

# 琥珀酸脱氢酶（SDH）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1109

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞和真菌

## 产品简介

琥珀酸脱氢酶（SDH；EC 1.3.5.1）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中。SDH 是线粒体的一种标志酶，位于线粒体内膜上的一种膜结合酶，是连接呼吸电子传递和氧化磷酸化的枢纽之一。此外，为多种原核细胞产能的呼吸链提供电子。本试剂盒提供了一种简单、方便、快速的 SDH 活性检测方法，其原理是 SDH 可以催化琥珀酸脱氢生成延胡索酸，脱下的氢通过吩嗪二甲酯硫酸（PMS）传递，从而还原 2,6-二氯酚（2,6-DCPIP），2,6-DCPIP 在 605nm 处具有特征吸收峰，通过检测 605nm 吸光度的变化测定 2,6-DCPIP 的还原速度，计算得到样本中 SDH 酶活性。

## 产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃保存
试剂二	10mL	20mL	4℃保存
试剂三	1mL	2mL	-20℃避光保存
试剂四	9mL	18mL	4℃保存
试剂五	0.5mL	1mL	-20℃避光保存

## 自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 605nm 处的吸光度）

96 孔板或微量比色皿、可调节式移液枪及枪头

水浴锅、制冰机，低温离心机

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

## 试剂准备

**注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。**

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃避光保存。

试剂四：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂五：即用型；整个实验过程中，冰上避光放置；分装-20℃避光保存。

## 样本制备

组织、细胞和真菌中胞浆蛋白与线粒体蛋白的提取：

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万个细胞，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂三，冰浴匀浆；
2. 离心匀浆液，600g，5min，4℃，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀；
3. 再次离心上清，11,000 g，10min，4℃，沉淀即为提取的线粒体，用作第 5 步操作；
4. 上清液即为胞浆提取物，可作为样本用于测定从线粒体泄漏的 SDH；

## 产品说明书

5. 在沉淀中加入 200 $\mu$ L 试剂二和 2 $\mu$ L 试剂三，充分重悬沉淀，用于下一步 SDH 活性检测。

**注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80 $^{\circ}$ C 保存 1 个月。测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。**

### 实验步骤

1. 酶标仪或分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 605nm。分光光度计去离子水调零。
2. 试剂四于 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ C（其它物种）孵育 10min。
3. 在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10 $\mu$ L 样本、180 $\mu$ L 试剂四和 10 $\mu$ L 试剂五，迅速混匀后于 605nm 检测，记录 1min 和 2min 的吸光值，分别记为  $A_1$  和  $A_2$ ，计算  $\Delta A=A_1-A_2$ 。

**注意：1. 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果  $\Delta A$  小于 0.001 可适当加大样本量；如果  $\Delta A$  大于 0.3，可用试剂二稀释样品，计算时结果乘以稀释倍数。**

**2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 25 $^{\circ}$ C（一般物种）或者 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）。**

**3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4-8 个样本），不推荐同时测多个样本。**

### 结果计算

#### A. 使用 96 孔板测定的计算公式

##### 1. 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯酚定义为一个酶活性单位。

SDH 上清活性(U/g 鲜重)=[ $\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ]  $\div$  ( $V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W$ )  $\div$  T=1923.8  $\times$   $\Delta A_{\text{上清}} \div W$

SDH 沉淀活性(U/g 鲜重)=[ $\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ]  $\div$  ( $V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W$ )  $\div$  T=384.76  $\times$   $\Delta A_{\text{沉淀}} \div W$

总 SDH 活性(U/g 鲜重)=SDH 上清活性+SDH 沉淀活性=1923.8  $\times$   $\Delta A_{\text{上清}} \div W$ +384.76  $\times$   $\Delta A_{\text{沉淀}} \div W$

##### 2. 按细胞或真菌数量计算：

单位的定义：每 1 万个细胞或真菌在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯酚定义为一个酶活性单位。

SDH 上清活性(U/ $10^4$  cells)=[ $\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ]  $\div$  ( $V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500$ )  $\div$  T=3.85  $\times$   $\Delta A_{\text{上清}}$

SDH 沉淀活性(U/ $10^4$  cells)=[ $\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ]  $\div$  ( $V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500$ )  $\div$  T=0.77  $\times$   $\Delta A_{\text{沉淀}}$

总 SDH 活性(U/ $10^4$  cells)=SDH 上清活性+SDH 沉淀活性=3.85  $\times$   $\Delta A_{\text{上清}}$ +0.77  $\times$   $\Delta A_{\text{沉淀}}$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：2,6-二氯酚摩尔消光系数，21 $\times 10^3$  mol/L/cm；d：96 孔板光径，0.5cm； $10^9$ ：1 mol=1 $\times 10^9$ nmol； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL；T：反应时间，1min； $\Delta A_{\text{上清}}$ ：上清测定值； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积，1.01mL；W：样品质量，g； $\Delta A_{\text{沉淀}}$ ：沉淀测定值； $V_{\text{样总}}$ ：加入试剂二和试剂三的总体积，0.202mL；500：细胞或真菌总数，500 万。

#### B. 使用微量比色皿进行测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d：0.5cm 调整为 d：1cm 进行计算即可。

### 注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

### 相关产品：

PMK1114 线粒体苹果酸脱氢酶 (MDHm) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1115 乳酸 (LA) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1116 丙酮酸 (PA) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

