

琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒 (微量法)
(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0208	琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒 (微量法)	100 管/96 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 100mL × 1 瓶	-20℃
试剂二	液体 20mL × 1 瓶	-20℃
试剂三	液体 1.5mL × 1 瓶	-20℃
试剂四	粉剂 × 1 瓶	-20℃
试剂五	粉剂 × 1 支	-20℃

一、产品说明

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。

SDH 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) 传递还原 2,6-二氯酚靛酚 (DCPIP), 并且在 600nm 处具有特征吸收峰, 通过 600nm 吸光度的变化, 测定 2, 6-DPIP 的还原速度, 代表 SDH 酶活性。

二、自备材料

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

三、样品准备

- 1、称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞, 加入 1mL 试剂一和 10 μ L 试剂三, 进行冰浴匀浆。
- 2、将匀浆液 4℃ 600g 离心 5min。
- 3、弃沉淀, 将上清液转移至另一离心管, 4℃ 11000g 离心 10min。
- 4、上清液即胞浆提取物, 可用于测定从线粒体泄漏的 SDH (此步可选做)。
- 5、向步骤 4 中的沉淀中加入 200 μ L 试剂二和 2 μ L 试剂三, 超声破碎 (冰浴, 功率 20% 或者 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 用于线粒体 SDH 酶活的测定。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 600nm, 蒸馏水调零。
- 2、在试剂四中加入 18mL 蒸馏水充分溶解, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min。用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
- 3、在试剂五中加入 1mL 蒸馏水, 充分溶解待用; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
- 4、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ L 样本、10 μ L 试剂五和 180 μ L 试剂四, 混匀,

立即记录 600nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 1min20s 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

五、酶活的计算

A. 用 96 孔板测定的计算公式如下:

1、按照组织蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1904 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按照样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 384 \times \Delta A \div W$$

3、按照细菌/细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ ceLL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.77 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数, 2.1×10^4 L / mol / cm;
d: 96 孔板光积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 0.202 mL; T: 反应时间, 1 min;
Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

B. 用石英比色皿测定的计算公式如下:

1、按照组织蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 952 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按照样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 192 \times \Delta A \div W$$

3、按照细菌/细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ ceLL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.385 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数, 2.1×10^4 L / mol / cm;
d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 0.202 mL;
T: 反应时间, 1 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。