

琥珀酸脱氢酶 (Succinate Dehydrogenase, SDH) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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。

需自备的仪器和用品：可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：50mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂二：10mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：1mL×1 支，-20℃保存；

试剂四：液体 5mL×1 瓶，4℃保存；

试剂五：粉剂×1 支，4℃保存，临用前加入 2mL 蒸馏水，用不完的试剂仍 4℃保存；

试剂六：粉剂×1 支，-20℃保存；临用前加入 2mL 蒸馏水，用不完的试剂 4℃保存。

样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

- 1、称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌或细胞，加入 1mL 试剂一和 10uL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆 600g，4℃离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃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)。

在步骤④的沉淀中加入 200uL 试剂二和 2uL 试剂三，超声波破碎 (冰浴，功率 20%或 200W，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次)，用于线粒体 SDH 活性测定。

测定步骤和加样表：

试剂名称 (μL)	测定管
试剂四	60
试剂五	30
蒸馏水	800

37℃(哺乳动物)或 25℃ (其它物种) 保温 10min 左右

样本	30
试剂六	30

用蒸馏水调零后，依次加各试剂到 1 mL 玻璃比色皿中，在加入试剂六的同时开始计时，混匀，在 600 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1 和 1 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

SDH 活性的计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

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。

$$\text{SDH 活性 (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 1508 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

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。

$$\text{SDH 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 304.6 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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。

$$\text{SDH 活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.609 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 9.5×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.03 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。