

琥珀酸脱氢酶(SDH)活性检测试剂盒（微量法）

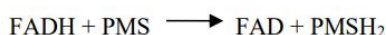
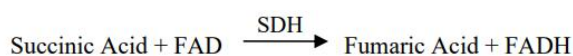
产品货号：BA1165

产品规格：100T/96S

产品简介：

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。

琥珀酸脱氢酶(SDH)催化琥珀酸氧化生成延胡索酸，脱下的氢经吩嗪二甲酯硫酸(PMS)介导，将2,6-二氯酚靛酚(DCPIP)还原为无色产物。由于DCPIP在600nm处具有特征吸收峰，其还原速率可通过吸光度下降来监测，从而反映SDH的酶活性。



注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体110mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体0.6mL×2支	-20℃
试剂三	液体18mL×1瓶	2-8℃
试剂四	液体1mL×1支	-20℃
试剂四稀释液	液体3mL×1瓶	2-8℃
试剂五	液体3mL×1瓶	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂二：为易挥发试剂，用完后尽快密封。
2. 试剂四：为易挥发试剂，用完后尽快密封。为高浓度试剂，每次加样前都需振荡混匀。
3. 试剂四工作液：根据样本量，临用前按照试剂四：试剂四稀释液=20μL：180μL(共200μL，10T)的比例配制，现用现配，当天用完。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、封板膜（2张）、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织样本：称取约0.1g组织，加入1mL试剂一和10μL试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4℃ 11000g离心10min，取上清，置冰上待测。
2. 细胞或者细菌样本：先收集500万细菌/细胞到离心管内，离心后弃上清；之后加入1mL试剂一和10μL试剂二，冰浴超声波破碎细菌（功率200W，超声3s，间隔7s，总时间5min）；然后11000g，4℃，离心10min，



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

取上清置于冰上待测。

注：也可根据样本量将试剂一和试剂二按 1mL: 10μL 的比例提前混合再进行样本提取(但是不可一次性全部混合，现用现配)

二、测定步骤

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 600nm，分光光度计用蒸馏水调零。
2. 使用前根据样本量将试剂三置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）预热 10min。
3. 样本测定（在 96 孔板/微量比色皿中加入下列试剂）：

试剂名称（μL）	测定管	空白管
样本	20	-
蒸馏水	-	20
试剂三	140	140
试剂四工作液	20	20
试剂五	20	20

充分混匀，立即测定 600nm 波长下 10s 时的初始吸光度 A1，然后迅速置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其他物种）反应 3min，测定 3min10s 时的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ ，得到 ΔA 测定、 ΔA 空白。空白管只需测 1-2 次。

注：(1)如果样本量过多，可根据样本量配制总工作液，临用前按照试剂三：试剂四工作液：试剂五=140μL：20μL：20μL(180L，1T)配制，现用现配。配制前提是试剂三已单独经过 37°C 预热，配制后立即使用，切勿长时间放置。

三、SDH 活性的计算

a.用微量比色皿测定的计算公式如下：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

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

$$\text{SDH 活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 158.730 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr$$

(2) 按样本质量计算：

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

$$\text{SDH 活性 (U/g 质量)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T$$

$$= 160.317 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W$$

(3) 按细菌或细胞数量计算：

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

$$\text{SDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times N) \div T$$

$$= 160.317 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div N$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯酚靛酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02mL；V 样总：加入试剂一和试剂二体积，1.01mL；T：反应时间，3min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌或细胞总数，以 10^9 计； 10^9 ：单位换算系数，1mol= 10^9 nmol。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

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

$$\text{SDH 活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 264.550 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr$$

(2) 按样本质量计算：

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



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

$$\text{SDH 活性 (U/g 质量)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T$$

$$= 267.196 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W$$

(3) 按细菌或细胞数量计算:

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

$$\text{SDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times N) \div T$$

$$= 267.196 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div N$$

V 反总: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{L}$; ϵ : 2,6-二氯酚靛酚摩尔消光系数, $2.1 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$; d: 比色皿光径, 0.6cm; V 样: 加入样本体积, 0.02mL; V 样总: 加入试剂一和试剂二体积, 1.01mL; T: 反应时间, 3min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细菌或细胞总数, 以 10^9 计; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

注意事项:

1. 测定过程中所有试剂(除预热试剂)和样本在冰上放置, 以免变性失活。
2. 若 ΔA 大于 1 (比色皿) / 0.6 (96 孔板), 需将酶液用蒸馏水稀释, 使 ΔA 小于 1/0.6, 可提高检测灵敏度; 若 ΔA 小于 0.01, 可增大操作表样本加入体积(同时调低试剂三体积)。注意同步修改计算公式。
3. 由于试剂一中含有一定浓度的蛋白(约 2mg/mL), 所以用同一提取液测定样本蛋白浓度时需要减去试剂一本身的蛋白含量。

实验案例:

样本	质量/细胞数量	测定 A1	测定 A2	空白 A1	空白 A2	SDH 活性	单位
兔肝脏	0.1003g	0.828	0.329	1.172	1.168	1318.664	U/g 质量
柳树叶片	0.1067g	1.074	0.986	1.172	1.168	211.341	U/g 质量
K562 细胞	$1000 \times 10^4 \text{cells}$	1.073	0.983	1.172	1.168	0.0230	U/ 10^4cells

注: 1. 样本均加入 1mL 试剂一和 10 μ L 试剂二进行前处理, 实验中未进行稀释;

2. 使用 96 孔板进行测定。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com