

琥珀酸脱氢酶(SDH)活性检测试剂盒说明书

Succinate Dehydrogenase Assay Kit

微量法

货号: AK109

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK109-A	100ml×1 瓶	-20℃保存
AK109-B	20ml×1 瓶	-20℃保存
AK109-C	1.5ml×1 支	-20℃保存
AK109-D	粉剂×1 支, 用时加入 18ml 蒸馏水充分溶解, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 水浴 10min	4℃保存
AK109-E	粉剂×1 支, 用时加入 1ml 蒸馏水充分溶解	-20℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 琥珀酸脱氢酶 (Succinate Dehydrogenase, 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。

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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、离心机、移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

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 AK109-A 和 10ul AK109-C, 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 AK109-B 和 2ul AK109-C, 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。

检测步骤:

试剂名称	测定管 (ul)
样本	10
AK109-E	10
AK109-D	180
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 $\Delta A = A1 - A2$	

计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照蛋白浓度计算

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。

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

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。

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

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。

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

注： 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，0.01 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 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按照蛋白浓度计算

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。

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

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。

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

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。

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

注： 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：96 孔板光径，0.5cm；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。