

琥珀酸脱氢酶(SDH)活性检测试剂盒说明书

Succinate Dehydrogenase Assay Kit

分光光度法

货号: AK108

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK108-A	50ml×1 瓶	-20℃保存
AK108-B	10ml×1 瓶	-20℃保存
AK108-C	1ml×1 支	-20℃保存
AK108-D	5ml×1 瓶	4℃保存
AK108-E	粉剂×1 支, 临用前加入 2ml 蒸馏水	4℃保存
AK108-F	粉剂×1 支, 临用前加入 2ml 蒸馏水	-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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1ml 玻璃比色皿、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 AK108-A 和 10ul AK108-C, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆 600g, 4℃离心 5min, 弃沉淀, 留上清。
3. 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4℃离心 10min, 得到上清液和沉淀。
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. 在步骤 3 的沉淀中加入 200ul AK108-B 和 2ul AK108-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)
AK108-D	60
AK108-E	30
蒸馏水	800
37℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)保温 10min 左右	
样本	30
AK108-F	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 AK108-F 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 $\Delta A=A1-A2$

计算公式:

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。

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

$$= 1508 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

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

$$= 304.6 \times \Delta A \div W$$

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。

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

$$= 0.609 \times \Delta A$$

注: $V_{\text{反总}}$: 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; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.03 mL; $V_{\text{样总}}$: 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。

注意事项:

测定过程中所有试剂和样本在冰上放置, 以免变性失活。