

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

（货号：BP10402W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

琥珀酸脱氢酶（SDH, EC 1.3.5.1）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中。在真核生物中，结合于线粒体内膜，在原核生物中整合于细胞膜上，是连接呼吸电子传递和氧化磷酸化的枢纽之一。

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 吸光度值的变化得出 SDH 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 120mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 30mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 0.5mL×1 支	-20℃避光保存	
试剂四	粉体 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 20mL 蒸馏水溶解（观察液体为蓝色），可分装保存。
试剂五	粉剂 4 支	-20℃避光保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 0.4mL 蒸馏水溶解； 3. 现配现用，两天内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以免造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

1.1 线粒体制备（提示：整个线粒体的提取过程须保持 4℃低温环境）：

称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL 试剂一，用冰浴匀浆器或研钵匀浆，转移至离心管后于 4℃×700g 离心 10min。弃沉淀，上清液移至另一离心管中，4℃×12000g 离心 10min。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），沉淀为线粒体。在沉淀（线粒体）中加入 200μL 试剂二和 2μL 试剂三，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10 秒，重复 30 次），液体置于冰上用于线粒体中琥珀酸脱氢酶（SDH）活性测定。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取，或按照细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/真菌数量（10⁴ 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例提取

1.2 原核生物（细菌）样本提取：

先收集细菌到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌加入 1mL 试剂二，超声波破碎细菌（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ 10^4 ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

1.3 液体样本：澄清的液体样本直接检测，若浑浊则于 12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 600nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
试剂四	180
试剂五	10
样本	50
混匀，室温（25℃）下，10s 时立即于 600nm 处读取 A1，5min 后读取 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

【注】若 ΔA 差值较小，可以延长反应时间 T（如增至 15min 或更长），或加大样本量 V1（如增至 70μL），则改变后的反应时间 T 和样本体积 V1 代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、线粒体制备样本的计算公式：

- ① 按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟使 A600 变化 0.005 定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性(U/g 鲜重)} = \Delta A \div 0.005 \div (W \times V1 \div V) \div T = 161.6 \times \Delta A \div W$$

- ② 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟使 A600 变化 0.005 定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性(U/mg prot)} = \Delta A \div 0.005 \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 800 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、原核生物（细菌）样本的计算公式：

- ① 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟使 A600 变化 0.005 定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性(U/mg prot)} = \Delta A \div 0.005 \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 800 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

- ② 按细菌数量计算：

酶活定义：每 1 万个细菌每分钟使 A600 变化 0.005 定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性(U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div 0.005 \div (500 \times V1 \div V2) \div T = 1.6 \times \Delta A$$

3、液体样本的计算公式：

- ① 按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体样本每分钟使 A600 变化 0.005 定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性(U/mL)} = \Delta A \div 0.005 \div V1 \div T = 800 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积，0.05 mL；

V---加入提取液体积，0.202 mL；

V2---细菌的提取液体积，1mL；

T---反应时间，5 min；

W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。