琥珀酸脱氢酶（SDH)检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1109

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/48S 96T/96S

适用样本：动植物组织、细胞和真菌

产品简介

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。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。本试剂盒提供了一种简单、方便、快速的 SDH 活性检测方法，其原理是 SDH 可以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，从而还原 2,6-二氯靛酚(2,6-DCPIP)，2,6-DCPIP 在 605nm 处具有特征吸收峰，通过检测 605nm 吸光度的变化测定 2,6-DCPIP 的还原速度，计算得到样本中 SDH 酶活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃保存
试剂二	10mL	20mL	4℃保存
试剂三	1mL	2mL	-20℃避光保存
试剂四	9mL	18mL	4℃保存
试剂五	0.5mL	1mL	-20℃避光保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 605nm 处的吸光度）
96 孔板或微量比色皿、可调节式移液枪及枪头
水浴锅、制冰机，低温离心机
去离子水
匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。
试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃避光保存。
试剂四：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
试剂五：即用型；整个实验过程中，冰上避光放置；分装-20℃避光保存。

样本制备

组织、细胞和真菌中胞浆蛋白与线粒体蛋白的提取：
1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万个细胞，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂三，冰浴匀浆；
2. 离心匀浆液，600g，5min，4℃，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀；
3. 再次离心上清，11,000 g，10min，4℃，沉淀即为提取的线粒体，用作第 5 步操作；
4. 上清液即为胞浆提取物，可作为样本用于测定从线粒体泄漏的 SDH；

5.在沉淀中加入 200μL 试剂二和 2μL 试剂三，充分重悬沉淀，用于下一步 SDH 活性检测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。

实验步骤

1. 酶标仪或分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 605nm。分光光度计去离子水调零。
2. 试剂四于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 10min。
3. 在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10μL 样本、180μL 试剂四和 10μL 试剂五，迅速混匀后于 605nm 检测，记录 1min 和 2min 的吸光值，分别记为 A_1 和 A_2，计算 $\Delta A=A_1-A_2$。

注意：1.实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果ΔA 小于 0.001 可适当加大样本量；如果ΔA 大于 0.3，可用试剂二稀释样品，计算时结果乘以稀释倍数。

2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）。

3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4-8 个样本），不推荐同时测多个样本。

结果计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式

1. 按样本鲜重计算：

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

SDH 上清活性(U/g 鲜重)=[$\Delta A_{上清}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times10^9$]÷($V_{样}\div V_{提取}\times W$)÷T=1923.8×$\Delta A_{上清}$÷W

SDH 沉淀活性(U/g 鲜重)=[$\Delta A_{沉淀}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times10^9$]÷($V_{样}\div V_{样总}\times W$)÷T=384.76×$\Delta A_{沉淀}$÷W

总 SDH 活性(U/g 鲜重)=SDH 上清活性+SDH 沉淀活性=1923.8×$\Delta A_{上清}$÷W+384.76×$\Delta A_{沉淀}$÷W

2. 按细胞或真菌数量计算：

单位的定义：每 1 万个细胞或真菌在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯靛酚定义为一个酶活性单位。

SDH 上清活性(U/10^4 cells)=[$\Delta A_{上清}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times10^9$]÷($V_{样}\div V_{提取}\times500$)÷T=3.85×$\Delta A_{上清}$

SDH 沉淀活性(U/10^4 cells)=[$\Delta A_{沉淀}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times10^9$]÷($V_{样}\div V_{样总}\times500$)÷T=0.77×$\Delta A_{沉淀}$

总 SDH 活性(U/10^4 cells)=SDH 上清活性+SDH 沉淀活性=3.85×$\Delta A_{上清}$+0.77×$\Delta A_{沉淀}$

$V_{反总}$：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：2,6-二氯靛酚摩尔消光系数，21×10^3 mol/L/cm；d：96 孔板光径，0.5cm；10^9：1 mol=1×10^9nmol；$V_{样}$：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，1min；$\Delta A_{上清}$：上清测定值；$V_{提取}$：加入提取液体积，1.01mL；W：样品质量，g；$\Delta A_{沉淀}$：沉淀测定值；$V_{样总}$：加入试剂二和试剂三的体积，0.202mL；500：细胞或真菌总数，500 万。

B. 使用微量比色皿进行测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d：0.5cm 调整为 d：1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1114 线粒体苹果酸脱氢酶（MDHm）检测试剂盒（微量法）

PMK1115 乳酸（LA）检测试剂盒（微量法）

PMK1116 丙酮酸（PA）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：