

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

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

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。

测定原理

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。

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、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

试剂一: 100mL×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂二: 20mL×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂三: 1.5mL×1 支, -20℃ 保存;

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂五: 粉剂×1 支, -20℃ 保存;

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 万细胞, 加入 1mL 试剂一和 10uL 试剂三, 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)。
- 5、在步骤④的沉淀中加入 200uL 试剂二和 2uL 试剂三, 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。

测定步骤和加样表

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 600nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定

(1) 在试剂四中加入 18mL 蒸馏水充分溶解, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融;

(2) 在试剂五中加入 1mL 蒸馏水, 充分溶解待用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融;

(3) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μL 样本、10 μL 试剂五和 180 μL 试剂四, 混匀, 立即记录 600nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 1min20s 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

SDH 活性的计算

a.用微量石英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。

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

(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。

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

(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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

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。