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

（货号：G0856F 分光法 48 样）

一、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。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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 60mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 15mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 0.5mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂四	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加 30mL 蒸馏水溶解（观察液体为蓝色）。
试剂五	粉剂×3 支	-20℃避光保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，每支再加 0.6mL 蒸馏水溶解，现配现用，两天内用完。

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、可调式移液器、低温离心机、研钵。

四、琥珀酸脱氢酶(SDH)活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

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）：

① 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。

② 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。

③ 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，或按照细菌/细胞数量（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

1.2 原核生物（细菌）样本制备：

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。

2、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 600nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
试剂四	590
试剂五	30
样本	80
混匀，室温（25℃）下，10s 时立即于 600nm 处读取 A1，5min 后读取 A2，△A=A1-A2。	

【注】若△A 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 120μL），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。

SDH 活性（U/mg prot）＝ΔA÷0.005÷(V1×Cpr) ÷T=500×ΔA÷Cpr

② 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。

SDH 活性（U/g 鲜重）＝ΔA÷0.005÷(W× V1÷V)÷T=101×ΔA÷W

③ 按细胞密度计算

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

SDH 活性（U/10^4 cell）＝ΔA÷0.005÷(500×V1÷V)÷T=0.202×ΔA

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。

SDH 活性（U/mg prot）＝ΔA÷0.005÷(V1×Cpr) ÷T=500×ΔA÷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。

SDH 活性（U/10^4 cell）＝ΔA÷0.005÷(500×V1÷V2)÷T=ΔA

V1---加入样本体积，0.08mL； 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，500 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。