

琥珀酸脱氢酶（SDH）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0950

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	-20℃保存
试剂二	液体 0.6 mL×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 3mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 3mL×1 瓶	2-8℃保存

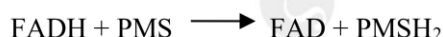
溶液的配制：

1、试剂二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20℃保存。

产品说明：

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。

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-DCPIP的还原速度，代表SDH酶活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4℃ 11000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 细胞或者细菌样本：先收集 500 万细菌/细胞到离心管内，离心后弃上清；之后加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂二，冰浴超声破碎细菌（功率 200W，超声 3s，间隔 7s，总时间 5min）；然后 11000g，4℃，离心 10 min，





取上清置于冰上待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min以上，调节波长至600nm，蒸馏水调零。
- 2、使用前根据样本量将试剂三置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）预热10min。
- 3、样本测定（在1mL玻璃比色皿中加入下列试剂）：

试剂名称（μL）	测定管	空白管
试剂三	850	850
试剂四	50	50
样本	50	-
蒸馏水	-	50
试剂五	50	50

充分混匀，立即测定600nm波长下20s时的初始吸光度A1，然后迅速置于37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）反应5min，测定5min20s时的吸光度A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ ，得到 ΔA 测定、 ΔA 空白。空白管只需测1-2次。

三、SDH 活性的计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 190.476 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

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

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

$$= 192.381 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

(3) 按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

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

$$= 192.381 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div N$$

V反总：反应体系总体积， $1 \times 10^{-3} \text{L}$ ； ϵ ：2,6-二氯酚靛酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.05mL；V样总：加入试剂一和试剂二体积，1.01mL；T：反应时间，5min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌或细胞总数，以 10^4 计； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

注意事项：

- 1、测定过程中所有试剂（除预热试剂）和样本在冰上放置，以免变性失活。
- 2、若 ΔA 大于0.6，需将酶液用蒸馏水稀释，使 ΔA 小于0.6，可提高检测灵敏度。计算公式中乘以稀释倍数。
- 3、由于试剂一中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以测定样本蛋白浓度时需要减去试剂一本身的蛋白含量（约1mg/mL）。

实验实例：



- 1、取 0.1040 大鼠肾脏加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂二，用冰浴匀浆器匀浆充分研磨，4℃11000g 离心 10min，取上清置冰上。按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定 = A_1 测定 - A_2 测定 = $1.071 - 0.845 = 0.226$ ， ΔA 空白 = A_1 空白 - A_2 空白 = $1.180 - 1.180 = 0$ ，按样本质量计算酶活得：
SDH 活性 (U/g 质量) = $192.381 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W = 418.059 \text{ U/g 质量}$ 。

相关发表文献：

- [1] Jiang Y, Cao S, Zhou B, Cao Q, Xu M, Sun T, Zhao X, Zhou Z, Wang Y. Hemocytes in blue mussel *Mytilus edulis* adopt different energy supply modes to cope with different BDE-47 exposures. *Sci Total Environ.* 2023 Aug 10;885:163766. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.163766. Epub 2023 May 3. PMID: 37146804.
- [2] Xue Z, Zhong S, Shen J, Sun Y, Gao X, Wang X, Li F, Lu L, Liu X. Multiple Mutations in SDHB and SDHC2 Subunits Confer Resistance to the Succinate Dehydrogenase Inhibitor Cyclobutrifluram in *Fusarium fujikuroi*. *J Agric Food Chem.* 2023 Mar 1;71(8):3694-3704. doi: 10.1021/acs.jafc.2c08023. Epub 2023 Feb 19. PMID: 36802617.
- [3] Zhang YH, Yang SS, Zhang Q, Zhang TT, Zhang TY, Zhou BH, Zhou L. Discovery of N-Phenylpropiolamide as a Novel Succinate Dehydrogenase Inhibitor Scaffold with Broad-Spectrum Antifungal Activity on Phytopathogenic Fungi. *J Agric Food Chem.* 2023 Mar 1;71(8):3681-3693. doi: 10.1021/acs.jafc.2c07712. Epub 2023 Feb 15. PMID: 36790098.
- [4] Sun S, Chen L, Huo J, Wang Y, Kou S, Yuan S, Fu Y, Zhang J. Discovery of Novel Pyrazole Amides as Potent Fungicide Candidates and Evaluation of Their Mode of Action. *J Agric Food Chem.* 2022 Mar 23;70(11):3447-3457. doi: 10.1021/acs.jafc.2c00092. Epub 2022 Mar 13. PMID: 35282681.
- [5] Chen W, Wei L, Li X, Ma H, Lou T, Zhang P, Zheng H, Zhu X, Zhang Y, Liu F, Chen C, Yang G. Point Mutations in FgSdhC2 or in the 5' Untranslated Region of FgSdhC1 Confer Resistance to a Novel Succinate Dehydrogenase Inhibitor Flubeneteram in *Fusarium graminearum*. *J Agric Food Chem.* 2021 Nov 10;69(44):13006-13019. doi: 10.1021/acs.jafc.1c04363. Epub 2021 Nov 1. PMID: 34723519.

参考文献：

- [1] Cimen H, Han MJ, Yang Y. et al. Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(2): 304-311.

相关系列产品：

- BC0710/BC0715 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒
BC2150/BC2155 柠檬酸 (CA) 含量检测试剂盒
BC0380/BC0385 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒

