

## 琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法)

产品编号	产品名称	包装
S0530S	琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法)	100次

### 产品简介:

- 碧云天研发的琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法) (Succinate Dehydrogenase Activity Assay Kit, Colorimetric), 简称SDH检测试剂盒(Succinate Dehydrogenase Assay Kit or SDH Assay Kit), 是一种用比色法, 快速、高灵敏地对组织、细胞或分离的线粒体中琥珀酸脱氢酶活性进行检测的试剂盒。
- 本试剂盒与Merck (Sigma-Aldrich)公司的Succinate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit (MAK197)检测原理和检测方法基本一致。
- 琥珀酸脱氢酶(Succinate dehydrogenase, SDH), 也称琥珀酸-辅酶Q还原酶(Succinate-coenzyme Q reductase, SQR)、呼吸链复合体II (Respiratory complex II), 是位于线粒体内膜上的一种多亚基膜结合酶, 属于黄素类的细胞色素氧化酶。SDH由2个亲水性亚基和2个疏水性膜锚定亚基组成, 是连接氧化磷酸化与电子传递的枢纽之一, 可为真核细胞线粒体和多种原核细胞需氧和产能的呼吸链提供电子。SDH可催化琥珀酸氧化为延胡索酸(Fumarate), 并将电子直接从FADH<sub>2</sub>传递至辅酶Q (Coenzyme Q, CoQ), 通过三羧酸循环(Tricarboxylic acid cycle, TAC)和电子传递链来维持细胞的能量代谢。因此, SDH是反应线粒体活性的标志酶之一, 其活性一般可作为评价三羧酸循环运行程度的指标。SDH的突变可导致遗传性副神经节瘤/嗜铬细胞瘤综合征和一种被称为利氏综合征的神经退行性疾病[1-3], 因此检测SDH对于临床相关疾病的诊断、预防和治疗等具有重要意义。
- 本试剂盒的检测原理如图1所示。琥珀酸脱氢酶催化琥珀酸(Succinate)脱氢生成延胡索酸, 通过人工电子受体吩嗪二甲酯硫酸盐(5-Methylphenazinium methosulfate, PMS)递氢将蓝色的2,6-二氯酚钠(2,6-Dichloroindophenol sodium salt hydrate, DCIP)还原, DCIP在600nm处具有特征吸收峰, 通过吸光度的变化即可测定DCIP的还原速度, 进而间接反映琥珀酸脱氢酶的活性。样品中琥珀酸脱氢酶的活性越高, 被还原的DCIP则越多, 剩余的蓝色的DCIP就越少, 琥珀酸脱氢酶的活性与反应体系中残留的DCIP成反比。



图1. 碧云天琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法) (S0530)检测原理示意图。

- 本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。**本试剂盒在样品体积为50μl时可以检测活力浓度低至0.6U/L的琥珀酸脱氢酶, 在0.67-66.7U/L活力范围内有良好的线性关系。本试剂盒内提供了标准品DCIP (100mM), 可以通过设置标准曲线(图2), 从而间接计算出样品中琥珀酸脱氢酶的活性。

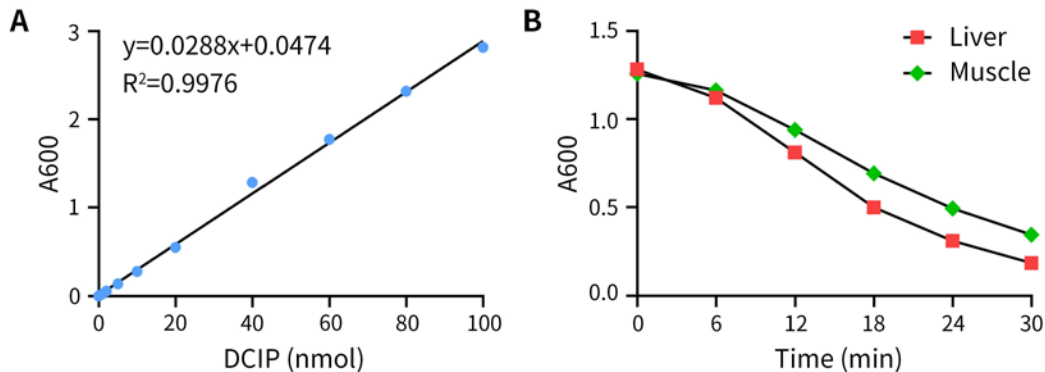


图2. 碧云天琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法) (S0530)对DCIP标准品和小鼠不同组织样品的检测效果。左图为本试剂盒对标准品DCIP的检测效果, 在0-100nmol范围内有良好的线性关系; 右图为80μg小鼠肌肉样品和90μg小鼠肝脏样品使用本试剂盒在反应30分钟内的信号变化图。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。**使用本试剂盒中的BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品, 也可以用于碧云天生产的其它代谢类试剂盒中同样使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay进行裂解的样品检测, 通用性强; 而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。

- **本试剂盒使用灵活，检测速度快，适用范围广。**本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆等生物体液、细胞培养上清以及组织、细胞或线粒体等样品的检测，全程约1小时即可完成。本试剂盒不仅适合少量样品的检测，也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。
- 用于96孔板检测时，本试剂盒小包装可以进行100次检测。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
S0530S-1	BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay	25ml
S0530S-2	SDH Assay Buffer	20ml
S0530S-3	DCIP (100mM)	100μl
S0530S-4	SDH Substrate	120μl
S0530S-5	SDH Probe	100μl
—	说明书	1份

#### 保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中DCIP (100mM)、SDH Probe须-20°C避光保存。

#### 注意事项：

- BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay和SDH Assay Buffer需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。DCIP (100mM)冻融可能会有析出、且易沉降，使用前须37°C水浴约5分钟，并充分混匀后再使用。其它试剂在使用时应在冰上进行。
- 血清等样品如果在4°C保存，保存时间不得超过1周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜在-20°C保存，-80°C保存更佳。
- 本试剂盒仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明：

##### 1. 样品的准备。

- 血液样品的准备。对于血清样品，将全血在常温如25°C下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素或者EDTA进行抗凝，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要触及白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20°C或-80°C。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。
- 细胞或组织样品的准备。对于培养的贴壁细胞，PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如100-500×g，5分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100-200μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例加入裂解液，适当吹打，冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。对于组织样品，按照每10mg组织加入100μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例，使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600/E6607)或玻璃匀浆器在约4°C或冰浴等低温条件下进行匀浆。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4°C或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20°C或-80°C冻存。
- 细胞培养上清样品的准备。对于贴壁细胞，直接取培养液上清；对于悬浮细胞，离心取培养液上清。
- 线粒体样品准备。建议从新鲜组织和细胞中分离线粒体。推荐使用碧云天细胞线粒体分离试剂盒(C3601)和组织线粒体分离试剂盒(C3606)。

##### 2. 试剂盒的准备。

- 融解BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay和SDH Assay Buffer，平衡至室温后混匀备用。DCIP (100mM) 37°C水浴约5分钟，使其充分融解。其它试剂存放于冰浴备用，使用完毕后立即按照试剂盒要求的条件保存。
- SDH检测工作液的配制：按照每个检测需要50μl SDH检测工作液的体积配制适量的SDH检测工作液。均匀混合47.5μl SDH Assay Buffer、1μl SDH Substrate、0.5μl DCIP (100mM)、1μl SDH Probe，即可配制成50μl SDH检测工作液(SDH Assay Working Solution)。根据待检测样品的数量，配制适量的SDH检测工作液。具体配制方法参考下表。配制好的SDH检测工作液如果置于4°C或冰浴避光保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。

Sample Number	1	10	20
SDH Assay Buffer (μl)	47.5	475	950
DCIP (100mM) (μl)	0.5	5	10
SDH Substrate (μl)	1	10	20
SDH Probe (μl)	1	10	20
<b>SDH Assay Working Solution (μl)</b>	<b>50</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>

注1：由于DCIP (100mM)和SDH Probe的用量较少且易沉降，特别是DCIP (100mM)，在使用前务必先轻轻涡旋再离心一

下，并充分混匀后再使用。

**注2:** 与电子供体PMS发生氧化还原反应的物质的存在会对琥珀酸脱氢酶的检测产生干扰，此时须同时设置背景对照孔，加入不含SDH Substrate的SDH检测工作液，即配制SDH检测工作液时1 $\mu$ l SDH Substrate用SDH Assay Buffer替代。更加理想的方式是把样品通过脱盐柱进行脱盐处理，去除其中可能干扰检测的代谢小分子，这样仅使用试剂盒提供的SDH底物，就能更准确地检测出样品中的SDH酶活性了。脱盐柱推荐使用BeyoDesalt™ G-25 Spin脱盐柱(P2613)。

### 3. DCIP标准曲线的设置。

取4 $\mu$ l DCIP (100mM)，加入196 $\mu$ l SDH Assay Buffer，混匀，配制成200 $\mu$ l浓度为2mM的DCIP标准溶液，再分别取0、0.5、1、2.5、5、10、20、30、40、50 $\mu$ l的2mM DCIP标准溶液加入96孔板的标准品孔中，并用SDH Assay Buffer补足至50 $\mu$ l，此时，DCIP标准曲线的各孔DCIP浓度和物质的量分别为0、0.02、0.04、0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2mM和0、1、2、5、10、20、40、60、80、100nmol。

### 4. 样品测定。

a. 取1-50 $\mu$ l步骤1制备的样品或稀释后的样品至96孔板样品孔中，并相应的加入SDH Assay Buffer至样品孔中，补足至50 $\mu$ l。同时设置仅含SDH Assay Buffer的孔为空白对照孔。

**注:** 为确保数值在标准曲线范围内，建议进行预实验将样品设置多个稀释倍数，以确定样品中琥珀酸脱氢酶的大致活性。如果数值不在标准曲线范围内，可调整样品的稀释倍数或者样品的量。此处的样品总稀释倍数记为n (例如本步骤中对样品进行了10倍稀释，加入的‘稀释后的样品’为25 $\mu$ l，则n=10 $\times$ 50/25=20)。

b. **样品孔各孔**加入50 $\mu$ l SDH检测工作液，**标准品孔各孔**加入50 $\mu$ l SDH Assay Buffer，混匀。

c. 立即使用适当的酶标仪测定A600，此时记录为0分钟读值为A<sub>1</sub>。

d. 25°C反应10-30分钟，反应时间记录为T，测定A600，记为A<sub>2</sub>。信号的变化值取决于琥珀酸脱氢酶催化消耗的DCIP的量，即 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

**注:** 为取得最佳的检测结果，反应时间可以根据待测样品中琥珀酸脱氢酶的活性进行调整，但是必须确保读数在标准曲线范围内。对于琥珀酸脱氢酶活性较高的样品，建议测定总时间为20分钟或30分钟，对应的测定间隔时间设为2分钟或5分钟；对于琥珀酸脱氢酶活性较低的样品，可以延长测定总时长为1小时，对应的测定间隔时间设为10或20分钟。也可以连续测定30分钟，每隔1或2分钟测定1次，最后取呈线性的时间点前的数据用于分析和计算。

### 5. 计算。

a. 标准品和样品的吸光度均需减去空白对照孔吸光度以纠正背景值。

b. 建立DCIP标准曲线。将 $\Delta A$ 值代入标准曲线，即可算出在反应时间内样品中琥珀酸脱氢酶催化消耗的DCIP量，记为Sa。如果样品背景对照孔信号比较高，样品的信号值需要减去样品背景对照值。由DCIP标准曲线(图2)可知，在0-100nmol范围内有良好的线性关系。

c. SDH活性的计算公式如下： $SDH \text{ Activity (nmol/min/}\mu\text{l或mU/}\mu\text{l或U/ml)} = Sa \times n / (\Delta T \times Sv)$ 。

**注:** Sa为步骤5b中根据标准曲线确定的DCIP的减少量(nmol)；

n为步骤4a中样品总稀释倍数；

$\Delta T$ 为步骤4d中的反应时间(min)；

Sv为步骤4a中的样品孔总体积(Sv=50 $\mu$ l)；

琥珀酸脱氢酶活力单位的定义：一个酶活力单位(unit, U)在25°C、pH7.2的条件下，1分钟内可以催化1.0 $\mu$ mol DCIP。

计算示例：

Sa=26.28nmol (根据 $\Delta A$ 值和标准曲线计算所得)，n=1

$\Delta T$ =30min

Sv=50 $\mu$ l

SDH Activity (nmol/min/ $\mu$ l or mU/ $\mu$ l)=26.28nmol / (30min $\times$ 50 $\mu$ l) = 0.0175

### 参考文献：

1. Kim HJ, Winge DR. Biochim. Biophys. Acta, 2013. 1827(5):627-636.
2. Rutter J, Winge DR, Schiffman JD. Mitochondrion. 2010. 10(4):393-401.
3. Bardella C, Pollard PJ, Tomlinson I. Biochim Biophys Acta. 2011. 1807(11):1432-1443.

### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0016/C0017	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	100次/500次
C0018	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8 法)	100次/500次
C0019	乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(WST-8 法)	100次/500次
S0110S	黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0111S	黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(WST-8 法)	100次
S0112	Amplex Red 黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒	100次/500次
S0113S	Amplex Red 黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒	100次
S0114S	黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0183S	果糖-6-磷酸检测试剂盒(WST-8 法)	100次

S0185	G6P 检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0187S	磷酸葡萄糖异构酶活性检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0189	G6PDH 活性检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0201	葡萄糖检测试剂盒(O-toluidine 法)	200次/1000次
S0202S	葡萄糖检测试剂盒(显色法)	100次
S0204S	D-乳酸检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0208S	L-乳酸检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0211	Amplex Red 胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒	100次/500次
S0215	Amplex Red 游离脂肪酸检测试剂盒	100次/500次
S0219	Amplex Red 甘油三酯检测试剂盒	100次/500次
S0223	Amplex Red 甘油检测试剂盒	100次/500次
S0227S	Amplex Red L-乳酸检测试剂盒	100次
S0231S	Amplex Red 尿酸与尿酸酶检测试剂盒	100次
S0235S	Amplex Red 磷酸盐检测试剂盒	100次
S0239S	Amplex Red 乙醇检测试剂盒	100次
S0240S	乙醇检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0241S	乙醇脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0243	Amplex Red 黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒	100次/500次
S0247S	Amplex Red 谷氨酸与谷氨酸氧化酶检测试剂盒	100次
S0251S	Amplex Red 过氧化氢与过氧化物酶检测试剂盒	100次
S0255S	Amplex Red 过氧化氢酶检测试剂盒	100次
S0259S	Amplex Red 单胺氧化酶检测试剂盒	100次
S0263S	Amplex Red 鞘磷脂酶检测试剂盒	100次
S0267S	Amplex Red 胆碱与乙酰胆碱检测试剂盒	100次
S0271S	Amplex Red 乙酰胆碱酯酶检测试剂盒	100次
S0275S	Amplex Red 磷脂酰胆碱检测试剂盒	100次
S0279S	Amplex Red 磷脂酶 D 检测试剂盒	100次
S0283S	Amplex Red 肌酸检测试剂盒	100次
S0287S	Amplex Red 肌酸激酶检测试剂盒	100次
S0291S	Amplex Red 肌酐检测试剂盒	100次
S0295S	Amplex Red 肌氨酸检测试剂盒	100次
S0299S	Amplex Red 丙酮酸检测试剂盒	100次
S0303S	Amplex Red 丙酮酸激酶检测试剂盒	100次
S0307S	Amplex Red ADP 检测试剂盒	100次
S0311S	Amplex Red 磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒	100次
S0315S	Amplex Red 丙氨酸检测试剂盒	100次
S0319S	Amplex Red 丙氨酸转氨酶检测试剂盒	100次
S0323S	Amplex Red $\alpha$ -酮戊二酸检测试剂盒	100次
S0327S	Amplex Red 天冬氨酸检测试剂盒	100次
S0331S	Amplex Red 天冬氨酸氨基转移酶检测试剂盒	100次
S0335S	Amplex Red 柠檬酸检测试剂盒	100次
S0339S	Amplex Red 草酰乙酸检测试剂盒	100次
S0343S	Amplex Red 葡萄糖检测试剂盒	100次
S0347S	Amplex Red 葡萄糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0351S	Amplex Red 果糖检测试剂盒	100次
S0355S	Amplex Red 乳糖检测试剂盒	100次
S0359S	Amplex Red 半乳糖与乳糖检测试剂盒	100次
S0363S	Amplex Red 半乳糖与半乳糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0367S	Amplex Red 麦芽糖检测试剂盒	100次
S0371S	Amplex Red 麦芽糖与葡萄糖检测试剂盒	100次
S0375S	Amplex Red 糖原检测试剂盒	100次
S0379S	Amplex Red 磷酸果糖激酶检测试剂盒	100次

S0383S	Amplex Red 乙酰辅酶 A 检测试剂盒	100次
S0387S	Amplex Red 辅酶 A 检测试剂盒	100次
S0391S	Amplex Red 乙酰辅酶 A 合成酶检测试剂盒	100次
S0511S	L-苹果酸检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0514S	苹果酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0517S	延胡索酸检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0520S	延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0523S	异柠檬酸检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0526S	异柠檬酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0529S	Amplex Red 琥珀酸检测试剂盒	100次
S0530S	琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0532S	Amplex Red 琥珀酰辅酶 A 合成酶检测试剂盒	100次
S0535S	支链氨基酸检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0538S	N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0540S	酪氨酸检测试剂盒(显色法)	100次
S0542S	酪氨酸酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0545S	酪氨酸酶抑制剂筛选试剂盒(显色法)	100次
S0547S	髓过氧化物酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0548S	Amplex Red 髓过氧化物酶活性检测试剂盒	100次
S0550S	Amplex Red 髓过氧化物酶抑制剂筛选试剂盒	100次
S0554S	葡萄糖摄取检测试剂盒(WST-8 法)	100次
S0556S	葡萄糖摄取检测试剂盒(DTNB 法)	100次
P0321	碱性磷酸酶检测试剂盒	100次/500次
P0322S	碱性磷酸酶检测试剂盒(荧光法)	100次/500次
P0326	酸性磷酸酶检测试剂盒	120次
P0327	酸性磷酸酶检测试剂盒(荧光法)	100次/500次
P0329	胎盘碱性磷酸酶检测试剂盒	100次
P0332	抗酒石酸酸性磷酸酶检测试剂盒	120次
P0335	抗氟离子酸性磷酸酶检测试剂盒	120次
P0392S	D-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8 法)	100次
P0393S	L-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8 法)	100次
P0395S	总乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8 法)	100次
P0401S	糖化酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
P0405S	$\alpha$ -淀粉酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
P0421S	细胞色素 C 氧化酶活性检测试剂盒(显色法)	100次

Version 2024.11.07