

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K649-M

产品规格: 48T(46 samples)/96T(94 samples)

检测仪器: 酶标仪(590-610 nm)

Elabscience®琥珀酸脱氢酶(SDH)比色法测试盒

Succinate Dehydrogenase (SDH) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织及细胞样本中琥珀酸脱氢酶(SDH)的活力。

检测原理

琥珀酸脱氢酶是一种结合于线粒体内膜的酶复合物，是连接呼吸电子传递和氧化磷酸化的枢纽之一。SDH 缺乏会导致神经代谢紊乱、肿瘤形成等疾病。

SDH 催化琥珀酸脱氢生成延胡索酸，同时电子传递物质将电子传递给 2,6-二氯酚靛酚(DCPIP)，随之还原型 DCPIP 被还原成氧化型 DCPIP，该还原产物在 600 nm 处具有特征吸收峰，通过 600nm 处吸光度的下降的变化来计算 SDH 酶活性。

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 A (Buffer Solution A)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 B (Buffer Solution B)	15 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	抑制剂 (Inhibitor)	0.8 mL×1 支	0.8 mL×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 A (Substrate A)	1.2 mL×1 支	1.2 mL×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 B (Substrate B)	1.2 mL×1 支	1.2 mL×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	底物 C (Substrate C)	0.6 mL×1 支	1.2 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		

	样本位置标记表	1 张	
--	---------	-----	--

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(590-610 nm，最佳波长 600 nm)

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)或 PBS(0.01 M，pH 7.4)

试剂准备

- ① 检测前，所有的试剂平衡至室温。
- ② 工作液配制：

按试剂一：试剂四：试剂五：试剂六=14：2：2：1的体积比混匀，现配现用，按需配制，避光保存，当天使用完毕。

样本准备

① 样本处理

组织样本：取 0.1 g 新鲜组织样本，用 2-8°C 的生理盐水(0.9% NaCl)漂洗，滤纸吸干，称重，放入匀浆容器中，然后加入 0.9 mL 试剂一和 10 μL 试剂三进行机械匀浆，4°C，600 × g 离心 5 min 取上清弃沉淀。4°C，15000 × g 离心 10 min，沉淀即为提取的线粒体。沉淀加入 200 μL 试剂二和 2 μL 试剂三混匀，超声 5 min，4°C，15000 × g 条件下离心 10 min。取上清于冰盒上待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取收集好的细胞 2×10^6 个细胞加入 400 μL 试剂一和 4 μL 试剂三混匀，匀浆，4°C，600 × g 离心 5 min，取上清弃沉淀。然后 4°C，15000 × g 离心 10 min，沉淀即为提取的线粒体，向沉淀中加入 200 μL 试剂二和 2 μL 试剂三混匀。超声 5 min，4°C，15000 × g 条件下离心 10 min。取上清冰盒上待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.83-65.42 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肝组织	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释
10%大鼠心组织	不稀释	10%小鼠肾组织	不稀释
10%大鼠肾组织	不稀释	10%小鼠心组织	不稀释

注：稀释液为试剂二。

实验关键点

- ① 匀浆样本上清需当天进行测定。
- ② 按照说明书规范对部分试剂进行避光保存。
- ③ 建议一次实验检测样本数控制在 8 个样本内。

操作步骤

- ① 空白孔：向酶标板对应空白孔中加入 20 μL 试剂二。
测定孔：向酶标板对应测定孔中加入 20 μL 样本。
- ② 向步骤①各酶标孔加入 190 μL 工作液。
- ③ 振板 5 s，立即于酶标仪 600 nm 波长处测定 OD 值记为 A_1 。室温静置 3 min，再次测定各酶标孔 OD 值记为 A_2 ， $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

注：建议一次实验检测样本数控制在 8 个样本内。

操作表

	空白孔	测定孔
待测样本(μL)	--	20
试剂二(μL)	20	--
工作液(μL)	190	190
振板 5 s，立即于酶标仪 600 nm 波长处测定 OD 值记为 A_1 。室温静置 3 min，再次测定各酶标孔 OD 值记为 A_2 ， $\Delta A = A_1 - A_2$ 。		

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

组织及细胞中琥珀酸脱氢酶(SDH)活力计算公式:

定义: 室温条件下, 每克组织或细胞蛋白每分钟水解底物生成 1 μmol 产物所需要的 SDH 酶量为一个酶活力单位。

$$\text{SDH 活力 (U/gprot)} = \frac{(\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \times V_{\text{总}} \times f}{V_{\text{样}} \times 21.8^* \times T \times C_{\text{pr}}} \times 1000^*$$

注解:

$\Delta A_{\text{空}}$: 空白孔变化 OD 值($A_1 - A_2$)

$\Delta A_{\text{测}}$: 测定孔变化 OD 值($A_1 - A_2$)

f: 样本加入检测体系之前的稀释倍数

$V_{\text{总}}$: 反应体系的总体积 (mL), 0.21 mL

$V_{\text{样}}$: 加入样本的体积 (mL), 0.02 mL

21.8*: 摩尔吸光系数

C_{pr} : 样本蛋白浓度 gprot/L

T: 反应时间 3 min

1000*: 1 mmol/L=1000 $\mu\text{mol/L}$

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.83-65.42 U/L	平均批间差	4.0 %
灵敏度	0.83 U/L	平均批内差	2.0 %
平均回收率	105%		

附录2 实例分析

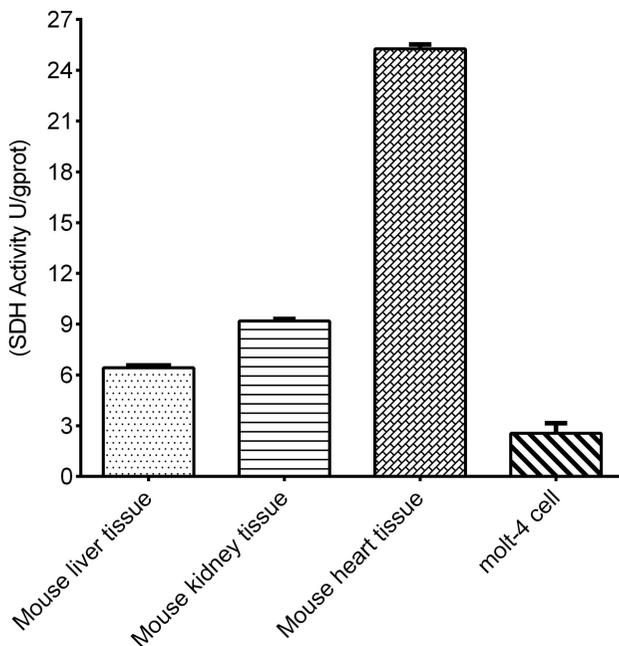
例如检测小鼠肾组织样本(数据仅供参考):

取20 μL 10%的小鼠肾组织匀浆, 按操作表操作, 结果如下:

空白孔初始OD值 A_1 为1.358, 3 min时的测定值 A_2 为1.355; 测定孔初始OD值 A_1 为1.000, 3 min时的测定值 A_2 为0.382, 10%小鼠肾组织匀浆的蛋白浓度为11.20 gprot/L, 计算结果为:

$$\text{SDH 活力 (U/gprot)} = \frac{[(1.000-0.382) - (1.358 - 1.355)] \times 0.21}{0.02 \times 21.8 \times 3 \times 11.20} \times 1000 = 8.82 \text{ U/gprot}$$

按照说明书操作, 测定小鼠肝(10%匀浆蛋白浓度为12.51 gprot/L, 加样量20 μL)、小鼠肾(10%匀浆蛋白浓度为11.20 gprot/L, 加样量20 μL)、小鼠心(10%匀浆蛋白浓度为3.10 gprot/L, 加样量20 μL)及molt-4细胞(蛋白浓度为0.79 gprot/L, 加样量20 μL)中的SDH酶活(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本中酶活较低	增加样本的浓度
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. *Nano Today*. IF:18.962
2. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. *Metabolism Open*, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
3. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022. IF:7.573
4. Carafa V, Russo R, Della Torre L, et al. The Pan-Sirtuin Inhibitor MC2494 Regulates Mitochondrial Function in a Leukemia Cell Line[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 820. IF:4.848
5. Sun J, Leng P, Li X, et al. Salvianolic acid A promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes through regulation of the AMPK-PGC1 α signalling pathway. *Adipocyte*. 2022;11 (1):562-571. IF:3.553
6. Xu X, Cui Y, Li C, et al. SETD3 Downregulation Mediates PTEN Upregulation-Induced Ischemic Neuronal Death Through Suppression of Actin Polymerization and Mitochondrial Function. *Mol Neurobiol*. 2021; 58 (10):4906-4920. IF:3.464
7. Gao S, Li N, Chen R, et al. Bushen Huoxue Formula Modulates Autophagic Flux and Inhibits Apoptosis to Protect Nucleus Pulposus Cells by Restoring the AMPK/SIRT1 Pathway. *Biomed Res Int*. 2022; 2022:8929448. IF:3.047
8. Cheng F, Yu J, Zhang X, et al. CircSEC31A Promotes the Malignant Progression of Non-Small Cell Lung Cancer Through Regulating SEC31A Expression via Sponging miR-376a[J]. *Cancer Management and Research*, 2020, Volume 12:11527-11539. IF:2.886
9. Soebagjo H D, Fatmariyanti S, Paulus Sugianto N, et al. Detection of the Calcium and ATP Role in Apoptosis of Retinoblastoma Culture Cells through Caspase-3 Expression[J]. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2019, 12(03): 1307-1314.
10. Al-Ziaydi A G, Al-Shammari A M, Hamzah M I, et al. Newcastle disease virus suppress glycolysis pathway and induce breast cancer cells death[J]. *VirusDisease*, 2020: 1-8.

