

琥珀酸脱氢酶 (SDH) 测试盒说明书

(货号: A022-1-1 50 管/48 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

琥珀酸脱氢酶 (SDH) 催化底物反应, FAD 是该反应的辅基, FAD 被还原成 FADH, 该反应与 2,6-DPIP 的还原相偶联, 测定 2,6-DPIP 的还原速度可以推算出 SDH 的活力。

二、试剂盒组成与试剂配制: (试剂盒有效期 3 个月)

- 试剂一: 液体 60mL×2 瓶, 4℃ 冷藏;
- 试剂二: 液体 6mL×1 瓶, 避光 4℃ 冷藏;
- 试剂三: 液体 6mL×1 瓶, 避光 4℃ 冷藏;
- 试剂四: 液体 6mL×2 瓶, 避光 4℃ 冷藏;
- 试剂五: 液体 6mL×1 瓶, 避光-20℃ 冷藏, 如需多次使用, 建议将试剂五分装后冷冻保存, 避免反复冻融;
- 试剂六: 液体 6mL×1 瓶, 4℃ 冷藏。

工作液的配制: 按试剂一:试剂二:试剂三:试剂四:试剂五:试剂六=2 : 0.1 : 0.1 : 0.2 : 0.1 : 0.1 的比例进行配制, 用多少配多少, 现用现配, 配好后一定要避光。

三、所需仪器及试剂:

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿, 37℃ 水浴锅, 涡旋混匀器, 秒表, 蛋白测定试剂 (组织样本用, 本公司有售)。

四、样本前处理:

组织样本: 准确称取组织重量, 按重量 (g): 体积 (mL) =1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测 (同时取部分上清液测定蛋白浓度, 蛋白定量试剂盒本公司有售)。

细胞样本: 收集细胞后, 每份细胞 (细胞数量尽量不要低于 10⁶ 个, 越多越好) 加入 0.3mL 的生理盐水, 冰水浴下超声破碎 (功率 200-300W, 运行 5 秒, 间隔 15 秒, 反复 3-5 分钟), 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清液 (上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售) 待测。

血清 (浆): 取不抗凝或抗凝全血 1000~1500 转/分, 离心 8 分钟, 取上层血清 (浆) 待测。

五、操作步骤:

1、操作表

	测定管
待测样本 (mL)	0.1
工作液 (mL)	2.6
立即混匀并计时, 迅速倒入比色皿中在可见分光光度计 600nm 处比色, 10 秒时读取吸光度值 (A ₁ 值), 在 1 分 10 秒时再次测定吸光度值 (A ₂ 值), 计算 ΔA=A ₁ -A ₂	

2、详细操作步骤:

- a、将可见分光光度计于 600nm 处, 1cm 光径比色皿, 以双蒸水调零 (比色皿准备两只, 一只用于调零, 一只用于测定)。
- b、将工作液 37℃ 避光预温 5 分钟以上。
- c、往相应编号的试管中加入 100μL 待测样本, 用 5mL 移液器吸取 2.6mL 工作液迅速冲入试管中, 立即混匀并计时。
- d、迅速倒入比色皿中在可见分光光度计 600nm 处比色, 10 秒时读取吸光度值 (A₁ 值), 在 1 分 10 秒时再次测定吸光度值 (A₂ 值);
- e、求出 2 次吸光度差值 (ΔA=A₁-A₂)。

注意点:

- ①、工作液一定要避光保存, 测定过程中工作液同样要避光;
- ②、比色皿必须用自来水冲洗干净, 再用双蒸水洗 2~3 次后, 才能对下一个样本进行检测;
- ③、在比色皿中加完样后, 下一步加试剂与按秒表需同步;
- ④、在比色皿中加完试剂后, 必须快速放入分光光度计的比色槽中;
- ⑤、试剂二、试剂三、试剂四、试剂五必须避光冷藏;
- ⑥、配好的混合试剂在测定前必须预温。

六、计算:

1、组织中琥珀酸脱氢酶活力的计算:

①、定义: 每毫克蛋白每分钟使反应体系的吸光度降低 0.01 为 1 个比活性单位。

②、计算公式:

$$\text{SDH活力 (U/mgprot)} = \frac{\Delta A \div 0.01}{T} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr})$$

2、血清中琥珀酸脱氢酶活力的计算:

①、定义: 每毫升血清每分钟使反应体系的吸光度降低 0.01 为 1 个比活性单位。

②、计算公式:

$$\text{SDH活力 (U/mL)} = \frac{\Delta A \div 0.01}{T} \div V_{\text{样}}$$

T: 反应时间, 1 分钟;

V_样: 样本加入量, 0.1mL;

Cpr: 待测样本蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。