

## 冰冻切片 NADH 心肌黄酶活性染色试剂盒产品说明书

### 主要用途

冰冻切片 NADH 心肌黄酶活性染色试剂是一种旨在使用人工电子受体染料二甲基噻唑二苯基四唑嗅蓝 (MTT)，受到 NADH 心肌黄酶催化还原，产生不溶性蓝黑色色素沉淀，来分析冰冻组织样品中酶活性的权威而经典的技术方法。该技术经过精心改良传统方法、成功实验证明的。主要适用于动物组织细胞的心肌黄酶活性定性检测。产品严格无菌，即到即用，操作简捷，性能稳定，显色清晰。

### 技术背景

心肌黄酶 (Diaphorase)，又称为硫辛酰胺脱氢酶 (lipoamide dehydrogenase)，黄递酶，二氢硫辛酰胺脱氢酶 (dihydrolipoamide dehydrogenase)，二氢硫辛酸脱氢酶 (dihydrolipoyl dehydrogenase) 等。因早期从猪心肌中提取，产品又呈现荧光的黄绿色蛋白质，故被称为心肌黄酶。分子量 102000 至 110000。NADH 心肌黄酶直接和黄素蛋白 (Flavoprotein) 反应，释放出氢原子，将氧化型黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 还原为还原型黄素腺嘌呤二核苷酸 (FADH<sub>2</sub>)，传递氢原子给氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD)，而形成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)，作为电子供体，还原人工电子受体，例如染料四氮唑兰 (tetrazolium) 化合物，包括硝基蓝四氮唑 (Nitro Blue Tetrazolium; NBT) 和二甲基噻唑二苯基四唑嗅蓝 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; MTT)，产生不溶性甲臞色素，由此用于鉴别内脏神经组织等各种动物组织。

### 产品内容

清理液 (Reagent A)	100 毫升
染色液 (Reagent B)	10 毫升
反应液 (Reagent C)	1 毫升
固着液 (Reagent D)	10 毫升
产品说明书	1 份

### 保存方式

保存染色液 (Reagent B) 和反应液 (Reagent C) 在 -20℃ 冰箱里，避免光照；其余的保存在 4℃ 冰箱里，有效保证 6 月

### 用户自备

- 1.5 毫升离心管：用于工作液配制的容器
- 培养箱：用于反应孵育
- 中性树脂：用于切片封片
- 光学显微镜：用于切片染色后观察分析

## 实验步骤

染色开始前，将-20℃冰箱里的试剂置于室温下融化；移取 900 微升**染色液（Reagent B）**到新的 1.5 毫升离心管，加入 100 微升**反应液（Reagent C）**，混匀后，标记为**染色工作液**，置于冰槽里，避免光照。然后进行下列操作。

1. 取出待测的 10 微米厚的冰冻组织切片
2. 小心加上 200 微升**清理液（Reagent A）**在切片上，铺满整个样品表面
3. 小心移去切片上的**清理液（Reagent A）**
4. 小心加上 200 微升 **染色工作液**，铺满整个切片样品表面
5. 放进 37℃培养箱里孵育 30 分钟，避免光照
6. 小心移去切片上的**染色工作液**
7. 小心加上 200 微升**清理液（Reagent A）**在切片上，铺满整个切片样品表面
8. 小心移去切片上的**清理液（Reagent A）**
9. 重复实验步骤 6 至 8 二次
10. 小心加上 200 微升**固着液（Reagent D）**在切片上，铺满整个切片样品表面
11. 室温下孵育 15 分钟
12. 小心移去切片上的**固着液（Reagent D）**
13. 小心加上 200 微升**清理液（Reagent A）**在切片上，铺满整个切片样品表面
14. 小心移去切片上的**清理液（Reagent A）**
15. 重复实验步骤 12 至 14 二次
16. 放上盖玻片或封片（中性树脂）
17. 即刻在光学显微镜下观察和计数：表达 NADH 心肌黄酶的组织细胞为阳性组织细胞，呈现蓝黑色

## 注意事项

1. 本产品为 50 次操作
2. 操作时，须戴手套
3. **反应液（Reagent C）**避免反复冻融
4. 阴性对照时，**染色工作液**不含有**反应液（Reagent C）**
5. 心肌组织可以用于阳性对照
6. 每次更换试剂溶液时，保持切片面基本晾干
7. 试剂溶液在切片表面时，避免有气泡存在，同时确保铺满切片表面
8. 整个操作，在避光状态下进行
9. 染色孵育时间，根据样品和酶活性强弱调整，通常为 5 至 60 分钟
10. 染色完成后，即刻进行光学显微镜观察
11. 样品染色后保存，避免光照
12. 染色参考图像见下图



13. 本公司提供 NADH 心肌黄酶活性 NBT 染色试剂产品

14. 本公司提供系列组织细胞酶活性染色试剂产品

### **质量标准**

1. 本产品经鉴定性能稳定
2. 本产品经鉴定显色清晰