

神经HRP 示踪显色液(TMB 法)

产品简介:

上个世纪 70 年代, Kristensopn 和 Olsson 报道了 HRP 可神经末梢摄取, 经轴浆逆行运输至神经元胞体, 经组织化学方法可显示出神经元的轮廓, 从而开发出 HRP 追踪神经元示踪技术, 即为 HRP 法。3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)是非常优越的酶免试验显色剂, 能溶解于多种有机溶剂和双蒸水中, 为稳定的无色溶液, 与适量过氧化脲或双氧水与缓冲液混匀后, 与过氧化物酶作用产生清晰的蓝色产物, 极易观察, 在辣根过氧化物酶的催化下,TMB会产生蓝色沉淀, 该沉淀不溶于水和乙醇, 显色后呈蓝色, 可在显微镜下观察。

神经 HRP 示踪显色液(TMB 法)是动物经麻醉、注入 HRP 后, 游离或络合型的 HRP 与氧化剂反应生成络合物, 该络合物氧化 TMB 显色剂, 呈蓝色, 在显微镜下清晰可见, 该检测法较 DAB 法灵敏。该显色液仅用于科研领域, 不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

名称 \ 编号	ADS022K0 50T	Storage
试剂(A): TMB Assay Buffer	500ml	4°C 避光
试剂(B): TMB 显色液	15ml	4°C 避光
试剂(C): TMB 增强剂	2×1ml	4°C
试剂(D): TMB Wash Buffer(20×)	100ml	RT
使用说明书	1 份	

操作步骤(仅供参考):

(一)准备工作

- 1、动物麻醉: 多用(3.5%)戊巴比妥钠、速眠宁或 10%水合氯醛等作为麻醉剂, 对于戊巴比妥钠大鼠的麻醉剂量为 0.25~0.35ml/100g。
- 2、导入 HRP: 有压力注射法、电泳法以及周围神经系统的注射涂抹等法。
- 3、确定动物存活期。
- 4、动物灌注: 麻醉后, 经左心室升主动脉插管行心内灌注固定; 先用生理盐水或 PBS 快速灌注; 随后用 4%的多聚甲醛固定液灌注, 先快后慢, 时间控制在 30~40min; 最后用 10%蔗糖磷酸缓冲液(pH7.2~7.4)灌注。
- 5、取材: 取组织置于 20%的蔗糖磷酸盐缓冲液中, 切片厚度 40μm, 存于蔗糖磷酸盐缓冲液备用。

(二)显色反应

- 1、配制TMB 孵育液：取适量的TMB Assay Buffer 和 TMB 显色液，按 TMB Assay Buffer: TMB 显色液=39:1 的比例混合，即为 TMB 孵育液，即配即用，不宜保存。
- 2、配制 1×TMB Wash Buffer：取适量的 TMB Wash Buffer(20×)，按 TMB Wash Buffer: 蒸馏水=1:19 的比例混合，即为 1×TMB Wash Buffer，室温保存，6 月有效。
- 3、切片用蒸馏水清洗 3 次，每次 2min。
- 4、切片入 10ml TMB 孵育液(提前 20°C温育)，避光孵育 20min，其间不断晃动。
- 5、将切片取出，配制 TMB 显色工作液：在用过的 TMB 孵育液中直接加入 TMB 增强剂，按 TMB 孵育液: TMB 增强剂=2000 ~ 8000: 1 的比例混合(具体比例应根据具体实验摸索确定)，即为 TMB 显色工作液，即配即用，不宜保存。
- 6、重新将切片浸入刚配置好的 TMB 显色工作液，20°C温育，避光孵育 20min，不断晃动。
- 7、漂洗：取 10ml 左右的 1×TMB Wash Buffer 漂洗切片 2~3 次，每次 5min。
- 8、贴片，载玻片用铬明矾明胶包被，室温空气干燥。
- 9、脱水、透明步骤按如下操作：
 - ①蒸馏水 10s；②70%乙醇 10s；③95%乙醇 10s；④100%乙醇 2 次，每次 10s；⑤二甲苯或脱蜡透明液 2 次，每次 2~5min。
- 10、中性树胶封片，显微镜下观察蓝色反应。

注意事项：

- 1、如果出现高的反应背景或沉淀，表明 TMB 底物反应过于强烈。
- 2、TMB 显色工作液配置后会出现蓝色絮状颗粒，属于正常现象，使用时需要不断晃动，避免颗粒沉着于切片上，影响后续的观察。
- 3、所用器皿必须洁净，避免含有氧化剂或还原剂，否则会产生非特异性反应。
- 4、TMB 显色液避免反复冻融，TMB 增强剂注意密闭保存，以免显色效率下降。
- 5、Wash Buffer 有挥发性气体，因此使用完要拧紧瓶盖，防止挥发失效。
- 6、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：12 个月内；4°C运输，4°C保存。