

神经 HRP 示踪显色液(DAB 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。DAB 即 3,3N-Diaminobenzidine Tertrahydrochloride, 是辣根过氧化物酶的常用底物, 在辣根过氧化物酶的催化下,DAB会产生棕色沉淀, 该棕色沉淀不溶于水和乙醇, 显色后呈棕色, 可在显微镜下观察。

神经 HRP 示踪显色液(DAB 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, 该络合物氧化供氢的 DAB 显色剂, 呈棕色, 在显微镜下清晰可见。该试剂仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成

名称 \ 编号	ADS023K0 50T	Storage
试剂(A): DAB Assay Buffer	2×500ml	RT 避光
试剂(B): DAB 显色液	30ml	-20℃ 避光
试剂(C): DAB 增强剂	2×1ml	4℃ 避光
试剂(D): DAB 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%)戊巴比妥钠作为麻醉剂, 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(pH7.4)。
- 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 DAB 孵育液: 取适量的 DAB Assay Buffer 和 DAB 显色液, 按 DAB Assay Buffer:

- DAB 显色液=39:1 的比例混合，即为 DAB 孵育液，即配即用，不宜保存。
- 2、配制 DAB 显色工作液：取适量的 DAB 孵育液和 DAB 增强剂，按 DAB 孵育液：DAB 增强剂=2000~8000：1 的比例混合(具体比例应根据具体时间摸索确定)，即为 DAB 显色工作液，即配即用，不宜保存。
 - 3、配制 1×DAB Wash Buffer：取适量的 DAB Wash Buffer(20×)，按 DAB Wash Buffer：蒸馏水=1:19 的比例混合，即为 1×DAB Wash Buffer；室温保存，6 月有效。
 - 4、切片用蒸馏水清洗 3 次，每次 2min。
 - 5、切片入 10ml DAB 孵育液(提前 20℃温育)，避光孵育 20min，其间不断晃动。
 - 6、切片入 10ml DAB 显色工作液(提前 20℃温育)，避光孵育 20min，其间不断晃动。
 - 7、漂洗：取 10ml 左右的 1×DAB 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透明 2 次，每次 2~5min。
 - 10、中性树胶封片，显微镜下观察棕色反应。

注意事项

- 1、如果出现高的反应背景或沉淀，表明 DAB 底物反应过于强烈。
- 2、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。
- 3、DAB 显色液避免反复冻融，以免显色效率下降。
- 4、DAB 增强剂注意密闭保存，否则显色效率下降。
- 5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 6、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期：12个月内。低温运输，按要求保存。