

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。

Leagene 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	DK0045 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 避光
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 Leagene 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。
- 7、试剂开封后请尽快使用, 以防影响后续实验效果。

有效期: 12 个月内有效; 低温运输, 按要求保存。

相关产品:

产品编号	产品名称
DC0032	Masson 三色染色液
DF0135	组织细胞固定液(4% PFA)
DZ2011	环保浸蜡脱蜡透明液
PS0013	RIPA 裂解液(强)
TC0713	葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 比色法)