



神经 HRP 示踪显色试剂盒(TMB 法)

Neural HRP tracer chromogenic kit (TMB method)

产品货号： S0200

产品规格： 50T

保存条件： 2-8℃避光保存，有效期 12 个月。

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，该络合物氧化供氢的 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。

本产品仅用于科研领域，不用于临床诊断。

产品组成：

名称	规格	50T	Storage
S0200 (A): TMB assay buffer		500ml	4℃ 避光
S0200 (B): TMB 显色液		15ml	4℃ 避光
S0200 (C): TMB 增强剂		2×1ml	4℃
S0200 (D): TMB Wash buffer(20×)		100ml	RT

使用方法：

(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(pH7.4)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 TMB 显色工作液: 取适量的 TMB 孵育液和 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时间摸索确定), 即为 TMB 显色工作液, 即配即用, 不宜保存。
3. 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。
4. 切片用蒸馏水清洗 3 次, 每次 2min。
5. 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。
6. 切片入 10ml TMB 显色工作液(提前 20°C 温育), 避光孵育 20min, 其间不断晃动。
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、中性树脂封片, 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. 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. TMB 显色液避免反复冻融, 以免显色效率下降。
4. TMB 增强剂注意密闭保存, 否则显色效率下降。