

神经HRP示踪显色液 (TMB法)

产品货号: R23106

产品规格: 50T/100T

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。

尚宝神经 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:

产品名称	50T	100T	保存条件
试剂(A): TMB Assay buffer	500ml	1000ml	4℃, 避光
试剂(B): TMB显色液	15ml	30ml	4℃, 避光
试剂(C): TMB增强剂	2×1ml	2×2ml	4℃
试剂(D): TMB Wash buffer(20×)	100ml	200ml	室温

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 40 μ m, 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℃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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

6. 重新将切片浸入刚配置好的 TMB 显色工作液，20℃ 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 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个月内有效。4℃ 运输，4℃ 保存。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>