# 产品简介：

**神经 HRP 示踪显色液(TMB 法)**

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，不适量过氧化脲或双氧水不缓冲液混匀后，不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 不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。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：** |  |  |
|  | 50T |
| 试剂(A): TMB assay buffer | 2×500ml | RT 避 光 |
| 试剂(B): TMB 显色液 | 30ml | -20℃ 避 光 |
| 试剂(C): TMB 增强剂 | 2×1ml | RT |
| 试剂(D): TMB Wash buffer(20×) | 100ml | RT |

**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 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℃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℃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、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。

**有效期：** 12 个月内有效。