



## 神经 HRP 示踪显色液(TMB 法)

### 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。

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。

### 组成:

名称	编号	R20631 50T	Storage
试剂(A): TMB Assay Buffer		500ml	4℃ 避光
试剂(B): TMB 显色液		15ml	4℃ 避光
试剂(C): TMB 增强剂		2×1ml	4℃
试剂(D): TMB Wash Buffer(20×)		100ml	RT
说明书		一份	

### 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 40 $\mu$ 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 $\times$ TMB Wash Buffer: 取适量的 TMB Wash Buffer(20 $\times$ ), 按 TMB Wash Buffer: 蒸馏水=1:19 的比例混合, 即为 1 $\times$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 温育, 避光孵育 20min, 不断晃动。

7、漂洗: 取 10ml 左右的 1 $\times$ 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:



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: [shyysw@sina.com](mailto:shyysw@sina.com)

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 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。