

伊文思蓝染色液（1%）

说明书

名 称	伊文思蓝染色液（1%）
英 文	Evans Blue Stain（1%）
货 号	CSP198
规 格	100mL
保 存	2-8℃, 避光保存 12 个月
用 途	仅供科研使用

【产品描述】

伊文思蓝 (Evans Blue) 又称偶氮蓝，分子式 $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$ ，分子量为 960.80，CAS 号为 314-13-6。伊文思蓝属于一种常用的偶氮染料制剂，因其分子量大小与血浆白蛋白相近，而且在血液中与血浆白蛋白有很高的亲和力，因此在神经科学研究中常被用于示踪观察血脑屏障 (BBB) 的完整性，也用于细胞染色区分活细胞、死细胞，亦可测定血容量。伊文思蓝作临床药物用于测定血浆和血容量，也可作动脉插管的定位。正常情况下血浆白蛋白无法透过血脑屏障，所以染色后如果神经系统血脑屏障完整，与血浆白蛋白结合的依文思蓝无法使其着色，相反如果神经系统血脑屏障被破坏，依文思蓝就可以进入神经系统并使其着色，在荧光波长 470nm、540nm 处有强峰，680 nm 处有弱峰，可以使用化学透析法和比色法进行检测。

伊文思蓝与台盼蓝都是细胞活性染料，常用于检测细胞膜的完整性和细胞是否存活；活细胞不会被染成蓝色，而死细胞会被染成淡蓝色，伊文思蓝染色后通过显微镜下直接计数或显微镜下拍照后计数，就可以对细胞存活率进行比较精确的定量，其中 0.5% 为最常用的浓度；活细胞因有外排功能而无法被伊文思蓝染色，因此可以通过此方法在显微镜下区分死细胞与活细胞，但无法区分死亡与坏死。该试剂仅用于科研领域，不用于临床诊断或其他用途。

【准备工作】

注射器、组织匀浆器；PBS、三氯乙酸或丙酮。

【操作说明】-仅供参考

使用前, 将 Evans Blue Stain(1%) 用 PBS 稀释成 Evans Blue Stain(0.5%)。

(一) 血脑屏障通透性

1、取处理后的实验动物(以小鼠为例), 经尾静脉或股静脉按照 2~3ml/kg 的比例 Evans Blue Stain(0.5%) 数秒至 1 分钟内, 小鼠眼睛、皮肤出现蓝色, 0.5~1h 后处死小鼠, 取目的脑组织。

2、脑组织置于 1.5ml 离心管中, 加入 1ml PBS, 迅速用组织匀浆器将脑组织制成匀浆, 1000g 离心 15min。

3、取上清, 加入等量三氯乙酸, 4℃孵育 18~24h; 该步骤亦可采用如下操作: 取上清, 按上清: 丙酮=3:7 比例加入丙酮, 室温孵育 24h。

4、1000g 离心 20~30 min 或 2000g 离心 15min。

5、取上述溶液 1~2ml, 用分光光度计测 620 nm 处吸光值(OD 值), 同时测定已知不同梯度的标准依文思蓝的 OD 值, 绘制标准曲线, 根据标准曲线计算出待测待测样品的依文思蓝含量。

(二) 活细胞染色

1、取 100 μl 重悬细胞到常规 1.5ml 或 0.5ml 离心管内, 入 100 μl Evans Blue Stain(0.5%) 轻轻混匀, 染色 3min(染色时间可适当延长, 但不宜超过 10min)。

2、吸取少量经过染色后的细胞, 用血细胞计数板计数。通常如果要比较精确地进行定量, 每个细胞样品至少数 500 个细胞, 数出蓝色细胞和细胞总数。

计算公式如下:

$$\text{细胞存活率} = (\text{细胞总数} - \text{蓝色细胞数}) / \text{细胞总数} \times 100\%$$

(三) 种子染色

1、用刀片做横切和沿种胚中央准确纵切, 入染色液染色 3~5min。

2、蒸馏水中浸泡 20~60min, 视脱色程度而定。

【注意事项】

- 注意无菌操作，避免污染；
- Evans Blue Stain (1%) 对人体有轻微毒性，为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 细胞染色时，注意凋亡小体偶尔也有拒染现象；
- 血脑屏障通透性实验中，Evans Blue Stain (0.5%) 注射量应根据不同动物以及动物的重量调整；
- 最好采用低温冷冻离心机进行离心；
- 仅供科研使用。