

外泌体荧光染料（DiR）

Cat NO: IME-M003

产品描述

DiD, DiO, DiI, DiR 和 DiS 染料是一族亲脂性的荧光染料，可以用来染细胞膜和其它脂溶性生物结构。当与细胞膜结合后其荧光强度大大增强，这类染料有着很高的淬灭常数和激发态寿命。一旦对细胞染色，这类染料在整个细胞膜上扩散，最佳浓度时可以使整个细胞膜染色。它们的荧光颜色区分明显：DiI(橙色荧光)，DiO(绿色荧光)，DiD(红色荧光)和 DiR (深红色荧光)这使得他们可以用来对活细胞进行多色成像和流式分析。DiR（ex/em= 748/780 nm）在活体成像或者示踪中非常有用，因为它们所发射的红外光可以高效地穿过细胞和组织，并且在红外光范围内，其本底荧光水平很低。

适用范围

本说明书适用于 DiR 外泌体或细胞标记等相关信息，请严格参照说明书操作。

运输和存储条件

- （1）运输条件：冰袋运输，国内现货 2~3 天即可送达。
- （2）储存条件：-20℃避光储存。

产品组成信息

表 1. 试剂盒组成信息

产品货号	产品名称	产品规格	储存
IME-M003	DiR	200 μL	-20℃， 6 个月
	100kD 超滤管	10 Tubes	常温，2 年

操作流程

一、染料工作液制备

用合适的缓冲液(如：无血清培养基，HBSS 或 PBS)稀释储存液，配制浓度为 1~5 μM 的工作液。

注意：工作液的最终浓度是根据不同细胞和实验的经验来配制。可以从推荐浓度的十倍以上寻找最佳条件，此外，未使用的储存液保存在-20℃，**避免反复冻融**。

二、外泌体染色

1、在外泌体（建议浓度 $\geq 1 \times 10^{10}$ particles/mL）悬液中加入染料工作液，建议染料终浓度为1~5 μ M（需预实验确定，避免过量导致毒性）。

2、加入染料工作液后将离心管盖紧，通过涡旋振荡器混匀 1 min，再放置于 37℃ 孵育30 min（避免高温破坏外泌体膜）。

3、向孵育后的外泌体染料复合物中加入适量 1×PBS 混匀，超过 0.5mL 时分批次进行离心。

4、转移至 100kDa MWCO（截留分子量）的过滤柱中，在高速离心机中以 3000g 离心 10 分钟，PBS 洗涤 2 次，**彻底去除**未结合的染料，最后将体积减少至 50~100 μ L。

5、从超滤柱中回收浓缩液，将其保存在微量离心管中并至于冰上，尽快使用标记的外泌体，以确保最高的荧光强度。

三、体内示踪

将 100 μ L DiR 标记的外泌体（约 10^{10} particles）通过尾静脉注射（全身分布研究）或局部注射小鼠，在不同时间点（如 0、1、2、4、6、24 小时）拍摄荧光图像，成像结束后，处死小鼠并取出主要器官（如肝、脾、肺、肾、心），对器官进行离体荧光成像，分析外泌体的分布。

注意事项

（1）体外追踪实验：PKH 26（激发/发射波长 551/567 nm）适合短时（<72 小时）观察，但可能干扰膜流动性。体内长时追踪：选择近红外染料（如 DiR，激发/发射 750/780 nm），穿透力强且背景低。

（2）由于外泌体染色效率难以达到 100%和在去游离染料过程中无法避免外泌体的损失，建议制备 2 倍于活体成像或示踪实验所需外泌体量以进行染料标记。

（3）染料工作液应现配现用，不能提前配制，否则将影响染色效果。

（4）仅用于科学研究。

常见问题

（1）标记效率低

现象：流式检测信号弱或荧光显微镜下外泌体无荧光。

可能原因：染料浓度不足或孵育时间过短。

解决方案：建议用于染料标记的外泌体原始浓度大于 0.5~1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，或梯度测试染料浓度（如 1 μM 、2 μM 、5 μM ）。

（2）高背景噪音

现象：流式细胞术或荧光成像中出现大量非特异性信号。

可能原因：游离染料未彻底去除。

解决方案：使用超速离心去除游离染料，延长超滤离心时间或 PBS 多洗几次。

（3）外泌体聚集或破裂

现象：电镜下外泌体聚集成团或膜结构不完整。

可能原因：染料浓度过高或孵育时间过长。离心速度过高（如 $>120,000\times g$ ）。

解决方案：降低染料浓度至 2 μM 以下，缩短孵育时间至 10 分钟。使用蔗糖垫（如 30%蔗糖层）保护外泌体结构。

（4）活体成像信号集中于肝脏

现象：肝脏信号过强

可能原因：单核吞噬系统非特异性摄取

解决方案：注射后延长成像时间（如 24 小时）或使用靶向修饰外泌体（如 CD47 过表达）。

（5）荧光淬灭

现象：标记后荧光信号随时间迅速减弱。

可能原因：样本反复冻融或长期暴露于光照。

解决方案：注意避光操作。分装标记后外泌体，避光-80℃保存。