

Incucyte[®] Exofluor 细胞外囊泡（绿色）标记试剂盒

Incucyte[®] 活细胞成像分析系统细胞外囊泡分析方案

产品信息

包装规格、储存条件和稳定性

Incucyte[®] Exofluor 细胞外囊泡（绿色）标记试剂盒用于荧光标记细胞外囊泡（EV）（如外泌体），以便使用 Incucyte[®] 活细胞成像分析系统研究活细胞内吞摄取 EV 的细胞生物学行为。该试剂盒包括冻干状态的 Incucyte[®] Exofluor 细胞外囊泡（绿色）标记染料用于标记 EV、Vivaspin[®] 2 浓缩管（用于去除游离染料预处理）和 Minisart[®] 过滤器（用于灭菌和去除未结合的聚集染料预处理）。预处理后，通过全培养基更换将标记的 EV 添加到细胞中，并通过使用 Incucyte[®] 活细胞成像分析系统实时监测绿色荧光来定量检测 EV 的内吞摄取情况。EV 标记试剂盒可兼容多种分离方法所获得的 EV（包括沉淀、TFF/IEC、超滤和超速离心），并包含 10 个标记反应所需的用量。该试剂盒适用于 Incucyte[®] SX5、S3 和 SX1 活细胞成像分析系统。

产品名称	产品货号	激发波长 (max)	发射波长 (max)	规格	储存条件	建议使用期限
与配有绿色 绿色或红色 橙色 近红外荧光模块的 Incucyte® 活细胞成像分析系统兼容						
Incucyte® Exofluor Green EV 标记试剂盒	BA-04877			1 个		
▪ Incucyte® Exofluor Green EV 标记染料		480 nm	513 nm	1 管	-20 °C	自接收日期起 12 个月
▪ Vivaspin® 2, PES*, 100 kDa				10 单位	15 - 30 °C	请参阅产品标签
▪ Minisart® PES, 0.22 µm				10 单位	15 - 30 °C	请参阅产品标签

* PES -- 聚醚砜

产品介绍

细胞外囊泡 (EV) 是由细胞自然分泌到细胞外空间中的异质性脂质结合颗粒 (50 - 1000 nm)。外泌体是一类大小为 40 至 160 nm, 起源于内吞途径的 EV 亚类。鉴于 EV 在运输生物分子 (如蛋白质、脂质、核酸) 中的作用, 研究人员对其应用于诊断和治疗的用途前景展现出极大的感兴趣。Incucyte® Exofluor 细胞外囊泡 (绿色) 标记试剂盒能够对细胞 EV 摄取情况进行非干扰的实时动态评估, 经验证可与配有绿色 | 红色或绿色 | 橙色 | 近红外光学模块的 Incucyte® 活细胞成像分析系统一起使用。Incucyte® Exofluor 细胞外囊泡 (绿色) 标记染料通过与蛋白质和氨基酸共价结合均匀标记小 EV (如外泌体) 的质膜。通过与 EV 不可逆结合以及去除游离染料, 可降低在摄取之前或期间染料非特异性附着在其他质膜上的风险。

推荐用法

建议使用无水 DMSO (未提供) 以 5mM 的储备浓度溶解制备 Incucyte® Exofluor 染料。Incucyte® Exofluor 染料使用磷酸盐缓冲液 (不含 Ca²⁺/Mg²⁺ 离子) 以 1:10 稀释, 并以 80 µM 的最终浓度用于 30 分钟 EV 标记反应。每个标记反应的 EV 体积将通过测定孔的数量和每个孔的 EV 浓度确定。建议在 1-4 µg 蛋白质 / 孔或 5 × 10⁷ - 1 × 10⁹ 颗粒 / 孔的范围内使用 EV。这些范围已通过测试多种纯化方法中的外泌体制备悬液样品得到验证。根据外泌体制备悬液样品的质量, 可能需要进行一些优化。Vivaspin® 2 柱用于从标记的 EV 中去除游离染料。每个柱最多可处理 40 µg 蛋白质或 100 µL 标记的 EV 样品。较高的蛋白质负荷可导致膜堵塞, 超过 100 µL 标记的 EV 样品体积会导致背景荧光增加。去除游离染料后, 使用 Minisart® 针头滤器 (0.22 µm) 进行灭菌和去除未结合的聚集体。

参考

1. Raghu Kalluri, Valerie S. LeBleu. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. Science 2020, 367(6478): eaau6977

Incucyte® Exofluor Green EV 标记试剂盒示例数据

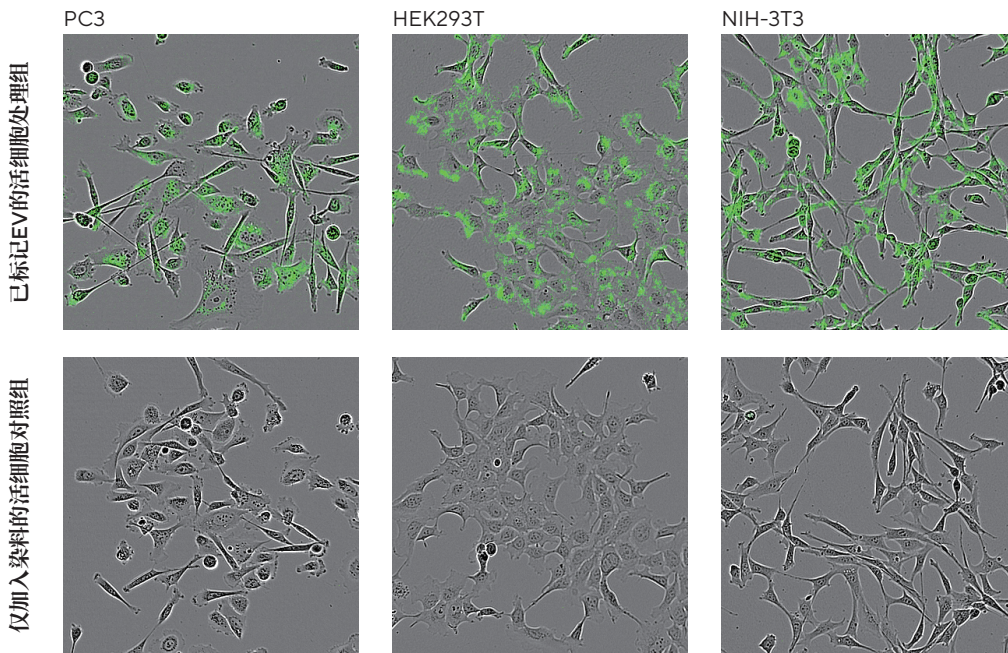


图 1: Exofluor Green EV 标记的 EV 可被细胞内吞摄取

使用 Incucyte® Exofluor 染料对 A549 人肺腺癌细胞系来源的外泌体 (2 µg/ 孔, HansaBioMed) 进行标记。基于不同细胞类型和培养基条件下对标记的外泌体内吞摄取情况进行成像观察 (顶行)。仅由染料处理的对照组 (底行) 表明, 在相同的细胞和培养基条件下并不显示荧光, 说明荧光信号不是由残留的游离染料所引起的。在用标记的 A549 人肺腺癌细胞系来源外泌体处理后 24 小时拍摄的各种细胞类型的图像显示, 与对照组相比, 细胞形态没有变化。

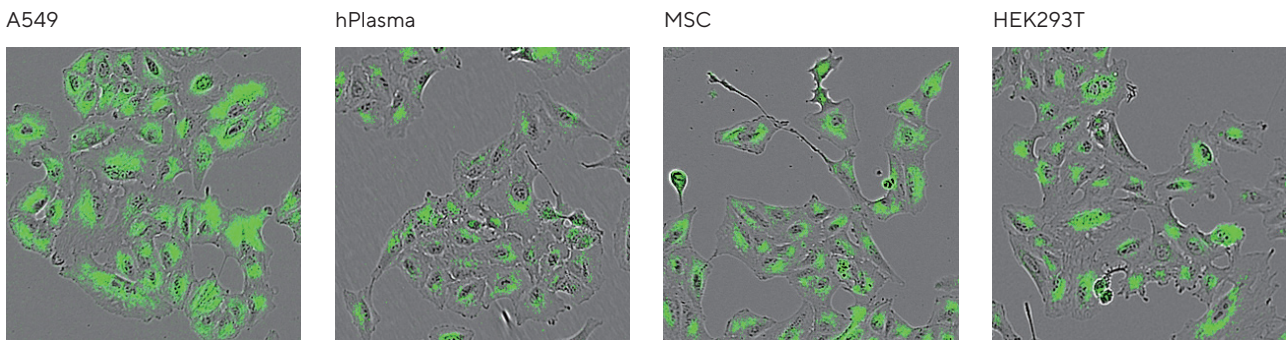


图 2: Exofluor Green EV 可广泛兼容标记不同细胞来源和纯化方法获得的外泌体

成像结果显示 A549 人肺腺癌细胞系受体细胞摄取了采用 Incucyte®Exofoor-Green 标记的各种 EV (处理后 24 小时)。使用超滤和 SEC 方法 (HansaBioMed) 提取 A549 来源外泌体, 并以 2 µg/ 孔用量加入到不同细胞系培养孔中进行处理。使用人血浆来源的外泌体 (Abcam, 超滤提取法), 浓度为 4 µg/ 孔。使用 TFF/IEX 色谱法提取间充质干细胞和 HEK293T 来源的 EV (赛多利斯), 并分别以 1.5×10^7 和 8.3×10^7 颗粒 / 孔用量加入到不同细胞系培养孔中进行处理。

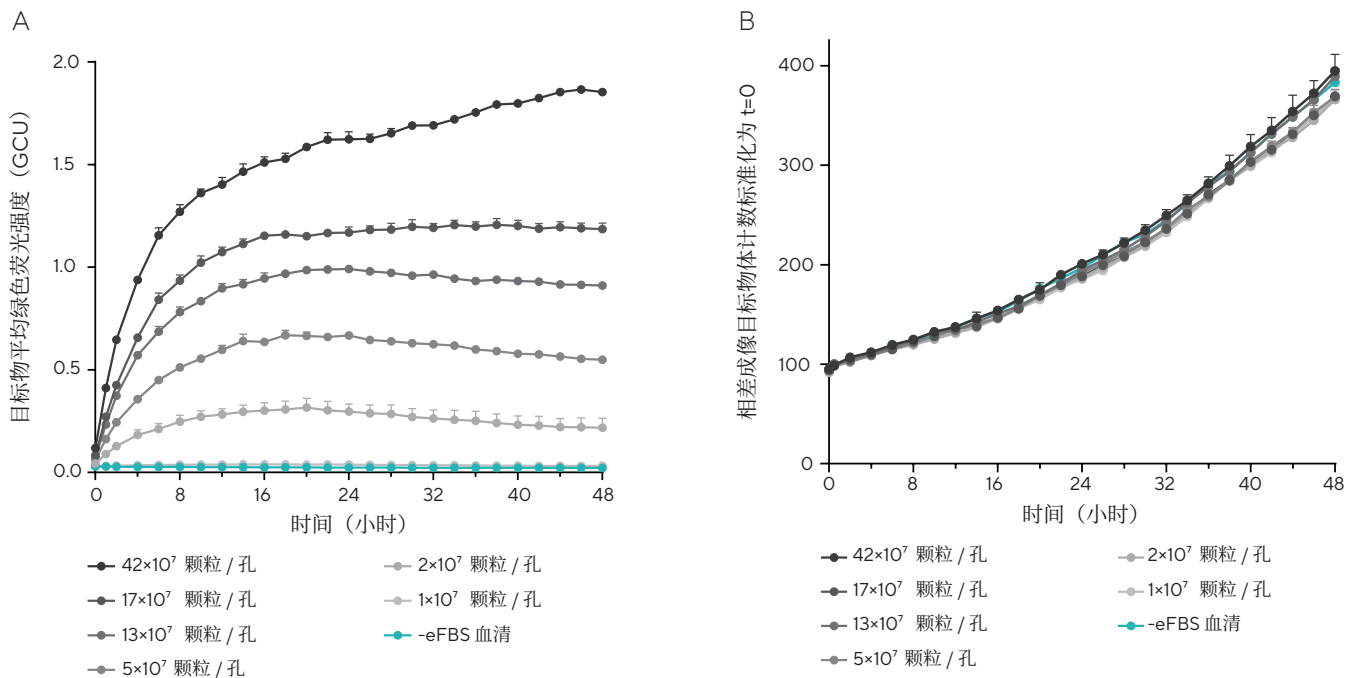


图 3: Exofluor Green EV 的 EV 浓度依赖性

使用 TFF/IEC 色谱法纯化来自 HEK293T 细胞的 EV，并使用 Incucyte® Exofluor Green EV 标记试剂盒进行标记，然后添加到 A549 受体细胞中。在 2 天内每 2 小时采集一次相差和绿色荧光图像，并使用 Incucyte® Cell-by-Cell Software 软件分析模块进行分析。(A) 将标记的 EV 滴定约 40 倍 (42×10⁷ 和 1×10⁷ 颗粒 / 孔)，并使用平均绿色荧光均值强度来评估 EV 摄取情况。可以很好观察到荧光强度显示出的浓度依赖性变化。(B) 相差成像目标物体计数分析模块 (Phase Object Count, 标准化为 t=0) 数据表明，在所有测试的不同浓度的标记 EV 下，细胞增殖没有发生变化。

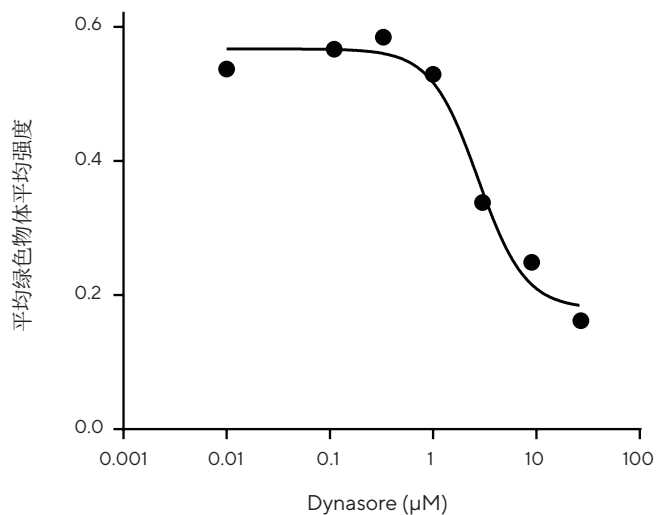
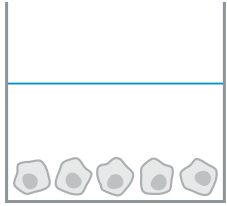


图 4: Exofluor Green EV 标记的外泌体摄取取决于内吞作用

将 A549 细胞接种后培养过夜，然后在无外泌体的培养基中用细胞内吞抑制剂 Dynasore (0.01 至 100μM) 处理。使用 Dynasore 处理后，立即加入用 Incucyte® Exofluor Green 标记的 Hansa A549 来源外泌体 (2 μg/ 孔)。细胞摄取外泌体受到抑制的抑制剂浓度梯度依赖性作用 (IC50=2.72μM) 反映在绿色荧光的强度中 (图中展示了 24 小时监测数据)。

快速指南

1. 细胞接种



在细胞生长培养基中接种细胞，然后静置以粘附 (4-24 小时)。Exofluor Green EV 标记试剂处理时，细胞应达到 15-35% 的汇合度 (细胞培养物密度)。

2. EV 标记



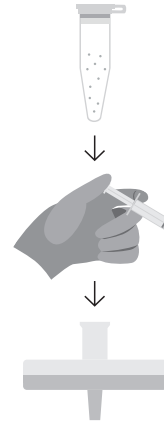
在 Incucyte® Exofluor-Green EV 标记染料溶解在 DMSO 中的，并以 80 μ M 的终浓度添加到 EV 悬液中。在 37 °C 下孵育标记反应溶液 30 分钟。

3. 游离染料去除



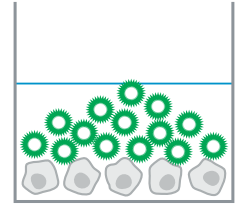
将 EV 标记反应溶液添加到 Vivaspin® 2 柱中 (每柱最大负荷 40 μ g 或 100 μ L)，并以 2000 \times g 离心 5 分钟去除游离染料。

4. 标记后清理



从 Vivaspin® 2 中收集已标记的悬浮在 EV 分析专用培养基中的 EV，并装入注射器以将混合物通过 Minisart® 过滤器 (0.22 μ m) 来同时完成灭菌并去除残留的聚集体。

5. 使用标记的 EV 处理细胞



将含有用于悬浮标记 EV 的培养基进行全培养基更换细胞培养物的现有培养基。

方法和步骤

材料

- Incucyte® Exofluor Green EV 标记试剂盒 (赛多利斯货号: BA-04877)
- DMSO, 无水 (如 Thermo, 货号: D12345)
- PBS (不含 Ca^{2+} / Mg^{2+})
- 用于接种细胞的细胞培养基, 培养基类型因细胞种类而异
- 无外泌体 FBS (推荐 Gibco, No.A2720803)
- 96 孔无菌微孔板 (如 Corning®, 货号: 3595)
- 无菌注射器 (3-10 mL)
- (可选) 凝胶上样吸头 (如 PR1MA, 货号: PR-200XLRK-FL)
- 16-gauge 规格针头, 首选钝头针头 (如 Stemcell, 货号: 28110)
- 用于标记和收集的无菌微量离心管 (优选琥珀色)
- 适用于 15 mL 锥形底管的离心机 (水平吊篮式或固定角度式)

通用指南

摄取细胞板

- 根据细胞的生长动力学，可能需要优化检测板中的细胞接种密度，以在过夜孵育后实现所需的细胞汇合度。一般而言，对于 96 孔细胞培养平板，每孔接种 1000 至 5000 个细胞 (10,000 至 50,000 个细胞 /mL) 是合理的起始细胞接种密度。
- 细胞接种后，将细胞培养平板置于环境温度下，以确保细胞沉降均匀 (15-30 分钟)。
- 轻轻挤压含有 70-100% 乙醇并已取出内部吸管的洗瓶以去除所有细胞培养孔中的气泡，将蒸汽吹至每个孔位的表面。

标记方法

- 使用前将 Incucyte® Exofluor 染料静置达到室温并避光。
- 推荐的对照组设计包括仅加入 Incucyte® Exofluor 染料(无 EV) 和仅加入 EV (无染料)。
- 除非另有说明，所有 Vivaspin® 2 离心步骤均以 2000 xg 进行 5 分钟 (室温)。
- Vivaspin® 2 柱可使用水平吊篮式或固定角度转子式离心机进行离心。使用固定角度转子式离心机时，建议将 Vivaspin® 2 柱倾斜，使刻度面朝上 | 朝外。
- Vivaspin® 2 柱润湿后，不要让膜变干。
- 对于 EV 标记后清理，为了便于使用，建议使用 16-gauge 钝头针头。标准的 16-gauge (或更宽直径) 针头也可用于提升安全性。
- 为了获得最佳的 EV 分析结果，建议进行预实验以确定最佳 EV 浓度，因为这取决于所用的分离和纯化方法。EV 分析实验中 EV 用量的参考范围为 1-4 µg/ 孔或 $5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ 颗粒 / 孔。
- 一种可参考的实践做法是在单次反应和连续稀释中标记 EV，以达到推荐或所需的范围。
- EV 内吞摄取分析实验请使用 EV 分析专用培养基 (使用无外泌体血清 -eFBS 制备) 进行，以尽可能减少 FBS 中的内源性外泌体，避免影响摄取动力学分析结果。
- 我们建议在使用 PBS 和 EV 分析专用培养基前，将这些溶液通过 0.22 µm 过滤器过滤，以去除任何不希望存在的干扰颗粒物。

优化的细胞培养孔板图示例

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			Exofluor Green EVs 4 µg/well A549 3K/well									
C			Exofluor Green EVs 2 µg/well A549 3K/well									
D			Exofluor Green EVs 1 µg/well A549 3K/well									
E			A549 3K/well Exofluor Green Dye Only									
F			A549 3K/well Assay Medium (-eFBS)									
G			A549 3K/well Standard Growth Medium									
H												

方法示例

第 0 天

将细胞接种至用于 EV 内吞摄取实验的细胞培养平板

1. 以适当的密度制备细胞接种原液，以便在细胞分析时达到 15-35% 汇合度 (细胞密度)。
2. 将细胞接种到所选细胞培养容器中 (例如，对于 96 孔平底细胞培养微孔板中每孔加入 100µL)。
3. 让细胞在 37°C 培养温度下贴壁生长过夜。

第1天

EV 标记方法

1. 短暂离心 Incucyte® Exofluor 染料，以确保内容物聚集在小瓶底部。
2. 将 Incucyte® Exofluor 染料制备至最终浓度为 5 mM。
 - 2.1 加入 20 μ L 无水 DMSO 用于溶解冻干 Incucyte® Exofluor 染料。通过涡旋震荡进行混合。
 - 2.2 短暂离心小瓶，在小瓶底部收集溶解的染料。
3. 根据预先检测定量的 EV 浓度和每个板的孔数，确定所需的 EV 标记反应数量。请注意，处理过程中存在一些应纳入计算的体积回收损失 (15-25%，取决于体积)。参见 EV 标记试剂盒的计算示例框 (步骤 1 和 2)。
4. 计算每次标记反应中达到 80 μ M 所需的 Incucyte® Exofluor 染料的所需体积 (工作浓度为 5 mM)。(参加计算示例框步骤 3)
 - 4.1 使用 $C1 \times V1 = C2 \times (V2 + V1)$ 计算 Incucyte® Exofluor 染料 ($V1$) 的所需体积
 - 4.2 $C1$ (Incucyte® Exofluor 染料工作原液) = 500 μ M
 - 4.3 $C2$ (标记反应中的 Incucyte® Exofluor 染料) = 80 μ M
 - 4.4 $V2$ 为标记反应中 EV 悬液的体积 (μ L)
5. 制备浓度为 0.5 mM 的 Incucyte® Exofluor 染料工作原液。(示例计算示例框步骤 4)
 - 5.1 使用 PBS (不含 Ca^{2+}/Mg^{2+}) 以 1:10 稀释 5 mM Incucyte® Exofluor 染料原液。
 - 5.2 分装多余的 Incucyte® Exofluor 染料，并在 -20 °C (避光) 下储存 1 个月。
6. 按照计算好用量对应的体积将 EV 标记样品转移到无菌微量离心管中，并避光放置。

注意：如果实验中包括 PBS，则将 PBS 用于仅含染料的对照样品。
7. 将计算好用量对应体积的 0.5 mM Incucyte® Exofluor 染料添加到 EV 悬液中，使染料的最终浓度达到 80 μ M。避光放置。
8. 短暂离心以上混合溶液，并在 37 °C 下孵育 30 分钟。

注意：在标记反应过程中，执行下面的“游离染料去除”步骤。
9. 加入 500 μ L PBS，停止标记反应。
10. 将标记的 EV 悬液避光存储在室温下，直至用于游离染料去除步骤。

使用 Incucyte® Exofluor Green EV 标记试剂盒进行 EV 标记的计算示例

1. 考虑实验设计：(示例)
 - a. 细胞培养板的孔数量 (8)
 - b. 每个孔所需的 EV 数量 (2 μ g)
 - c. 梯度稀释范围 (无)
 - d. 处理过程中的液体样品体积损失系数 (~25%)
2. 对于冻干形式的标准化外泌体，建议使用每孔 1-4 μ g；对于定制纯化 EV，建议使用 $5 \times 10^7 - 1 \times 10^9$ 颗粒 / 孔 (参见优化方法示例)。

计算示例 (EV 标记体积)：

8 个孔，2 μ g / 孔 = 标记反应总共需要 16 μ g 的 EV。如果有 1 μ g/ μ L 的 EV 原液，则标记反应需要 16 μ g = 16 μ L 的 EV。如考虑到处理过程中的体积损失，则总共需要：16 μ L \rightarrow 20 μ L (20 μ g) 的 EV 原液。

3. 计算使标记反应中的最终浓度达到 80 μ M 所需的 Incucyte® Exofluor 染料体积。

计算示例：

$$C1 \times V1 = C2 \times (V2 + V1)$$

$$500 \mu\text{M} \times V1 = 80 \mu\text{M} \times (20 \mu\text{L} + V1)$$

$$V1 = 20 \mu\text{L} \times 0.19 = 3.8 \mu\text{L}$$

4. 制备 Incucyte® Exofluor 染料的工作原液。

计算示例：

制备工作浓度为 0.5 mM 的 Incucyte® Exofluor 染料工作原液，则需 1 μ L 的 5 mM Incucyte® Exofluor Dye + 9 μ L PBS = 500 μ M。

游离染料去除

1. 在给定以下限制条件的情况下，确定处理每个标记反应所需的 Vivaspin® 2 柱数量：每个 Vivaspin® 2 所装载的 EV 不应超过 100 μ L 或 40 μ g 蛋白质。
 - 1.1 超过 Vivaspin® 2 容量会影响去除游离染料的能力。
 - 1.2 单个标记反应完成后可在多个 Vivaspin® 2 柱上分离。
2. 计算并制备含有 -eFBS 的 Vivaspin® 2 柱分析专用培养基，参见“Vivaspin® 2 柱回收率计算示例”表。
 - 2.1 计算每个 Vivaspin® 2 柱所需的分析专用培养基体积，以使 EV 以最终工作体积回收 (通常在 1-4 μ g / 孔或 $5 \times 10^7 - 1 \times 10^9$ 颗粒 / 孔的范围内)。
 - 2.2 对于 96 孔板，建议每个孔至少 100 μ L。
 - 2.3 分析专用培养基通常是补充了 -eFBS 的标准基础培养基，而不是补充标准 FBS。

3. 使用 Vivaspin® 2 柱之前的准备工作。

3.1 将 2 mL PBS 加入 Vivaspin® 2 柱的顶部。以 2000 xg 离心 Vivaspin® 2 柱 5 分钟，丢弃超滤管下段（注：此处待确认真实含义，英文原句是：and decant lower section of column）。

3.2 将 1 mL PBS 加入 Vivaspin® 2 柱的顶部。将 PBS 孵育留在薄膜上方，以防止其在标记反应过程中变干。

4. 将标记反应（EV 标记反应 + 500 µL PBS）的内溶物转移到含有 1 mL PBS 的 Vivaspin® 2 柱的顶部。

5. 离心 Vivaspin® 2 柱，从已标记的 EV 悬液中去除游离染料，并丢弃离心后收集到的废液。

6. 加入 2 mL PBS 清洗 Vivaspin® 2 柱上的已标记 EV 悬液，离心丢弃离心后收集到的废液。

7. 再次离心 Vivaspin® 2 柱，去除任何残留的染料溶液。立即进行下一步，防止薄膜变干。

注意：如果干式旋转后发现 Vivaspin® 2 柱上有残余溶液（超过 50 µL），参见故障排除“Vivaspin® 2 残余溶液”说明。

8. 通过将含有 -eFBS 的分析专用培养基添加到 Vivaspin® 2 柱中，从 Vivaspin® 2 柱中回收已标记的 EV。

8.1 为每个 Vivaspin® 2 柱准备新的回收管（1-5 mL）。

8.2 如果待回收的样品体积超过 1.5 mL，则应在回收步骤中采用可容纳过量分析专用培养基的回收管。不建议在 Vivaspin® 2 中装载超过 1.5 mL 的分析专用培养基，因为可能会溢出。

8.3 在继续操作之前，将计算的分析专用培养基（参见计算示例中的“EV 回收步骤 3”）添加到所有单次实验所需的 Vivaspin® 2 柱中。这一步骤对防止薄膜变干非常重要。

8.4 上下轻微吸打分析专用培养基，从 Vivaspin® 2 柱中回收 EV，并将含有 EV 的培养基转移到做好特定标记的收集管中。

8.5 使用低吸附吸头从 Vivaspin® 2 柱收集最后 100-400 µL 的已标记 EV，并转移到做好特定标记的收集管中。

注意：用移液器回收培养基中已标记的 EV 的另一种方法是反向离心：(1) 取下溶液样品过滤管，(2) 将柱子倒置，(3) 将浓缩液回收帽插入溶液样品过滤管中，(4) 以 2000 xg 离心 2 分钟。

Vivaspin® 2 柱外泌体回收率的计算示例

1. 考虑实验设计（示例）：

a. 标记反应试剂用量（20 µg）

b. 外泌体浓度（2 µg/孔）

c. 测定体积（100 µL/孔）

2. 20 µg = 1 Vivaspin® 2 柱的标记反应（柱容量为 40 µg）

3. 计算回收所需的分析专用培养基体积。

计算示例：

Vivaspin® 2（标记反应）含有 20 µg 外泌体。需要最终回收的悬液中 EV 浓度为每 100 µL 孔含 2 µg 外泌体。

回收体积 = 20 µg 外泌体 × 100 µL 孔 / 2 µg 外来物 / 孔 = 1 mL 分析专用培养基

标记后清理

1. 为每个 EV 标记反应准备无菌收集管（优选琥珀色）。

2. 预润湿 Minisart® 针头滤器。请注意，这一步骤不是必需的，但可提高样品体积回收率。如果样品回收处理体积小于 1000 µL（使用干式针头滤器时预计损失 ≥ 250 µL），则这一步骤可能是必要的。

2.1 用分析专用培养基（≥ 0.5 mL/样品）制备无菌样品管。

2.2 将针头固定在注射器上（3-5 mL，具体取决于处理液体的体积量）。

2.3 在注射器中充入空隙空气，然后收集约 500 µL 的分析专用培养基。继续抽出后气隙，以清除针头中的培养基。

2.4 取下针头并安装 Minisart® 过滤器（保存包装以便临时存放过滤器）。

2.5 使收集到的培养基通过 Minisart® 过滤器，并使用空隙空气清除液体，处理用过的培养基。

2.6 小心取下 Minisart® 过滤器，将其保存在原始包装中，以便随时使用。

3. 将无菌针头固定在注射器上，抽出已标记的 EV 悬液，确保有前后空气间隙来填充和清空针头。空气间隙体积应等于标记 EV 悬液体积的 20-30%。

4. 注射器装入含 EV 的培养基后，取下针头并连接 0.22 µm Minisart® 过滤器（如已预润湿，则使用步骤 2 中的过滤器）。

5. 缓慢推动已标记的 EV 通过 Minisart® 过滤器，以便逐滴（例如每 5-10 秒 1 mL）流入步骤 1 中制备的新收集管中。

注意：过快地推动 EV 通过 Minisart® 会导致回收率下降。

使用标记的 EV 处理细胞

1. 从培养箱中取出将用于检测内容摄入行为的细胞培养平板，用含有培养基的已标记 EV 进行全培养基更换。
 - 1.1 避免细胞培养平板孔中长时间无培养基，以免孔变干并导致细胞扰动或死亡。
 - 1.2 建议在新的 96 孔板中制备已标记的 EV 样品并使用多通道移液器，以便转移到测定孔板。
 - 1.3 根据细胞摄取 EV 的一般生物学过程，建议在往细胞培养物中添加 EV 之前用化合物处理细胞。
2. 去除孔中的所有气泡（参见“通用指南”部分），并将细胞培养平板置于 Incucyte® 活细胞成像分析系统中。

注意：用于检测的细胞培养平板需进行全培养基更换，在培养基适应细胞培养平板孔中的温度之前进行平板成像扫描会导致在第一次图像采集之前出现一定程度的细胞汇聚成团。如需立即成像，可将平板置于 Incucyte® 活细胞成像分析系统中，并进行一次平板扫描以消除细胞汇聚成团。如果无需立即扫描，在获取扫描前，请让平板在设备箱体内存适应大约 15-30 分钟。

获取图像

1. 使用 Incucyte® 软件，准备获取“相差”和“绿色”通道图像（物镜选择：10X 或 20X）。扫描频率取决于实验条件，但在测定细胞开始吸收标记 EV 最初的几个小时内，可能需要更频繁的扫描（例如，30 分钟间隔）。
2. 建议所有应用可使用 Incucyte® Cell-by-Cell 分析软件模块（货号：9600-0031）进行数据采集。使用 Basic Analyzer 进行数据采集可能适用于某些应用，但需要对测定进行优化。
3. 要生成指标，用户必须创建适合所选细胞类型、测定条件和放大倍数的分析定义。

Cell-by-Cell 分析模块（推荐）

1. 在 Cell-by-Cell 分析模块中，选择贴壁逐细胞分析类型，创建新的分析定义。
 - 1.1 从处理孔和对照孔中选择代表性成像视野。确保大部分视野中具有约 50% 的细胞覆盖率，以实现准确的圈描。
 - 1.2 使用滑块控件确定最佳的圈描（目标是每个细胞被独立圈描出来），从优化 segmentation（关闭荧光通道）开始。

- 1.3 评估 Cell-by-Cell 分析模块中的圈描并相应地细化参数。一旦对调整中的参数感到满意，单击“全部预览”，确保分析参数适用于所选的其他时间点或处理方式。
- 1.4 荧光信号包含在细胞边界中，不需要生成单独的荧光圈描。荧光通道的“Surface Fit No Mask”默认设置将启用背景扣除法。
- 1.5 预览所有代表性图像并对所设置参数感到满意后，完成启动向导分析以选择希望分析的扫描时间和细胞培养孔位，并指定分析定义名称。

注意：如果您的实验正在进行中，可选择“Analyze Future Scans”进行实时分析

2. 细胞分割完成后，使用分析软件中的 2D 散点图基于绿色荧光强度对数据进行分类。
3. 如需进一步了解详尽操作指南，可参阅 Incucyte® 软件界面中的《User Manual（用户手册）》。
4. 细胞吸收标记的 EV 时，细胞内的荧光强度会增加。有关推荐的指标，参阅下表。

图像分析基本步骤

1. 要创建处理定义，从包含 1-3 个不同时间点的已标记 EV 的细胞培养孔中选择代表性图像，并包括阴性对照孔。
2. 在荧光通道关闭的情况下，设置用于细胞汇合度测量的相差圈描。
3. 确定相差成像下的圈描后，打开荧光通道：使用背景扣除法“Surface Fit”功能从掩模中去除背景荧光。
 - 3.1 所选阈值将确保低于荧光阈值的物像不会被进行圈描处理（建议选择“Edge Split Off”，以进行更完整的圈描处理）。
 - 3.2 选择相应的阈值，确保绿色目标在阳性响应图像中被圈描，但该值在仅添加染料或阴性对照孔中较低。选择合适的阈值以确保可在不超出细胞边界范围或避免收集不需要的荧光背景的情况下对最广泛的细胞区域进行圈描。
 - 3.3 过滤器功能有助于避免对细胞碎片进行圈描（例如将过滤器参数设定为最小尺寸）。
4. 细胞吸收标记的 EV 时，细胞内的荧光强度会增加。请参阅下表了解相关推荐指标。

成像数据结果说明

数据报告类型	Cell-by-Cell Analysis	Basic Analyzer
推荐应用	<ul style="list-style-type: none">所有应用软件可在多种细胞成像图像中处理分割出细胞的特征形态（在相同的细胞类型范围内）。	<ul style="list-style-type: none">背景荧光不会限制背景扣除的优化条件。由于荧光阈值因不同实验条件而异，所以在不同实验中需个性化的设置分析定义和参数。
绿色荧光均值强度增加	绿色荧光均值强度（GCU）。分类后：绿色荧光平均强度（GCU） 每孔相差成像目标物体计数（Object Count）	不推荐使用
荧光强度增加，集中在可检测荧光信号图像区域	不推荐使用	绿色荧光总累积强度（每个图像）归一校准为相面积（每个图像）（ $GCU \times \mu m^2 / \text{图像} \div \mu m^2 / \text{图像}$ ）。注：选择“边缘分割”进行荧光信号掩膜。使用自定义指标设置分析类型。

故障排除指南

弱荧光信号或无信号

- 在未处理的图像中，由细胞内吞摄取的被标记的 EV 可能不可见（或荧光微弱）。
通过启用图像处理定义将去除背景并增强信号可视化。
- EV 颗粒的数量可能不足以呈现可视化的内吞摄取。可检测被标记 EV 的滴定，找到一个适用于最终分析的窗口。
- 如希望确定 EV 以“ μg ”为单位的合适用量，我们建议每孔测试 1-4 μg
- 如希望确定“每毫升颗粒数”为单位的合适用量（低蛋白质含量浓度的 EV），建议从至少 50×10^6 颗粒 / 孔开始，并逐步向上滴定。
- EV 颗粒可能在提取过程中被机械力剪切或破坏。
- 外泌体生物特征 | 用于内吞摄取实验的细胞可能阻碍 EV 摄取。
- 不合适的 -eFBS 可能仍含有低浓度的外泌体。在市售的无外泌体 FBS 产品中我们推荐 Gibco 无外泌体胎牛血清（货号：A2720803）。强烈不建议使用含外泌体的血清，因为这会影响摄取标记的外泌体。

成像结果的高背景噪音

- 在单个 Vivaspin® 2 柱中加入超过 20 μL 的 Incucyte® ExoFluor 染料（0.5 mM）可能会导致所处理的 EV 中出现游离染料残留物。使用超过 20 μL 的 Incucyte® ExoFluor 染料时，强烈建议同步设立“仅染料”对照组以监测荧光成像背景 GCU 的变化。
- 利用 2 mL PBS 额外添加一步 Vivaspin® 2 柱的洗涤可能有助于降低背景噪音，以最大限度地减少来自未结合染料的背景信号。
- 如果从低纯度提取方法（如 PEG 纯化方法）开始，则可能需要额外纯化外泌体。
- 一些市售 eFBS 血清会在测定中引入高背景。可考虑使用 Gibco 无外泌体胎牛血清（货号：A2720801）用于本分析实验。

Vivaspin® 2 柱中残余液

- 如果在干式旋转之前 Vivaspin® 2 柱中有残余液，可能是柱子内置的膜上蛋白质载量过高的原因。使用低吸附吸头小心混合 2-3 次，然后进行第二次干式旋转。

提高低产量回收率（产率）

- 如果回收体积小于 1 mL 培养基，建议先用约 500 μL 培养基预润洗 0.2 μm 过滤器。在处理 EV 悬液样品之前，确保尽可能彻底清除预润洗培养基。使用干薄膜会导致至少 250 μL 的体积损失，而预润洗只会损失约 60-100 μL 的体积。

销售与服务 联系方式

更多联系信息，请访问

www.sartorius.com.cn

赛多利斯（上海）贸易有限公司

邮箱 leadscn@sartorius.com

服务热线 400 920 9889 | 800 820 9889

上海

上海市浦东新区盛荣路 388

弄百佳通产业园 3 号楼

7-11 层, 201210

电话 +86 21 6066 6100

北京

北京市顺义区安祥街 12 号

环普国际科创园 4 号楼

6 层, 101318

电话 +86 10 8042 6300

广州

广州市越秀区水荫路 117 号

1105 单元, 510075

电话 +86 20 3761 7284

苏州

苏州市虎丘区科技城锦峰路

158 号 101park-28 幢 201,

215163

电话 +86 512 6616 0490

成都

成都市上东大街 246 号新良

大厦 2618 室, 610012

电话 +86 28 8666 6877

西安

西安市和平路 118 号和平银

座 1107 室, 710001

电话 +86 29 8751 2305

