

荧光素的选用技巧

在如此多的荧光染料中，进行合适的选择对于获得可靠的流式细胞术结果至关重要，下面给大家介绍几种荧光素的选用原则：

1. PE-Cy5.5 与 APC 搭配是最好选择

流式细胞仪用户在进行四色分析，经常将 PE-Cy5(或 TC) 标记的抗体与 APC 标记的抗体搭配使用，但此搭配需较大幅度地调节两者的颜色补偿，补偿有时可高达 80-90%，甚至无法实现正确补偿，这是由 BD 流式细胞仪本身的光路设计引起的。

此时，用户可选用 PE-Cy5.5 来替代 PE-Cy5(或 TC)，颜色补偿只需 1% 左右。原因为 Cy5 的激发波长与 APC 的激发波长相近，均在 630nm 左右，所以 PE-Cy5 染料中的 Cy5 在进行内部能量传递(即 PE 的发射光再激发 Cy5)的同时，也会被激发 APC 的第二个激光器(氩氦激光器)所激发，导致 PE-Cy5 与 APC 的颜色补偿很难调。相反，PE-Cy5.5 中的 Cy5.5 激发波长为 675nm，不能被激发 APC 的第二个激光器所激发，也就不存在 Cy5.5 对 APC 的干扰，颜色补偿也就很小。

因此，建议使用 PE-Cy5(TC) 和 APC 的 BD 用户，更换为 PE-Cy5.5 和 APC 组合

2. 根据抗原表达量选择荧光染料

FITC 为荧光比较弱的染料，而 PE 和 PE-Cy5(TC) 是荧光很强的染料。PerCP 与 FITC 的荧光强度相似，APC 的荧光强度稍强于 FITC。

细胞表面或内部的各种抗原表达量也不同，如 CD4 和 CD8 在细胞表面的表达分子数很多，而 CD25 等分子在细胞上的表达量则不多。在用流式细胞术分析这些分子时应根据表达量来选择荧光染料，对于表达较多的分子，可用 FITC 等弱荧光染料，而对于表达较少的分子，则须要用荧光较强的染料，包括 PE、PE-Cy5 和 PE-Cy5.5 等。

为增加高亮度荧光染料的可选性和稳定性，我公司推出 iFluor 系列荧光染料标记的抗体，其共同特点为：高亮度、光稳定性强及 pH 值不敏感。供大家参考。