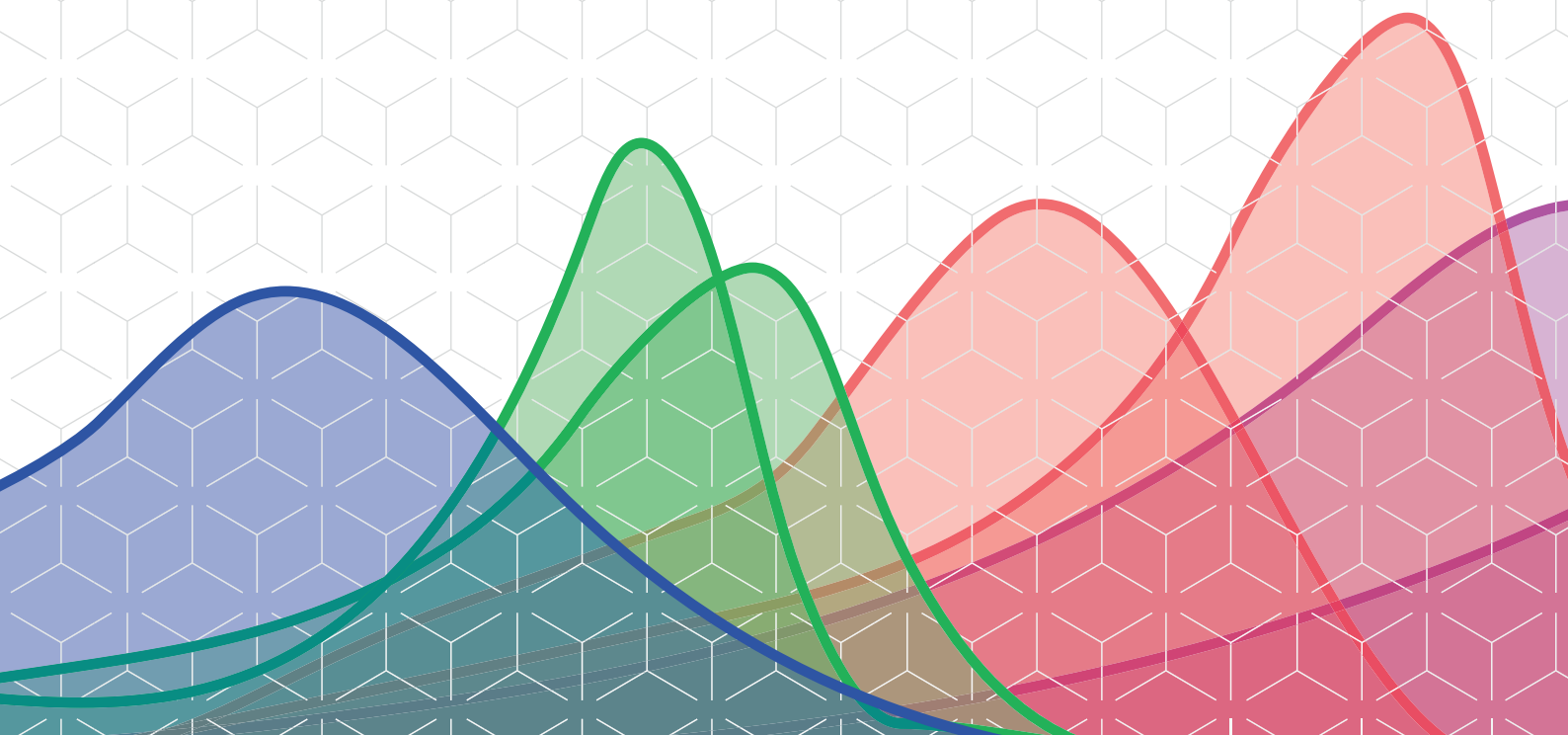


abcam

多色流式细胞术

快速设置流式细胞术实验的便捷指南



目录

简介	4
流式细胞仪基础知识.....	5
熟悉流式细胞仪组件，掌握成功利用多色流式细胞术进行分析的基础知识	
荧光基团与荧光补偿.....	7
荧光基团对于流式细胞术检测至关重要，其特性是了解多色实验中补偿重要性的关键	
抗原检测的直接方法与间接方法	12
每种方法都有其优势和局限性，了解这些信息有助于为您的实验选择最适合的方法	
组合构建	14
随着实验中颜色数量的增加，组合的设计难度也越来越大。我们的提示将确保您成功	
推荐的对照	17
遵循我们的建议，采用推荐的对照设置将确保您得出可靠的结果	
数据分析	19
数据分析与实验设置同样重要，我们的提示与技巧将助您完成实验的最后步骤	
Abcam 的多色流式细胞术产品	22
Abcam 为多色组合的构建提供各种抗体和辅助试剂	
荧光染料图.....	30
该简单、快速的指南可帮助您选择最适合您个人多色实验的荧光染料	

简介

流式细胞术已经成为一项功能强大的技术，可在数秒内对数千个单个细胞或其他颗粒的多项参数进行分析。

本指南将帮助您轻松、快速地完成多色实验设置。

Abcam 提供各种流式细胞术试剂支持您的研究。



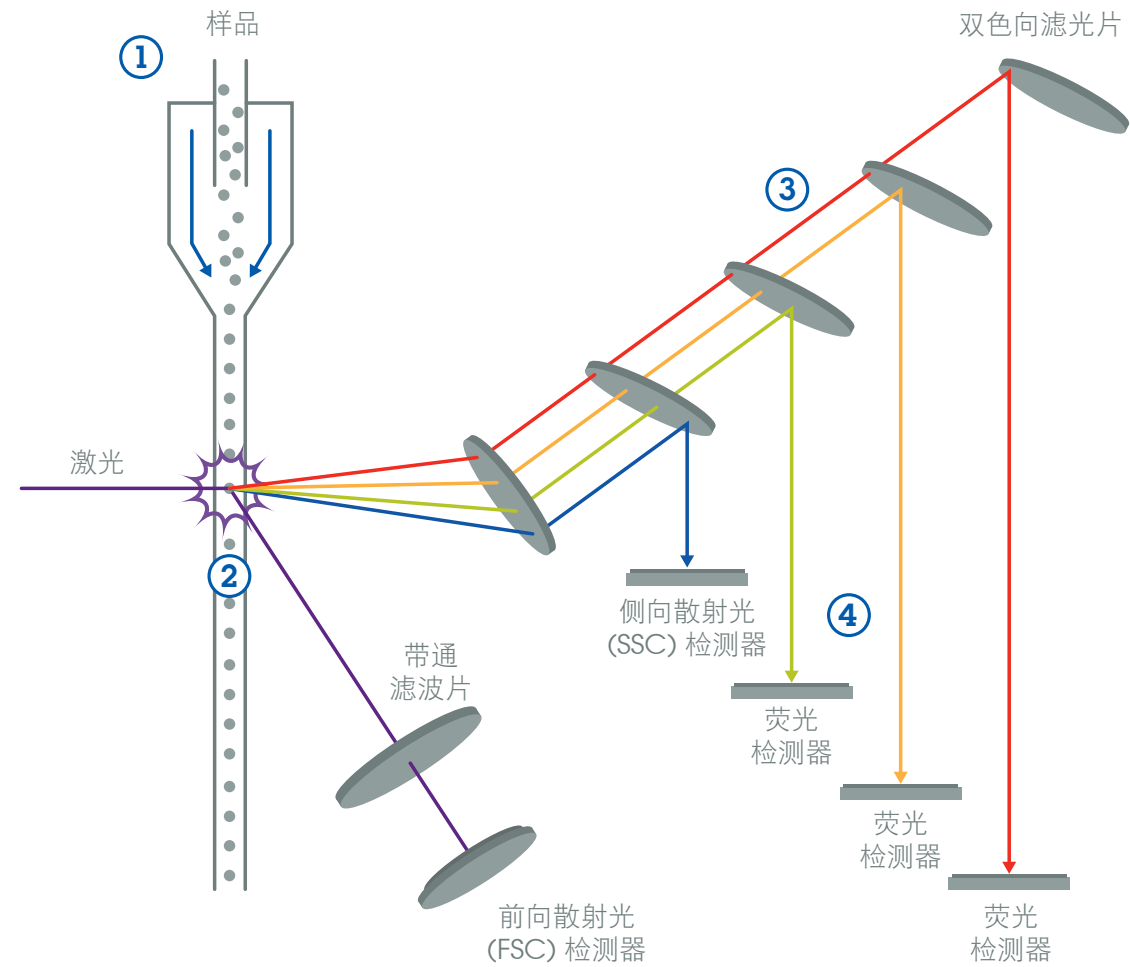
11000+
经流式细胞术
验证的试剂

400+
KO 验证可确保抗体
在流式细胞术中
发挥作用

15000+
与流式细胞术相关的
Abreviews®、
图像和参考文献

Alexa Fluor® 是 Life Technologies 的注册商标。Alexa Fluor® 染料偶联物包含由 Life Technologies 授权给 Abcam 的技术。

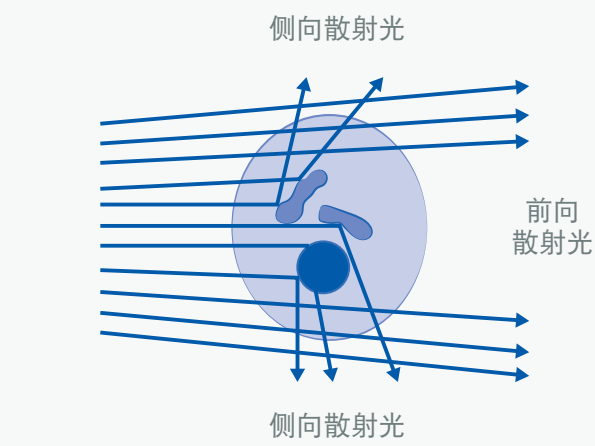
流式细胞仪基础知识



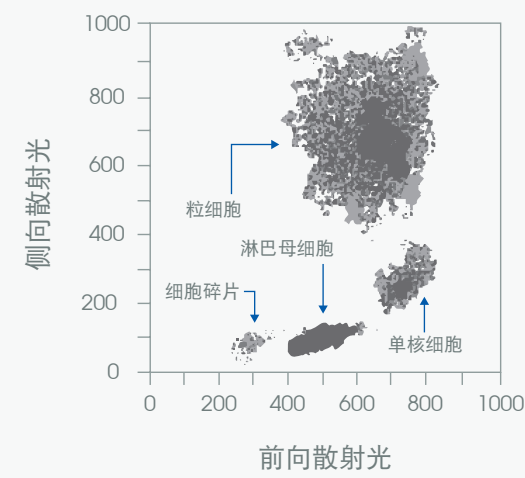
- ① 样品引入仪器流动室后，将进入液流系统，在流体动力聚焦的原理和过程下被分离成单细胞列。流体动力聚焦的原理是通过控制液流包裹样品使其聚焦为窄流，从而实现细胞分离。
- ② 在样品通过激光时，仪器以事件的形式记录各单个细胞。对于单个事件，仪器将记录其前向散射光 (FSC) 和侧向散射光 (SSC)。如果细胞带有荧光标记，激光将激发荧光基团，其发射光则以荧光强度的形式被收集起来。
- ③ 如果要检测荧光基团的特定波长发射光，则发射光需通过一系列透镜和滤光片，直至到达适合的检测器。这些检测器叫做光电倍增管 (PMT)，每种 PMT 只会检测特定波长的荧光。
- ④ 光学滤光片会拦截特定波长的光，而让其他波长的光透过。双色向滤光片也是一种透镜，以一定角度放置时可允许特定波长的光线透过，同时反射其他波长的光。将不同类型的双色向滤光片进行不同的排列可同时检测多种信号。

FSC 和 SSC

在光线通过细胞或在细胞周围发生衍射时，细胞尺寸 (FSC) 和颗粒度 (SSC) 将被检测。
FSC 越大则细胞尺寸越大，SSC 越大则意味着细胞内颗粒成分越复杂。



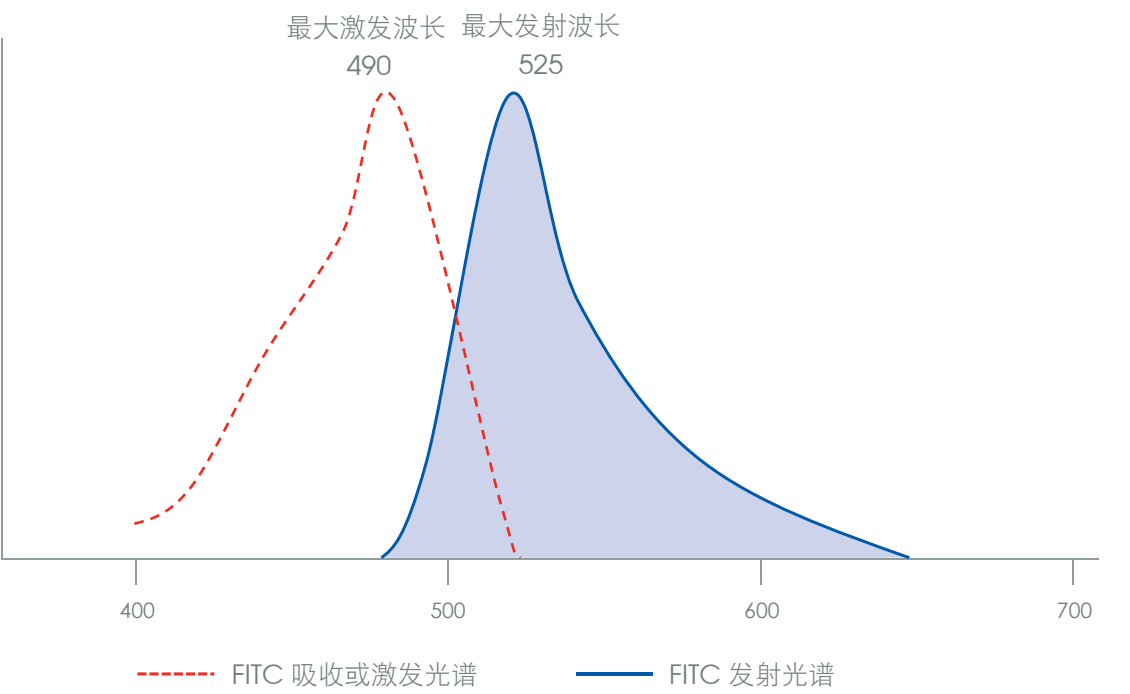
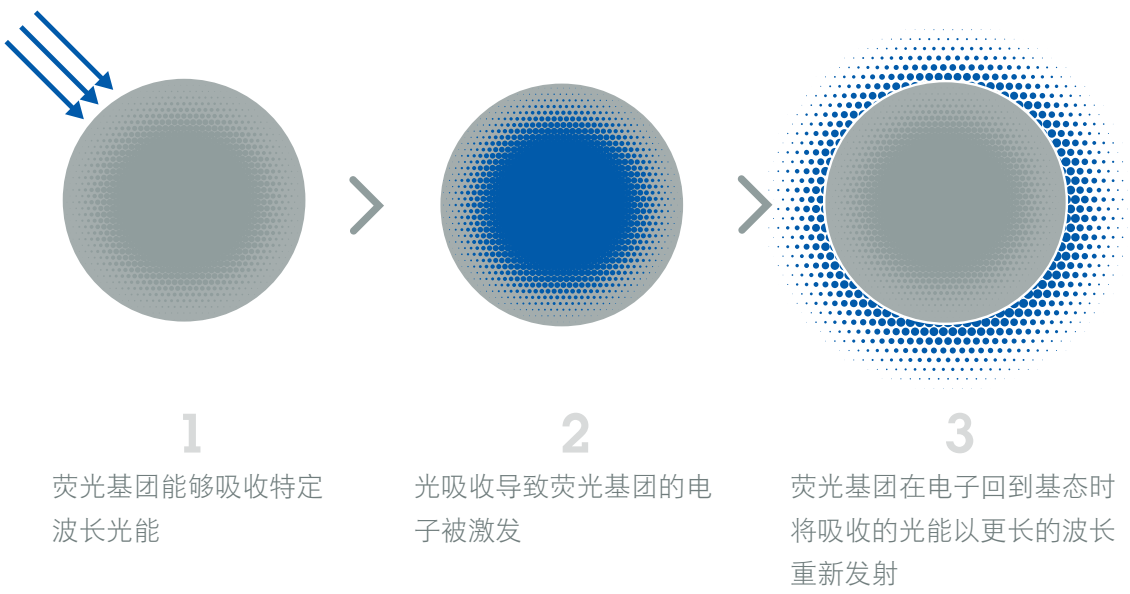
有时可通过 FSC 和 SSC 数据提供的细胞尺寸和颗粒度信息区分不同的细胞类型。



荧光基团与荧光补偿

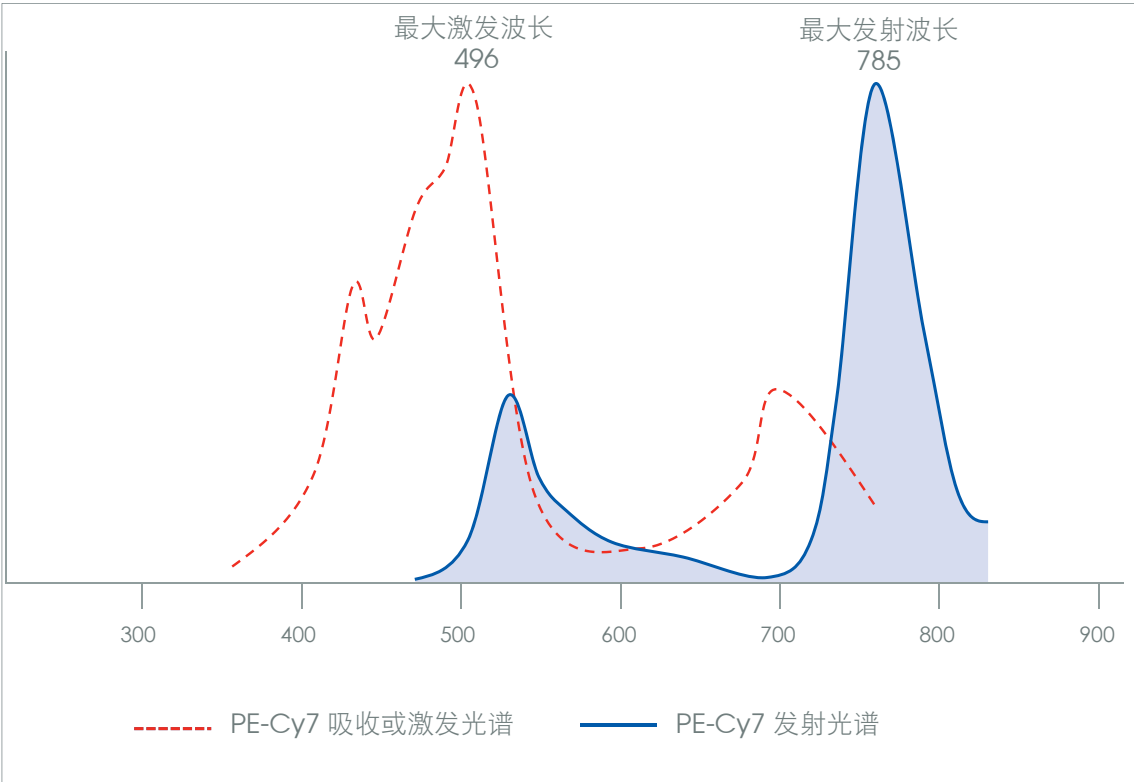
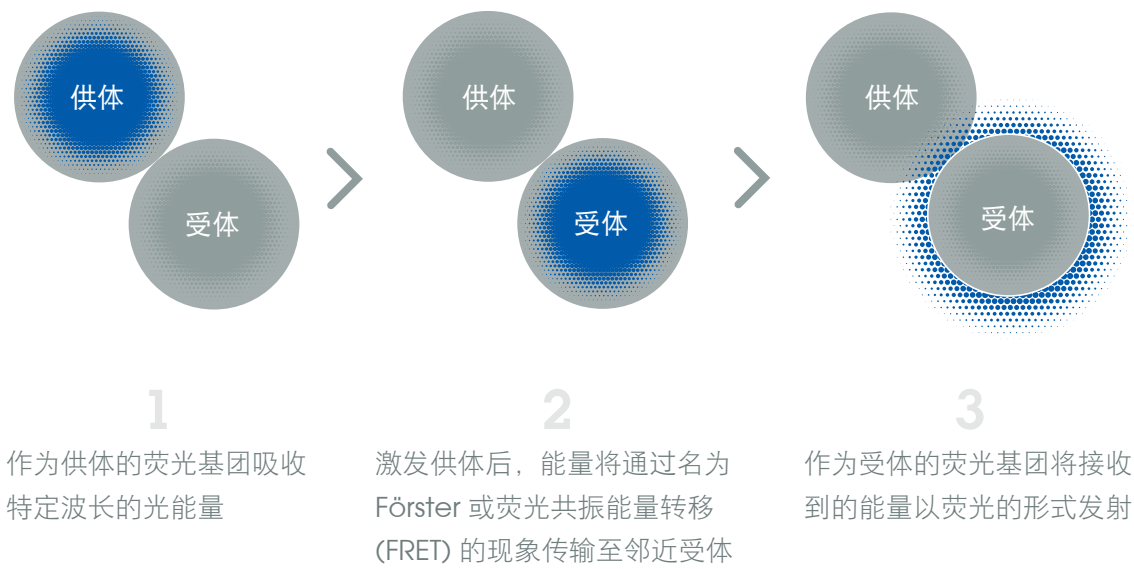
荧光基团

荧光基团（又称荧光染料）常用于偶联抗体，是流式细胞术等应用的检测试剂。荧光基团可吸收和发射一定波长范围的光，通常称为吸收（激发）和发射光谱。



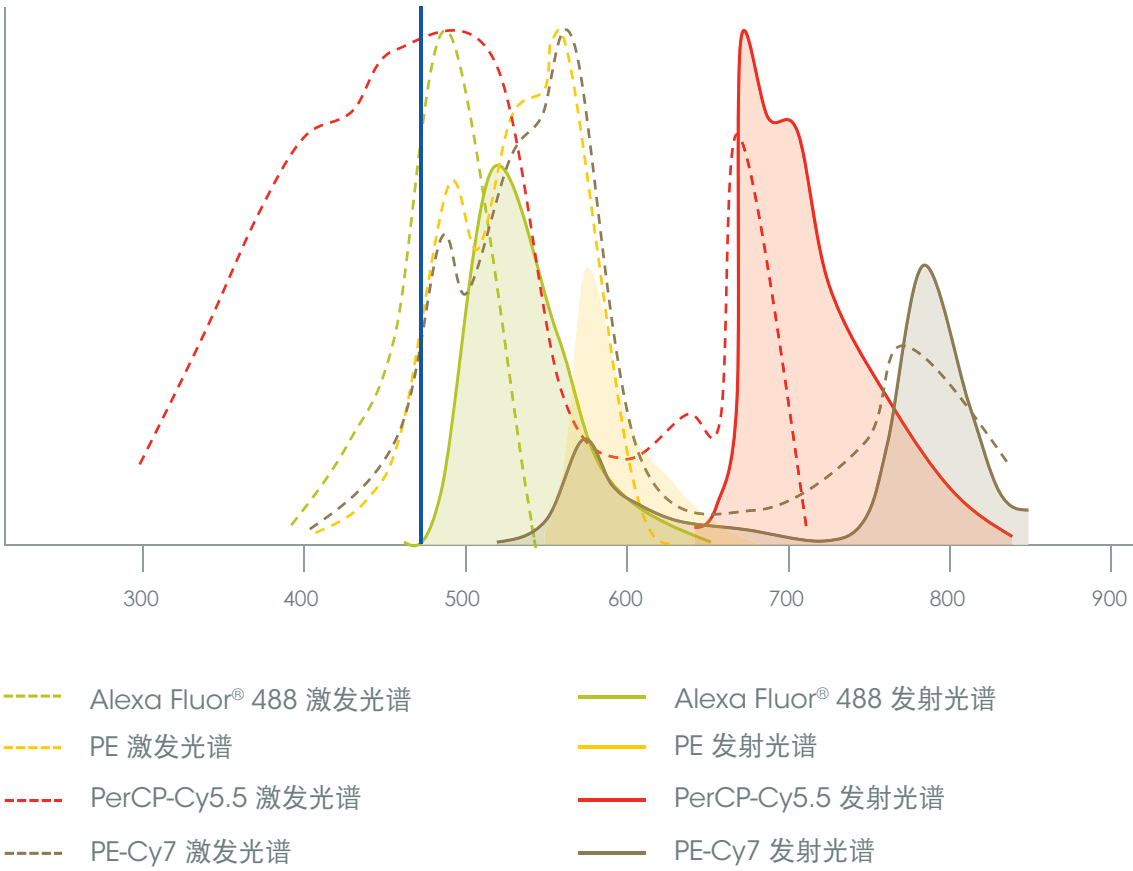
用于流式细胞术的复合荧光染料

多色组合的设计常需要使用复合荧光染料，这类染料由两种共价结合的不同荧光基团组成。一个荧光基团（供体）提供激发特性，而另一个荧光基团（受体）提供发射特性。以 PE-Cy7 为例，藻红蛋白 (PE) 和 Cy7 分别用作供体和受体荧光基团。因此，PE-Cy7 具有 PE 的激发特性和 Cy7 的发射特性。



复合荧光染料可提高组合的大小和灵活性

使用复合荧光染料时，一种激光可激发多种荧光基团，这些荧光基团由不同的检测器测定。例如，Alexa Fluor® 488、PE、PerCP-Cy5.5 和 PE-Cy7 均可由蓝色激光 (488 nm) 激发，但这些荧光基团产生的发射光则分别为绿色、黄色、紫色和红外光。



复合荧光染料操作提示与技巧

- 由于对光漂白高度敏感，复合荧光染料需要时刻避光
- 请勿冷冻复合荧光染料抗体偶联物，否则可能会导致供体荧光基团变性
- 尽可能减少样品固定和穿透处理，因为会减弱荧光基团亮度
- 由于批次间差异较大，不同批次的试剂都需要进行优化
- 由于 FRET 的效率不可能达到 100%，因此某些供体荧光基团的发射光可能出现渗漏
- 在 4°C 下标记细胞，防止复合荧光染料降解或去耦合

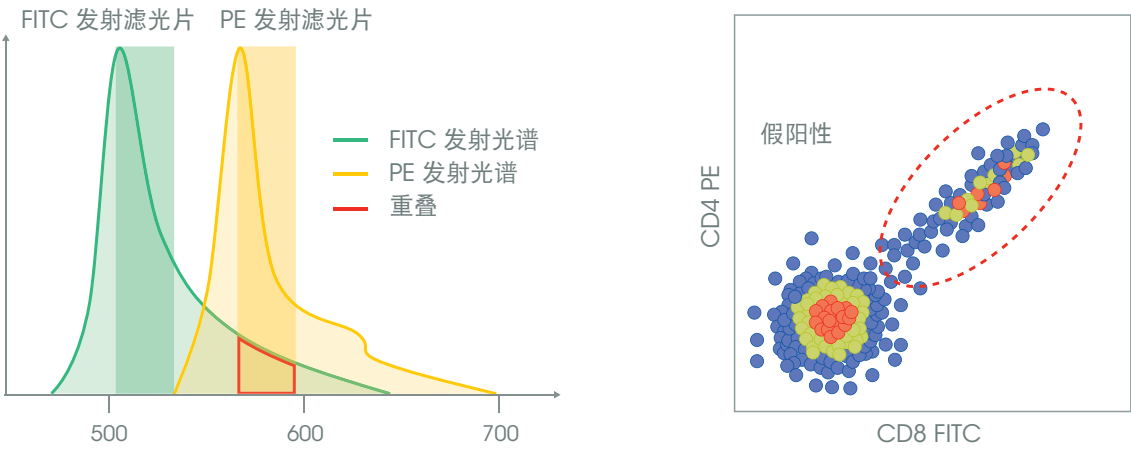
Alexa Fluor® 是 Life Technologies 的注册商标。Alexa Fluor® 染料偶联物包含由 Life Technologies 授权给 Abcam 的技术。

流式细胞术的荧光补偿

荧光基团的发射光谱常出现部分重叠，具体可参见下面示例中的 PE 和 FITC 光谱。该重叠会产生假阳性信号，因为单个通道内可能检出多个荧光基团的荧光。光谱重叠问题在多色实验中尤为明显，必须通过补偿进行修正。补偿可确保所检测的荧光来自目标荧光染料。

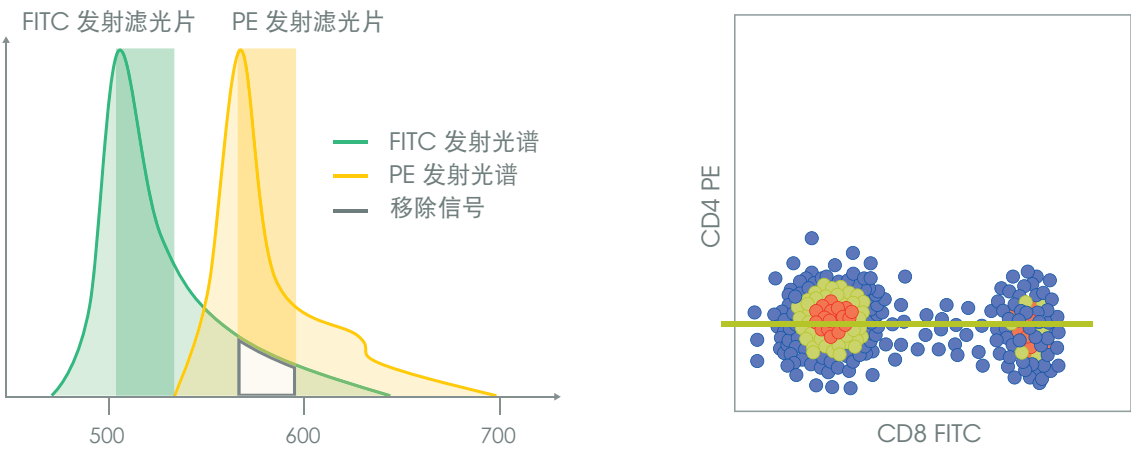
补偿前

用蓝色激光 (488 nm) 激发后，FITC 特异性通道检测到大量 FITC 发射信号，但其发射光谱尾部的光信号会进入检测 PE 所用滤光片的范围。这部分就是我们在 PE 通道中看到的“假阳性”信号（即 FITC 中呈阳性的细胞在 PE 检测中也呈阳性）。



补偿后

进行补偿时，需要准备仅由 FITC-标记抗体染色的样品，调整设置直至 PE 通道内不再出现 FITC 信号。补偿后，FITC 发射光信号只会在 FITC 特异性通道内检出。



应用补偿的提示与技巧

任何流式细胞仪的正确荧光补偿设置过程都基本相同，由于仪器间存在细微差别，因此我们建议，在使用流式细胞仪前务必查看制造商提供的说明。尽管如此，以下指导方法在多数情况下仍适用：

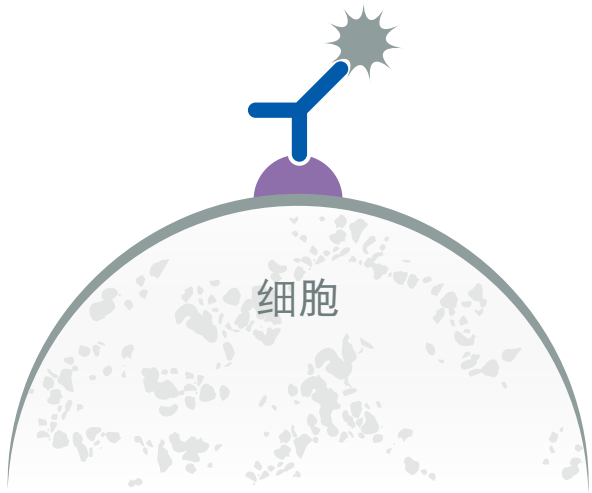
- 应避免同时使用发射光重叠程度较高的某些荧光染料（例如，APC 和 PE-Cy5）。
- 各荧光染料都需要补偿对照，并且应同时包含阳性和阴性细胞群。
 - 设置补偿时应单独使用这些补偿对照。
 - 用作补偿对照的荧光基团必须与实验中所使用的荧光基团一致。
 - 阳性对照的亮度必须大于或等于任何需要使用该补偿设置的样品的亮度。
 - 阳性细胞群至少应占整个细胞群的 10%。
 - 阳性细胞群的背景荧光（或自发荧光）应与阴性对照相同。
 - 理想情况下，对照样品中的阳性和阴性细胞群应为同类型细胞。如果无法实现，请考虑使用荧光补偿微珠。或者，也可以使用不同类型的细胞作为补偿对照，前提是其能够表达目标标记物。
 - 如果对照细胞中的目标标记物含量极低或不存在，则可使用靶向更常见标记物的其他抗体，但需携带相同的荧光染料。
- 通常，补偿设置从处于光谱的远红端（更高的波长）的荧光染料开始，逐步往下到那些处于光谱的低端的荧光染料。务必检查所有通道的补偿情况
- 当我们需要用某一通道来检测弱表达抗原群体时，应该避免同时使用另一个强的荧光染料，且其发射光可能会显著溢出到该弱表达抗原检测通道。
- 当阴性细胞群的中值与阳性细胞群的在溢出检测通道中的中值一致时，补偿设置正确。

抗原检测的直接方法与间接方法

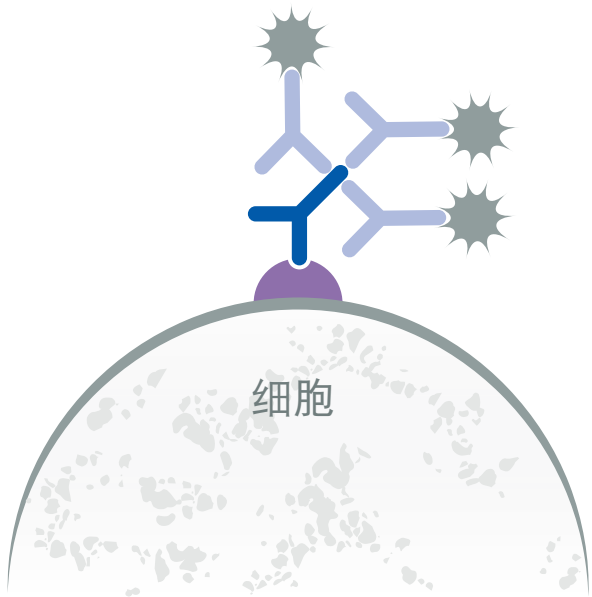
流式细胞术依靠抗体的使用来将荧光基团标记到目标抗原上，可通过荧光基团的偶联对象是一抗还是二抗来区分这两种方法：

- 直接方法：一抗直接偶联荧光基团
- 间接方法：一抗不进行偶联，而是通过能够与一抗结合并且偶联有荧光基团的二抗进行检测

直接



间接



 抗原  一抗  二抗  荧光基团

	直接	间接	备注
时间	短	长	由于直接方法的实验方案仅需一个标记步骤，因此一般用时较短
成本	高	低	相较于偶联一抗，二抗的价格更低。此外，同一个二抗可以被用于检测不同的一抗
复杂度	低	高	间接方法需要选择合适的二抗，并且，这些方法需要额外的对照
灵活性	中	中	商品化的预偶联一抗限制了荧光基团和目标组合的灵活性，但二抗只能允许你同时检测有限数量的抗原
灵敏度	低	高	一抗上可结合多个二抗，从而使信号放大
种属交叉反应	最小化的	可能发生种属交叉反应	二抗可能与靶标以外的其他种属发生交叉反应，使用预吸附二抗可防止交叉反应
背景	降低的	可能存在背景	使用间接方法分析含内源性免疫球蛋白的样品时背景较高

两种方法各有优势和局限性，具体请参见上表。得益于流式细胞仪的高灵敏度，用户通常倾向于采用直接方法，这种方法可显著节省时间和精力，对于多色实验尤为重要。然而，在某些情况下，由于二抗具有放大信号的功能，间接方法也会被需要。

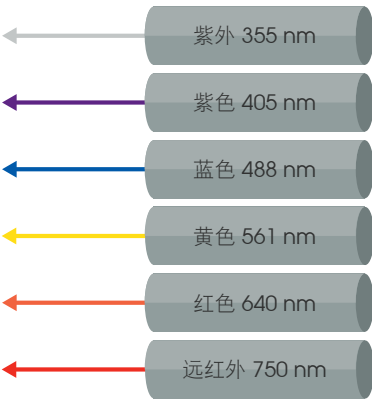
组合设计

现在我们要开始设计实验。在确定了所要研究的抗原后，您需要构建组合。构建组合是多色实验设计中最具挑战的环节之一，以下步骤可指导您轻松、快速地完成该过程。

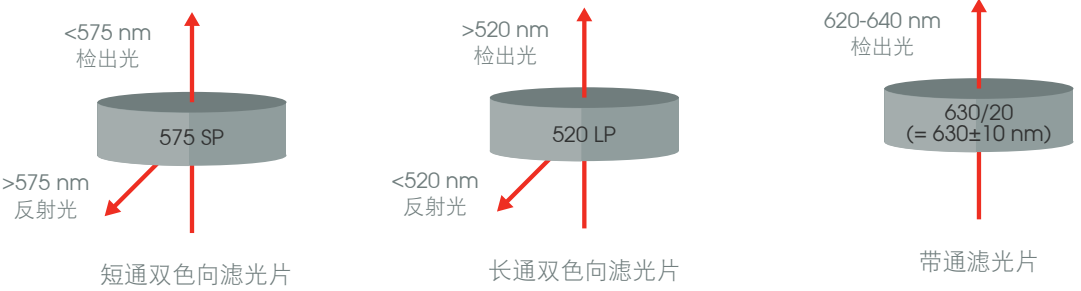
1. 了解您的流式细胞仪

激光：只能使用由激光的相应波长的光激发的荧光染料

为确保最佳检测效果，请务必了解所使用仪器的激光/滤光片组合。参考仪器手册或咨询平台设备负责人

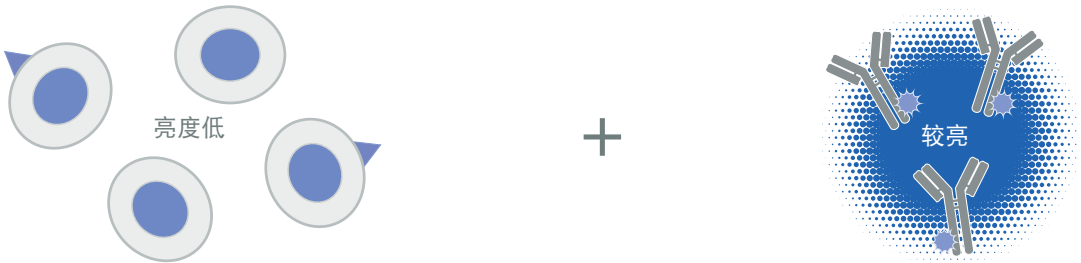


滤光片：荧光染料所发射光线的检测由滤光片控制

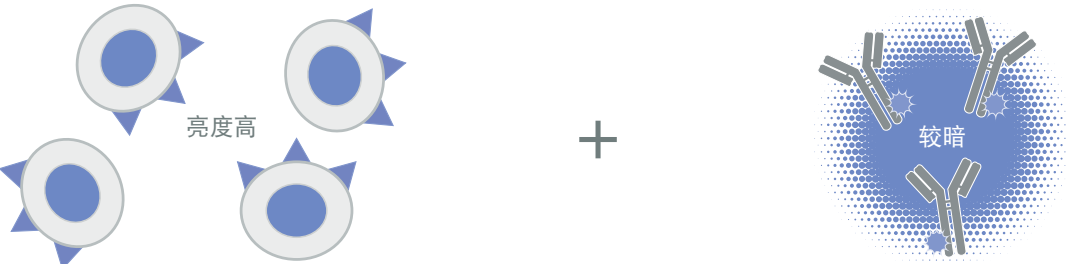


2. 了解您所使用的细胞群、抗原和荧光染料

低/未知抗原表达和/或细胞群稀少 = 使用较亮的荧光染料，如 PE



高抗原表达和/或细胞群数量密集 = 使用较暗的荧光染料，如 PerCP

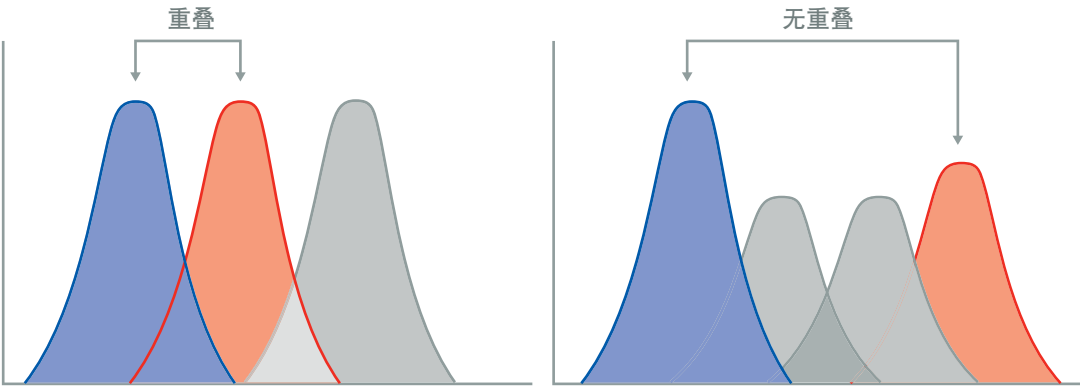


请访问荧光染料表 www.abcam.com/fluorochrome-chart 查询所使用荧光染料的相对亮度

3. 最大限度降低光谱重叠

最大限度降低发射光谱重叠

- 降低荧光染料亮度以避免重叠
- 可通过补偿控制光谱重叠



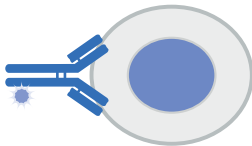
4. 加入对照



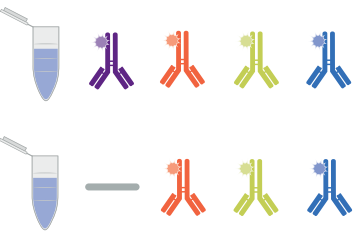
未染色细胞 - 用于确定阴性细胞群、细胞大小以及颗粒度



活/死细胞标记物 - 用于区分健康细胞



单染阳性对照 - 用于设置荧光补偿

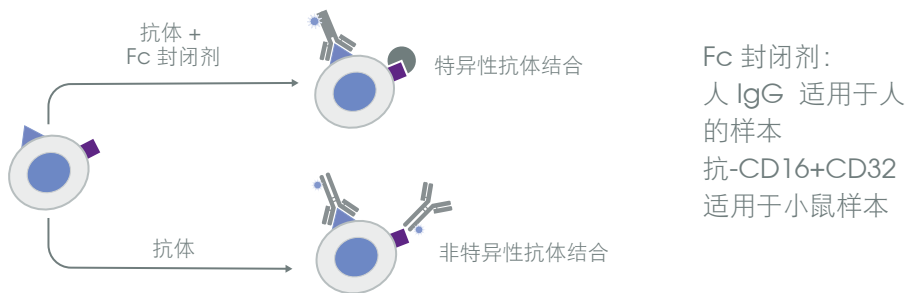


荧光扣除染色 - 定义阳性细胞群

5. 优化染色方案



抗体浓度：需要对抗体进行滴定，以避免非特异性结合或灵敏度降低



Fc 封闭剂：
人 IgG 适用于人的样本
抗-CD16+CD32 适用于小鼠样本

Fc 封闭：针对含有大量 Fc 受体的细胞（例如，吞噬细胞）使用 Fc 封闭剂，以避免非特异性结合

推荐的对照

在多色流式细胞术实验的控制方面，有三个因素非常重要：

	问题	原因	对照
自发荧光	背景偏高	自然产生的细胞组分，如 NADPH，能够发出荧光，从而遮蔽抗原特异性信号	加入未染色但经过处理的细胞以确定阴性细胞群以及细胞的大小和颗粒度
非特异性结合	背景偏高/假阳性	死细胞与抗体结合	利用活/死细胞标记物排除死细胞
		抗体可能结合脱靶表位、Fc-受体或通过其偶联荧光基团结合表位或抗原	加入同型和/或同克隆对照以确定是否存在大量非特异性结合
		二抗与细胞结合*	加入仅经过二抗处理的细胞*
光谱重叠	假阳性/当阳性阴性细胞群边界模糊时设门出现偏差	荧光溢出	加入单一染色的阳性对照以设置荧光补偿
		标记物表达弱，或者没有出现阴性和阳性两种表达群体，并且存在荧光溢出	加入荧光扣除对照 (FMO) 以区分阳性/阴性细胞群

*如果采用间接方法进行染色

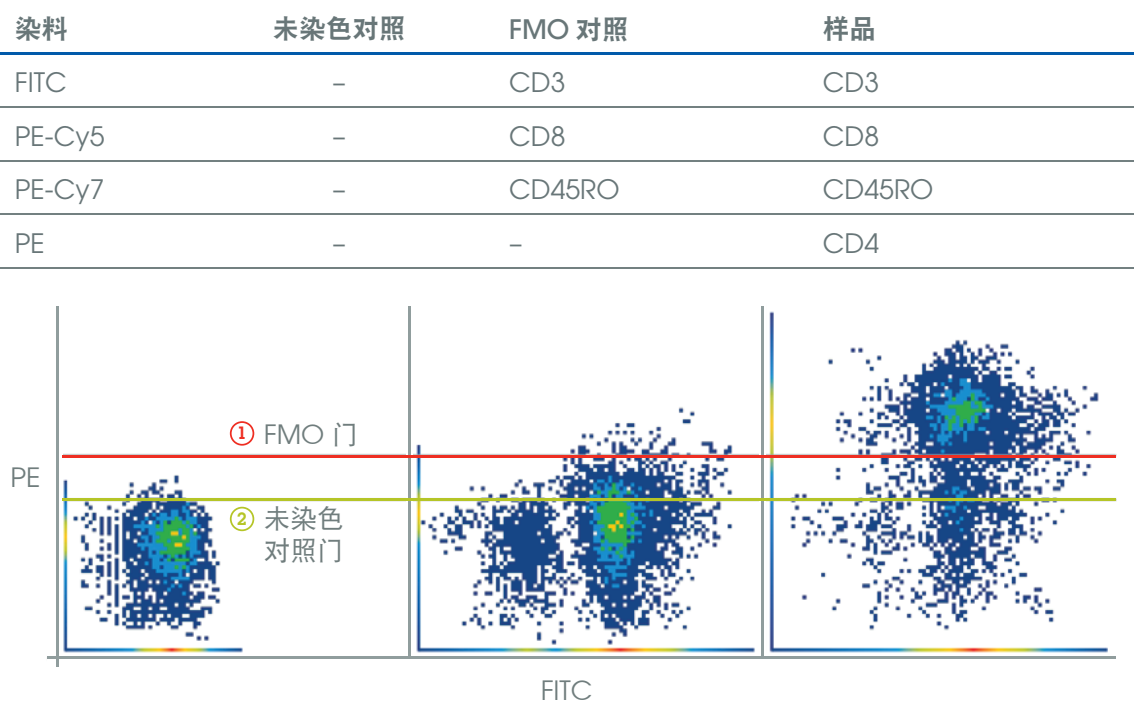
同型对照

同型对照是所分析细胞表面或内部均不存在的抗原（例如 KLH）生成的抗体。理想的同型对照应满足以下条件：

- 宿主种属、类别、亚类、荧光染料类型以及每个免疫球蛋白上荧光染料的分子数量相同。
- 制造工艺和配方相同。

荧光扣除对照

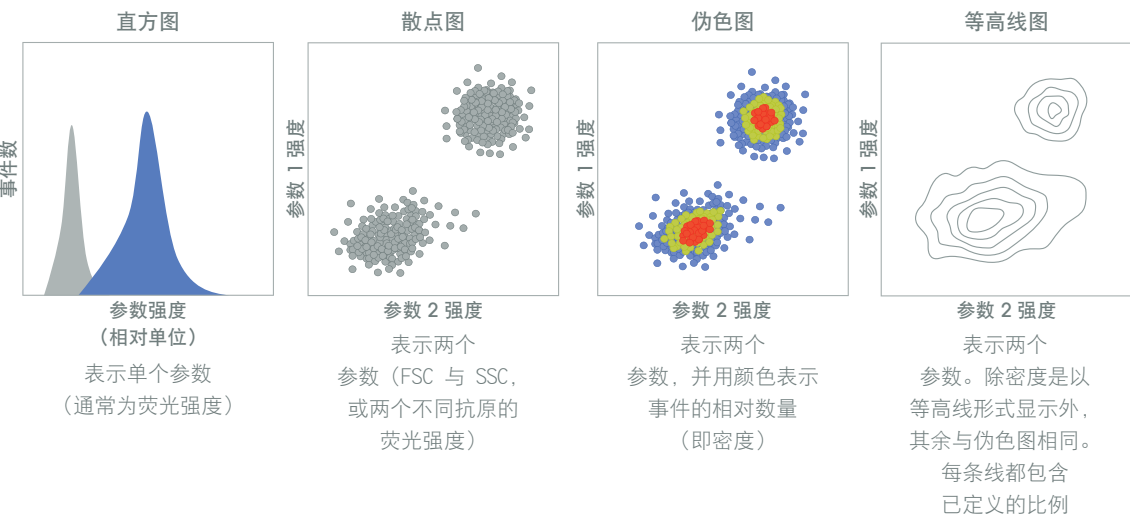
荧光扣除 (FMO) 对照是准确区分阳性和阴性细胞群的关键，这种对照是使用你实验组合中除一种抗体外其他全部抗体染色的样品。FMO 对照可提供真正的阴性对照，因为它考虑了你实验组合中其他所有荧光染料对于检测目标荧光染料的通道中所观测信号的影响。例如，在 FITC、PE-Cy5、PE-Cy7 和 PE 构成的多色组合中，PE FMO 对照中将包含 FITC、Cy5-PE 和 Cy7-PE 试剂，但不含 PE。



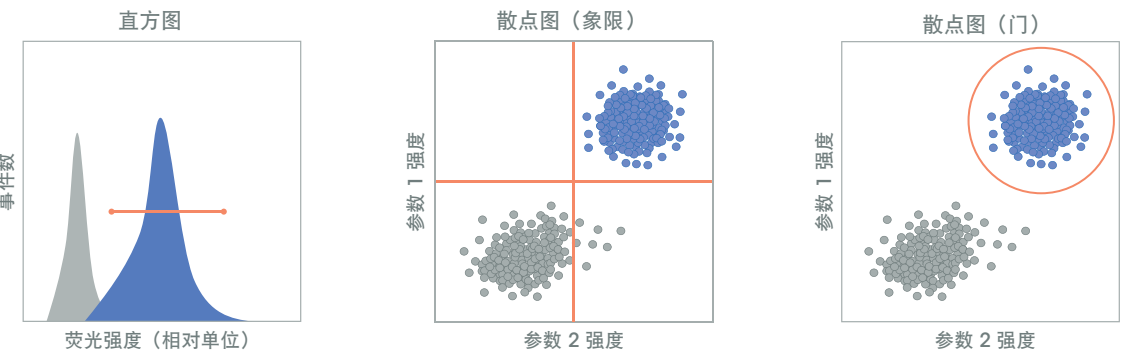
当使用未染色对照设置 PE 阳性/阴性细胞门界（**线 1**）时，右侧散点图中线 1 上方的所有细胞都将显示为 PE 阳性。而使用 FMO 对照设门（**线 2**）时，可发现存在明显的信号延伸，并且某些细胞未呈 PE 阳性。

数据分析

数据作图



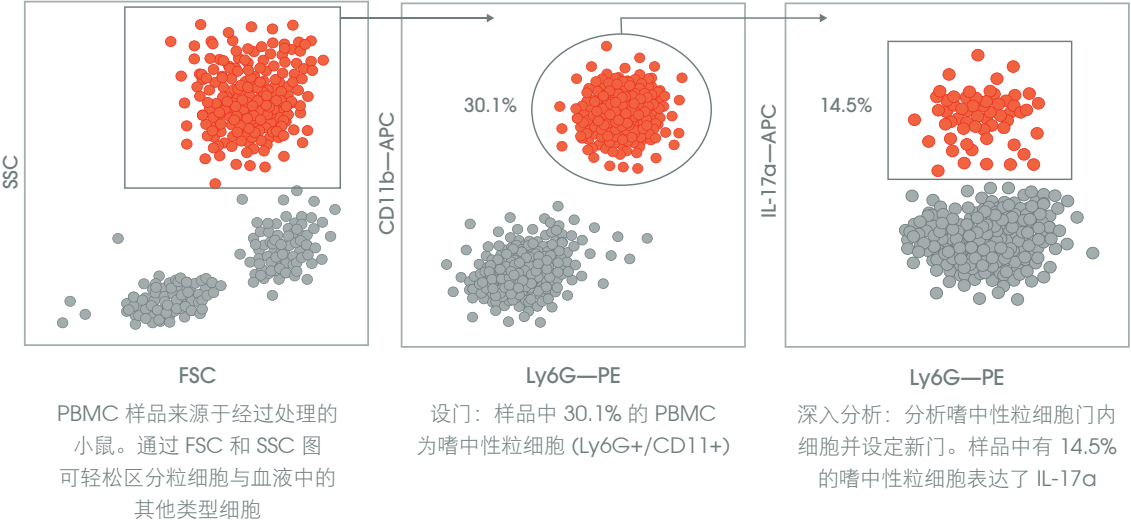
定量数据分析所需的设门策略



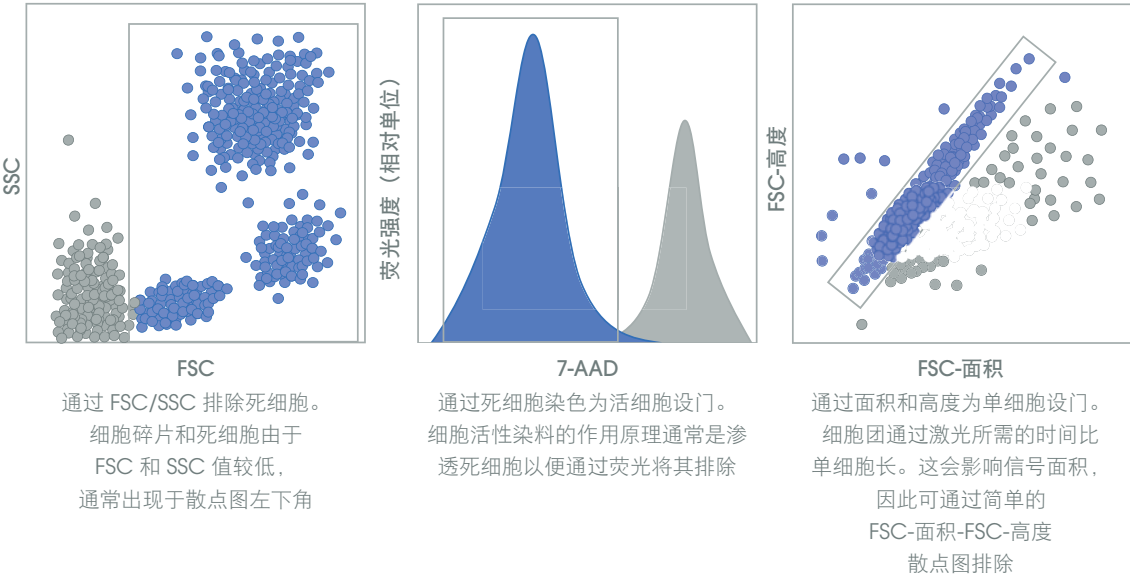
在直方图中，您可在峰上设门以标识表达或未表达标记物的细胞比例

通常可使用多种工具在散点图中设门。象限可轻松标识单阳性或双阳性细胞群，因此较为常用。也可使用其他工具，例如矩形、椭圆和多边形门

计算比例



消除死细胞和双联体



数据定量分析的提示与技巧

用于数据作图和分析的方法有很多，这些方法各有利弊。需悉心了解何种方法最能表达您的数据。

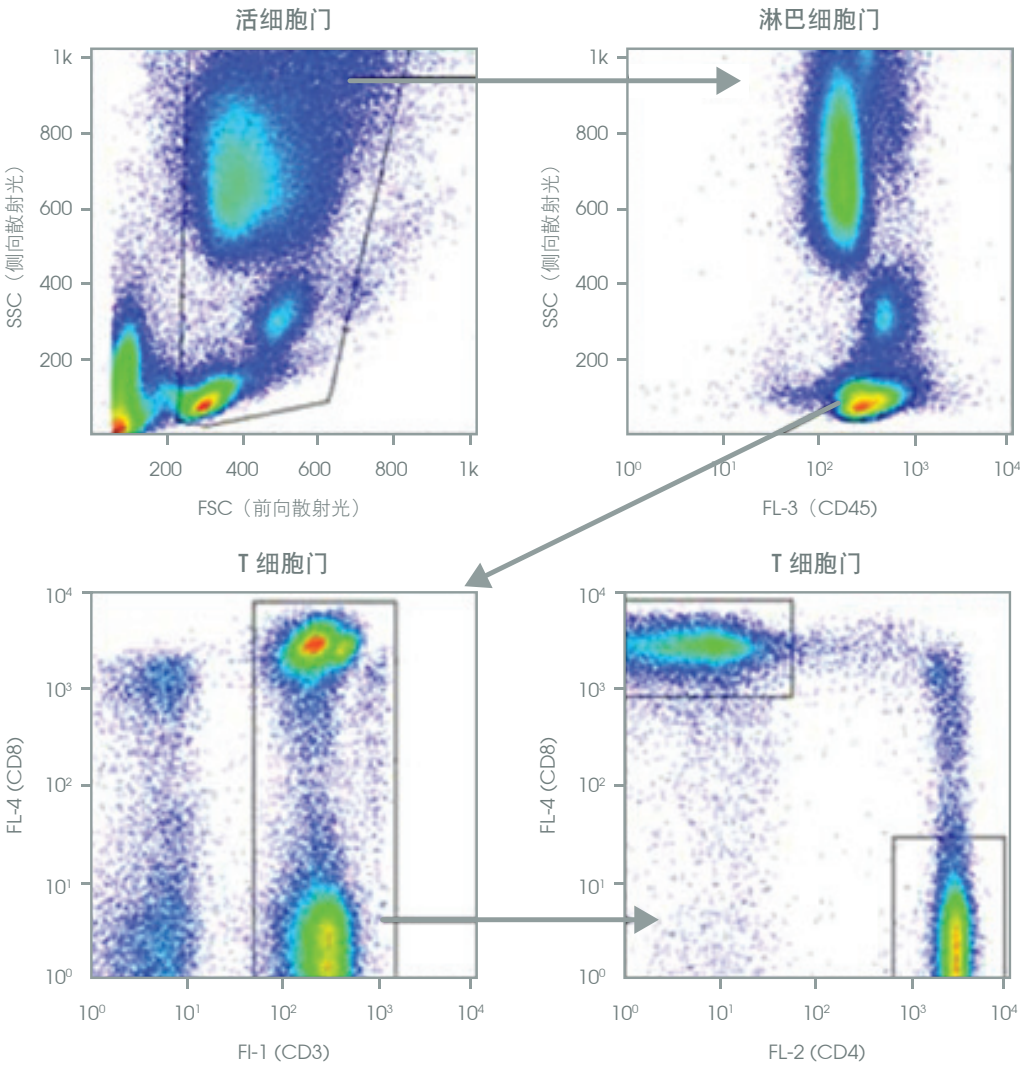
- 对于大部分细胞均表达目标标记物并且染色明亮的情况，**直方图**效果最好。平均荧光强度 (MFI) 为对于亮度的检测值，也是丰度的相对测量值。
- **散点图**：取决于样品类型，您可能仅需要 FSC/SSC 即可括出细胞群以做进一步分析。通常情况下，如果样品中有超过一种以上细胞群拥有相似的 FSC/SSC 分析结果或表达共同的标记物，则使用两种荧光标记物可以更加清晰地区分细胞群。
 - 转换为伪彩图有助于突出同一个区域内相互靠近的多个细胞群体
 - 转换为等高线图有助于突出散点图中不明显的小细胞群
- **设门**可实现细胞群定量分析。记住，一个门代表了总细胞群的一个子集。如需深入分析细胞群以及其中的门，您可能需要推算出基于总细胞群体的数量。例如，上例中，总细胞群的 30.1% 是嗜中性粒细胞，其中 14.5% 表达了 IL-17α。那么对于整个样品而言，表达了 IL-17α 的嗜中性粒细胞仅占 4.36% (30.1 x 0.145)。

Abcam 的多色流式细胞术产品

偶联一抗

与许多其他技术一样，流式细胞术也依靠具有高度特异性的可信赖抗体来得到可靠结果。我们提供了广泛的适用于免疫分型的偶联一抗。

- 被广泛引用的针对人类和小鼠抗原的抗体克隆
- 偶联各种染料的抗体，可为多色组合的构建提供灵活性
- 可按要求提供大包装
- 对于大部分抗体克隆，我们都提供了 PBS-only 的配方产品，如果没有合适的偶联一抗，您可以将抗体与您选择的荧光染料进行偶联



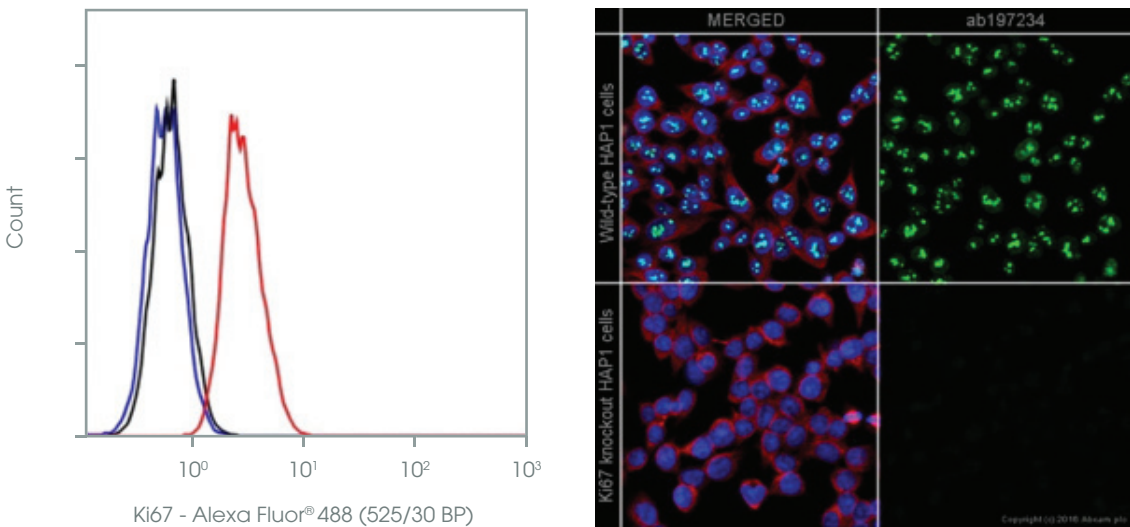
人类 T 细胞标记物多色组合（CD3-FITC、CD4-PE、CD8-APC 和 CD45-PE/Cy7®）(ab106073)。外周血经红细胞裂解后得到的细胞，使用抗体染色并清洗后再采用流式细胞术进行分析。更多信息，请参见数据表。

如需进行除免疫分型以外的其他分析，我们还提供各种已经过偶联和流式细胞术验证的其他靶标的抗体产品。这些产品的优势如下：

- **RabMAB® 技术**：相较于传统单抗，重组抗体的生产提供了更高的亲和性、特异性和一致性
- **灵活多样的染料选择**：有大量供选染料，可满足您的需求
- **游离染料去除步骤**：去除游离染料以确保高信噪比
- **经流式细胞术和 ICC 验证**：我们测试，并提供了高分辨率细胞图像确保产品的特异性

我们已经引入基于敲除 (KO) 的验证方法，并应用于越来越多的抗体产品。通过敲除验证，我们可以在不表达靶蛋白的细胞系（KO 细胞系）中进行测试来确证抗体特异性。所得数据将与正常细胞系（野生型）的数据进行平行比较。如果抗体具有特异性，则在敲除细胞系中应检测不出信号，而在野生型细胞系中能检出特异性信号。

详情请访问 www.abcam.cn/KO-validated



抗 Ki67 抗体 (EPR3610) (Alexa Fluor® 488) (ab197234)。左图：叠加直方图，图中为经 ab197234 染色的 HeLa 细胞（红线）、同型对照抗体（黑线）和未标记样品（蓝线）。右图：使用 ab197234（绿色）对野生型 HAP1 细胞中的 Ki67 染色（上图）和 Ki67 敲除的 HAP1 细胞染色（下图）的共聚焦图像。微管蛋白显示为红色，核 DNA 为蓝色。更多详细信息，请参见数据表。

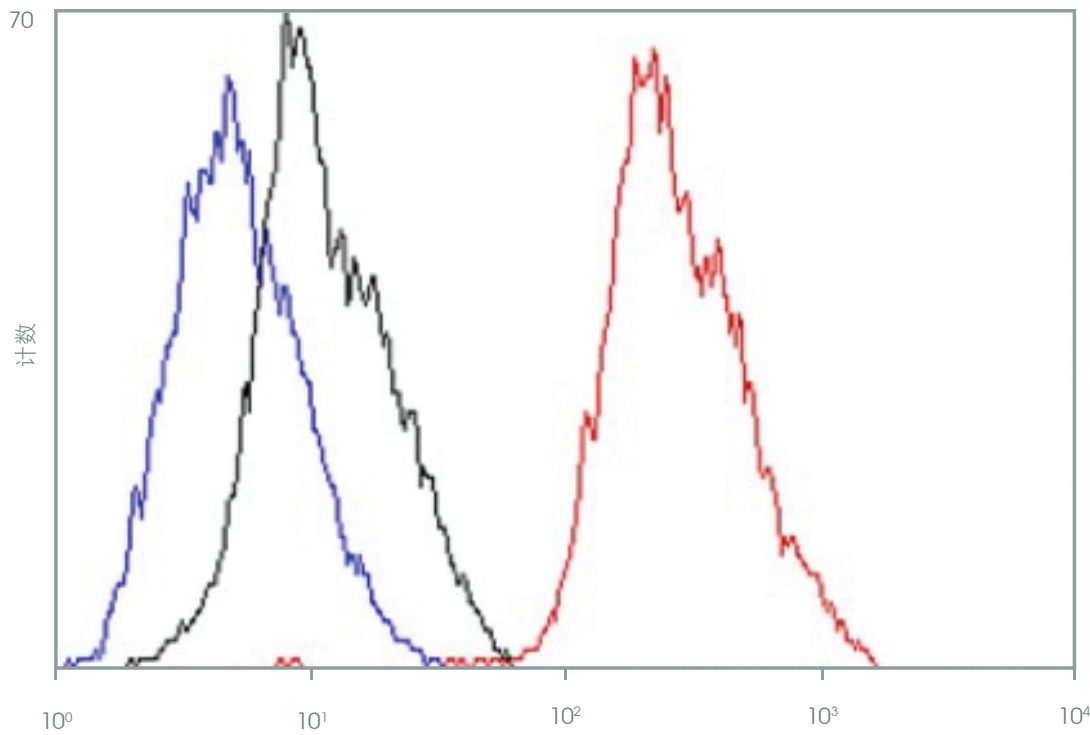
PBS-only 缓冲液配方

无 BSA 和叠氮化物的重组兔单克隆抗体，可轻松用于抗体偶联标记和细胞功能分析：

- 无 BSA、叠氮化物和甘油
- 低内毒素 - 已测试（选定产品）
- 以 100 µg 分装形式提供（浓度至少为 1 mg/mL）
- 现货，可随时配送

详情请访问 www.abcam.cn/PBS-only-RabMAB

Alexa Fluor® 是 Life Technologies 的注册商标。Alexa Fluor® 染料偶联物包含由 Life Technologies 授权给 Abcam 的技术。



兔 IgG，单抗 (EPR25A) - 同型对照（低内毒素，无叠氮化物）(ab199376)。使用 ab194825（红色）及流式细胞术分析Jurkat 细胞的 KCTD5 表达，并与 ab199376（黑色）以及未标记对照（蓝色）进行比较的结果。更多详细信息，请参见数据表

偶联物定制服务

如果没有适合的偶联抗体或所需配方的抗体，我们还可以为您提供定制服务。

偶联物定制服务包括：

- Alexa Fluor® 405、488、555、568、594、647、680、750、790
- FITC、PE、APC、PerCP、生物素

我们还可能提供其他偶联物定制服务，并在实验室进行验证（验证所需时间一般为 2-6 周，具体取决于客户要求）。

定制配方服务：

- 无 BSA
- 无叠氮化物
- 低内毒素含量
- 定制浓度
- 定制规格

详情请访问 www.abcam.cn/custom-conjugation

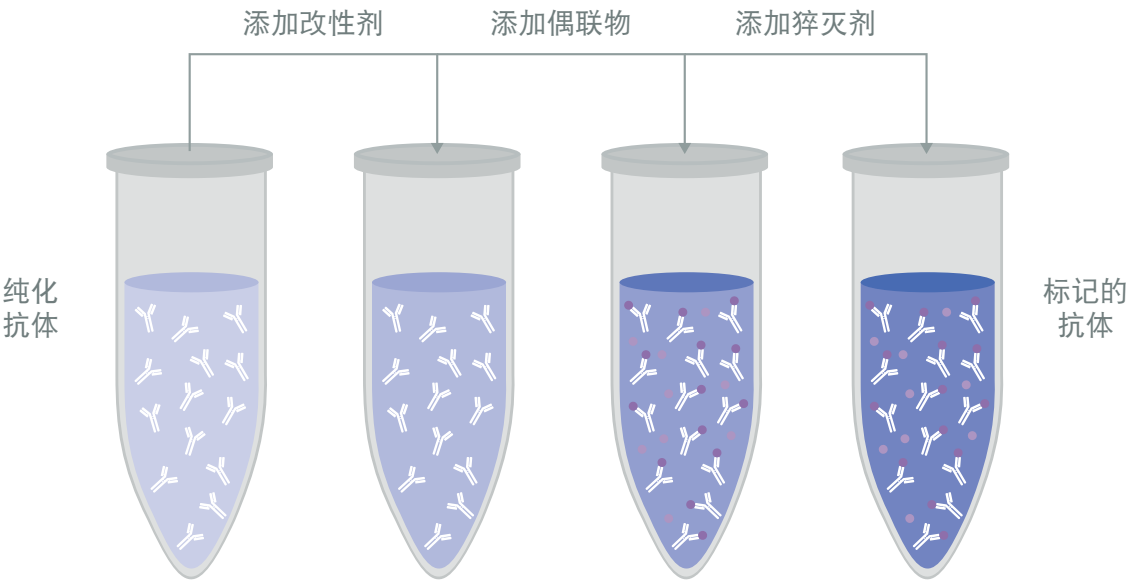
Alexa Fluor® 是 Life Technologies 的注册商标。Alexa Fluor® 染料偶联物包含由 Life Technologies 授权给 Abcam 的

技术。

偶联试剂盒

轻松、快速地将选定标记添加至一抗。可从一系列荧光染料标记中进行选择以完善您的多色组合。

- **快速：**偶联抗体可在 20 分钟内准备就绪且操作时间仅需 30 秒（快速偶联试剂盒），远小于标准偶联试剂盒用时（4 小时）。
- **100%抗体回收率：**无需过柱纯化步骤
- **简单的实验方案**
- **用量小：**单次反应最少可标记 10 µg 抗体



偶联物	最大激发/发射波长	快速偶联试剂盒产品货号	标准偶联试剂盒产品货号
APC	650/660		ab201807
APC-Cy7	650/785	ab102859	
生物素（A 型）	n/a	ab201795	
生物素（B 型）	494/520	ab201796	
FITC	496/578	ab188285	ab102884
PE	496/578		ab102918
PE-Cy7	496/785	ab102903	
PerCP-Cy5.5	482/695	ab102911	

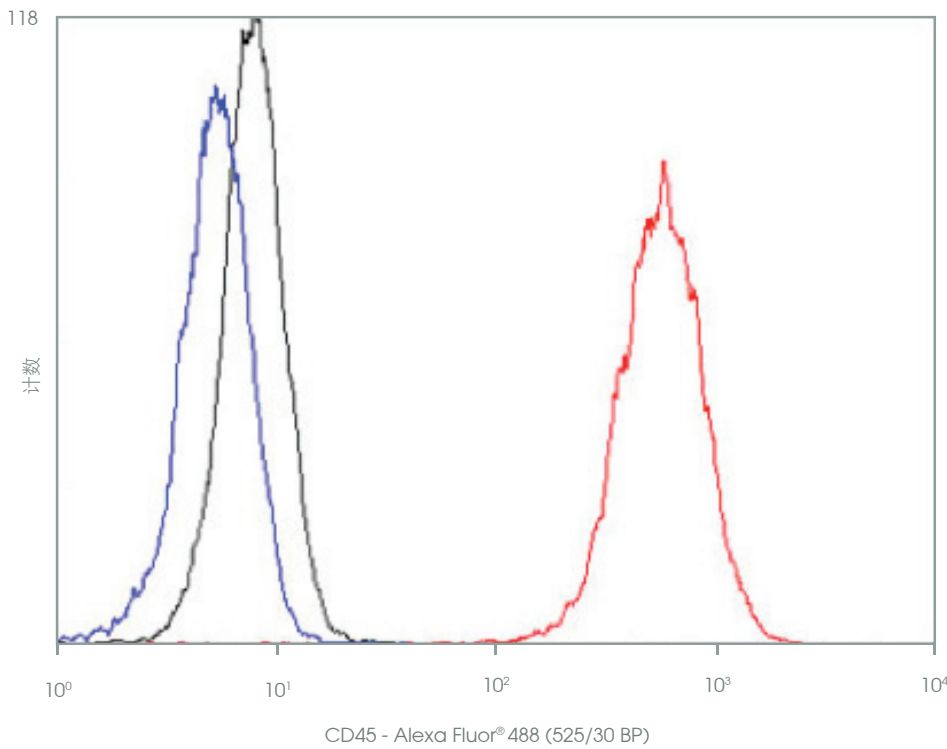
请访问以下网址选择适合的偶联试剂盒：www.abcam.cn/conjugation-kits

二抗

- 目前我们提供 9 种不同 Alexa Fluor[®] 染料偶联的二抗，是多色流式细胞术的理想选择。这些染料
- 涵盖了整个光谱范围（紫外至近红外），光谱重叠极小。
 - 可靶向包括兔、小鼠、大鼠、山羊和鸡等多个物种的抗体及其同型抗体。
 - 包括大量各种预吸附抗体以确保种属交叉反应程度低。

	Alexa Fluor [®] 405	Alexa Fluor [®] 488	Alexa Fluor [®] 555	Alexa Fluor [®] 594	Alexa Fluor [®] 647
抗小鼠 IgG H&L	ab175658	ab150105	ab150114	ab150116	ab150115
抗兔 IgG H&L	ab175652	ab150077	ab150074	ab150080	ab150075
抗大鼠 IgG H&L	ab175671	ab150157	ab150154	ab150160	ab150155
抗山羊 IgG H&L	ab175664	ab150129	ab150130	ab150132	ab150131
抗鸡 IgG H&L	ab175674	ab150169	ab150174	ab150172	ab150171

详情请访问 www.abcam.cn/Alexa-Fluor-secondaries



山羊抗大鼠 IgG H&L (Alexa Fluor[®] 488) (ab150157)。叠加直方图显示了使用 ab30446 和二抗山羊抗大鼠 IgG H&L (Alexa Fluor[®] 488) (ab150157) 染色 Jurkat 细胞（红线）、同型对照抗体（黑线）和未标记样品（蓝线）的结果。更多详细信息，请参见数据表。

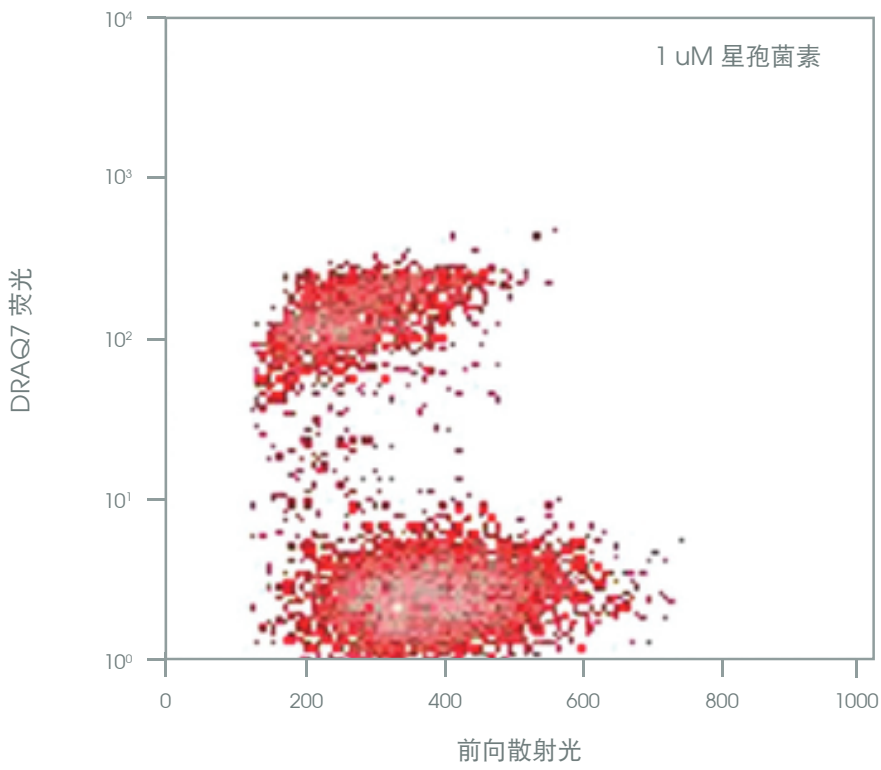
Alexa Fluor[®] 是 Life Technologies 的注册商标。Alexa Fluor[®] 染料偶联物包含由 Life Technologies 授权给 Abcam 的技术。

细胞活性测定染料

我们提供一系列颜色选项和活性检测类型用以评估细胞活性，此类检测利用了某些染料只能在细胞膜不完整时进出细胞的特性。

产品	最大激发/发射波长	产品货号	特性
7-氨基放线菌素 D (7-AAD)	488/647	ab142391	非渗透性染料，通过嵌入 DNA 对死细胞细胞核染色
钙黄绿素 AM	495/515	ab141420	细胞渗透性染料，接触到活细胞的胞内酯酶后水解为带绿色荧光的钙黄绿素
DRAQ7™ 1 mL (0.3 mM)	599 和 644/665-678	ab109202	非渗透性远红染料，通过嵌入 dsDNA 对死细胞细胞核染色，毒性低，适用长期培养
死/活细胞鉴定试剂盒	活细胞染料：494/515 死细胞染料：528/617	ab115347	一步测定：活细胞染料具有膜渗透性，被胞内酯酶水解后会发射荧光。死细胞染料无法渗透细胞膜，可嵌入 DNA
核绿 DCS1	503/526	ab138905	细胞非渗透性绿色荧光染料，可在嵌入 dsDNA 后发射荧光
碘化丙啶	536/617	ab139418	非渗透性细胞核染料，可在嵌入 DNA/RNA 后发射荧光

详情请访问 www.abcam.cn/cell-viability



DRAQ7™ 1 mL (0.3 mM) (ab109202)。经 1 μM 星孢菌素处理的 Jurkat 细胞的 DRAQ7™ 染色结果（图上半部）

同型对照

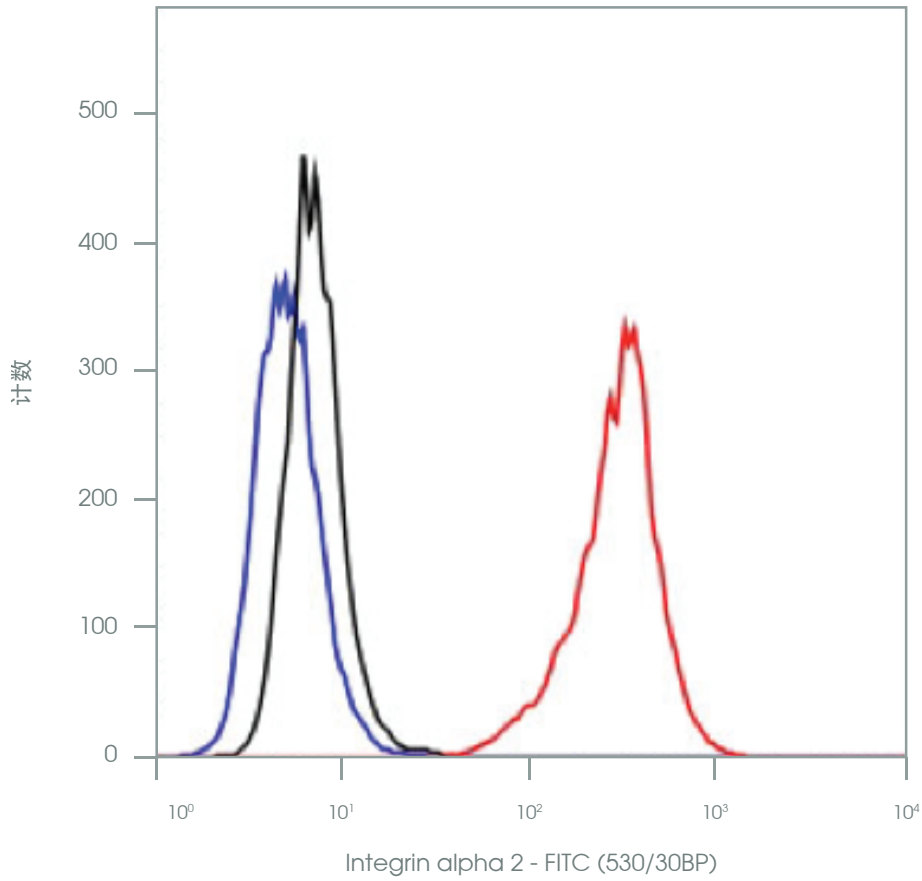
我们提供完整的同型对照系列产品，包括未偶联和偶联 Alexa Fluor® 染料、生物素、PE、FITC 的产品及其他形式产品。

同型对照特色产品

宿主种类	同型	偶联物	克隆 ID	产品货号
兔	IgG	未偶联	EPR25A	ab172730
兔	IgG	Alexa Fluor® 488	EPR25A	ab199091
兔	IgG	Alexa Fluor® 647	EPR25A	ab199093
小鼠	IgG	未偶联		ab37355
小鼠	IgG1	未偶联	B11/6	ab91353
小鼠	IgG1	FITC	B11/6	ab91356
小鼠	IgG1	未偶联	MOPC-21	ab18443
小鼠	IgG2a	未偶联	MOPC-173	ab18413

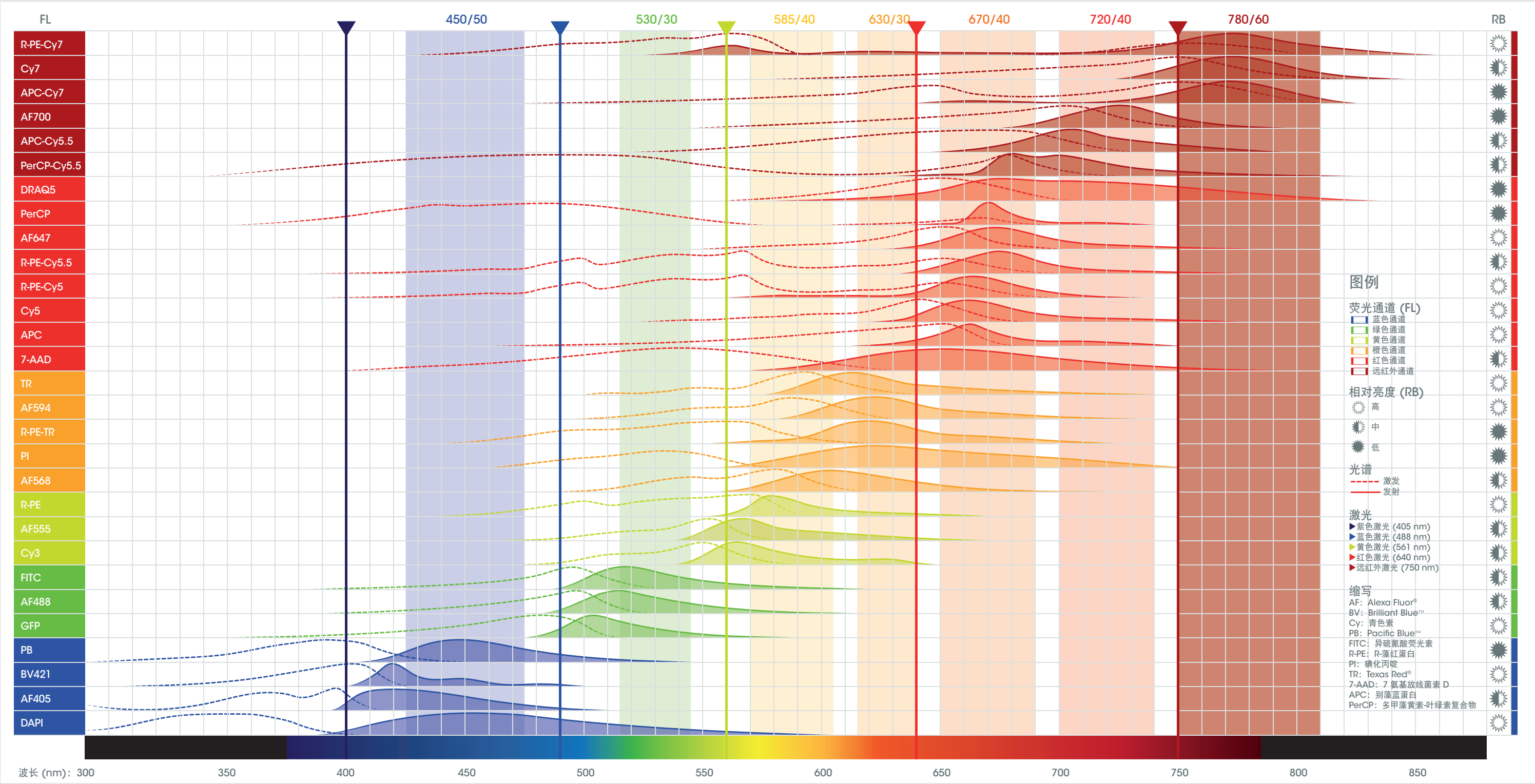
详情请访问 www.abcam.cn/isotype-control

Alexa Fluor® 是 Life Technologies 的注册商标。Alexa Fluor® 染料偶联物包含由 Life Technologies 授权给 Abcam 的技术。



兔 IgG，单抗 (EPR25A) - 同型对照 (ab172730)。叠加直方图显示 ab133557 染色的 A549（人肺癌）细胞（红线）、同型对照抗体（黑线）(ab172730) 和未标记对照（蓝线）的结果

荧光染料图



如何使用本图

1. 检查仪器

型号、激光数量、滤光片和检测器决定了可以使用的荧光染料。
– 尝试根据各激光的激发范围选择合适的荧光染料

2. 选择明亮的染料

可按染料在特定仪器上的亮度对可获得的染料进行排序。
– 为弱表达抗原选择强的荧光染料偶联的抗体，反之亦然

3. 将荧光溢出降至最低

光谱重叠程度决定了是否需要进行荧光补偿。
– 通过牺牲亮度避免荧光溢出
– 避免强荧光染色的细胞群的荧光溢出到其他对于靶标检测灵敏度有更高要求的检测通道中

示例

荧光染料	靶标表达	激光	通道	亮度	补偿	组合
FITC APC	高低	蓝色 红色	绿色 红色	中高	低	非常适合
FITC PE	高低	蓝色 蓝色	绿色 黄色	中高	良好	适合
PerCP 7-AAD	高低	蓝色 蓝色	红色 红色	低中	严重	不适合

Alexa Fluor® 是 Life Technologies 的注册商标。Alexa Fluor® 染料偶联物包含由 Life Technologies 授权给 Abcam 的技术。

