蛋白标记技术及荧光选择

荧光蛋白标记技术是将荧光标记物以化学方法与特异性抗体共价结合，在抗体-荧光结合物与对应的抗原特异结合后，通过荧光显微镜等仪器设备观察荧光蛋白标记物的信号情况，从而实现对待检物的定位、定性或定量检测。在实验过程中，我们经常会遇到如何选择荧光标记物、多重荧光检测时如何进行荧光标记物的搭配等问题。

作为标记的荧光标记物应符合以下要求：

- 具有能与蛋白形成共价键的化学基团，且与蛋白结合后不易解离，同时未结合的荧光标记物及其降解产物易于清除；
- 荧光效率高，在与抗体结合后仍能保持较高的荧光效率；
- 与蛋白结合后不影响蛋白原有的生化与免疫性质；
- 标记方法简单，安全无毒；
- 与蛋白结合稳定，终产物易于保存。

标记分类

比较常用的荧光染料有：

- 小分子荧光素：FITC, Rhodamin
- Cy 系列：Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7
- Alexa Fluor 系列：AF350, AF488, AF555, AF594, AF647, AF680, AF750
- 荧光蛋白：PE, APC, PerCP
- 荧光串联标记：PE-Cy, PerCP-Cy 等

不同种类荧光标记抗体的适用实验类型

激发波段	405nm	488nm	555nm	594nm	647nm	680nm	750nm
适用实验	IF FCM	IF FCM	IF	IF	IF FCM	IF WB	IF WB 红外成像
荧光标记物	AF350 AF405	FITC AF488 PE PerCP	Cy3 AF555 Rhodamine PE TRITC	AF594 Texas Red	AF647 APC Cy5	AF680 Cy5.5	AF750 Cy7

做多重荧光检测设计实验时，一般会遵循以下原则：

- 确认检测设备的参数：荧光显微镜通常是一个卤素光源配若干个滤光片，流式细胞仪通常是 2-3 个激光管配若干个检测通道；
- 在可选范围内选择更强的荧光，常用荧光及其强弱程度排序：PE>APC>PE-Cy5>PE-Cy5.5/PerCP-Cy5.5>FITC；
- 细胞表面蛋白可以选择 PE 等荧光蛋白，如需要进入到细胞内的检测，尽量选择小分子荧光素；
- 对荧光多重染色，荧光素与抗体组合需要考虑目的抗原的含量，样本中含量低的指标优先选择荧光较强的荧光素。如果是分步加入荧光抗体，考虑到荧光的衰减，按照荧光素的强弱排序依次加入。

抗体标记选择

偶联到抗体上的探针主要有酶（辣根过氧化酶 HRP），荧光基团（FITC, PE, Cy, APC 等）和生物素。而选用带有哪种标记探针的二抗主要取决于具体的实验。

对于 western blot 和 ELISA，常用的二抗是酶标二抗；

细胞或组织标记实验（组织免疫化学，细胞免疫化学，流式细胞术）中通常使用荧光基团标记的二抗；

免疫组化中也可以使用辣根过氧化酶或碱性磷酸酶标记的二抗。