

Keuze van fluorochromen voor flowcytometrische immuunfenotypering, een handreiking

1. Inleiding

Om de binding van een antistof aan een antigeen zichtbaar te maken, wordt gebruik gemaakt van fluorescentie. Hierbij wordt een fluorochroom aan een antistof gebonden. Een fluorochroom is een molecuul dat na aangestraald te zijn door een bepaalde lichtbron (meestal laserlicht), emissie van licht kan geven van een bepaalde golflengte. Wanneer het door het fluorochroom uitgezonden licht op een cel gedetecteerd kan worden, heeft de binding tussen antigeen en antistof plaatsgevonden en is het bewijs geleverd dat het eiwit op of in de cel aanwezig is.

2. Enkele voorwaarden

- Het antigeen waartegen het geconjugeerde monoklonale antilichaam (MoAb) is gericht, de target, dient altijd eerst vastgesteld te worden en is leidend in de keuze van het aan het MoAb geconjugeerde fluorochroom.

- Het golflengte spectrum van het fluorochroom is bepalend voor het gebruik van een conjugaat en de combinatie binnen een panel. Men dient een panel samen te stellen van conjugaten waarvan de spectrale overlap onderscheidend en compenseerbaar is (bijv. APC en PECy5). Echter, in die situaties waarin MoAbs, ieder geconjugeerd aan de desbetreffende fluorochromen gericht zijn tegen goed van elkaar te onderscheiden populaties (bijv. T- en B-cellen), kan er toch voor gekozen worden om deze conjugaten te combineren. Het is echter aan te raden om een alternatief fluorochroom voor een van beide te kiezen indien dit voor handen is (bijv. de combinatie van PECy5.5 en APC) (zie figuur 1).

Fluorochroom-combinaties met interlaser excitatie en emissie die vermeden moeten worden zijn bijvoorbeeld:

- PE-Cy5 en APC
- PE-Cy7 en APC-Cy7
- PE-TR en A594

- Fluorochromen gekoppeld aan MoAbs die gericht zijn tegen kleine cel populaties of cel populaties met lage antigeen-dichtheid dienen een hoge intensiteit te hebben. Kies een fluorochroom met lagere intensiteit voor het aantonen van cellen met hoge antigeen-dichtheid. Daarnaast dienen ook fluorochromen, waarmee populaties met lage antigeen dichtheid binnen een grotere populatie (bijvoorbeeld CD8) aangetoond moeten worden, een hoge intensiteit te hebben.

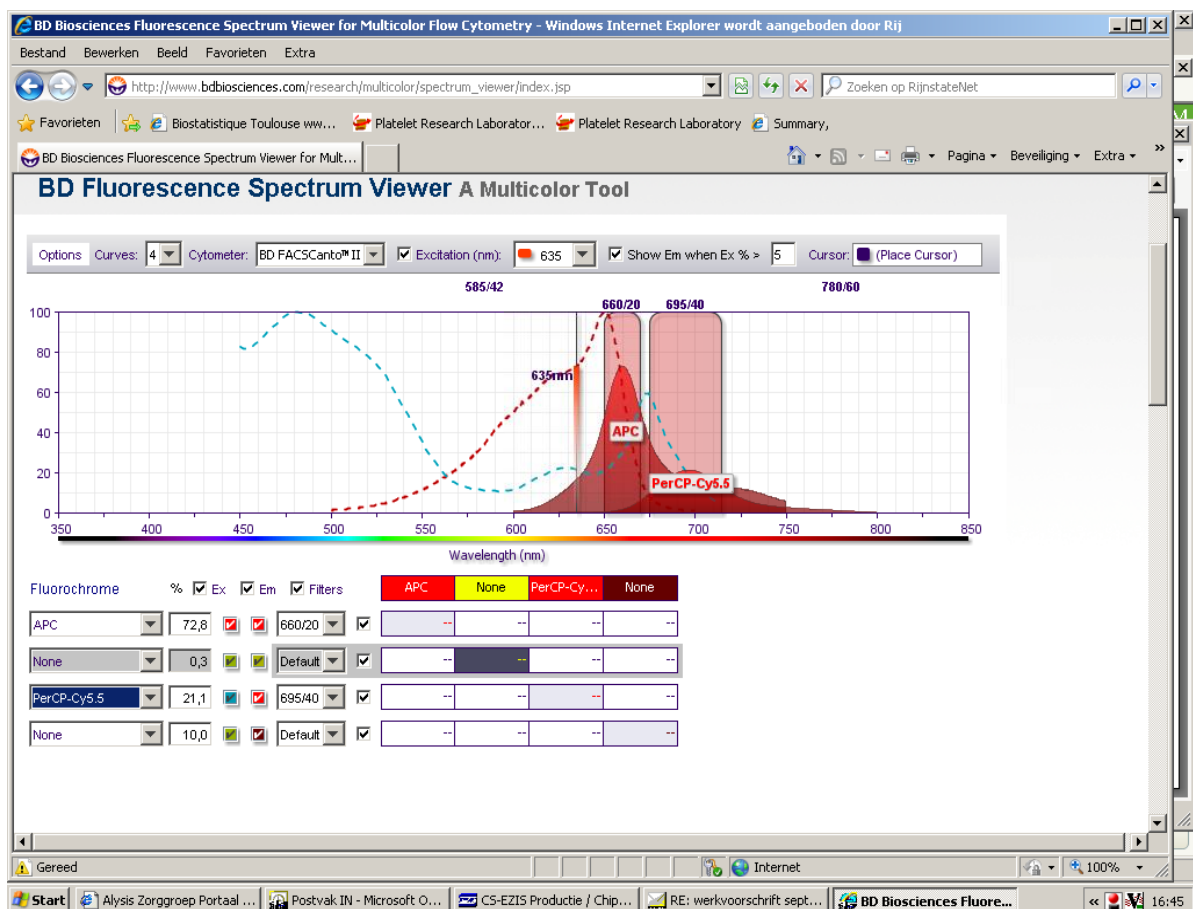
- Er bestaan echter uitzonderingen: indien een normale kleine populatie een relatief hoge gemiddelde antigeen-dichtheid heeft (bijvoorbeeld CD10 expressie op precursor B-cellen) terwijl de maligne “tegenhanger” een nog hogere expressie heeft, is het aan te bevelen om een relatief zwak fluorochroom te gebruiken in plaats van een fluorochroom met hogere intensiteit.

- De MoAbs en de fluorochromen in combinaties (panels) dienen elkaar niet te beïnvloeden. Het is mogelijk dat fluorochromen elkaar versterken (bijv. een FRET [Fluorescence resonance energy transfer] effect) of verzwakken (quenching), bijvoorbeeld indien de antigenen, waartegen de MoAbs gericht zijn, dicht bij elkaar gelokaliseerd zijn. Daarom dienen voor de implementatie van panels van MoAbs de conjugaten in een volledig panel vergeleken te worden met de individuele MoAbs.

- Bij de keuze van een fluorochroom dient gerealiseerd te worden dat:

- a. Conjugaten met fluorochromen die een hoge intensiteit en een hoge signaal-ruis verhouding bezitten, hebben vaak de voorkeur omdat ook cellen met een lage antigeen-dichtheid aangetoond kunnen worden. Echter voor het aantonen van celpopulaties die een zeer hoge antigeen-dichtheid bezitten (bijvoorbeeld CD38 op plasmacellen) kan de compensatie van

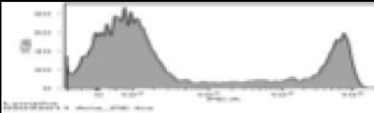
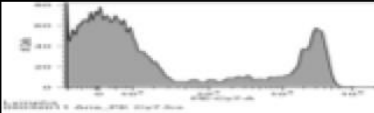
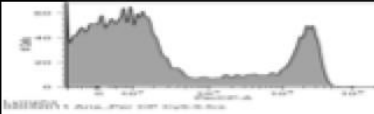
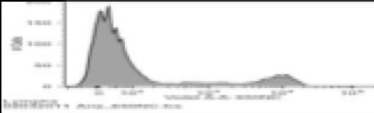
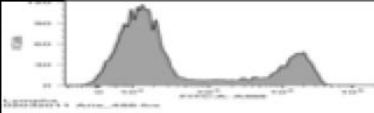
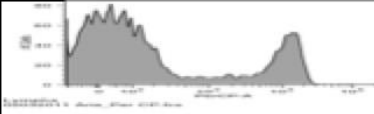
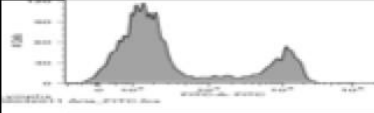
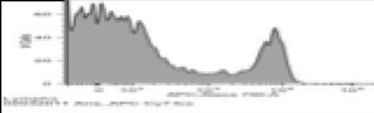
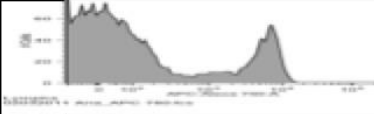
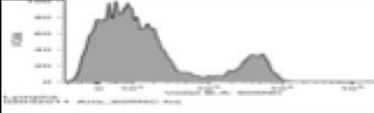
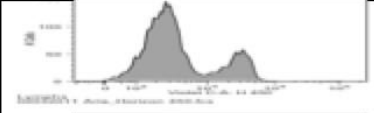
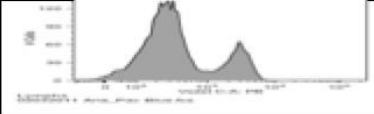
- spectrale overlap bemoeilijkt worden (doorstraling) zodat voor die gevallen een fluorochroom met een niet te hoge intensiteit gekozen dient te worden.
- Tandem fluorochromen (bestaande uit twee aan elkaar gekoppelde fluorochromen waarbij de energie van het geëxciteerde fluorochroom doorgegeven wordt aan het tweede fluorochroom, die daardoor voor de emissie zorgt) kunnen uit elkaar vallen waardoor de fluorescentie van het betreffende MoAb in het verkeerde kanaal gemeten wordt. Daarom is, met name bij een tandem fluorochroom, van belang de juiste bewaarcondities voor de conjugaten (vervaldatum, 4-8^o C opslag in complete donker) in acht te nemen en de bewaartermijnen van panels vast te stellen.
 - Het cyanine deel van een tandem fluorochroom specifiek kan binden aan, met name, monocytten.
 - Het primaire fluorochroom van het tandem fluorochroom achtergrond fluorescentie kan geven. Voorbeelden hiervan zijn:
* PE met PE-TR, PE-Cy5, PE-Cy5.5 of PE-Cy7
* APC met APC-A700 of APC-Cy7
 - In sommige gevallen kunnen MoAb conjugaten van tandem fluorochromen (vooral tandems van APC) last hebben van idiosyncrasie (afwijkend bindingskarakteristieken) resulterend in meer of mindere intensiteit. Dit fenomeen lijkt met lading van het fluorochroom te maken te hebben, is moeilijk voorspelbaar en men dient alert te blijven voor een afwijkende fluorescentie.



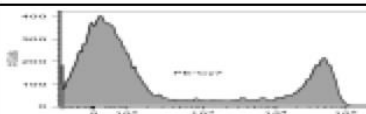
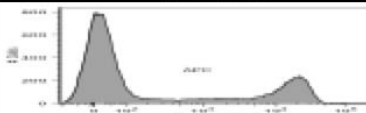
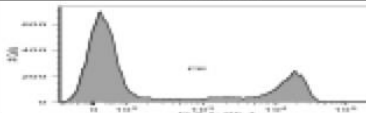
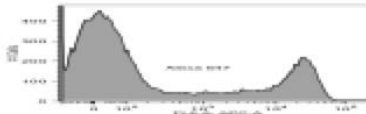
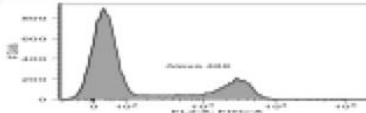
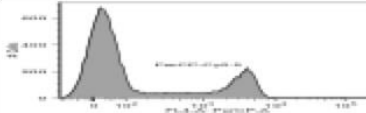
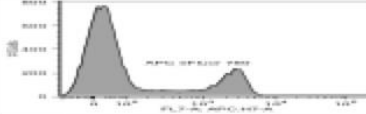
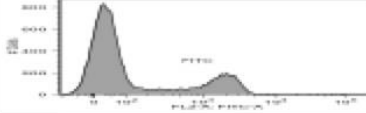
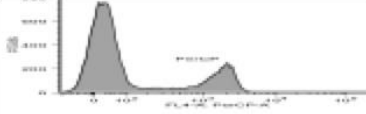
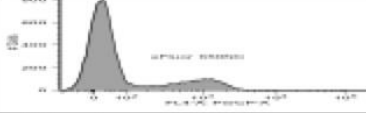
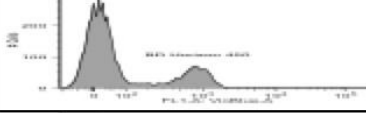
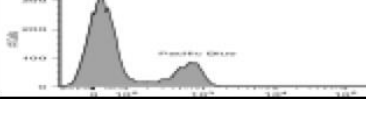
Figuur 1 Voorbeeld van spectrale overlap tussen PECy5.5 en APC

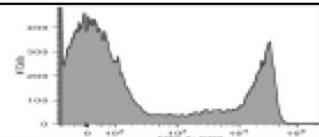
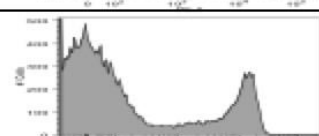
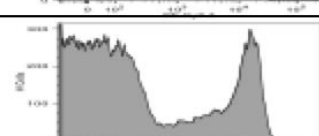
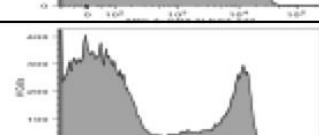
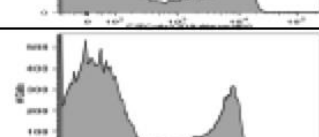
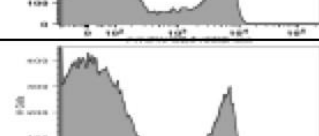
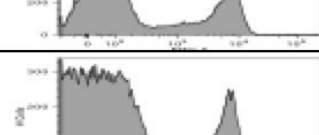
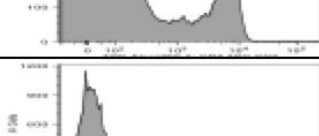
Overzicht van intensiteit van Fluorochromen gekoppeld aan CD8 gemeten in verschillende flowcytometers

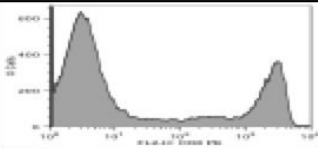
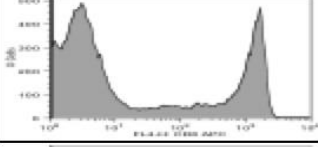
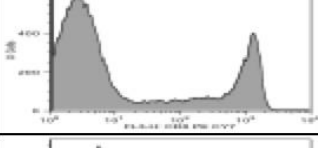
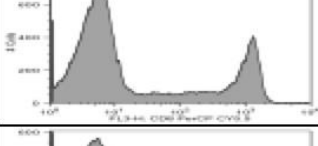
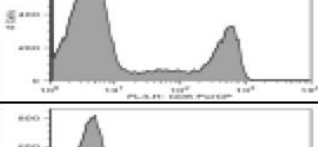
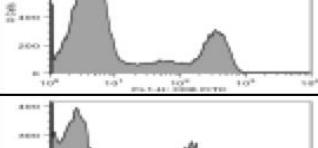
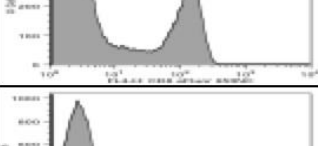
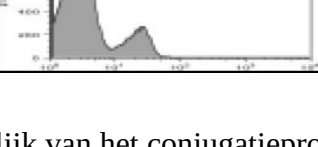
(Ref. <http://www.dartmouth.edu/~dartlab/index.php?page=anti-cd8-stain-index>)

Fluorochrome	Laser	Filter	PMT	Stain Index	FACSAria
PE	blue	575/26 nm band pass	Blue-D	380	
PE-Cy7	blue	780/60 nm band pass	Blue-A	181	
PerCP-Cy5.5	blue	695/40 nm band pass	Blue-B	117	
eFluor-650NC	violet	655/20 nm band pass	Violet-A	104	
Alexa Fluor-488	blue	522/31 nm band pass	Blue-E	100	
PerCP	blue	695/40 nm band pass	Blue-B	68	
FITC	blue	522/31 nm band pass	Blue-E	51	
APC-Cy7	red	78/60 nm band pass	Red-A	42	
APC-eFluor-780	red	78/60 nm band pass	Red-A	40	
eFluor-605NC	violet	605/20 nm band pass	Violet-B	22	
BD Horizon-V450	violet	450/40 nm band pass	Violet-C	10	
Pacific Blue	violet	450/40 nm band pass	Violet-C	9	

Fluorochrome	Laser	Filter	PMT	Stain Index	Gallios
PE	blue	575/30 nm band pass	FL-2	617	
PE-Cy7	blue	755 nm long pass	FL-5	532	
Brilliant Violet-421	violet	450/40 nm band pass	FL-9	476	
APC	red	660/20 band pass	FL-6	440	
Alexa Fluor 647	red	660/20 band pass	FL-6	307	
APC-Cy7	red	755 nm long pass	FL-8	196	
APC eFluor-780	red	755 nm long pass	FL-8	174	
Alexa Fluor 488	blue	525/40 nm band pass	FL-1	133	
PerCP-Cy5.5	blue	675/20 nm band pass	FL-4	118	
FITC	blue	525/40 nm band pass	FL-1	97	
eFluor-650NC	red	660/20 band pass	FL-6	71	
BD Horizon-V450	violet	450/40 nm band pass	FL-9	61	
Pacific Blue	violet	450/40 nm band pass	FL-9	44	
PerCP	blue	675/20 nm band pass	FL-4	32	
eFluor-605NC	blue	620/30 nm band pass	FL-3	27	

Fluorochrome	Laser	Filter	PMT	Stain Index	MACSQuant
PE-Cy7	blue	750 nm long pass	FL-5	321	
APC	red	655 nm long pass	FL-6	243	
PE	blue	585/40 nm band pass	FL-3	234	
Alexa Fluor-647	red	655 nm long pass	FL-6	176	
Alexa Fluor-488	blue	525/50 nm band pass	FL-2	45	
PerCP-Cy5.5	blue	655 nm long pass	FL-4	45	
APC-eFluor-780	red	750 nm long pass	FL-7	31	
FITC	blue	525/50 nm band pass	FL-2	28	
APC-Cy7	red	750 nm long pass	FL-7	27	
PerCP	blue	655 nm long pass	FL-4	26	
eFluor-650NC	blue	655 nm long pass	FL-4	15	
BD Horizon-V450	violet	450/50 nm band pass	FL-1	13	
Pacific Blue	violet	450/50 nm band pass	FL-1	9	

Fluorochrome	Laser	Filter	PMT	Stain Index	FACSCanto
APC	red	660/20 nm band pass	Red-C	195	
PE	blue	585/42 nm band pass	Blue-D	132	
PE-Cy7	blue	780/60 nm band pass	Blue-A	85	
Alexa Fluor-647	red	660/20 nm band pass	Red-C	72	
PerCP-Cy5.5	blue	670 nm long pass	Blue-B	62	
PerCP	blue	670 nm long pass	Blue-B	50	
Alexa Fluor-488	blue	530/30 nm band pass	Blue-E	50	
APC eFluor-780	red	780/60 nm band pass	Red-A	34	
FITC	blue	530/30 nm band pass	Blue-E	29	
APC-Cy7	red	780/60 nm band pass	Red-A	27	
eFluor-650NC	blue	670 nm long pass	Blue-B	13	

Fluorochrome	Laser	Filter	PMT	Stain Index	FACSCalibur
PE	blue	585/42 nm band pass	FL-2	555	
APC	red	661/16 nm band pass	FL-4	295	
PE-Cy7	blue	650 nm long pass	FL-3	272	
PerCP-Cy5.5	blue	650 nm long pass	FL-3	172	
Alexa Fluor 647	red	661/16 nm band pass	FL-4	145	
Alexa Fluor 488	blue	530/30 nm band pass	FL-1	106	
PerCP	blue	650 nm long pass	FL-3	97	
FITC	blue	530/30 nm band pass	FL-1	79	
eFluor 650NC	red	661/16 nm band pass	FL-4	49	
eFluor 605NC	blue	585/42 nm band pass	FL-2	7	

De intensiteit van de fluorochroom kan echter variëren afhankelijk van het conjugatieproces en de MoAb waaraan deze gekoppeld is. Daarom is de vergelijking van meerdere overzichten uit verschillende bronnen afkomstig van belang om tot een juiste conclusie te komen:

Ref. <http://www.cincinnatichildrens.org/assets/0/78/1067/2481/2525/2527/d420beff-63a9-41d8-a18c-bbadea6693ac.pdf>



Fluorochrome	Ex (nm)	Em (nm)	Filter	LP	ϵ (cm ² M ⁻¹)	Quantum Yield	Brightness Intensity	Brightness
Qdot 655	405	655	660/20	640	5700000	0.60	3420000	5
PE	496,565	575	575/25	550	1960000	0.84	1646400	5
Qdot 605	405	605	610/20	595	2800000	0.40	1120000	5
Qdot 585	405	585	585/15	570	2200000	0.40	880000	5
APC	645	660	670/30	-	240000	0.68	163200	5
Qdot 525	405	525	525/50	-	360000	0.40	144000	5
Texas Red	595	603	610/20	600	116000	0.90	104400	5
Alexa Fluor 546	556	573	585/15	-	104000	0.96	99840	5
Alexa Fluor 647	650	668	670/30	-	239000	0.33	78870	5
Qdot 800	405	800	780/60	750	8000000			5
Qdot 705	405	705	710/50	670	8300000			5
Cy5	649	670	660/20	-	250000	0.40	100000	4
RFP dTomato	554	581	585/15	-	138000	0.69	95220	4
PE Cy7	496,565	774	780/60	755				4
PE Cy5	496,565	670	660/20	635				4
Cy7	743	767	780/60	755	250000	0.28	70000	3
Alexa Fluor 568	578	603	610/20	565	91300	0.75	68475	3
Oregon Green 488	496	516	530/30	505	76000	0.90	68400	3
Alexa Fluor 488	495	519	530/30	505	71000	0.94	66740	3
Alexa Fluor 680	679	702	730/45	690	184000	0.38	66240	3
Alexa Fluor 532	532	554	560/40	557	81000	0.80	64800	3
DSRed (RFP)	558	583	585/15	-	75000	0.79	59250	3
EYFP*	514	524	530/30	505	84000	0.63	52920	3
Venus	515	528	530/30	505	92000	0.57	52440	3
m Orange	546	562	575/25	550	71000	0.69	48990	3
PerCP Cy5.5	482	690	710/50	685				3
PE Cy5.5	496,565	690	710/50	685				3
APC Cy5.5	650	690	730/45	690				3
7AAD	546	647	710/50	685	25000			3
Cy5.5	675	694	670/30	-	250000	0.23	57500	3
Alexa Fluor 660	663	690	670/30	-	132000	0.37	48840	3
Alexa Fluor 700	696	719	730/45	690	192000	0.25	48000	3
RFP Tomato	554	581	585/15	-	69000	0.69	47610	3
Alexa Fluor 594	590	617	610/20	600	73000	0.64	46720	3
FITC	493	525	530/30	505	78000	0.50	39000	3
EGFP*	489	508	530/30	505	55000	0.60	33000	3
AmCyan	458	489	525/50	505	40000	0.75	30000	3
APC/Alexa Fluor 750	650	774	780/60	755	240000	0.12	28800	3
m Strawberry	574	596	610/20	600	90000	0.29	26100	3
PerCP	482	675	710/50	635	320000			3
PE Texas Red	496,565	613	610/20	600	116000			3
APC Cy7	650	774	780/60	755				3
Cy3	514	566	575/25	550	150000	>0.15	>22500	1
Hoechst Blue (33258)	352	455	450/50	-	40000	0.59	23800	1
Pacific Blue	410	455	450/50	-	29500	0.78	23010	1
Indo-1 Violet (High Ca2+)	330	405	450/50	-	33000	0.66	18480	1
Marina Blue	362	459	450/50	-	18700	0.89	16643	1
m Cherry	587	610	610/20	600	72000	0.22	15840	1
DAPI	345	461	450/50	-	27000	0.58	15660	1
Alexa Fluor 555	555	565	575/25	550	150000	0.10	15000	1
Cascade Blue	377	420	450/50	-	29000	0.50	14500	1
Cascade Yellow	402	545	525/50	505	25000	0.56	14000	1
m Raspberry	597	624	610/20	600	86000	0.15	12900	1
m Tangerine	568	585	585/15	-	38000	0.30	11400	1
ECFP	434	477	450/50	-	26000	0.40	10400	1
Alexa Fluor 430	434	541	525/50	505	16000	0.55	8800	1
Lumifer Yellow CH	428	438	525/50	505	24200	0.21	6082	1
m Banana	540	553	530/30	505	6000	0.70	4200	1
m Plum	589	649	670/30	635	41000	0.10	4100	1
m HoneyDew	487	537	530/30	505	17000	0.12	2040	1
Pacific Orange	410	551	525/50	505				1
APC-H7	650	785	780/60	755				1
Alexa Fluor 350	346	442	450/50	-	19000			1
Qdot 565	405	565	575/25	550	1100000			?
Qdot 545	406	545	560/40	535				?
PI (propidium iodide)	535	617	610/20	685				?
PE-Alexa Fluor 610	496,565	628	610/20	600				?
Indo-1 Blue (Low Ca2+)	350	475	450/50	-				?
Hoechst Red (33342)	350	650	670/30	635				?
Alexa Fluor 632	632	647	670/30	-	100000			?
Alexa Fluor 610	612	628	610/20	600	138000			?
Alexa Fluor 514	517	542	530/30	505	80000			?
Alexa Fluor 800	562	825	830/30	805	71000			?
Alexa Fluor 405	401	421	450/50	-	34000			?
EGFP*			510/20	495				
EYFP*			545/35	525				

633nm He-Ne Red Laser
561nm Yellow-Green Laser
488nm Argon or Blue Diode Laser
405nm Violet Laser
355nm UV Laser



Ref. http://www.bdbiosciences.com/documents/Multicolor_Fluorochrome_Guide.pdf



Brightness of various fluorochrome conjugates

Relative Brightness		Reagent	Filter
BRIGHTEST		Brilliant Violet™ 421	450/50
		PE	575/26
		Brilliant Violet 605	610/20
		BD Horizon PE-CF594	610/20
		PE-Cy5	670/14
		APC	660/20
BRIGHT		PE-Cy7	780/60
		Alexa Fluor® 647	660/20
		PerCP-Cy5.5	695/40
MODERATE		Alexa Fluor® 488	530/30
		FITC	530/30
		BD Horizon V450	450/50
		Pacific Blue™	450/50
DIM		Alexa Fluor® 700	730/45
		PerCP	695/40
		APC-Cy7	780/60
		AmCyan	525/20
		BD Horizon V500	525/20
		BD APC-H7	780/60

Freshly isolated lymphocytes, stained with anti-human CD4 (RPA-T4) conjugated with various fluorochromes run on a BD LSR II flow cytometer. The fluorochromes were ranked based on observed stain index values. This chart is meant as a guideline of relative stain indices of various fluorochromes. Observed relative stain indices may vary depending on instrument, instrument configuration, reagents, and cell type used.