

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-F022

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm)

Elabscience®铁死亡抑制蛋白 1(FSP-1)荧光法测试盒

Ferroptosis Suppressor Protein-1 (FSP-1) Activity

Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动(植)物组织以及细胞样本中铁死亡抑制蛋白1(FSP-1)的活力。

检测原理

铁死亡抑制蛋白 1(Ferroptosis suppressor protein-1, FSP-1)基于其氨基酸系列 C 末端片段、核易位、过表达等因素诱导非 caspase 依赖性的细胞凋亡, 并可通过 FSP1-CoQ10-NAD(P)H 途径、平行于经典的谷胱甘肽(GSH)-GPX4 途径使细胞免于铁死亡, 在细胞生命活动中发挥“双刃剑”的作用。

本试剂盒的检测原理: FSP-1 催化底物反应生成 NADH, 使其在激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm 条件下荧光值上升, 加入抑制剂后会抑制 FSP-1 的活力造成荧光值上升的速率降低, 测定其差值可计算出 FSP-1 的活力。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	40 mL × 2 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂 × 2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	抑制剂 (Inhibitor)	0.08 mL × 1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	0.05 mL × 1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	1 mmol/L 标准品溶液 (1 mmol/L Standard Solution)	1 mL × 1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)，恒温箱

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25°C，试剂四使用前需将液体离心。

② 试剂二工作液的配制：

取一支试剂二，加入2 mL的试剂一，混匀，未使用完的试剂二工作液可分装在-20°C保存7天。

③ 试剂三工作液的配制：

将试剂三：试剂一按体积比= 1：19配制，混匀，按需配制，未使用完的试剂三工作液可分装在-20°C保存3天。

④ 试剂四工作液的配制：

将试剂四：试剂一按体积比= 1：19配制，按需配制，未使用完的试剂四工作液可分装在-20°C保存10天。

⑤ 显色工作液的配制：

将试剂四工作液：试剂一按体积比= 1：11配制，按需配制，避光待用，当天使用有效。

⑥ 100 μmol/L标准品溶液的配制：

将试剂五与试剂一按体积比= 1：9进行稀释，按需配制，现配现用。

⑦ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	20	30	40	50	60	70	100
100 μmol/L 标准品溶液(μL)	0	40	60	80	100	120	140	200
试剂一(μL)	200	160	140	120	100	80	60	0

样本准备

① 样本处理

组织样本:按照组织样本质量(g):试剂一体积(mL)=1:9的比例匀浆,4℃,10000 ×g离心10 min,取上清置于冰上待测,制备好的上清在4 h内完成检测。

细胞样本:取 1×10^6 个细胞离心后弃上清,加入200 μ L试剂一匀浆,4℃,10000 ×g离心10 min,取上清置于冰上待测,制备好的上清在4 h内完成检测。

② 样本的稀释

在正式检测前,需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验,根据预实验的结果,结合本试剂盒的线性范围:0.15-5.00 U/L,请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	2-5	10%青豆组织	不稀释
10%小鼠肾组织	1-2	10%小鼠肺组织	不稀释
10%小鼠心组织	不稀释	10%小鼠脑组织	不稀释
1×10^6 个Hela细胞	不稀释	1×10^6 个HL-60细胞	不稀释

注:稀释液为试剂一。

实验关键点

- ① 试剂三工作液、试剂四工作液使用前需混匀。
- ② 标准品易氧化,使用时注意现配现用。
- ③ 测定孔加入试剂三工作液后,需确保样本和试剂三工作液混合均匀。

操作步骤

- ① 标准孔：取 10 μL 不同浓度的标准品溶液加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 10 μL 样本加入相应的酶标孔中。
对照孔：取 10 μL 样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中的标准孔和对照孔加入 15 μL 试剂一。
向步骤①中的测定孔加入 15 μL 试剂三工作液。
- ③ 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min。
- ④ 向步骤③的各孔中加入 15 μL 试剂二工作液。
- ⑤ 向步骤④的各孔加入 60 μL 显色工作液。
- ⑥ 振板 5 s，荧光酶标仪设置激发波长 535 nm，发射波长 587 nm，立即检测测定孔和对照孔荧光值 F_1 。
- ⑦ 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min，振板 5 s，荧光酶标仪设置激发波长 535 nm，发射波长 587 nm，测定各孔荧光值 F_2 。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度的标准品(μL)	10	--	--
样本(μL)	--	10	10
试剂一(μL)	15	--	15
试剂三工作液(μL)	--	15	--
37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min			
试剂二工作液(μL)	15	15	15
显色工作液(μL)	60	60	60
振板 5 s，荧光酶标仪设置激发波长 535 nm，发射波长 587 nm，立马检测测定孔和对照孔荧光值 F_1 。25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min，振板 5 s，荧光酶标仪设置激发波长 535 nm，发射波长 587 nm，测定各孔荧光值 F_2 。标准曲线使用 F_2 进行拟合。			

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

① 组织样本中铁死亡抑制蛋白 1(FSP-1)酶活计算公式:

定义: 25 ℃ 条件下, 每千克组织在每升反应体系中每分钟生成 1 μmol 试卤灵的能力定义为一个酶活力单位。

$$\text{FSP-1 活力 (U/Kg wet weight)} = (\Delta F_{\text{对}} - \Delta F_{\text{测}} - b) \div a \times f \div \frac{m}{V} \div T$$

② 细胞样本中铁死亡抑制蛋白 1(FSP-1)酶活计算公式:

定义: 25 ℃ 条件下, 每 1×10^9 个细胞在每升反应体系中每分钟生成 1 μmol 试卤灵的能力定义为为一个活力单位。

$$\text{FSP-1 活力 (U/10}^9) = (\Delta F_{\text{对}} - \Delta F_{\text{测}} - b) \div a \times f \div \frac{n}{V} \div T$$

注解:

y: 标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

$\Delta F_{\text{测}}$: 样本测定荧光值 F_2 -样本测定荧光值 F_1

$\Delta F_{\text{对}}$: 样本对照荧光值 F_2 -样本对照荧光值 F_1

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

m: 组织湿重质量, g

V: 样本处理过程中加入试剂一的体积, mL

n: 细胞数量, 1×10^6 个

T: 反应时间, 20 min

附录1 关键数据

1. 技术参数

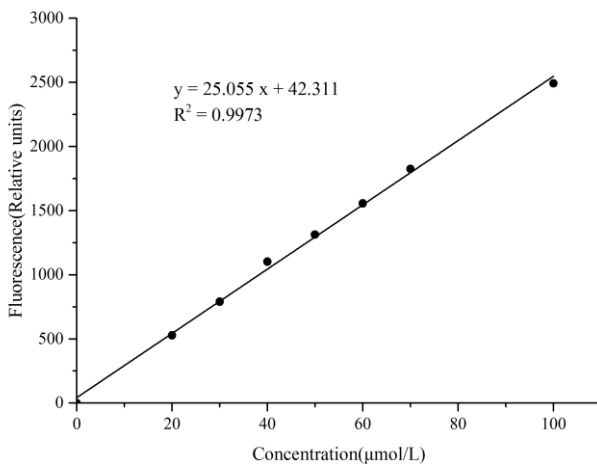
检测范围	0.15-5.00 U/L	批间差	6.5-8.0%
灵敏度	0.15 U/L	批内差	3.0-5.4%
稀释回收率	98-100%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量10 μL, 按照操作步骤进行实验, 荧光值如下表所示:

标准品浓度 (μmol/L)	0	20	30	40	50	60	70	100
F ₂ 值	223	758	1016	1344	1537	1796	2098	2746
	224	744	1013	1306	1537	1764	2000	2683
平均 F ₂ 值	223	751	1013	1325	1537	1780	2049	2715
绝对 F ₂ 值	0	528	790	1102	1314	1557	1826	2492

②绘制标曲(如下图):



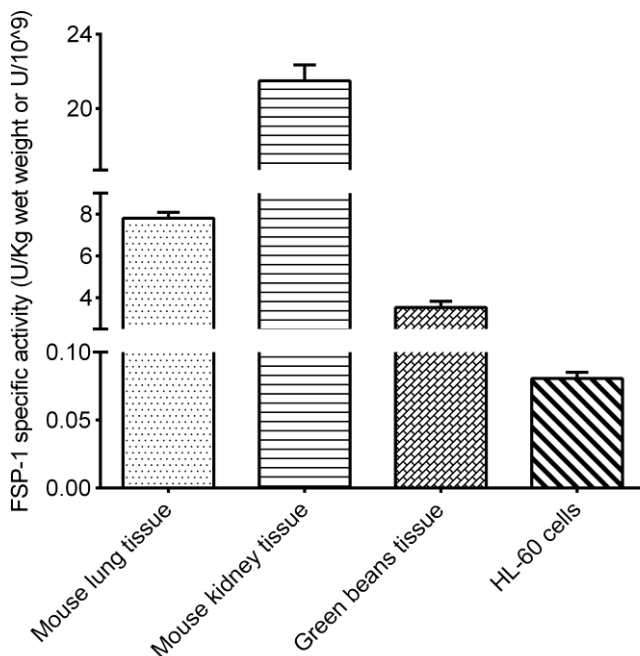
附录2 实例分析

例如检测 1×10^6 个HL-60细胞(数据仅供参考):

取 $10 \mu\text{L}$ 1×10^6 个HL-60细胞上清液加入到酶标板孔内, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 25.055x + 42.311$, 测定孔 F_1 平均值为316, 测定孔 F_2 平均值为631, $\Delta F_{\text{测}} = 631 - 316 = 315$ 。对照孔 F_1 平均值为329, 对照孔 F_1 平均值为899, $\Delta F_{\text{对}} = 899 - 329 = 570$ 。计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{FSP-1活力}(U/10^9) &= (570 - 315 - 42.311) \div 25.055 \div 1 \div 0.2 \div 20 \\ &= 0.085 U/10^9 \end{aligned}$$

按说明书操作, 测定小鼠肺组织(10%组织匀浆, 加样量 $10 \mu\text{L}$)、小鼠肾组织(10%组织匀浆, 加样量 $10 \mu\text{L}$)、青豆组织(10%组织匀浆, 加样量 $10 \mu\text{L}$)、HL-60细胞(1×10^6 个, 加样量 $10 \mu\text{L}$)中的FSP-1活力(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

