

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: GBQ019

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](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://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	无要求
	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  $\mu\text{mol/L}$ 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( $\mu\text{mol/L}$ )	0	20	30	40	50	60	70	100
100 $\mu\text{mol/L}$ 标准品溶液( $\mu\text{L}$ )	0	40	60	80	100	120	140	200
试剂一( $\mu\text{L}$ )	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 $1 \times 10^6$ 个细胞离心后弃上清，加入200 μL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
$1 \times 10^6$ 个Hela 细胞	不稀释	$1 \times 10^6$ 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  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准品溶液加入相应的酶标孔中。  
测定孔：取 10  $\mu\text{L}$  样本加入相应的酶标孔中。  
对照孔：取 10  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  试剂一。  
向步骤①中的测定孔加入 15  $\mu\text{L}$  试剂三工作液。
- ③ 37°C 避光孵育 20 min。
- ④ 向步骤③的各孔中加入 15  $\mu\text{L}$  试剂二工作液。
- ⑤ 向步骤④的各孔加入 60  $\mu\text{L}$  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°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( $\mu\text{L}$ )	10	--	--
样本( $\mu\text{L}$ )	--	10	10
试剂一( $\mu\text{L}$ )	15	--	15
试剂三工作液( $\mu\text{L}$ )	--	15	--
37°C 避光孵育 20 min			
试剂二工作液( $\mu\text{L}$ )	15	15	15
显色工作液( $\mu\text{L}$ )	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°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°C 条件下，每千克组织在每升反应体系中每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  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°C 条件下，每  $1 \times 10^9$  个细胞在每升反应体系中每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  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,  $1 \times 10^6$  个

T: 反应时间, 20 min

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

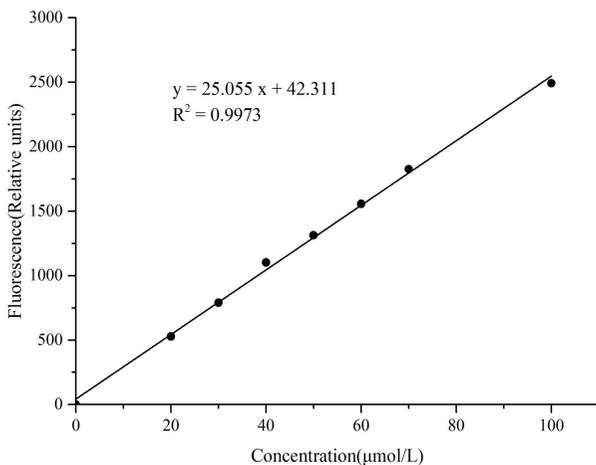
检测范围	0.15-5.00 U/L	批间差	6.5-8.0%
灵敏度	0.15 U/L	批内差	3.0-5.4%
稀释回收率	98-100%		

### 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 <sub>2</sub> 值	223	758	1016	1344	1537	1796	2098	2746
	224	744	1013	1306	1537	1764	2000	2683
平均 F <sub>2</sub> 值	223	751	1013	1325	1537	1780	2049	2715
绝对 F <sub>2</sub> 值	0	528	790	1102	1314	1557	1826	2492

②绘制标曲(如下图):



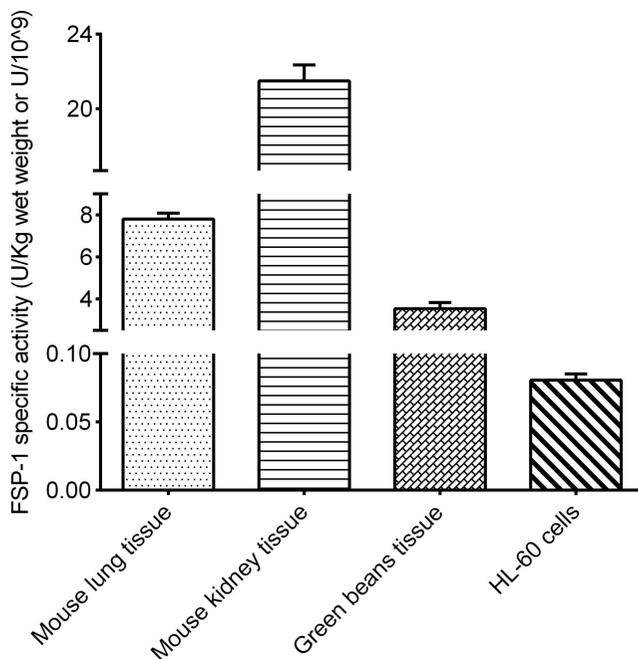
## 附录2 实例分析

例如检测 $1 \times 10^6$ 个HL-60细胞(数据仅供参考):

取 $10 \mu\text{L}$   $1 \times 10^6$ 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:

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

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( $1 \times 10^6$ 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。





