天净沙系列

CAT#:7-C154-87-0f
低温运输、-20℃保存

焦磷酸硫胺素含量测定试剂盒（荧光法）

Thiamine Pyrophosphate Assay Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是荧光法测定焦磷酸硫胺素（Thiamine Pyrophosphate，TPP，CAS: 154-87-0）含量的试剂盒。其原理是焦磷酸硫胺素在碱性条件下被氧化生成硫胺荧，硫胺荧在 365 nm 激发产生 435 nm 荧光，荧光强度与焦磷酸硫胺素浓度呈正比，通过测定荧光值即可测定焦磷酸硫胺素含量。本产品具有如下特点:

1. 操作简单快捷。
2. 即开即用，用户不用单独准备各种试剂。
3. 提供焦磷酸硫胺素阳性对照溶液，便于在遇到问题时分析原因。
4. 适用于检测人工合成的、或从各种材料中提取的焦磷酸硫胺素样本。
5. 检测的线性范围是 313 nM 至 10 μM，检测下限是 313 nM。
6. 本产品具有较高的灵敏度，但容易受到还原剂（如 GSH、抗坏血酸）干扰，导致假阴性结果。
7. 本产品足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测或 400 次 250 μL 体系的 96 孔板检测。
8. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用 logo 热封袋包装

成份	编号	规格	包装
焦磷酸硫胺素含量测定反应液	7-C154-87-0r	120 mL	125 mL 本色瓶
焦磷酸硫胺素含量测定反应物 1	7-C154-87-0f1	100 T	1.5 mL 棕色管
焦磷酸硫胺素含量测定反应物 2	7-C154-87-0f2	100 T	1.5 mL 棕色管
10 μM 焦磷酸硫胺素溶液	6-C154-87-0	1 mL	1.5 mL 本色管
使用手册	sc7-C154-87-0f	1 份	无

运输及保存

低温运输、-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

待测样品，样本溶解液，96 孔板（跟所用的荧光光度计兼容），可测 365 nm 激发光/435 nm 发射光的荧光光度计、甲醇。

使用方法

一、首次使用本试剂盒时试剂的配制

1. 配制焦磷酸硫胺素反应物溶液：将 88 mL 焦磷酸硫胺素含量测定反应液加入到干净的空塑料瓶中，分别取 1 mL 焦磷酸硫胺素含量测定反应液加入到装有焦磷酸硫胺素含量测定反应物 1 和焦磷酸硫胺素含量测定反应物 2 的瓶中，吹打溶解，并将溶解后的液体转移到含有 88 mL 焦磷酸硫胺素含量测定反应液的瓶中，得焦磷酸硫胺素反应物溶液 90 mL。没用完的此溶液需要-20℃保存。

二、样本前处理

2. 对于血清/细胞提取物：取 100 μL 样本，加入 300 μL 预冷甲醇，涡旋混匀。10,000×g，4℃离心 10 min，取上清液备用（去除蛋白质）。

3. 对于食品/植物样本:研磨后 80℃热水提取 30 min，10,000×g 离心 10 min 取上清。必要时过 0.22 μm 滤膜去除颗粒物。

4. 预留 10 mL 最后溶解样本的样本溶解液，作为后续测荧光值的阴性对照。

三、标准曲线梯度稀释液的制备

5. 每次测量都应制作标准曲线，下面以 6 个稀释度的标准曲线为例。

6. 标记 1-6 个 1.5 mL 离心管，2-5 号每个管中加入 0.2 mL 焦磷酸硫胺素含量测定反应液。

7. 将 10 μM 焦磷酸硫胺素溶液做为 1 号管样品。

8. 2 号管中加入 0.2 mL 的 10 μM 焦磷酸硫胺素溶液，充分震荡 1 分钟，得 5 μM 焦磷酸硫胺素溶液。放冰上待用。

9. 换枪头，在 3 号管中加入 0.2 mL 5 μM 焦磷酸硫胺素溶液（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 2.5 μM 焦磷酸硫胺素溶液。放冰上待用。

10. 重复上面的操作直到得到 10 μM、5 μM、2.5 μM、1.25 μM、625 nM、312.5 nM 共 6 个稀释度的样品。放冰上待用。

四、用光径 1 cm 的比色皿测定荧光值

11. 如有 N 个待测样本，每个做 1 次重复，则反应数为 N+7，其中 N 个用于待测样本，1 个用于阴性对照，6 个用于标曲样本。如每个样本做重复，则反应数应相应地变动。以下按 1 个样做 1 次重复示例。

12. 按下表在各管中加入各成分。根据分光光度计一次可以同时测定的样本数决定每次加几个样本:

成分	N 个样本管	阴性对照	6 个标曲管
焦磷酸硫胺素反应物溶液	各 900 μL	900 μL	900 μL
N 个待测样本	各 100 μL	不加	不加
第 4 步所备样本溶解液	不加	100 μL	不加
第 10 步所得 6 个样	不加	不加	各 100 μL 分别到对应的管

13. 摇晃 30 秒混合均匀，放室温避光反应 10 分钟。设置荧光分光光度计参数:激发波长 365 nm；发射波长 435 nm 测定荧光强度（FI）。

五、数据分析

14. 计算真实荧光值：每个样本测得的荧光值减去阴性对照的荧光值即为每个样本的

	真实荧光值。共 N+6 个读数。 15. 制备标准曲线：以焦磷酸硫胺素溶液的浓度为横轴，以其真实荧光值为纵轴，绘制标准曲线。 16. 将 N 个待测样品的真实荧光值带入标准曲线方程，即可计算出每个待测样品中的焦磷酸硫胺素的浓度。 **六、多孔板酶标仪检测** 17. 同上，只是所有反应体系按比例缩小使得终体积跟酶标用多孔板板兼容，最后在激发波长 365 nm；发射波长 435 nm 测定荧光强度（FI）。
关联产品	焦磷酸硫胺素抑制剂筛选试剂盒