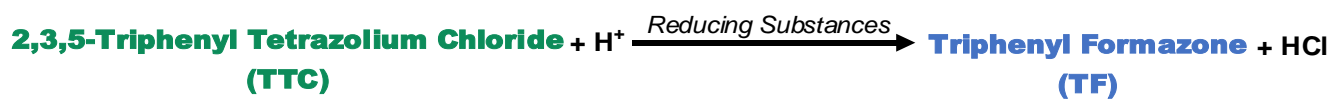




植物根系活力检测试剂盒（TTC 法）

Plant Root Vitality Assay Kit (TTC-Method)



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



植物根系活力检测试剂盒（TTC 法）

Plant Root Vitality Assay Kit (TTC-Method)

一、产品描述

根系是植物吸收水分和养分的主要器官，其活力直接影响植物的生长发育和产量水平。通过检测根系活力，可以了解植物对环境胁迫的适应能力和资源利用效率，从而评估植物的健康状况和生长潜力，在农业生产和科学研究中具有重要的作用 and 意义。

氢受体 2,3,5-氯化三苯基四氮唑（2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride, TTC）可被氢还原为红色三苯基甲腙（Triphenyl Formazone, TF），产物在 485 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征植物根系活力水平。本产品中带有反应终止剂，能够有效防止持续反应造成的结果误差。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
试剂一	组分 A	粉剂×3 瓶	4°C避光保存	使用前向 1 瓶组分 A 中加入 1 瓶组分 B 再加入 60 mL 试剂二充分溶解 (配制后 4°C可保存 1 周)
	组分 B	粉剂×3 瓶	4°C保存	
试剂二		液体 100 mL×2 瓶	4°C保存	若出现固体析出属于正常现象 (恢复至室温或超声促溶使沉淀完全溶解即可)
试剂三		粉剂×1 瓶	4°C避光保存	-
试剂四		液体 30 mL×1 瓶	4°C保存	-
标准品		粉剂×1 支 (10 mg TTC 标准品)	4°C保存	使用前加入 1 mL 试剂二充分溶解 (即为 10 mg/mL TTC 标准液)

注：TTC 标准液配制后 4°C可保存 1 周，若变为红色则停止使用；试剂一配制后若变为红色则停止使用。

需自备试剂：乙酸乙酯（C₄H₈O₂，MW=88.11，CAS:141-78-6）

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96 孔板（非聚苯乙烯材质酶标板，避免乙酸乙酯腐蚀）、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱、乙酸乙酯、5 mL 离心管、2 mL 离心管和蒸馏水。

1.植物根系样本预处理

准备 0.3 g 左右植物根系组织，使用蒸馏水清洗 3-5 次，滤纸吸干水分后即为待测样本。

2.测定步骤

2.1 仪器准备

酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 485 nm。

2.2 TTC 标准曲线的制作

①100 $\mu\text{g/mL}$ TTC 标准液的制备

吸取 100 μL 10 mg/mL TTC 标准液加入 900 μL 试剂二充分混匀，即为 1 mg/mL TTC 标准液；吸取 200 μL 1 mg/mL TTC 标准液至 5 mL 离心管中，加入 1800 μL 试剂二充分混匀，即为 100 $\mu\text{g/mL}$ TTC 标准液；

②100 $\mu\text{g/mL}$ TF 标准液的制备

向步骤①制备的 100 $\mu\text{g/mL}$ TTC 标准液中加入 8-10 mg 试剂三，充分振荡混匀 2 min，此过程会产生不溶红色物质，再加入 2 mL 乙酸乙酯，充分振荡混匀 2 min，室温静置 5 min，待分层后取上层红色溶液，即为 100 $\mu\text{g/mL}$ TF 标准液；

③TF 标准稀释液的制备

将步骤②制备的 100 $\mu\text{g/mL}$ TF 标准液使用乙酸乙酯稀释至 50、40、30、20、10、5 $\mu\text{g/mL}$ ，即为 TF 标准稀释液，稀释体积可参考下表：

序号	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	100	100	100	100	100	100
TF 标准液体积 (μL)	200	200	150	100	100	50
乙酸乙酯体积 (μL)	200	300	350	400	900	950
稀释后浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	50	40	30	20	10	5

注：乙酸乙酯易挥发，配制后注意密封以防止挥发，建议操作过程在通风橱中进行。

吸光值测定：分别吸取 200 μL TF 标准稀释液至 96 孔板中，测定 485 nm 处吸光值，记为 A 标准；吸取 200 μL 乙酸乙酯至 96 孔板中，测定 485 nm 处吸光值，记为 A 空白；计算 ΔA 标准=A 标准-A 空白。注：各浓度标准管和空白管只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 50、40、30、20、10、5 $\mu\text{g/mL}$ TF 标准稀释液浓度为横坐标 (x)，以其对应的 ΔA 标准为纵坐标，绘制标准曲线，得到线性回归方程 $y=kx+b$ ($R^2 \geq 0.99$)。

2.3 待测样本的测定

①在 2 mL 离心管中依次加入下列试剂（可根据预实验结果适当调整样本量和反应时间）

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)
待测样本 (mg)	100	100
试剂一	1000	1000
试剂四	-	250
使样本全部浸入溶液，37℃避光反应 4 h（可根据颜色状态调节时间）		
试剂四	250	-
充分混匀，将样本取出使用滤纸充分吸干，置于研钵或匀浆器中		
乙酸乙酯	1000	1000
充分研磨至匀浆，转移至 2 mL 离心管内，乙酸乙酯定容至 2 mL； 4℃ 15000 g 离心 10 min，取上清液；		

②吸光值测定：吸取 200 μL 上清液至 96 孔板中，测定 485 nm 处吸光值，记为 A 测定和 A 对照，计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照。将 ΔA 测定代入标准方程 $y=kx+b$ 中计算得到 x ($\mu\text{g/mL}$)。注：每个样本均需设一个对照管。

3.植物根系活力计算（以 TTC 还原强度表征根系活力）

$$\text{TTC 还原强度}[\mu\text{g TTC}/(\text{g}\cdot\text{h})] = \frac{x \times V_{\text{SE}}}{W \times T} = \frac{0.5 \times x}{W}$$

注释： V_{SE} ：反应体系中使用乙酸乙酯定容的总体积，2 mL； W ：反应体系中加入待测样本的质量，g； T ：37℃避光反应时间，4 h。

四、注意事项

①乙酸乙酯易挥发，建议在通风橱中进行操作，并做好防护措施；

②若 A 测定大于 1.3，建议适当缩短 37℃避光反应时间或减少样本量后再进行测定；若 ΔA 测定小于 0.01，建议适当延长反应时间或增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；

③TTC 反应后产物为肉眼可见红（粉）色产物，可通过根系颜色大致判断是否需要调整反应时间，若 37℃避光反应还未到反应时间则出现明显红（粉）色可提前终止反应，并记录具体反应时间；若 37℃避光反应 4 h 后仍未出现红（粉）色，可直接延长反应时间至 8 h 或 16 h 并记录反应时间；

④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

