

植物根系活力检测试剂盒（TTC 法）说明书

微量法

货号：BC5275

规格：100T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一 A	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂一 B	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 125 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×3 支	常温保存
试剂四	液体 120 mL×1 瓶（自备）	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

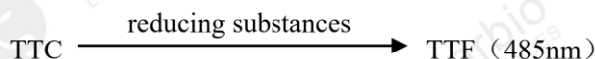
溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前取一支试剂一 B 加入一瓶试剂一 A 中，加入 30mL 试剂二溶解。现用现配。配制好后置于 2-8℃，一周内使用，若出现红色，则不能使用。
- 2、试剂二：若试剂有结晶析出，可 40℃加热或者超声溶解。
- 3、试剂四：乙酸乙酯，自备。提供一 125mL 空瓶。
- 4、标准品：临用前加入 1mL 试剂二，充分震荡混匀，即 10mg/mL TTC 标准品。2-8℃可以保存 1 周，若出现红色，则不能使用。

产品说明：

根系是植物吸收水分和矿质营养的主要器官，同时又是植物体中重要物质如氨基酸、激素等物质合成、同化、转化的器官，因此根的生长情况和活动能力直接影响植物个体的生长情况、营养水平和产量水平等，根系活力具有重要的实际意义。

TTC 可被氢还原成不溶性的红色三苯基甲腈（TTF），TTF 在 485nm 处有吸收峰。当 TTC 溶液渗入到植物根部组织时，呼吸过程产生的还原物质可将其还原成 TTF(红色)，植物根部组织被染成红色。根系活力强弱可用 TTC 的还原量来表示。此方法检测的根系活力即植物根系的脱氢酶活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板(非聚苯乙烯材质)、研钵/匀浆器、乙酸乙酯 (>98%，AR)，冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

样本的制备：将根部组织洗净，去除根上的泥土，轻轻擦干，不要过分挤压破坏根系细胞。





二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 485nm，可见分光光度计用乙酸乙酯调零。
- 2、标准品的稀释：
 - (1) 临用前取 10 μ L 10mg/mL TTC 标准品，加入 1990 μ L 试剂二，充分混匀，配制成 50 μ g/mL TTC 标准品，现用现配。（后续实验需要 1000 μ L，为减小实验误差，故配制大体积。）
 - (2) 取 1mL 50 μ g/mL TTC 标准品加入到一支试剂三内，充分震荡混匀 2min。混匀后加入 1mL 乙酸乙酯，再次充分震荡混匀 2min，室温静置分层 5min，取上层溶液（此上层溶液即为 50 μ g/mL TTC-乙酸乙酯标准品）。
 - (3) 将上层溶液用乙酸乙酯进行稀释，得到 20 μ g/mL 标准品备用（吸取 200 μ L 50 μ g/mL TTC-乙酸乙酯标准品加入 300 μ L 乙酸乙酯混匀即可）。

3、标准品的测定

取 200 μ L 20 μ g/mL 标准品和 200 μ L 乙酸乙酯（即 0 μ g/mL）于微量玻璃比色皿或 96 孔板(非聚苯乙烯材质)中，分别测定其在 485nm 处的吸光度。计算 ΔA 标准 = $A_{(20\mu\text{g/mL})} - A_{(0\mu\text{g/mL})}$ 。 ΔA 标准只需做 1-2 次。

4、在 2mL EP 管按下表步骤加样：

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样品	0.1g	0.1g
试剂一	1000	-
试剂二	-	1000
根部需要全部浸入溶液中，37°C暗反应 4h，取出后立即冰浴 5min，去滤液，尽量用滤纸吸干根系水分，置于研钵/匀浆器中。		
试剂四	1000	1000

充分研磨（建议在通风橱操作）后全部移至于离心管中，12000 rpm，4°C，离心 10min，取 200 μ L 上清至微量玻璃比色皿或 96 孔板(非聚苯乙烯材质)中，测定 485nm 下的吸光值。计算 ΔA 测定 = $A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （标准曲线只需做 1-2 次，每一个测定管对应一个对照管）。 ΔA 测定的测定范围在 0.005-1.5 之间。

三、根系活力计算

按照样本质量计算根系活力：以 TTC 的还原量来表示根系活力

TTC 还原强度 [μ g TTC/(g·h)] = $\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V \div (W \times T) = 5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$

W：根重，g；C 标：标准品浓度，20 μ g/mL；T：反应时间，4h；V：试剂四的体积即匀浆体积，1mL。

注意事项：

- 1、试剂四容易挥发，有毒，为了您的健康，请穿实验服，戴口罩，戴乳胶手套操作。
- 2、若样品 37°C暗反应未到 4h 但根系已出现深粉色，此时可以直接进行下一步实验操作；若 ΔA 测定大于 1.5，可以减少样本质量或者缩短反应时间进行实验，计算公式注意修改。
- 3、若 4h 暗反应结束后，根系没有出现粉色或者 ΔA 测定小于 0.005，可以延长暗反应时间（8h，16h 甚至 24h）或者加大样品量，计算公式注意修改。
- 4、如果离心后待测的上清依然浑浊，可尝试加大离心转速或者延长时间，例如 15000rpm 4°C离心 20min。

实验实例：

- 1、称取 0.131g 葱的根部，洗净，擦干，按照测定步骤操作，用 96 孔板（非聚苯乙烯材质）测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.714 - 0.082 = 0.632$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{(20\mu\text{g/mL})} - A_{(0\mu\text{g/mL})} = 0.660 - 0.042 = 0.618$ ，带入公式计算：



TTC 还原强度=5×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W=39.033 μg TTC/(g·h)

- 2、称取 0.126g 景天的根部，洗净，擦干，按照测定步骤操作，用 96 孔板（非聚苯乙烯材质）测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.422-0.139=0.283，ΔA 标准= A_(20μg/mL)-A_(0μg/mL)=0.660-0.042=0.618，带入公式计算：

TTC 还原强度=5×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W=18.172 μg TTC/(g·h)

- 3、称取 0.118g 蒜的根部，洗净，擦干，按照测定步骤操作，用 96 孔板（非聚苯乙烯材质）测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.191-0.055=0.136，ΔA 标准= A_(20μg/mL)-A_(0μg/mL)=0.660-0.042=0.618，带入公式计算：

TTC 还原强度=5×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W=9.325 μg TTC/(g·h)

参考文献：

[1] Xiuyun Zhu, Meng Liang, Yu Ma. A Review Report on the Experiments for the Determination of Root Activity by TTC Method[J]. Guangdong Chemical Industry, 2020.

[2] Sangen Wang. Plant Physiology Experiment Course[M]. Science Press, 2005.

相关系列产品：

BC3120/BC3125 植物脱氢酶（PDHA）活性检测试剂盒

