（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-K855-S

产品规格：100Assays(43 samples)

检测仪器：紫外-可见光分光光度计(485 nm)

Elabscience®植物根系活力比色法测试盒

Plant Root Activity 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所有植物根系的活力。

检测原理

植物根系是活跃的吸收器官和合成器官，根的生长情况和代谢水平即根系活力将直接影响植物地上部分的生长和营养状况以及最终产量，是植物生长的重要生理指标之一。

该试剂盒检测原理以红四氮唑（TTC）为底物，孵育 1~3 小时，根系中脱氢酶能够还原 TTC 并生成不溶于水的红色的三苯甲臜（TTF），再用有机溶剂(乙酸乙酯或丙酮等)将其从根中提取出来，检测 485nm 处吸光度，进而计算出 TTC 的还原量，然后以还原量表示脱氢酶活性，并作为植物根系活力的指标。该试剂盒主要用于定量测定植物的根系活力或脱氢酶活性。

提供试剂和物品

编号	名称	规格(Size) (100 Assay)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	25 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	显色剂 (Chromogenic Agent)	粉剂×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	还原剂 (Reducing Reagent)	粉剂×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	终止液 (Stop Solution)	25 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月

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：紫外-可见光分光光度计(最佳检测波长 485 nm)，恒温箱(37°C)、匀浆机

试剂：乙酸乙酯、双蒸水

试剂准备

① 试剂一若有晶体析出，使用前需60°C加热溶解至澄清状态；

② 试剂一工作液配制：

将试剂一与双蒸水按照1：9体积比进行稀释，配制好的工作液2-8°C保存7天。

③ 试剂二工作液配制：

称取0.4 g试剂二完全溶解于100 mL双蒸水，配制成溶液后可2-8°C避光保存七天，若变红则弃用。

④ 试剂二反应工作液配制：

将试剂一工作液与试剂二工作液按照体积比1：1进行混匀，现配现用，按需配制，配制好的工作液需当天使用完毕。

⑤ 试剂三工作液配制：

称取20 mg试剂三粉剂，加入0.5 mL双蒸水混匀溶解，按需配制，2-8°C可保存7天。

⑥ 试剂四工作液配制：

将试剂四与双蒸水按照1: 4体积比进行稀释（试剂四加入到双蒸水中）。

⑦ 配制100 μg/mL TTC标准工作液：

取 0.2 mL试剂二工作液置于10 mL离心管中，加入50 μL试剂三工作液混匀，产生红色的不溶于水的红色颗粒物，加8 mL乙酸乙酯，充分混合溶解颗粒（直至颗粒溶解），静置分层（下层0.25 mL无色水层，不可用），上层红色溶液中TTC浓度为100 μg/mL。

⑧ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
TTC 质量(μg)	**0**	**25**	**50**	**75**	**100**	**150**	**200**
100 μg/mL TTC 标准品(mL)	0	0.25	0.50	0.75	1.00	1.50	2.00
乙酸乙酯(mL)	5.00	4.75	4.50	4.25	4.00	3.50	3.00

TTC标准品质量 (μg)：反应体系中含有的TTC质量。

样本准备

① 样本处理

选取植物根部（最好是根毛区），用双蒸水冲洗干净并用吸水纸吸干表面水分，用剪刀剪至0.5-2 cm的长度，每个样本称取0.1-0.3 g置于10 mL EP管备用。

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：0-0.67 mg/g/h，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
春兰	不稀释	龙葵	不稀释
石阶草	不稀释	飞蓬	不稀释
窃衣	不稀释	油菜	不稀释

注：稀释液为乙酸乙酯。

实验关键点

① 试剂二需避光保存，配制好的试剂二工作液在一周内使用完毕。

② 实验需在通风橱进行操作。

③ 选择新鲜的植物根系。

操作步骤

① 标准管：取 100 μg/ml TTF 上层红色溶液 0、0. 25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0 ml 置于 15 mL 离心管，然后分别按顺序补加乙酸乙酯 5.0、4.75、4.5、4.25、4.0、3.5、3.0 ml，485 nm 测定各管 OD 值；

② 对照管/测定管：称取 0.1-0.3 g 待测样本，加入到 5 mL EP 管中。

③ 向步骤②各对照管先加入 1 mL 试剂四工作液，然后再加入 4 mL 试剂二反应工作液。向步骤②各测定管加入 4 mL 试剂二反应工作液。

④ 将步骤③中的离心管置于 37°C，避光孵育 3 h。

⑤ 向步骤④的各测定管加入 1 mL 试剂四工作液。

⑥ 将步骤⑤中的样本取出，擦干表面水分并剪碎，加入 1 mL 乙酸乙酯匀浆至根系样本中的红色物质完全提取，然后将匀浆液用乙酸乙酯定容至 5 mL。

⑦ 混匀静置，紫外-可见光分光光度计（比色皿光径 1.0 cm，系列标准管以空白管调零）于 485 nm 处测定样本的吸光度值。

操作表

标准管

TTC 质量(μg)	**0**	**25**	**50**	**75**	**100**	**150**	**200**
100 μg/mL TTC 标准品(mL)	0	0.25	0.50	0.75	1.00	1.50	2.00
乙酸乙酯(μL)	5.00	4.75	4.50	4.25	4.00	3.50	3.00
485 nm 测定各管 OD 值							

对照管和测定管

	对照管	**测定管**
待测样本(g)	0.1-0.3	0.1-0.3
试剂四工作液(mL)	1	
试剂二反应工作液(mL)	4	4
混匀，37°C 避光孵育 3 h		
试剂四工作液(mL)		1
取出样本擦干水分并剪碎（0.5 cm 左右），加入 1 mL 乙酸乙酯匀浆至根系样本中的红色物质完全提取出（60 Hz, 600 s），然后将匀浆液用乙酸乙酯定容至 5 mL。		
混匀静置 5 min，紫外分光光度计（比色杯光皿 1.0 cm，系列标准管以空白管调零）或酶标仪于 485 nm 处测定上清的吸光度值。		

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

定义：37°C 条件下，每克植物根系样本催化每 mg 红四氮唑（TTC）生成 TTF 的量为一个酶活单位。

$$\underset{\text{(U/g wet weight)}}{\text{TTC}} = \frac{(\Delta A_{485} - b)}{a} \times f \div 1000 \div m \div T$$

注解:

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

ΔA_{485}：485 nm 波长处样本测定 OD 值-对照 OD 值

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

m：根系样本的质量，g

t：孵育时长，h

1000：1 mg = 1000 μg

附录1 关键数据

1. 技术参数

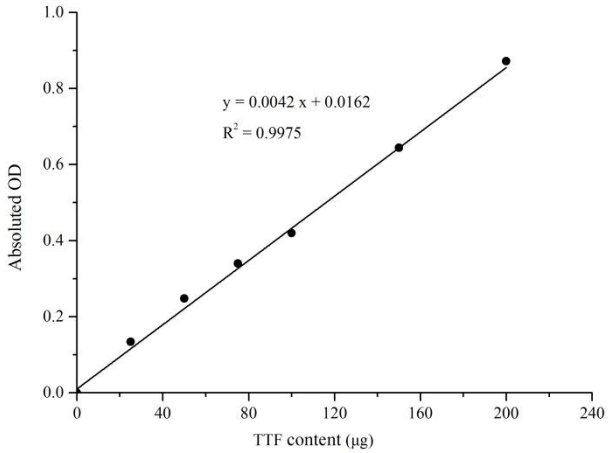
检测范围	0-0.67 U/g wet weight	平均批间差	3 %
平均回收率	103 %	平均批内差	1 %

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同含量的TTF标准品质量如表所示，按照操作步骤进行实验，各管OD值如下表所示：

标准品质量(μg)	0	25	50	75	100	150	200
OD值	0.000	0.134	0.248	0.340	0.380	0.644	0.872

② 绘制标曲(如下图)：



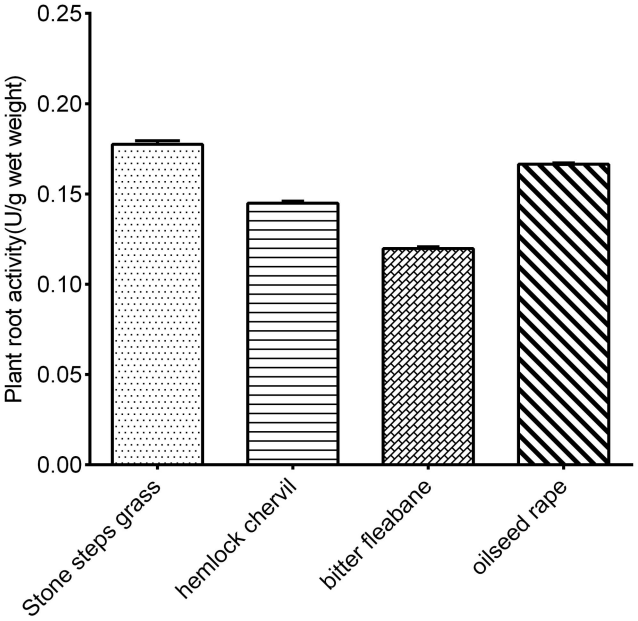
附录2 实例分析

例如检测石阶草根系样本(数据仅供参考)：

称取0.1-0.3 g石阶草根系，按说明书操作步骤进行检测，其结果为：标准曲线：y = 0.0042 x + 0.0163，对照孔平均OD值为0.076，测定孔平均OD值为0.537，根系活力计算结果为：

$$\underset{\text{(U/g wet weight)}}{\text{根系活力}} = \frac{(0.537 - 0.076) - 0.0163}{0.0042} \div 1000 \div 0.2 \div 3 = 0.18 \text{ U/g wet weight}$$

按说明书操作，按照说明书操作，测定石阶草根系、窃衣根系、飞蓬根系和油菜的根系活力(如下图)



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测定值较小	孵育时间较短	延长孵育时间
	根系样本不新鲜	选择新鲜的根系测定

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。