

## 叶酸检测试剂盒

FAD[03]01.23

10. 蒸馏水 11. 量筒及 300 mL 三角瓶

### 六. 试剂配制

**1. 叶酸保护液配制:** 取叶酸保护剂 1 瓶, 在超净工作台内加入 1×叶酸缓冲液 10 mL, 彻底溶解(现用现配)。

注: 叶酸保护剂也可用 10mL 蒸馏水溶解。

**2. 样品处理液(20 mL/样品):** 将 20×叶酸检测用缓冲液用蒸馏水稀释至 1×, 按照叶酸保护液与稀释后的 1×叶酸检测用缓冲液 1:50 的比例, 加入叶酸保护液备用(现用现配)。

注: 根据样品数量计算所需样品处理液体积, 每个 96 孔板一般可检测 8 个样品, 所需样品处理液为 160 mL, 则吸取 20×叶酸检测用缓冲液 10 mL 于一个洁净的三角瓶中, 加入 190 mL 蒸馏水混匀, 制备得到 200 mL 稀释液, 加入 4 mL 配制好的叶酸保护液, 即为样品处理液。

**3. 标准品/样品稀释液:** 在超净工作台内, 将叶酸保护液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 按照叶酸保护液与 1×叶酸缓冲液 1:50 的比例将叶酸保护液加入 1×叶酸缓冲液中备用。

### 七. 乳粉样品处理

**1.** 称取 1 g (精确至 0.01 g) 乳粉样品于 50 mL 离心管中, 加入样品处理液 20 mL, 相当于样品的提取稀释倍数为 20, 这个稀释倍数已经包括在标准曲线中。混匀, 95℃ 水浴加热提取 30 min, 其间应至少振荡混合 5 次, 然后迅速置于冰水中冷却至 30℃ 以下。

以下操作均需在超净工作台内进行:

**2.** 将冷却后的提取液用 0.22 μm 滤膜过滤至 2 mL 无菌离心管中, 即为无菌样品溶液。

**3.** 用标准品/样品稀释液将上述样品溶液稀释至叶酸浓度约为 0.1、0.2、0.4 μg/100 g(mL)。

#### 样品稀释处理示例

如检测婴幼儿乳粉样品中添加叶酸含量时, 以产品标签中叶酸含量为 80 μg/100 g(mL) 为例, 称取样品 1 g, 加入 20 mL 样品处理液, 95℃ 水浴加热提取 30 min, 迅速冷却至 30℃ 以下, 取冷却后的提取液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 要得到叶酸终浓度约为 0.1 μg/100 g(mL)、0.2 μg/100 g(mL) 和 0.4 μg/100 g(mL) 的样品溶液, 还需将样品溶液稀释 800 倍、400 倍和 200 倍, 稀释步骤如下:

样品稀释倍数	稀释方法
①10 倍稀释	900 μL 标准品/样品稀释液+100 μL 提取液
②100 倍稀释	900 μL 标准品/样品稀释液+100 μL ①溶液

### 一. 简介

本试剂盒参照国标 GB 5009.211-2022 《食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》, 利用鼠李糖乳杆菌

(*Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus*) ATCC 7469 对叶酸的特异性, 在含有叶酸的样品中生长形成的浊度来测定叶酸的含量。

### 二. 检测原理

在含有除叶酸以外所有营养成分的培养基中, 鼠李糖乳杆菌的生长强度(浊度)与叶酸的含量呈线性关系。将培养基、鼠李糖乳杆菌与经过处理的样品提取液(或标准品溶液)加入 96 孔板微孔中, 鼠李糖乳杆菌会一直生长至叶酸耗尽。以培养后不同浓度标准溶液中菌体浊度相对于各标准品的浓度绘制标准曲线, 通过检测样品孔中鼠李糖乳杆菌浊度, 与标准曲线对比即可得到样品中叶酸含量。

### 三. 产品性能

检测时间: 实验操作约 1 h, 培养时间 44-48 h

线性范围: 0.1-1.0 μg/100 g(mL)

回收率: 80-120%

批内差异: <10%

批间差异: <10%

贮藏条件: 试剂盒于 2-8℃ 保存一年。

### 四. 试剂盒组成

叶酸标准品	3 瓶
叶酸检测菌球	3 瓶
叶酸培养基	3 瓶
1×叶酸缓冲液(50 mL/瓶)	3 瓶
20×叶酸检测用缓冲液(30 mL/瓶)	1 瓶
叶酸保护剂	3 瓶
无菌水(10 mL/瓶)	3 瓶
独立包装无菌 96 孔微孔板	3 块
封板膜	3 片

### 五. 其他试剂及设备(本试剂盒不提供)

- 超净工作台
- 酶标仪(550 或 630 nm)
- 恒温培养箱, 36℃ ±1℃
- 高压灭菌锅
- 水浴锅, 95℃
- 涡旋仪
- 移液枪及无菌枪头, 20-200 μL, 100-1000 μL
- 无菌离心管: 1.5 mL 或 2 mL, 15 mL, 50 mL, 其中 15 mL 和 50 mL 需带有旋转盖
- 无菌注射器与 0.22 μm 无菌滤膜

③200 倍稀释	200 μL 标准品/样品稀释液+200 μL ②溶液
④400 倍稀释	300 μL 标准品/样品稀释液+100 μL ②溶液
⑤800 倍稀释	700 μL 标准品/样品稀释液+100 μL ②溶液

**注：**样品每一步稀释完后都要混匀，样品提取液必须当天使用，并避光保存；若检测未知样品，应假设两种叶酸含量，分别进行上述处理，两个假设值为相邻数量级，按照上述步骤操作。

## 八. 检测过程

### 1. 叶酸标准溶液制备（需在超净工作台内进行）

取叶酸冻干标准品 1 瓶，加入 2.5 mL 标准品/样品稀释液，配制成叶酸标准溶液，取 8 个无菌的 1.5mL 离心管，按下表配制 0.1-1.0 μg/100 g(mL)系列浓度的标准溶液。

μg/100 g(mL)	标准溶液体积 μL		标准品/样品稀释液体积 μL		总体积 μL
空白：0	0	+	500	=	500
标准 1：0.1	50	+	950	=	1000
标准 2：0.2	100	+	900	=	1000
标准 3：0.3	150	+	850	=	1000
标准 4：0.4	200	+	800	=	1000
标准 5：0.6	300	+	700	=	1000
标准 6：0.8	400	+	600	=	1000
标准 7：1.0	500	+	500	=	1000

**注：**标准溶液需现用现配，不可储存。

### 2. 叶酸培养基溶液制备

- 1) 取 1 瓶无菌水，加入叶酸培养基中，拧紧瓶盖，振荡溶解（必须使用试剂盒中提供的无菌水）。
- 2) 将培养基瓶置于 95℃ 水浴 5 min，其间振荡 2-3 次，再迅速置于冰水中冷却至 30℃ 以下。
- 3) 在超净工作台内，使用 0.22 μm 的无菌滤膜将培养基溶液过滤至 15 mL 无菌离心管中。每瓶培养基足够进行 1 块微孔板的实验。

**操作步骤 3-4 均需在超净工作台内进行：**

### 3. 叶酸检测用微生物溶液制备

取叶酸检测菌球 1 瓶，将菌球溶解于过滤除菌的叶酸培养基溶液中，拧紧盖子，充分振荡，使菌液混匀。

### 4. 检测步骤

- 1) 将所需数量的微孔条插入微孔架，记录板孔位置，标准溶液和样品稀释液需做 3 孔平行实验，剩余微孔条放回铝箔袋中，密封后 2-8℃ 保存。
- 2) 在每个微孔中加入 100 μL 叶酸检测用微生物溶液。
- 3) 滴加 100 μL 空白标准溶液（零标准）于 A1、A2、A3 孔；依次滴加 100 μL 各标准溶液于 B1、B2、B3——H1、H2、

H3 孔；标准溶液浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μg/100 g(mL)。

4) 滴加 100 μL 各样品稀释液于其余的微孔中。

5) 用封板膜密封微孔条上的各个微孔，按压封板膜，保证各个微孔充分密闭。

5. 培养于 36℃ ±1℃ 培养箱中避光培养 44-48 h。

### 6. 测定

1) 取出微孔板，再次按压封板膜，保证封板膜充分密封各个微孔，反复颠倒振荡，使微生物充分混匀。

2) 对角揭开封板膜，用针刺破各微孔表面的气泡。

3) 酶标仪 550 或 630 nm 条件下检测，推荐使用 550 nm。

**注：**培养后若不能及时测定吸光度值，可将微孔板置于 2-8℃ 冷藏保存不超过 48 h。

## 九. 结果计算

### 1. 判定检测结果有效：

低浓度标准品 OD 值 < 高浓度标准品 OD 值

### 2. 选取最佳稀释度进行结果计算：

选取 3 个稀释度中，OD 值在标准曲线中间线性最好的；两个及以上取计算结果的平均值。

使用 ELISA 专业统计分析软件中 4-Parameter 计算方法对样品中叶酸浓度进行计算。计算公式如下：

$$X = \frac{c \times f}{m}$$

X — 样品中叶酸浓度 μg/100 g(mL)；

c — 标准曲线上读取的浓度 μg/100 g(mL)；

f — 稀释倍数（不需考虑热提取时稀释的 20 倍）；

m — 样品重量 g。

例如：

样品重量：1 g

样品稀释倍数（三选一）：1 : 400

标准曲线读取的浓度：0.24 μg/100 g(mL)

结果计算（样品实际检测值）：

$$0.24 \times 400 / 1 = 96 \mu\text{g}/100 \text{g(mL)}$$

**注意：**实验中需要的耗材必须无菌；实验后需按照相关规定处理废弃物。

**注：**

婴幼儿辅食米粉、面条等外源性添加叶酸的样品均可使用乳粉的处理方法进行样品的处理，但是由于这类产品淀粉含量高，提取过程中容易形成胶体状态，提取结束后无法直接使用滤膜过滤，可先进行样品的稀释再进行除菌除杂过滤，用滤液进行检测；

水果、蔬菜、肉类、动物内脏等原生性叶酸，由于和蛋白质络合，需要使用酶进行分解，样品处理方法请参照 GB5009.211-2014《食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》，处理得到的滤液经适当稀释用于试剂盒检测。

## 北京陆桥技术股份有限公司

地址：北京市朝阳区高碑店北路甲 3 号（100123）

山东：青岛市市北区台柳路 177 号和达中心 A 座 703 室（266033）

广东：广州市番禺区石北工业路金河产业园 A 栋东 4 楼（511400）



东北：哈尔滨市松北区科技创新城创新一路 2727 号国乳中心 808 室  
成都：四川省成都高新西区中海国际橙郡一期 1 栋 1 单元 204 (610096)  
上海：上海市漕河泾松江新兴产业园区研展路 455 号 B 座 4 层 406 室  
销售热线：010-51203999    0532-82689263  
                  020-38011430    0451-87821139  
网 址：[www.beijinglandbridge.com](http://www.beijinglandbridge.com)  
E- mail: [tech\\_e@beijinglandbridge.com](mailto:tech_e@beijinglandbridge.com)