

## 叶酸微孔板法即用型试剂盒

(产品货号: GVT2001)

版本GFAD [01]09.22

### 1. 简介

本产品是根据国标GB 5009.211-2022《食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》研制的叶酸检测微孔板法即用型试剂盒, 每盒产品包含3套试剂。

### 2. 检测原理

叶酸是鼠李糖乳杆菌*Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469) 生长所必需的营养素, 在一定控制条件下, 将鼠李糖乳杆菌菌液接种至含有试样液的培养液中, 培养一段时间后测定透光率(或吸光度值), 根据叶酸含量与透光率(或吸光度值)的标准曲线计算出试样中叶酸的含量。

### 3. 试剂盒组成

叶酸标准品(冻干)	3瓶	无菌水(30mL)	3瓶
叶酸检测菌球(冻干)	3瓶	无菌96孔微孔板	3块
叶酸测定培养基基础(20 mL)	3瓶	封板膜	3片
叶酸测定培养基添加剂(冻干)	3瓶		

4. 贮藏条件: 于2-8°C避光保存一年。

### 5. 其他试剂、耗材和设备(本试剂盒不提供)

5.1 无菌工作台(无菌操作时使用)	5.6 涡旋振荡器
5.2 恒温培养箱, 36°C±1°C	5.7 移液枪及无菌枪头, 10-100 μL, 100-1000 μL
5.3 酶标仪(540nm~610nm)	5.8 三角瓶和容量瓶
5.4 高压灭菌锅	5.9 无菌离心管: 1.5 mL, 15 mL(需带有旋转盖)
5.5 超声波振荡器	5.10 无菌注射器与0.22 μm无菌滤膜

### 6. 测定培养基制备(无菌操作)

- 6.1 制备叶酸测定培养基: 移取1.0mL叶酸测定培养基基础加入叶酸测定培养基添加剂中, 溶解3min, 使其充分混匀, 全部转入20 mL叶酸测定培养基基础中, 混匀。
- 6.2 不接种标准0对照管培养基: 取上述培养基200μL于1.5mL无菌离心管中, 作为不接种标准0对照管用培养基。
- 6.3 接种叶酸测定培养基: 取1瓶叶酸检测菌球, 加入制备好的叶酸测定培养基(6.1)中, 混匀后即可使用。

### 7. 标准系列管制备(无菌操作):

本产品提供以下2种标准系列管制备方法, “方法一”与国标法步骤一致, “方法二”省去标准工作液稀释步骤, 两种方法制备的标准系列管叶酸含量完全相同, 操作时可视情况二选一。

方法一: 准确吸取1.5 mL无菌水于叶酸标准品中, 溶解后充分混匀, 取1mL加入4mL无菌水中, 混匀, 即为叶酸标准工作液。取10个1.5 mL无菌离心管, 按表1-1配制系列浓度标准溶液。

表1-1 标准曲线的制作

标准品管序号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
叶酸含量/ng	0.00	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.80	1.00
标准溶液/μL	0	50	100	200	300	400	500	600	800	1000
无菌水/μL	1000	950	900	800	700	600	500	400	200	0

方法二: 准确吸取1.5 mL无菌水于叶酸标准品中, 溶解后充分混匀。取10个1.5 mL无菌离心管, 按表1-2配制系列浓度标准溶液。

表1-2 标准曲线的制作

标准品管序号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
叶酸含量/ng	0.00	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.80	1.00
标准溶液/μL	0	10	20	40	60	80	100	120	160	200
无菌水/μL	1000	990	980	960	940	920	900	880	840	800

### 8. 试样系列管制备

- 8.1 试样按照GB 5009.211-2022对应的步骤“6.1~6.3”进行制备、提取和稀释。
- 8.2 将制备好的试样稀释液无菌条件下用无菌水相滤膜(0.22μm)过滤除菌, 按照表2顺序制备试样系列管。

表2 试样管的制备

试样管序号	S1	S2	S3
试样溶液/μL	100	200	300
无菌水/μL	400	300	200

## 9. 检测步骤（无菌操作）

9.1 取出无菌微孔板，记录板孔位置，标准溶液做2~3孔平行试验，试样稀释液每个梯度做2孔平行，另外准备1孔加入150 μL 无菌水作为不接种标准0对照管（含0.00 ng叶酸）。

9.2 在每个微孔中加入150 μL制备好的接种叶酸测定培养基（6.3），其中不接种标准0对照管加入150 μL未接种叶酸测定培养基（6.2）。

9.3 吸取150 μL标准系列管（7）或试样系列管（8.2）至指定微孔中。

9.4 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（特别注意微孔的边缘部分应充分密封）。

## 10. 培养

将微孔板置于36°C±1°C恒温培养箱中避光培养40h-48h。

## 11. 测定

11.1 取出微孔板，再次按压封板膜，保证封板膜充分密闭各个微孔，反复颠倒振荡，混匀微孔板中培养物。

11.2 对角揭开封板膜，用针刺破各微孔表面的气泡。

11.3 用酶标仪在540 nm处测定吸光度值。

如果0对照孔出现浑浊，说明可能有杂菌污染，需重做试验。

注：适宜的叶酸测定光谱范围540nm~610nm。

## 12. 分析结果表述

按照国标GB 5009.211-2022中“7 分析结果表述”进行结果分析。

12.1 标准曲线：以标准系列管叶酸含量为横坐标，每个标准点透光率（或吸光度值）均值为纵坐标，绘制标准曲线。

12.2 试样结果计算：

从标准曲线查得试样或酶空白系列管中叶酸的相应含量（ $c_x$ ），如果3支试样系列管中有2支叶酸含量在0.10ng-0.80ng 范围内，且各管之间折合为每毫升试样提取液中叶酸含量偏差<10%，则按公式（1）、（2）、（3）进行结果计算：

试样稀释液叶酸浓度：

$$c = \frac{c_x}{V_x} \dots\dots\dots (1)$$

$c$  —— 试样稀释液中叶酸浓度ng/mL；

$c_x$  —— 标准曲线上查得试样系列管中叶酸含量 ng；

$V_x$  —— 制备试样系列管时吸取的试样稀释液体积 mL。

注：微孔板法吸取100μL、200μL和300μL时，对应 $V_x$ 分别为1mL、2mL和3mL。

采用直接提取法的试样叶酸含量按式（2）计算：

$$X = \frac{\bar{c} \times V \times f}{m} \times \frac{100}{1\,000} \dots\dots\dots (2)$$

$X$  —— 样品中叶酸含量μg/100 g(mL)；

$\bar{c}$  —— 试样稀释液叶酸浓度平均值ng/mL；

$V$  —— 试样提取液定容体积 mL；

$f$  —— 试样提取液稀释倍数；

$m$  —— 试样质量 g；

$\frac{100}{1\,000}$  —— 单位换算系数。

采用酶解提取法的试样叶酸含量按式（3）计算：

$$X = \frac{(\bar{c} \times f - \bar{c}_0) \times V}{m} \times \frac{100}{1\,000} \dots\dots\dots (3)$$

$\bar{c}_0$  —— 酶空白液中叶酸浓度平均值ng/mL

式中 $X$ 、 $c$ 、 $f$ 、 $V$ 、 $m$ 、 $\frac{100}{1\,000}$ 的含义同式（2）。

### 12.3 说明：

计算结果保留三位有效数字。

注：液体试样叶酸含量也可以微克每百毫升（μg/100mL）为单位。

精密度、检出限和定量限参考国标。

## 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)