



维生素 B₁₂ 检测试剂盒

VTB[03]01.23

一. 简介

本试剂盒参照国标GB 5009.285-2022 《食品安全国家标准 食品中维生素B₁₂的测定》，利用莱士曼氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830对维生素 B₁₂的特异性，在含有维生素B₁₂的样品中生长形成的浊度来测定维生素B₁₂的含量。

二. 检测原理

在含有除维生素 B₁₂ 以外所有营养成分的培养基中，莱士曼氏乳酸杆菌的生长强度(浊度)与维生素 B₁₂ 的含量呈线性关系。将培养基、莱士曼氏乳酸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，莱士曼氏乳酸杆菌会一直生长至维生素 B₁₂ 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，通过检测样品孔中莱士曼氏乳酸杆菌浊度，与标准曲线对比即可得到样品中维生素 B₁₂ 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：0.02-0.16 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

维生素 B ₁₂ 标准品	3
	瓶
维生素 B ₁₂ 检测菌球	3
	瓶
维生素 B ₁₂ 培养基	3
	瓶
1×维生素 B ₁₂ 缓冲液（50 mL/瓶）	3
	瓶
维生素 B ₁₂ 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

五. 其他试剂及设备（本试剂盒不提供）

1. 超净工作台
2. 酶标仪(550 或 630 nm)
3. 恒温培养箱, 36℃±1℃
4. 高压灭菌锅
5. 水浴锅, 95℃
6. 涡旋仪
7. 移液枪及无菌枪头, 20-200 μL, 100-1000 μL
8. 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
9. 无菌注射器与 0.22 μm 无菌滤膜
10. 蒸馏水
11. 量筒及 300 mL 三角瓶

六. 试剂配制

1. 维生素 B₁₂ 保护液配制: 取维生素 B₁₂ 保护剂 1 瓶，在超净工作台内加入 1×维生素 B₁₂ 缓冲液 10 mL 彻底溶解（现用现配）。

注：维生素 B₁₂ 保护剂也可用 10mL 蒸馏水溶解。

2. 样品处理液（20 mL/样品）: 根据待测样品数量，量取所需体积的蒸馏水，按照维生素 B₁₂ 保护液与蒸馏水 1:50 的比例，加入维生素 B₁₂ 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的体积，每个 96 孔板一般可检测 8 个样品，所需样品处理液为 160 mL，则量取蒸馏水 200 mL 稀释液，加入 4 mL 配制好的维生素 B₁₂ 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，将维生素 B₁₂ 保护液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌，按照维生素 B₁₂ 保护液与 1×维生素 B₁₂ 缓冲液 1:50 的比例将维生素 B₁₂ 保护液加入 1×维生素 B₁₂ 缓冲液中备用。

七. 乳粉样品处理

1. 称取 1 g（精确至 0.001 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，其间至少振荡 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，将样品稀释至维生素 B₁₂ 浓度约为 0.06、0.08、0.10 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维生素 B₁₂ 含量时，以产品标签中维生素 B₁₂ 含量为 2 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，要得到维生素 B₁₂ 终浓度约为 0.06 μg/100 g(mL)、0.08 μg/100 g(mL) 和 0.10 μg/100 g(mL) 的

样品溶液，还需将样品液稀释 33.3 倍、25 倍和 20 倍，为操作方便，样品稀释倍数为 35 倍、25 倍、20 倍，稀释步骤如下：

样品稀释倍数	稀释方法
①5 倍稀释	400 μL 标准品/样品稀释液+100 μL 提取液
②20 倍稀释	300 μL 标准品/样品稀释液+100 μL ①溶液
③25 倍稀释	400 μL 标准品/样品稀释液+100 μL ①溶液
④35 倍稀释	600 μL 标准品/样品稀释液+100 μL ①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，应假设两种维生素 B₁₂ 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. 维生素 B₁₂ 标准溶液制备（需在超净工作台内进行）：

取维生素 B₁₂ 冻干标准品 1 瓶，加入 5 mL 标准品/样品稀释液，配制成维生素 B₁₂ 标准溶液，取 8 个无菌的 1.5 mL 离心管，按下表配制 0.02-0.16 μg/100g(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
标准 1: 0.02	100	+	900	=	1000
标准 2: 0.04	200	+	800	=	1000
标准 3: 0.06	300	+	700	=	1000
标准 4: 0.08	400	+	600	=	1000
标准 5: 0.10	500	+	500	=	1000
标准 6: 0.12	600	+	400	=	1000
标准 7: 0.14	700	+	300	=	1000
标准 8: 0.16	800	+	200	=	1000

注：标准溶液需用现配，不可储存。

2. 维生素 B₁₂ 培养基溶液制备

- 1)取 1 瓶无菌水，加入维生素 B₁₂ 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. 维生素 B₁₂ 检测用微生物溶液制备

取维生素 B₁₂ 检测菌球 1 瓶，将菌球溶解于过滤除菌的维生素 B₁₂ 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 维生素 B₁₂ 检测用微生物溶液。
- 3) 滴加 100 μL 标准溶液 1 (0.02) 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 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16 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 计算方法对样品中维生素 B₁₂ 浓度进行计算。计算公式如下：

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

X — 样品中维生素 B₁₂ 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 : 25
 标准曲线读取的浓度：0.08 μg/100 g(mL)
 结果计算（样品实际检测值）：
 0.08 × 25 / 1 = 2.0 μg/100 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、面条等样品均可使用乳粉的处理方法进行样品处理，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。

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

E-mail：tech_e@beijinglandbridge.com