

牛奶中尿素氮 (MUN) 含量 (酶法) 检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-N013 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

奶牛生产中所用的尿素氮通常是指乳尿素氮(milk urea nitrogen, MUN)。MUN 主要来源于瘤胃降解蛋白。测定 MUN 对保持奶牛能氮平衡、发挥生产潜能及最大效率利用饲料蛋白质、降低成本等有着深远意义。

该试剂盒利用尿素在脲酶的作用下水解产生氨离子和二氧化碳, 氨离子在碱性介质中与酚显色剂生成蓝色物质, 该物质的生成量与尿素含量成正比。通过于625nm处检测该有色物质含量进而得出牛奶中尿素氮 (MUN) 含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	
试剂 A	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 B	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 C	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 0.5mL×2 支	-20℃保存	每支: 1. 可-20℃分装冻存, 尽量减少反复冻融。
试剂二	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	试剂三 A 1.5mL×2 支 试剂三 B 0.2mL×1 支	4℃避光保存	1. 临用前向一支试剂三 A 中加入 46 μL 的试剂三 B, 混匀备用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准管	粉体 2 支	4℃保存	每支: 1. 每支临用前加 1mL 蒸馏水溶解, 即浓度为 6mg/mL 的尿素, 检测前再用蒸馏水稀释 200 倍 (5:995) 即成 0.03mg/mL (0.5mmol/L) 的尿素; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、牛奶中尿素氮 (MUN) 含量检测:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

试剂组分 (μL)	加入量
试剂 A	100
蒸馏水	1200

牛奶样本	100
试剂 B	50
试剂 C	50
混匀，静置 5min，12000rpm 离心 10min，上清液待检测。	

【注】：若离心后上清液仍不是很澄清，可再次离心直至上清液澄清为止。

2、检测步骤：

- ① 打开酶标仪，设定波长到 625nm。
- ② 做实验前选取 2 个样本，找出适合本次检测样本的稀释倍数 D。
- ③ 所有试剂解冻至室温，在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样本	20		
蒸馏水		20	
标准品			20
试剂一	10	10	10
蒸馏水	130	130	130
混匀，37°C避光反应 15min			
试剂二	20	20	20
试剂三	20	20	20
混匀，37°C避光反应 20min，于 625nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。			

【注】：测定管 A 值若大于 0.9，可把样本用蒸馏水进行稀释，稀释倍数 D 代入公式。

五、结果计算：

1、按液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{牛奶尿素氮(MUN)}(\text{mg/mL}) &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div 60.04 \times 2 \times 14 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D \\ &= 0.014 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 15 \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{牛奶尿素氮(MUN)}(\text{mg/dL}) &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div 60.04 \times 2 \times 14 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D \times 100 \\ &= 1.4 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 15 \times D \end{aligned}$$

C 标准---尿素标品浓度，0.03mg/mL； D---稀释倍数，未稀释即为 1；

V₁---加入样本体积，0.02mL； V 标---加入标准品体积，0.02mL；

15---样本提取阶段牛奶样本稀释倍数； 60.04---尿素分子量；

2---一分子尿素含有 2 个氮元素； 14---氮元素分子量。