

牛奶中尿素氮（MUN）含量（酶法）检测试剂盒说明书

（货号：BP10388F 分光法 48 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	注意事项
试剂 A	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 B	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 C	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 0.8mL×2 支	-20℃保存	每支： 1. 可-20℃分装冻存，尽量减少反复冻融； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	试剂三 A 2.5mL×2 瓶 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 77 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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

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 分光光度计预热 30min，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 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样本	60		
蒸馏水		60	
标准品			60
试剂一	30	30	30
蒸馏水	550	550	550
混匀，37℃避光反应 15min			
试剂二	80	80	80
试剂三	80	80	80
混匀，37℃避光反应 20min，全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 625nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。			

【注】：1.测定管 A 值若超过 1.5，可把样本用蒸馏水进行稀释，稀释倍数 D 代入公式。

2.若 ΔA 差值在零附近徘徊，可增加样本加样量 V1（如增至 120μL，则蒸馏水相应减少，保持总体积不变；空白管和标准管维持不变），则改变后 V1 需代入公式重新计算。

3.试剂二和试剂三禁止预混使用，需依次加入。

五、结果计算：

1、按液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{牛奶尿素氮(MUN)}(\text{mg/mL}) &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div 60.04 \times 2 \times 14 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V1 \times D \\ &= 0.014 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 15 \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{牛奶尿素氮(MUN)}(\text{mg/dL}) &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div 60.04 \times 2 \times 14 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V1 \times D \times 100 \\ &= 1.4 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 15 \times D \end{aligned}$$

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，0.06mL；

V 标---加入标准品体积，0.06mL；

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。