NADMED

NL

Q-NADMED BLOOD
NAD+- en NADH-testkit

Kwantitatieve testkit voor volbloed

Versie 4.0

UITSLUITEND VOOR EENMALIG GEBRUIK

Lees deze gebruiksaanwijzing in haar geheel voordat u dit product gebruikt.

CE IVD VOOR DIAGNOSTISCH GEBRUIK IN VITRO

ALGEMENE INFORMATIE

A. Handelsnaam: Q-NADMED Blood NAD+- en NADH-testkit: kwantitatieve testkit voor volbloed
B. Catalogusnummer:
    a. IVD_001, 40 monsters (indeling met 96 wells)
    b. IVD_001/MY, 40 monsters (indeling met 96 wells)
C. Opslag: -80 °C
D. Gebruiksaanwijzing uitgegeven: september 2023

Fabrikant:

NADMED Ltd/Oy
Haartmaninkatu 4, Bldg 14
00290 Helsinki, FINLAND
www.nadmed.com, info@nadmed.com

INHOUDSOPGAVE

ALGEMENE INFORMATIE 2
INHOUDSOPGAVE 3
BEOOGD GEBRUIK 4
KLINISCHE ACHTERGROND 4
UITGANGSPUNTEN VAN DE TEST 4
GELEVERDE REAGENTIA 5
VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN 5
OPSLAG EN UITERSTE GEBRUIKSDATUM VAN REAGENTIA 6
ANDERE BENODIGDE MATERIALEN 6
BEREIDING VAN REAGENS 7
MONSTERAFNAME EN -OPSLAG 7
PRAKTISCHE OVERWEGINGEN 8
EXTRACTIE VAN NAD+ EN NADH UIT BLOED 10
BEREIDING VAN STANDAARDEN 11
TESTPROCEDURES 13
BEREKENING VAN RESULTATEN 15
POSITIEVE CONTROLE 15
PRESTATIES EN BEPERKINGEN 16
SYMBOLEN 20
SCHEMATISCHE AFBEELDINGEN 22
AANTEKENINGEN 23
PLAATINDELING 24

BEOOGD GEBRUIK

Q-NADMED Blood, een medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek, is een analytische testkit voor het meten van concentraties van NAD+- en NADH-metabolieten in menselijk volbloed. De test is kwantitatief. De beoogde gebruikers van de Q-NADMED-testkit zijn getrainde laboratoriummedewerkers. Het eerste beoogde doel is het detecteren van systemische veranderingen in NAD+ en NADH. De primaire beoogde gebruikers van de testresultaten zijn zorgverleners die de verkregen resultaten interpreteren binnen de context van de ziekte/gezondheidstoestand. De resultaten van de Q-NADMED-testkit kunnen worden gebruikt bij de besluitvorming over behandeling, zoals suppletie met NAD-precursors. Het tweede beoogde doel van de Q-NADMED-testkit is om NAD+- en NADH-concentraties te controleren bij patiënten die worden behandeld met bijvoorbeeld suppletie met NAD-precursors en om de dosis aan te passen.

KLINISCHE ACHTERGROND

NAD+- en NADH-metabolieten passen het metabolisme en de energiehomeostase in het menselijk lichaam aan aan veranderende endogene en exogene omstandigheden. Geaccumuleerde onderzoeksgegevens laten zien dat systemische concentraties NAD+ afnemen in reactie op manifestatie van ziekte en zo een signaal creëren van een verstoord evenwicht in de homeostase van de lichaamsenergie. De mate van NAD+-afname verschilt per patiënt en per ziektebeeld. Door de progressieve afname van NAD+-concentraties kan het lichaam zijn basale metabole functies niet blijven uitvoeren om zelfs bij lopende therapie. Q-NADMED maakt screening van patiënten op NAD+- en NADH-deficiëntie mogelijk om die te corrigeren en de doeltreffendheid van behandeling te verhogen. Er is veel lopend onderzoek naar de bijdrage van NAD+ en NADH aan de mechanismen en progressie van verschillende ziekten. Een lijst met ziektebeelden met verdachte veranderingen in NAD+- en NADH-concentraties groeit voortdurend met inmiddels gepubliceerd bewijs voor mitochondriale ziekte, veroudering, sepsis, virusinfecties, cardiovasculaire ziekte en nierziekte, diabetes type I en II, neurologische aandoeningen en kanker.

UITGANGSPUNTEN VAN DE TEST

Het uitgangspunt van de test is een cyclische enzymatische reactie met colorimetrische eindpuntdetectie. Eerst worden NAD+- en NADH-metabolieten in een enkele stap samen geëxtraheerd uit een bloedmonster. Vervolgens wordt het extract in tweeën verdeeld. In het eerste deel wordt NAD+ gestabiliseerd en NADH verwijderd; in het tweede deel wordt NADH gestabiliseerd en NAD+ verwijderd. Daarna worden NAD+- en NADH-metabolieten geanalyseerd in twee aparte platen aan de hand van een enzymatische reactie die is gekoppeld aan kleurverandering. De intensiteit van de kleurverandering bij de test is recht evenredig met de concentratie NAD+ en NADH in het reactiemengsel.

GELEVERDE REAGENTIA

REAGENTIA	BESCHRIJVING*	VÓÓR DE TEST
BUFFER A	28 ml extractiebuffer	Op kamertemperatuur laten komen (15–25°C).
NAD+ stabilizing reagent	8 ml gebufferde oplossing voor NAD+-meting	Op kamertemperatuur laten komen (15–25°C).
NADH stabilizing reagent	8 ml gebufferde oplossing voor NADH-meting	Op kamertemperatuur laten komen (15–25°C).
NAD+ standard stock	1 microbuisje met 40 µl 1 mM NAD+	Zie bereidingsrichtlijn.
NADH standard stock	1 microbuisje met 40 µl 1 mM NADH	Zie bereidingsrichtlijn.
BUFFER C	2 flesjes met 19 ml testbuffer	Op kamertemperatuur laten komen (15–25°C).
Assay color reagent	2 flesjes met 3 ml reagens met Assay color	Op kamertemperatuur laten komen (15–25°C). Dient te worden gebruikt binnen 2 uur na equilibreren.
Enzyme	2 microbuisjes met 40 µl enzym. Eén per plaat.	Pas ontdooien vlak voor toevoeging aan mastermengsel.
Stop solution	3 ml oplossing om de testreactie te stoppen	Op kamertemperatuur laten komen (15–25°C).
Positive control (buffer)	1 microbuisje met 200 µl buffer voor bereiding van de positieve controle	Op kamertemperatuur laten komen (15–25°C). Zie bereidingsrichtlijn.

*N.B.: aanvaardbare variatie van het vulvolume: 5%.

VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Alleen voor diagnostisch gebruik in vitro. Alleen voor gebruik door getraind personeel.

De Stop solution kan irritatie van de huid, oog en luchtwegen veroorzaken. Vermijd het inademen van dampen.

Assay color reagent kan huidirritatie veroorzaken. Zorgvuldig hanteren; gebruik handschoenen.

BUFFER A kan oogirritatie veroorzaken. Zorgvuldig hanteren; gebruik een veiligheidsbril.

Niet roken, drinken, eten of make-up aanbrengen op de werkplek. Draag beschermende handschoenen, kleding en oogbescherming. Handen grondig wassen na hanteren.

In het veiligheidsinformatieblad (VIB) voor Q-NADMED staan de geïdentificeerde gevaren van de chemische stoffen in deze kit en de toepasselijke waarschuwingen voor die gevaren.

In het Q-NADMED-veiligheidsinformatieblad (VIB) wordt de afvoer van gebruikte kitonderdelen beschreven.

OPSLAG EN UITERSTE GEBRUIKSDATUM VAN REAGENTIA

- Voor opening dienen alle kitonderdelen opgeslagen te worden bij -80°C. Voorkom temperatuurschommelingen in de vriezer.
- Na ontdooien zijn BUFFER A, NAD+ en NADH stabilizing reagents, Positive control (buffer) en Stop solution stabiel gedurende twee weken bij kamertemperatuur.
- BUFFER C dient op de dag van de test te worden ontdooid en gebruikt.
- Assay color reagent is na ontdooien stabiel gedurende maximaal 3 uur bij kamertemperatuur.
- Enzyme dient direct na ontdooien te worden gebruikt.
- De standaarden en de positieve controle dienen op de dag van de test te worden bereid en gebruikt.
- Standaarden dienen te worden beschermd tegen licht.

ANDERE BENODIGDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn nodig maar worden niet meegeleverd bij de kit:

- Gedeïoniseerd water (milli-Q-water uit een waterzuiveringssysteem of in de handel verkrijgbaar gedeïoniseerd water, bijv. Sigma cat.nr. 38796)
- Microbuisjes van 1,5 ml voor monsterbereiding, extractie, stabilisatie en bereiding van teststandaarden. Vereisten voor het materiaal van de microbuisjes: gebruik basale niet-steriele microcentrifugebuisjes gemaakt van transparant/natuurlijk gekleurd polypropyleen (PP) bedoeld voor in-vitrodiagnostiek (bijv. Sarstedt-ref. 72.690.001). Gebruik geen microbuisjes die voor moleculaire biologie bedoeld zijn en die aangemerkt zijn als steriel (chemisch gesteriliseerd), vrij van endotoxine, pyrogenen, menselijk DNA en lage retentie; gebruik geen microbuisjes die bedoeld zijn voor werk met eiwitten en die aangemerkt zijn als LoBind.
- Twee plastic pipetreservoirs met meerdere kanalen (van niet-steriel polystyreen): een voor het pipetteren van het mastermengsel, het andere voor het pipetteren van de Stop solution.
- Twee doorzichtige microtiterplaten van polystyreen met 96 wells en gemiddelde affiniteit voor eiwitbinding bedoeld voor colorimetrische tests en absorptietests.
- Droog bad (verwarmingsblok) met instelbare temperatuur (max. 80 °C).
- Gekoelde microcentrifuge als tafelmodel (max. snelheid 20.000 x g).
- IJswaterbad (gepakt ijs met toegevoegd kraanwater tot een stevige brij die de ingebrachte microbuisjes stevig bijeenhoudt en ze niet laat drijven).
- Gekalibreerde pipetten met één kanaal (0,5–10 µl, 5–50 µl, 20–200 µl, 100–1000 µl) en met meerdere kanalen (5–50 µl, 30–300 µl) en afgeschuinde pipetpunten, met lage retentie.
- Spectrofotometrisch afleesapparaat voor microtiterplaten, geschikt voor het meten van absorptie bij 570–573 nm.
- Aluminiumfolie ter bescherming van microbuisjes en platen tegen licht.

BEREIDING VAN REAGENS

Ontdooi alle onderdelen voor de NAD+- en/of NADH-test vóór de test volgens de instructies in de tabel op pagina 5.

A. **BUFFER A**: klaar voor gebruik

B. **NAD+ stabilizing reagent**: klaar voor gebruik

C. **NADH stabilizing reagent**: klaar voor gebruik

D. **Enzyme**: klaar voor gebruik

E. **Stop solution**: klaar voor gebruik. Als zich bij het ontdooien neerslag vormt in de Stop solution, dient die voor gebruik opnieuw te worden opgelost door middel van 5 minuten incubatie bij 37 °C, en vervolgens koelen tot 25 °C. Stop solution niet stevig schudden.

F. **Positive control (buffer)**: klaar voor gebruik. (Zie bereiding van de positieve controle voor nadere instructies)

G. **50 µM NAD+ standard stock**: voeg 25 µl 1 mM NAD+ standard stock (meegeleverd) toe aan 475 µl gedeïoniseerd water, vortex. Beschermen tegen licht. (Zie bereiding van standaarden en positieve controle voor nadere instructies.)

H. **10 µM NAD+ standard stock**: voeg 10 µl 1 mM NADH standard stock (meegeleverd) toe aan 990 µl gedeïoniseerd water, vortex. Beschermen tegen licht. (Zie bereiding van standaarden en positieve controle voor nadere instructies.)

I. **Mastermengsel:** 1 flesje **Assay color reagent** (3 ml) dient met 1 flesje **BUFFER C** te worden gemengd om 1 fles mastermengsel te krijgen voor 1 microtiterplaat voor de NAD+-test of de NADH-test. Beschermen tegen licht door het mengsel in de originele amberkleurige fles te laten. Niet stevig schudden. Restanten weggooien. Niet opnieuw invriezen.

MONSTERAFNAME EN -OPSLAG

De kit voor het analyseren van volbloed. Veneus bloed, afgenomen door middel van venapunctie, en perifeer bloed, afgenomen met behulp van bloedafnamehulpmiddelen van het lancettype, zijn geschikte monstertypen. Volbloedmonsters dienen te worden afgenomen in afnamebuisjes met een gespoten coating van lithiumheparine of K2 EDTA als antistollingsmiddel en **goed te worden** gemengd door de buisjes om te keren.

Vereisten voor de afnamebuisjes voor veneus bloed met antistollingsmiddelen (BD Vacutainer of Vacuette): gebruik K2 EDTA-bloedbuisjes met een gespoten coating van K2 EDTA die leidt tot een concentratie van 1,2-2 mg K2 EDTA per 1 ml afgenomen bloed of bloedbuisjes met lithiumheparine (LH) met een gespoten coating van LH die leidt tot een concentratie van 17-18 IE LH per 1 ml afgenomen bloed. Voor de analyse zijn kleine volumes volbloed nodig. Daarom adviseren we het gebruik van kleine bloedafnamebuisjes, bijv. 2-3 ml. Het is essentieel om het beoogde bloedvolume in de afnamebuis op te vangen om de doelconcentratie van antistollingsmiddel in het monster aan te houden.

Monsters kunnen vers of bevroren worden geanalyseerd. Vers bloed kan binnen 72 uur geanalyseerd worden als het na afname voortdurend bij 4-8 °C wordt bewaard. Aangezien bloed in de afnamebuis fasescheiding ondergaat, is het essentieel dat het monster zorgvuldig wordt gemengd alvorens een aliquot

voor extractie wordt genomen. Als bloed niet vers geanalyseerd kan worden, adviseren we dringend dat u het monster binnen 72 uur na afname in aliquots van 150-200 µl verdeelt met behulp van niet-steriele, enkelwandige transparante microbuisjes van 0,5-2 ml van polypropyleen en ze bij -20 °C of -80 °C invriest. Het invriezen van afnamebuisjes met een groter monstervolume (bijv. > 2 ml) of in dubbelwandige microbuisjes met sta-rand zal de vriestijd en vooral de ontdooitijd vóór extractie verlengen, wat kan leiden tot grote variatie in de resultaten. De bewaartijd voor kleine aliquots is één maand bij -20 °C en ongeveer een jaar bij -80 °C. Met de kit wordt de hoeveelheid intracellulair NAD gemeten. Het is dan ook zeer belangrijk om elk vers afgenomen monster voor en tijdens het verdelen voldoende te mengen zodat elk aliquot ongeveer evenveel cellen bevat. Bevroren monsters moeten voorafgaand aan de test bevroren blijven. Voor klinische onderzoeken adviseren we dringend voor alle monsters in het onderzoek dat hetzelfde tijdsinterval wordt aangehouden tussen monsterafname en verdelen/invriezen. Voor het meten van NAD+ en NADH is 100 µl volbloed nodig. Daarom mogen monsters die vries-dooicycli hebben ondergaan, niet voor de analyse worden gebruikt.

PRAKTISCHE OVERWEGINGEN

- Gebruik kitonderdelen niet na de uiterste gebruiksdatum.
- Gebruik de materialen van verschillende kitbatches niet door elkaar. Opeenvolgende vries-dooicycli zijn niet toegestaan.
- Deze test is NIET geschikt voor het meten van NAD+ en NADH in plasma of serum, gekweekte cellen of weefsels (menselijk of dierlijk).
- Meng alle reagentia grondig door ze rustig te zwenken. Kleine microbuisjes dienen snel op lage snelheid gecentrifugeerd te worden voordat ze worden geopend.
- Voor de test kunnen verse en bevroren bloedmonsters worden gebruikt. Een homogeen (goed gemengd) monster is essentieel voor analyse.
- We adviseren om maximaal acht monsters tegelijkertijd te extraheren om de hanteertijd tot een minimum te beperken.
- De analyses van NAD+ en NADH worden in twee afzonderlijke platen gedaan. We adviseren om de NAD+- en NADH-tests op de dag van extractie uit te voeren.
- Om kruisbesmetting te voorkomen, gebruikt u telkens nieuwe pipetpunten tussen het toevoegen van standaard, monster en reagens door. Gebruik ook afzonderlijke reservoirs voor het mastermengsel en de Stop solution.
- Pipetten met hoge precisie en afgeschuinde punten met minder retentie verbeteren de nauwkeurigheid.
- Assay color reagent is een geel, lichtgevoelig bestanddeel dat bruin wordt na enzymatische reactie. Blootstelling aan direct zonlicht of direct kunstlicht zorgt voor een niet-specifieke kleurverandering in groen. Om de verstoring door licht op de test tot een minimum te beperken, adviseren we het volgende:
    - pipetteren van het mastermengsel en vervolgens van Stop solution in de plaat onder omstandigheden met natuurlijk indirect licht (gedimde omstandigheden). Om deze omstandigheden te bereiken, schakelt u kunstlicht binnen uit en vermijdt u dat u vlak bij het raam pipetteert. Met natuurlijk indirect licht (gedimde omstandigheden) bedoelen we de hoeveelheid

omgevingslicht die iemand ervaart als hij/zij met een auto op een bewolkte dag onder een brug rijdt.

- de 96-wellsplaat tijdens de reactietijd afdekken met aluminiumfolie na toevoeging van het mastermengsel en tijdens overbrengen naar het plaatafleesapparaat na toevoeging van Stop solution. Omwikkel de plaat niet met aluminiumfolie vanwege het risico van contaminatie en het vermengen van monsters tijdens het uitpakken.
- Het protocol geeft aan welke stappen onder gedimde omstandigheden moeten worden genomen.

- De positieve controle is een kunstmatig monster met bekende hoeveelheden zuivere NAD+ en NADH.
- Technische eisen aan een droog bad (verwarmingsblok):
  - Test de efficiëntie van warmteoverdracht in het droge bad als volgt:
    1. Pipetteer 250 µl water in een microbuisje dat past in het droge bad dat u gebruikt.
    2. Plaats een gewone labthermometer in het microbuisje met de vloeistof en zet het buisje in het droge bad dat op 80 °C is ingesteld.
    3. Meet hoelang het duurt voordat de vloeistof een temperatuur van 70-75 °C heeft bereikt;
    4. Alle in dit protocol vermelde incubatietijden in een droog bad hebben betrekking op een droog bad dat geëquilibreerd is op 80 °C en dat 250 µl water in 2 minuten tot 75 °C verwarmt. Dit is voldoende om de chemische reactie in de oplossing 70-75 °C te laten bereiken na incubatie in het droge bad.
- Technische eisen voor het spectrofotometrische plaatafleesapparaat:
  1. Meting van lichtabsorptie bij 570-573 nm.
  2. Optie om de helderheid/intensiteit van de scanlamp op **laag** in te stellen. Bij sommige plaatafleesapparaten kan de helderheid worden ingesteld als het aantal flitsen per meting. In het laatste geval stelt u het aantal flitsen in op een aantal tussen 5 en 10.
- Mastermengsel en Stop solution bevatten oppervlakteactieve stoffen. Om luchtbellen te voorkomen, pipetteert u het mastermengsel en de Stop solution door de pipet in te drukken tot de eerste stoppositie; verwijder eventuele luchtbellen met een kleine naald uit de wells. Voorkom contact tussen pipetpunten en de inhoud van de wells.
- We adviseren de volgende volgorde van stappen:
  1. Breng BUFFER A, NAD+ stabilizing reagent, NADH stabilizing reagent en Stop solution de dag voorafgaand aan de test op kamertemperatuur. Deze oplossingen zijn gedurende twee weken stabiel bij kamertemperatuur.
  2. Bereid op de dag van de test eerst de standaarden en de positieve controle.
  3. Ontdooi op de dag van de test de flesjes met BUFFER C en Assay color reagent en laat ze op kamertemperatuur komen. Het duurt ongeveer 2-3 uur om te ontdooien. Extraheer in de tussentijd de monsters en bereid twee aliquots met de monsterextracten voor afzonderlijke metingen van NAD+ en NADH. Voer de NAD+- en NADH-tests een voor een uit in afzonderlijke platen.

EXTRACTIE VAN NAD+ EN NADH UIT BLOED

Opmerking: dit deel wordt onder normale lichtomstandigheden uitgevoerd.

1. Breng BUFFER A, NAD+ stabilizing reagent en NADH stabilizing reagent vóór extractie op kamertemperatuur.
2. Gebruik vers bloed dat op ijs is gekoeld of ontdooi bevroren bloedmonsters in het ijswaterbad gedurende 12-15 minuten voorafgaand aan extractie. (Tip: gebruik tijdens het ontdooien snelle cycli met warme handen.) We adviseren om maximaal 8 monsters tegelijkertijd te extraheren.
3. Pipetteer 500 µl BUFFER A in microbuisjes van 1,5 ml.
4. Verwarm de aliquots met BUFFER A gedurende 2-3 minuten (max. 5 minuten) in een droog bad ingesteld op 75-80 °C. Laat ze in het droge bad staan tot stap 6.
5. Meng de bloedmonsters voorafgaand aan extractie snel door ze een paar keer op en neer te pipetteren waarbij de pipetpunt wordt rondgedraaid; voorkom schuimvorming.
6. Voeg 100 µl bloed toe in een snelle stevige beweging rechtstreeks in het microbuisje met warme BUFFER A in het droge bad. Meng door middel van een paar intensieve cycli op en neer pipetteren gelijktijdig met simultaan draaien van de punt om het koude monster efficiënt te mengen met de warme BUFFER A.
7. Incubeer het homogenaat gedurende 1 minuut bij 75-80 °C.
8. Koel het mengsel gedurende minstens 5 minuten in een ijswaterbad. Na het koelen op ijs dient het homogenaat zonder vrije vloeistof te polymeriseren.
9. Centrifugeer op 20.000 x g gedurende 10 minuten bij 4 °C. Breng het supernatant over in een schoon microbuisje en gooi de pellet weg. Houd de totale hoeveelheid verkregen extracten (supernatanten) met NAD+ en NADH op 4 °C, bedekt met folie tot de volgende stap. Volg stap 2 tot en met stap 9 bij de volgende batch van 8 monsters zolang u monsters te extraheren heeft. Ga verder met stap 10 als alle monsters geëxtraheerd zijn. *Optioneel:* de supernatanten kunnen gedurende één week worden bewaard bij een temperatuur van -80 °C. Ontdooi ze in dat geval gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur voordat bij stap 10 de aliquots worden bereid.
10. Bereid twee afzonderlijke aliquots van de verkregen extracten in schone microbuisjes: 150 µl/buisje.
11. Aan het eerste aliquot van 150 µl voegt u 100 µl NAD+ stabilizing reagent toe om een gestabiliseerd extract met NAD+ te verkrijgen (NAD+ blijft bewaard en NADH wordt verwijderd). Vortex en incubeer gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur. Als de test niet direct wordt uitgevoerd, bewaart u de gestabiliseerde extracten in de koelkast tot de test wordt gedaan. Beschermen tegen licht door te bedekken met aluminiumfolie.
12. Aan het tweede aliquot van 150 µl voegt u 100 µl NADH stabilizing reagent toe om een gestabiliseerd extract met NADH te verkrijgen (NADH blijft bewaard en NAD+ wordt verwijderd). Vortex en incubeer 2 minuten in een droog bad ingesteld op 80 °C. Koel gedurende 5 minuten op ijs. Als de test niet direct wordt uitgevoerd, bewaart u de gestabiliseerde extracten in de koelkast tot de test wordt gedaan. Beschermen tegen licht door te bedekken met aluminiumfolie.

OPMERKING: de eindverdunning van het oorspronkelijke volbloedmonster is 10 keer.

OPMERKING: bij individuele suppletie met NAD-precursors kunnen de concentraties NAD+ in het bloed toenemen. Dan dient het gestabiliseerde extract van NAD+ voorafgaand aan de test verder verdund te worden (twee keer) met gedeïoniseerd water. In dit geval zal de verdunning van het oorspronkelijke bloedmonster voor NAD+ 20 keer zijn. Voor het gestabiliseerde extract van NADH is geen verdunning nodig.

BEREIDING VAN STANDAARDEN

Opmerking: dit deel wordt onder normale lichtomstandigheden uitgevoerd.

1. Bereid de standaarden op de dag van de test. Ontdooi microbuisjes met 1 mM standard Stocks gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur. Tijdens ontdooien met folie beschermen tegen licht.
2. Bereid **50 µM NAD+ stock** door 25 µl 1 mM NAD+ standard stock (meegeleverd) toe te voegen aan 475 µl gedeïoniseerd water en te vortexen. Deze stock wordt gebruikt voor bereiding van de standaarden en positieve controle voor NAD+.
3. Bereid **de standaarden voor NAD+** volgens onderstaand schema door aangegeven hoeveelheden in de volgende volgorde te mengen: gedeïoniseerd water, 50 µM NAD+ stock, BUFFER A en NAD+ stabilizing reagent. Het eindvolume van elke standaard is 1 ml. (**Tip**: gebruik dezelfde eenkanaals pipet van 20–200 µl voor het pipetteren van 50 µm NAD+ stock en water).

STANDAARDNUMMER	CONCENTRATIE NAD+ (µM)	BEREIDING VAN STANDAARD			
		50 µM NAD+ stock (µl)	dH_2O (µl)	BUFFER A (µl)	NAD+ stabilizing reagent (µl)
ST1	0	0	100	500	400
ST2	1	20	80	500	400
ST3	2	40	60	500	400
ST4	3	60	40	500	400
ST5	5	100	0	500	400

4. Bereid **10 µM NADH stock** door 10 µl 1 mM NADH standard stock (meegeleverd) toe te voegen aan 990 µl gedeïoniseerd water en te vortexen. Deze stock wordt gebruikt voor de bereiding van de standaarden en positieve controle voor NADH.
5. Bereid **de standaarden voor NADH** volgens onderstaand schema door aangegeven volumes in de volgende volgorde te mengen: gedeïoniseerd water, 10 µM NADH stock, BUFFER A en NADH stabilizing reagent. Het eindvolume van elke standaard is 1 ml. (**Tip**: gebruik dezelfde eenkanaals pipet van 20-200 µl voor het pipetteren van 10 µm NADH stock en water).

STANDAARDNUMMER	CONCENTRATIE NADH (µM)	BEREIDING VAN STANDAARD			
		10 µM NADH stock (µl)	dH_2O (µl)	BUFFER A (µl)	NADH stabilizing reagent (µl)
ST1	0	0	100	500	400
ST2	0,2	20	80	500	400
ST3	0,4	40	60	500	400
ST4	0,6	60	40	500	400
ST5	1	100	0	500	400

6. Bedek het rek met gereedstaande standaarden met aluminiumfolie ter bescherming tegen licht en laat ze in de koelkast staan voordat u ze in de plaat pipetteert.

BEREIDING VAN DE POSITIEVE CONTROLE

Opmerking: dit deel wordt onder normale lichtomstandigheden uitgevoerd.

De positieve controle wordt vóór de test bereid door bekende hoeveelheden NAD+- en NADH-standaarden te mengen met de Positive control (buffer) (meegeleverd). Het volume van de positieve controle en de concentratie van NAD-metabolieten bootsen een bloedmonster van een gezond menselijk individu na. Na bereiding worden op de positieve controle dezelfde extractie- en stabilisatiestappen uitgevoerd als op volbloedmonsters.

1. Ontdooi het microbuisje met Positive control (buffer) gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur.
2. Om de positieve controle te bereiden, pipetteert u 45 µl Positive control buffer in een microbuisje.
3. Voeg 75 µl **50 µM NAD+ stock** (zie voor bereiding pagina 11) en 30 µl **10 µM NADH stock** (zie voor bereiding pagina 11) toe aan de Positive control buffer en vortex. De verwachte concentratie NAD+ in de positieve controle is 25 ± 2 µM, en die van NADH is 2 ± 0,3 µM.
4. De positieve controle bevat geen eiwitten. Daarom kan die bij kamertemperatuur worden geëxtraheerd met BUFFER A. Voeg 100 µl van de bereide positieve controle toe aan 500 µl BUFFER A bij kamertemperatuur om een 'extract' van de positieve controle te maken, vortex en ga verder met stap 5.
5. Bereid twee afzonderlijke aliquots van het 'extract' van de positieve controle (uit stap 4) in schone microbuisjes: 150 µl/buisje.
6. Voeg aan <u>het eerste aliquot van 150 µl</u> 100 µl **NAD+ stabilizing reagent** toe, vortex en incubeer gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur. Bewaar het vervolgens bedekt met folie in de koelkast tot de test wordt gedaan. Deze aliquot met gestabiliseerde positieve controle wordt gebruikt voor **de NAD+-test**.
7. Voeg aan <u>het tweede aliquot van 150 µl</u> 100 µl **NADH stabilizing reagent** toe, en vortex het. Verwarm deze oplossing 2 minuten bij 75-80 °C, en koel op ijs. Bewaar de oplossing vervolgens bedekt met folie in de koelkast tot de test wordt gedaan. Deze aliquot met gestabiliseerde positieve controle wordt gebruikt voor **de NADH-test**.

OPMERKING: de eindverdunning van de positieve controle is 10 keer.

TESTPROCEDURES

Opmerkingen:

- Stappen 1-3 worden onder normale lichtomstandigheden uitgevoerd.
- **Stappen 4-9 worden onder gedimde omstandigheden (zonder direct kunstlicht) uitgevoerd.**
- Elke test bevat blanco monsters ter correctie van alle niet-specifieke achtergrondsignalen. Blanco monsters worden bereid van vier gestabiliseerde monsterextracten (bijv. BL UNK1-4 van monsters 1-4) ter correctie van niet-specifieke interactie tussen de extractbestanddelen en Assay color reagent in het mastermengsel. Voor de positieve controle is geen afzonderlijk blanco monster nodig.
- Als het bloed wordt geanalyseerd van proefpersonen die suppletie met NAD+-precursors gebruiken, zijn er voor deze monsters minstens twee wells met blanco monsters voor dit monstertype nodig. Als er monsters van gesupplementeerde en niet-gesupplementeerde proefpersonen op dezelfde plaat worden geanalyseerd, adviseren we dat u twee wells met blanco monsters per omstandigheid bereidt. Kies hiervoor willekeurig twee gestabiliseerde extracten van gesupplementeerde personen en twee van niet-gesupplementeerde personen. Gebruik deze extracten om blanco monsters te bereiden: twee wells per omstandigheid.
- **Alle blanco monsters worden met het mastermengsel geïncubeerd ZONDER toegevoegd enzym**.
- Het enzym dient vlak voor toevoeging aan het mastermengsel te worden ontdooid. Centrifugeer het microbuisje met het enzym voor opening kort op lage snelheid.

Stappen:

1. Incubeer de gereedstaande standaarden, gestabiliseerde monsterextracten en gestabiliseerde positieve controle gedurende 5 minuten op kamertemperatuur voordat u ze in de plaat pipetteert.
2. Pipetteer 20 µl van elke standaard voor NAD+ of NADH in duplo en begin bij ST1 (0 µM) volgens de plaatindeling op pagina 23.
3. Pipetteer 20 µl gestabiliseerde positieve controle en gestabiliseerde monsterextracten in duplo (zie de indeling op pagina 23). Pipetteer voor de eerste vier gestabiliseerde monsterextracten een extra replica in de aangegeven well (BL UNK1-4) volgens de indeling op pagina 23. Deze vier wells zijn blanco monsters die nodig zijn voor de analyse zonder enzym, ter correctie van de niet-specifieke interactie tussen het extract en Assay color reagent in het mastermengsel.
4. Werk vanaf deze stap onder gedimde omstandigheden. Bereid het mastermengsel door Assay color reagent toe te voegen aan BUFFER C en meng rustig door rond te draaien.
5. Voeg 190 µl van het mastermengsel zonder enzym toe aan elk van de vier wells met blanco monsters (BL UNK1-4).
6. Voeg 40 µl enzym toe aan het flesje met het resterende mastermengsel. Meng rustig en voorkom schuimvorming. Schenk het mastermengsel met toegevoegde enzymen in het reservoir; bescherm het mastermengsel in het reservoir tijdens het pipetteren met aluminiumfolie. (Zie verdere instructies in onze instructievideo op www.nadmed.com.)
7. Voeg 190 µl mastermengsel met toegevoegd enzym toe aan alle resterende wells, waaronder de gestabiliseerde positieve controle, met behulp van een pipet met meerdere kanalen; voorkom schuimvorming en vermijd direct licht. Bedek de klaarstaande plaat direct met aluminiumfolie.

8. **Voor NAD+-test:** incubeer de afgedekte plaat gedurende 4-6 minuten bij kamertemperatuur.

   Voor NADH-test: incubeer de afgedekte plaat gedurende 6-10 minuten bij kamertemperatuur.

   OPMERKING: de reactie kan worden gestopt wanneer er een duidelijke kleurgradiënt in de standaarden is en verschillen in kleurintensiteit tussen monsters met toegevoegd enzym en blanco monsters. Hoe langer de reactietijd, des te intenser het signaal dat wordt waargenomen. De kleurintensiteit in de NADH-test is lager dan bij NAD+, omdat de concentratie NADH in het bloed veel lager is dan NAD+. Daarom loopt het bereik van de NADH-standaarden van 0 tot 1 µM, terwijl het bereik van NAD+-standaarden van 0 tot 5 µM loopt.

9. Stop de reacties door met een pipet met meerdere kanalen 10 µl Stop solution aan elke well toe te voegen in dezelfde volgorde als het mastermengsel. Voorkom schuimvorming door de plaat rustig met de hand te schudden op een tafeloppervlak en luchtbellen te verwijderen.

10. Meet de lichtabsorptie bij 573 nm onmiddellijk na het toevoegen van de Stop solution. Schud indien mogelijk de plaat vóór de meting gedurende 5 seconden in het plaatafleesapparaat. Opmerking: na toevoeging van de Stop solution kan de kleurintensiteit in alle wells in gelijke mate langzaam toenemen. Dit is te verwachten vanwege niet-enzymatische achtergrondprocessen in het mastermengsel.

BEREKENING VAN RESULTATEN

1. Bereken het gemiddelde van de afleeswaarden voor de absorptie voor elke standaard (ST1-ST5). Maak een standaardcurve door de gemiddelde absorptie voor elke standaard op de y-as uit te zetten tegen de concentratie (in µM) op de x-as, en voer een eenvoudige lineaire regressie uit die geschikt is voor de standaardcurve.
2. Vind de concentratie van elke metaboliet in elke well met behulp van de formule voor lineaire regressie van de standaardcurve.
3. Bereken het gemiddelde van de vier blanco monsters (BL UNK1-4). De verkregen waarde staat voor een niet-specifiek signaal van de gestabiliseerde extracten.
4. Bereken het gemiddelde van de duplo's van elk gestabiliseerd monsterextract (UNK).
5. Bereken het gemiddelde van de duplo's van de gestabiliseerde positieve controle en vermenigvuldig met 10 om de concentratie (µM) van NAD+- en NADH-metabolieten in de oorspronkelijke 150 µl positieve controle te berekenen.
6. Corrigeer de verkregen concentraties in gestabiliseerde monsterextracten aan de hand van de waarden van de blanco monsters (berekend in stap 3) en vermenigvuldig met 10 om de concentratie (µM) te verkrijgen van NAD+- of NADH-metabolieten in het oorspronkelijke bloedmonster (zie details op pagina 16). Als gestabiliseerde NAD+-extracten nog eens extra zijn verdund, moet de concentratie worden vermenigvuldigd met de extra verdunningsfactor.

POSITIEVE CONTROLE

Het doel van de positieve controle is om de doeltreffendheid van de stabilisatiestap te controleren wanneer een van de metabolieten uit het mengsel is verwijderd. De concentratie van gemeten NAD+ in de positieve controle valt naar verwachting binnen 23-27 µM; de concentratie van NADH valt naar verwachting binnen 1,7-2,3 µM.

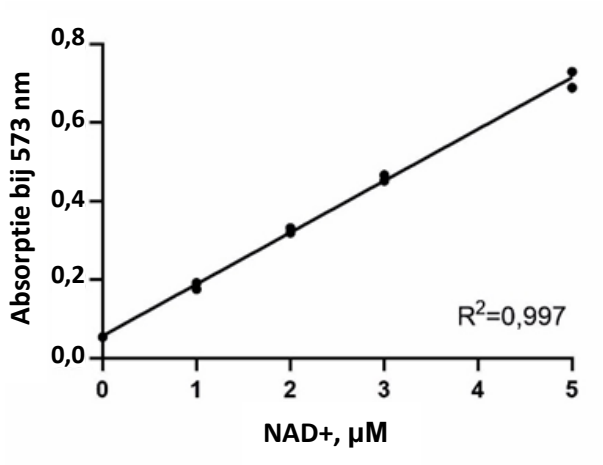
- Absorptiewaarden van gestabiliseerde positieve controle in de NAD+-plaat liggen naar verwachting tussen absorptie van ST3 en ST4.
- Absorptiewaarden van gestabiliseerde positieve controle in de NADH-plaat zijn naar verwachting gelijk aan ST2 met een variatie van 0,05 optische eenheden.

PRESTATIES EN BEPERKINGEN

A. VOORBEELDGEGEVENS

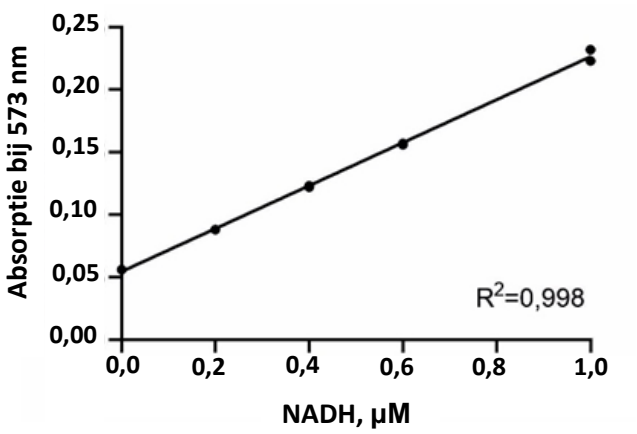
De standaardcurve en de concentraties in de gestabiliseerde monsterextracten worden alleen ter demonstratie gegeven en mogen nooit worden gebruikt in plaats van de realtime kalibratiecurve.

STANDAARDCURVE VOOR NAD+



Standaard	NAD+ (µM)	Absorptie (573 nm) Testtijd – 4 min
ST1	0	0,054
		0,054
ST2	1	0,176
		0,192
ST3	2	0,319
		0,332
ST4	3	0,452
		0,466
ST5	5	0,689
		0,730

STANDAARDCURVE VOOR NADH



Standaard	NADH (µM)	Absorptie (573 nm) Testtijd – 6 min
ST1	0	0,056
		0,056
ST2	0,2	0,088
		0,088
ST3	0,4	0,122
		0,123
ST4	0,6	0,157
		0,156
ST5	1	0,223
		0,232

BEREKENING VAN RESULTATEN VOOR NAD+

Concentratiewaarden in de gestabiliseerde monsterextracten (UNK) en blanco monsters (BL UNK1-4) worden vastgesteld op grond van de formule voor lineaire fit van de NAD+-standaardcurve

Onbekend	Concentratie in gestabiliseerde extracten (µM)	Concentratie in gestabiliseerde extracten gecorrigeerd met gemiddelde van blanco monster BL UNK 1-4, µM)	NAD+-eindconcentratie in het oorspronkelijke monster (µM)*
UNK 1	2,944 3,151	3,008	30,08
UNK 2	2,841 3,129	2,945	29,45
UNK 3	2,686 2,730	2,668	26,68
UNK 4	1,895 1,999	1,907	19,07
UNK 5	2,346 2,420	2,343	23,43
UNK 6	3,432 3,499	3,425	34,25
BL UNK 1 BL UNK 2 BL UNK 3 BL UNK 4	0,040 0,048 0,026 0,048	–	

*Gecorrigeerd met verdunningsfactor x10

BEREKENING VAN RESULTATEN VOOR NADH

Concentratiewaarden in de gestabiliseerde monsterextracten (UNK) en blanco monsters (BL UNK1-4) worden vastgesteld op grond van de formule voor lineaire fit van de NADH-standaardcurve.

Onbekend	Concentratie in gestabiliseerde extracten (µM)	Concentratie in gestabiliseerde extracten gecorrigeerd met gemiddelde van blanco monster (BL UNK 1-4, µM)	Uiteindelijke NADH-concentratie in het oorspronkelijke monster (µM)*
UNK 1	0,239 0,239	0,086	0,86
UNK 2	0,284 0,290	0,133	1,33
UNK 3	0,228 0,234	0,077	0,77
UNK 4	0,234 0,239	0,083	0,83
UNK 5	0,200 0,195	0,044	0,44
UNK 6	0,228 0,245	0,083	0,83
BL UNK 1 BL UNK 2 BL UNK 3 BL UNK 4	0,156 0,161 0,150 0,150	–	

*Gecorrigeerd met verdunningsfactor x10

B. DETECTIEGRENZEN

De detectiegrens voor blanco monsters (limit of blank, LoB) voor Q-NADMED Blood staat in onderstaande tabel (LoB ± standaarddeviatie [SD]).

Detectiegrens blanco	
	pmol/well
NAD+	1,84 ± 0,9
NADH	2,10 ± 0,5

De detectiegrens (limit of detection, LoD) werd berekend aan de hand van de standaardcurves voor NAD+ en NADH en staat in onderstaande tabel (LoD ± SD).

Detectiegrens	
	µM in volbloed
NAD+	0,33 ± 0,2
NADH	0,19 ± 0,05

De kwantificeringsgrens (limit of quantitation, LoQ) staat in onderstaande tabel (LoQ ± SD).

Kwantificeringsgrens	
	µM in volbloed
NAD+	0,66 ± 0,3
NADH	0,40 ± 0,1

C. NAUWKEURIGHEID EN REPRODUCEERBAARHEID

De variatie binnen tests bij meting bepaalde de nauwkeurigheid van de testprestaties. De nauwkeurigheid binnen tests staat in onderstaande tabel (CV = variatiecoëfficiënt).

Nauwkeurigheid binnen tests	
	CV (%) ± SD
NAD+	1,48 ± 0,8
NADH	3,33 ± 1,5

In onderstaande tabel zijn de resultaten van de reproduceerbaarheid van de test samengevat (N = aantal, *3 aliquots van hetzelfde monster werden in triplo geanalyseerd).

Reproduceerbaarheid						
	NAD+			NADH		
Monster	Ctr1	Ctr2	Ctr3	Ctr1	Ctr2	Ctr3
Aantal metingen*	9	9	9	9	9	9
Gemiddelde (µM)	27,41	29,41	22,00	0,55	0,71	0,64
Standaarddeviatie	0,62	1,31	0,87	0,03	0,05	0,05
CV (%)	2,28	4,45	3,95	5,20	7,06	8,45

D. NAUWKEURIGHEID

De nauwkeurigheid van de test werd berekend met monsters met bekende hoeveelheden zuivere NAD+ en NADH. In onderstaande tabel zijn de resultaten samengevat (testnauwkeurigheid ± SD).

Nauwkeurigheid (%)		
NAD+	N = 32	97,13 ± 7,6
NADH	N = 25	104,22 ± 16,5

E. TESTGRENSWAARDEN

De boven- en ondergrenswaarden staan voor de laagste en hoogste concentraties die zijn waargenomen bij 5-7% van de individuen in een gegeven populatie-extract. In onderstaande tabel zijn de grenswaarden samengevat.

Grenswaarde		
	Onder	Boven
NAD+ (µM)	20	36
NADH (µM)	0,6	1,8

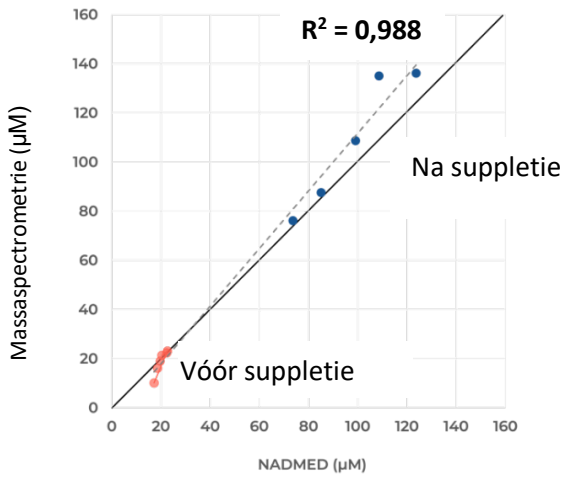
F. PRESTATIEKENMERKEN

De interferentie van andere metabolieten in het extract werd niet apart onderzocht, aangezien de bijdrage ervan klein is en er rekening mee wordt gehouden door blanco analyse zonder toegevoegd enzym uit te voeren.

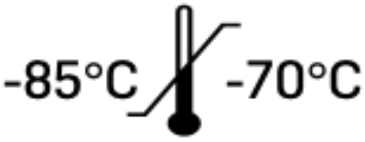
Waarschuwing: kaliumsorbaat, boraat, pyridine en bismut in een monster kunnen leiden tot enzymremming en kunnen daardoor onderschatting van de resultaten veroorzaken.

G. WIJZE VAN VERGELIJKEN

Om de prestaties van Q-NADMED te valideren, hebben we de NAD+-concentratie gemeten in een set controlemonsters van menselijk bloed die ook waren geanalyseerd met behulp van massaspectrometrie. Bevroren bloedmonsters van vijf gezonde individuen (voor en na 16 weken van suppletie met niacine) werden parallel geanalyseerd met behulp van Q-NADMED en massaspectrometrie. Resultaten van Q-NADMED stemden overeen met die van massaspectrometrie.



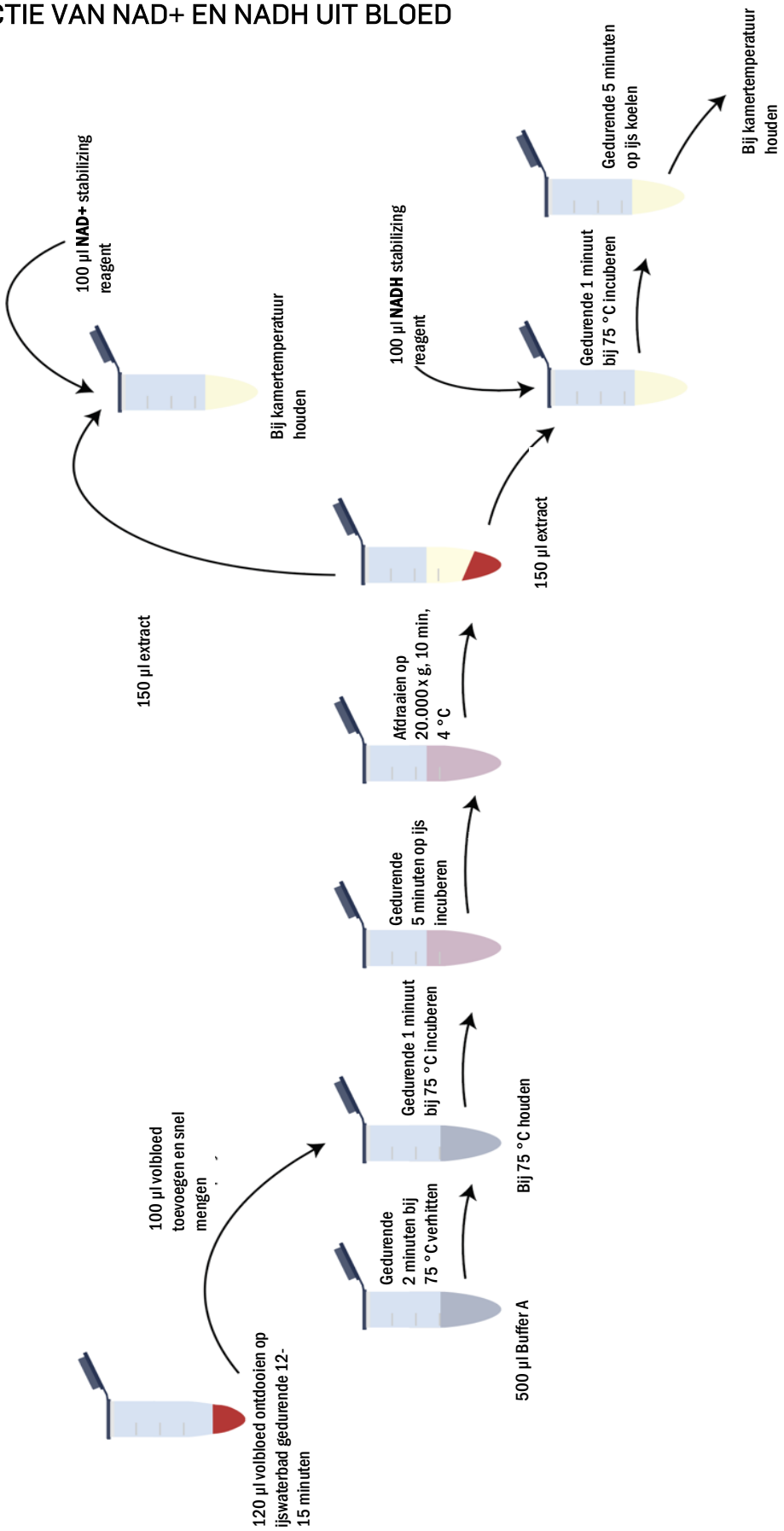
SYMBOLEN

Symbool	
	Brandbare vloeistof en damp
	Waarschuwing/gevaar
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Uiterste gebruiksdatum
	Catalogusnummer
	Partijnummer
	Fabrikant
	Bovenste grenswaarde van temperatuur

	Niet gebruiken als verpakking beschadigd is
	Droog bewaren
Σ 96	Aantal reacties
CE IVD	Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	Beschermen tegen direct licht

SCHEMATISCHE AFBEELDINGEN

A. EXTRACTIE VAN NAD+ EN NADH UIT BLOED

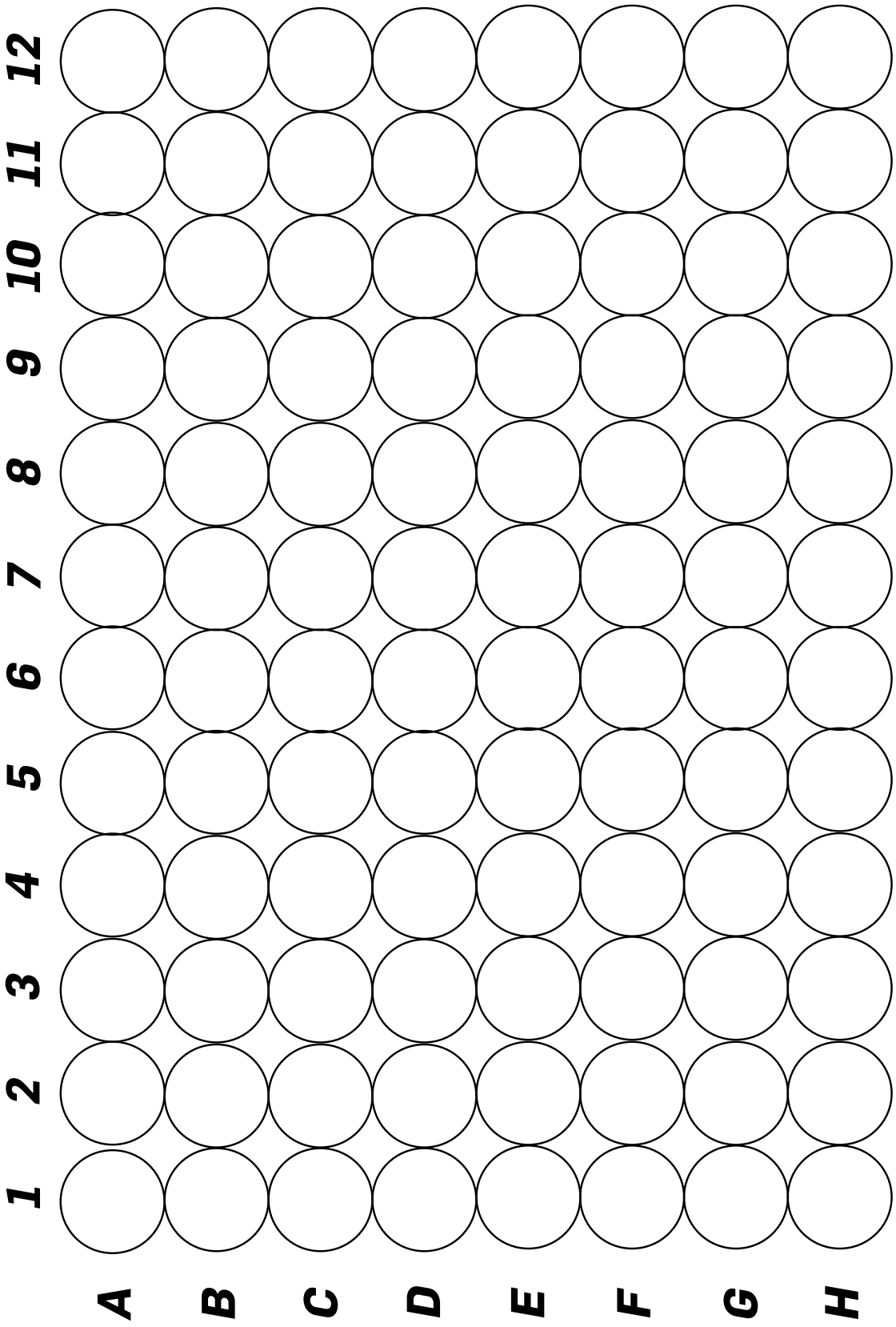


B. AANBEVOLEN PLAATINDELING VOOR NAD+- OF NADH-METING

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
St1	St1	UNK1	UNK1	UNK9	UNK9	UNK17	UNK17	UNK25	UNK25	UNK33	UNK33
St2	St2	UNK2	UNK2	UNK10	UNK10	UNK18	UNK18	UNK26	UNK26	UNK34	UNK34
St3	St3	UNK3	UNK3	UNK11	UNK11	UNK19	UNK19	UNK27	UNK27	UNK35	UNK35
St4	St4	UNK4	UNK4	UNK12	UNK12	UNK20	UNK20	UNK28	UNK28	UNK36	UNK36
St5	St5	UNK5	UNK5	UNK13	UNK13	UNK21	UNK21	UNK29	UNK29	UNK37	UNK37
PosCtr	PosCtr	UNK6	UNK6	UNK14	UNK14	UNK22	UNK22	UNK30	UNK30	UNK38	UNK38
BL UNK1	BL UNK2	UNK7	UNK7	UNK15	UNK15	UNK23	UNK23	UNK31	UNK31	UNK39	UNK39
BL UNK3	BL UNK4	UNK8	UNK8	UNK16	UNK16	UNK24	UNK24	UNK32	UNK32	UNK40	UNK40

Plaatindeling voor NAD+- of NADH-test: St = standaard, BL = blanco's met aangegeven monsters die worden gebruikt voor de blanco aflezing, UNK = onbekende (unknown) monsters, gestabiliseerde extracten van de monsters met onbekende metabolietenconcentratie, PosCtr = gestabiliseerde positieve controle. Gebruik 20 µl standaarden, positieve controle en gestabiliseerde monsterextracten per well. Blanco monsters van de eerste vier monsters worden geanalyseerd in het mastermengsel zonder toegevoegd enzym.

AANTEKENINGEN

PLAATINDELING

Gebruik deze plaatindeling om standaarden en geteste monsters vast te leggen.