

Q-NADMED BLOOD

Souprava pro stanovení obsahu NAD⁺ a NADH

Souprava pro kvantitativní stanovení obsahu v plné krvi

Verze 4.0

POUZE K JEDNORÁZOVÉMU POUŽITÍ

Před použitím produktu je nutné přečíst si celé tyto pokyny.

CE IVD K DIAGNOSTICKÉMU POUŽITÍ IN VITRO

OBEČNÉ INFORMACE

- A. Obchodní název: Souprava pro stanovení obsahu NAD⁺ a NADH Q-NADMED Blood: souprava pro kvantitativní stanovení obsahu v plné krvi
- B. Katalogové číslo:
 - a. IVD_001, 40 vzorků (96jamkový formát)
 - b. IVD_001/MY, 40 vzorků (96jamkový formát)
- C. Skladování: -80 °C
- D. Vydání návodu k použití: Zář 2023

Výrobce:

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

OBSAH

OBECNÉ INFORMACE	2
OBSAH	3
URČENÉ POUŽITÍ	4
ZÁKLADNÍ KLINICKÉ ÚDAJE	4
PRINCIPY ANALÝZY	4
DODANÉ REAGENCIE	5
UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ	5
UCHOVÁVÁNÍ A DATA EXSPIRACE REAGENCIÍ	6
DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL	6
PŘÍPRAVA REAGENCIÍ	7
ODBĚR A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ	7
PRAKTICKÉ INFORMACE	8
EXTRAKCE NAD ⁺ A NADH Z KRVE	10
PŘÍPRAVA STANDARDŮ	11
POSTUP ANALÝZY	13
VÝPOČET VÝSLEDKŮ	15
POZITIVNÍ KONTROLA	15
INTERPRETACE A OMEZENÍ	16
SYMBOLY	20
SCHÉMATICKÁ VYOBRAZENÍ	22
POZNÁMKY	23
USPOŘÁDÁNÍ DESTIČKY	24

URČENÉ POUŽITÍ

Q-NADMED Blood, zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro, je analytická souprava pro měření koncentrace metabolitů NAD⁺ a NADH v lidské plné krvi. Analýza je kvantitativní. Určené uživatele analytické soupravy Q-NADMED představuje školený laboratorní personál. Prvním určeným účelem je detekce systémových změn v NAD⁺ a NADH. Primární určením uživatele výsledků analýzy jsou zdravotničtí pracovníci, kteří získané výsledky interpretují v kontextu onemocnění či zdravotního stavu. Výsledky získané pomocí analytické soupravy Q-NADMED lze využívat při rozhodování o léčbě, jako je například doplňkové podávání prekursorů NAD. Druhým určeným účelem analytické soupravy Q-NADMED je monitorování hladiny NAD⁺ a NADH u pacientů léčených například doplňkovým podáváním prekursorů NAD a úprava dávek.

ZÁKLADNÍ KLINICKÉ ÚDAJE

Metabolity NAD⁺ a NADH adaptují metabolismus a energetické homeostázy lidského těla na měnící se endogenní a exogenní podmínky. Nashromážděné údaje z výzkumů ukazují, že systémová hladina NAD⁺ klesá v reakci na projevy onemocnění, což vytváří signál pro nerovnováhu v energetické homeostáze těla. Míra poklesu NAD⁺ se liší u různých pacientů a patologií. Postupný pokles hladiny NAD⁺ tělu znemožňuje udržování základních metabolických funkcí i za podmínek probíhající léčby. Analyzátor Q-NADMED umožňuje screening pacientů zaměřený na deficit NAD⁺ a NADH za účelem jeho korekce a zvýšení efektivity léčby. Probíhající výzkum podílu NAD⁺ a NADH na mechanismech a progresi různých nemocí je velmi aktivní. Seznam patologií s podezřením na změny koncentrací NAD⁺ a NADH se stále rozrůstá, přičemž už byly publikovány důkazy pro mitochondriální onemocnění, stárnutí, sepsi, virové infekce, kardiovaskulární onemocnění a onemocnění ledvin, diabetes I. a II. typu, neurologické poruchy a rakovinu.

PRINCIPY ANALÝZY

Princip analýzy je cyklická enzymatická reakce s kolorimetrickou detekcí koncového bodu. Nejprve jsou metabolity NAD⁺ a NADH společně extrahovány z krevního vzorku v jednom kroku. Poté se extrakt rozdělí na dvě části. V první části se stabilizuje NAD⁺, zatímco NADH se odstraní, ve druhé části se stabilizuje NADH a odstraní se NAD⁺. Dále se metabolity NAD⁺ a NADH analyzují na dvou samostatných destičkách enzymatickou reakcí spojenou s barevnou změnou. Intenzita barevné změny v rámci analýzy je lineárně proporcionální ke koncentraci NAD⁺ nebo NADH ve směsi pro reakci.

DODANÉ REAGENCIE

REAGENCIE	POPIS*	PŘED ANALÝZOU
BUFFER A	28 ml extrakčního pufru	Nechte ustálit na pokojovou teplotu (15–25 °C).
NAD ⁺ stabilizing seagent	8 ml pufovaného roztoku pro měření NAD ⁺	Nechte ustálit na pokojovou teplotu (15–25 °C).
NADH stabilizing reagent	8 ml pufovaného roztoku pro měření NADH	Nechte ustálit na pokojovou teplotu (15–25 °C).
NAD ⁺ standard stock	1 mikrozkušavka se 40 µl 1 mM NAD ⁺	Viz pokyny k přípravě.
NADH standard stock	1 mikrozkušavka se 40 µl 1 mM NADH	Viz pokyny k přípravě.
BUFFER C	2 lahvičky s 19 ml analyzačního pufru	Nechte ustálit na pokojovou teplotu (15–25 °C).
Assay color reagent	2 lahvičky se 3 ml reagentie s barvou analýzy	Nechte ustálit na pokojovou teplotu (15–25 °C). Spotřebujte do 2 h od ustálení.
Enzyme	2 mikrozkušavky s 40 µl enzymu. Jedna na destičku.	Rozmrazte až před přidáním do směsi master mix.
Stop solution	3 ml roztoku pro zastavení reakce analýzy	Nechte ustálit na pokojovou teplotu (15–25 °C).
Positive control (buffer)	1 mikrozkušavka s 200 µl pufru pro přípravu pozitivní kontroly	Nechte ustálit na pokojovou teplotu (15–25 °C). Viz pokyny k přípravě.

*Poznámka: Přijatelná odchylka plnicího objemu je 5 %.

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Bezpečnost

Pouze pro diagnostiku in vitro. Pouze pro použití školeným personálem.

Složka Stop solution může způsobit podráždění pokožky, očí a dýchacích cest. Nevdechujte výpary.

Složka Assay color reagent může způsobit podráždění pokožky. Manipulujte s ní opatrně, v rukavicích.

Složka BUFFER A může způsobit podráždění očí. Manipulujte s ní opatrně, v ochranných brýlích.

V pracovní zóně nekuřte, nepijte, nejzte ani neaplikujte kosmetiku. Používejte ochranné rukavice, ochranné oblečení a ochranu očí. Po manipulaci si důkladně umyjte ruce.

Identifikovaná rizika chemických látek obsažených v této soupravě a příslušná varování a informace související s těmito riziky jsou uvedeny v bezpečnostním listu Q-NADMED.

Bezpečnostní list Q-NADMED obsahuje informace o likvidaci použitých složek soupravy.

UCHOVÁVÁNÍ A DATA EXSPIRACE REAGENCIÍ

- Do otevření je třeba všechny složky uchovávat při -80 °C. Zamezte teplotním výkyvům v mrazáku.
- Po rozmrazení jsou složky BUFFER A, NAD⁺ a NADH stabilizing reagents, Positive control (buffer) a Stop solution stabilní po dobu dvou týdnů při pokojové teplotě.
- Složku BUFFER C je třeba nechat roztát a použít v den provádění stanovení.
- Složka Assay color reagent je po rozmrazení stabilní po dobu až 3 hodin při pokojové teplotě.
- Složku Enzyme je nutné spotřebovat bezprostředně po rozmrazení.
- Standardy a pozitivní kontrolu je třeba připravit a spotřebovat v den analýzy.
- Standardy je třeba chránit před světlem.

DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL

Následující materiál je potřebný, ale není dodaný v rámci soupravy:

- Deionizovaná voda (voda milli-Q ze systému purifikace vody nebo komerčně dostupná deionizovaná voda, např. Sigma kat. č. 38796).
- Mikrozkušavky, 1,5 ml, pro přípravu vzorků, extrakci, stabilizaci a přípravu standardů pro stanovení. Požadavky na materiál mikrozkušavek: používejte základní nesterilní zkumavky do mikrocentrifugy vyrobené z transparentního / přirozeně zbarveného polypropylénu (PP) určené pro diagnostiku in vitro (např. Sarstedt č. 73.690.001). Nepoužívejte mikrozkušavky určené pro molekulární biologii označené jako sterilní (chemicky sterilizované), bez obsahu endotoxinů, pyrogenní, pro lidskou DNA a s nízkou retencí. Nepoužívejte mikrozkušavky pro práci s proteiny, označené jako LoBind.
- Dvě plastové vaničky pro vícekanálové pipety (z nesterilního polystyrenu): jedna pro pipetování směsi master mix, druhá pro pipetování složky Stop solution
- Dvě 96 jamkové destičky z transparentního polystyrenu se středně vysokou afinitou k vázání proteinů určeného pro kolorimetrické a absorbanční analýzy.
- Suchá lázeň (zahřívací blok) s nastavitelnou teplotou (do 80 °C).
- Stolní centrifuga s chlazením (max. rychlost 20 000 × g).
- Ledová vodní lázeň (napěchovaný led s přidanou kohoutkovou vodou do stavu směsi, která pevně udrží vložené zkumavky a neumožní jejich pohyb).
- Kalibrované jednoramenné pipety (0,5–10 µl, 5–50 µl, 20–200 µl, 100–1000 µl) a vícekanálové pipety (5–50 µl, 30–300 µl) a zkosené pipetovací špičky, s nízkou retencí.
- Spektrofotometrický analyzátor destiček s možností měření absorbance 570–573 nm.
- Hliníková fólie k ochraně mikrozkušavek a destiček před světlem.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Před analýzou rozmrazte všechny složky pro stanovení NAD⁺ a/nebo NADH podle pokynů v tabulce na straně 5.

- A. **BUFFER A:** připraveno k použití
- B. **NAD⁺ stabilizing reagent:** připraveno k použití
- C. **NADH stabilizing reagent:** připraveno k použití
- D. **Enzyme:** připraveno k použití
- E. **Stop solution** – připraveno k použití. Pokud se ve složce Stop solution po rozmrazení utvoří precipitát, je nutné jej znovu rozpustit 5minutovou inkubací při 37 °C a před použitím zchladit zpět na 25 °C. Se složkou Stop solution silně netřepejte.
- F. **Positive control (buffer):** připraveno k použití. (Další pokyny uvádí část věnovaná přípravě pozitivní kontroly)
- G. **50 µM NAD⁺ standard working stock:** přidejte 25 µl složky 1 mM NAD⁺ standard stock (dodáno) do 475 µl deionizované vody, vortexujte. Chraňte před světlem. (Další pokyny uvádí část věnovaná přípravě standardů a pozitivní kontroly.)
- H. **10 µM NADH standard working stock:** přidejte 10 µl složky 1 mM NADH standard stock (dodáno) do 990 µl deionizované vody, vortexujte. Chraňte před světlem. (Další pokyny uvádí část věnovaná přípravě standardů a pozitivní kontroly.)
- I. **Master mix:** 1 lahvičku složky **Assay color reagent** (3 ml) je třeba vmíchat do 1 lahvičky složky **BUFFER C**, čímž vznikne 1 lahvička směsi master mix potřebné pro 1 destičku k analýze NAD⁺ nebo NADH. Chraňte před světlem v původní jantarově zbarvené lahvičce. Neprotřepávejte silně. Zbytky zlikvidujte. Nezmrazujte opakovaně.

ODBĚR A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

Souprava je určena pouze pro analyzování vzorků plné krve. Vhodnými typy vzorků jsou žilní krev odebraná z vpichu do žíly a periferní krev odebraná prostředkem pro odběr krve lancetového typu. Vzorky plné krve je třeba sbírat do odběrových zkumavek s nasprejovaným lithiovým heparinem nebo K2 EDTA jako antikoagulantem a řádně promíchat převrácením nahoru a dolů.

Požadavky na zkumavky pro odběr žilní krve s antikoagulanty (BD Vacutainer nebo Vacuette): používejte zkumavky na krev K2 EDTA obsahující povlak K2 EDTA pro zajištění koncentrace 1,2–2 mg K2 EDTA na 1 ml odebrané krve nebo zkumavky na krev s lithium-heparinem (LH) obsahující povlak LH pro zajištění koncentrace 17–18 IU LH na 1 ml odebrané krve. Analýza vyžaduje malé objemy plné krve. Proto doporučujeme používat malé zkumavky pro odběr krve, např. 2–3 ml. Odebrání určeného objemu krve do zkumavky je absolutně nezbytné pro zajištění cílové koncentrace antikoagulantu ve vzorku.

Vzorky lze analyzovat čerstvé nebo zmrazené. Čerstvou krev lze analyzovat do 72 hodin od odebrání, pokud byla nepřetržitě uchovávána při teplotách 4–8 °C. Před analýzou prochází krev fází separace v odběrové zkumavce. Před odebráním alikvotní části pro extrakci je extrémně důležité opatrně promíchat vzorek. Pokud krev nelze analyzovat čerstvou, důrazně doporučujeme alikvotovat vzorek do 72 hodin od odebrání na alikvoty o objemu 150–200 µl s použitím nesterilních, jednostěnných, transparentních polypropylenových

zkumavek o objemu 0,5–2 ml a jejich zmrazení na teploty -20 °C nebo -80 °C. Zmrazení odběrových zkumavek s větším objemem vzorku (t.j. >2 ml) nebo v dvoustěnných zkumavkách s lemem prodlouží dobu zmrazování a zejména dobu rozmrazování před extrakcí, což může způsobit vysokou variabilitu výsledků. Skladovací doba pro malé alikvoty je jeden měsíc při teplotě -20 °C a přibližně jeden rok při teplotě -80 °C. Souprava měří intracelulární obsah NAD. Proto je velmi důležité každý čerstvý vzorek během alikvotace dostatečně promíchat, aby bylo zajištěno, že každý alikvot bude obsahovat přibližně stejný počet buněk. Zmrazené vzorky musí být před analýzou udržovány neustále zmrazené. Pro klinické hodnocení důrazně doporučujeme dodržovat pro všechny vzorky ve studii stejný časový interval mezi odebráním vzorku a alikvotací/zmrazením. Pro měření NAD⁺ a NADH je třeba 100 µl plné krve. Znovu zmrazené a rozmrazené vzorky krve nelze použít pro analýzu.

PRAKTICKÉ INFORMACE

- Komponenty soupravy nepoužívejte po datu expirace.
- Nemíchejte materiály z různých šarží souprav. Další cykly zmrazení-rozmrazení nejsou povoleny.
- Tato analýza NENÍ vhodná pro měření NAD⁺ a NADH v plazmě ani séru, kultivovaných buňkách ani tkáních (lidských ani zvířecích).
- Opatrným vířením důkladně promíchejte všechny reagenty. Malé mikrozskumavky je třeba před otevřením rychle centrifugovat při nízké rychlosti.
- Pro analýzu lze použít čerstvé i zmrazené krevní vzorky. Pro analýzu je velmi důležité mít homogenní (správně namíchaný) vzorek.
- V zájmu minimalizace manipulační doby doporučujeme extrakci nejvýše osmi vzorků najednou.
- Analýzy NAD⁺ a NADH se provádějí na dvou samostatných destičkách. Analýzy NAD⁺ a NADH doporučujeme provádět v den extrakce.
- Aby nedošlo ke křížové kontaminaci, vyměňujte pipetovací špičky za nové po přidání každé složky Standard, vzorku i reagenty. Používejte rovněž samostatné vaničky pro směs master mix a složku Stop solution.
- Vysoce přesné pipety a zkosené špičky s nižší retencí zvyšují přesnost.
- Složka Assay color reagent je žlutá a citlivá na světlo, po enzymatické reakci zhnědne. Po vystavení přímému slunečnímu světlu i přímému umělému světlu se její nespecifická barva změní na zelenou. V zájmu minimalizace rušivých vlivů světla na analýzu doporučujeme následující:
 - Pipetovat směs master mix a poté složku Stop solution do destičky za podmínek nepřímého přirozeného světla (podmínky tlumeného světla). K dosažení těchto podmínek vypněte umělé vnitřní osvětlení a nepipetujte u okna. Přirozeným nepřímým světlem (podmínky tlumeného světla) myslíme množství okolního světla, které lze pozorovat při jízdě automobilem pod mostem při zamračené obloze.
 - Zakrýt 96jamkovou destičku během reakční doby po přidání směsi master mix i během přenosu do analyzátoru destiček po přidání složky Stop solution víčkem z hliníkové fólie. Destičku neomotávejte hliníkovou fólií, hrozí kontaminace a smíchání vzorků při odmotávání.
 - Protokol by měl obsahovat kroky, při nichž je vyžadována práce při tlumeném světle.

- Pozitivní kontrola je umělý vzorek obsahující známé množství čistého NAD⁺ a NADH.
- Technické požadavky na suchou lázeň (zahřívací blok):
 - Otestování účinnosti tepelného přenosu v suché lázni následujícím způsobem:
 1. Přidejte 250 µl vody do mikrozkušavky vhodné do suché lázně, kterou používáte.
 2. Do mikrozkušavky s kapalinou vložte běžný laboratorní teploměr a umístěte ji do suché lázně nastavené na 80 °C.
 3. Změřte dobu potřebnou pro zvýšení teploty kapaliny na 70–75 °C.
 4. Všechny inkubační doby suché lázně uvedené v tomto protokolu se vztahují na suchou lázeň vyváženou na 80 °C, která ohřeje 250 µl vody na 75 °C za 2 minuty. To je dostatečné na chemickou reakci pro dosažení teploty 70–75 °C v roztoku po inkubaci v suché lázni.
- Technické požadavky pro spektrofotometrický analyzátor destiček:
 1. Měření absorpce světla při 570–573 nm.
 2. Možnost upravit jas/intenzitu světla při skenování na **nízkou** hodnotu. U některých analyzátorů destiček lze jas upravit jako počet záblesků na měření. V takovém případě nastavte počet záblesků od 5 do 10.
- Směs master mix a složka Stop solution obsahují detergenty. Aby nedošlo k tvorbě bublin, pipetujte směs master mix a složku Stop solution natlačením pipety do polohy první zarážky a odstraňte případné bubliny v jamkách jehličkou. Zamezte doteku obsahu jamek pipetovacími špičkami.
- Kroky doporučujeme provádět v tomto pořadí:
 1. Den před analýzou přiveďte složky BUFFER A, NAD⁺ stabilizing reagent, NADH stabilizing reagent a Stop solution na pokojovou teplotu. Tyto roztoky jsou při pokojové teplotě stabilní dva týdny.
 2. V den analýzy připravte standardy a pozitivní kontrolu.
 3. V den analýzy rozmrazte lahvičky se složkami BUFFER C a Assay color reagent a nechte je dosáhnout pokojové teploty. Rozmrazení těchto lahviček trvá 2–3 hodiny. Mezitím extrahujte vzorky a připravte dvě alikvoty extraktů vzorků pro samostatné měření NAD⁺ a NADH. Proveďte analýzy NAD⁺ a NADH na samostatných destičkách, jednu po druhé.

EXTRAKCE NAD⁺ A NADH Z KRVE

Poznámka: Tato část se provádí při normálních světelných podmínkách.

1. Před extrakcí přiveďte složky BUFFER A, NAD⁺ stabilizing reagent a NADH stabilizing reagent na pokojovou teplotu.
2. Použijte čerstvou krev chlazenou ledem nebo rozmrazujte zmrazené krevní vzorky v ledové lázni po dobu 12–15 minut před extrakcí. (**Tip:** během rozmrazování používejte občasné rychlé cykly teplých rukou.) Doporučujeme extrakci nejvýše 8 vzorků najednou.
3. Napipetujte 500 µl složky BUFFER A do 1,5ml mikrozkušavek.
4. Ohřejte alikvoty složky BUFFER A v suché lázni při 75–80 °C po dobu 2–3 min (max. 5 min). Ponechte je v suché lázni až do kroku 6.
5. Před extrakcí rychle promíchejte krevní vzorky několika cykly spuštění a vytažení pipety se souběžnou rotací špičky, zamezte tvorbě bublinek.
6. Přidejte 100 µl krve jedním jistým pohybem přímo do mikrozkušavky s ohřátou složkou BUFFER A v suché lázni. Neprodleně promíchejte několika intenzivními cykly spuštění a vytažení pipety se souběžnou rotací špičky, aby se účinně promíchal studený vzorek s ohřátou složkou BUFFER A.
7. Inkubujte homogenát při 75–80 °C po dobu 1 min.
8. Zchlad'te směs v ledové lázni alespoň na 5 min. Po zchlazení na ledu by měl homogenát polymerizovat bez volné tekutiny.
9. Centrifugujte při 20 000 × g po dobu 10 min při teplotě 4 °C. Přeneste supernatant do čisté mikrozkušavky a peletu zlikvidujte. Udržujte získané celkové extrakty (supernatanty) obsahující NAD⁺ i NADH při teplotě 4 °C přikryté víčkem z fólie až do dalšího kroku. Pokračujte kroky 2 až 9 s další várkou 8 vzorků, dokud máte vzorky k extrahování. Jakmile jsou všechny vzorky extrahovány, přistupte ke kroku 10. *Volitelně:* Supernatanty lze skladovat při -80 °C jeden týden. V takovém případě rozmrazujte 10 min při pokojové teplotě před přípravou alikvot v kroku 10.
10. Ze získaných extraktů připravte dvě samostatné alikvoty do čistých mikrozkušavek: 150 µl na mikrozkušavku.
11. Do první 150µl alikvoty přidejte 100 µl složky **NAD⁺ stabilizing reagent**, čímž získáte stabilizovaný extrakt s NAD⁺ (ponechá se NAD⁺ a odstraní NADH). Vortexujte a inkubujte při pokojové teplotě 5 min. Pokud se analýza neprovádí hned, udržujte stabilizované extrakty chlazené až do analýzy. **Chraňte před světlem zakrytím víčkem z hliníkové fólie.**
12. Do druhé 150µl alikvoty přidejte 100 µl složky **NADH stabilizing reagent**, čímž získáte stabilizovaný extrakt s NADH (ponechá se NADH a odstraní NAD⁺). Vortexujte a inkubujte po dobu 2 min v suché lázni při teplotě 80 °C. Chlad'te na ledu 5 min. Pokud se analýza neprovádí hned, udržujte stabilizované extrakty chlazené až do analýzy. **Chraňte před světlem zakrytím víčkem z hliníkové fólie.**

POZNÁMKA: Konečné ředění původního vzorku plné krve bude 10násobné.

POZNÁMKA: V případě individuálního doplňkového podávání prekurzorů NAD se může hladina NAD⁺ v krvi zvýšit, takže stabilizovaný extrakt NAD⁺ je nutné před analýzou dále zředit (dvojnásobně) deionizovanou vodou. Konečné ředění původního vzorku plné krve bude pro NAD⁺ 20násobné. Stabilizovaný extrakt s NADH ředění nevyžaduje.

PŘÍPRAVA STANDARDŮ

Poznámka: Tato část se provádí v normálních světelných podmínkách.

1. Standardy připravte v den analýzy. Mikrozkumavky s 1 mM složky standard stock rozmrazujte 5 min při pokojové teplotě. Během rozmrazování chraňte před světlem víčkem z fólie.
2. Připravte **50 µM roztok NAD⁺** přidáním 25 µl složky 1 mM NAD⁺ standard stock (dodáno) do 475 µl deionizované vody, vortexujte. Tento zásobní roztok se používá pro přípravu standardů NAD⁺ a pozitivní kontroly.
3. Připravte **standardy NAD⁺** podle schématu níže smícháním uvedených objemů činidel v následujícím pořadí: deionizovaná voda, 50 µM roztok NAD⁺, a složek BUFFER A a NAD⁺ stabilizing reagent. Konečný objem každého standardu je 1 ml. (**Tip:** k pipetování 50 µM roztoku NAD⁺ a vody použijte jednu stejnou pipetu 20–200 µl).

ČÍSLO STANDARDU	KONCENTRACE NAD ⁺ (µM)	PŘÍPRAVA STANDARDU			
		50 µM roztok NAD ⁺ (µl)	dH ₂ O (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. Připravte **10 µM roztok NADH** přidáním 10 µl složky 1 mM NADH Standard Stock (dodáno) do 990 µl deionizované vody, vortexujte. Tento zásobní roztok se používá pro přípravu standardů NADH a pozitivní kontroly.
5. Připravte **standardy NADH** podle schématu níže smícháním uvedených objemů činidel v následujícím pořadí: deionizovaná voda, 10 µM roztok NADH, a složek BUFFER A a NADH stabilizing reagent. Konečný objem každého standardu je 1 ml. (**Tip:** k pipetování 10 µM roztoku NADH a vody použijte jednu stejnou pipetu 20–200 µl).

ČÍSLO STANDARDU	KONCENTRACE NADH (µM)	PŘÍPRAVA STANDARDU			
		10 µM roztok NADH (µl)	dH ₂ O (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. Přikryjte stojan s připravenými standardy hliníkovou fólií jako ochranu před světlem a před pipetováním na destičku uložte do chladničky.

PŘÍPRAVA POZITIVNÍ KONTROLY

Poznámka: Tato část se provádí za normálních světelných podmínek.

Pozitivní kontrola se připravuje před analýzou smícháním známého množství standardů NAD⁺ a NADH s pufrům pro přípravu pozitivní kontroly (dodáno). Objem pozitivní kontroly a koncentrace metabolitů NAD napodobují krevní vzorek zdravého lidského pacienta. Připravená pozitivní kontrola prochází stejným postupem extrakce a stabilizace jako vzorky plné krve.

1. Rozmrazujte mikrozkušavku se složkou Positive control (buffer) po dobu 5 min při pokojové teplotě.
2. Připravte pozitivní kontrolu přidáním 45 µl pufru pro přípravu pozitivní kontroly do mikrozkušavky.
3. Přidejte 75 µl z **50 µM roztoku NAD⁺** (příprava viz str. 11) a 30 µl z **10 µM roztoku NADH** (příprava viz str. 11) do pufru pro přípravu pozitivní kontroly a vortexujte. Očekávaná koncentrace NAD⁺ v pozitivní kontrole je $25 \pm 2 \mu\text{M}$, v případě NADH pak $2 \pm 0,3 \mu\text{M}$.
4. Pozitivní kontrola neobsahuje proteiny, takže ji lze extrahovat pomocí složky BUFFER A při pokojové teplotě. Vytvořte „extrakt“ pozitivní kontroly přidáním 100 µl připravené pozitivní kontroly do 500 µl složky BUFFER A při pokojové teplotě, vortexujte a pokračujte krokem 5.
5. Připravte dvě samostatné alikvoty „extraktu“ pozitivní kontroly (z kroku 4) do čistých mikrozkušavek: 150 µl na zkumavku.
6. Do první 150 µl alikvoty přidejte 100 µl složky **NAD⁺ stabilizing reagent**, vortexujte a inkubujte 5 min při pokojové teplotě. Poté udržujte v chladničce a zakryté fólií až do analýzy. Tato stabilizovaná alikvota pozitivní kontroly se použije při analýze **NAD⁺**.
7. Do druhé 150 µl alikvoty přidejte 100 µl složky **NADH stabilizing reagent**, vortexujte. Tento roztok zahřívejte 2 min na 75–80 °C, zchladte na ledu. Poté udržujte v chladničce a zakryté fólií až do analýzy. Tato stabilizovaná alikvota pozitivní kontroly se použije při analýze **NADH**.

POZNÁMKA: Konečné ředění pozitivní kontroly bude 10násobné.

POSTUP ANALÝZY

Poznámky:

- Kroky 1–3 se provádějí v normálních světelných podmínkách.
- **Kroky 4–9 se provádějí v podmínkách tlumeného světla (když je přímé umělé osvětlení zhasnuté).**
- Každá analýza obsahuje slepé vzorky pro účely korekce všech nespecifických signálů pozadí. Slepé vzorky jsou připraveny z prvních čtyř stabilizovaných extraktů vzorků (t.j. BL UNK1–4 vzorků 1–4) v zájmu korekce nespecifických interakcí mezi složkami extraktů a složkou Assay color reagent ve směsi master mix. Pozitivní kontrola nevyžaduje samostatný slepý vzorek.
- Pokud se analyzuje krev subjektů procházející suplementací prekurzorů NAD⁺, vyžadují tyto vzorky minimálně dvě jamky se slepými vzorky pro tento typ vzorku. Pokud budou na stejné destičce analyzovány vzorky subjektu se suplementací a bez suplementace, doporučujeme připravit dvě jamky se slepými vzorky pro každý stav. K tomuto účelu náhodně vyberte dva stabilizované extrakty od osob se suplementací a dva od osob bez suplementace. Použijte tyto extrakty pro přípravu slepých vzorků: dvě jamky pro každý stav.
- **Všechny slepé vzorky se inkubují se směsí master mix BEZ přidané složky Enzyme.**
- Složku Enzyme je třeba rozmrazit bezprostředně před přidáním do směsi master mix. Mikrozskumavku se složkou Enzyme před otevřením krátce centrifugujte na nízkou rychlost.

Kroky:

1. Před napipetováním na destičku inkubujte připravené standardy, stabilizované extrakty vzorků a stabilizovanou pozitivní kontrolu po dobu 5 min při pokojové teplotě.
2. Napipetujte duplicitně 20 µl každého standardu NAD⁺ nebo NADH od ST1 (0 µM) podle schématu destičky na str. 23.
3. Napipetujte duplicitně 20 µl stabilizované pozitivní kontroly a stabilizovaných extraktů vzorků (viz schéma na str. 23). U prvních čtyř stabilizovaných extraktů vzorků napipetujte navíc jeden replikát do určené jamky (BL UNK1–4) podle schématu na str. 23. Tyto čtyři jamky jsou slepé vzorky potřebné pro analýzu bez složky Enzyme, za účelem korekce nespecifické interakce mezi extraktem a složkou Assay color reagent ve směsi master mix.
4. Od tohoto kroku dále pracujte v podmínkách tlumeného světla. Připravte směs master mix přidáním složky Assay color reagent do složky BUFFER C, jemně promíchejte otáčením.
5. Přidejte 190 µl směsi master mix bez enzymu do každé ze čtyř jamek pro slepé vzorky (BL UNK1–4).
6. Přidejte 40 µl složky Enzyme do lahvičky se zbývajícím směsí master mix. Jemně promíchejte tak, aby se nevytvořila pěna. Nalijte směs master mix s přidanými enzymy do nádoby. Chraňte směs master mix v nádobě během pipetování víčkem z hliníkové fólie. (Prohlédněte si prosím další pokyny v našem instruktážním videu na stránkách www.nadmed.com.)
7. Přidejte 190 µl směsi master mix s přidanou složkou Enzyme do všech zbývajících jamek včetně stabilizované pozitivní kontroly pomocí vícekanálové pipety, zamezte pění a přímému světlu. Připravenou destičku hned přikryjte víčkem z hliníkové fólie.
8. **Pro analýzu NAD⁺:** inkubujte zakrytou destičku 4–6 min při pokojové teplotě.
Pro analýzu NADH inkubujte zakrytou destičku 6–10 min při pokojové teplotě.

POZNÁMKA: reakci lze zastavit, pokud je zřetelný barevný gradient v standardech a rozdíl intenzity barev mezi vzorky s přidaným enzymem a slepými vzorky. Čím delší je reakční doba, tím intenzivnější signál bude možné pozorovat. Intenzita barev při analýze NADH je nižší než u NAD⁺, protože koncentrace NADH v krvi je mnohem nižší než NAD⁺. Proto se standardy NADH pohybují od 0 do 1 µM, zatímco standardy NAD⁺ od 0 do 5 µM.

9. Zastavte reakce přidáním 10 µl složky Stop solution do každé jamky ve stejném pořadí jako směs master mix pomocí vícekanálové pipety. Zamezte zpěnění tak, že jemně destičkou zatřesete rukou na desce stolu, odstraníte bublinky.
10. Změřte absorbanci světla při 573 nm ihned po přidání složky Stop solution. Pokud je to možné, protřepejte destičku uvnitř analyzátoru mikrodestiček po dobu 5 s před měřením. Poznámka: po přidání složky Stop solution se může intenzita barvy ve všech jamkách pomalu rovnoměrně zvyšovat. To se očekává v důsledku neenzymatického procesu na pozadí ve směsi master mix.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

1. Vypočtete průměr naměřených hodnot absorbance pro každý standard (ST1–ST5). Vytvořte standardní křivku zanesením střední absorbance pro každý standard na osu y oproti koncentraci (v μM) na ose x a proveďte prosté proložení lineární regrese standardní křivky.
2. Zjistěte koncentraci všech metabolitů v každé jamce podle vzorce lineární regrese standardní křivky.
3. Vypočtete průměr pro čtyři slepé vzorky (BL UNK1–4). Získané hodnoty představují nespecifický signál stabilizovaných extraktů.
4. Vypočtete průměr duplikátů každého stabilizovaného extraktu vzorku (UNK).
5. Vypočtete průměr duplikátů stabilizované pozitivní kontroly a vynásobte 10, abyste zjistili koncentraci (μM) metabolitu NAD⁺ a NADH v původních 150 μl pozitivní kontroly.
6. Získané koncentrace ve stabilizovaných extraktech vzorků korigujte na hodnotu slepých vzorků (vypočtenou v kroku 3) a vynásobte 10, abyste zjistili koncentraci (μM) metabolitu NAD⁺ nebo NADH v původním krevním vzorku (viz podrobnosti na straně 17). Pokud byly stabilizované extrakty NAD⁺ dodatečně ředěny, je nutné koncentraci vynásobit faktorem dodatečného ředění.

POZITIVNÍ KONTROLA

Účelem pozitivní kontroly je monitorovat účinnost stabilizačního kroku, pokud je ze směsi odstraněn některý z metabolitů. Koncentrace naměřeného NAD⁺ v pozitivní kontrole se očekává v rozmezí 23–27 μM , koncentrace NADH se očekává v rozmezí 1,7–2,3 μM .

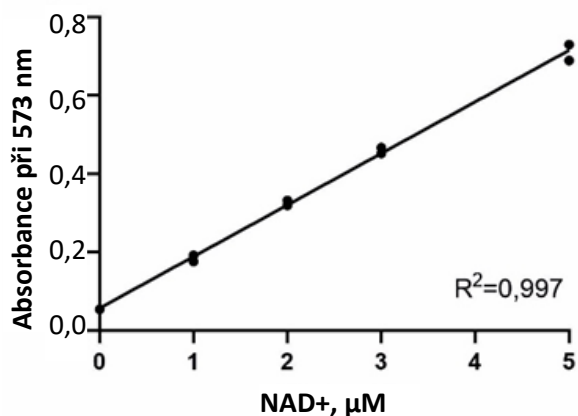
- Hodnoty absorbance stabilizované pozitivní kontroly na destičce NAD⁺ se očekávají mezi absorbancí ST3 a ST4.
- Hodnoty absorbance stabilizované pozitivní kontroly na destičce NADH se očekávají stejné jako u ST2 s odchylkou 0,05 optické jednotky.

INTERPRETACE A OMEZENÍ

A. OBVYKLÉ ÚDAJE

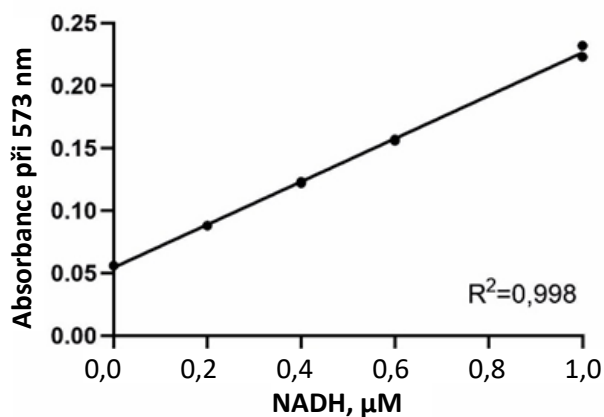
Křivka standardu a koncentrace ve stabilizovaných extraktech vzorků jsou uvedeny jen pro ukázkou a v žádném případě se nesmějí použít namísto křivky kalibrace v reálném čase.

KŘIVKA STANDARDU PRO NAD⁺



Standard	NAD ⁺ (μM)	Absorbance (573 nm) Doba analýzy – 4 min
ST1	0	0,054
ST2	1	0,176
ST3	2	0,319
ST4	3	0,452
ST5	5	0,689

KŘIVKA STANDARDU PRO NADH



Standard	NADH (μM)	Absorbance (573 nm) Doba analýzy – 6 min
ST1	0	0,056
ST2	0,2	0,088
ST3	0,4	0,122
ST4	0,6	0,157
ST5	1	0,223

VÝPOČET VÝSLEDKŮ PRO NAD⁺

Hodnoty koncentrace v stabilizovaných extraktech vzorků (UNK) a slepých vzorcích (BL UNK1–4) se stanoví podle vzorce pro lineární proložení standardní křivky NAD⁺

Neznámý vzorek	Koncentrace ve stabilizovaných extraktech (μM)	Koncentrace ve stabilizovaných extraktech korigovaná průměrem slepých vzorků (BL UNK 1–4, μM)	Konečná koncentrace NAD ⁺ v původním vzorku (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	0,040	–	
BL UNK 2	0,048		
BL UNK 3	0,026		
BL UNK 4	0,048		

*Korigováno o faktor ředění ×10

VÝPOČET VÝSLEDKŮ PRO NADH

Hodnoty koncentrace v stabilizovaných extraktech vzorků (UNK) a slepých vzorcích (BL UNK1–4) se stanoví podle vzorce pro lineární proložení standardní křivky NADH

Neznámý vzorek	Koncentrace ve stabilizovaných extraktech (μM)	Koncentrace ve stabilizovaných extraktech korigovaná průměrem slepých vzorků (BL UNK 1–4, μM)	Konečná koncentrace NADH v původním vzorku (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	0,156	–	
BL UNK 2	0,161		
BL UNK 3	0,150		
BL UNK 4	0,150		

*Korigováno o faktor ředění ×10

B. LIMITY DETEKCE

V tabulce níže je uveden limit slepého vzorku (LoB) pro měření soupravou Q-NADMED Blood (LoB $\pm$ standardní odchylka [SD]).

Limit slepého vzorku	
	pmol/jamka
NAD ⁺	1,84 $\pm$ 0,9
NADH	2,10 $\pm$ 0,5

Limit detekce (LoD) byl vypočítán ze standardních křivek NAD⁺ a NADH a je uveden v tabulce níže (LoD $\pm$ SD).

Limit detekce	
	μ M v plné krvi
NAD ⁺	0,33 $\pm$ 0,2
NADH	0,19 $\pm$ 0,05

Limit kvantifikace (LoQ) je uveden v tabulce níže (LoQ $\pm$ SD).

Limit kvantifikace	
	μ M v plné krvi
NAD ⁺	0,66 $\pm$ 0,3
NADH	0,40 $\pm$ 0,1

C. PŘESNOST A REPRODUKOVATELNOST

Přesnost provedení analýzy byla stanovena podle odchylky měření v rámci analýzy. Přesnost v rámci analýzy je uvedena v tabulce níže (CV = variační koeficient).

Přesnost v rámci analýzy	
	CV (%) $\pm$ SD
NAD ⁺	1,48 $\pm$ 0,8
NADH	3,33 $\pm$ 1,5

V tabulce níže výsledky reprodukovatelnosti analýzy jsou shrnuty (N = počet, * 3 alikvoty stejného vzorku byly analyzovány triplicitně).

Reprodukovatelnost						
	NAD ⁺			NADH		
Vzorek	Ctr1	Ctr2	Ctr3	Ctr1	Ctr2	Ctr3
Počet měření*	9	9	9	9	9	9
Střední hodnota (μ M)	27,41	29,41	22,00	0,55	0,71	0,64
Standardní odchylka	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. PŘESNOST

Přesnost analýzy byla vypočítána podle vzorků se známým množstvím čistého NAD⁺ nebo NADH. Výsledky jsou shrnuty v tabulce níže (přesnost analýzy ± SD).

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

E. MEZNÍ HODNOTA ANALÝZY

Nízké a vysoké mezní hodnoty představují nejnižší a nejvyšší koncentraci pozorované u 5–7 % osob daného vzorku populace. Mezní hodnoty jsou shrnuty v tabulce níže.

Mezní hodnota		
	Nízká	Vysoká
NAD ⁺ (μM)	20	36
NADH (μM)	0,6	1,8

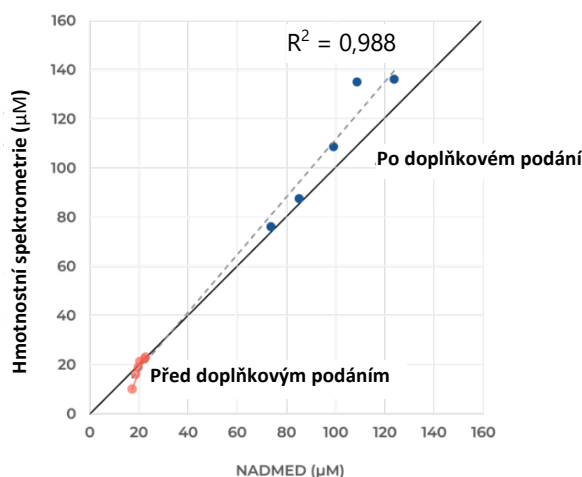
F. VÝKONNOSTNÍ CHARAKTERISTIKY

Interference ostatních metabolitů v extraktu nebyla samostatně hodnocena, protože jejich příspěvek je nízký a zohledněný prováděním analýzy slepých vzorků bez přidané složky Enzyme.

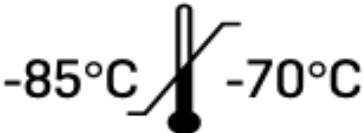
Upozornění: sorban draselný, boritan, pyridin a bizmut ve vzorku může způsobit inhibici složky Enzyme, a tím podhodnocení výsledků.

G. POROVNÁNÍ METOD

V zájmu potvrzení výkonnosti metody Q-NADMED jsme změřili koncentraci NAD⁺ v sadě kontrolních vzorků lidské krve, které byly rovněž analyzovány hmotnostní spektrometrií. Zmrazené krevní vzorky pěti zdravých pacientů (před a po 16 týdnech doplňkového podávání niacinu) byly paralelně analyzovány metodou Q-NADMED a hmotnostní spektrometrií. Výsledky metody Q-NADMED byly v souladu s výsledky hmotnostní spektrometrie.



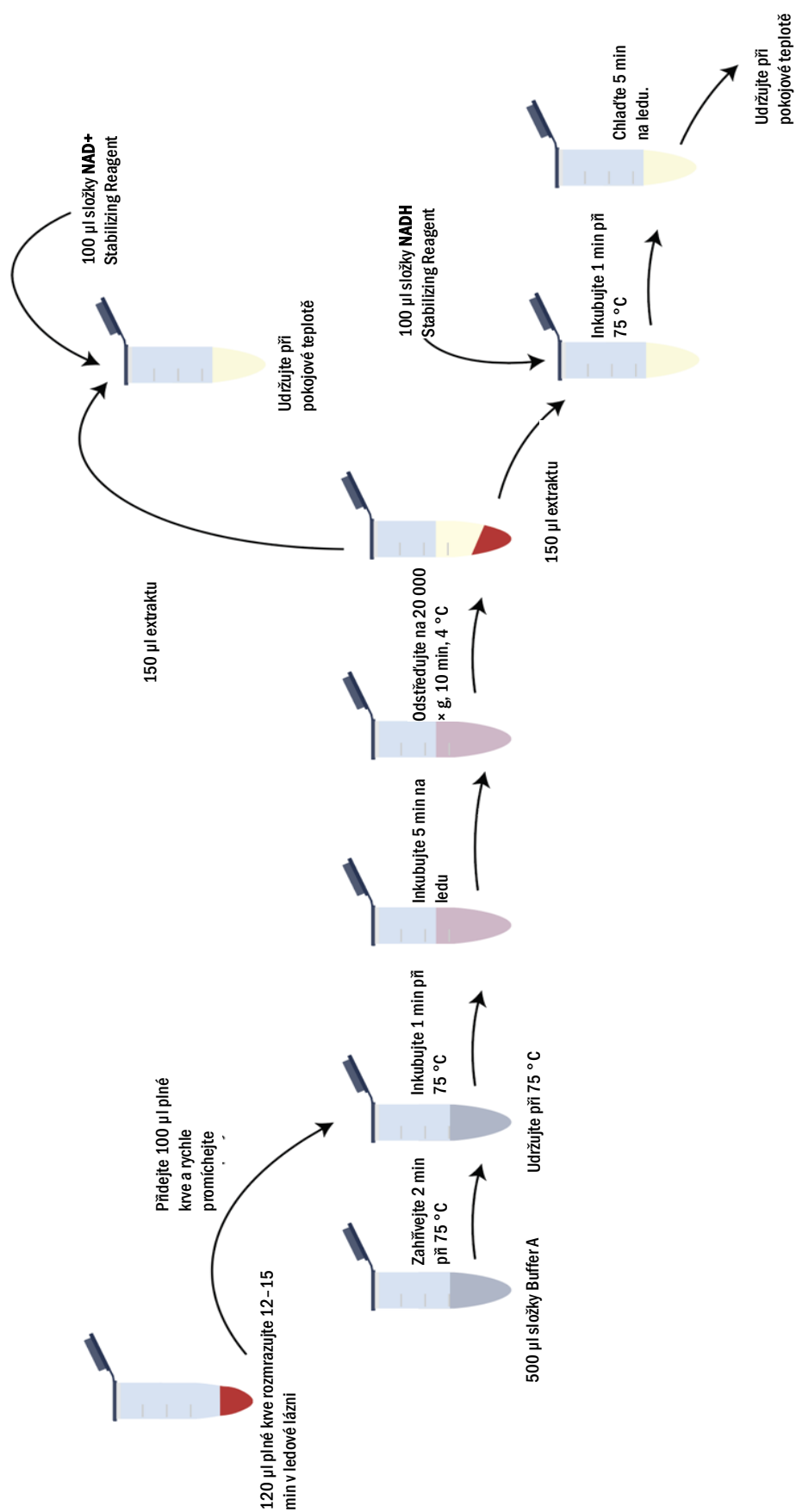
SYMBOLY

Symbol	
	Hořlavá kapalina a páry
	Upozornění/nebezpečí
	Viz návod k použití
	Spotřebujte do data
	Katalogové číslo
	Kód šarže
	Výrobce
	Horní limit teploty

	Nepoužívejte, je-li poškozen obal
	Udržujte v suchu
	Počet reakcí
	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Chraňte před přímým světlem

SCHÉMATICKÁ VYOBRAZENÍ

A. EXTRAKCE NAD⁺ A NADH Z KRVĚ



B. DOPORUČENÉ USPOŘÁDÁNÍ DESTIČKY PRO MĚŘENÍ NAD+ NEBO NADH

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

Uspořádání destičky pro analýzu NAD+ nebo NADH: St – standard, BL – slepé vzorky s předepsanými vzorky pro odečtení výsledků slepých vzorků, UNK – neznámé vzorky, stabilizované extrakty ze vzorků s neznámou koncentrací metabolitu, PosCtr – stabilizovaná pozitivní kontrola. Používejte 20 µl standardu, pozitivní kontroly a stabilizovaných extraktů vzorků na jamku. Slepé vzorky prvních čtyř vzorků se analyzují ve směsi master mix bez přidané složky Enzyme.

POZNÁMKY

USPOŘÁDÁNÍ DESTIČKY

K zaznamenávání analyzovaných standardů a vzorků používejte toto uspořádání destičky.

12								
11								
10								
9								
8								
7								
6								
5								
4								
3								
2								
1								
	A	B	C	D	E	F	G	H