

Q-NADMED BLOOD NAD⁺ and NADH assay kit

Kit per l'analisi quantitativa nel sangue intero

Versione 4.0

ESCLUSIVAMENTE MONOUSO

Prima dell'utilizzo del prodotto, leggere per intero le istruzioni.

CE IVD PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

INFORMAZIONI GENERALI

- A. Denominazione commerciale: Q-NADMED Blood NAD⁺ and NADH assay kit: kit per l'analisi quantitativa nel sangue intero
- B. Numero di catalogo:
 - a. IVD_001, 40 campioni (formato a 96 pozzetti)
 - b. IVD_001/MY, 40 campioni (formato a 96 pozzetti)
- C. Conservazione: -80 °C
- D. Data di pubblicazione delle istruzioni per l'uso: settembre 2023

Produttore:

NADMED Ltd / Oy

Haartmaninkatu 4, Bldg 14

00290 Helsinki, FINLANDIA

www.nadmed.com, info@nadmed.com

SOMMARIO

INFORMAZIONI GENERALI	2
SOMMARIO	3
USO PREVISTO	4
CONTESTO CLINICO	4
PRINCIPI DELL'ANALISI	4
REAGENTI FORNITI	5
PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI.....	5
CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA DEI REAGENTI	6
ALTRI MATERIALI NECESSARI	6
PREPARAZIONE DEI REAGENTI.....	7
RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI.....	7
CONSIDERAZIONI PRATICHE	8
ESTRAZIONE DI NAD ⁺ E NADH DAL SANGUE.....	10
PREPARAZIONE DEGLI STANDARD	11
PROCEDURA D'ANALISI	13
CALCOLO DEI RISULTATI	15
CONTROLLO POSITIVO	15
PRESTAZIONI E LIMITAZIONI	16
SIMBOLI.....	20
FIGURE SCHEMATICHE	22
NOTE.....	23
FORMATO DELLA PIASTRA.....	24

USO PREVISTO

Q-NADMED Blood, un dispositivo diagnostico in vitro, è un kit per l'analisi analitica destinato alla misurazione delle concentrazioni dei metaboliti NAD⁺ e NADH nel sangue umano intero. L'analisi è di tipo quantitativo. L'uso di Q-NADMED è destinato a personale di laboratorio adeguatamente formato. La principale destinazione d'uso è il rilevamento delle variazioni sistemiche di NAD⁺ e NADH. L'uso di Q-NADMED è destinato principalmente agli operatori sanitari responsabili dell'interpretazione dei risultati ottenuti nel contesto di un quadro di salute/malattia. I risultati del kit di analisi Q-NADMED possono essere utilizzati nel contesto dei processi decisionali riguardanti il trattamento, ad esempio in merito all'integrazione con precursori del NAD. La destinazione d'uso secondaria del kit di analisi Q-NADMED è il monitoraggio dei livelli di NAD⁺ e NADH in pazienti attualmente in trattamento, ad esempio pazienti che ricevono un'integrazione con precursori del NAD, e la conseguente regolazione della dose.

CONTESTO CLINICO

I metaboliti NAD⁺ e NADH adattano il metabolismo e l'omeostasi energetica del corpo umano a variazioni delle condizioni endogene ed esogene. Numerosi dati di ricerca mostrano come i livelli sistemici di NAD⁺ aumentino in risposta a una malattia conclamata, a testimonianza di uno squilibrio nell'omeostasi energetica del corpo. L'entità della diminuzione di NAD⁺ varia a seconda dei pazienti e delle patologie. La progressiva diminuzione dei livelli di NAD⁺ impedisce al corpo di supportare le funzioni metaboliche di base legate, anche quando è in corso una terapia. Q-NADMED consente lo screening della carenza di NAD⁺ e NADH nei pazienti, con l'obiettivo di correggere il trattamento e aumentarne l'efficienza. La ricerca sul contributo di NAD⁺ e NADH ai meccanismi e alla progressione di diverse patologie è in costante fermento. L'elenco delle patologie con sospetta variazione delle concentrazioni di NAD⁺ e NADH è in continuo aggiornamento. Sono già state pubblicate prove relativamente al coinvolgimento di patologie mitocondriali, invecchiamento, sepsi, infezioni virali, patologie cardiovascolari e renali, diabete di tipo I e II, disturbi neurologici e cancro.

PRINCIPI DELL'ANALISI

Il principio dell'analisi è una reazione enzimatica ciclica con rilevamento al punto finale colorimetrico. Innanzitutto, i metaboliti NAD⁺ e NADH vengono estratti insieme da un campione di sangue in un unico passaggio. Quindi, la porzione estratta viene suddivisa in due parti. Nella prima, il NAD⁺ viene stabilizzato mentre il NADH viene rimosso; nella seconda, il NADH viene stabilizzato mentre il NAD⁺ viene rimosso. Successivamente, i metaboliti NAD⁺ e NADH vengono analizzati su due piastre separate mediante una reazione enzimatica associata a una variazione cromatica. L'intensità di tale variazione nell'analisi è linearmente proporzionale alla concentrazione di NAD⁺ o NADH nella miscela di reazione.

REAGENTI FORNITI

REAGENTI	DESCRIZIONE*	PRIMA DELL'ANALISI
BUFFER A	28 mL di tampone di estrazione	Portare a temperatura ambiente (15–25 °C).
NAD+ stabilizing reagent	8 mL di soluzione tamponata per la misurazione di NAD+	Portare a temperatura ambiente (15–25 °C).
NADH stabilizing reagent	8 mL di soluzione tamponata per la misurazione di NADH	Portare a temperatura ambiente (15–25 °C).
NAD+ standard stock	1 microprovetta con 40 µL di NAD+ 1 mM	Consultare la guida alla preparazione.
NADH standard stock	1 microprovetta con 40 µL di NADH 1 mM	Consultare la guida alla preparazione.
BUFFER C	2 flaconcini con 19 mL di tampone per l'analisi	Portare a temperatura ambiente (15–25 °C).
Assay color reagent	2 flaconcini con 3 mL di reagente con colorante per l'analisi	Portare a temperatura ambiente (15–25 °C). Utilizzare entro 2 ore dall'equilibratura.
Enzyme	2 microprovette con 40 µL di enzima. Uno per piastra.	Scongela solo prima dell'aggiunta alla miscela master.
Stop solution	3 mL di soluzione per l'arresto della reazione di analisi	Portare a temperatura ambiente (15–25 °C).
Positive control (buffer)	1 microprovetta con 200 µL di tampone per la preparazione del controllo positivo	Portare a temperatura ambiente (15–25 °C). Consultare la guida alla preparazione.

*Nota: la variazione accettata del volume di riempimento è pari al 5%.

PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI

Sicurezza

Per uso diagnostico in vitro esclusivamente da parte di personale adeguatamente formato.

Stop solution può causare irritazione cutanea, oculare e respiratoria. Evitare l'inalazione dei fumi.

Assay color reagent può causare irritazione cutanea. Maneggiare con cura e indossare dei guanti.

BUFFER A può causare irritazione oculare. Maneggiare con cura e indossare occhiali protettivi.

Non fumare, non consumare alimenti e bevande e non applicare prodotti cosmetici nell'area di lavoro. Indossare guanti e indumenti protettivi, nonché sistemi protettivi per gli occhi. Lavarsi accuratamente le mani dopo l'uso.

La scheda dei dati di sicurezza (SDS) di Q-NADMED riporta i pericoli identificati connessi alle sostanze chimiche presenti nel kit, nonché le opportune avvertenze associate a tali pericoli.

La scheda dei dati di sicurezza (SDS) di Q-NADMED descrive le procedure per lo smaltimento dei componenti del kit utilizzati.

CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA DEI REAGENTI

- Prima dell'apertura, conservare tutti i componenti del kit a -80 °C. Evitare sbalzi di temperatura nel congelatore.
- Dopo lo scongelamento, BUFFER A, NAD⁺ e NADH stabilizing reagent, Positive control (buffer) e Stop solution rimangono stabili per due settimane a temperatura ambiente
- Scongela ed utilizzare BUFFER C il giorno stesso dell'analisi.
- Dopo lo scongelamento, Assay color reagent rimane stabile per un massimo di 3 ore a temperatura ambiente
- Utilizzare Enzyme subito dopo lo scongelamento
- Preparare ed utilizzare gli standard e il controllo positivo il giorno stesso dell'analisi
- Tenere gli standard al riparo dalla luce

ALTRI MATERIALI NECESSARI

I seguenti materiali sono necessari ma non forniti nel kit:

- Acqua deionizzata (acqua milli-Q da un sistema di purificazione delle acque o acqua deionizzata disponibile in commercio, ad esempio Sigma n. di cat. 38796).
- Microprovette, 1,5 mL, per la preparazione dei campioni, l'estrazione, la stabilizzazione e la preparazione degli standard per l'analisi. Requisiti relativi al materiale di cui sono composte le microprovette: utilizzare provette per microcentrifuga di base non sterili realizzate in polipropilene (PP) trasparente o di colore naturale destinate all'uso diagnostico in vitro (ad esempio Sarstedt, rif. 72.690.001). Non utilizzare microprovette destinate alla biologia molecolare contrassegnate come sterili (sterilizzazione chimica), prive di endotossine, pirogeni, DNA umano e a bassa ritenzione. Non utilizzare microprovette destinate all'uso con proteine contrassegnate come LoBind.
- Due vaschette per pipette multicanale in plastica (polistirene non sterile): una per il pipettaggio della miscela master, l'altra per il pipettaggio della Stop solution.
- Due micropiastre in polistirene trasparente da 96 pozzetti con affinità di legame media alle proteine, progettate per analisi colorimetriche e di assorbanza.
- Bagno secco (blocco riscaldante) con temperatura regolabile (fino a 80 °C).
- Microcentrifuga da banco con sistema di raffreddamento (velocità massima 20.000 x g).
- Bagno ghiacciato (ghiaccio in blocco con aggiunta di acqua di rubinetto fino a renderlo semi sciolto in modo che sorregga adeguatamente le microprovette inserite senza farle galleggiare).
- Pipette monocanale calibrate (0,5–10 µL, 5–50 µL, 20–200 µL, 100–1000 µL) e pipette multicanale (5–50 µL, 30–300 µL) e puntali per pipette smussati a bassa ritenzione.
- Lettore spettrofotometrico per micropiastre in grado di misurare l'assorbanza nell'intervallo 570–573 nm.
- Foglio d'alluminio per proteggere piastre e microprovette dalla luce.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Prima dell'uso, scongelare tutti i componenti per l'analisi di NAD⁺ e/o NADH attenendosi alle istruzioni riportate nella tabella a pagina 5.

- A. **BUFFER A:** Pronto all'uso
- B. **NAD⁺ stabilizing reagent:** Pronto all'uso
- C. **NADH stabilizing reagent:** Pronto all'uso
- D. **Enzyme:** Pronto all'uso
- E. **Stop solution:** Pronta all'uso. Se a seguito dello scongelamento si nota la presenza di precipitati nella Stop solution, sciogliere nuovamente per 5 minuti mediante incubazione a +37 °C, quindi riportare a 25 °C prima dell'uso. Evitare di agitare energicamente la Stop solution.
- F. **Positive control (buffer):** Pronto all'uso. (Per ulteriori informazioni, consultare la sezione relativa alla preparazione del controllo positivo).
- G. **50 µM NAD⁺ standard stock:** aggiungere 25 µL di NAD⁺ standard stock 1 mM (fornito) a 475 µL di acqua deionizzata, quindi agitare su vortex. Tenere al riparo dalla luce. (Per ulteriori informazioni, consultare la sezione relativa alla preparazione degli standard e del controllo positivo).
- H. **10 µM NADH standard stock:** aggiungere 10 µL di NADH standard stock 1 mM (fornito) a 990 µL di acqua deionizzata, quindi agitare su vortex. Tenere al riparo dalla luce. (Per ulteriori informazioni, consultare la sezione relativa alla preparazione degli standard e del controllo positivo).
- I. **Miscela master:** miscelare 1 flaconcino di Assay color reagent (3 mL) con 1 flaconcino di BUFFER C per ottenere 1 flaconcino di miscela master, necessario per l'analisi di NAD⁺ o NADH su 1 piastra. Tenere al riparo dalla luce e conservare all'interno del flaconcino originale color ambra. Evitare di agitare energicamente. Eliminare la quota rimanente. Non ricongelare.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il kit è destinato all'analisi di sangue intero. Il sangue venoso, prelevato mediante puntura venosa, e il sangue periferico, prelevato mediante dispositivi per il prelievo di sangue a lancetta, sono tipologie di campione adatte. I campioni di sangue intero devono essere prelevati in provette con anticoagulanti quali litio eparina o K2 EDTA applicati a spruzzo e **miscelati adeguatamente** roteando in direzione verticale.

Requisiti per le provette per il prelievo di sangue venoso con anticoagulanti (BV Vacutainer o Vacuette): utilizzare provette per sangue K2 EDTA contenenti K2 EDTA applicato a spruzzo con una concentrazione di K2 EDTA pari a 1,2–2 mg per 1 mL di sangue prelevato o provette per sangue con litio eparina (LH) contenenti LH applicata a spruzzo con una concentrazione di LH pari a 17–18 UI per 1 mL di sangue prelevato. L'analisi richiede piccoli volumi di sangue intero. Pertanto, si consiglia di utilizzare provette di piccole dimensioni per il prelievo del sangue, ad esempio 2–3 mL. Prelevare il volume desiderato di sangue è fondamentale per mantenere la concentrazione target di anticoagulante nel campione.

I campioni possono essere analizzati freschi o congelati. Il sangue fresco può essere analizzato entro 72 ore se mantenuto costantemente a 4–8 °C dopo il prelievo. Poiché nella provetta le diverse fasi del sangue si separano, è fondamentale miscelare accuratamente il campione prima di prelevare un'aliquota per l'estrazione. Se non è possibile analizzare il sangue fresco, si consiglia di suddividere il campione in aliquote da 150–200 µL entro 72 ore dal prelievo utilizzando microprovette non sterili in polipropilene trasparente a parete singola da 0,5–2 mL e di congelarle a -20 °C o a -80 °C. Il congelamento delle provette con un volume di campione maggiore (ossia > 2 mL) o in microprovette a doppia parete con base d'appoggio aumenta il

tempo di congelamento e, soprattutto, il tempo di scongelamento prima dell'estrazione, cosa che può causare elevata variabilità dei risultati. Il tempo di conservazione per piccole aliquote è di un mese a -20 °C e di circa un anno a -80 °C. Il kit misura il contenuto di NAD intracellulare. Pertanto, un'adeguata miscelazione di ciascun campione fresco prima e durante la suddivisione in aliquote è fondamentale per garantire che ciascuna aliquota contenga circa lo stesso numero di cellule. I campioni congelati devono essere mantenuti tali senza interruzione prima dell'analisi. Per gli studi clinici, si consiglia di adottare lo stesso intervallo di tempo tra il prelievo del campione e la suddivisione in aliquote/il congelamento per tutti i campioni dello studio. Per misurare NAD⁺ e NADH sono necessari 100 µL di sangue intero. Successivamente, i campioni di sangue congelati e scongelati non possono essere utilizzati per l'analisi.

CONSIDERAZIONI PRATICHE

- Non utilizzare kit con componenti scaduti.
- Non miscelare materiali di kit provenienti da lotti differenti. È vietata l'esecuzione di ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.
- Questa analisi NON è adatta per la misurazione di NAD⁺ e NADH nel plasma o nel siero, né in cellule o tessuti coltivati (umani o animali).
- Miscelare accuratamente tutti i reagenti agitandoli delicatamente. Prima dell'apertura, centrifugare brevemente a bassa velocità le microprovette di piccole dimensioni.
- Per l'analisi è possibile utilizzare campioni di sangue sia fresco che congelato. È essenziale ottenere campioni omogenei (appropriatamente mescolati) per l'analisi.
- Si consiglia di effettuare l'estrazione al massimo su otto campioni di sangue per volta, in modo da ridurre al minimo il tempo di manipolazione.
- Le analisi di NAD⁺ e NADH avvengono su due piastre separate. Si consiglia di eseguire l'analisi di NAD⁺ e NADH il giorno stesso dell'estrazione.
- Per evitare la contaminazione crociata, sostituire i puntali delle provette ogni volta che si aggiunge lo standard, il campione e il reagente. Utilizzare vaschette separate per la miscela master e la Stop solution.
- L'utilizzo di pipette ad alta precisione e di puntali smussati a bassa ritenzione aiuta a migliorare la precisione.
- Assay color reagent è un composto di colore giallo sensibile alla luce. Assume un colore marrone a seguito della reazione enzimatica. L'esposizione alla luce solare diretta o alla luce artificiale diretta causa una variazione cromatica aspecifica verso il verde. Per ridurre al minimo l'interferenza della luce con l'analisi, si consiglia di:
 - pipettare la miscela master e la Stop solution nella piastra in presenza di luce naturale indiretta (condizioni di scarsa illuminazione). A tal fine, spegnere l'illuminazione artificiale interna ed evitare di eseguire il pipettaggio in prossimità di finestre. Con "in presenza di luce naturale indiretta (condizioni di scarsa illuminazione)" si intende una luce ambientale analoga a quella percepita guidando un'auto sotto un ponte in una giornata nuvolosa.
 - dopo l'aggiunta della miscela master, e nel corso della reazione, coprire la piastra da 96 pozzetti con un coperchio in foglio d'alluminio. Mantenere coperto anche durante il trasferimento al lettore per piastre dopo l'aggiunta della Stop solution. Evitare di avvolgere la piastra col foglio

d'alluminio a causa del rischio di contaminazione e di miscelazione del campione durante la rimozione dello stesso.

- il protocollo indica i passaggi che devono essere eseguiti in condizioni di scarsa illuminazione.
- Il controllo positivo è un campione artificiale contenente quantità note di NAD⁺ e NADH puri.
- Requisiti tecnici per il bagno secco (blocco riscaldante):
 - Testare l'efficienza del trasferimento di calore nel bagno secco come segue:
 1. Aggiungere 250 µL di acqua in una microprovetta che può essere inserita nel bagno secco utilizzato,
 2. Inserire un termometro da laboratorio convenzionale nella microprovetta contenente il liquido e posizionarla nel bagno secco impostato a 80 °C,
 3. Misurare il tempo necessario affinché la temperatura del liquido raggiunga 70–75 °C,
 4. Tutti i tempi di incubazione nel bagno secco indicati in questo protocollo si riferiscono a un bagno secco equilibrato a 80 °C che riscalda 250 µL di acqua a 75 °C in 2 minuti. Ciò è sufficiente affinché la reazione chimica nella soluzione raggiunga i 70–75 °C con l'incubazione nel bagno secco.
- Requisiti tecnici per il lettore per piastre spettrofotometrico:
 1. Misurazione dell'assorbimento della luce nell'intervallo 570–573 nm,
 2. Possibilità di regolare la luminosità/intensità della luce di scansione su **bassa**. In alcuni lettori per piastre è possibile regolare la luminosità in base al numero di flash per misurazione. In quest'ultimo caso, impostare il numero di flash tra 5 e 10.
- La miscela master e la Stop solution contengono detergenti. Per evitare la formazione di bolle, eseguire il pipettaggio della miscela master e della Stop solution premendo il pistone fino al primo arresto, quindi rimuovere tutte le bolle presenti nei pozzetti adoperando un ago di piccole dimensioni. Evitare il contatto tra il contenuto dei pozzetti e i puntali delle pipette.
- Si consiglia di procedere attenendosi alla seguente procedura:
 1. Portare BUFFER A, NAD⁺ stabilizing reagent, NADH stabilizing reagent e Stop solution a temperatura ambiente il giorno precedente l'analisi. Tali soluzioni rimangono stabili a temperatura ambiente per due settimane.
 2. Il giorno stesso dell'analisi, preparare gli standard e il controllo positivo.
 3. Il giorno stesso dell'analisi, scongelare i flaconcini di BUFFER C e Assay color reagent e portarli a temperatura ambiente. Lo scioglimento di questi flaconcini richiede dalle 2 alle 3 ore. In questo lasso di tempo, eseguire l'estrazione sui campioni e preparare due aliquote derivate da tali estratti, in modo da effettuare misurazioni separate di NAD⁺ e NADH. Eseguire l'analisi di NAD⁺ e NADH su piastre separate, una alla volta.

ESTRAZIONE DI NAD⁺ E NADH DAL SANGUE

Nota: le operazioni riportate in questa sezione vengono svolte in condizioni di illuminazione normale.

1. Portare BUFFER A, NAD⁺ stabilizing reagent e NADH stabilizing reagent a temperatura ambiente prima dell'estrazione.
2. Utilizzare campioni di sangue fresco raffreddato su ghiaccio o scongelare campioni di sangue congelato su un bagno di acqua ghiacciata per 12–15 minuti prima dell'estrazione. (**Consiglio:** occasionalmente, scaldare brevemente con le mani durante lo scongelamento). Si consiglia di effettuare l'estrazione al massimo su 8 campioni di sangue per volta.
3. Pipettare 500 µL di BUFFER A in microprovette da 1,5 mL.
4. Riscaldare le aliquote di BUFFER A in un bagno secco impostato a 75–80 °C per 2–3 minuti (5 al massimo). Lasciare le aliquote nel bagno secco sino al passaggio 6.
5. Prima dell'estrazione, miscelare brevemente i campioni di sangue con un paio di cicli di pipettaggio su e giù e ruotando contemporaneamente il puntale; evitare la formazione di schiuma.
6. Con uno spostamento rapido e deciso, aggiungere 100 µL di sangue direttamente nella microprovetta contenente BUFFER A caldo lasciato nel bagno secco. Miscelare immediatamente mediante alcuni cicli di pipettaggio deciso su e giù e ruotare contemporaneamente il puntale in modo da ottenere una miscelazione omogenea del campione freddo con il BUFFER A caldo.
7. Incubare l'omogenato a 75–80 °C per 1 minuto.
8. Raffreddare la miscela in un bagno di acqua ghiacciata per almeno 5 minuti. Al termine del raffreddamento su ghiaccio, l'omogenato deve risultare polimerizzato e privo di liquido libero.
9. Centrifugare a 20.000 x g per 10 minuti a 4 °C. Trasferire il surnatante in una microprovetta pulita ed eliminare il sedimento. Mantenere gli estratti totali (surnatanti) così ottenuti contenenti NAD⁺ e NADH a 4 °C, coperti con un foglio d'alluminio fino al passaggio successivo. Procedere dal passaggio 2 al passaggio 9 con i successivi 8 campioni, finché sono presenti campioni da sottoporre a estrazione. *Facoltativamente*, i surnatanti possono essere conservati a -80 °C per una settimana. In questo caso, scongelare a temperatura ambiente per 10 minuti prima della preparazione delle aliquote del passaggio 10.
10. In microprovette pulite, preparare due aliquote separate dagli estratti ottenuti: 150 µL/provetta.
11. Nella prima aliquota da 150 µL, aggiungere 100 µL di NAD⁺ stabilizing reagent in modo da ottenere un estratto stabilizzato contenente NAD⁺ (il NAD⁺ viene mantenuto mentre il NADH viene rimosso). Agitare su vortex e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti. Nel caso in cui non si proceda immediatamente all'analisi, refrigerare gli estratti fino all'esecuzione della stessa. **Tenere al riparo dalla luce coprendo con un foglio d'alluminio.**
12. Nella seconda aliquota da 150 µL, aggiungere 100 µL di NADH stabilizing reagent in modo da ottenere un estratto stabilizzato contenente NADH (il NADH viene mantenuto mentre il NAD⁺ viene rimosso). Agitare su vortex e incubare per 2 minuti in un bagno secco impostato a 80 °C. Raffreddare su ghiaccio per 5 minuti. Nel caso in cui non si proceda immediatamente all'analisi, refrigerare gli estratti fino all'esecuzione della stessa. **Tenere al riparo dalla luce coprendo con un foglio d'alluminio.**

NOTA: il campione di sangue intero originale avrà una diluizione finale pari a 10 volte.

NOTA: in caso di integrazione personalizzata con precursori del NAD, i livelli ematici di NAD⁺ potrebbero aumentare; pertanto, prima dell'analisi, è necessario diluire (due volte) l'estratto stabilizzato di NAD⁺ utilizzando acqua deionizzata. In questo caso, il campione di sangue originale avrà una diluizione del NAD⁺ pari a 20 volte. L'estratto stabilizzato di NADH non necessita di diluizione.

PREPARAZIONE DEGLI STANDARD

Nota: le operazioni riportate in questa sezione vengono svolte in condizioni di normale illuminazione.

1. Preparare gli standard il giorno stesso dell'analisi. Scongelare le microprovette contenenti gli standard stock 1 mM per 5 minuti a temperatura ambiente. Durante lo scongelamento, tenere al riparo dalla luce coprendo con un foglio d'alluminio.
2. Preparare **50 μM NAD⁺ stock** aggiungendo 25 μL di NAD⁺ standard stock 1 mM (fornito) in 475 μL di acqua deionizzata; agitare su vortex. Lo stock viene utilizzato per la preparazione degli standard di NAD⁺ e per la preparazione del controllo positivo.
3. Preparare gli **standard di NAD⁺** attenendosi allo schema seguente, miscelando i volumi indicati di reagenti nel seguente ordine: acqua deionizzata, 50 μM NAD⁺ stock, BUFFER A e NAD⁺ stabilizing reagent. Il volume finale di ciascuno standard è pari a 1 mL. (**Consiglio:** utilizzare la stessa pipetta da 20–200 μL per pipettare 50 μM NAD⁺ stock e acqua).

NUMERO DELLO STANDARD	CONCENTRAZIONE DI NAD ⁺ (μM)	PREPARAZIONE DELLO STANDARD			
		50 μM NAD ⁺ stock (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. Preparare **10 μM NADH stock** aggiungendo 10 μL di NADH standard stock 1 mM (fornito) in 990 μL di acqua deionizzata; agitare su vortex. Lo stock viene utilizzato per la preparazione degli standard di NADH e per la preparazione del controllo positivo.
5. Preparare gli **standard di NADH** attenendosi allo schema seguente, miscelando i volumi indicati di reagenti nel seguente ordine: acqua deionizzata, 10 μM NADH stock, BUFFER A e NADH stabilizing reagent. Il volume finale di ciascuno standard è pari a 1 mL. (**Consiglio:** utilizzare la stessa pipetta da 20–200 μL per pipettare 10 μM NADH stock e acqua).

NUMERO DELLO STANDARD	CONCENTRAZIONE DI NADH (μM)	PREPARAZIONE DELLO STANDARD			
		10 μM NADH stock (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. Coprire il supporto contenente gli standard già pronti con un coperchio in foglio d'alluminio in modo da tenerli al riparo dalla luce. Mantenerli refrigerati prima del pipettaggio nella piastra.

PREPARAZIONE DEL CONTROLLO POSITIVO

Nota: le operazioni riportate in questa sezione vengono svolte in condizioni di normale illuminazione

Il controllo positivo deve essere preparato prima dell'esecuzione dell'analisi miscelando quantità note di standard di NAD⁺ e NADH e Positive control buffer (fornito). Il volume del controllo positivo e la concentrazione dei metaboliti NAD sono analoghi a quelli di un campione di sangue proveniente da un soggetto umano sano. La preparazione del controllo positivo prevede le stesse fasi di estrazione e stabilizzazione dei campioni di sangue intero.

1. Scongela la microprovetta contenente Positive control (buffer) per 5 minuti a temperatura ambiente.
2. Per preparare il controllo positivo, aggiungere 45 µL di Positive control buffer in una microprovetta.
3. Aggiungere 75 µL di **50 µM NAD⁺ stock** (per la preparazione, consultare pagina 11) e 30 µL of **10 µM NADH stock** (per la preparazione, consultare pagina 11) all'interno di Positive control buffer e agitare su vortex. La concentrazione attesa di NAD⁺ e NADH nel controllo positivo è pari a $25 \pm 3 \mu\text{M}$ e $2 \pm 0,3 \mu\text{M}$, rispettivamente.
4. Il controllo positivo non contiene proteine. Pertanto è possibile estrarlo utilizzando BUFFER A a temperatura ambiente. Aggiungere 100 µL del controllo positivo così preparato a 500 µL di BUFFER A a temperatura ambiente in modo da creare un "estratto" di controllo positivo, quindi agitare su vortex e procedere al passaggio 5.
5. Preparare due aliquote separate dell'estratto di controllo positivo (dal passaggio 4) all'interno di microprovette pulite: 150 µL/provetta.
6. Alla prima aliquota da 150 µL aggiungere 100 µL di **NAD⁺ stabilizing reagent**, agitare su vortex e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti. Mantenere refrigerato e coperto con foglio d'alluminio fino al momento dell'analisi. L'aliquota del controllo positivo stabilizzato è destinata ad essere utilizzata per l'analisi di **NAD⁺**.
7. Alla seconda aliquota da 150 µL aggiungere 100 µL of **NADH stabilizing reagent**, quindi agitare su vortex. Riscaldare tale soluzione a 75–80 °C per 2 minuti, quindi raffreddare su ghiaccio. Mantenerla refrigerata e coperta on foglio d'alluminio fino al momento dell'analisi. L'aliquota del controllo positivo stabilizzato è destinata ad essere utilizzata per l'analisi di **NADH**.

NOTA: il controllo positivo ha una diluzione finale pari a 10 volte.

PROCEDURA D'ANALISI

Note:

- I passaggi 1–3 sono eseguiti in condizione di normale illuminazione.
- **I passaggi 4–9 sono eseguiti in condizioni di scarsa illuminazione (luce artificiale diretta spenta).**
- Ciascuna analisi contiene dei bianchi campione per la correzione dei segnali di fondo aspecifici. I bianchi campione sono preparati da quattro estratti dei campioni stabilizzati (ossia BL UNK1–4 dei campioni 1–4) in modo da correggere eventuali interazioni aspecifiche tra i componenti dell'estratto e l'Assay color reagent all'interno della miscela master. Il controllo positivo non richiede un bianco separato.
- Qualora venga analizzato il sangue di un soggetto che assume integrazione con precursori di NAD⁺, i campioni necessitano di almeno due pozzetti con bianchi campione per questo tipo di campione. Se sulla stessa piastra vengono analizzati campioni provenienti da soggetti che assumono tale integrazione e campioni da soggetti che invece non la assumono, si consiglia di preparare due pozzetti di bianchi campione per condizione. A tal fine, selezionare in modo casuale due estratti stabilizzati da soggetti che assumono l'integrazione e due da soggetti che non la assumono. Utilizzare questi estratti per preparare i bianchi campione; due pozzetti per condizione.
- **Tutti i bianchi campione vengono incubati con la miscela master SENZA l'aggiunta di Enzyme.**
- Scongela Enzyme appena prima della sua aggiunta alla miscela master. Prima dell'apertura, centrifugare brevemente a bassa velocità la microprovetta contenente Enzyme.

Passaggi:

1. Incubare gli standard pronti, gli estratti dei campioni stabilizzati e il controllo positivo stabilizzato per 5 minuti a temperatura ambiente prima del pipettaggio nella piastra.
2. Pipettare 20 µL di ciascuno standard di NAD⁺ o NADH in duplicato a partire da ST1 (0 µM) attenendosi allo schema della piastra riportato a pagina 23.
3. Pipettare 20 µL di controllo positivo stabilizzato e di estratti dei campioni stabilizzati in duplicato (consultare lo schema riportato a pagina 23). Per i primi quattro estratti dei campioni stabilizzati, pipettare una ulteriore replica nel pozzetto indicato (BL UNK1–4) attenendosi allo schema riportato a pagina 23. Questi quattro pozzetti rappresentano i bianchi campione necessari per l'analisi senza Enzyme, in modo da correggere eventuali interazioni aspecifiche tra l'estratto e Assay color reagent all'interno della miscela master.
4. Da qui in avanti, procedere in condizioni di scarsa illuminazione. Preparare la miscela master aggiungendo Assay color reagent a BUFFER C, quindi agitare delicatamente roteando.
5. Aggiungere 190 µL di miscela master senza Enzyme in ciascuno dei quattro pozzetti dei bianchi campione (BL UNK1–4).
6. Aggiungere 40 µL di Enzyme nel flaconcino con la rimanente miscela master. Agitare delicatamente evitando la formazione di schiuma. Versare la miscela master con gli enzimi aggiunti nella vaschetta. Durante il pipettaggio, proteggere la miscela master nella vaschetta utilizzando un coperchio in foglio d'alluminio (per ulteriori indicazioni, visionare il video dimostrativo all'indirizzo www.nadmed.com).
7. Aggiungere 190 µL di miscela master a cui è stato aggiunto Enzyme nei rimanenti pozzetti contenenti il controllo positivo stabilizzato utilizzando una pipetta multicanale. Evitare la formazione

di schiuma e proteggere dalla luce diretta. Coprire immediatamente la piastra preparata con un coperchio in foglio d'alluminio.

8. **Per l'analisi di NAD⁺:** incubare la piastra coperta per 4–6 minuti a temperatura ambiente.

Per l'analisi di NADH: incubare la piastra coperta per 6–10 minuti a temperatura ambiente.

NOTA: è possibile interrompere la reazione quando negli standard è visibile un netto gradiente cromatico e una differenza nell'intensità di colore tra i campioni con enzima aggiunto e i bianchi campione. L'intensità del segnale aumenta all'aumentare della durata del tempo di reazione. L'intensità di colore nell'analisi di NADH è inferiore a quella di NAD⁺ in quanto la concentrazione ematica di NADH è di gran lunga inferiore rispetto a quella di NAD⁺. Pertanto, gli standard di NADH variano tra 0 e 1 μM , mentre quelli di NAD⁺ tra 0 e 5 μM .

9. Utilizzando una pipetta multicanale, interrompere le reazioni aggiungendo 10 μL di Stop solution a ciascun pozzetto nello stesso ordine con cui è stata aggiunta la miscela master. Evitare la formazione di schiuma scuotendo delicatamente la piastra su una superficie piana. Rimuovere eventuali bolle.
10. Misurare l'assorbanza della luce a 573 nm immediatamente dopo l'aggiunta della Stop solution. Prima della misurazione, se possibile, scuotere per 5 secondi la piastra all'interno del relativo lettore. Nota: dopo l'aggiunta della Stop solution, l'intensità di colore può aumentare lentamente in maniera uniforme in tutti i pozzetti. Ciò è previsto, in quanto dovuto a un processo di fondo non enzimatico che avviene nella miscela master.

CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle letture di assorbanza per ciascuno standard (ST1–ST5). Creare una curva standard tracciando l'assorbanza media per ciascuno standard sull'asse y e la concentrazione (in μM) sull'asse x. Eseguire un adattamento tramite regressione lineare della curva standard.
2. Utilizzando la formula di regressione lineare della curva standard, trovare la concentrazione di ciascun metabolita in ciascun pozzetto.
3. Calcolare la media dei quattro bianchi campione (BL UNK1–4). Il valore ottenuto rappresenta il segnale aspecifico degli estratti stabilizzati.
4. Calcolare la media dei duplicati di ciascun estratto di campione stabilizzato (UNK).
5. Calcolare la media dei duplicati del controllo positivo stabilizzato e moltiplicare per 10 in modo da ottenere la concentrazione (μM) del metabolita NAD⁺ e NADH nei 150 μL originali di controllo positivo.
6. Correggere le concentrazioni ottenute negli estratti dei campioni stabilizzati in base al valore del bianco campione (calcolato al passaggio 3) e moltiplicare per 10 in modo da ottenere la concentrazione (μM) del metabolita NAD⁺ o NADH nel campione di sangue originale (si vedano i dettagli a pagina 16). Se gli estratti stabilizzati di NAD⁺ sono stati ulteriormente diluiti, moltiplicare la concentrazione per l'ulteriore fattore di diluizione.

CONTROLLO POSITIVO

Lo scopo del controllo positivo è quello di monitorare l'efficienza della fase di stabilizzazione quando uno dei metaboliti viene rimosso dalla miscela. Ci si aspetta che la concentrazione misurata di NAD⁺ nel controllo positivo sia compresa tra 23 e 27 μM , mentre quella di NADH tra 1,7 e 2,3 μM .

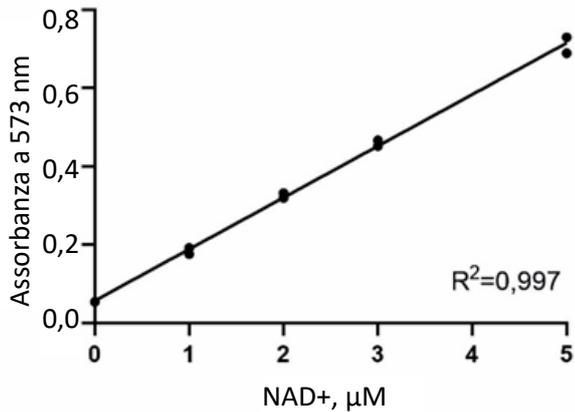
- Ci si aspetta che i valori di assorbanza del controllo positivo stabilizzato sulla piastra del NAD⁺ ricadano tra l'assorbanza di ST3 e di ST4.
- Ci si aspetta che i valori di assorbanza del controllo positivo stabilizzato sulla piastra del NADH siano pari a quelli di ST2, con una variazione di 0,05 unità ottiche.

PRESTAZIONI E LIMITAZIONI

A. DATI TIPICI

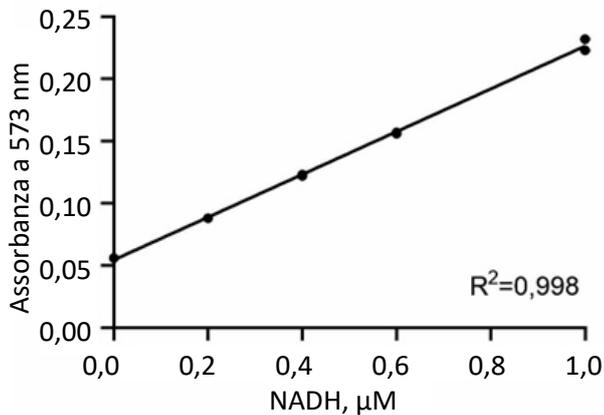
La curva standard e le concentrazioni negli estratti dei campioni stabilizzati vengono fornite esclusivamente a scopo illustrativo e non devono essere utilizzate in sostituzione della curva di calibrazione in tempo reale.

CURVA STANDARD PER NAD⁺



Standard	NAD ⁺ (μM)	Absorbance (573 nm) Durata dell'analisi - 4 minuti
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

CURVA STANDARD PER NADH



Standard	NADH (μM)	Absorbance (573 nm) Durata dell'analisi - 6 minuti
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

CALCOLO DEI RISULTATI PER NAD⁺

I valori di concentrazione negli estratti dei campioni stabilizzati (UNK) e nei bianchi campione (BL UNK 1-4) vengono determinati tramite la formula di adattamento lineare della curva standard di NAD⁺.

Non noto	Concentrazione negli estratti stabilizzati (µM)	Concentrazione negli estratti stabilizzati corretta in base alla media dei bianchi campione (BL UNK 1-4, µM)	Concentrazione finale di NAD ⁺ nel campione originale (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		

*Corretto in base al fattore di diluizione 10

CALCOLO DEI RISULTATI PER NADH

I valori di concentrazione negli estratti dei campioni stabilizzati (UNK) e nei bianchi campione (BL UNK 1-4) vengono determinati tramite la formula di adattamento lineare della curva standard di NADH.

Non noto	Concentrazione negli estratti stabilizzati (µM)	Concentrazione negli estratti stabilizzati corretta in base alla media dei bianchi campione (BL UNK 1-4, µM)	Concentrazione finale di NADH nel campione originale (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		

*Corretto in base al fattore di diluizione 10

B. LIMITE DI RILEVAMENTO

Nella seguente tabella, viene riportato il limite del bianco (LoB) per Q-NADMED Blood (LoB \pm deviazione standard (DS)).

Limite del bianco	
	pmol/pozzetto
NAD+	1,84 \pm 0,9
NADH	2,10 \pm 0,5

Nella seguente tabella, viene riportato il limite di rilevamento (LoD) calcolato a partire dalle curve standard per NAD+ e NADH (LoD \pm DS).

Limite di rilevamento	
	μ M in sangue intero
NAD+	0,33 \pm 0,2
NADH	0,19 \pm 0,05

Nella seguente tabella, viene riportato il limite di quantificazione (LoQ) (LoQ \pm DS).

Limite di quantificazione	
	μ M in sangue intero
NAD+	0,66 \pm 0,3
NADH	0,40 \pm 0,1

C. PRECISIONE E RIPRODUCIBILITÀ

La variazione intra-analisi delle misurazioni è stata usata per determinare la precisione delle prestazioni dell'analisi. Nella seguente tabella, viene riportata la precisione intra-analisi (CV = coefficiente di variazione).

Precisione intra-analisi	
	CV (%) \pm DS
NAD+	1,48 \pm 0,8
NADH	3,33 \pm 1,5

I risultati relativi alla riproducibilità dell'analisi sono riepilogati nella seguente tabella (N = numero, * 3 aliquote dello stesso campione sono state analizzate in triplicato).

Riproducibilità						
	NAD+			NADH		
Campione	Ctr1	Ctr2	Ctr3	Ctr1	Ctr2	Ctr3
N di misurazioni *	9	9	9	9	9	9
Media (μ M)	27,41	29,41	22,00	0,55	0,71	0,64
Deviazione standard	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. ACCURATEZZA

L'accuratezza dell'analisi è stata calcolata utilizzando campioni contenenti quantità note di NAD⁺ e NADH puri. Nella seguente tabella vengono riepilogati i risultati (accuratezza dell'analisi \pm DS).

Accuratezza (%)		
NAD ⁺	N = 32	97,13 \pm 7,6
NADH	N = 25	104,22 \pm 16,5

E. VALORE SOGLIA DELL'ANALISI

I valori soglia basso e alto rappresentano le concentrazioni minima e massima osservate nel 5–7% degli individui di una data popolazione. Nella seguente tabella vengono riepilogati i valori soglia.

Valore soglia		
	Basso	Alto
NAD ⁺ (μ M)	20	36
NADH (μ M)	0,6	1,8

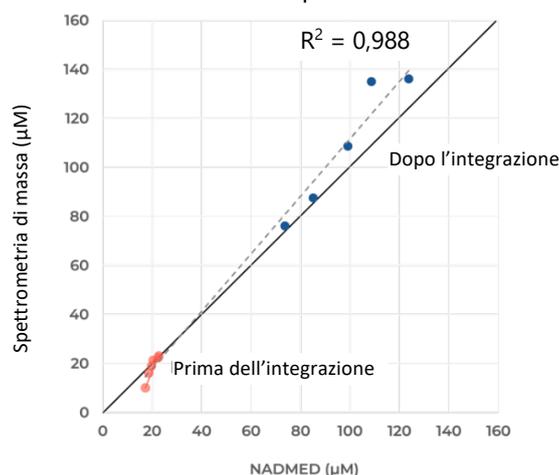
F. CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

L'interferenza di altri metaboliti presenti nell'estratto non è stata studiata separatamente, in quanto il loro contributo è trascurabile e comunque già considerato nell'analisi del bianco eseguita senza l'aggiunta di Enzyme.

Avvertenza: sorbato di potassio, borato, piridina e bismuto in un campione possono indurre inibizione enzimatica e portare quindi a una sottostima dei risultati.

G. METODI DI CONFRONTO

Per validare le prestazioni di Q-NADMED, la concentrazione di NAD⁺ è stata misurata in un set di campioni di sangue umano intero di controllo. Tali campioni sono stati inoltre analizzati mediante spettrometria di massa. Campioni di sangue congelati provenienti da cinque soggetti sani, prima e dopo 16 settimane di integrazione con niacina, sono stati analizzati in parallelo con Q-NADMED e spettrometria di massa. I risultati ottenuti con Q-NADMED erano coerenti con quelli ottenuti mediante spettrometria di massa.



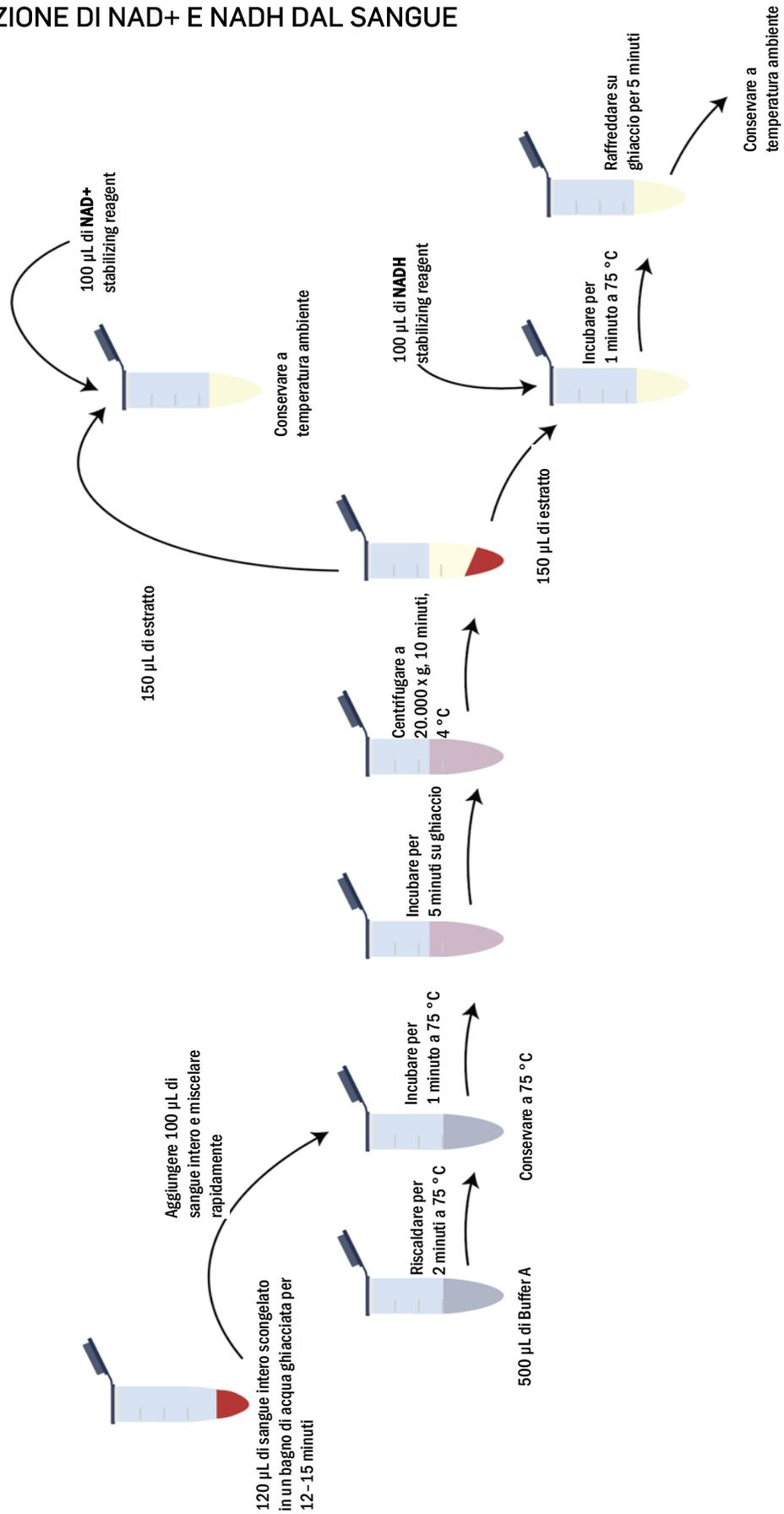
SIMBOLI

Simbolo	
	Liquidi e vapori infiammabili
	Avvertenza/pericolo
	Seguire le istruzioni per l'uso
	Scadenza
	Numero di catalogo
	Lotto
	Produttore
	Temperatura massima

	<p>Non utilizzare se la confezione risulta danneggiata</p>
	<p>Mantenere asciutto</p>
	<p>Numero di reazioni</p>
	<p>Dispositivo medico-diagnostico in vitro</p>
	<p>Conservare al riparo dalla luce diretta</p>

FIGURE SCHEMATICHE

A. ESTRAZIONE DI NAD⁺ E NADH DAL SANGUE



B. FORMATO DELLA PIASTRA CONSIGLIATO PER LA MISURAZIONE DI NAD+ E 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

Formato della piastra per l'analisi di NAD+ e NADH: St – standard, BL - bianchi con i campioni indicati utilizzati per la lettura del bianco, UNK – campioni non noti, estratti stabilizzati dei campioni con concentrazione di metaboliti non nota, PosCtr – controllo positivo stabilizzato. Utilizzare 20 µL di standard, controllo positivo e estratti dei campioni stabilizzati per pozzetto. I bianchi campione dei primi quattro campioni vengono analizzati nella miscela master senza l'aggiunta di Enzyme.

NOTE

FORMATO DELLA PIASTRA

Utilizzare tale formato per registrare gli standard e i campioni analizzati.

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