

Q-NADMED BLOOD analyssats för NAD⁺ och NADH

Sats för kvantitativ analys av helblod

version 4.0

ENDAST FÖR ENGÅNGSBRUK

Dessa instruktioner måste läsas i sin helhet innan produkten används.

CE IVD FÖR DIAGNOSTISK ANVÄNDNING IN VITRO

ALLMÄN INFORMATION

- A. Märkesnamn: Q-NADMED Blood analyssats för NAD⁺ och NADH: sats för kvantitativ analys av helblod
- B. Katalognummer:
 - a.a. IVD_001, 40 prover (96-brunnsformat)
 - a.b. IVD_001/MY, 40 prover (96-brunnsformat)
- C. Lagring: -80 °C
- D. Bruksanvisning utgiven: september 2023

Tillverkare:

NADMED Ltd / Oy

Haartmansgatan 4, Byggnad 14

00290 Helsingfors, FINLAND

www.nadmed.com, info@nadmed.com

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

ALLMÄN INFORMATION	2
INNEHÅLLSFÖRTECKNING.....	3
AVSEDD ANVÄNDNING	4
KLINISK BAKGRUND	4
ANALYSENS PRINCIPER	4
MEDFÖLJANDE REAGENSER	5
FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR	5
LAGRING AV REAGENSER OCH UTGÅNGSDATUM	6
ANNAT MATERIAL SOM KRÄVS	6
REAGENSFÖRBEREDELSE	7
INSAMLING OCH FÖRVARING AV PROV	7
PRAKTISKA ÖVERVÄGANDEN	8
EXTRAKTION AV NAD ⁺ OCH NADH FRÅN BLOD	10
FÖRBEREDELSE AV STANDARDER	11
ANALYSPROCEDUR	13
BERÄKNING AV RESULTAT	15
POSITIV KONTROLL	15
PRESTANDA OCH BEGRÄNSNINGAR	16
SYMBOLER	20
SCHEMATISKA BILDER	22
ANTECKNINGAR	23
PLATTLAYOUT	24

AVSEDD ANVÄNDNING

Q-NADMED Blood, en medicinteknisk produkt för diagnostik in vitro, är en analyssats för mätning av koncentrationer av metaboliterna NAD⁺ och NADH i humant helblod. Analysen är kvantitativ. De avsedda användarna av analyssatsen Q-NADMED är utbildad laboratoriepersonal. Det första avsedda syftet är att detektera systemiska förändringar i NAD⁺ och NADH. Primära avsedda användare av analysresultaten är vårdpersonal som tolkar resultaten ur ett sjukdoms-/hälsoperspektiv. Resultatet av analyssatsen Q-NADMED kan användas för att ta beslut om behandling, såsom tillskott av NAD-föregångare. Det andra avsedda syftet med analyssatsen Q-NADMED är att övervaka nivåerna av NAD⁺ och NADH hos patienter som får behandling, såsom tillskott av NAD-föregångare, och vid behov kunna justera dosen.

KLINISK BAKGRUND

Metaboliterna NAD⁺ och NADH anpassar människokroppens metabolism och energihomeostas till förändrade endogena och exogena förhållanden. Ackumulerade forskningsdata visar att systemiska nivåer i minskningen av NAD⁺ som svar på pågående sjukdom signalerar en obalans i kroppens energihomeostas. Graden av NAD⁺ varierar hos olika patienter och sjukdomar. Progressivt sjunkande nivåer av NAD⁺ gör det omöjligt för kroppen att fortsätta sina grundläggande metaboliska funktioner, ens under pågående behandling. Med Q-NADMED går det att identifiera brist på NAD⁺ och NADH hos patienter, i syfte att korrigera bristen och öka behandlingens verkningsgrad. Den pågående forskningen om hur NAD⁺ och NADH bidrar till olika sjukdomars mekanismer och förlopp är mycket aktiv. En lista över sjukdomar som misstänks orsaka förändrade koncentrationer av NAD⁺ och NADH utökas ständigt och det finns redan publicerade bevis för mitokondriell sjukdom, åldrande, sepsis, virusinfektioner, kardiovaskulära sjukdomar och njursjukdomar, diabetes typ 1 och 2, neurologiska störningar och cancer.

ANALYSENS PRINCIPER

Analysens princip är en cyklisk enzymatisk reaktion med en kolorimetrisk slutpunktsdetektion. Först extraheras metaboliter av NAD⁺ och NADH tillsammans från ett blodprov i ett enda steg. Sedan delas extraktet upp i två delar. I den första delen stabiliseras NAD⁺ medan NADH tas bort, och i den andra delen stabiliseras NADH medan NAD⁺ tas bort. Därefter analyseras metaboliter av NAD⁺ och NADH på två separata plattor genom en enzymatisk reaktion kopplad till en färgändring. Färgändringens intensitet under analys är linjärt proportionerlig till koncentrationen av NAD⁺ eller NADH i reaktionsblandningen.

MEDFÖLJANDE REAGENSER

REAGENS	BESKRIVNING*	FÖRE ANALYSEN
BUFFER A	28 ml extraktionsbuffert	Låt värma upp till rumstemperatur (15–25 °C).
NAD ⁺ stabilizing reagent	8 ml buffrad lösning för mätning av NAD ⁺	Låt värma upp till rumstemperatur (15–25 °C).
NADH stabilizing reagent	8 ml buffrad lösning för mätning av NADH	Låt värma upp till rumstemperatur (15–25 °C).
NAD ⁺ standard stock	1 mikrorör med 40 µl 1 mM NAD ⁺	Se förberedelseguide.
NADH standard stock	1 mikrorör med 40 µl 1 mM NADH	Se förberedelseguide.
BUFFER C	2 flaskor med 19 ml analysbuffert	Låt värma upp till rumstemperatur (15–25 °C).
Assay color reagent	2 flaskor med 3 ml reagens med analysfärgen	Låt värma upp till rumstemperatur (15–25 °C). Bör användas inom 2 timmar efter uppvärmning till rumstemperatur.
Enzyme	2 mikrorör med 40 µl enzym. En per platta.	Tina endast innan det läggs till mastermixen.
Stop solution	3 ml lösning för att stoppa analysreaktionen	Låt värma upp till rumstemperatur (15–25 °C).
Positive control (buffer)	1 mikrorör med 200 µl buffert för förberedelse av positiv kontroll	Låt värma upp till rumstemperatur (15–25 °C). Se förberedelseguide.

* Obs: Godkänd variation av påfyllningsvolym: 5 %.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

Säkerhet

Endast för diagnostisk användning in vitro. Får endast användas av utbildad personal.

Stop solution kan irritera hud, ögon och luftvägar. Undvik att andas in ångor.

Assay color reagent kan orsaka hudirritation. Hanteras försiktigt, använd handskar.

BUFFER A kan orsaka ögonirritation. Hanteras försiktigt, använd skyddsglasögon.

Rök, drick eller ät inte samt applicera inte kosmetika inom arbetsområdet. Använd skyddshandskar, skyddskläder och ögonskydd. Tvätta händerna grundligt efter hantering.

De identifierade riskerna med kemikalierna i denna sats, och lämplig varningsinformation kopplad till riskerna, presenteras i säkerhetsdatabladet (SDS) för Q-NADMED.

I säkerhetsdatabladet (SDS) för Q-NADMED beskrivs även hur förbrukade satskomponenter ska kasseras.

LAGRING AV REAGENSER OCH UTGÅNGSDATUM

- Innan de öppnas ska alla satskomponenter lagras vid -80 °C. Undvik temperaturvariationer i frysen.
- Efter upptining är BUFFER A, NAD⁺ och NADH stabilizing reagent, Positive control (buffer) och Stop solution stabila i två veckor vid rumstemperatur.
- BUFFER C bör tinas och användas samma dag som analysen utförs.
- Assay color reagent är stabilt i upp till tre timmar vid rumstemperatur efter upptining.
- Enzymet ska användas direkt efter upptining.
- Standarder och positiv kontroll ska förberedas och användas på analysdagen.
- Standarderna ska skyddas mot ljus.

ANNAT MATERIAL SOM KRÄVS

Följande material krävs men ingår inte i satsen:

- Avjoniserat vatten (milli-Q-vatten från ett vattenreningssystem eller kommersiellt tillgängligt avjoniserat vatten t.ex. Sigma katalognummer 38796).
- Mikrorör, 1,5 ml, för beredning av prover, extrahering, stabilisering och beredning av analysstandarder. Materialkrav för mikrorören: använd vanliga icke-sterila mikrocentrifugrör av transparent/ofärgad polypropen (PP) avsedda för in vitro-diagnostik (t.ex. Sarstedt, ref. 72.690.001). Använd inte mikrorör avsedda för molekylär biologi märkta som sterila (kemiskt steriliserade), fria från endotoxiner, pyrogena ämnen, mänskligt DNA samt med låg retentionsgrad. Använd inte mikrorör avsedda för arbete med protein märkta med LoBind.
- Två plastreservoarer för flerkanalspipetter (av icke-steril polystyren), en för pipettering av mastermix, den andra för pipettering av Stop solution.
- Två genomskinliga polystyren-mikroplattor med 96 brunnar och mellanhög proteinbindande affinitet, avsedda för analyser av kolorimetri och absorbans.
- Torrbad (värmeblock) med justerbar temperatur (upp till 80 °C).
- Kylande mikrocentrifug (max. hastighet 20 000 x g).
- Isvattenbad (en sörja av packad is och kranvatten som håller mikrorören på plats och förhindrar att de flyter upp).
- Kalibrerade enkanalspipetter (0,5–10 µl, 5–50 µl, 20–200 µl, 100–1 000 µl) och flerkanalspipetter (5–50 µl, 30–300 µl) och fasade pipettspetsar, låg retention.
- Spektrofotometrisk mikroplattläsare som kan mäta absorbans vid 570–573 nm.
- Aluminiumfolie för att skydda mikrorör och plattor mot ljus.

REAGENSFÖRBEREDELSE

Tina alla komponenter för analys av NAD⁺ och/eller NADH före analysen enligt anvisningarna i tabellen på sida 5.

- A. **BUFFER A:** Redo att använda
- B. **NAD⁺ stabilizing reagent:** Redo att använda
- C. **NADH stabilizing reagent:** Redo att använda
- D. **Enzyme:** Redo att använda
- E. **Stop solution:** Redo att använda. Om fällning uppstår i Stop solution vid upptining bör den återupplösas med 5 minuters inkubering vid 37 °C, och sedan kylas igen till 25 °C före användning. Skaka inte Stop solution kraftigt.
- F. **Positive control (buffer):** Redo att använda. (Se ytterligare instruktioner i Förberedelse av positiv kontroll.)
- G. **50 µM-stamlösning NAD⁺:** tillsätt 25 µl 1 mM NAD⁺ standard stock (medföljer) i 475 µl avjoniserat vatten, vortexblanda. Skyddas mot ljus. (Se ytterligare instruktioner i Förberedelse av standarder och positiv kontroll.)
- H. **10 µM-stamlösning NADH:** tillsätt 10 µl 1 mM NADH standard stock (medföljer) i 990 µl avjoniserat vatten, vortexblanda. Skyddas mot ljus. (Se ytterligare instruktioner i Förberedelse av standarder och positiv kontroll.)
- I. **Mastermix:** 1 flaska **Assay color reagent** (3 ml) ska blandas i 1 flaska **BUFFER C** för att skapa 1 flaska med mastermix som krävs för 1 platta med NAD⁺ eller NADH-analys. Skydda mot ljus genom att behålla den i den bruna originalflaskan. Skaka inte kraftigt. Kassera all överbliven vätska. Får inte frysas på nytt.

INSAMLING OCH FÖRVARING AV PROV

Satsen är avsedd för analys av helblod. Lämpliga provtagningsmetoder är venöst blod via venpunktion med kanyl eller perifert blod via lansettstick eller liknande. Helblodsprover ska samlas in i provtagningsrör sprejade invändigt med litiumheparin eller K2 EDTA som antikoagulans, och blandas ordentligt genom att röret vänds upp och ned upprepade gånger.

Krav för provtagningsrör med antikoagulans för insamling av venöst blod (BD Vacutainer eller Vacuette): använd K2 EDTA-rör sprejade invändigt med K2 EDTA motsvarande en koncentration av 1,2–2 mg K2 EDTA per 1 ml insamlat blod eller litiumheparin (LH)-rör sprejade invändigt med LH motsvarande en koncentration av 17–18 IE per 1 ml insamlat blod. Analysen kräver endast små volymer av helblod. Vi rekommenderar därför att små provtagningsrör, runt 2–3 ml, används. Det är viktigt att den avsedda volymen blod samlas in i provtagningsröret för att provet ska få rätt målkoncentration av antikoagulans.

Proverna kan analyseras färska eller frusna. Färskt blod kan analyseras inom 72 timmar om det kontinuerligt har förvarats vid 4–8 °C efter provtagningen. Insamlat blod separerar i faser i provröret och därför är det mycket viktigt att provet blandas noga före alikvotering. Om blodet inte kan analyseras direkt rekommenderar vi alikvotering av provet inom 72 timmar från provtagningstillfället i alikvoter om 150–

200 µl i icke-sterila, transparenta polypropenmikrorör med enkelväggar i volymer om 0,5–2 ml. Alikvoterna fryses sedan ned till –20 °C eller –80 °C. Frysning av provrör med större volym (> 2 ml) eller mikrorör med dubbelvägg och rak nederkant ökar infrysningstiden och i synnerhet upptiningstiden före extraktionen, vilket kan ge stora variationer i resultaten. Lagringstiden för små alikvoter är en månad vid –20 °C och omkring ett år vid –80 °C. Satsen mäter intracellulärt NAD-innehåll. Därför är det mycket viktigt att blanda varje färskt prov ordentligt före och under alikvotering för att säkerställa att varje alikvot innehåller ungefär samma antal celler. Frusna prover måste hållas kontinuerligt nedfrysna före analysen. Vid kliniska provningar rekommenderar vi att tidsintervallet mellan provtagning och alikvotering/infrysning hålls konsekvent för samtliga prover i provningen. För mätning av NAD⁺ och NADH behövs 100 µl helblod. Prover som har tinats upp och frusits in på nytt kan inte användas i analysen.

PRAKTISKA ÖVERVÄGANDEN

- Använd inte satsens komponenter efter utgångsdatumet.
- Blanda inte material från olika satspartier. Efterföljande frysnings- och upptiningscykler tillåts inte.
- Den här analysen är INTE lämplig för mätning av NAD⁺ och NADH i plasma eller serum, odlade celler eller vävnader (människa eller djur).
- Blanda alla reagenser grundligt genom att virvla dem sakta. Små mikrorör ska snabbt centrifugeras vid låg hastighet före öppnandet.
- Såväl färska som frusna blodprover kan användas för analysen. Det är mycket viktigt att använda ett homogent (ordentligt blandat) prov för analys.
- Vi rekommenderar att maximalt åtta prover extraheras samtidigt för att minimera hanteringstiden.
- Analys av NAD⁺ och NADH utförs på två separata plattor. Vi rekommenderar att analyserna av NAD⁺ och NADH görs på extraktionsdagen.
- Byt till nya pipettspetsar mellan tillsättning av varje standard, prov och reagens för att undvika korskontaminering. Använd också separata reservoarar för mastermix och Stop solution.
- Högprecisionspipetter och fasade spetsar med mindre retention förbättrar precisionen.
- Assay color reagent är en gul, ljuskänslig förening som blir brun vid enzymatisk reaktion. Exponering för direkt solljus eller direkt artificiellt ljus gör att dess ospecifika färg växlar till grönt. För att minimera ljusstörningarna vid analysen rekommenderar vi följande:
 - Pipettering av mastermix och sedan Stop solution i plattan i naturligt indirekt ljus (dunkelt ljus). Släck artificiella inomhuslampor och undvik att pipettera nära ett fönster för att åstadkomma goda ljusförhållanden. Med naturligt indirekt ljus (dunkelt ljus) menas den mängd ljus du upplever i en bil som kör under en bro en mulen dag.
 - Täck 96-brunnsplattan med ett lock av aluminiumfolie under reaktionstiden efter tillsättning av mastermixen och under överföringen till plattläsaren efter tillsättning av Stop solution. Slå inte in plattan i aluminiumfolien eftersom det då finns risk för kontaminering och provblandning under uppackningen.
 - De steg som kräver arbete under dunkla ljusförhållanden anges tydligt i protokollet.

- Positiv kontroll är ett artificiellt prov som innehåller kända mängder rent NAD⁺ och NADH.
- Tekniska krav för torrbad (värmeblock):
 - Testa hur effektivt torrbadets värmeöverföring är enligt följande:
- 1. Tillsätt 250 µl vatten i ett mikrorör som passar i torrbadet som du använder.
- 2. Placera en vanlig laborietermometer i mikroröret tillsammans med vätskan och placera den i torrbadet som har ställts in på 80 °C.
- 3. Mät tiden som krävs för att öka vätskans temperatur till 70–75 °C.
- 4. Alla inkubationstider i torrbad som anges i detta protokoll gäller för ett torrbad inställt på 80 °C som värmer 250 µl vatten till 75 °C på 2 minuter. Detta räcker för att den kemiska reaktionen ska nå 70–75 °C i lösningen vid inkubering i torrbadet.
- Tekniska krav för spektrofotometrisk plattläsare:
 1. Mätning av ljusabsorption vid 570–573 nm.
 2. Alternativ för att justera skanninglampans ljusstyrka/intensitet till **låg**. På vissa plattläsare kan ljusstyrkan justeras som antalet blixtar per mätning. I det senare fallet ska antalet blixtar i intervallet ställas in på mellan 5 och 10.
- Mastermix och Stop solution innehåller tvättmedel. Undvik bubblor vid pipettering av mastermixen och Stop solution genom att trycka på pipetten till första stoppläget och sedan avlägsna eventuella bubblor i brunnarna med en liten nål. Undvik att röra vid brunnarnas innehåll med pipettspetsarna.
- Vi rekommenderar att stegen utförs i följande ordning:
 1. Se till att BUFFER A, NAD⁺ stabilizing reagent, NADH stabilizing reagent och Stop solution håller rumstemperatur dagen före analysen. Vid rumstemperatur är dessa lösningar stabila i två veckor.
 2. Bered standardlösningarna och den positiva kontrollen på analysdagen.
 3. Tina flaskorna med BUFFER C och Assay color reagent till rumstemperatur på analysdagen. De smälter på ca 2–3 timmar. Utför under denna tid extraktionen av proverna och förbered två alikvoter av provextrakten för separat mätning av NAD⁺ och NADH. Utför analyser av NAD⁺ och NADH på separata plattor, en i taget.

EXTRAKTION AV NAD⁺ OCH NADH FRÅN BLOD

Observera: Det här avsnittet utförs i normala ljusförhållanden.

1. Se till att BUFFER A, NAD⁺ stabilizing reagent och NADH stabilizing reagent har uppnått rumstemperatur före extraktion.
2. Använd färskt blod som kylts på is eller tina frusna blodprover i isvattenbad i 12–15 min före extraktionen. (**Tips:** Använd tillfälliga snabbcykler med varma händer under upptiningen). Vi rekommenderar att högst 8 prover extraheras samtidigt.
3. Pipettera 500 µl BUFFER A i 1,5 ml mikrorör.
4. Värm upp alikvoterna av BUFFER A i ett torrbad inställt på 75–80 °C i 2–3 min (max 5 min). Behåll dem i torrbadet fram till steg 6.
5. Blanda snabbt blodproverna genom att utföra ett par upp-och-ner-pipetteringscykler samtidigt som spetsen roteras före extraktion; undvik skumbildning.
6. Tillsätt till 100 µl blod med en snabb, stadig rörelse direkt i mikroröret med het BUFFER A i torrbadet. Blanda omedelbart med ett par intensiva upp-och-ner-pipetteringscykler, med samtidig rotation av spetsen för att effektivt blanda det kalla provet med uppvärmd BUFFER A.
7. Inkubera homogenatet vid 75–80 °C i 1 minut.
8. Kyl blandningen i ett isvattenbad i minst 5 minuter. Efter kylning på is ska homogenatet ha polymeriserats utan någon fri vätska.
9. Centrifugera vid 20 000 x g i 10 min vid 4 °C. Överför supernatanten till ett rent mikrorör och kassera pelleten. Förvara de erhållna totala extrakten (supernatanterna) som innehåller NAD⁺ och NADH vid 4 °C, täckta med ett folielock, till nästa steg. Utför sedan steg 2 till och med steg 9 för nästa uppsättning om 8 prover. Gå vidare till steg 10 när alla prover har extraherats. Alternativ: Supernatanterna kan förvaras vid –80 °C i en vecka. Tina dem i detta fall vid rumstemperatur i 10 min innan alikvoter förbereds i steg 10.
10. Bered två separata alikvoter från de erhållna extrakten i rena mikrorör: 150 µl/rör.
11. Tillsätt 100 µl NAD⁺ stabilizing reagent till den första 150 µl-alikvoten för att få ett stabiliserat extrakt med NAD⁺ (behåller NAD⁺ och tar bort NADH). Vortexblanda och inkubera vid rumstemperatur i 5 minuter. Om analysen inte utförs omedelbart ska de stabiliserade extrakten förvaras i kyl fram till analysen. **Skydda mot ljus genom att täcka med ett lock av aluminiumfolie.**
12. Tillsätt 100 µl NADH stabilizing reagent till den andra 150 µl-alikvoten för att få ett stabiliserat extrakt med NADH (behåller NADH och tar bort NAD⁺). Vortexblanda och inkubera i 2 min i ett torrbad inställt på 80 °C. Kyl på is i 5 minuter. Om analysen inte utförs omedelbart ska de stabiliserade extrakten förvaras kylda fram till analysen. **Skydda mot ljus genom att täcka med ett lock av aluminiumfolie.**

OBS: Slutlig utspädning av det ursprungliga helblodsprovet kommer att vara 10 gånger.

OBS: Vid individuell komplettering med NAD-föregångare kan nivåerna av NAD⁺ öka i blodet och NAD⁺-stabiliserat extrakt bör då spädas ut ytterligare (två gånger) med avjoniserat vatten före analysen. I det här fallet blir utspädningen av det ursprungliga helblodsprovet 20 gånger volymen för NAD⁺. NADH-stabiliserat extrakt kräver inte utspädning.

FÖRBEREDELSE AV STANDARDS

Observera: Det här avsnittet utförs i normala ljusförhållanden.

1. Förbered standarderna på analysdagen. Tina mikrorör med 1 mM standard stock i 5 minuter vid rumstemperatur. Skydda mot ljus med ett folielock under upptining.
2. Förbered **50 µM NAD⁺-stamlösning** genom att tillsätta 25 µl 1 mM NAD⁺ standard stock (medföljer) till 475 µl avjoniserat vatten, vortexblanda. Denna stamlösning används för förberedelse av NAD⁺-standards och positiv kontroll.
3. Förbered **NAD⁺-standards** enligt schemat nedan genom att blanda angivna volymer av reagenserna i följande ordning: avjoniserat vatten, 50 µM NAD⁺-stamlösning, BUFFER A och NAD⁺ stabilizing reagent. Den slutliga volymen för varje standard är 1 ml. (**Tips:** Använd samma 20–200 µl enkelpipett för att pipettera 50 µM NAD⁺-stamlösning och vatten).

STANDARD-NUMMER	KONCENTRATION av NAD ⁺ (µM)	FÖRBEREDELSE AV STANDARDS			
		50 µM NAD ⁺ -stamlösning (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. Förbered **10 µM NADH-stamlösning** genom att lägga till 10 µl av 1 mM NADH standard stock (medföljer) till 990 µl avjoniserat vatten, vortexblanda. Denna stamlösning används för att förbereda NADH-standards och positiv kontroll.
5. Förbered **NADH-standards** enligt schemat nedan genom att blanda angivna volymer av reagenserna i följande ordning: avjoniserat vatten, 10 µM NADH-stamlösning, BUFFER A och NADH stabilizing reagent. Den slutliga volymen för varje standard är 1 ml. (**Tips:** Använd samma 20–200 µl enkelpipett för att pipettera 10 µM NADH-stamlösning och vatten).

STANDARD-NUMMER	KONCENTRATION av NADH (µM)	FÖRBEREDELSE AV STANDARDS			
		10 µM NADH-stamlösning (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. Täck stativet med färdiga standards med ett lock av aluminiumfolie för att skydda mot ljus, och förvara i kyl före pipettering på plattan.

FÖRBEREDELSE AV POSITIV KONTROLL

Observera: Det här avsnittet utförs i normala ljusförhållanden.

Positiv kontroll förbereds före analysen genom att blanda kända mängder av standarder för NAD⁺ och NADH med Positive control Buffer (medföljer). Den positiva kontrollens volym och koncentrationen av NAD-metaboliter efterliknar ett blodprov från en frisk försöksperson. Förberedd positiv kontroll genomgår samma extraktions- och stabiliseringssteg som helblodsprov.

1. Tina mikroröret med Positive control (buffer) i 5 minuter vid rumstemperatur.
2. Då positiv kontroll bereds tillsätts 45 µl Positive control (buffer) i ett mikrorör.
3. Tillsätt 75 µl **50 µM NAD⁺-stamlösning** (för beredning, se sida 11) och 30 µl **10 µM NADH-stamlösning** (för beredning, se sida 11) till det nya röret med Positive control (buffer) och vortexblanda. Förväntad koncentration i den positiva kontrollen är $25 \pm 2 \mu\text{M}$ för NAD⁺ och $2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ för NADH.
4. Den positiva kontrollen innehåller inte proteiner och kan därför extraheras med BUFFER A vid rumstemperatur. Tillsätt 100 µl beredd positiv kontroll till 500 µl av BUFFER A vid rumstemperatur för att skapa ett "extrakt" av den positiva kontrollen, vortexblanda och fortsätt till steg 5.
5. Förbered två separata alikvoter av "extraktet" av positiv kontroll (från steg 4) i rena mikrorör: 150 µl/rör.
6. Tillsätt 100 µl **NAD⁺ stabilizing reagent** till den första 150 µl-alikvoten, vortexblanda och inkubera vid rumstemperatur i 5 minuter. Håll sedan kyld, täckt med folie, fram till analysen. Denna stabiliserade positiva kontroll-alikvot kommer att användas i analysen av **NAD⁺**.
7. Tillsätt 100 µl **NADH stabilizing reagent**, till den andra 150 µl-alikvoten, vortexblanda. Värm upp den här lösningen till 75–80 °C i 2 minuter, kyl på is. Håll sedan kyld, täckt med folie, fram till analysen. Denna stabiliserade positiva kontroll-alikvot kommer att användas i analysen av **NADH**.

OBS: Slutlig utspädning av den positiva kontrollen blir 10 gånger.

ANALYSPROCEDUR

Observera:

- Steg 1–3 utförs i normala ljusförhållanden.
- Steg 4–9 utförs i dunkla förhållanden (med allt direkt artificiellt ljus släckt).
- Varje analys innehåller blankprover för att korrigera för alla ospecifika bakgrundssignaler. Blankprover bereds från fyra stabiliserade provextrakt (d.v.s. BL UNK 1–4 för proverna 1–4) i syfte att korrigera för ospecifik interaktion mellan extraktkomponenterna och Assay color reagent i mastermixen. Den positiva kontrollen kräver inte ett separat blankprov.
- Om blod från patienter som får tillskott av NAD⁺-föregångare ska analyseras, kräver dessa prover minst två brunnar med blankprover för provtypen. Om prover från patienter med tillskott analyseras på samma platta som prover från patienter utan tillskott rekommenderar vi två brunnar med blankprover per respektive patientgrupp. Välj i så fall slumpmässigt ut två stabiliserade extrakt från patienter med tillskott och två från patienter utan tillskott. Bered sedan blankprover av dessa, två brunnar per patientgrupp.
- **Alla blankprover inkuberas med mastermix UTAN tillagt enzym.**
- Enzymet bör tinas precis innan det tillsätts till mastermixen. Centrifugera kort mikroröret med enzym vid låg hastighet innan det öppnas.

Steg:

1. Inkubera färdiga standarder, stabiliserade provextrakt och stabiliserad positiv kontroll i 5 minuter vid rumstemperatur före pipettering på plattan.
2. Pipettera 20 µl av varje NAD⁺ eller NADH-standard i dubletter med början från ST1 (0 µM) enligt plattschemat på sidan 23.
3. Pipettera 20 µl stabiliserad positiv kontroll och stabiliserat provextrakt i dubletter (se schemat på sidan 23). För de första fyra stabiliserade provextrakten ska ett extra replikat pipetteras till den indikerade brunnen (BL UNK 1–4) enligt schemat på sidan 23. Dessa fyra brunnar är blankprover som behövs för analys utan enzym, för att korrigera för ospecifik interaktion mellan extraktet och Assay color reagent i mastermixen.
4. **Från och med detta steg ska arbetet utföras under dunkla förhållanden.** Bered mastermix genom att tillsätta Assay color reagent till BUFFER C och blanda sakta genom rotation.
5. Tillsätt 190 µl av mastermixen utan enzym i var och en av de fyra blankprovsbrunnarna (BL UNK1–4).
6. Tillsätt 40 µl enzym i flaskan med resterande mastermix. Blanda sakta, undvik skumbildning. Häll upp mastermixen med tillsatt enzym i reservoaren. Täck mastermixen i reservoaren med ett lock av aluminiumfolie under pipetteringen. (Ytterligare anvisningar finns i vår instruktionsvideo på www.nadmed.com.)
7. Tillsätt 190 µl av mastermixen med tillsatt enzym i alla resterande brunnar, inklusive stabiliserad positiv kontroll, med en flerkanalspipett. Undvik skumbildning och direkt ljus. Täck omedelbart över den färdiga plattan med ett aluminiumfolielock.
8. **För analys av NAD⁺:** inkubera den täckta plattan i 4–6 minuter vid rumstemperatur.
För analys av NADH: inkubera den täckta plattan i 6–10 minuter vid rumstemperatur.

OBS: Reaktionen kan stoppas när en tydlig färggradient framträder i standarderna och skillnader i färgintensitet uppstår mellan proverna med tillsatt enzym och blankproverna. Ju längre reaktionstid, desto intensivare blir signalen som observeras. Färgintensiteten i analysen av NADH är lägre än i NAD⁺, eftersom koncentrationen av NADH är mycket lägre än koncentrationen av NAD⁺ i blodet. Därför ligger intervallet för NADH-standarder på mellan 0 och 1 µM, medan intervallet för NAD⁺-standarder är 0 till 5 µM.

9. Stoppa reaktionerna genom att med en flerkanalspipett lägga till 10 µl Stop solution i varje brunn i samma ordning som mastermixen tillsattes. Undvik skumbildning genom att försiktigt skaka plattan för hand på en bordsyta och ta bort eventuella bubblor.
10. Mät ljusabsorbans vid 573 nm omedelbart efter tillsättning av Stop solution. Skaka om möjligt plattan inuti mikroplattläsaren i 5 sekunder före mätning. Obs: Efter tillsättning av Stop solution kan färgintensiteten långsamt öka på ett enhetligt sätt i alla brunnar. Detta är förväntat p.g.a. en icke-enzymatisk bakgrundsprocess i mastermixen.

BERÄKNING AV RESULTAT

1. Beräkna medelvärdet för absorbansvärdena för varje standard (ST1–ST5). Skapa en standardkurva genom att rita medelabsorbansen för varje standard på Y-axeln mot koncentrationen (i μM) på X-axeln och genomför inpassning av standardkurvan enligt en enkel linjär regression.
2. Hitta koncentrationen av varje metabolit i varje brunn genom att använda formeln för standardkurvas linjära regression.
3. Beräkna medelvärdet för de fyra blankproverna (BL UNK 1–4). Det erhållna värdet representerar en ospecifik signal från de stabiliserade extrakten.
4. Beräkna medelvärdena för dubbletterna av varje stabiliserat provextrakt (UNK).
5. Beräkna medelvärdena för dubbletterna av den positiva kontrollen och multiplicera med 10 för att erhålla koncentrationen (μM) av metaboliterna NAD^+ och NADH i de ursprungliga 150 μl av den positiva kontrollen.
6. Korrigera de erhållna koncentrationerna i de stabiliserade provextrakten för blankprovsvärdet (beräknades i steg 3) och multiplicera med 10 för att erhålla koncentrationen (μM) av metaboliten NAD^+ eller NADH i det ursprungliga blodprovet (se detaljerad information på sida 16). Om NAD^+ -stabiliserat extrakt har utspäts ytterligare måste koncentrationen multipliceras med ytterligare utspädningsfaktor.

POSITIV KONTROLL

Syftet med den positiva kontrollen är att övervaka stabiliseringsstegets effektivitet när en av metaboliterna tas bort från blandningen. Koncentrationen av uppmätt NAD^+ i den positiva kontrollen förväntas vara inom intervallet 23–27 μM , koncentrationen av NADH förväntas vara inom intervallet 1,7–2,3 μM .

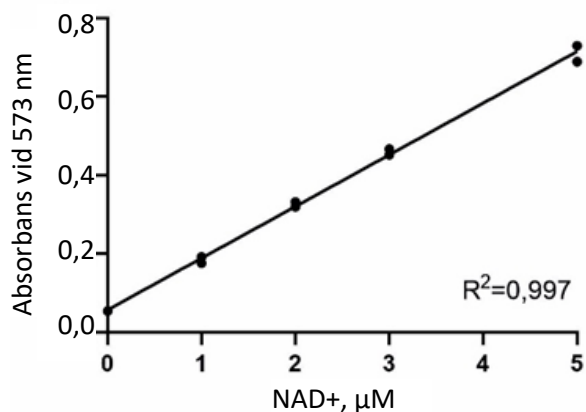
- Absorbansvärdena för stabiliserad positiv kontroll på NAD^+ -plattan förväntas vara mellan absorbansen för ST3 och ST4.
- Absorbansvärdena för stabiliserad positiv kontroll på NADH -plattan förväntas vara lika med ST2 med en variation på 0,05 optiska enheter.

PRESTANDA OCH BEGRÄNSNINGAR

A. TYPISKA DATA

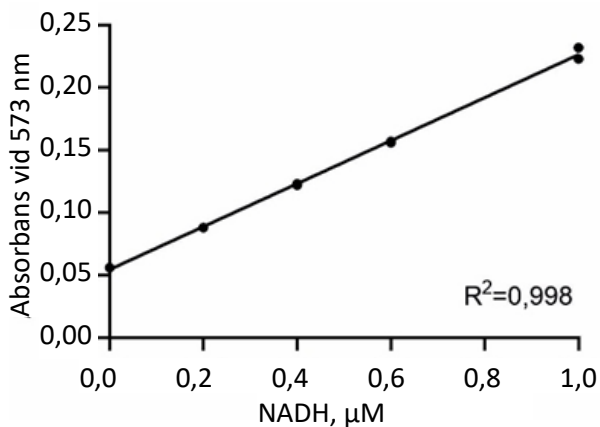
Standardkurvan och koncentrationerna i de stabiliserade provextrakten tillhandahålls endast i demonstrationssyfte och bör aldrig användas istället för realtidskalibrationskurvan.

STANDARDKURVA FÖR NAD⁺



Standard	NAD ⁺ (μM)	Absorbans (573 nm) Analystid – 4 minuter
ST1	0	0,054
ST2	1	0,176
ST3	2	0,319
ST4	3	0,452
ST5	5	0,689

STANDARDKURVA FÖR NADH



Standard	NADH (μM)	Absorbans (573 nm) Analystid – 6 minuter
ST1	0	0,056
ST2	0,2	0,088
ST3	0,4	0,122
ST4	0,6	0,157
ST5	1	0,223

BERÄKNING AV RESULTAT FÖR NAD⁺

Koncentrationsvärden i de stabiliserade provextrakten (UNK) och blankproven (BL UNK 1–4) fastställs utifrån NAD⁺-standardkurvens formel för linjär regression.

Okänt	Koncentration i stabiliserade extrakt (µM)	Koncentration i stabiliserade extrakt (µM) korrigerat med blankprovets genomsnitt (BL UNK 1–4, µM)	Slutlig NAD ⁺ -koncentration i originalprovet (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		

*Korrigerat med utspädningsfaktor x10

BERÄKNING AV RESULTAT FÖR NADH

Koncentrationsvärden i de stabiliserade provextrakten (UNK) och blankproven (BL UNK 1–4) fastställs utifrån NADH-standardkurvens formel för linjär regression.

Okänt	Koncentration i stabiliserade extrakt (µM)	Koncentration i stabiliserade extrakt (µM) korrigerat med blankprovets genomsnitt (BL UNK 1–4, µM)	Slutlig NADH-koncentration i originalprovet (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		

*Korrigerat med utspädningsfaktor x10

B. DETEKTIONSGRÄNSER

Blankprovsgränsen (LoB) för Q-NADMED Blood presenteras i tabellen nedan (LoB $\pm$ standardavvikelse (SD)).

Blankprovsgräns	
	pmol/brunn
NAD ⁺	1,84 $\pm$ 0,9
NADH	2,10 $\pm$ 0,5

Detektionsgränsen (LoD) beräknades från standardkurvorna för NAD⁺ och NADH och presenteras i tabellen nedan (LoD $\pm$ SD).

Detektionsgräns	
	μ M i helblod
NAD ⁺	0,33 $\pm$ 0,2
NADH	0,19 $\pm$ 0,05

Kvantifieringsgränsen (LoQ) presenteras i tabellen nedan (LoQ $\pm$ SD).

Kvantifieringsgräns	
	μ M i helblod
NAD ⁺	0,66 $\pm$ 0,3
NADH	0,40 $\pm$ 0,1

C. PRECISION OCH REPRODUCERBARHET

Analysens precision fastställdes utifrån variationen mellan olika analyser vid mätning. Precisionen mellan olika analyser presenteras i tabellen nedan (CV = koefficientvariationen).

Precision mellan olika analyser	
	CV (%) $\pm$ SD
NAD ⁺	1,48 $\pm$ 0,8
NADH	3,33 $\pm$ 1,5

Resultaten av analysreproducerbarheten sammanfattas i tabellen nedan (N = antal, * 3 alikvoter av samma prov analyserades i triplikat).

Reproducerbarhet						
	NAD ⁺			NADH		
Prov	Ctr1	Ctr2	Ctr3	Ctr1	Ctr2	Ctr3
Antal mätningar *	9	9	9	9	9	9
Medeltal (μ M)	27,41	29,41	22,00	0,55	0,71	0,64
Standardavvikelse	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. PRECISION

Analysens precision beräknades från prover med kända mängder rent NAD⁺ och NADH. Resultaten sammanfattas i tabellen nedan (analysens precision $\pm$ SD).

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

E. ANALYSENS GRÄNSVÄRDEN

Låga och höga gränsvärden representerar den minsta och högsta koncentrationen som har observerats hos 5–7 % av individer inom en given population. Gränsvärdena sammanfattas i tabellen nedan.

Gränsvärde		
	Lågt	Hög
NAD ⁺ (μM)	20	36
NADH (μM)	0,6	1,8

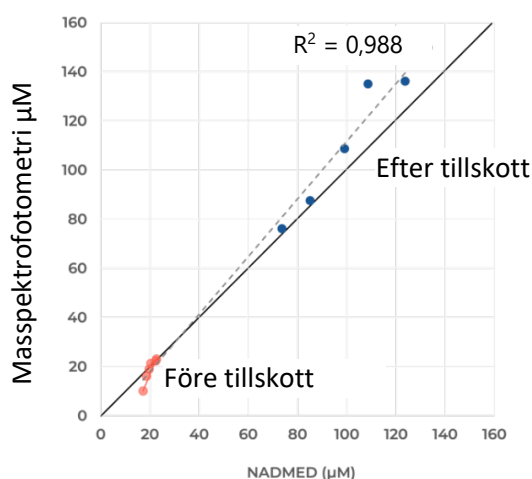
F. PRESTANDAEGENSKAPER

Störningar från andra metaboliter i extraktet utreddes inte separat, eftersom deras bidrag är begränsat och beaktas genom att utföra blankprovspanalysen utan tillagt enzym.

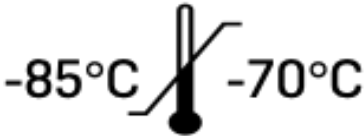
Varning: Kaliumsorbat, borat, pyridin eller vismut i ett prov kan orsaka enzymhämmning och därmed en underskattning av resultaten.

G. METODJÄMFÖRELSE

För att validera Q-NADMED:s prestanda mätte vi koncentrationen av NAD⁺ i en uppsättning kontrollprover av humant blod som också analyserades med masspektrometri. Friska blodprover från fem friska försökspersoner (före och efter 16 veckor av niacintillskott) analyserades parallellt med Q-NADMED och masspektrometri. Resultaten från Q-NADMED stämde överens med resultaten som erhöles med masspektrometri.



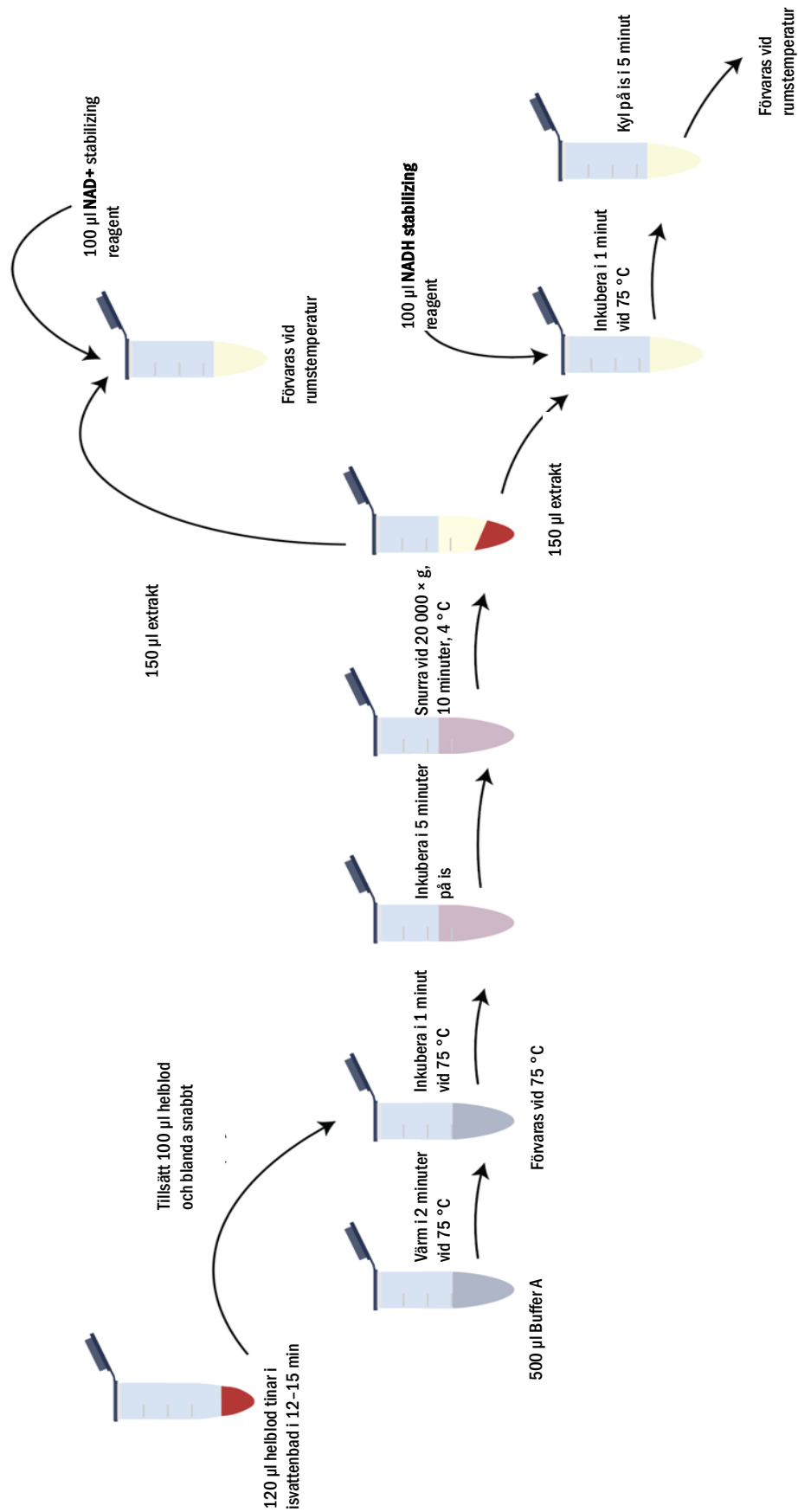
SYMBOLER

Symbol	
	Lättantändlig vätska och ånga
	Varning/fara
	Se bruksanvisningen
	Bäst före-datum
	Katalognummer
	Satsnummer
	Tillverkare
	Övre temperaturgräns

	Använd inte om förpackningen har skadats
	Förvaras torrt
	Antal reaktioner
	Medicinteknisk produkt för diagnostik in vitro
	Ljuskänsligt

SCHEMATISKA BILDER

A. EXTRAKTION AV NAD⁺ OCH NADH FRÅN BLOD



B. REKOMMENDERAD PLATTLAYOUT FÖR MÄTNING AV NAD+ ELLER 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

Plattdesign för analysen av NAD+ eller NADH: St – standarder, BL – blankprover med indikerade prover för blankprovsläsning, UNK – okända prover, stabiliserade extrakt från prover med okänd metabolitkoncentration, PosCtr – stabiliserad positiv kontroll. Använd 20 µl av standarder, positiv kontroll och stabiliserade provextrakt per brunn. Blankprover från de första fyra proverna analyseras i mastermixen utan tillagt enzym.

ANTECKNINGAR

PLATTLAYOUT

Använd den här plattlayouten för att registrera analyserade Standards och prover.

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