

Q-NADMED BLOOD NAD⁺- Assay-Kit

Quantitatives Assay-Kit für Vollblut

Version 4.0

NUR ZUR EINMALIGEN VERWENDUNG

Diese Anweisungen müssen vor der Verwendung dieses Produkts vollständig durchgelesen werden.

CE  **ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK**

ALLGEMEINE INFORMATIONEN

- A. Geschützter Name: Q-NADMED Blood: NAD+- Assay-Kit zur Quantitätsbestimmung von NAD+ in Vollblut
- B. Bestellnummer:
 - a. IVD_001_01_40, 40 Proben (96-Well-Format)
 - b. IVD_001_01_40/MY, 40 Proben (96-Well-Format)
- C. Aufbewahrung: -80 °C
- D. Gebrauchsanleitung vom: September 2023

Hersteller:

NADMED Ltd / Oy

Haartmaninkatu 4, Bldg 14

00290 Helsinki, FINNLAND

www.nadmed.com, info@nadmed.com

INHALTSVERZEICHNIS

ALLGEMEINE INFORMATIONEN	2
INHALTSVERZEICHNIS	3
VERWENDUNGSZWECK	4
KLINISCHER KONTEXT	4
TESTPRINZIP	4
MITGELIEFERTE REAGENZIEN	5
VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE	5
LAGERUNG UND VERFALLSDATEN DER REAGENZIEN	6
SONSTIGE NOTWENDIGE MATERIALIEN	6
REAGENSVORBEREITUNG	7
PROBENNAHME UND AUFBEWAHRUNG	7
PRAKTISCHE ERWÄGUNGEN	8
EXTRAKTION VON NAD ⁺ AUS DEM BLUT	10
VORBEREITUNG DER STANDARDS	11
TESTVERFAHREN	13
BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	14
POSITIVKONTROLLE	14
LEISTUNG UND GRENZEN	15
SYMBOLE	18
SCHEMATISCHE DARSTELLUNG	20
ANMERKUNGEN	21
PLATTENANORDNUNG	22

VERWENDUNGSZWECK

Q-NADMED Blood, ein Medizinprodukt zur In-vitro-Diagnostik, ist ein Analyse-Assay-Kit zum Messen der Konzentrationen von NAD⁺-Metaboliten in humanem Vollblut. Dieser Assay ist quantitativ. Die vorgesehenen Benutzer des Q-NADMED-Assay-Kits sind geschulte Labormitarbeiter. Der erste Verwendungszweck ist die Feststellung systemischer Veränderungen von NAD⁺. Die primären vorgesehenen Benutzer der Assay-Ergebnisse sind Angehörige von Gesundheitsberufen, die die gewonnenen Ergebnisse im Kontext der Erkrankung/des Gesundheitszustands auswerten. Die Ergebnisse des Q-NADMED-Assay-Kits können für Behandlungsentscheidungen, beispielsweise über die Supplementierung mit NAD-Vorläufern, eingesetzt werden. Der zweite Verwendungszweck des Q-NADMED-Assay-Kits ist die Überwachung der NAD⁺-Spiegel bei Patienten, wie beispielsweise die Supplementierung mit NAD-Vorläufern und zur Dosisanpassung.

KLINISCHER KONTEXT

NAD⁺ ist ein bekannter Hauptregulator des Stoffwechsels und der Energiehomöostase im menschlichen Körper. Zahlreiche Forschungsdaten zeigen, dass der systemische NAD⁺-Spiegel als Reaktion auf eine manifestierte Erkrankung abnimmt und so ein Signal für ein Ungleichgewicht der Energiehomöostase des Körpers produziert. Das Maß der NAD⁺-Abnahme ist je nach Patienten und jeweiliger Krankheit unterschiedlich. Eine fortschreitende Abnahme der NAD⁺-Werte führt dazu, dass der Körper seine grundlegenden, zum Überleben notwendigen Stoffwechselfunktionen nicht aufrechterhalten kann, sogar im Fall einer fortlaufenden Behandlung. Mit Q-NADMED können Patienten auf einen NAD⁺-Mangel untersucht, dieser behoben und die Wirksamkeit der Behandlung erhöht werden.

TESTPRINZIP

Das Testprinzip beruht auf einer zyklischen, enzymatischen Reaktion mit kolorimetrischem Endpunktnachweis. Vor dem Stabilisierungsschritt wird NAD⁺ aus der Blutprobe extrahiert. Dann wird der stabilisierte Extrakt mittels enzymatischer Reaktion, die an eine Farbänderung gekoppelt ist, analysiert. Die Intensität der Farbänderung im Assay verhält sich linear proportional zu den Konzentrationen von NAD⁺ im Reaktionsgemisch.

Q-NADMED Blood NAD⁺-Assay-Kit ist zur Analyse von NAD⁺ in 40 Vollblutproben ausgelegt. Die Anzahl an Proben wird durch das vorhandene Volumen an BUFFER A definiert. Mit dem Kit kann die NAD⁺-Analyse flexibel gestaltet werden, da zwei kleinere Probensets zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen werden können. Weitere Einzelheiten siehe Praktische Erwägungen auf S. 8.

MITGELIEFERTE REAGENZIEN

REAGENZIEN	BESCHREIBUNG*	VOR DEM TEST
BUFFER A	28 ml Extraktionspuffer	Auf Raumtemperatur äquilibrieren (15–25 °C).
NAD+ stabilizing reagent	2 Flaschen mit 8 ml gepufferte Lösung für die NAD+-Messung	Auf Raumtemperatur äquilibrieren (15–25 °C).
NAD+ standard stock	2 Mikroröhrchen mit 40 µl NAD+ (1 mM)	Siehe Anleitung zur Vorbereitung.
BUFFER C	2 Flaschen mit 19 ml Testpuffer	Auf Raumtemperatur äquilibrieren (15–25 °C).
Assay color reagent	2 Flaschen mit 3 ml Reagens mit der Testfarbe	Auf Raumtemperatur äquilibrieren (15–25 °C). Sollte innerhalb von 2 h nach der Äquilibration verwendet werden.
Enzyme	2 Mikroröhrchen mit 40 µl Enzymelösung. Eine pro Platte.	Erst direkt vor dem Hinzugeben zum Mastermix auftauen.
Stop solution	1 Flasche mit 3 ml Lösung zum Beenden der Assay-Reaktion	Auf Raumtemperatur äquilibrieren (15–25 °C).
Positive control (buffer)	1 Mikroröhrchen mit 200 µl Buffer zur Vorbereitung der Positivkontrolle	Auf Raumtemperatur äquilibrieren (15 – 25 °C). Siehe Anleitung zur Vorbereitung.

*Hinweis: Zugelassene Variation des Füllvolumens 5 %.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

Sicherheit

Nur zur In-vitro-Diagnostik. Nur von geschultem Personal zu verwenden.

Die Stop solution kann Reizungen der Haut, Augen oder des Atmungsapparates hervorrufen. Einatmen von Dämpfen vermeiden.

Das Assay color reagent kann Hautreizungen hervorrufen. Mit Vorsicht handhaben, Handschuhe tragen.

BUFFER A kann Augenreizungen verursachen. Mit Vorsicht handhaben, Schutzbrille tragen.

Im Arbeitsbereich nicht rauchen, trinken, essen oder Kosmetika auftragen. Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Schutzbrille tragen. Nach Beendigung der Arbeiten Hände gründlich waschen.

Das Sicherheitsdatenblatt (SDS) zu Q-NADMED enthält die identifizierten Gefahren im Zusammenhang mit den in diesem Kit enthaltenen Chemikalien und die entsprechenden Warnhinweise im Zusammenhang mit diesen Gefahren.

Im Sicherheitsdatenblatt (SDS) zu Q-NADMED ist die Entsorgung von verwendeten Kitbestandteilen beschrieben.

Q-NADMED Blood NAD+-Assay-Kit ist geeignet zur Messung von NAD+-Metaboliten aus Vollblut. Zur Messung von NAD+- und NADH-Metaboliten in Vollblut verwenden Sie bitte das Q-NADMED Blood NAD+- und NADH-Assay-Kit (Katalognummer IVD_001).

LAGERUNG UND VERFALLSDATEN DER REAGENZIEN

- ☐ Vor dem Öffnen alle Bestandteile des Kits bei -80 °C lagern. Temperaturschwankungen im Gefrierschrank vermeiden.
- ☐ Nach dem Auftauen sind BUFFER A, NAD⁺ stabilizing Reagents, Positive control (buffer) und Stop solution zwei Wochen lang bei Zimmertemperatur stabil.
- ☐ BUFFER C sollte am Tag des Assays aufgetaut und verwendet werden.
- ☐ Das Assay color reagent ist nach dem Auftauen bis zu drei Stunden lang bei Zimmertemperatur stabil.
- ☐ Enzyme direkt nach dem Auftauen verwenden.
- ☐ Assay-Standards und Positivkontrolle am Tag des Tests vorbereiten und verwenden.
- ☐ Standards vor Licht schützen.

SONSTIGE NOTWENDIGE MATERIALIEN

Die folgenden Materialien sind notwendig, aber nicht im Kit enthalten:

- ☐ Entionisiertes Wasser (Milli-Q-Wasser aus einem Wasseraufbereitungssystem oder auf dem Markt erhältliches entionisiertes Wasser, z. B. Sigma Kat.nr. 38796)
- ☐ Mikroröhrchen, 1,5 ml, zur Probenvorbereitung, Extraktion, Stabilisierung und Vorbereitung der Assay-Standards. Materialanforderungen für die Mikroröhrchen: Verwenden Sie nicht-sterile Mikrozentrifugenröhrchen aus transparentem/naturfarbenen Polypropylen (PP) für die In-vitro-Diagnostik (z. B. Sarstedt Ref. 72.690.001). Keine Mikroröhrchen für die Molekularbiologie mit folgenden Eigenschaften verwenden: steril (chemisch sterilisiert), frei von Endotoxin, Pyrogen, humaner DNA und mit geringer Haftbarkeit; keine Mikroröhrchen verwenden, die zur Arbeit mit LoBind-Proteinen vorgesehen sind.
- ☐ Zwei Plastikreservoirs (aus nicht sterilem Styropor) für Mehrkanalpipetten: eins zum Pipettieren des Mastermixes und das andere zum Pipettieren der Stop solution
- ☐ Zwei transparente Polystyrol (PS)-Mikroplatten mit 96 Wells und mittlerer Proteinbindungsaffinität, entwickelt für kolorimetrische und Absorptionstests.
- ☐ Trockenbad (Heizblock) mit Temperaturregelung (bis zu 80 °C).
- ☐ Tischmikrozentrifuge mit Kühlung (max. Geschwindigkeit 20000 x g).
- ☐ Eis-/Wasserbad (mit Leitungswasser vermisches Eis, das die eingetauchten Mikroröhrchen fest umschließt, sodass diese nicht schwimmen).
- ☐ Kalibrierte Einkanalpipetten (0,5 – 10 µl, 5 – 50 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl) und Mehrkanalpipetten (5 – 50 µl, 30 – 300 µl) und abgeschrägte Low-Retention Pipettenspitze.
- ☐ Spektralphotometrisches Mikroplattenlesegerät für Absorptionsmessungen bei 570 – 573 nm.
- ☐ Aluminiumfolie, um Mikroröhrchen und Platten vor Licht zu schützen.

REAGENSVORBEREITUNG

Ein Set an Reagenzien für eine 96-Wells-Platte für NAD⁺, BUFFER A, Stop solution und Positive control (Buffer) entsprechend der **Anweisungen in der Tabelle auf Seite 5** vor Durchführung des Assays auftauen.

- A. **BUFFER A:** Gebrauchsfertig. Eine Flasche ist für zwei Probensets (insgesamt 40 Proben). Nachdem das erste Probenaset zur Extraktion aufgetaut wurde, kann BUFFER A bei Zimmertemperatur zwei Wochen lang gelagert bzw. erneut bei -80 °C bis zur Analyse des zweiten Probensets eingefroren werden.
- B. **NAD⁺ stabilizing reagent:** Gebrauchsfertig. Einmalgebrauch. Nicht erneut einfrieren.
- C. **Enzyme:** Gebrauchsfertig. Einmalgebrauch. Nicht erneut einfrieren.
- D. **Stop solution:** Gebrauchsfertig. Eine Flasche ist für zwei Assays ausgelegt. Wenn sich beim Auftauen der Stop solution ein Niederschlag bildet, sollte dieser durch 5-minütige Inkubation bei 37 °C wieder aufgelöst und vor der Verwendung wieder auf 25 °C gekühlt werden. Die Stop solution nicht kräftig schütteln. Nachdem das erste Probenaset zur Analyse aufgetaut wurde, kann die Stop solution bei Zimmertemperatur zwei Wochen lang gelagert bzw. erneut bei -80 °C bis zur Analyse des zweiten Probensets eingefroren werden.
- E. **Positive control (buffer):** Gebrauchsfertig. Eine Flasche ist für zwei Assays ausgelegt. Weitere Anweisungen siehe Vorbereitung der Positivkontrolle. Nach der Vorbereitung der Positivkontrolle für das erste Assay lagern Sie den restlichen Buffer zwei Wochen lang bei Zimmertemperatur oder frieren Sie sie bis zur zweiten Verwendung bei -80 °C ein.
- F. **Assay Standards:** Vorbereitet aus 1 mM NAD⁺ standard stock. Weitere Anweisungen siehe Vorbereitung der Standards und Vorbereitung der Positivkontrolle.
- G. **Mastermix:** 1 Flasche **Assay color reagent** (3 ml, Set 1 oder Set 2) in 1 Flasche **BUFFER C** (Set 1 oder Set 2) geben, um 1 Flasche Mastermix für 1 Platte für das NAD⁺-Assay zu erhalten. In der braunen Originalflasche lassen, um es vor Licht zu schützen Nicht kräftig schütteln. Verbleibendes Material entsorgen. Nicht erneut einfrieren.

PROBENNAHME UND AUFBEWAHRUNG

Dieses Kit ist für die Analyse von Vollblut vorgesehen. Geeignete Probentypen sind venöses Blut, das per Venenpunktur abgenommen, oder peripheres Blut, das mit Blutlanzetten abgenommen wurde. Vollblutproben sollte in Sammelröhrchen entnommen werden, die zuvor mit Lithium-Heparin oder K2 EDTA als Antikoagulanzen sprühbeschichtet wurden, und dann durch Auf- und Abschwenken sorgfältig vermischt werden.

Anforderungen für Entnahmeröhrchen mit Antikoagulantien für die venöse Blutentnahme (BD Vacutainer oder Vacuette): K2 EDTA Blutentnahmeröhrchen, die innen mit K2 EDTA sprühbeschichtet sind, wodurch sich eine Konzentration von 1,2 – 2 mg K2 EDTA pro 1 ml entnommenem Blut ergibt, oder Lithium-Heparin (LH) Blutentnahmeröhrchen mit LH-Sprühbeschichtung auf der Innenseite, wodurch sich eine Konzentration von 17 – 18 IE LH pro 1 ml entnommenem Blut ergibt. Zur Analyse sind kleine Volumen an Vollblut erforderlich, daher wird die Verwendung kleiner Entnahmeröhrchen empfohlen, z. B. 2 – 3 ml. Die Entnahme des vorgesehenen Blutvolumens im Entnahmeröhrchen ist elementar, um die Zielkonzentration an Antikoagulans in der Probe zu erhalten.

Die Proben können frisch oder gefroren analysiert werden. Frisches Blut kann innerhalb von 72 Stunden analysiert werden, wenn es nach dem Auftauen kontinuierlich bei einer Temperatur von 4 ° – 8 °C gelagert

wurde. Da das Blut im Entnahmeröhrchen eine Phasenseparation durchläuft, ist es entscheidend, die Probe vor der Entnahme eines Aliquots zur Extraktion sorgfältig zu vermischen. Sollte das Blut nicht frisch analysiert werden können, wird dringend empfohlen, die Probe innerhalb von 72 Stunden nach der Entnahme mithilfe nicht-steriler, einwandiger, transparenter Polypropylen-Mikroröhrchen von 0,5 – 2 ml zu aliquotieren (150 – 200 µl) und im Anschluss bei -20 °C oder -80 °C einzufrieren. Das Einfrieren von Entnahmeröhrchen mit einem größeren Probenvolumen (z. B. > 2 ml) oder in doppelwandigen Mikroröhrchen mit Stehrand erhöht nicht nur die Gefrierzeit, sondern insbesondere auch die Auftauzeit vor der Extraktion, was eine starke Variabilität bei den Ergebnissen zur Folge haben kann. Die Lagerungszeit bei kleinen Aliquots beträgt bei -20 °C einen Monat und bei -80 °C circa ein Jahr. Mit diesem Kit wird der intrazelluläre NAD-Gehalt gemessen. Daher ist es äußerst wichtig, jede frische Probe vor und während des Aliquotierens gründlich zu vermischen, damit jedes Aliquot etwa die gleiche Anzahl an Zellen enthält. Gefrorene Proben müssen vor dem Test permanent eingefroren bleiben. Für klinische Studien wird dringend empfohlen, bei allen Proben der Studie die gleichen zeitlichen Abstände zwischen der Probenentnahme und dem Aliquotieren/Einfrieren einzuhalten. Zum Messen von NAD⁺ sind 100 µl Vollblut erforderlich. Im Anschluss erneut eingefrorene und aufgetaute Blutproben können nicht für die Analyse verwendet werden.

PRAKTISCHE ERWÄGUNGEN

- Q-NADMED Blood NAD⁺-Assay-Kit ist zur Analyse NAD⁺ in 40 Vollblutproben ausgelegt. Die Anzahl an Proben wird durch das vorhandene Volumen an BUFFER A definiert. Mit diesem Kit kann in NAD⁺-Analyse flexibel gestaltet werden, da zwei kleinere Probensets zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen werden können. Zum Beispiel:
 - Der Extraktion von 30 Proben sollte am selben Tag die NAD⁺-Analyse auf einer 96-Well-Platte mit den Komponenten von Set 1 erfolgen.
 - An einem anderen Tag sollte der Extraktion der verbleibenden 10 Proben die NAD⁺-Analyse auf einer zweiten 96-Wells-Platte mit den Komponenten von Set 2 erfolgen.
 - *Optional:* Alle 40 Proben können auf einmal auf einer einzigen 96-Wells-Platte mit einem Set an Reagenzien analysiert werden (Set 1). In diesem Fall wird das zweite Set an Reagenzien (Set 2) bleibt unverwendet oder kann zur Wiederholung der ersten Messungen am selben Tag benutzt werden.
- Verwenden Sie keine Komponenten des Kits nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Mischen Sie keine Materialien aus unterschiedlichen Kit-Chargen.
- Dieses Assay ist NICHT zum Messen von NAD⁺ in Plasma oder Serum, gezüchteten Zellen oder Geweben (human oder Tier) geeignet.
- Die einzelnen Reagenzien gründlich durch vorsichtiges Schwenken mischen. Kleine Mikroröhrchen sollten vor dem Öffnen schnell bei geringer Geschwindigkeit zentrifugiert werden.
- Für den Test können sowohl frische als auch gefrorene Blutproben verwendet werden. Für die Analyse ist es äußerst wichtig, eine homogene (gründlich vermischte) Probe zur Verfügung zu haben.
- Wir empfehlen, maximal acht Proben auf einmal zu extrahieren, um die Verarbeitungszeit zu minimieren.
- Zur Vermeidung einer Kreuzkontamination wechseln Sie nach der Hinzufügung jedes Standards, jeder Probe und jedes Reagens zu einer neuen Pipettenspitze. Verwenden Sie des Weiteren verschiedene Reservoirs für den Mastermix und die Stop solution.
- Hoch-Präzisionspipetten und abgeschrägte Low Retention-Pipettenspitzen erhöhen die Präzision.

- Das Assay color reagent ist ein gelber, lichtempfindlicher Bestandteil, der sich bei der enzymatischen Reaktion braun färbt. Eine Exposition gegenüber direktem Sonnenlicht oder künstlichem Licht verursacht eine unspezifische Farbänderung zu grün. Um die Lichtinterferenz mit dem Assay zu minimieren, empfehlen wir:
 - Pipettieren des Mastermixes und dann der Stop solution in die Platte unter natürlichen indirekten Lichtverhältnissen (gedämpftes Licht). Schalten Sie dazu das künstliche Licht in Innenräumen aus und vermeiden Sie es, in Fensternähe zu pipettieren. Mit natürlichem indirekten Licht (gedämpftes Licht) ist die Menge an Helligkeit gemeint, die man beim Fahren eines Autos unter einer Brücke bei bedecktem Wetter erlebt.
 - Abdecken der 96-Well-Platte mit Aluminiumfolie während der Reaktionszeit beim Hinzugeben des Mastermixes und beim Transfer zum Plattenlesegerät nach Zugabe der Stop solution. Wickeln Sie die Platte nicht in Aluminiumfolie ein, da beim Auspacken die Gefahr einer Kontamination und Vermischung der Proben besteht.
 - Im Protokoll sind die Arbeitsschritte angegeben, die unter gedämpften Lichtverhältnissen erfolgen müssen.
- Die Positivkontrolle ist eine künstliche Probe, die eine bekannte Anzahl purer NAD⁺ enthält.
- Technische Anforderungen für das Trockenbad (Heizblock):
 - Testen Sie die Effizienz der Wärmeübertragung im Trockenbad wie folgt:
 1. Geben Sie 250 µl Wasser in ein Mikroröhrchen, das in das Trockenbad passt, das Sie verwenden.
 2. Führen Sie ein herkömmliches Laborthermometer in das Mikroröhrchen mit der Flüssigkeit ein und geben Sie es in das auf 80 °C eingestellte Trockenbad.
 3. Messen Sie die Zeit, die benötigt wird, um die Temperatur der Flüssigkeit auf 70–75 °C anzuheben.
 4. Alle in diesem Protokoll genannten Trockenbadinkubationszeiten gelten für ein Trockenbad, das 250 µl Wasser innerhalb von 2 Minuten auf 75 °C erhitzt. Dies ist genug, damit die chemische Reaktion in der Lösung bei der Inkubation im Trockenbad 70–75 °C erreicht.
- Technische Anforderungen für das spektrophotometrische Plattenlesegerät:
 - Messung der Lichtabsorption bei 570 – 573 nm
 - Option, die Lichthelligkeit / -intensität beim Scannen auf **niedrig** einzustellen. Bei einigen Plattenlesegeräten kann die Helligkeit als Anzahl an Blitzen pro Messung eingestellt werden. Stellen Sie in so einem Fall die Anzahl der Blitze zwischen 5 und 10 ein.
- Der Mastermix und die Stop solution enthalten Tenside. Um Blasenbildungen zu vermeiden, pipettieren Sie den Mastermix und die Stop solution, indem Sie die Pipette auf die erste Stopposition drücken und dann etwaige Blasen im Well mit einer kleinen Nadel entfernen. Vermeiden Sie, den Inhalt der Wells mit Pipettenspitzen zu berühren.
- Wir empfehlen die folgende Reihenfolge:
 1. Bringen Sie BUFFER A, NAD⁺-stabilizing reagent, Positive control (Buffer) und die Stop solution am Tag vor dem Assay auf Raumtemperatur oder verwenden Sie Lösungen, die bei Zimmertemperatur gelagert wurden, innerhalb von zwei Wochen nach dem Auftauen.
 2. Bereiten Sie die Assay-Standards und die Positivkontrolle am Tag des Assays vor.
 3. Tauen Sie am Tag des Assays die Flaschen mit BUFFER C und Assay color reagent bis auf Raumtemperatur auf. Das Auftauen dieser Flaschen dauert etwa 2 – 3 Stunden. In dieser Zeit extrahieren Sie die Proben und stabilisieren Sie die gewonnenen Extrakte zur Messung von NAD⁺. Führen Sie das NAD⁺-Assay auf einer einzelnen Platte durch.

EXTRAKTION VON NAD⁺ AUS DEM BLUT

Hinweis: dieser Abschnitt wird unter normalen Lichtverhältnissen durchgeführt.

1. Bringen Sie BUFFER A, und NAD⁺ stabilizing reagent vor der Extraktion auf Raumtemperatur.
2. Verwenden Sie frisches, auf Eis gekühltes Blut oder tauen Sie gefrorene Blutproben vor der Extraktion 12 – 15 Minuten lang im Eiswasserbad auf. (**Tipp:** beim Auftauen können Sie gelegentlich durch das Auflegen warmer Hände nachhelfen). Wir empfehlen, maximal 8 Proben auf einmal zu extrahieren.
3. 500 µl von BUFFER A in 1,5 ml Mikroröhrchen pipettieren.
4. Aliquots von BUFFER A in einem auf 75–80 °C vorgewärmten Trockenbad 2 bis 3 Minuten (max. 5 Min) erhitzen. Bis Schritt 6 im Trockenbad lassen.
5. Blutproben vor der Extraktion schnell durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren bei gleichzeitiger Rotation der Spitze vermischen, um Schaumbildung zu vermeiden.
6. 100 µl Blut durch eine schnelle zielsichere Bewegung direkt in das Mikroröhrchen mit dem heißen BUFFER A geben, das im Trockenbad gelassen wurde. Sofort durch mehrmaliges intensives Auf- und Abpipettieren vermischen und gleichzeitig die Spitze rotieren, um die kalte Probe wirksam mit dem heißen BUFFER A zu vermischen.
7. Homogenat 1 Min lang bei 75 –80 °C inkubieren.
8. Die Mischung mindestens 5 Min lang in einem Eiswasserbad abkühlen. Nach dem Abkühlen auf Eis sollte das Homogenat ohne freie Flüssigkeit polymerisieren.
9. 10 Min lang bei 4 °C bei 20000 x g zentrifugieren. Überstand in ein sauberes Mikroröhrchen geben und Pellet entsorgen. Gewonnenes Gesamtextrakt (Überstände) mit NAD⁺ bei 4 °C abgedeckt mit einer Aluminiumfolie bis zum nächsten Schritt stehen lassen. Führen Sie Schritt 2 bis 9 mit der nächsten Charge mit 8 Proben durch, bis Sie alle Proben extrahiert haben. Nachdem alle Proben extrahiert wurden, fahren Sie mit Schritt 10 fort. *Optional:* Die Überstände können eine Woche lang bei -80 °C gelagert werden. In diesem Fall 10 Min lang vor der Vorbereitung der Aliquots in Schritt 10 bei Raumtemperatur auftauen.
10. Ein Aliquot aus jedem gewonnenen Extrakt in einem sauberen Mikroröhrchen vorbereiten – 150 µl/Röhrchen.
11. Für jedes 150 µl-Aliquot 100 µl NAD⁺ stabilizing reagent hinzugeben, um stabilisierten Extrakt mit NAD⁺ zu erhalten. Bei Raumtemperatur 5 Min lang vortexen und inkubieren. Wird der Test nicht sofort durchgeführt, stabilisierte Extrakte bis zum Assay im Kühlschrank aufbewahren. **Mit Abdeckung aus Aluminiumfolie vor Licht schützen.**

HINWEIS: Die endgültige Verdünnung der Original-Vollblutprobe beträgt das 10-fache.

HINWEIS: Im Fall individueller Supplementierungen mit NAD-Vorläufern können die NAD⁺-Werte im Blut ansteigen und daher sollte der stabilisierte NAD⁺-Extrakt vor dem Test weiter mit entionisiertem Wasser verdünnt werden (zweimal). Dann beträgt die Verdünnung der Original-Blutprobe das 20-fache für NAD⁺.

VORBEREITUNG DER STANDARDS

Hinweis: Dieser Abschnitt wird unter normalen Lichtverhältnissen durchgeführt.

- Standards am Tag des Assays vorbereiten. Ein Mikroröhrchen mit 1 mM NAD⁺ standard Stocks 5 min lang bei Raumtemperatur auftauen. Beim Auftauen mit Folienabdeckung vor Licht schützen.
- 50 µM NAD⁺-stock** durch Hinzufügen von 25 µl von 1 mM NAD⁺ standard stock (mitgeliefert) in 475 µl entionisiertem Wasser vorbereiten und vortexen. Dieser stock (Stamm) wird zur Vorbereitung der NAD⁺ Standards und Positivkontrolle verwendet.
- Bereiten Sie die **NAD⁺ Standards** gemäß dem nachfolgenden Schema vor, indem Sie die angegebenen Volumina der Reagenzien in der folgenden Reihenfolge vermischen: entionisiertes Wasser, 50 µM NAD⁺ stock, BUFFER A und NAD⁺ stabilizing reagent. Das endgültige Volumen jedes Standards beträgt 1 ml. (**Tipp:** Dieselbe 20–200-µL-Pipette zum Pipettieren von 50 µM NAD⁺ stock und Wasser verwenden).
- Den Ständer mit den gebrauchsfertigen Assay-Standards mit Aluminiumfolie abdecken, um sie vor Licht zu schützen, und vor dem Pipettieren in die Platte im Kühlschrank aufbewahren.

NUMMER DES STANDARDS	KONZENTRATION von NAD ⁺ (µM)	VORBEREITUNG DES STANDARDS			
		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

VORBEREITUNG DER POSITIVKONTROLLE

Hinweis: Dieser Abschnitt wird unter normalen Lichtverhältnissen durchgeführt.

Die Positivkontrolle wird vor dem Assay durch Vermischen der bekannten Menge von NAD⁺-Standards mit dem Positive control Buffer (mitgeliefert) vorbereitet. Das Volumen und die Konzentration von NAD⁺ in der Positivkontrolle ahmen eine Blutprobe einer gesunden Person nach. Die vorbereitete Positivkontrolle wird den gleichen Extraktions- und Stabilisierungsschritten unterzogen wie Vollblutproben.

1. Das Mikroröhrchen mit Positive control (Buffer) 5 min lang bei Raumtemperatur auftauen.
2. Zur Vorbereitung der Positivkontrolle 75 µl Positive control Buffer in ein Mikroröhrchen geben
3. 75 µl von **50 µM NAD⁺ stock** (zur Vorbereitung siehe Seite 11) in den Positive control Buffer hinzufügen und vortexen, um die Positivkontrolle vorzubereiten. Die erwartete Konzentration von NAD⁺ in den gewonnenen 150 µl der Positivkontrolle beträgt $25 \pm 2 \mu\text{M}$.
4. Die Positivkontrolle enthält keine Proteine und kann mit BUFFER A bei Raumtemperatur extrahiert werden. 100 µl der vorbereiteten Positivkontrolle zu 500 µl BUFFER A bei Raumtemperatur hinzufügen, um einen „Extrakt“ Positivkontrolle herzustellen, dann vortexen und mit Schritt 5 fortfahren.
5. Ein Aliquot des Positivkontrollen-„Extrakts“ (aus Schritt 4) in einem sauberen Mikroröhrchen vorbereiten – 150 µl/Röhrchen.
6. 100 µl **NAD⁺ stabilizing reagent** hinzufügen, vortexen und bei Raumtemperatur 5 Min lang inkubieren. Dann bis zur Verwendung im NAD⁺-Assay im Kühlschrank und mit Aluminiumfolie abgedeckt aufbewahren.

HINWEIS: Die endgültige Verdünnung der Positivkontrolle beträgt das 10-fache.

TESTVERFAHREN

Hinweise:

- ☐ Schritt 1 – 3 werden unter normalen Lichtverhältnissen durchgeführt.
- ☐ **Schritt 4 – 9 werden unter gedämpften Lichtverhältnissen durchgeführt (d. h. das künstliche Licht ist ausgeschaltet).**
- ☐ Jeder Assay enthält Leerproben zur Korrektur aller unspezifischen Hintergrundsignale. Die Leerproben werden aus vier stabilisierten Probenextrakten vorbereitet (z. B. BL UNK1 – 4 der Proben 1 – 4), damit unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Extraktkomponenten und dem Assay color reagent im Mastermix korrigiert werden. Für die Positivkontrolle ist kein separater Leerwert notwendig.
- ☐ Wird Teilnehmerblut analysiert, das mit NAD⁺ Vorläufern angereichert wurde, sind für die Proben mindestens zwei Wells mit Leerproben für diesen Probentyp erforderlich. Werden Proben von angereicherten und nicht angereicherten Teilnehmern auf derselben Platte analysiert, wird empfohlen zwei Wells mit Leerproben pro Typ zu präparieren. Dazu werden nach dem Zufallsprinzip zwei stabilisierte Extrakte mit Anreicherung und zwei ohne Anreicherung von den entsprechenden Teilnehmern ausgewählt. Verwenden Sie diese Extrakte zur Vorbereitung der Leerproben: zwei Wells pro Typ.
- ☐ **Alle Leerproben werden mit Mastermix OHNE hinzugefügtem Enzyme inkubiert.**
- ☐ Enzyme sollte erst direkt vor dem Hinzufügen zum Mastermix aufgetaut werden. Das Mikroröhrchen mit Enzyme vor dem Öffnen bei niedriger Geschwindigkeit kurz zentrifugieren.

Schritte:

1. Gebrauchsfertige Standards, stabilisierte Probenextrakte und stabilisierte "Extrakte" der Positivkontrolle 5 Min lang bei Raumtemperatur inkubieren und danach auf die Platte pipettieren.
2. 20 µl von jedem NAD⁺-standard doppelt pipettieren und bei ST1 (0 µM), wie auf dem Plattenschema auf Seite 21 dargestellt, beginnen.
3. 20 µl stabilisierter Positivkontrolle und stabilisierter Probenextrakte doppelt pipettieren (siehe Schema auf S. 21). Pipettieren Sie für die ersten vier stabilisierten Probenextrakte ein Duplikat in das entsprechende Well („BL UNK1-4“), wie auf dem Schema auf S. 21 dargestellt. Diese vier Wells sind Leerproben, die für die Analyse ohne Enzyme benötigt werden, um unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Extraktkomponenten und dem Assay color reagent im Mastermix zu korrigieren.
4. Arbeiten Sie ab diesem Schritt unter gedämpften Lichtverhältnissen. Bereiten Sie den Mastermix vor, indem Sie Assay color reagent in BUFFER C geben und durch vorsichtige Rotation mischen.
5. Geben Sie 190 µl des Mastermixes ohne Enzyme in jedes der vier Leerproben-Wells (BL UNK1-4).
6. Geben Sie 40 µl Enzyme in den verbleibenden Mastermix. Vorsichtig vermischen und Schaumbildung vermeiden. Geben Sie den Mastermix mit der hinzugefügtem Enzymelösung in das Reservoir, schützen Sie den Mastermix im Reservoir beim Pipettieren mit einer Abdeckung aus Aluminiumfolie. (Weitere Anweisungen finden Sie in unserem Schulungsvideo unter www.nadmed.com.)
7. Geben Sie 190 µl des Mastermixes mit zugefügtem Enzyme in alle verbleibenden Wells, einschließlich dem mit stabilisierter Positivkontrolle mit einer Mehrkanalpipette. Schaumbildung und direkten Lichteinfall vermeiden. Bedecken Sie die gebrauchsfertige Platte sofort mit Aluminiumfolie.

- Bei Raumtemperatur in der abgedeckten Platte inkubieren.

HINWEIS: die Reaktion kann beendet werden, wenn ein deutlicher Farbunterschied in den Standards und ein Unterschied der Farbintensität zwischen den Proben mit hinzugefügtem Enzyme und den Leerproben vorhanden ist. Je länger die Reaktionszeit, je intensiver wird das Signal zu erkennen sein.

- Stoppen Sie die Reaktionen, in dem Sie mit einer Mehrkanalpipette 10 µl Stop solution in jedes Well in der gleichen Reihenfolge wie Mastermix hinzugeben. Vermeiden Sie Schaumbildung, schütteln Sie die Platte vorsichtig mit der Hand auf der Arbeitsfläche hin und her, sodass sich Blasen auflösen.
- Messen Sie die Lichtabsorption bei 573 nm unverzüglich nach Hinzufügung der Stop solution Sofern möglich, schütteln Sie vor der Messung die Platte im Mikroplattenlesegerät für 5 Sekunden. Hinweis: Nach Hinzufügung der Stop solution kann die Farbintensität langsam und einheitlich in allen Wells zunehmen. Dies liegt an den nichtenzymatischen Hintergrundvorgängen im Mastermix.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Berechnen Sie den Durchschnitt der Absorptionswerte für jeden standard (ST1 – ST5). Erstellen Sie eine Standardkurve, indem Sie die mittlere Absorption für jeden standard auf der Y-Achse gegen die Konzentration (in µM) auf der X-Achse eintragen und eine einfache lineare Regressionsanpassung der Standardkurve durchführen.
- Ermitteln Sie die Metabolitenkonzentrationen in jedem Well mit der Formel für die lineare Regression der Standardkurve.
- Berechnen Sie den Durchschnitt für vier Leerproben (BL UNK1-4). Der errechnete Wert repräsentiert ein unspezifisches Signal der stabilisierten Extrakte.
- Berechnen Sie den Durchschnitt der Duplikate jedes stabilisierten Probenextrakts (UNK).
- Berechnen Sie den Durchschnitt der Duplikate der stabilisierten Positivkontrolle und multiplizieren Sie ihn mit 10, um die Konzentration (µM) der NAD⁺-Metaboliten in den original 150 µl der Positivkontrolle zu erhalten.
- Korrigieren Sie die erhaltenen Konzentrationen der stabilisierten Probenextrakte für den Leerprobenwert (der in Schritt 3 berechnet wurde) und multiplizieren Sie mit 10, um die Konzentration (µM) der NAD⁺ -Metaboliten in der Original-Blutprobe zu erhalten (Einzelheiten, siehe Seite 15). Wenn NAD⁺ stabilisierte Extrakte zusätzlich verdünnt wurden, muss die Konzentration mit einem zusätzlichen Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

POSITIVKONTROLLE

Die Positivkontrolle hat den Zweck, die Gesamt-Assay-Leistung zu überwachen. Die gemessene NAD⁺-Konzentration in der Positivkontrolle wird voraussichtlich im Bereich von 23 – 27 µM liegen.

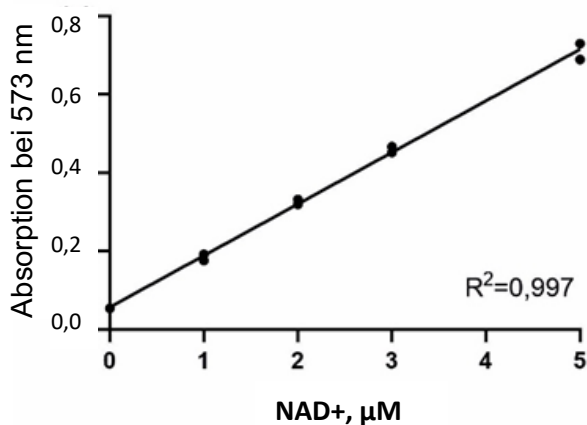
- Die Absorptionswerte der stabilisierten Positivkontrolle auf der NAD⁺-Platte werden voraussichtlich zwischen den Absorptionswerten von ST3 und ST4 liegen.

LEISTUNG UND GRENZEN

A. TYPISCHE DATEN

Die Standardkurve und die Konzentrationen der stabilisierten Probenextrakte werden nur zu Demonstrationszwecken bereitgestellt und sollten niemals statt der Echtzeit-Kalibrationskurve verwendet werden.

STANDARDKURVE FÜR NAD⁺



Standard	NAD ⁺ (µM)	Absorption (573 nm) Assayzeit – 4 Min
ST1	0	0,054
		0,054
ST2	1	0,176
		0,192
ST3	2	0,319
		0,332
ST4	3	0,452
		0,466
ST5	5	0,689
		0,730

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE FÜR NAD⁺

Die Werte für die Konzentrationen in den stabilisierten Probenextrakten (UNK) und Leerproben (BL UNK1-4) werden mit der linearen Anpassungsformel der NAD⁺-Standardkurve ermittelt.

Unbekannt	Konzentration in stabilisierten Extrakten (µM)	Konzentration in stabilisierten Extrakten korrigiert mittels Durchschnitt der Leerprobe (BL UNK 1-4, µM)	Endgültige NAD ⁺ -Konzentration in der ursprünglichen Probe (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		

*Korrigiert mittels Verdünnungsfaktor x 10

B. NACHWEISGRENZEN

Die Leerwertgrenze (Limit of Blank, LoB) für Q-NADMED Blood ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (LoB $\pm$ Standardabweichung [SD]).

Leerwertgrenze	
	pmol/Well
NAD+	1,84 $\pm$ 0,9

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) wurde aus den NAD+- Standardkurven berechnet und ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (LoD $\pm$ SD).

Nachweisgrenze	
	μ M in Vollblut
NAD+	0,33 $\pm$ 0,2

Die Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantitation, LoQ) ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (LoQ $\pm$ SD).

Quantifizierungsgrenze	
	μ M in Vollblut
NAD+	0,66 $\pm$ 0,3

C. PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT

Mithilfe von Intra-Assay-Variationen wurde die Genauigkeit der Assay-Leistung bei der Messung bestimmt. Die Intra-Assay-Präzision ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (VK = Variationskoeffizient).

Intra-Assay-Präzision	
	VK (%) $\pm$ SD
NAD+	1,48 $\pm$ 0,8

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Assay-Reproduzierbarkeit zusammengefasst (N = Anzahl, 3 Aliquots derselben Probe werden dreifach ausgewertet).

Reproduzierbarkeit	NAD+					
Probe	Ctr1	Ctr2	Ctr3			
N der Messungen*	9	9	9			
Mittelwert (μ M)	27,41	29,41	22,00			
Standardabweichung	0,62	1,31	0,87			
Variationskoeffizient (VK) (%)	2,28	4,45	3,95	5,20	7,06	8,45

D. GENAUIGKEIT

Die Testgenauigkeit wurde anhand von Proben mit bekannten Mengen an reinem NAD⁺ berechnet. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst (Testgenauigkeit $\pm$ SD).

Genauigkeit (%)		
NAD ⁺	N = 32	97,13 $\pm$ 7,6

E. CUT-OFF-WERT DES ASSAYS

Die niedrigsten und höchsten Cut-off-Werte repräsentieren die kleinsten und höchsten Konzentrationen, die bei 5 bis 7 % der Personen eines gegebenen Populationsausschnitts beobachtet wurden. In der nachfolgenden Tabelle sind Cut-off-Werte zusammengefasst.

Cut-off-Werte		
	Niedrig	Hoch
NAD ⁺ (μ M)	20	36

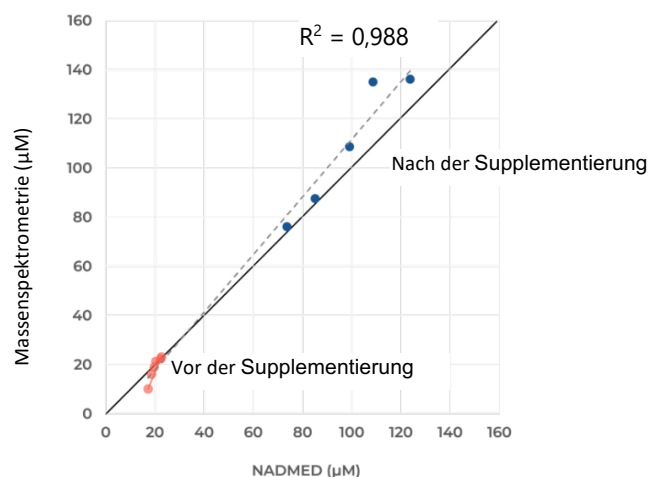
F. LEISTUNGSMERKMALE

Interferenzen durch andere Metaboliten im Extrakt wurden nicht gesondert untersucht, da ihr Einfluss gering ist und durch die Durchführung der Leerwert-Analyse ohne Enzyme-Zusatz berücksichtigt wird.

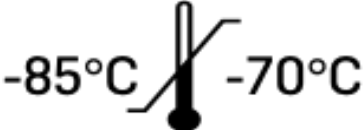
Warnhinweis: Kaliumsorbat, Borat, Pyridin und Wismut in einer Probe können zu einer Hemmung der Enzyme und damit zu einer Unterschätzung der Ergebnisse führen.

G. METHODENVERGLEICH

Zur Validierung der Leistung von Q-NADMED wurde die NAD⁺-Konzentration in einer Reihe von menschlichen Kontrollblutproben gemessen, die ebenfalls mittels Massenspektrometrie analysiert wurden. Gefrorene Blutproben von fünf gesunden Probanden (vor und nach 16 Wochen Niacin-Supplementierung) wurden parallel mit Q-NADMED und Massenspektrometrie analysiert. Die Q-NADMED-Ergebnisse stimmten mit denen der Massenspektrometrie überein.



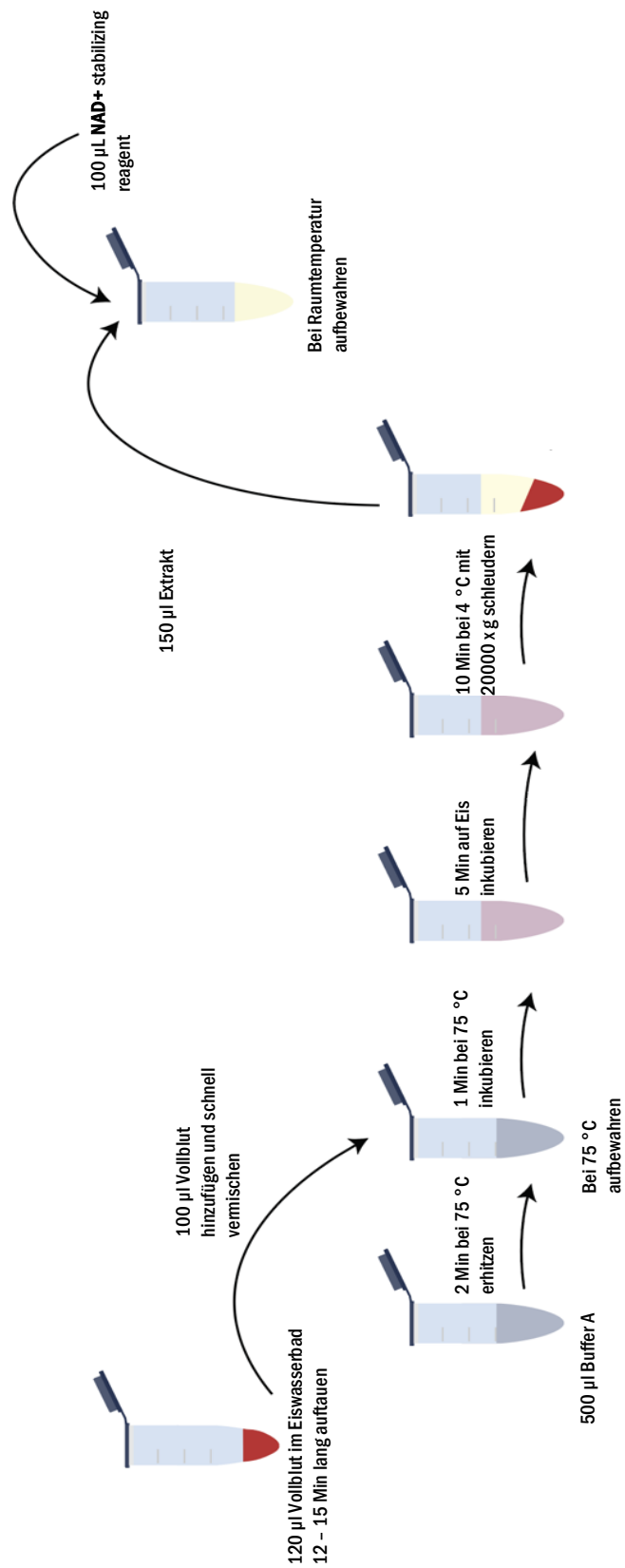
SYMBOLS

Symbol	
	Entzündliche Flüssigkeit und Dampf
	Warnung/Gefahr
	Gebrauchsanweisung beachten
	Verwendbar bis
	Katalognummer
	Chargencode
	Hersteller
	Höchsttemperatur

	Nicht verwenden, falls Verpackung beschädigt
	Trocken aufbewahren
	Anzahl der Reaktionen
	Medizinisches Gerät für In-vitro-Diagnostik
	Vor direktem Licht schützen

SCHEMATISCHE DARSTELLUNG

A. EXTRAKTION VON NAD⁺ AUS DEM BLUT



B. EMPFOHLENE PLATTENANORDNUNG ZUR NAD⁺-MESSUNG

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

Plattenanordnung für NAD⁺-Assay: St – standard, BL - Leerwert mit angezeigten Proben zur Leerwertmessung, UNK – unbekannte Proben, stabilisierte Extrakte der Proben mit unbekannter Metabolitkonzentration, PosCtr – stabilisierte Positivkontrolle. Pro Well 20 µl der Standards, Positivkontrolle und stabilisierten Probenextrakte verwenden. Leerproben der ersten vier Proben werden im Mastermix ohne Enzyme-Zusatz analysiert.

ANMERKUNGEN

PLATTENANORDNUNG

Verwenden Sie diese Plattenanordnung, um getestete Standards und Proben zu erfassen.

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