NADMED

TH

ชุดตรวจวิเคราะห์
Q-NADMED BLOOD NAD+ และ NADH

ชุดตรวจวิเคราะห์โลหิตรวมเชิงปริมาณ

เวอร์ชัน 4.0

สำหรับใช้ครั้งเดียวเท่านั้น

จำเป็นต้องอ่านคำชี้แจงทั้งหมดก่อนเริ่มใช้ผลิตภัณฑ์นี้

CE IVD สำหรับใช้เพื่อการวินิจฉัยภายนอกร่างกาย

ข้อมูลทั่วไป

A. ชื่อกรรมสิทธิ์: ชุดตรวจวิเคราะห์ Q-NADMED Blood NAD+ และ NADH: ชุดตรวจวิเคราะห์โลหิตรวมเชิงปริมาณ
B. หมายเลขแคตตาล็อก:
    a. IVD_001, 40 ตัวอย่าง (รูปแบบ 96 หลุม)
    b. IVD_001/MY, 40 ตัวอย่าง (รูปแบบ 96 หลุม)
C. การเก็บรักษา: -80°C
D. ออก IFU เมื่อ: กันยายน 2023

ผู้ผลิต:

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

สารบัญ

ข้อมูลทั่วไป 2
การใช้งานตามวัตถุประสงค์ 4
ข้อมูลภูมิหลังทางคลินิก 4
หลักการตรวจวิเคราะห์ 4
สารทำปฏิกิริยาที่จัดเตรียมไว้ให้ 5
ข้อควรระวังและคำเตือน 5
การเก็บรักษาและวันหมดอายุของสารทำปฏิกิริยา 6
วัสดุอื่น ๆ ที่จำเป็น 6
การเตรียมสารทำปฏิกิริยา 7
การเก็บตัวอย่างและการเก็บรักษา 7
ข้อควรพิจารณาในทางปฏิบัติ 8
การสกัด NAD+ และ NADH จากเลือด 10
การเตรียมสารมาตรฐาน 11
ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ 13
การคำนวณผลการตรวจวิเคราะห์ 15
สารควบคุมเชิงบวก 15
ประสิทธิภาพและข้อจำกัด 16
สัญลักษณ์ 20
รูปภาพแผนผัง 22
หมายเหตุ 23
แบบฟอร์ม 24

การใช้งานตามวัตถุประสงค์

อุปกรณ์ทางการแพทย์สำหรับวินิจฉัยภายนอกร่างกาย Q-NADMED Blood เป็นชุดตรวจวิเคราะห์สำหรับวัดความเข้มข้นของเมทาบอไลท์ NAD+ และ NADH ในโลหิตรวมของมนุษย์ การตรวจวิเคราะห์นี้เป็นการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ กลุ่มผู้ใช้เป้าหมายของชุดตรวจวิเคราะห์ Q-NADMED คือบุคลากรในห้องปฏิบัติการที่ผ่านการฝึกอบรมแล้ว วัตถุประสงค์แรกที่กำหนดไว้คือเพื่อใช้ตรวจหาการเปลี่ยนแปลงอย่างเป็นระบบใน NAD+ และ NADH กลุ่มผู้ใช้เป้าหมายหลักของผลการตรวจวิเคราะห์นี้คือ บุคลากรทางการแพทย์ที่ตีความผลการวิเคราะห์ที่ได้รับในบริบทของสถานะสุขภาพ/โรค โดยสามารถใช้ผลการวิเคราะห์ของชุดตรวจวิเคราะห์ Q-NADMED เพื่อทำการตัดสินใจเกี่ยวกับการรักษา เช่น การเสริมด้วยสารตั้งต้นของ NAD วัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้ลำดับที่สองของชุดตรวจวิเคราะห์ Q-NADMED คือเพื่อตรวจติดตามระดับ NAD+ และ NADH ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษา เช่น การเสริมด้วยสารตั้งต้นของ NAD และการปรับขนาดยา

ข้อมูลภูมิหลังทางคลินิก

เมทาบอไลท์ของ NAD+ และ NADH จะปรับระบบเมตาบอลิซึมของร่างกายมนุษย์และการรักษาดุลยภาพของพลังงานให้สอดคล้องกับการเปลี่ยนของสภาวะจากภายนอกร่างกายและจากภายในร่างกาย ข้อมูลการวิจัยตั้งแต่ในอดีตแสดงให้เห็นว่าระดับการลดลงอย่างเป็นระบบของ NAD+ ที่ตอบสนองต่อโรคที่แสดงอาการ ทำให้มีสัญญาณของการไม่สมดุลของการรักษาดุลยภาพของพลังงานในร่างกาย ระดับของการลดลงของ NAD+ จะแตกต่างกันไปในผู้ป่วยและพยาธิวิทยาที่แตกต่างกัน ระดับของ NAD+ ที่ลดลงมากขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้ร่างกายไม่สามารถคงการทำงานของเมทาบอลิซึมขั้นพื้นฐานไว้ได้ แม้แต่ในสภาวะที่ยังคงมีการรักษาอย่างต่อเนื่อง Q-NADMED ช่วยให้สามารถคัดกรองผู้ป่วยที่มีภาวะพร่อง NAD+ และ NADH ได้เพื่อทำการแก้ไขและเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ในปัจจุบันมีการวิจัยอย่างต่อเนื่องและจริงจังเกี่ยวกับการมีส่วนร่วมของ NAD+ และ NADH ต่อกลไกและการลุกลามของโรคต่าง ๆ รายการของพยาธิวิทยาที่สงสัยว่ามีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ NAD+ และ NADH เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องด้วยหลักฐานที่มีการตีพิมพ์อยู่แล้วในโรคไมโทคอนเดรีย การเสื่อมสภาพตามอายุ ภาวะพิษเหตุติดเชื้อ การติดเชื้อไวรัส โรคระบบหัวใจและหลอดเลือดและโรคไต โรคเบาหวานชนิดที่ 1 และ 2 ความผิดปกติทางระบบประสาท และโรคมะเร็ง

หลักการตรวจวิเคราะห์

หลักการตรวจวิเคราะห์ คือปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เป็นวงรอบ ด้วยการตรวจจับจุดยุติแบบการวัดสี ขั้นตอนแรก เมทาบอไลท์ของ NAD+ และ NADH จะถูกสกัดออกจากตัวอย่างเลือดในขั้นตอนเดียว จากนั้น สารสกัดนี้จะถูกแบ่งออกเป็นสองส่วน ในส่วนแรก จะมีการทำให้ NAD+ คงตัวและแยก NADH ออก ในส่วนที่สอง จะมีการทำให้ NADH คงตัวและแยก NAD+ ออก จากนั้น จะมีการวิเคราะห์เมทาบอไลท์ของ NAD+ และ NADH บนจานหลุมสองชิ้นที่แยกจากกันโดยใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ร่วมกับการเปลี่ยนของสี ความเข้มข้นของสีที่เปลี่ยนแปลงในการตรวจวิเคราะห์นี้เป็นสัดส่วนเชิงเส้นกับความเข้มข้นของ NAD+ หรือ NADH ในส่วนผสมของปฏิกิริยา

สารทำปฏิกิริยาที่จัดเตรียมไว้ให้

สารทำปฏิกิริยา	คำอธิบาย*	ก่อนการตรวจวิเคราะห์
บัฟเฟอร์ A	บัฟเฟอร์สำหรับสกัด 28 มล.	ปรับให้สมดุลกับอุณหภูมิห้อง (15–25°C)
สารที่ทำให้ NAD+ คงตัว	สารละลายบัฟเฟอร์ 8 มล. สำหรับการวัด NAD+	ปรับให้สมดุลกับอุณหภูมิห้อง (15–25°C)
สารที่ทำให้ NADH คงตัว	สารละลายบัฟเฟอร์ 8 มล. สำหรับการวัด NADH	ปรับให้สมดุลกับอุณหภูมิห้อง (15–25°C)
สต็อกสารมาตรฐานของ NAD+	NAD+ เข้มข้น 1 mM ปริมาณ 40 ไมโครลิตร จำนวน 1 หลอดไมโครทิวป์	โปรดดูคู่มือการเตรียมสาร
สต็อกสารมาตรฐานของ NADH	NADH เข้มข้น 1 mM ปริมาณ 40 ไมโครลิตร จำนวน 1 หลอดไมโครทิวป์	โปรดดูคู่มือการเตรียมสาร
บัฟเฟอร์ C	บัฟเฟอร์สำหรับการตรวจวิเคราะห์ 19 มล. จำนวน 2 ขวด	ปรับให้สมดุลกับอุณหภูมิห้อง (15–25°C)
สารทำปฏิกิริยาของสีจากการตรวจวิเคราะห์	สารทำปฏิกิริยากับสีจากการตรวจวิเคราะห์ 3 มล. จำนวน 2 ขวด	ปรับให้สมดุลกับอุณหภูมิห้อง (15–25°C) ควรใช้ภายใน 2 ชม. หลังการปรับสมดุล
เอนไซม์	เอนไซม์ปริมาณ 40 ไมโครลิตร จำนวน 2 หลอดไมโครทิวป์ หนึ่งหลอดต่อหนึ่งจานหลุม	ละลายก่อนเติมลงในส่วนผสมหลักเท่านั้น
สารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยา	สารละลาย 3 มล. เพื่อหยุดการทำปฏิกิริยาของการตรวจวิเคราะห์	ปรับให้สมดุลกับอุณหภูมิห้อง (15–25°C)
สารควบคุมเชิงบวก (บัฟเฟอร์)	บัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตร จำนวน 1 หลอดไมโครทิวป์สำหรับการเตรียมสารควบคุมเชิงบวก	ปรับให้สมดุลกับอุณหภูมิห้อง (15–25°C) โปรดดูคู่มือการเตรียมสาร

*หมายเหตุ: ปริมาตรสารที่เติมสามารถแปรผันได้ที่ 5%

ข้อควรระวังและคำเตือน

ความปลอดภัย

สำหรับการใช้เพื่อการวินิจฉัยภายนอกร่างกายเท่านั้น สำหรับการใช้โดยบุคลากรที่ผ่านการฝึกอบรมเท่านั้น

สารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยาอาจทำให้เกิดการระคายเคืองที่ผิวหนัง ดวงตา และระบบหายใจ

หลีกเลี่ยงการสูดดมไอระเหย สารทำปฏิกิริยาของสีจากการตรวจวิเคราะห์อาจทำให้เกิดการระคาย

เคืองที่ผิวหนัง สวมถุงมือและจัดการด้วยความระมัดระวัง

บัฟเฟอร์ A อาจทำให้เกิดการระคายเคืองที่ดวงตา สวมแว่นตานิรภัยและจัดการด้วยความระมัดระวัง

อย่าสูบบุหรี่ ดื่ม รับประทาน หรือใช้เครื่องสำอางในพื้นที่ทำงาน สวมถุงมือป้องกัน เสื้อผ้าป้องกัน และอุปกรณ์ป้องกันดวงตา ล้างมือให้สะอาดหลังจากใช้งานเสร็จสิ้น

เอกสารข้อมูลความปลอดภัย (SDS) ของ Q-NADMED ระบุถึงอันตรายของสารเคมีต่าง ๆ ในชุดอุปกรณ์นี้ รวมถึงข้อมูลคำเตือนที่เหมาะสมเกี่ยวกับอันตรายดังกล่าว

เอกสารข้อมูลความปลอดภัย (SDS) ของ Q-NADMED อธิบายถึงการกำจัดส่วนประกอบในชุดอุปกรณ์ที่ใช้แล้ว

การเก็บรักษาและวันหมดอายุของสารทำปฏิกิริยา

- ก่อนเปิด ควรเก็บรักษาส่วนประกอบทั้งหมดของชุดอุปกรณ์ไว้ที่ -80°C หลีกเลี่ยงความผันผวนของอุณหภูมิในช่องแช่แข็ง
- หลังการละลาย บัฟเฟอร์ A สารทำปฏิกิริยาที่เพิ่มความคงตัวของ NAD+ และ NADH สารควบคุมเชิงบวก (บัฟเฟอร์) และสารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยาจะคงตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาสองสัปดาห์
- บัฟเฟอร์ C ควรจะละลายและใช้ในวันที่ทำการตรวจวิเคราะห์
- สารทำปฏิกิริยาของสีจากการตรวจวิเคราะห์มีความคงตัวสูงถึง 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหลังการละลาย
- ควรใช้เอนไซม์โดยทันทีหลังการละลาย
- ควรจัดเตรียมสารควบคุมเชิงบวกและสารมาตรฐานและใช้ในวันที่ทำการตรวจวิเคราะห์
- ควรป้องกันสารมาตรฐานไม่ให้สัมผัสกับแสง

วัสดุอื่น ๆ ที่จำเป็น

วัสดุต่อไปนี้จำเป็นต้องใช้ แต่ไม่ได้จัดเตรียมไว้ให้ในชุดอุปกรณ์:

- น้ำปราศจากไอออน (น้ำมิลลิคิวจากระบบทำน้ำให้บริสุทธิ์หรือน้ำปราศจากไอออนที่มีจำหน่ายทั่วไป เช่น Sigma cat #38796)
- หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มล. สำหรับการจัดเตรียมตัวอย่าง การสกัด การทำให้คงตัว และการจัดเตรียมสารมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ข้อกำหนดด้านวัสดุของหลอดไมโครทิวบ์: ใช้หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Microcentrifuge) พื้นฐานที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งทำจากโพลีโพรพีลีน (PP) แบบโปร่งใส/สีตามธรรมชาติสำหรับการวินิจฉัยภายนอกร่างกาย (เช่น Sarstedt Ref 72.690.001) ห้ามใช้หลอดไมโครทิวป์สำหรับอณูชีววิทยาที่มีป้ายกำกับว่าปลอดเชื้อ (ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี) ปราศจากเอนโดทอกซิน ไพโรเจน DNA ของมนุษย์ และมีการตกค้างต่ำ ห้ามใช้หลอดไมโครทิวป์ที่มีไว้สำหรับทำงานกับโปรตีนที่มีป้ายกำกับว่า LoBind
- อ่างเก็บปีเปตต์พลาสติกแบบหลายช่องจำนวนสองชิ้น (จากโพลีสไตรีนที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ) ชิ้นหนึ่งสำหรับการปีเปตต์ส่วนผสมหลัก และอีกชิ้นสำหรับการปีเปตต์สารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยา
- จานหลุมไมโครเพลทโพลีสไตรีนโปร่งใสแบบ 96 หลุมที่มีสัมพรรคภาพการจับกับโปรตีนระดับปานกลางจำนวนสองชิ้น สำหรับการตรวจวัดสีและการดูดกลืนแสง
- เครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองแบบแห้ง (เครื่องให้ความร้อนหลอดทดลอง) ปรับอุณหภูมิได้ (สูงถึง 80°C)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสารละลายปริมาตรน้อย (Microcentrifuge) เพื่อระบายความร้อนแบบวางบนโต๊ะ (ความเร็วสูงสุด 20,000 x g)
- อ่างน้ำแข็ง (แพ็คน้ำแข็งเติมน้ำประปาจนเหลวละลายพอที่จะสามารถยึดหลอดไมโครทิวป์ที่ใส่ไว้อย่างแน่นหนา เพื่อป้องกันไม่ให้หลอดลอย)
- ปีเปตต์แบบช่องเดียวที่ปรับเทียบแล้ว (0.5–10 ไมโครลิตร, 5–50 ไมโครลิตร, 20–200 ไมโครลิตร, 100–1000 ไมโครลิตร) และปีเปตต์แบบหลายช่อง (5–50 ไมโครลิตร, 30–300 ไมโครลิตร) และปีเปตต์แบบเอียงที่มีการกักเก็บต่ำ
- เครื่องอ่านไมโครเพลทแบบสเปกโตรโฟโตเมตริกที่สามารถวัดการดูดกลืนแสงที่ 570–573 นาโนเมตรได้
- อลูมิเนียมฟอยล์เพื่อปกป้องหลอดไมโครทิวป์และจานหลุมจากแสง

การเตรียมสารทำปฏิกิริยา

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดสำหรับการตรวจวิเคราะห์ NAD+ และ/หรือ NADH ตามคำแนะนำในตารางที่หน้า 5 ก่อนการตรวจวิเคราะห์

A. :บัฟเฟอร์ A: พร้อมใช้
B. สารที่ทำให้ NAD+ คงตัว: พร้อมใช้
C. สารที่ทำให้ NADH คงตัว: พร้อมใช้
D. เอนไซม์: พร้อมใช้
E. สารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยา: พร้อมใช้ หากหลังจากละลายแล้วเกิดการตกตะกอนในสารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยา ควรทำละลายซ้ำด้วยการบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นที่ 25°C ก่อนใช้งาน อย่าเขย่าสารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยาอย่างแรง
F. สารควบคุมเชิงบวก (บัฟเฟอร์): พร้อมใช้ (สำหรับคำแนะนำเพิ่มเติม โปรดดูการเตรียมสารควบคุมเชิงบวก)
G. สต็อกสารมาตรฐานของ NAD+ 50 µM: เติม 25 ไมโครลิตรของสต็อกสารมาตรฐาน NAD+1 mM (ที่ให้ไว้) ลงในน้ำปราศจากไอออน 475 ไมโครลิตร แล้ววอร์เท็กซ์ (Vortex) ป้องกันไม่ให้โดนแสง (สำหรับคำแนะนำเพิ่มเติม โปรดดูการเตรียมสารมาตรฐานและการเตรียมสารควบคุมเชิงบวก)
H. สต็อกสารมาตรฐานของ NADH 10 µM: เติม 10 ไมโครลิตรของสต็อกสารมาตรฐานNADH+1 mM (ที่ให้ไว้) ลงในน้ำปราศจากไอออน 990 ไมโครลิตร แล้ววอร์เท็กซ์ ป้องกันไม่ให้โดนแสง (สำหรับคำแนะนำเพิ่มเติม โปรดดูการเตรียมสารมาตรฐานและการเตรียมสารควบคุมเชิงบวก)
I. ส่วนผสมหลัก: ควรผสมสารทำปฏิกิริยาของสีจากการตรวจวิเคราะห์ 1 ขวด (3 มล.) ลงในบัฟเฟอร์ C 1 ขวด เพื่อให้ได้ส่วนผสมหลัก 1 ขวดที่จำเป็นสำหรับการตรวจวิเคราะห์ NAD+ หรือ NADH จำนวน 1 จานหลุม ป้องกันไม่ให้โดนแสงโดยการเก็บรักษาไว้ในขวดสีอำพันเดิม ห้ามเขย่าแรง ทิ้งส่วนที่เหลือ ห้ามนำไปแช่แข็งซ้ำ

การเก็บตัวอย่างและการเก็บรักษา

ชุดอุปกรณ์นี้ใช้สำหรับการวิเคราะห์โลหิตรวม เลือดจากหลอดเลือดดำที่เก็บตัวอย่างโดยการเจาะหลอดเลือดดำ และเลือดส่วนปลายที่เก็บตัวอย่างโดยอุปกรณ์เก็บตัวอย่างเลือดแบบมีใบมีด เป็นประเภทตัวอย่างที่เหมาะสม ควรเก็บตัวอย่างโลหิตรวมลงในหลอดเก็บตัวอย่างที่เคลือบพ่นด้วยลิเธียมเฮปารินหรือ K2 EDTA ที่เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด และผสมให้เข้ากันดีด้วยการหมุนหลอดขึ้นลงไปมา

ข้อกำหนดสำหรับหลอดเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (BD Vacutainer หรือ Vacuette): ใช้หลอดเก็บตัวอย่างเลือด K2 EDTA ที่เคลือบพ่น K2 EDTA ซึ่งทำให้ได้ความเข้มข้นของ K2 EDTA ที่ 1.2–2 มก. ต่อเลือดที่เก็บตัวอย่าง 1 มล. หรือหลอดเก็บตัวอย่างเลือดลิเธียมเฮปาริน (LH) ที่ประกอบด้วย LH เคลือบพ่น ทำให้ได้ LH ที่มีความเข้มข้น 17–18 IU ต่อเลือดที่เก็บตัวอย่าง 1 มล. การวิเคราะห์นี้จำเป็นต้องมีโลหิตรวมปริมาณเล็กน้อย ดังนั้น เราขอแนะนำให้ใช้หลอดเก็บตัวอย่างเลือดขนาดเล็ก เช่น 2-3 มล. การเก็บตัวอย่างเลือดในปริมาตรที่กำหนดในหลอดเก็บตัวอย่างเลือดมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อให้ได้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดในความเข้มข้นเป้าหมายที่กำหนดไว้ในตัวอย่างเลือด

ทั้งนี้ สามารถจะวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดได้ทั้งแบบสดใหม่หรือแช่แข็งก็ได้ เลือดสดจะสามารถวิเคราะห์ได้ภายใน 72 ชั่วโมง หากมีการเก็บรักษาอย่างต่อเนื่องที่ 4°–8°C หลังการเจาะเลือด เมื่อเลือดแยกชั้นในหลอดเก็บตัวอย่างแล้ว ให้ผสมตัวอย่างด้วยความระมัดระวังก่อนที่จะแบ่งส่วนเพื่อทำการสกัด ขั้นตอนนี้มีความสำคัญอย่างยิ่ง หากไม่สามารถวิเคราะห์เลือดแบบสดได้ เราขอแนะนำเป็นอย่างยิ่งให้แบ่งส่วนตัวอย่างภายใน 72 ชั่วโมงหลังการเจาะเลือด โดยแบ่งออกเป็นส่วนละ 150-200 ไมโครลิตรโดยใช้หลอดไมโครทิวป์โพรพิลีนโปร่งใสผนังเดียวที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อขนาด 0.5–2 มล. และแช่แข็งไว้ที่ -20°C หรือ - 80°C หลอดเก็บตัวอย่างแช่แข็งที่มีปริมาตรตัวอย่างมาก (เช่น > 2 มล.) หรือในหลอดไมโครทิวป์ที่มีผนังสองชั้นแบบมีกระโปรงจะเพิ่มเวลาในการแช่แข็ง และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง

ระยะเวลาการละลายก่อนการสกัด ซึ่งอาจทำให้ผลการวิเคราะห์มีความผันแปรสูง เวลาการเก็บรักษาสำหรับส่วนแบ่งขนาดเล็กคือหนึ่งเดือนที่อุณหภูมิ -20°C และประมาณหนึ่งปีที่ -80°C ชุดอุปกรณ์นี้จะวัดปริมาณ NAD ภายในเซลล์ ดังนั้น การผสมตัวอย่างที่สดใหม่แต่ละตัวอย่างอย่างเหมาะสมในขั้นตอนก่อนหน้า และในระหว่างการแบ่งส่วนจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อให้แน่ใจว่าส่วนแบ่งทั้งหมดมีเซลล์จำนวนเท่ากันโดยประมาณ ตัวอย่างเลือดที่แช่แข็งจะต้องได้รับการเก็บรักษาแบบแช่แข็งอย่างต่อเนื่องก่อนการตรวจวิเคราะห์ สำหรับการวิจัยทางคลินิก เราขอแนะนำเป็นอย่างยิ่งให้ใช้ช่วงเวลาเดียวกันระหว่างการเจาะเลือดและการแบ่งส่วน/การแช่แข็งสำหรับตัวอย่างทั้งหมดในการศึกษาวิจัย สำหรับการวัดปริมาณ NAD+ และ NADH จำเป็นต้องมีโลหิตรวมปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทั้งนี้ ตัวอย่างเลือดที่ละลายจากการแช่แข็งแล้วจะไม่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ได้อีก

ข้อควรพิจารณาในทางปฏิบัติ

- ห้ามใช้ส่วนประกอบของชุดอุปกรณ์หลังจากวันหมดอายุ
- อย่าผสมวัสดุจากชุดอุปกรณ์ในรุ่นการผลิตที่แตกต่างกัน ห้ามทำรอบการแช่แข็งและละลายอีก
- การตรวจวิเคราะห์นี้ไม่เหมาะสำหรับการวัดปริมาณ NAD+ และ NADH ในพลาสมาหรือซีรั่ม เซลล์ที่เพาะเลี้ยง หรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ (ของมนุษย์หรือสัตว์)
- ผสมสารทำปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากันโดยการค่อย ๆ หมุนวนหลอด ควรปั่นแยกหลอดไมโครทิวป์ขนาดเล็กอย่างรวดเร็วที่ความเร็วต่ำก่อนเปิดฝาออก
- สามารถใช้ตัวอย่างเลือดแบบสดใหม่และแบบแช่แข็งสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกัน (ผสมจนเข้ากันดี) จำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการวิเคราะห์
- เราขอแนะนำให้สกัดอย่างน้อยแปดตัวอย่างในคราวเดียว เพื่อลดเวลาในการจัดการ
- การวิเคราะห์ NAD+ และ NADH จะดำเนินการบนจานหลุม 2 ชิ้นที่แยกกัน เราขอแนะนำให้ดำเนินการตรวจวิเคราะห์ NAD+ และ NADH ในวันที่ทำการสกัด
- เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม ให้เปลี่ยนเป็นทิปปีเปตต์ใหม่ระหว่างการเติมสารมาตรฐาน ตัวอย่าง และสารทำปฏิกิริยาแต่ละชนิด นอกจากนี้ ให้ใช้อ่างเก็บแยกต่างหากสำหรับส่วนผสมหลักและสารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยา
- ปีเปตต์ที่มีความแม่นยำสูงและทิปแบบเอียงที่มีการกักเก็บน้อยกว่าจะเพิ่มความแม่นยำ
- สารทำปฏิกิริยาของสีจากการตรวจวิเคราะห์เป็นสารประกอบสีเหลืองที่ไวต่อแสงซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังจากทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ การสัมผัสกับแสงอาทิตย์หรือแสงไฟประดิษฐ์โดยตรงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของสีที่ไม่เฉพาะเจาะจงกลายเป็นสีเขียว เพื่อลดการรบกวนของแสงในการตรวจวิเคราะห์นี้ เราขอแนะนำให้ดำเนินการต่อไปนี้:
  - ปีเปตต์ส่วนผสมหลัก จากนั้นทำการปีเปตต์สารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยาลงในจานหลุมภายใต้ภาวะที่มีแสงธรรมชาติทางอ้อม (สภาวะแสงหรี่) เพื่อให้ได้สภาวะดังกล่าวนี้ ให้ปิดไฟประดิษฐ์ภายในอาคารและหลีกเลี่ยงการปีเปตต์ใกล้กับหน้าต่าง สำหรับแสงธรรมชาติทางอ้อม (แสงหรี่) เราหมายถึงปริมาณแสงไฟแวดล้อมที่บุคคลหนึ่งสามารถรับได้ขณะขับรถยนต์ใต้สะพานในวันที่มีเมฆมาก
  - ปิดจานหลุมแบบ 96 หลุมด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ในช่วงเวลาปฏิกิริยาหลังจากเติมส่วนผสมหลัก และในขณะที่เปลี่ยนถ่ายไปยังเครื่องอ่านเพลทหลังจากเติมสารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยา อย่าหุ้มจานหลุมด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ เนื่องจากมีความเสี่ยงที่จะปนเปื้อนและการปะปนกันของตัวอย่างในระหว่างการแกะวัสดุหุ้ม
  - เกณฑ์วิธีการวิจัยนี้ระบุถึงขั้นตอนที่จำเป็นสำหรับการทำงานภายใต้สภาวะแสงหรี่
- สารควบคุมเชิงบวกเป็นตัวอย่างเทียมที่มี NAD+ และ NADH บริสุทธิ์ในปริมาณที่ทราบ

- ข้อกำหนดทางเทคนิคสำหรับเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองแบบแห้ง (เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง):
    - ทดสอบประสิทธิภาพของการถ่ายโอนความร้อนในเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองแบบแห้งดังนี้:
    1. เติมน้ำ 250 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครทิวป์ที่มีขนาดพอดีกับเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองแบบแห้งที่ท่านกำลังใช้อยู่
    2. เสียบเทอร์โมมิเตอร์ห้องปฏิบัติการแบบดั้งเดิมลงในหลอดไมโครทิวป์ที่มีของเหลว และวางลงในเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองแบบแห้งที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 80°C
    3. ตรวจวัดเวลาที่จำเป็นในการเพิ่มอุณหภูมิของของเหลวเป็น 70°–75°C
    4. เวลาบ่มของเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองแบบแห้งทั้งหมดที่ระบุไว้ในเกณฑ์วิธีการวิจัยนี้กำหนดไว้สำหรับเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองแบบแห้งที่ปรับสมดุลเป็น 80°C ที่ทำให้น้ำ 250 ไมโครลิตรร้อนเป็น 75°C ในเวลา 2 นาที ระยะเวลานี้เพียงพอสำหรับการทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อให้ได้อุณหภูมิ 70°–75°C ในสารละลายหลังการบ่มในเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองแบบแห้ง
- ข้อกำหนดทางเทคนิคสำหรับเครื่องอ่านเพลทแบบสเปกโตรโฟโตเมตริก
    1. การตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ 570–573 นาโนเมตร
    2. ตัวเลือกในการปรับความสว่าง/ความเข้มข้นของแสงในการสแกนเป็น ต่ำ ในเครื่องอ่านเพลทบางเครื่อง สามารถปรับความสว่างตามจำนวนแสงกระพริบต่อการวัดหนึ่งครั้ง ในกรณีหลัง ให้กำหนดจำนวนแสงกระพริบจาก 5 เป็น 10
- ส่วนผสมหลักและสารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยาจะมีสารซักฟอกเป็นส่วนประกอบ เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดฟองอากาศ ทำปิเปตต์ส่วนผสมหลักและสารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยาโดยการกดปิเปตต์ไปยังตำแหน่งหยุดแรก ใช้เข็มขนาดเล็กเจาะฟองอากาศใด ๆ ที่มีอยู่ในหลุมทิ้ง หลีกเลี่ยงการใช้ทิปปิเปตต์สัมผัสกับส่วนผสมในหลุม
- เราขอแนะนำให้ทำตามลำดับขั้นตอนต่อไปนี้:
    1. นำบัฟเฟอร์ A สารที่ทำให้ NAD+ คงตัว สารที่ทำให้ NADH คงตัว และสารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยามาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องในวันก่อนการตรวจวิเคราะห์ สารละลายเหล่านี้จะมีความคงตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาสองสัปดาห์
    2. เตรียมสารมาตรฐานและสารควบคุมเชิงบวกในวันที่ทำการตรวจวิเคราะห์
    3. ละลายขวดที่มีบัฟเฟอร์ C และสารทำปฏิกิริยาของสีจากการตรวจวิเคราะห์ จากนั้น นำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องในวันที่ทำการตรวจวิเคราะห์ การละลายสารในขวดเหล่านี้จะใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง ในช่วงเวลานี้ ให้สกัดตัวอย่างและจัดเตรียมส่วนแบ่งสองส่วนของตัวอย่างที่สกัดสำหรับทำการวัดปริมาณ NAD+ และ NADH แบบแยกกัน ดำเนินการตรวจวิเคราะห์ NAD+ และ NADH บนจานหลุมที่แยกจากกัน ครั้งละจานหลุม

การสกัด NAD+ และ NADH จากเลือด

หมายเหตุ: หัวข้อนี้ดำเนินการภายใต้สภาวะแสงปกติ

1. นำบัฟเฟอร์ A สารที่ทำให้ NAD+ คงตัว สารที่ทำให้ NADH คงตัว มาไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนการสกัด
2. ใช้ตัวอย่างเลือดแบบสดใหม่ที่ทำให้เย็นลงโดยวางบนน้ำแข็ง หรือละลายตัวอย่างเลือดที่แช่แข็งในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 12-15 นาทีก่อนการสกัด (เคล็ดลับ: ให้ใช้มืออุ่น ๆ จับหมุนไปเรื่อย ๆ ขณะทำการละลาย) เราขอแนะนำให้สกัดอย่างน้อย 8 ตัวอย่างในคราวเดียวกัน
3. ทำการปิเปตต์บัฟเฟอร์ A ปริมาณ 500 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มล.
4. ให้ความร้อนส่วนแบ่งของบัฟเฟอร์ A ในเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองแบบแห้งที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 75°–80°C เป็นเวลา 2–3 นาที (จนถึง 5 นาที) เก็บไว้ในเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองแบบแห้งจนถึงขั้นตอนที่ 6
5. ผสมตัวอย่างเลือดอย่างรวดเร็วด้วยการปิเปตต์ขึ้นและลงสองสามรอบพร้อมการหมุนทิปควบคู่ไปก่อนการสกัด โดยหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดฟอง
6. เติมเลือด 100 ไมโครลิตรในครั้งเดียวอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องลงในหลอดไมโครทิวป์พร้อมบัฟเฟอร์ A ที่ร้อนในเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองแบบแห้ง ผสมโดยทันทีด้วยการปิเปตต์ขึ้นและลงแบบเข้มข้นสองสามครั้งพร้อมกับการหมุนทิปควบคู่ไป เพื่อผสมตัวอย่างที่เย็นกับบัฟเฟอร์ A ที่ร้อนอย่างมีประสิทธิภาพ
7. บ่มให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิ 75°–80°C เป็นเวลา 1 นาที
8. ทำให้ส่วนผสมเย็นลงในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที หลังจากทำให้เย็นตัวบนน้ำแข็งแล้ว สารที่เป็นเนื้อเดียวกันนี้ควรรวมตัวโดยไม่มีของเหลวอิสระใด ๆ
9. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C โอนถ่ายส่วนลอยเหนือตะกอนลงในหลอดไมโครทิวป์ที่สะอาด แล้วกำจัดตะกอนทิ้งไป เก็บสารสกัดทั้งหมดที่ได้ (ส่วนเหนือตะกอน) ที่มี NAD+ และ NADH ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ปิดด้วยฝาฟอยล์จนกว่าจะถึงขั้นตอนต่อไป ดำเนินการต่อจากขั้นตอนที่ 2 ถึงขั้นตอนที่ 9 ด้วยชุดถัดไปจำนวน 8 ตัวอย่าง ตราบเท่าที่คุณมีตัวอย่างที่จะสกัดออกมา เมื่อสกัดตัวอย่างทั้งหมดแล้ว ให้ดำเนินการต่อในขั้นตอน*ทางเลือก:* ส่วนเหนือตะกอนสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ ในกรณีนี้ ให้ทำละลายที่อุณหภูมิห้อง
เป็นเวลา 10 นาทีก่อนเตรียมส่วนแบ่งในขั้นตอนที่ 10
10. เตรียมส่วนแบ่งสองส่วนแยกจากสารสกัดที่ได้ลงในหลอดไมโครทิวป์ที่สะอาด: 150 ไมโครลิตร / หลอด
11. สำหรับส่วนแบ่งแรกที่ขนาด 150 ไมโครลิตร ให้เติมสารทำให้ NAD+ คงตัว ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงไป เพื่อให้ได้สารสกัดที่คงตัวซึ่งมี NAD+ (เก็บ NAD+ ไว้และแยก NADH ออก) เวอร์เท็กซ์และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หากไม่ทำการตรวจวิเคราะห์ทันที ให้แช่เย็นสารสกัดที่คงตัวจนกว่าจะทำการตรวจวิเคราะห์ ปกป้องจากแสงโดยการคลุมด้วยฝาปิดอลูมิเนียมฟอยล์
12. สำหรับส่วนแบ่งที่สองที่ขนาด 150 ไมโครลิตร ให้เติมสารทำให้ NADH คงตัว ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงไป เพื่อให้ได้สารสกัดที่คงตัวซึ่งมี NADH (เก็บ NADH ไว้และแยก NAD+ ออก) เวอร์เท็กซ์และบ่มเป็นเวลา 2 นาทีในเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองแบบแห้งที่ตั้งอุณหภูมิเป็น 80°C จากนั้น ทำให้เย็นลงโดยวางบนน้ำแข็ง 5 นาที หากไม่ทำการตรวจวิเคราะห์ทันที ให้แช่เย็นสารสกัดที่มีความคงตัวจนกว่าจะทำการตรวจวิเคราะห์ ปกป้องจากแสงโดยการคลุมด้วยฝาปิดอลูมิเนียมฟอยล์

หมายเหตุ: การเจือจางขั้นสุดท้ายของตัวอย่างโลหิตรวมเดิมจะเท่ากับ 10 เท่า

หมายเหตุ: ในกรณีที่มีการเสริมด้วยสารตั้งต้นของ NAD ในแต่ละตัวอย่าง ระดับของ NAD+ ในเลือดอาจเพิ่มขึ้น ดังนั้น จึงควรทำการเจือจางสารสกัดที่ทำให้คงตัวของ NAD+ (สองเท่า) โดยใช้น้ำ

ปราศจากไอออนก่อนการตรวจวิเคราะห์ ในกรณีนี้ การเจือจางตัวอย่างเลือดเดิมจะเท่ากับ 20 เท่าสำหรับ NAD+ สารสกัดที่ทำให้คงตัวของ NADH ไม่จำเป็นต้องทำการเจือจาง

การเตรียมสารมาตรฐาน

หมายเหตุ: หัวข้อนี้ดำเนินการภายใต้สภาวะแสงปกติ

1. ให้เตรียมสารมาตรฐานในวันที่ทำการตรวจวิเคราะห์ ละลายหลอดไมโครทิวป์ด้วยสต็อกสารมาตรฐาน 1 mM เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ปกป้องให้พ้นจากแสงด้วยฝาปิดฟอยล์ในระหว่างการทำละลาย
2. เตรียมสต็อกสารมาตรฐานของ NAD+ 50 μM โดยการเติมสต็อกสารมาตรฐานของ NAD+1 mM (ที่ให้ไว้) 25 ไมโครลิตร ลงในน้ำปราศจากไอออน 475 ไมโครลิตร แล้ววอร์เท็กซ์ สต็อกนี้ใช้ในการจัดเตรียมสารมาตรฐาน NAD+ และสารควบคุมเชิงบวก
3. เตรียมสารมาตรฐาน NAD+ ตามสูตรด้านล่างโดยการผสมสารทำปฏิกิริยาในปริมาตรที่ระบุตามลำดับต่อไปนี้: น้ำปราศจากไอออน, สต็อกของ NAD+ 50 μM, บัฟเฟอร์ A และสารทำให้ NAD+ คงตัว ปริมาตรสุดท้ายของสารมาตรฐานแต่ละหลอดเท่ากับ 1 มล. (เคล็ดลับ: ใช้ปิเปตต์ 20 – 200 ไมโครลิตรแบบอันเดียวกันนี้ทำการปิเปตต์สต็อกของ NAD+50 μM และน้ำ)

จำนวนสารมาตรฐาน	ความเข้มข้นของ NAD+ (μM)	การเตรียมสารมาตรฐาน			
		NAD+ 50 μM สต็อก (μL)	dH_2O (μL)	บัฟเฟอร์ A (μL)	สารทำให้ NAD+ คงตัว (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. เตรียมสต็อกของ NADH 10 μM โดยการเติมสต็อกสารมาตรฐานของ NADH 1 mM (ที่ให้ไว้) 10 ไมโครลิตร ลงในน้ำปราศจากไอออน 990 ไมโครลิตร แล้ววอร์เท็กซ์ สต็อกนี้ใช้ในการจัดเตรียมสารมาตรฐาน NADH และสารควบคุมเชิงบวก
5. เตรียม สารมาตรฐาน NADH ตามสูตรด้านล่างโดยการผสมสารทำปฏิกิริยาในปริมาตรที่ระบุตามลำดับต่อไปนี้: น้ำปราศจากไอออน, สต็อกของ NADH 10 μM, บัฟเฟอร์ A และสารที่ทำให้ NADH คงตัว ปริมาตรสุดท้ายของสารมาตรฐานแต่ละหลอดเท่ากับ 1 มล. (เคล็ดลับ: ใช้ปิเปตต์ 20 – 200 ไมโครลิตรแบบอันเดียวกันนี้ทำการปิเปตต์สต็อกของ NADH 10 μM และน้ำ)

จำนวนสารมาตรฐาน	ความเข้มข้นของ NADH (μM)	การเตรียมสารมาตรฐาน			
		NADH 10 μM สต็อก (μL)	dH_2O (μL)	บัฟเฟอร์ A (μL)	สารทำให้ NADH คงตัว (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. ปิดคลุมขาตั้งที่มีสารมาตรฐานที่พร้อมใช้งานด้วยฝาปิดอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสง และเก็บในตู้เย็นก่อนที่จะทำการปิเปตต์บนจานหลุม

การเตรียมสารควบคุมเชิงบวก

หมายเหตุ: หัวข้อนี้ดำเนินการภายใต้สภาวะแสงปกติ

สารควบคุมเชิงบวกจะเตรียมไว้ก่อนการตรวจวิเคราะห์โดยการผสมปริมาณ NAD+ และสารมาตรฐาน NADH ที่ทราบกับบัฟเฟอร์ของสารควบคุมเชิงบวก (ที่ให้ไว้) ปริมาตรของสารควบคุมเชิงบวกและความเข้มข้นของสารเมทาบอไลท์ NAD จะจำลองตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี สารควบคุมเชิงบวกที่เตรียมไว้จะดำเนินการตามขั้นตอนการทำให้คงตัวและการสกัดแบบเดียวกันกับตัวอย่างโลหิตรวม

1. ละลายหลอดไมโครทิวป์ที่มีสารควบคุมเชิงบวก (บัฟเฟอร์) เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
2. ในการเตรียมสารควบคุมเชิงบวก ให้เติมบัฟเฟอร์ของสารควบคุมเชิงบวกปริมาตร 45 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครทิวป์
3. เติมสต็อกของ NAD+ 50 μM 75 ไมโครลิตรลงไป (สำหรับการเตรียม ดูหน้า 11) และเติมสต็อกของ NADH 10 μM 30 ไมโครลิตร (สำหรับการเตรียม ดูหน้า 11) ลงในบัฟเฟอร์ของสารควบคุมเชิงบวกแล้ววอร์เท็กซ์ ความเข้มข้นที่คาดหวังของ NAD+ ในสารควบคุมเชิงบวกเท่ากับ 25 ± 2 μM และ NADH เท่ากับ 2 ± 0.3 μM
4. สารควบคุมเชิงบวกไม่มีโปรตีน ดังนั้น จึงสามารถสกัดด้วยบัฟเฟอร์ A ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารควบคุมเชิงบวกที่เตรียมไว้ 100 ไมโครลิตรลงในบัฟเฟอร์ A 500 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิห้องเพื่อสร้าง "สารสกัด" ของสารควบคุมเชิงบวก วอร์เท็กซ์ และดำเนินการในขั้นตอนที่ 5
5. เตรียมส่วนแบ่งที่แยกจากกันสองส่วนของสารควบคุมเชิงบวกที่ "สกัด" ออกมา (จากขั้นตอนที่ 4) ลงในหลอดไมโครทิวป์ที่สะอาด: 150 ไมโครลิตร / หลอด
6. <u>สำหรับส่วนแบ่งที่หนึ่ง)ปริมาตร 150 ไมโครลิตร</u> เติมสารทำให้ NAD+ คงตัว ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไป วอร์เท็กซ์ และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นรักษาความเย็นและคลุมด้วยฟอยล์จนกว่าจะตรวจวิเคราะห์ ส่วนแบ่งของสารควบคุมเชิงบวกที่คงตัวนี้จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์ NAD+
7. <u>สำหรับส่วนแบ่งที่สองปริมาตร 150 ไมโครลิตร</u> เติมสารที่ทำให้ NADH คงตัว100 ไมโครลิตรลงไป แล้ววอร์เท็กซ์ ให้ความร้อนสารละลายนี้ที่อุณหภูมิ 75°–80°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น ทำให้เย็นลงโดยวางบนน้ำแข็ง แล้วรักษาความเย็นและคลุมด้วยฟอยล์จนกว่าจะตรวจวิเคราะห์ ส่วนแบ่งของสารควบคุมเชิงบวกที่คงตัวนี้จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์ NADH

หมายเหตุ: การเจือจางขั้นสุดท้ายของสารควบคุมเชิงบวกจะเท่ากับ 10 เท่า

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

หมายเหตุ:

- ขั้นตอนที่ 1–3 ดำเนินการภายใต้สภาวะแสงปกติ
- ขั้นตอนที่ 4–9 ดำเนินการในสภาวะแสงหรี่ (เมื่อปิดแสงไฟประดิษฐ์โดยตรง)
- การตรวจวิเคราะห์ทั้งหมดจะมีตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลย (Sample blank) เพื่อแก้ไขสัญญาณพื้นหลังใด ๆ ทั้งหมด ตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลยจะเตรียมไว้จากสารสกัดตัวอย่างที่มีความคงตัวสี่รายการ (กล่าวคือ BL UNK1–4 ของตัวอย่าง 1–4) เพื่อแก้ไขปฏิกิริยาที่ไม่เฉพาะเจาะจงระหว่างส่วนประกอบของสารสกัดต่าง ๆ และสารทำปฏิกิริยาของสีจากการตรวจวิเคราะห์ในส่วนผสมหลัก สารควบคุมเชิงบวกไม่จำเป็นต้องมีแบลงค์ (Blank) แยกจากกัน
- หากมีการวิเคราะห์เลือดของอาสาสมัครที่ดำเนินการเสริมสารตั้งต้นของ NAD+ ตัวอย่างเหล่านี้จำเป็นต้องมีหลุมอย่างน้อยสองหลุมที่มีตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลยสำหรับประเภทตัวอย่างนี้ หากจะวิเคราะห์ตัวอย่างของอาสาสมัครที่มีและไม่มีการดำเนินการเสริมบนจานหลุมเดียวกัน เราขอแนะนำให้เตรียมหลุมสองหลุมของตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลยต่อสภาวะ สำหรับส่วนนี้ ให้เลือกสารสกัดที่คงตัวแล้วสองรายการแบบสุ่มจากอาสาสมัครที่มีการดำเนินการเสริม และสองรายการจากอาสาสมัครที่ไม่มีการดำเนินการเสริม ใช้สารสกัดเหล่านี้ในการจัดเตรียมตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลย: สองหลุมต่อสภาวะ
- <u>ตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลยทั้งหมด</u>จะถูกบ่มด้วยส่วนผสมหลัก<u>โดยไม่จำเป็น</u>ต้องเติมเอนไซม์
- ควรละลายเอนไซม์ในทันทีก่อนที่จะเติมส่วนผสมหลัก ปั่นแยกหลอดไมโครทิวป์ด้วยเอนไซม์ระยะสั้น ๆ ที่ความเร็วต่ำก่อนเปิดฝาหลอด

ขั้นตอน:

1. บ่มสารมาตรฐานที่พร้อมใช้ สารสกัดตัวอย่างที่คงตัวแล้ว และสารควบคุมเชิงบวกที่คงตัวแล้วเป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้องก่อนทำปิเปตต์ลงในจานหลุม
2. ทำปิเปตต์ 20 ไมโครลิตรของสารมาตรฐาน NAD+ หรือ NADH ที่ซ้ำกันแต่ละรายการโดยเริ่มต้นจาก ST1 (0 μM) ตามแผนผังจานหลุมในหน้า 23
3. ทำปิเปตต์สารควบคุมเชิงบวกที่คงตัวแล้ว 20 ไมโครลิตร และสารสกัดจากตัวอย่างที่คงตัวแล้วที่ซ้ำกัน (ดูแผนผังในหน้า 23) สำหรับสารสกัดของตัวอย่างที่คงตัวแล้วสี่รายการแรก ให้ทำปิเปตต์ซ้ำพิเศษอีกหนึ่งครั้งไปยังหลุมที่ระบุไว้ (BL UNK1–4) ตามแผนผังในหน้า 23 หลุมทั้งสี่นี้เป็นตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลยที่จำเป็นสำหรับการวิเคราะห์โดยไม่มีเอนไซม์สำหรับแก้ไขปฏิกิริยาที่ไม่เฉพาะเจาะจงระหว่างสารสกัดกับสารทำปฏิกิริยาของสีจากการตรวจวิเคราะห์ภายในส่วนผสมหลัก
4. จากขั้นตอนนี้เป็นต้นไป ให้ทำในสภาวะที่มีแสงหรี่ เตรียมส่วนผสมหลักโดยการเติมสารทำปฏิกิริยาของสีจากการตรวจวิเคราะห์ลงในบัฟเฟอร์ C ค่อย ๆ ผสมเข้าด้วยกันโดยการหมุน
5. เติม<u>ส่วนผสมหลักที่ไม่มีเอนไซม์</u> 190 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมของตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลยทั้งสี่ (BL UNK1- 4)
6. เติมเอนไซม์ 40 ไมโครลิตรลงในขวดที่มีส่วนผสมหลักซึ่งเหลืออยู่ ค่อย ๆ ผสมเข้าด้วยกัน และหลีกเลี่ยงอย่าให้เกิดฟอง เทส่วนผสมหลักที่เติมเอนไซม์แล้วลงในอ่างเก็บ ปกป้องส่วนผสมหลักในอ่างเก็บในระหว่างการทำปิเปตต์โดยใช้ฝาปิดอลูมิเนียมฟอยล์ (โปรดดูคำแนะนำเพิ่มเติมในวิดีโอแนะนำของเราที่ www.nadmed.com)
7. เติม<u>ส่วนผสมหลักที่เติมเอนไซม์แล้ว</u> 190 ไมโครลิตรไปยังหลุมที่เหลืออยู่ทั้งหมด ซึ่งรวมถึงสารควบคุมเชิงบวกที่คงตัวแล้วโดยใช้ปิเปตต์แบบหลายช่อง หลีกเลี่ยงการเกิดฟองและการสัมผัสกับแสงโดยตรง ปิดคลุมจานหลุมที่พร้อมใช้ด้วยฝาปิดอลูมิเนียมฟอยล์ทันที
8. สำหรับการตรวจวิเคราะห์ NAD+: บ่มจานหลุมที่ปิดคลุมไว้เป็นเวลา 4-6 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับการตรวจวิเคราะห์ NADH: บ่มจานหลุมที่ปิดคลุมไว้เป็นเวลา 6-10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ: ปฏิกิริยาสามารถหยุดได้เมื่อมีการไล่ระดับสีที่ชัดเจนในสารมาตรฐาน และความแตกต่างในความเข้มของสีระหว่างตัวอย่างที่มีการเติมเอนไซม์และตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลย ยิ่งเวลาการเกิดปฏิกิริยานานขึ้น สัญญาณก็จะยิ่งเข้มมากขึ้นเท่านั้น ความเข้มของสีในการตรวจวิเคราะห์ NADH จะต่ำกว่าใน NAD+ เนื่องจากความเข้มข้นของ NADH ต่ำกว่า NAD+ ในเลือดมาก ดังนั้น ช่วงสารมาตรฐาน NADH จึงมีตั้งแต่ 0 ถึง 1 μM ในขณะที่ช่วงสารมาตรฐาน NAD+ มีตั้งแต่ 0 ถึง 5 μM

9. หยุดการเกิดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมตามลำดับเดียวกันกับส่วนผสมหลักโดยใช้ปิเปตต์แบบหลายช่อง หลีกเลี่ยงการเกิดฟองโดยค่อย ๆ เขย่าจานหลุมด้วยมือบนพื้นผิวโต๊ะ และกำจัดฟองอากาศ

10. ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ 573 นาโนเมตรทันทีหลังจากเติมสารละลายสำหรับการหยุดปฏิกิริยา หากเป็นไปได้ ให้เขย่าจานหลุมภายในเครื่องอ่านไมโครเพลทเป็นเวลา 5 วินาทีก่อนการตรวจวัด หมายเหตุ: หลังจากเติมสารละลายสำหรับหยุดปฏิกิริยา ความเข้มของสีอาจค่อย ๆ เพิ่มอย่างสม่ำเสมอในหลุมทั้งหมด ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากกระบวนการพื้นหลังที่ไม่ใช่เอนไซม์ในส่วนผสมหลัก

การคำนวณผลลัพธ์

1. คำนวณค่าเฉลี่ยของค่าการอ่านการดูดกลืนแสงในสารมาตรฐานแต่ละรายการ (ST1–ST5) สร้างเส้นโค้งมาตรฐานโดยการพลอตค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงในสารมาตรฐานแต่ละรายการบนแกน y เทียบกับความเข้มข้น (ในหน่วย μM) บนแกน x และดำเนินการปรับการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่ายของเส้นโค้งมาตรฐาน
2. หาความเข้มข้นของสารเมทาบอไลท์แต่ละชนิดในแต่ละหลุมโดยใช้สูตรการถดถอยเชิงเส้นของเส้นโค้งมาตรฐาน
3. คำนวณค่าเฉลี่ยของตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลยทั้งสี่หลุม (BL UNK1-4) ค่าที่ได้แสดงถึงสัญญาณที่ไม่เฉพาะเจาะจงของสารสกัดที่คงตัวแล้ว
4. คำนวณค่าเฉลี่ยของค่าซ้ำของสารสกัดตัวอย่างที่คงตัวแล้ว (UNK) แต่ละตัวอย่าง
5. คำนวณค่าเฉลี่ยของค่าที่ซ้ำกันของสารควบคุมเชิงบวกที่คงตัวแล้ว และคูณด้วย 10 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น (μM) ของ NAD+ และเมทาบอไลท์ของ NADH ในสารควบคุมเชิงบวก 150 μL ดั้งเดิม
6. แก้ไขความเข้มข้นที่ได้ในสารสกัดตัวอย่างที่คงที่แล้วด้วยค่าของตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลย (คำนวณในขั้นตอนที่ 3) และคูณด้วย 10 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น (μM) ของ NAD+ หรือเมทาบอไลท์ของ NADH ในตัวอย่างเลือดเดิม (ดูรายละเอียดในหน้า 16) หากสารสกัดที่คงตัวแล้วของ NAD+ ได้รับการเจือจางเพิ่มเติม ความเข้มข้นจะต้องคูณด้วยปัจจัยการเจือจางเพิ่มเติม

สารควบคุมเชิงบวก

สารควบคุมเชิงบวกมีเป้าหมายเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของขั้นตอนการคงตัว เมื่อเมทาบอไลท์ตัวใดตัวหนึ่งถูกแยกออกจากส่วนผสม ความเข้มข้นของ NAD+ ที่วัดได้ในสารควบคุมเชิงบวกคาดว่าจะอยู่ระหว่าง 23–27 μM ส่วนความเข้มข้นของ NADH คาดว่าจะอยู่ระหว่าง 1.7–2.3 μM

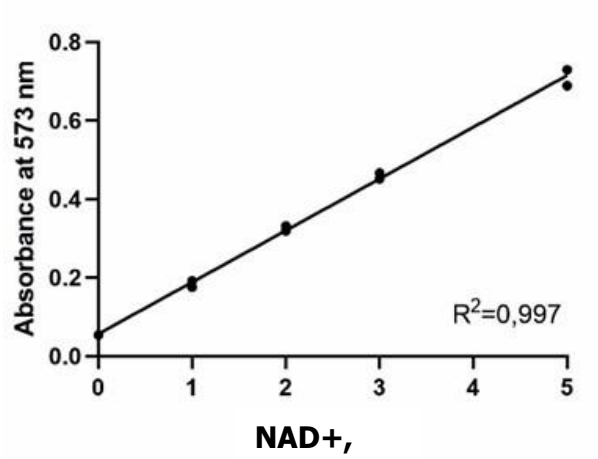
- ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุมเชิงบวกที่คงตัวแล้วบนจานหลุม NAD+ คาดว่าจะอยู่ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของ ST3 และ ST4
- ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุมเชิงบวกที่คงตัวแล้วบนจานหลุม NADH คาดว่าจะเท่ากับ ST2 โดยมีการแปรผันของหน่วยออปติคัล 0.05

ประสิทธิภาพและข้อจำกัด

A. ข้อมูลทั่วไป

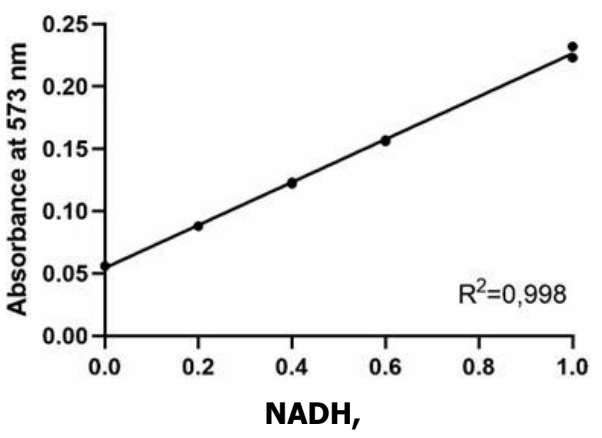
เส้นโค้งมาตรฐานและความเข้มข้นในสารสกัดตัวอย่างที่คงตัวแล้วมีไว้เพื่อการสาธิตเท่านั้น และไม่ควรใช้แทนเส้นโค้งการสอบเทียบแบบเรียลไทม์

เส้นโค้งมาตรฐานสำหรับ NAD+



มาตรฐาน	NAD+ (μM)	การดูดกลืนแสง (573 นาโนเมตร) เวลาการตรวจวิเคราะห์ - 4 นาที
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

เส้นโค้งมาตรฐานสำหรับ NADH



มาตรฐาน	NADH (μM)	การดูดกลืนแสง (573 นาโนเมตร) เวลาการตรวจวิเคราะห์ - 6 นาที
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

การคำนวณผลลัพธ์สำหรับ NAD+

ค่าความเข้มข้นในสารสกัดของตัวอย่างที่คงตัวแล้ว (UNK) และตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลย (BL UNK1–4) จะกำหนดจากสูตรเส้นตรงของเส้นโค้งมาตรฐาน NAD+

ไม่ทราบ	ความเข้มข้นในสารสกัดที่คงตัวแล้ว (µM)	ความเข้มข้นในสารสกัดที่คงตัวแล้วซึ่งแก้ไขโดยค่าเฉลี่ยของตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลย (BL UNK 1-4, µM)	ความเข้มข้นสุดท้ายของ NAD+ ในตัวอย่างดั้งเดิม (µM)*
UNK 1	2.944	3.008	30.08
	3.151		
UNK 2	2.841	2.945	29.45
	3.129		
UNK 3	2.686	2.668	26.68
	2.730		
UNK 4	1.895	1.907	19.07
	1.999		
UNK 5	2.346	2.343	23.43
	2.420		
UNK 6	3.432	3.425	34.25
	3.499		
BL UNK 1	0.040	-	
BL UNK 2	0.048		
BL UNK 3	0.026		
BL UNK 4	0.048		

*แก้ไขโดยปัจจัยการเจือจาง x10

การคำนวณผลลัพธ์สำหรับ NADH

ค่าความเข้มข้นในสารสกัดของตัวอย่างที่คงตัวแล้ว (UNK) และตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลย (BL UNK1–4) จะกำหนดจากสูตรเส้นตรงของเส้นโค้งมาตรฐาน NADH

ไม่ทราบ	ความเข้มข้น ในสารสกัดที่คงตัวแล้ว (µM)	ความเข้มข้นในสารสกัดที่คงตัวแล้วซึ่งแก้ไขโดยค่าเฉลี่ยของตัวอย่างแบลงค์ (BL UNK 1-4, µM)	ความเข้มข้นขั้นสุดท้ายของ NADH ตัวอย่างดั้งเดิม (µM)*
UNK 1	0.239	0.086	0.86
	0.239		
UNK 2	0.284	0.133	1.33
	0.290		
UNK 3	0.228	0.077	0.77
	0.234		
UNK 4	0.234	0.083	0.83
	0.239		
UNK 5	0.200	0.044	0.44
	0.195		
UNK 6	0.228	0.083	0.83
	0.245		
BL UNK 1	0.156	-	
BL UNK 2	0.161		
BL UNK 3	0.150		
BL UNK 4	0.150		

*แก้ไขโดยปัจจัยการเจือจาง x10

B. ข้อจำกัดการตรวจพบ

ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (Limit of Blank, LoB) สำหรับ Q-NADMED Blood แสดงในตารางด้านล่างนี้ (LoB ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน [Standard deviation, SD])

ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ	
	pmol/หลุม
NAD+	1.84 ± 0.9
NADH	2.10 ± 0.5

ข้อจำกัดการตรวจพบ (Limit of Detection, LoD) คำนวณจากเส้นโค้งมาตรฐาน NAD+ และ NADH และแสดงในตารางด้านล่างนี้ (LoD ± SD)

ข้อจำกัดการตรวจพบ	
	μM ในโลหิตรวม
NAD+	0.33 ± 0.2
NADH	0.19 ± 0.05

ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (Limit of Quantitation, LoQ) แสดงในตารางด้านล่างนี้ (LoQ ± SD)

ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้	
	μM ในโลหิตรวม
NAD+	0.66 ± 0.3
NADH	0.40 ± 0.1

C. ความแม่นยำและความสามารถในการทำซ้ำ

ความแปรผันในการตรวจวิเคราะห์ภายในสำหรับการตรวจวัดจะกำหนดความแม่นยำของประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ ตารางด้านล่างนี้แสดงถึงความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ภายใน (CV=Coefficient of variation (สัมประสิทธิ์ของการแปรผัน))

ความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ภายใน	
	CV (%) ± SD
NAD+	1.48 ± 0.8
NADH	3.33 ± 1.5

ตารางด้านล่างนี้สรุปผลลัพธ์ของความสามารถในการทำซ้ำการตรวจวิเคราะห์ (N=number (จำนวน), * ส่วนแบ่ง 3 ส่วนของตัวอย่างเดียวกันได้รับการวิเคราะห์สามครั้ง)

ความสามารถในการทำซ้ำ						
	NAD+			NADH		
ตัวอย่าง	Ctr1	Ctr2	Ctr3	Ctr1	Ctr2	Ctr3
จำนวนการตรวจวัด *	9	9	9	9	9	9
ค่าเฉลี่ย (μM)	27.41	29.41	22.00	0.55	0.71	0.64
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	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. ความถูกต้องแม่นยำ

ความถูกต้องแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์นี้คำนวณจากตัวอย่างที่มีจำนวนของ NAD+ และ NADH บริสุทธิ์ที่ทราบ ตารางด้านล่างนี้สรุปผลการตรวจวิเคราะห์ (ความถูกต้องแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ ± SD)

ความถูกต้องแม่นยำ (%)		
NAD+	N = 32	97.13 ± 7.6
NADH	N = 25	104.22 ± 16.5

E. เกณฑ์การตรวจวิเคราะห์

ค่าเกณฑ์มาตรฐานต่ำและสูงแสดงถึงความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุดที่พบใน 5–7% ของบุคคลที่ดึงจากประชากรที่กำหนด ตารางด้านล่างนี้สรุปค่าเกณฑ์มาตรฐาน

ค่าเกณฑ์มาตรฐาน		
	ต่ำ	สูง
NAD+ (μM)	20	36
NADH (μM)	0.6	1.8

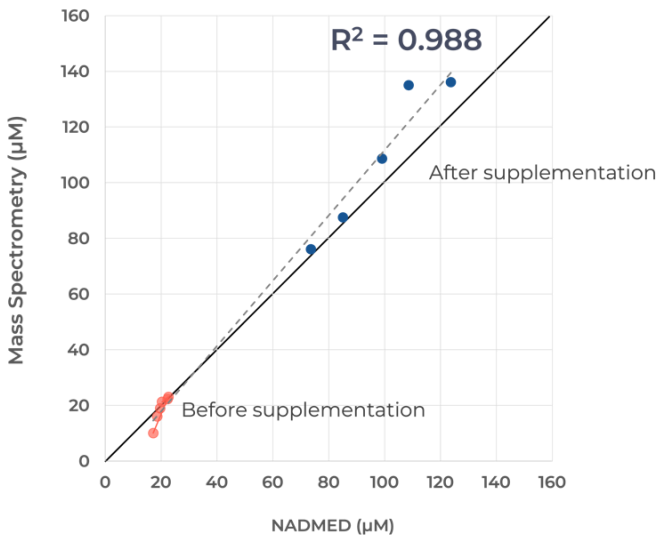
F. ลักษณะของประสิทธิภาพ

การรบกวนของสารเมทาบอไลท์อื่น ๆ ในสารสกัดไม่ได้ถูกตรวจสอบแยกต่างหาก เนื่องจากการมีส่วนร่วมอยู่ในระดับต่ำและนำมาพิจารณาโดยการดำเนินการวิเคราะห์แบลงค์โดยไม่เติมเอนไซม์

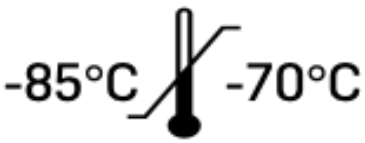
คำเตือน: โพแทสเซียมซอร์เบต บอเรต ไพริดีน และบิสมัทในตัวอย่างสามารถทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ ซึ่งทำให้ประเมินผลการวิเคราะห์ต่ำกว่าความเป็นจริง

G. การเปรียบเทียบวิธีการ

เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของ Q-NADMED เราได้วัดความเข้มข้นของ NAD+ ในชุดตัวอย่างเลือดมนุษย์ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับการวิเคราะห์โดยแมสสเปกโตรเมทรีเช่นกัน ตัวอย่างเลือดแช่แข็งของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี 5 ราย (ก่อนและหลังการเสริมไนอาซินเป็นเวลา 16 สัปดาห์) ได้รับการวิเคราะห์ควบคู่กันไปโดย Q-NADMED และแมสสเปกโตรเมทรี ผลการวิเคราะห์จาก Q-NADMED สอดคล้องกับผลที่ได้จากแมสสเปกโตรเมทรี



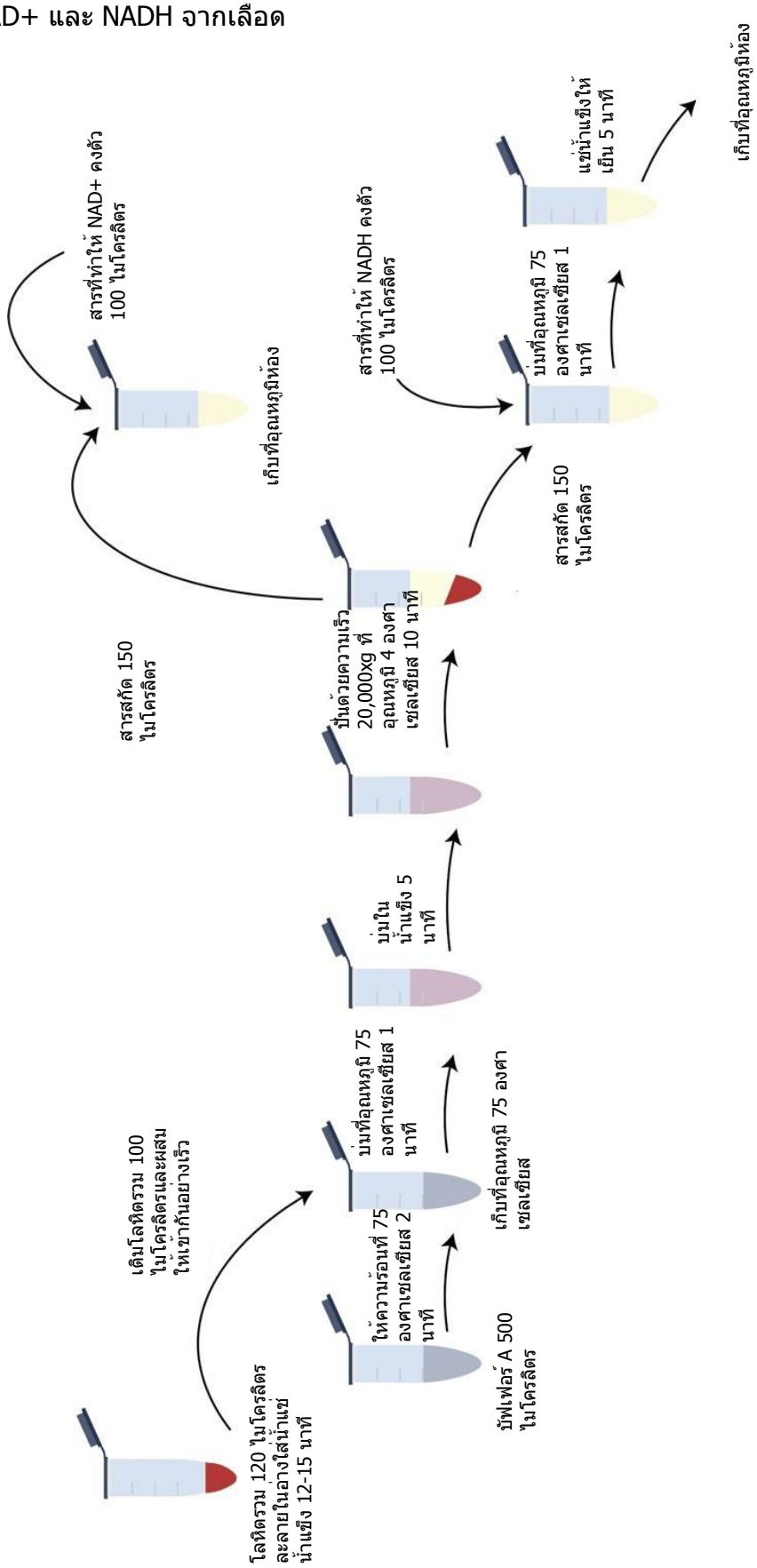
สัญลักษณ์

สัญลักษณ์	
	ของเหลวและไอระเหยที่ติดไฟได้
	คำเตือน/อันตราย
	ดูคำแนะนำสำหรับการใช้งาน
	ใช้ก่อนวันที่
	หมายเลขแคตตาล็อก
	รหัสชุด
	ผู้ผลิต
	ขีดจำกัดอุณหภูมิสูงสุด

	ห้ามใช้หากบรรจุภัณฑ์เสียหาย
	เก็บไว้ให้แห้งเสมอ
Σ 96	จำนวนหรือปฏิกิริยา
CE IVD	อุปกรณ์ทางการแพทย์สำหรับวินิจฉัยภายนอกร่างกาย
	ป้องกันไม่ให้โดนแสงโดยตรง

รูปแผนผัง

A. การสกัด NAD+ และ NADH จากเลือด

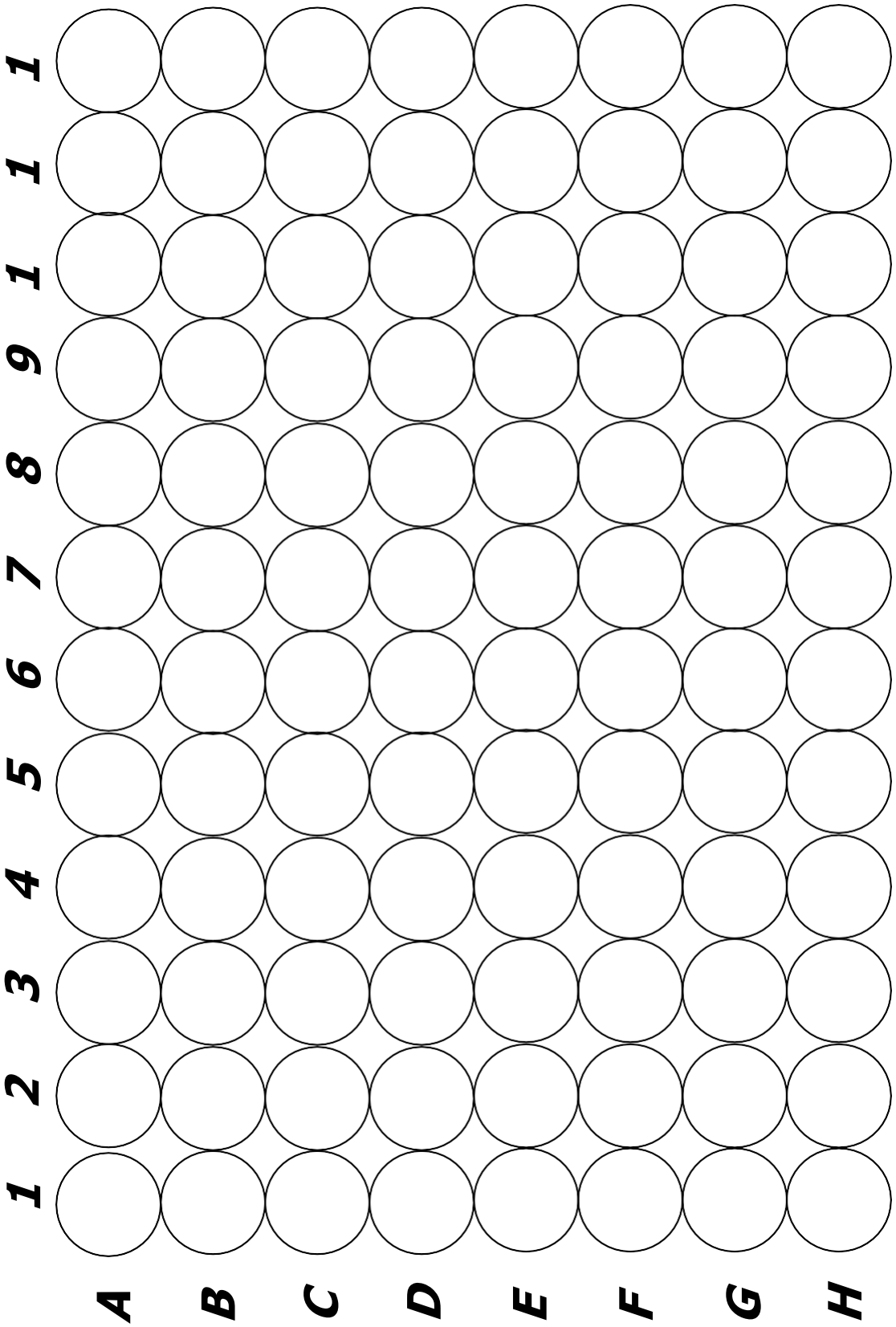


B. รูปแบบจานหลุมที่แนะนำสำหรับการวัด NAD+ หรือ NADH

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

รูปแบบจานหลุมสำหรับการวัด NAD+ หรือ NADH: St – มาตรฐาน, BL – แบลงค์หรือสารละลายที่ไม่มีตัวอย่างที่ต้องการวัดที่มีตัวอย่างที่ระบุไว้ที่ใช้สำหรับการอ่านค่าแบลงค์, UNK – ตัวอย่างที่ไม่ทราบ สารสกัดที่มีความคงตัวจากตัวอย่างที่ไม่ทราบความเข้มข้นของสารเมทาบอไลท์, PosCtr – สารควบคุมเชิงบวกที่มีความคงตัว ใช้สารมาตรฐาน สารควบคุมเชิงบวก และสารสกัดตัวอย่างที่มีความคงตัว 20 ไมโครลิตรต่อหลุม ตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่เลยของตัวอย่างสี่รายการแรกได้รับการวิเคราะห์ในส่วนผสมหลักโดยไม่เติมเอนไซม์

หมายเหตุ

รูปแบบจานหลุมร่าง

ใช้รูปแบบของจานหลุมนี้เพื่อบันทึกสารมาตรฐานและตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์