

Q-NADMED BLOOD NAD⁺ および NADH アッセイキット

全血定量アッセイキット

バージョン 5.0

単回使用限定

本製品を使用する前に、これらの説明と指示すべてを必ずお読みください。

CE  FOR IN VITRO 診断用

一般的な情報

商標名：

Q-NADMED BLOOD NAD+ および NADH アッセイキット（全血定量アッセイキット）

カタログ番号：

IVD_001; IVD_001/TH

保管：

到着時 -85°C~-70°C

IFU (使用説明書) 発行日：

2024 年 4 月

製造者：

NADMED Ltd / Oy

www.nadmed.com

info@nadmed.com

Haartmaninkatu 4, Building 14

00290 Helsinki

FINLAND (フィンランド)

パッケージ上の記号



可燃性の液体および蒸気が含まれています。「事前注意および警告」を参照してください。



警告/危険。「事前注意および警告」を参照してください。



使用については「使用説明書」をご覧ください



使用期限



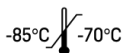
カタログ番号



バッチコード



製造者



保管温度上限



パッケージが破損している場合は、使用しないで下さい。



数または反応



体外診断用医療機器



直射光を遮光して下さい



乾燥状態を保って下さい

目次

一般的な情報	2
パッケージ上の記号	2
使用目的	4
臨床的背景	4
本アッセイの原理	4
サンプルの取り扱いと保管	5
試薬の保管、安定性および調製	7
事前注意事項と警告	8
トラブルシューティング	8
材料が必要ですがキットには含まれていません	9
実際上の考慮事項	11
Q-NADMED 血液中の NAD⁺ および NADH アッセイのワークフロー	12
NAD⁺ および NADH の抽出と安定化	13
標準品の調製	15
陽性対照の調製	17
アッセイ手順	18
計算結果	20
性能と制限事項	23
注記	25
プレートレイアウト	26

使用目的

Q-NADMED Blood（体外診断用医療機器）は、ヒト全血中の NAD⁺および NADH の代謝物濃度を測定するための分析アッセイキットです。そして、そのアッセイは定量的に測定されます。Q-NADMED アッセイキットの対象ユーザは、訓練を受けた検査室職員です。本来の目的の一番目は、NAD⁺ および NADH における全身上の変化を検出することです。アッセイ結果を利用する主な対象ユーザは、得られた結果を疾患/健康状態に照らして解釈する医療専門家達です。Q-NADMED アッセイキットの結果は、NAD 前駆体の補給など、治療に関する意思決定に使用できます。Q-NADMED アッセイキットの第二の目的は、NAD 前駆体の補給や用量の調整など、治療を受けている患者の NAD⁺ と NADH レベルを監視することです。

臨床的背景

NAD⁺ および NADH の代謝物は、さまざまな内外の刺激に反応して、ヒトの代謝とエネルギー恒常性を調整する重要な役割を果たします。研究では、全身の NAD⁺ レベルが病気の発症と相関して減少し、身体のエネルギー平衡の崩壊を示していることが実証されています (Covarrubias et al. 2021 doi: [10.1038/s41580-020-00313-x](https://doi.org/10.1038/s41580-020-00313-x)). NAD⁺ 低下の範囲は、一様ではなく、個体や病状によって異なります。NAD⁺ が著しく低下すると、必須の代謝機能を維持する身体的能力が損なわれ、その状態は治療を継続しても続くこととなります。さまざまな疾患の作用機序および進行に対する NAD⁺ および NADH の寄与についての研究は、非常に活発に行われています。NAD⁺ および NADH 濃度の変化が疑われる病状の一覧には、ミトコンドリア病、老化、敗血症、ウイルス感染症、心血管疾患および腎臓疾患、I 型糖尿病および II 型糖尿病、神経障害、そしてがんに対してすでに公開されているエビデンスで常に拡大しています。（たとえば、Pirinen al.2020 doi: [10.1016/j.cmet.2020.04.008](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.04.008), Verdin 2015 doi: [10.1126/science.aac4854](https://doi.org/10.1126/science.aac4854), Fan ら 2020 doi: [10.1111/jdi.13303](https://doi.org/10.1111/jdi.13303), Navas & Carnero 2021 doi: [10.1038/s41392-020-00354-w](https://doi.org/10.1038/s41392-020-00354-w)).

Q-NADMED アッセイは、NAD⁺ および NADH に欠損のある患者のスクリーニングを容易にして、これらの欠損を修正し、治療計画の有効性を高めるための絞った介入を可能にします。

本アッセイの原理

本キットは、細胞内 NAD⁺ および NADH の含有量を測定します。本アッセイの原理は、比色法によるエンドポイント検出を用いた環状酵素反応です。最初に、NAD⁺ と NADH の代謝産物は、単一のステップで全血サンプルから一緒に抽出されます。分析処理では、そのサンプル抽出物は NAD⁺ および NADH に対して別々に測定されます。最初のセグメントでは、この処理は NADH を積極的に除去しながら NAD⁺ を安定化することに重点を置いています。逆に、2 番目のセグメントでは、NADH の安定化に重点が移ると同時に NAD⁺ の除去が確実になされます。NAD⁺ および NADH の安定化された抽出物は、色の変化を伴う酵素反応により、2 つの別々のプレート上で分析されます。本アッセイにおける色の変化における強度は、反応混合物中の NAD⁺ または NADH の濃度に直線的に比例します。

サンプルの取り扱いと保管

要件と制限事項：

- このキットは、全血中の NAD⁺ および NADH 測定用に設計されています。このアッセイは、血漿、血清、培養細胞、組織における測定には適していません。
- NAD⁺ および NADH の測定には、100 μ L の全血が必要です。一方、アッセイを確実に実行するには、150~200 μ L の容量が最適です。
- 新鮮でも冷凍でもサンプルを分析できます。
 - a) 新鮮な血液は採取後 72 時間以内であれば分析できます。採取後、分析までは 4°C~-8°C で保管してください。
 - b) 凍結サンプルは、アッセイ前に凍結状態を継続的に維持しなければなりません。その後の凍結融解サイクルは許可されません。アリコートの保存期間は、-20°C で 1 ヶ月または -80°C~-70°C で約 1 年です。
- 臨床試験や縦断的試験では、全血のサンプリングと取り扱いとを一貫して行うことが非常に重要です。アッセイ前の分析タイプ (新鮮または冷凍) と保管方法の一貫性を目指して下さい。以下の採血手順と重要な事前注意事項を参照してください。

血液採取：

採取： 静脈から採取した全血サンプル (静脈穿刺などの方法を使用) および身体他の部分から採取した全血サンプル (ランセット型デバイスを使用) が適しています。血液サンプルの分注と凍結に関する詳細な手順は、次のサイトでご覧いただけます <https://www.nadmed.com/documents/>。

サンプル量： 本分析自体に必要な全血は少量です。このため、凍結サンプルを分析する場合は、凍結前に大量の血液 (たとば、2~3 mL など) を 150~200 μ L に分注することを推奨します。サンプル中の抗凝固剤の目標濃度を維持するには、血液を抗凝固剤が含まれる採血管に直接採取することが不可欠です。

抗凝固剤： 一般的に全血サンプルは、抗凝固剤として K2 EDTA またはリチウムヘパリン (LH) を含む採血管に採取し、上下に回転させて適切に混合する必要があります。抗凝固剤の最終濃度は、採取した血液 1mL あたり K2 EDTA で 1.2~2 mg、または採取した血液 1 mL あたり 17~18 IU の LH とする必要があります。静脈血の採血の場合は、上記の抗凝固剤濃度になるように設計された K2 EDTA または LH のスプレーコーティングを施した採血用バキュテナー (たとえば、BD Vacutainer® または Vacuette® など) を推奨します。

検査結果の完全性と信頼性を確保するための重要な予防措置:

サンプルの混合： 全血が静止した状態では、さまざまな相に分離されます。したがって、処理中に新鮮なサンプルを十分に混合することが不可欠です。

避けるべき行為： 採血管内での大量 (2~3 mL) の血液の凍結を避けてください。スカート付き二層マイクロチューブの使用は避けてください。これらの方法を実行すると、凍結と解凍の双方に必要な時間が大幅に増加する可能性があることから、これは特に重要です。解凍時間が長ければ、アッセイ結果に大きなばらつきが生じ、分析の精度と信頼性に影響を及ぼす可能性があります。

分析と分注のタイミング： 採血後すぐにサンプル分析できない場合は、必ず 72 時間以内にサンプルを分注 (アリコート) してください。150~200 μ L のアリコートの使用が好ましいです。

アリコートの保管：アリコートを非滅菌の単層透明ポリプロピレンマイクロチューブに保存します。チューブの容量は、0.5～2 mL とする必要があります。分注後、サンプルを急速凍結します。冷凍の場合は、-80℃～-20℃の温度で実施してください。

試薬の保管、安定性および調製

試薬	説明 (*)	調整 (**)	保管および安定性 (**, ***)
BUFFER A	28 mL サンプル 40 個に十分	使用準備完了。室温にします。	室温で 2 週間安定です。
NAD+ STABILIZING REAGENT	8 mL サンプル 40 個に十分		
NADH STABILIZING REAGENT	8 mL サンプル 40 個に十分		
POSITIVE CONTROL (BUFFER)	200 μ L プレート 2 つに十分		
DEIONIZED WATER	10 mL プレート 2 つに十分		
STOP SOLUTION	3 mL プレート 2 つに十分	使用準備完了。室温にします。 沈殿物が形成された場合は、アッセイ前に 37°C に温め、室温まで冷却します。	
BUFFER C	2x 19 mL 96 ウェルプレートあたりア リコート 1 つ	室温にします。ASSAY COLOR REAGENT 1 ボトルと BUFFER C 1 ボトルを混合します (= 96 ウェルプレート 1 枚に十分なマスターミックス) を混合します。マスターミックスを直ちに使用します。遮光します。激しく振らないでください。残りは廃棄します。	解凍後は室温で 12 時間安定です。
ASSAY COLOR REAGENT	2x 3 mL 96 ウェルプレートあたりア リコート 1 つ		解凍後は室温で 3 時間安定です。
NAD+ STANDARD STOCK	40 μ L (1mM) 標準品および陽性対照にと って十分です。	室温にします。13 ページの調整ガイドを参照してください。	解凍後は直ちにご使用ください。標準品は遮光する必要があります。
NADH STANDARD STOCK	40 μ L (1mM) 標準品および陽性対照にと って十分です。		
ENZYME	2x 40 μ L 96 ウェルプレートあたりア リコート 1 つ	室温にします。プレートブランクの処理後にマスターミックスに添加します。	解凍後は直ちにご使用ください。

* 充填量の許容変動は +/- 5 % です。

** 室温 : 15°C ~ 25°C

*** 開封する前に、キットのすべてのコンポーネントは -85°C ~ -70°C で保管してください。冷凍庫内の温度変動を避けてください。

事前注意事項と警告

in vitro 診断用に限定。訓練を受けた人員に使用を限定。作業領域では喫煙、飲酒、飲食、化粧品の使用をしないでください。保護手袋、衣類、保護眼鏡を着用してください。取り扱い後は手をよく洗ってください。

BUFFER A は、目の炎症を引き起こす場合があります。注意: ゴーグルを使用してください。

NAD+ STABILIZING REAGENT は、皮膚や目に炎症を引き起こす場合があります。注意: 手袋とゴーグルを使用してください。

NADH STABILIZING REAGENT は、皮膚、目、呼吸器への刺激を引き起こす場合があります。煙の吸入を避けてください。

STOP SOLUTION は、皮膚、目、呼吸器への炎症を引き起こす場合があります。煙の吸入を避けてください。

ASSAY COLOR REAGENT は、皮膚への刺激を引き起こす場合があります。注意: 手袋を使用してください。

Q-NADMED 安全データシート (SDS) には、[\(SDS\)](#) このキット内の化学物質の特定済みの危険性と、それらの危険性に関連する適切な警告情報が記載されています。

Q-NADMED 安全データシート (SDS) には、[\(SDS\)](#) 使用済みのキットコンポーネントの廃棄について説明されています。

トラブルシューティング

抽出またはアッセイの実行中に問題が発生した場合は、次の URL で「NADMED トラブルシューティングガイド」をご確認ください <https://www.nadmed.com/documents/>。

材料が必要ですがキットには含まれていません

カテゴリー	項目	仕様/要件
消耗品	マイクロチューブ、 1.5 mL	<i>in vitro</i> 診断用を目的とした透明/天然色のポリプロピレン (PP) から作られた非滅菌微量遠心管を使用してください (例えば、Sarstedt Ref 72.690.001)。 次の NADMED アッセイとは互換性がありません: a) エンドトキシン、発熱物質、ヒト DNA を含まず、低残留性の分子生物学グレードの滅菌マイクロチューブ (化学的に滅菌済み) b) 「LoBind」と表示されたタンパク質研究用のマイクロチューブ
	96 ウェルプレート (2つ)	比色アッセイを目的とした中程度のタンパク結合を有する非滅菌の透明ポリスチレン平底プレートを使用します (たとえば、Revvity、旧 PerkinElmer、ref. 6055640)。
	マルチチャンネルピ ペッティング用リキ ッドリザーバー (2 個)	非滅菌ポリスチレンプラスチックを使用してください。アッセイマスターミックスと STOP SOLUTION 用溶液には別々の容器リザーバーを使用してください。
	ピペットチップ	低残留性で、非滅菌の面取りされたピペットチップを使用してください。
	氷 (氷水槽)	容器に氷を入れ、その上から冷たい水道水を注ぎます。サンプルの液体部分は浸されていますが、チューブは氷で支えられたままです。
	アルミホイル	説明書の指示に従って、アッセイ中にサンプル、標準品およびプレートを光から保護するためのホイルを使用してください。
設備および 機械	校正済みピペット	たとえば、5~50 μ L、20~200 μ L、および 100~1000 μ L の用量の単一チャンネル。たとえば、5~50 μ L および 30~300 μ L の用量のマルチチャンネルピペット。
	微量遠心分離機	4°Cに冷却して、速度 20,000 x g の遠心分離機を使用します。
	分光光度計マイクロ プレートリーダー	a) 570~573 nm の波長での吸光度を測定 b) スキャンライトの明るさ/強度を「低」に調整します。あるいは、測定ごとのフラッシュ数に基づいて明るさを調整することもできます (5~10 回のフラッシュに設定)。
	1.5 mL マイクロチュ ープに適合するドラ イ・バス・ヒート・ ブロック	最大 80°Cまでの温度調整が可能です。一貫した信頼性の高い結果を保証するには、次のように 熱伝達をテストし、温度を校正 します。 1. ヒートブロックを 80°Cに設定し、75°C~80°Cに達するまで待ちます。 2. 500 μ L の水をマイクロチューブに加え、チューブをヒートブロック上に置きます。マイクロチューブがブロックにしっかりと固定していることを確認します。 3. 従来型の実験用温度計を水の入ったマイクロチューブに挿入します。 4. 75°Cに達するまでに必要な時間を測定します。5 分以内にその温度に達すれば、熱伝達は十分であると考えられます。

80°Cの設定で5分以内に正しい温度に到達しない場合:

- a) チューブがブロックにしっかりと固定していることを確認します
- b) デバイスの目標温度を上げます

特殊事項 アッセイ測定部を薄暗い照明条件で作業する可能性。Q-NADMED 血液 NAD⁺ および NADH の実
際的な考慮事項とワークフローを参照してください。

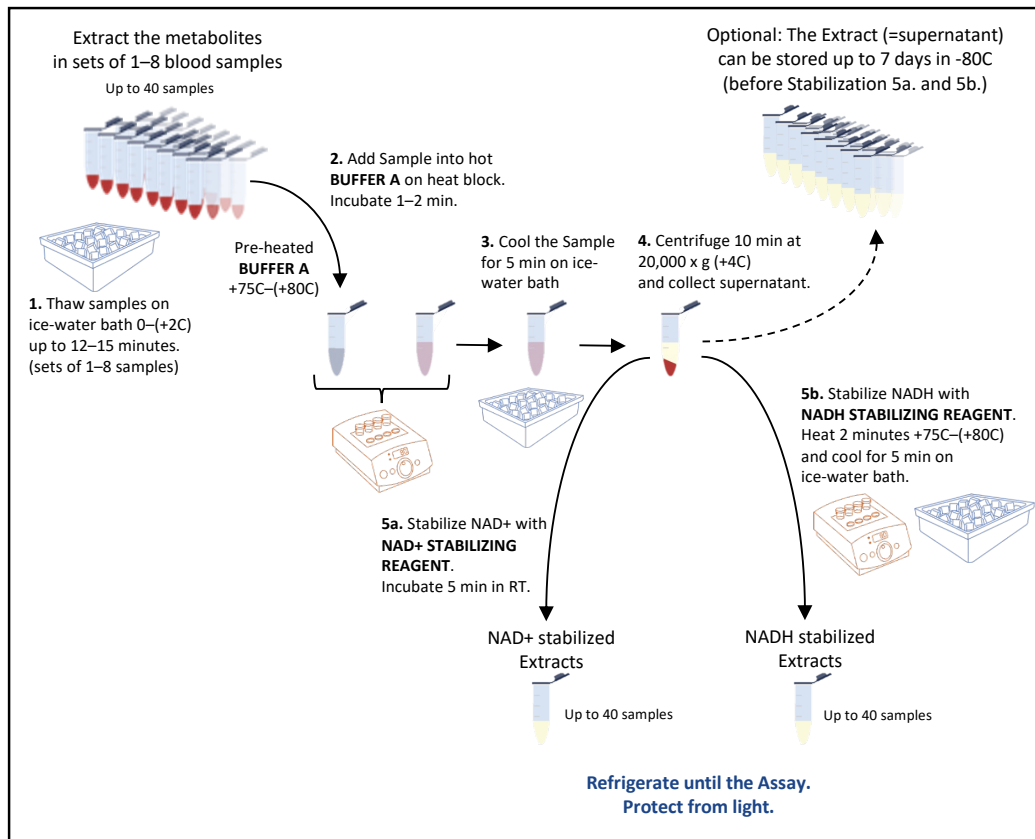
実際上の考慮事項

視覚的な指示については、(<https://www.nadmed.com/products/NAD-NADH-kit>) をご覧ください。

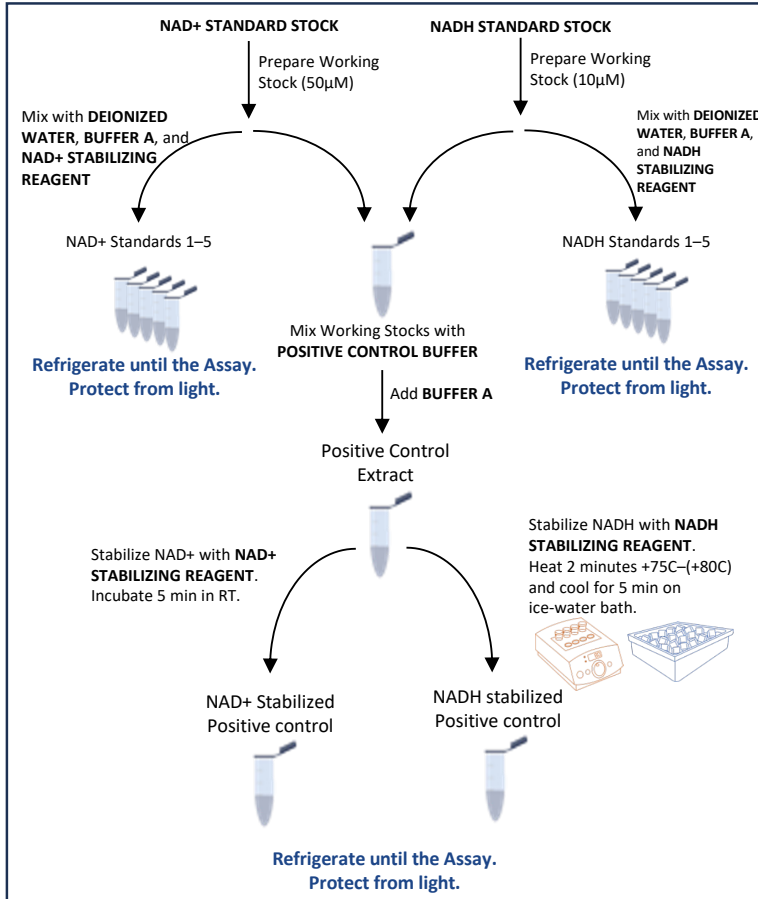
カテゴリー	指示
制限事項	<p>サンプルの取り扱いと保管をよく読んでください。このアッセイは全血用に設計されており、血漿、血清、培養細胞、組織中の NAD⁺ および NADH の測定には適していません。</p> <p>有効期限を過ぎたキットのコンポーネントを使用しないでください。異なるキットロットの材料を混合しないでください。その後の試薬の凍結融解サイクルは許可されていません。</p>
使いやすさ	<p>すべての試薬を穏やかに旋回させて完全に混合します。小さなマイクロチューブは、開封前に低速で素早く遠心分離する必要があります。</p> <p>DEIONIZED WATER、BUFFER A、NAD⁺ STABILIZING REAGENT、NADH STABILIZING REAGENT、および STOP SOLUTION をアッセイの 1 日前に室温に戻すことを推奨します。アッセイ当日に BUFFER C と ASSAY COLOR REAGENT を室温に戻します。これらのボトルは溶解するまでに約 2~3 時間かかります。</p>
精度	<p>NAD⁺ と NADH の分析は 2 つの別々のプレートで実施されます。双方のアッセイを同日に実行することを推奨します。</p> <p>交差汚染を避けるため、標準品、サンプル、試薬を追加するたびに新しいピペットチップに交換してください。マルチチャンネルピペットを使用する場合は、ピペットチップがウェルの内容物に触れないようにしてください。</p> <p>高精度ピペットと低残留性の面取りチップとにより精度が向上します。</p> <p>BUFFER C および STOP SOLUTION には界面活性剤が含まれています。気泡を避けるために、ピペットを最初の停止位置まで押すことによって、マスターミックスおよび STOP SOLUTION をピペットで取ります。プレートをプレートリーダーに挿入する前に、小さな針でウェル内の気泡を取り除きます。</p>
遮光	<p>安定化されたサンプル抽出物、標準品および陽性対照が積極的に処理されていないときは、光から保護してください。ただし、便宜上、抽出、調製、96 ウェルプレート上へのピペッティングは、通常の光条件下で実行できます。</p> <p>ASSAY COLOR REAGENT は、黄色の感光性化合物であり、アッセイの酵素反応により茶色に変ります。過度の自然光や直接人工光にさらされれば、非特異的に緑色に変色します。</p> <p>アッセイへの光の干渉を最小限に抑えるために、プロトコールでは特に薄暗い条件を必要とする手順を示しています。自然光と直接人工光の双方からの反応を防御するには、次のことをお勧めします。</p> <ul style="list-style-type: none">● ベンチの真上にある人工光源のスイッチを切ります。ブラインドを閉めるか、窓から離してください。● ASSAY COLOR REAGENT およびアッセイ用マスターミックスを使用する場合は常に、プレートおよびピペトリザーバーにアルミホイルのカバーをかけてください。● プレートがプレートリーダーに挿入されるまで、アッセイの培養手順中に 96 ウェルプレートをアルミホイルカバーで覆います。(包まないでください)。

Q-NADMED 血液中の NAD⁺ および NADH アッセイのワークフロー

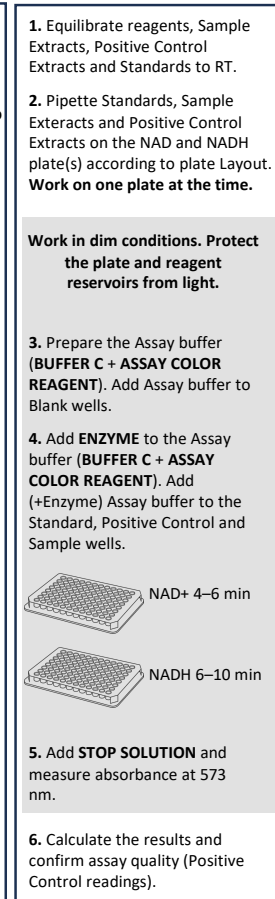
1. Extraction of Metabolites and NAD⁺/NADH stabilization



2. Preparation of NAD⁺/NADH Standards and NAD⁺/NADH Positive Controls



3. NAD⁺ and NADH Assays



NAD+ および NADH の抽出と安定化

このセクションでは、全血からの NAD+ および NADH の抽出に関するガイダンスを提供しています。抽出後に NAD+ と NADH は、別々比色アッセイ用に別々に安定化されます。抽出物 (遠心分離後) は、アッセイ当日に安定化する前に、 -80°C ~ -70°C で 1 週間保存できます。

ヒント：動画ガイダンスを参照してください (<https://www.nadmed.com/products/NAD-NADH-kit>)

注記：オリジナル全血サンプルの最終希釈度は 10 倍となります。NAD 前駆体を補給した場合、被験者の血液中の NAD+ 濃度が増加する場合があります。このため、比色アッセイの前に、NAD+ 安定化抽出物を用いて DEIONIZED WATER (付属品) を使用してさらに 1:2 に希釈する必要があります。この場合、オリジナル血液サンプルの希釈度は NAD+ の 20 倍となります。NADH で安定化された抽出物は希釈する必要がありません。

材料：

75°C~80°Cに設定されたドライ・バス・ヒート・ブロック	必要な材料の表を参照してください。
氷水槽	必要な材料の表を参照してください。
微量遠心分離機	必要な材料の表を参照してください。
マイクロチューブ	すべての手順に印が付いています
BUFFER A	室温
NAD+ STABILIZING REAGENT	室温
NADH STABILIZING REAGENT	室温
DEIONIZED WATER	室温

抽出：

- すべてのサンプルに対して、500 μL の BUFFER A をピペットで 1.5 mL のマイクロチューブに入れます。
- 新鮮な血液サンプルを扱う場合は、氷上で冷却し、BUFFER A を用いた抽出に進みます。
 - 凍結した全血サンプルを扱う場合は、次のように氷水槽中で解凍します。
 - 一度に 1~8 個のサンプルセットを操作します。
 - 解凍の最初の数分間に、チューブの壁面に生じた氷をティッシュペーパーで取り除きます。
 - 解凍は 12~15 分以内に完了する必要があります。解凍を監視し、必要に応じて解凍を促進します。サンプルを 2~3 秒間保持し、氷水槽に戻し、これを 2 分毎に繰り返します。
- 80°C に設定したドライ・バス・ヒート・ブロック中で BUFFER A (1~8 サンプルセット) を予熱します。抽出前に 5 分間そのままにしておきます。
- 解凍した全血サンプルを数回ピペッティングサイクルで上下に混合し、泡立ちを避けてください。
- BUFFER A のマイクロチューブをヒートブロックから取り外さずに、次のようにサンプルを注入します。
 - チューブの底に触れずに、100 μL の血液をピペットで BUFFER A に入れます。

- 2~3回の激しい上下ピペティングサイクルと共に、チップを同時に回転させることで素早く混合し、冷たいサンプルと熱い BUFFER A とを効率的に混合します。
6. 各反応物を 75°C~80°Cで 1~2 分間培養します。すべてのサンプルの培養時間を一定に保ちます。
 7. 抽出物を氷水槽中で少なくとも 5 分間冷却します。サンプル抽出が成功したかを確認します。氷上で冷却した後、ホモジネートは遊離した液体なしに重合する必要があります。
 8. 抽出物を 20,000 x g かつ 4°C で 10 分間遠心分離します。上清を清浄なマイクロチューブに移し、ペレットを廃棄します。
 9. サンプル抽出物(上清)を光から保護し、安定化手順まで冷蔵(4°C~8°C)保管します。
- 🔄 次のバッチ (1~8 サンプル) に対して抽出を繰り返します。
10. 遅滞なく安定化手順に進みます。

🔗 オプション：上清は -80°C ~ -70°C で 1 週間保存できます。この場合、以下に説明する安定化手順に進む前に、凍結抽出物を室温で 10 分間解凍してください。

安定化：

11. 抽出物を室温に平衡化し、2つの 150 μ L アリコートで清浄なマイクロチューブに入れて調製します。
12. 最初の 150 μ L アリコートに、100 μ L の **NAD+ STABILIZING REAGENT** を加えます。渦動させて、室温で 5 分間培養します。
13. 2 番目の 150 μ L アリコートに、100 μ L の **NADH STABILIZING REAGENT** を加えます。渦動させて、75°C~80°Cのドライバス中で 2 分間培養します。氷上で 5 分間冷却します。
14. 安定化させたサンプル抽出物を光から保護し、アッセイプレート上でピペティングする前に冷蔵(4°C~8°C)で保管してください。

標準品の調製

アッセイ当日に標準品を調製します。NAD⁺ から始めて、一度に1つの標準品セットを調製します。ここで調製した作業標準品ストックは、陽性対照混合物の調製に使用されます。

注記：精度を向上させるために、DEIONIZED WATER と作業標準品ストックに同じピペットを使用します。

材料：

1 mM NAD ⁺ STANDARD STOCK	使用時に解凍してください。開封する前に低速で沈降させてください
1 mM NADH STANDARD STOCK	使用時に解凍してください。開封する前に低速で沈降させてください
BUFFER A	室温
NAD ⁺ STABILIZING REAGENT	室温
NADH STABILIZING REAGENT	室温
DEIONIZED WATER	室温

プロトコール：

- 1 mM NAD⁺ 標準品および1 mM NADH 標準品を含むマイクロチューブを室温で5分間解凍します。解凍中はホイルの蓋で遮光してください。
- 25 μ L の1 mM NAD⁺ STANDARD STOCK を475 μ L の DEIONIZED WATER に加えて、渦動させて50 μ M NAD⁺ 作業用ストックを調製します。以下の表に従ってNAD⁺ 標準品の調製に進み、示された順序で試薬をピペットで移します。

NAD⁺ 標準品の調製

標準品の ID	NAD ⁺ 濃度 (μ M)	DEIONIZED WATER (μ L)	50 μ M NAD ⁺ 作業用ストック (μ L)	BUFFER A (μ L)	NAD ⁺ STABILIZING REAGENT (μ L)
NAD ⁺ ST1	0	100	0	500	400
NAD ⁺ ST2	1	80	20	500	400
NAD ⁺ ST3	2	60	40	500	400
NAD ⁺ ST4	3	40	60	500	400
NAD ⁺ ST5	5	0	100	500	400

- 1 mM NADH 標準品ストック 10 μ L を990 μ L の DEIONIZED WATER に加えて10 μ M NADH STANDARD STOCK を調製して、渦動させます。以下の表に従ってNADH 標準品の調製に進み、示された順序で試薬をピペットで移します。

NADH 標準品の調製

標準品の ID	NADH 濃度 (μ M)	DEIONIZED WATER (μ L)	10 μ M NADH 作業用ストック (μ L)	BUFFER A (μ L)	NADH STABILIZING REAGENT (μ L)
NADH ST1	0.0	100	0	500	400
NADH ST2	0.2	80	20	500	400
NADH ST3	0.4	60	40	500	400
NADH ST4	0.6	40	60	500	400
NADH ST5	1.0	0	100	500	400

4. 標準品を渦動させます。標準品を光から保護し、アッセイプレート上でピペッティングする前に冷蔵 (4°C~8°C) で保管してください。

陽性対照の調製

10 μM NADH 作業用ストックの安定性が限られているため、陽性対照はアッセイ当日に標準品の調製直後に調製します。陽性対照は、健康なヒト被験者の血液サンプル中の NAD 代謝産物の濃度を模倣しています。陽性対照には、全血サンプルと同様に抽出および安定化を実行します。

陽性対照の最終希釈度は 10 倍となります。検査結果の計算後、陽性対照の NAD⁺ の予想濃度は $25 \pm 2 \mu\text{M}$ 、NADH では $2 \pm 0.3 \mu\text{M}$ となります。

材料：

75°C~80°Cに設定されたドライ・バス・ヒート・ブロック	必要な材料の表を参照してください。
氷水槽	必要な材料の表を参照してください。
50 μM NAD ⁺ 作業用ストック	標準品の調製、室温
10 μM NADH 作業用ストック	標準品の調製、室温
POSITIVE CONTROL (BUFFER)	室温
BUFFER A	室温
NAD ⁺ STABILIZING REAGENT	室温
NADH STABILIZING REAGENT	室温

プロトコール：

1. マイクロチューブ内で陽性対照混合物を調製します。渦動。

45 μL の POSITIVE CONTROL (BUFFER)

75 μL of 50 μM NAD⁺ 作業用ストック

30 μL of 10 μM NADH 作業用ストック

2. 500 μL の BUFFER A をピペットで清浄なマイクロチューブに入れます。
3. 100 μL の陽性対照混合物を BUFFER A に加えて渦動します。

注記：陽性対照は BUFFER A を使用して室温で抽出しますが、加熱は必要ありません。

4. 陽性対照抽出物の 150 μL アリコートをして 2 つ調製し、清浄なマイクロチューブに入れます。
5. 最初の 150 μL アリコートに、100 μL の NAD⁺ STABILIZING REAGENT を加えます。渦動させて、室温で 5 分間培養します。
6. 2 番目の 150 μL アリコートに、100 μL の NADH STABILIZING REAGENT を加えます。渦動させて、80°C のドライバス中で 2 分間培養します。氷上で 5 分間冷却します。
7. 安定化された NAD⁺ および NADH 陽性対照抽出物を光から保護し、アッセイプレート上でピペッティングする前に (4° -8°C) 冷蔵 (4° ~ 8°C) で保管してください。

アッセイ手順

アッセイ手順は、NAD⁺測定とNADHとの測定の双方で同じです。NAD⁺およびNADHのアッセイを別のプレートで実施します。一度に1つのアッセイに取り組みます。

ブランクは、マスターミックス中の抽出成分と ASSAY COLOR REAGENT と間の非特異的相互作用から生じる非特異的バックグラウンドシグナルを補正するために使用します。サンプルブランクは、ENZYME を添加せずにマスターミックスとともに培養します。(陽性対照には別のブランクは必要ありません。)サンプルブランクは、4つの代表的な安定化サンプル抽出物から(最小限)調製します。既知のNAD補給を受けた被験者と補給されていない被験者を同じプレートで分析する場合、条件ごとにサンプルブランクのウェル2つの使用を推奨します。

注記：手順 1. - 2.は通常の光条件下で実行します。手順 3.以降の手順は、薄暗い環境下で実行します(「実践上の考慮事項」を参照：遮光)。

注記：マスターミックスと STOP SOLUTION には別々のリザーバーを使用してください。

材料：

分光光度計リーダー	必要な材料の表を参照してください。
BUFFER C	室温
ASSAY COLOR REAGENT	室温
ENZYME	使用時に解凍してください。開封前に低速で沈降させてください。
STOP SOLUTION	室温

プロトコール：

1. プレートにピペットで移す前に、標準品、安定化サンプル抽出物および安定化陽性対照を室温で5分間平衡化します。
2. 以下の推奨プレートレイアウトに従って、96ウェルプレートに対してピペットを使用します。
 - 20 μ L の標準品 (ST1 ~ 5) を2つずつ
 - 20 μ L の安定化陽性対照および安定化サンプル抽出物を2つずつ(未知、UNK)
 - 上記の指示に従い、選択した20 μ L のブランク (BL UNK1 ~ 4)。

この手順以降は薄暗い条件で作業してください。

3. ASSAY COLOR REAGENT を BUFFER C に加えて穏やかに回転させてマスターミックスを調製します。

注記：アルミホイルの蓋を用いて、ピペッティング中にはリザーバーとプレート内のマスターミックスを保護してください。
4. ENZYME を含まないマスターミックス 190 μ L を4つのサンプルのブランクウェル (BL UNK1 ~ 4) のそれぞれに加えます。
5. 残りのマスターミックスを含むボトルに40 μ L の ENZYME を加えます。泡立たないように穏やかに混ぜます。酵素を加えたマスターミックスをリザーバーに注ぎます。

6. マルチチャンネルピペットを使用して、残りのすべてのウェルに ENZYME を含むマスターミックス 190 μ L を加えます。泡立ちや光を避けます。準備ができたプレートを直ちにアルミホイルの蓋で覆います。

7. **NAD⁺ アッセイ:** カバーしたプレートを室温で 4 ~ 6 分間培養します。

NADH アッセイ: カバーしたプレートを室温で 6 ~ 10 分間培養します。

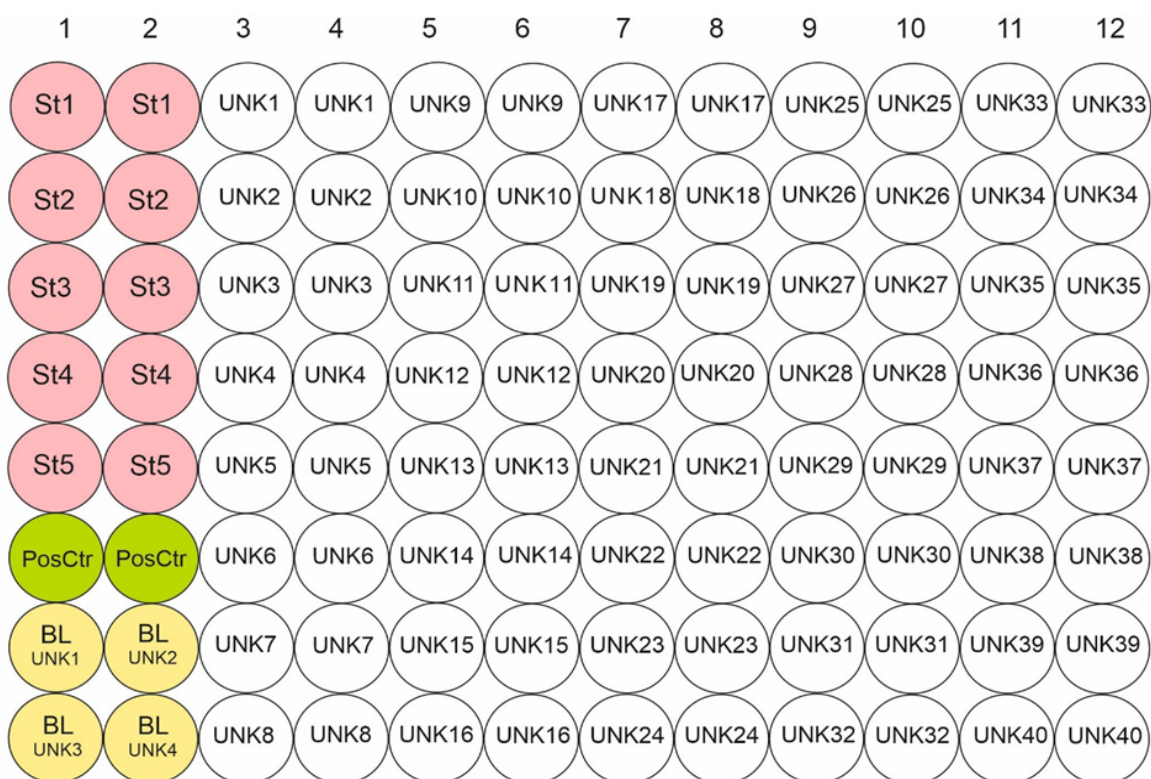
注記: 標準品に明確な色勾配があり、酵素を添加したサンプルとサンプルブランクとの間に色の強度の違いがある場合、反応が停止することがあります。反応時間が長いほど、より強いシグナルが観察されます。標準品および全血中の NADH 濃度が低いことから、NADH アッセイの色の強度は一般に NAD⁺ よりも低くなります。

8. マルチチャンネルピペットを使用して、マスターミックスと同じ順序で各ウェルに STOP SOLUTION 10 μ L を加えて反応を停止します。泡立ちを避けてください。テーブルの上でプレートを手で軽く振り、針で気泡を取り除きます。

9. STOP SOLUTION を添加した直後に 573 nm で吸光度を測定します。可能であれば、測定前にマイクロプレートリーダー内のプレートを 5 秒間振ってください。

注記: STOP SOLUTION を添加した後は、すべてのウェルで色の強度が均一に増加します。これは、マスターミックスの非酵素的なバックグラウンドプロセスによるものと予想されます。

NAD⁺ または NADH の測定に推奨されるプレートレイアウト



NAD⁺ または NADH のアッセイ用のプレートレイアウト: St = 標準、BL = ブランク、PosCtr - 安定化陽性対照、UNK = 代謝産物の濃度が不明な安定化サンプル。選択されたサンプルのサンプルブランクは、ENZYME を添加せずにマスターミックス中で分析します。

計算結果

陽性対照 (アッセイ品質管理)

陽性対照は参考用ではなく、NAD⁺ および NADH の安定化および比色アッセイの効率を監視することを目的としています。サンプル結果を計算する前に、陽性対照が期待どおりに機能することを確認してください。

NAD⁺:

NAD⁺ アッセイでは、安定化 NAD⁺ 陽性対照によって吸収される光の量は、標準品の ST3 および ST4 で観察される範囲内である必要があります。この吸光度範囲は、23 ~ 27 μM の NAD⁺ 濃度に対応します (10 倍希釈の補正後)。

NADH:

NADH アッセイでは、安定化 NADH 陽性対照によって吸収される光の量は ST2 (+/-0.05 光学単位) に等しい必要があります。この吸光度は、NADH 濃度 1.7 ~ 2.3 μM に相当します (10 倍希釈補正後)。

サンプルの結果

以下の指示に従って、各プレートからの結果を別々に計算します。以下の「代表的なデータ」のセクションは、対照被験者の標準曲線と結果の計算の例を示しています。

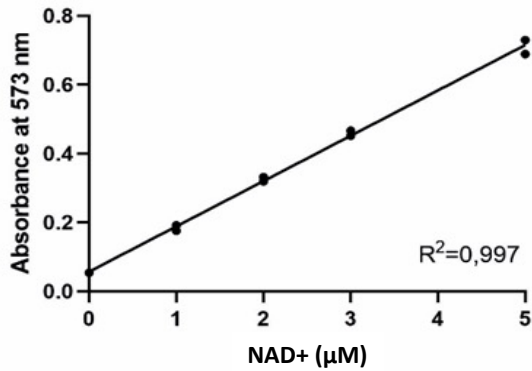
1. それぞれの標準品 (ST1 ~ ST5) の吸光度読み取り値の平均を計算します。
2. X 軸の既知の標準濃度 (μM 単位) に対して、Y 軸にそれぞれの標準品の平均吸光度をプロットすることで、標準曲線を作成します。標準曲線の単純な線形回帰フィッティングを計算します。
3. 標準曲線の線形回帰式を使用して、サンプルウェルとブランクウェル (UNK および BL UNK) のそれぞれの濃度を計算します。
4. それぞれの安定化サンプル抽出物の複製物の平均を計算します。
5. サンプルブランク (BL UNK1~4) の平均を計算します。得られた値は、サンプルの標準化に使用された安定化抽出物の非特異的シグナルを表します。
6. サンプル濃度の平均からブランクの平均を引くことにより、非特異的シグナルを補正します。
7. 複製物の平均を計算し、10 を掛けると、血液中の NAD⁺ および NADH の濃度 (μM) が得られます。

注記: NAD⁺ 安定化抽出物が既知のサプリメントを使用してさらに希釈された場合は、その濃度に追加の希釈係数を掛けなければなりません。

代表的なデータ

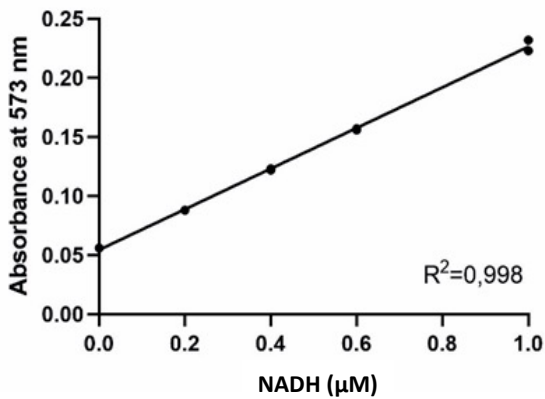
標準曲線と安定化サンプル抽出物の濃度は証明目的に限定して提供されており、リアルタイム検量線の代わりに使用してはいけません。

A) NAD⁺ の標準曲線



標準	NAD ⁺ (μ M)	吸光度(573 nm) アッセイ時間 : 4 分
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

B) NADH の標準曲線



標準	NADH (μ M)	吸光度(573 nm) アッセイ時間 : 6 min
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

C) NAD⁺ の結果の計算

安定化サンプル抽出物 (UNK) およびサンプルブランク (BL UNK1 ~ 4) の濃度値は、NAD⁺ 標準曲線の線形近似式から決定されます。

未知の	濃度 安定化された抽出物中の (μ M)	サンプルブランクの平均により補正 された安定化抽出物の濃度 (BL UNK 1 ~ 4、 μ M)	オリジナルサンプル中の最 終 NAD ⁺ 濃度 (μ M)*
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		

*希釈倍率×10で補正

D) NADH の結果の計算

安定化サンプル抽出物 (UNK) およびサンプルブランク (BL UNK1 ~ 4) の濃度値は、NADH 標準曲線の線形近似式から決定されます。

未知の	濃度 安定化された抽出物中の (μ M)	サンプルブランクの平均により補正 された安定化抽出物の濃度 (BL UNK 1 ~ 4、 μ M)	オリジナルサンプル中の最 終 NADH 濃度 (μ M)*
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		

*希釈倍率×10で補正

性能と制限事項

検出限界

Q-NADMED 血液のブランク限界 (LoB) を以下の表に示します (LoB ± 標準偏差 [SD])。

ブランクの限界 (pmol/ウェル)	
NAD+	1.84 ± 0.9
NADH	2.10 ± 0.5

検出限界 (LoD) は NAD+ および NADH の標準曲線から計算され、以下の表に示されています (LoD ± SD)。

検出限界 (全血中 μM)	
NAD+	0.33 ± 0.2
NADH	0.19 ± 0.05

定量限界 (LoQ) を以下の表に示します (LoQ ± SD)。

定量限界 (全血中 μM)	
NAD+	0.66 ± 0.3
NADH	0.40 ± 0.1

精度と再現性

測定におけるアッセイ内変動により、アッセイ実施の精度を決定しました。以下の表は、アッセイ内精度 (CV=変動係数) を示しています。

アッセイ内精度 (CV (%) ± SD)	
NAD+	1.48 ± 0.8
NADH	3.33 ± 1.5

以下の表は、アッセイの再現性の結果をまとめたものです。

再現性

サンプル	NAD+			NADH		
	Ctr1	Ctr2	Ctr3	Ctr1	Ctr2	Ctr3
測定の回数 *	9	9	9	9	9	9
平均 (μM)	27.41	29.41	22.00	0.55	0.71	0.64
標準偏差	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

(N=数値、* 同じサンプルの3つのアリコートをもとに3回分析)。

精度

アッセイの精度は、既知量の純粋な NAD⁺ および NADH を含むサンプルから計算しました。以下の表は、その結果をまとめたものです (アッセイ精度 +/- SD)。

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

アッセイカットオフ

低カットオフ値と高カットオフ値は、特定の母集団抽出物から 5~7% のフィンランド人に認められた最小濃度と最高濃度を表します。以下の表はカットオフ値をまとめたものです。

	カットオフ値	
	低値	高値
NAD ⁺ (μM)	20	36
NADH (μM)	0.6	1.8

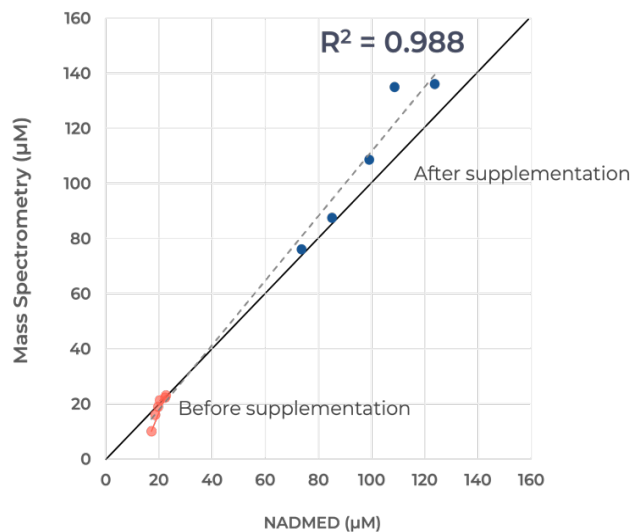
性能特性

抽出物中の他の代謝産物からの干渉は、それらの寄与度が低く、酵素を追加せずにブランク補正を実行することによって考慮されているため、別々には調査しませんでした。

警告：サンプル中のソルビン酸カリウム、ホウ酸カリウム、ピリジンおよびビスマスは酵素阻害を引き起こす可能性があることから、結果が過小評価される原因となります。

分析法の妥当性確認

Q-NADMED の性能を検証するために、質量分析法でも分析された一連の対照ヒト血液サンプル中の NAD⁺ 濃度を測定しました。5 名の健常被験者の凍結血液サンプル (16 週間のナイアシン補給の前後) を Q-NADMED と質量分析とを並行して分析しました。Q-NADMED からの結果は、質量分析によって得られた結果と一致しました。



プレートレイアウト

このプレートレイアウトを用いて、サンプルをプレートに記録します。

