

Q-NADMED BLOOD NAD⁺- und NADH-Assay-Kit

Quantitatives Assay-Kit für Vollblut

Version 9.0

NUR ZUR EINMALIGEN VERWENDUNG

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

CE  **ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK**

ALLGEMEINE INFORMATIONEN

Geschützter Name:

Q-NADMED Blood NAD+- und NADH-Assay-Kit: Quantitatives Assay-Kit für Vollblut

Bestellnummern:

IVD_001; IVD_001/TH

Lagerung:

-85 °C --70 °C bei Ankunft

Gebrauchsanleitung vom:

Oktober 2025

Hersteller:

NADMED Ltd / Oy

www.nadmed.com

info@nadmed.com

Tukholmankatu 8, Biomedicum 2U

00290 Helsinki

FINNLAND

SYMBOLE AUF DER VERPACKUNG



Enthält leicht entzündbare Flüssigkeit und Dampf. Siehe VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE



Warnung/Gefahr. Siehe VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE



Gebrauchsanweisung beachten



Verwendbar bis



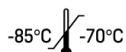
Artikelnummer



Chargencode



Hersteller



Höchsttemperatur zur Lagerung



Bei beschädigter Verpackung nicht verwenden



192

Anzahl der Reaktionen



In-vitro-Diagnostikum



Vor direktem Licht schützen



Trocken aufbewahren

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| ALLGEMEINE INFORMATIONEN | 2 |
| SYMBOLS AUF DER VERPACKUNG | 2 |
| VERWENDUNGSZWECK..... | 4 |
| KLINISCHER KONTEXT..... | 4 |
| TESTPRINZIP | 4 |
| | |
| PROBENHANDHABUNG UND LAGERUNG..... | 5 |
| LAGERUNG, STABILITÄT UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN | 7 |
| VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE | 8 |
| FEHLERBEHEBUNG | 8 |
| SONSTIGE NOTWENDIGE, ABER NICHT IM KIT ENTHALTENE MATERIALIEN | 9 |
| PRAKTISCHE ERWÄGUNGEN | 10 |
| ARBEITSABLAUF DES Q-NADMED BLOOD NAD+- UND NADH-ASSAYS | 11 |
| | |
| EXTRAKTION UND STABILISIERUNG VON NAD+ UND NADH..... | 12 |
| VORBEREITUNG DER STANDARDS | 14 |
| VORBEREITUNG DER POSITIVKONTROLLE..... | 16 |
| TESTVERFAHREN..... | 17 |
| BERECHNUNG DER ERGEBNISSE | 19 |
| | |
| LEISTUNG UND GRENZEN | 22 |
| ANMERKUNGEN..... | 24 |
| PLATTENANORDNUNG..... | 25 |

VERWENDUNGSZWECK

Q-NADMED Blood, ein Medizinprodukt zur In-vitro-Diagnostik, ist ein Analyse-Assay-Kit zur Messung der Konzentrationen von NAD⁺- und NADH-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⁺ und NADH. 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⁺ und NADH-Spiegel bei Patienten, die eine Supplementierung mit NAD-Vorläufern erhalten, sowie ggf. die Dosisanpassung.

KLINISCHER KONTEXT

NAD⁺ und NADH-Metaboliten sind Hauptregulatoren des Stoffwechsels und der Energiehomöostase im menschlichen Körper und justieren unterschiedliche interne und externe Stimuli. Forschungsarbeiten haben ergeben, dass der systemische NAD⁺-Spiegel als Reaktion auf eine manifestierte Erkrankung abnimmt und so ein Signal für ein Ungleichgewicht der Energiehomöostase des Körpers produziert (Covarrubias et al. 2021 [doi:10.1038/s41580-020-00313-x](https://doi.org/10.1038/s41580-020-00313-x)). Das Maß der NAD⁺-Abnahme ist unterschiedlich und variiert je nach Patient und jeweiliger Krankheit. Eine deutliche Abnahme der NAD⁺-Werte führt dazu, dass der Körper seine grundlegenden, zum Überleben notwendigen Stoffwechselfunktionen selbst bei laufender Therapie nicht aufrechterhalten kann. Zur Rolle von NAD⁺ und NADH bei den Mechanismen und dem Fortschreiten verschiedener Erkrankungen wird sehr aktiv geforscht. Die Liste der Erkrankungen, bei denen Veränderungen der NAD⁺- und NADH-Konzentrationen vermutet werden, wird ständig erweitert. Entsprechende Evidenz wurde bereits für mitochondriale Erkrankungen, Alterung, Sepsis, Virusinfektionen, Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen, Diabetes Typ I und II, neurologische Erkrankungen und Krebs veröffentlicht. (z. B. Pirinen et 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 et al 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)).

Mit Q-NADMED können Patienten auf einen NAD⁺- und NADH-Mangel untersucht, eine gezielte Maßnahme zur Mangelbehebung eingeleitet und die Wirksamkeit der Behandlungen erhöht werden.

TESTPRINZIP

Mit dem Kit wird der intrazelluläre NAD⁺- und NADH-Gehalt gemessen. Das Testprinzip beruht auf einer zyklischen, enzymatischen Reaktion mit kolorimetrischem Endpunktnachweis. Zuerst werden die NAD⁺- und NADH-Metaboliten zusammen in einem einzigen Schritt aus der Vollblutprobe extrahiert. Bei der Analyse werden NAD⁺ und NADH separat im Probenextrakt gemessen. Im ersten Teil wird NAD⁺ stabilisiert und NADH eliminiert. Im Umkehrschluss wird im zweiten Teil NADH stabilisiert, wobei gleichzeitig die Entfernung von NAD⁺ sichergestellt wird. Danach werden die stabilisierten NAD⁺- und NADH-Extrakte auf zwei verschiedenen Platten 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⁺ oder NADH im Reaktionsgemisch.

PROBENHANDHABUNG UND LAGERUNG

Anforderungen und Grenzen:

- Dieses Kit dient zur Messung von NAD⁺ und NADH in Vollblut. Dieser Assay ist NICHT zum Messen in Plasma oder Serum, gezüchteten Zellen oder Geweben geeignet.
- Zum Messen von NAD⁺ und NADH sind 100 µl Vollblut erforderlich. Ein Volumen von 150-200 µl ist jedoch optimal, um den Test zuverlässig durchzuführen.
- Die Proben können frisch oder gefroren analysiert werden.
 - a) Frisches Blut kann innerhalb von 72 Stunden nach der Entnahme analysiert werden. Nach Entnahme bis zur Analyse bei 4°-8°C lagern.
 - b) Gefrorene Proben müssen vor dem Test eingefroren bleiben. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist nicht zulässig. Die Lagerzeit für gefrorene Proben beträgt einen Monat bei -20°C oder ein Jahr bei -80 - -70°C.
- In klinischen Studien und Längsschnittstudien ist es wichtig, einheitliche präanalytische Praktiken zu haben. Das Ziel ist eine einheitliche Probenahme, Handhabung, Lagerung und Analyse (frisch oder gefroren). Siehe nachfolgend die Anweisungen zur Blutentnahme und Wichtige Vorsichtsmaßnahmen.

Blutentnahme:

Entnahme: Vollblutproben aus einer Vene (mit Methoden wie Venenpunktur) und Vollblutproben aus anderen Körperteilen (mittels Blutlanzetten) sind geeignet. Weitere Anweisungen zum Aliquotieren und Einfrieren der Blutproben finden Sie unter <https://www.nadmed.com/documents/>.

Probenvolumen: Für die Analyse selbst werden kleine Mengen Vollblut benötigt. Daher wird empfohlen, für eine Analyse gefrorener Proben vor dem Einfrieren ein größeres Blutvolumen (z. B. 2 - 3 ml) in 150 - 200 µl Aliquots zu aliquotieren. Es ist elementar, dass die Blutentnahme direkt im Entnahmeröhrchen mit Antikoagulantien erfolgt, um die Zielkonzentration an Antikoagulans in der Probe zu erhalten.

Antikoagulantien: Im Allgemeinen sollten Vollblutproben in Entnahmeröhrchen entnommen werden, die zuvor mit K2 EDTA oder Lithium-Heparin (LH) als Antikoagulantien sprühbeschichtet wurden, und dann durch Auf- und Abschwenken sorgfältig vermischt werden. Die endgültigen Konzentrationen der Antikoagulantien sollte zwischen 1,2 - 2 mg an K2 EDTA pro 1 ml entnommenen Bluts oder 17 - 18 IU an LH pro 1 ml entnommenen Bluts betragen. Für die venöse Blutentnahme werden Blutentnahme-Vacutainer empfohlen, die innen mit K2 EDTA oder LH sprühbeschichtet sind, damit die oben beschriebenen Antikoagulantienkonzentrationen erreicht werden (z. B. BD Vacutainer® oder Vacuette®).

Wichtige Vorsichtsmaßnahmen zur Sicherstellung der Integrität und Zuverlässigkeit der Ergebnisse:

Vermischen der Probe: Wenn Vollblut länger ruht, trennen sich seine Bestandteile voneinander. Bei der Verarbeitung muss daher eine frische Probe gründlich und häufig durchmischt werden.

Zeiten für die Analyse und das Aliquotieren: Sollte die Blutprobe nicht direkt nach der Entnahme analysiert werden können, teilen (aliquotieren) Sie die Probe unbedingt innerhalb von 72 Stunden in das gewünschte Volumen zwischen 150 - 200 µl.

Lagerung der Aliquots: Lagern Sie die Aliquots in nicht-sterilen, einwandigen, transparenten Polypropylen-Mikroröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 0,5 - 2 ml. Frieren Sie die Proben nach dem Aliquotieren schnell ein. Verwenden Sie zum Einfrieren vorgekühlte Probenbehälter bei Temperaturen von -80°C bis -20°C.

Zu vermeiden: Frieren Sie große (2 - 3 ml) Blutmengen nicht direkt in den Entnahmeröhrchen ein. Verwenden Sie keine doppelwandigen Mikroröhrchen mit Stehrand. Dadurch kann sich die Zeit zum Einfrieren und Auftauen erheblich verlängern. Lange Gefrier-/Auftauzeiten können eine Variabilität bei den Ergebnissen zur Folge haben, was sich sowohl auf die Korrektheit als auch die Zuverlässigkeit der Analyse auswirkt.

LAGERUNG, STABILITÄT UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Vor dem Öffnen alle Bestandteile des Kits bei -85 °C bis -70 °C lagern. Temperaturschwankungen im Gefrierschrank vermeiden.

| REAGENS | BESCHREIBUNG (*) | VORBEREITUNG (**) | STABILITÄT (**) |
|---------------------------------------|--|--|--|
| EXTRACTION BUFFER A | 28 ml Ausreichend für 40 Proben | Auf Raumtemperatur äquilibrieren. Gebrauchsfertig. | Nach dem Auftauen zwei Wochen lang stabil bei Raumtemperatur. |
| NAD⁺-STABILIZER | 8 ml Ausreichend für 40 Proben | | |
| NADH-STABILIZER | 8 ml Ausreichend für 40 Proben | | |
| POSITIV-KONTROLLE (BUFFER) | 200 µl Ausreichend für zwei Platten | | |
| ENTIONISIERTES WASSER | 10 ml Ausreichend für zwei Platten | | |
| STOP SOLUTION | 3 ml Ausreichend für zwei Platten | Auf Raumtemperatur äquilibrieren. Gebrauchsfertig. (Wenn sich Niederschlag gebildet hat, wärmen Sie die Lösung vor dem Assay auf 37 °C auf und kühlen Sie sie dann auf Raumtemperatur ab.) | |
| ASSAY BUFFER C | 2x 19 ml Ein Aliquot pro 96-Well-Platte | Auf Raumtemperatur äquilibrieren. ASSAY BUFFER C + ASSAY COLOR REAGENT = Assay Master Mix. Siehe Anleitung zur Vorbereitung auf Seite 17. | Nach dem Auftauen 12 Stunden lang stabil bei Raumtemperatur. In bernsteinfarbener Flasche aufbewahren. |
| ASSAY COLOR REAGENT | 2x 3 ml Ein Aliquot pro 96-Well-Platte | | Nach dem Auftauen 3 Stunden lang stabil bei Raumtemperatur. In bernsteinfarbener Flasche aufbewahren. |
| NAD⁺-STANDARD STOCK | 40 µl (1 mM) Ausreichend für Standards und Positivkontrolle | Siehe Anleitung zur Vorbereitung auf Seite 14. | Sollte sofort nach dem Auftauen verwendet werden. Vor Licht schützen. |
| NADH-STANDARD STOCK | 40 µl (1 mM) Ausreichend für Standards und Positivkontrolle | | |
| NAD ENZYME | 2x 40 µl Ein Aliquot pro 96-Well-Platte | Nach der Verarbeitung der Leerproben zum Assay Master Mix hinzugeben. | Sollte sofort nach dem Auftauen verwendet werden. |

*Zugelassene Variation des Füllvolumens +/- 5 %.

** Raumtemperatur: 15 - 25 °C

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

Nur zur *In-vitro-Diagnostik*. Nur von geschultem Personal zu verwenden. Im Arbeitsbereich nicht rauchen, trinken, essen oder Kosmetika auftragen. Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Schutzbrille tragen. Nach Beendigung der Arbeiten Hände gründlich waschen.

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

NAD⁺-STABILIZER kann Haut- und Augenreizungen verursachen. Mit Vorsicht handhaben, Handschuhe und Schutzbrille tragen.

NADH-STABILIZER kann Reizungen der Haut, Augen oder des Atmungsapparates hervorrufen. Einatmen von Dämpfen vermeiden.

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.

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.

FEHLERBEHEBUNG

Sollten Probleme bei der Extraktion oder dem Assay auftreten, lesen Sie den NADMED-Leitfaden zur Fehlerbehebung unter <https://www.nadmed.com/documents/>.

SONSTIGE NOTWENDIGE, ABER NICHT IM KIT ENTHALTENE MATERIALIEN

| KATEGORIE | ARTIKEL | SPEZIFIKATIONEN / ANFORDERUNGEN |
|-----------------------------|---|--|
| Artikel | Mikroröhrchen, 1,5 ml | Verwenden Sie unsterile Mikrozentrifugenröhrchen aus transparentem/natürlichem Farbpolypropylen (PP) zur In-vitro-Diagnostik (z. B. Sarstedt Nr. 72.690.001). <u>NICHT</u> kompatibel mit NADMED-Assay: a) Mikroröhrchen für die Molekularbiologie, die frei von Endotoxin, Pyrogen, humaner DNA und von geringer Haftbarkeit (chemisch sterilisiert) sind b) Mikroröhrchen, die zur Arbeit mit „LoBind“-Proteinen gekennzeichnet sind |
| | 96-Well-Platten (2 Stück) | Verwenden Sie nicht sterile, transparente Styropor-Mikroplatten mit mittlerer Proteinbindungsaaffinität, entwickelt für kolorimetrische Assays (z. B. Revvity, Nr. 6055640). |
| | Flüssigkeitsreservoirs für Mehrkanalpipetten (2 Stück) | Verwenden Sie Plastikreservoirs aus nicht sterilem Styropor. Verwenden Sie verschiedene Reservoirs für den Assay Master Mix und die STOP SOLUTION. |
| | Pipettenspitzen | Verwenden Sie nicht-sterile, abgeschrägte Low Retention-Pipettenspitzen. |
| | Eis (Eiswasserbad) | Füllen Sie einen Behälter mit abgepacktem Laboreis und gießen Sie kaltes Leitungswasser darüber, bis eine Art Schneewasser erreicht ist. Es wurde genug Wasser hinzugefügt, wenn der flüssige Teil der Probe in Wasser eingetaucht ist, das Eis aber die eingesetzten Röhrchen fest aufrecht hält (Vermeiden Sie, dass Proben im Wasser schwimmen). |
| | Aluminiumfolie | Verwenden Sie Folienabdeckungen, um Proben, Standards und die Platten bei der Durchführung des Assays vor Licht zu schützen, wie in der Anleitung erklärt. |
| Geräte und Maschinen | Kalibrierte Pipetten | Einkanalpipetten für Volumen von z. B. 5 – 50 µl, 20 – 200 µl und 100 – 1000 µl. Mehrkanalpipetten für Volumen von z. B. 5 – 50 µl und 30 – 300 µl. |
| | Mikrozentrifuge | Verwenden Sie eine Zentrifuge mit Kühlung auf 4 °C und einer Geschwindigkeit bis zu 20000 x g |
| | Spektralphotometrisches Mikroplattenlesegerät | a) Fähigkeit zur Messung der Absorption bei 570 – 573 nm Wellenlänge b) Einstellbare Scanhelligkeit/-intensität. Die Einstellung kann auf „niedrig“ oder anderenfalls die Helligkeit als Anzahl an Blitzen pro Messung eingestellt werden (Einstellung 5 bis 10 Blitze). |
| | Trockenbad (Heizblock) passend für 1,5 ml Mikroröhrchen | Eine Temperaturregelung von bis zu 80 °C ist erforderlich. Um auf einheitliche und zuverlässige Ergebnisse zu gewährleisten, testen Sie die Wärmeübertragung und kalibrieren Sie die Temperatur: 1. Stellen Sie den Heizblock auf 80 °C ein und warten Sie, bis 75 °C – 80 °C erreicht sind. 2. Geben Sie 500 µl Wasser in ein Mikroröhrchen und geben Sie das Röhrchen in den Heizblock. Achten Sie darauf, dass das Mikroröhrchen gut in den Block passt. 3. Stecken Sie ein herkömmliches Laborthermometer in das Mikroröhrchen mit dem Wasser. 4. Messen Sie die Zeitspanne, bis 75 °C erreicht sind. Die Wärmeübertragung gilt als ausreichend, wenn die Temperatur innerhalb von 5 Minuten erreicht wird. Sollte die korrekte Temperatur bei einer Einstellung auf 80 °C NICHT innerhalb von 5 Minuten erreicht worden sein: a) vergewissern Sie sich, dass die Röhrchen gut in den Block passen b) erhöhen Sie die Zieltemperatur Ihres Geräts Rekalibrieren. |
| Besonderheiten | Möglichkeit, für den ASSAY-Teil der Messung unter gedämpften Lichtverhältnissen zu arbeiten. Siehe PRAKTISCHE ERWÄGUNGEN und ARBEITSABLAUF DES Q-NADMED BLOOD NAD+- und NADH-ASSAY. | |

PRAKTISCHE ERWÄGUNGEN

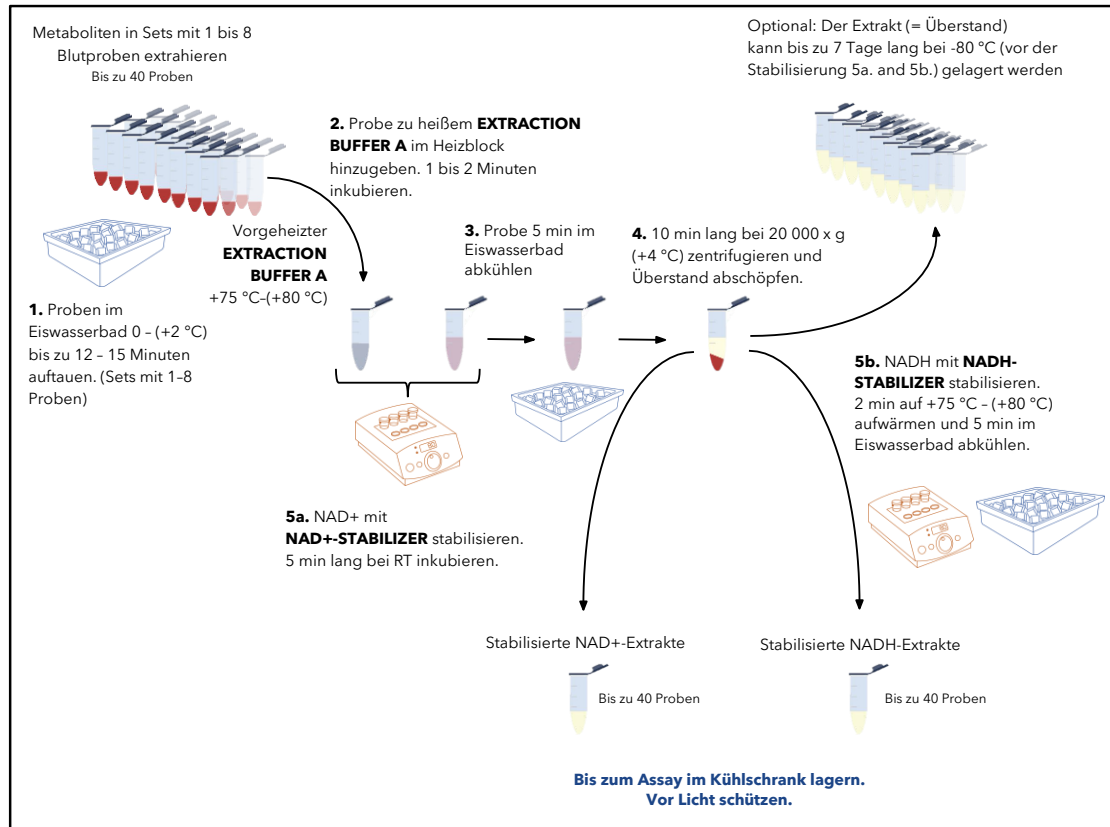


Anweisungen mit Bildern finden Sie unter (<https://www.nadmed.com/products/NAD-NADH-kit>).

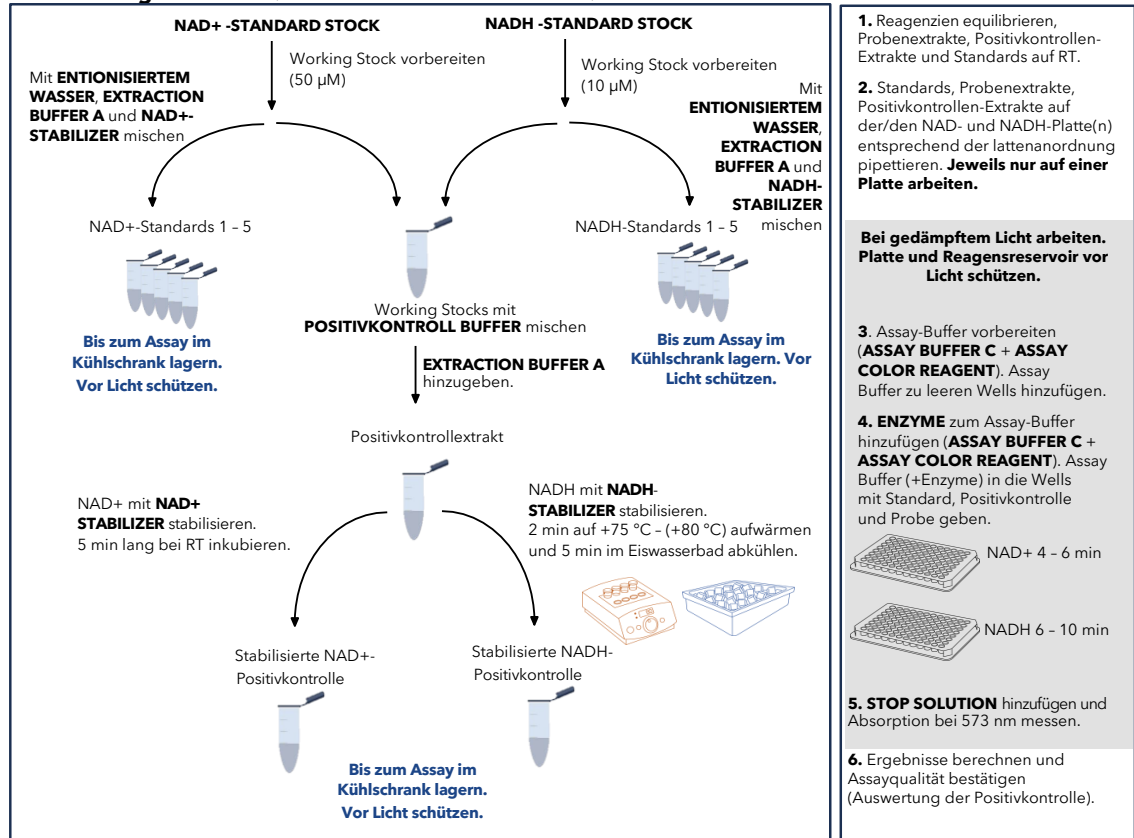
| KATEGORIE | ANWEISUNGEN |
|-------------------------------|---|
| Einschränkungen | <p>Lesen Sie sich den Abschnitt PROBENHANDHABUNG UND LAGERUNG sorgfältig durch. Dieses ist Assay ist für Vollblut ausgelegt und NICHT zum Messen von NAD⁺ und NADH in Plasma oder Serum, gezüchteten Zellen oder Geweben geeignet.</p> <p>Verwenden Sie keine Komponenten des Kits nach Ablauf des Verfallsdatums. Mischen Sie keine Materialien aus unterschiedlichen Kit-Chargen. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist nicht zulässig.</p> |
| Anwenderfreundlichkeit | <p>Vermischen Sie alle Reagenzien gründlich durch vorsichtiges Schwenken. Kleine Mikroröhrchen sollten vor dem Öffnen schnell bei geringer Geschwindigkeit zentrifugiert werden.</p> <p>Wir empfehlen, das ENTIONISIERTE WASSER, EXTRACTION BUFFER A, NAD⁺-STABILIZER, NADH-STABILIZER und die STOP SOLUTION einen Tag vor dem Assay auf Raumtemperatur: zu bringen. Bringen Sie ASSAY BUFFER C und ASSAY COLOR REAGENT am Tag des Assays auf Raumtemperatur. Das Auftauen dieser Flaschen dauert etwa 2- 3 Stunden.</p> |
| Genauigkeit | <p>Die Analysen von NAD⁺ und NADH erfolgen auf zwei separaten Platten. Es ist empfehlenswert, beide Assays am selben Tag durchzuführen.</p> <p>Zur Vermeidung einer Kreuzkontamination wechseln Sie nach der Hinzufügung jedes Standards, jeder Probe und jedes Reagens zu einer neuen Pipettenspitze. Bei der Arbeit mit Mehrkanalpipetten achten Sie darauf, dass der Inhalt der Wells nicht mit der Pipettenspitze in Berührung kommt.</p> <p>Hoch-Präzisionspipetten und abgeschrägte Low Retention-Pipettenspitzen erhöhen die Präzision.</p> <p>ASSAY BUFFER C und die STOP SOLUTION enthalten Tenside. Um Blasenbildungen zu vermeiden, pipettieren Sie den Master Mix und die STOP SOLUTION, indem Sie die Pipette auf die erste Stopposition drücken. Entfernen Sie dann etwaige Blasen im Well mit einer kleinen Nadel, bevor Sie die Platte ins Plattenlesegerät stellen.</p> |
| Vor Licht schützen | <p>Schützen Sie die stabilisierten Probenextrakte, Standards und Positive Controls vor Licht, wenn sie nicht aktiv verarbeitet werden. Allerdings kann deren Extraktion, Vorbereitung und das Pipettieren auf die 96-Wells-Platten aus praktischen Gründen unter normalen Lichtverhältnissen erfolgen.</p> <p>Das ASSAY COLOR REAGENT ist ein gelber, lichtempfindlicher Bestandteil, der sich bei der enzymatischen Reaktion des Assays braun färbt. Eine Exposition gegenüber direktem Sonnenlicht oder direktem künstlichem Licht verursacht eine unspezifische Farbänderung zu grün.</p> <p>Um die Lichtinterferenz mit dem Assay zu minimieren, ist im Protokoll angegeben, welche Arbeitsschritte unter gedämpften Lichtverhältnissen auszuführen sind. Um Reaktionen durch Sonnenlicht oder direktes künstliches Licht zu vermeiden, wird Folgendes empfohlen:</p> <ul style="list-style-type: none">• Schalten Sie das künstliche Licht direkt über Ihrem Arbeitsplatz ab. Schließen Sie die Jalousien oder arbeiten Sie nicht direkt in Fensternähe.• Decken Sie die Platte und Pipettierungsreservoirs mit Aluminiumfolie ab, wenn Sie mit dem ASSAY COLOR REAGENT und Assay Master Mix arbeiten.• Decken Sie die 96-Wells-Platte bei der Assay-Inkubation mit Aluminiumfolie ab, bis die Platte in das Plattenlesegerät gestellt wird. (Nicht einwickeln). |

ARBEITSABLAUF DES Q-NADMED BLOOD NAD⁺- UND NADH-ASSAYS

1. Extraktion der Metaboliten und NAD⁺-/NADH-Stabilisierung



2. Vorbereitung von NAD⁺-/NADH-Standards und NAD⁺-/NADH-Positivkontrollen 3. NAD⁺- und NADH-Assays



EXTRAKTION UND STABILISIERUNG VON NAD+ UND NADH

In diesem Abschnitt wird erklärt, wie NAD+ und NADH aus Vollblut extrahiert wird. Nach der Extraktion werden NAD+ und NADH jeweils in Vorbereitung auf separate kolorimetrische Assays stabilisiert. Die Extrakte können (nach der Zentrifugierung) vor der Stabilisierung am Tag der Assays eine Woche lang bei -80 °C – -70 °C gelagert werden.

TIPP: Siehe Videoanleitung (<https://www.nadmed.com/products/NAD-NADH-kit>)

HINWEIS: Die endgültige Verdünnung der ursprünglichen Vollblutprobe beträgt das 10-Fache. Im Fall individueller Supplementierungen mit NAD-Vorläufern können die NAD+-Werte im Blut ansteigen. Daher sollte der stabilisierte NAD+-Extrakt vor dem kolorimetrischen Assay weiter mit ENTIONISIERTEM WASSER (mitgeliefert) im Verhältnis 1:2 verdünnt werden. Dann beträgt die Verdünnung der ursprünglichen Blutprobe das 20-Fache für NAD+. Der stabilisierte NADH-Extrakt muss nicht verdünnt werden.

Materialien:

| | |
|---|--------------------------------------|
| Trockenbad-Heizblock, der auf 75 °C - 80 °C eingestellt ist | Siehe Tabelle NOTWENDIGE MATERIALIEN |
| Eiswasserbad | Siehe Tabelle NOTWENDIGE MATERIALIEN |
| Mikrozentrifuge | Siehe Tabelle NOTWENDIGE MATERIALIEN |
| Mikroröhrchen | Gekennzeichnet für jeden Schritt |
| EXTRACTION BUFFER A | Raumtemperatur |
| NAD+-STABILIZER | Raumtemperatur |
| NADH-STABILIZER | Raumtemperatur |
| ENTIONISIERTES WASSER | Raumtemperatur |

Extraktion:

1. Für alle Proben 500 µl von **EXTRACTION BUFFER A** in 1,5 ml Mikroröhrchen pipettieren. Mit Kappen verschließen.
2. a) Wenn Sie mit frischen Blutproben arbeiten, fahren Sie mit der Extraktion mit EXTRACTION BUFFER A fort.
b) Wenn Sie mit gefrorenen Vollblutproben arbeiten, tauen Sie diese wie folgt im Eiswasserbad auf:
 - Arbeiten Sie jeweils mit Sets von 1 - 8 Proben.
 - Entfernen Sie in den ersten Minuten des Auftauens sämtliches Eis, das sich an den Wänden des Röhrchens gebildet hat.
 - Das Auftauen sollte innerhalb von 12 - 15 Minuten abgeschlossen sein. Überwachen Sie den Auftauprozess und beschleunigen ihn falls notwendig: halten Sie die Probe 2 - 3 Sekunden in der Hand und stellen Sie sie zurück ins Eiswasserbad, alle 2 Minuten wiederholen.

3. EXTRACTION BUFFER A (in Sets mit 1 – 8 Proben) im auf 80 °C eingestellten Trockenbad vorwärmen. Vor der Extraktion 5 Minuten lang im Trockenbad lassen.
4. Aufgetaute Vollblutprobe schnell durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischen, um Schaumbildung zu vermeiden.
5. Ohne das Mikroröhrchen mit EXTRACTION BUFFER A aus dem Heizblock zu nehmen, injizieren Sie die Probe wie folgt:
 - 100 µl Blut in EXTRACTION BUFFER A pipettieren, ohne den Boden des Röhrchens zu berühren.
 - Sofort durch 2 – 3-maliges intensives Auf- und Abpipettieren vermischen und gleichzeitig die Spitze rotieren, um die kalte Probe wirksam mit dem heißen EXTRACTION BUFFER A zu vermischen.
6. Jede chemische Reaktion 1 – 2 min lang bei 75 – 80 °C inkubieren. Inkubationszeit für alle Proben konstant halten.
7. Extrakt mindestens 5 min lang in einem Eiswasserbad abkühlen lassen. Probe auf erfolgreiche Extraktion prüfen. Nach dem Abkühlen auf Eis sollte das Homogenat ohne freie Flüssigkeit polymerisieren.
- ↻ Extraktion bei den nächsten Chargen mit 1 – 8 Proben wiederholen.
8. Extrakte 10 min lang bei 4 °C bei 20,000 x g zentrifugieren. Überstand in ein sauberes Mikroröhrchen geben und Pellet entsorgen.
9. Probenextrakte (Überstände) vor Licht geschützt bis zu 1h vor den Stabilisierungsschritten im Kühlschrank (4 °C – 8 °C) stehen lassen.
- ↪ Optional: Die Überstände können eine Woche lang bei -80 °C – -70 °C gelagert werden. In diesem Fall 10 min lang vor der den nachfolgend beschriebenen Stabilisierungsschritten die gefrorenen Extrakte bei Raumtemperatur auftauen.

Stabilisierung:

10. Extrakt auf Raumtemperatur äquilibrieren und zwei 150 µl-Aliquots in sauberen Mikroröhrchen vorbereiten.
11. Zum ersten 150 µl-Aliquot 100 µl **NAD⁺-STABILIZER** hinzugeben. Vortexen und bei Raumtemperatur 5 min lang inkubieren.
12. Zum zweiten 150 µl-Aliquot 100 µl **NADH-STABILIZER** hinzugeben. Vortexen und dann 2 min lang in einem Trockenbad bei 75 °C – 80 °C inkubieren. 5 min lang auf Eis abkühlen.
13. Stabilisierte Probenextrakte vor Licht geschützt bis zum Pipettieren auf der Assayplatte im Kühlschrank (4 °C – 8 °C) stehen lassen.

VORBEREITUNG DER STANDARDS

Standards am Tag des Assays vorbereiten. Nur ein Standardset auf einmal vorbereiten und mit NAD⁺ beginnen. Die hier vorbereiteten Working Standard Stocks (Stämme) werden zur Vorbereitung der Positivkontrollmischung verwendet.

HINWEIS: Verwenden Sie dieselbe Pipette für ENTIONISIERTES WASSER und die Standard Working Stocks zur Erhöhung der Genauigkeit.

Materialien:

| | |
|---------------------------------------|---|
| 1 mM NAD ⁺ -STANDARD STOCK | Bei Gebrauch auftauen. Vor dem Öffnen von bei niedriger Geschwindigkeit herunterzentrifugieren |
| 1 mM NADH-STANDARD STOCK | Bei Gebrauch auftauen. Vor dem Öffnen von bei niedriger Geschwindigkeit herunterzentrifugieren. |
| EXTRACTION BUFFER A | Raumtemperatur |
| NAD ⁺ -STABILIZER | Raumtemperatur |
| NADH-STABILIZER | Raumtemperatur |
| ENTIONISIERTES WASSER | Raumtemperatur |

Protokoll:

1. Mikroröhrchen mit 1 mM NAD⁺-STANDARD und 1 mM NADH-STANDARD 5 min lang bei Raumtemperatur auftauen. Beim Auftauen mit Folienabdeckung vor Licht schützen.
2. **50 µM NAD⁺-Working Stock** durch Hinzufügen von 25 µl von 1 mM NAD⁺-STANDARD STOCK in 475 µl ENTIONISIERTEM WASSER vorbereiten, vortexen. Mit der Vorbereitung der NAD⁺-Standards entsprechend der nachfolgenden Tabelle fortfahren und Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge pipettieren.

| VORBEREITUNG DES NAD ⁺ -STANDARDS | | | | | |
|--|-------------------------------------|----------------------------|---|--------------------------|-----------------------------------|
| STANDARD-ID | NAD ⁺ KONZENTRATION (µM) | ENTIONISIERTES WASSER (µL) | 50 µM NAD ⁺ Working Stock (µL) | EXTRACTION BUFFER A (µL) | NAD ⁺ -STABILIZER (µL) |
| 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 |

3. **10 µM NADH-Working Stock** durch Hinzufügen von 10 µL 1 mM NADH-STANDARD STOCK in 990 µl ENTIONISIERTEM WASSER vorbereiten, vortexen. Mit der Vorbereitung der NADH-Standards entsprechend der nachfolgenden Tabelle fortfahren und Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge pipettieren.

VORBEREITUNG DES NADH STANDARDS

| STANDARD-ID | NADH KONZENTRATION (μM) | ENTIONISIERTES WASSER (μL) | 10 μM NADH Working Stock (μL) | EXTRACTION BUFFER A (μL) | NADH-STABILIZER (μL) |
|-----------------|--------------------------------------|---|---|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 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. Alle Standards vortexen. Standards vor Licht geschützt bis zum Pipettieren auf den Assay platten im Kühlschrank (4 °C - 8 °C) stehen lassen.

VORBEREITUNG DER POSITIVKONTROLLE

Die Positivkontrolle ahmt den Wert der NAD-Metaboliten in der Blutprobe einer gesunden Person nach. Die Positivkontrolle wird genau wie Vollblutproben Extraktions- und Stabilisierungsschritten unterzogen. Die erwartete NAD⁺-Konzentration in der Positivkontrolle beträgt $25 \pm 2 \mu\text{M}$ und NADH ist $2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ nach der Berechnung der Ergebnisse.

HINWEIS: Die Positivkontrolle wird direkt nach der Vorbereitung der Standards vorbereitet, da die Stabilität der $10 \mu\text{M}$ NADH-Working Stock beschränkt ist.

Materialien:

| | |
|---|---|
| Trockenbad-Heizblock, der auf $75 \text{ }^\circ\text{C}$ - $80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt ist | Siehe Tabelle NOTWENDIGE MATERIALIEN |
| Eiswasserbad | Siehe Tabelle NOTWENDIGE MATERIALIEN |
| $50 \mu\text{M}$ NAD ⁺ -Working Stock | In Vorbereitung der Standards, Raumtemperatur |
| $10 \mu\text{M}$ NADH-Working Stock | In Vorbereitung der Standards, Raumtemperatur |
| POSITIVKONTROLLE (BUFFER) | Raumtemperatur |
| EXTRACTION BUFFER A | Raumtemperatur |
| NAD ⁺ -STABILIZER | Raumtemperatur |
| NADH-STABILIZER | Raumtemperatur |

Protokoll:

1. Positivkontrollmischung in einem Mikroröhrchen vorbereiten. Vortexen.

45 μl **POSITIVKONTROLLE (BUFFER)**

75 μl **$50 \mu\text{M}$ NAD⁺-Working Stock**

30 μl **$10 \mu\text{M}$ NADH-Working Stock**

2. 500 μl **EXTRACTION BUFFER A** in ein sauberes Mikroröhrchen pipettieren.
3. 100 μl Positivkontrollmischung zu EXTRACTION BUFFER A hinzugeben. Vortexen.

HINWEIS: Die Positivkontrolle wird mit EXTRACTION BUFFER A bei Raumtemperatur extrahiert, keine Erhitzung notwendig.

4. Zwei 150 μl -Aliquots mit Positivkontrollextrakt in sauberen Mikroröhrchen vorbereiten.
5. Zum ersten 150 μl -Aliquot 100 μl **NAD⁺-STABILIZER** hinzugeben. Vortexen und bei Raumtemperatur 5 min lang inkubieren.
6. Zum zweiten 150 μl -Aliquot 100 μl **NADH-STABILIZER** hinzugeben. Vortexen und dann 2 min lang in einem Trockenbad-Heizblock bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubieren. 5 min lang auf Eis abkühlen.
7. Stabilisierte NAD⁺- und NADH-Positivkontrollextrakte vor Licht geschützt bis zum Pipettieren auf den Assayplatten im Kühlschrank ($4 \text{ }^\circ\text{C}$ - $8 \text{ }^\circ\text{C}$) stehen lassen.

TESTVERFAHREN

Das Testverfahren ist für die NAD⁺- und die NADH-Messungen gleich.

Leerproben werden zur Korrektur aller unspezifischen Hintergrundsignale aus unspezifischen Interaktionen zwischen den Extraktkomponenten und dem ASSAY COLOR REAGENT im Master Mix verwendet. Alle Leerproben werden mit Master Mix ohne NAD-ENZYME-ZUSATZ inkubiert. Für die Positivkontrolle ist kein separater Leerwert notwendig. Leerproben werden aus vier (Minimum) repräsentativen stabilisierten Probenextrakten vorbereitet. Liegen bei den analysierten Personen Nachweise einer NAD-Supplementierung vor, wird empfohlen, Proben mit und ohne Supplementierung als Leerstellen zu verwenden (mindestens zwei Wells pro Erkrankung).

HINWEIS: Schritt 1 bis 2 werden unter normalen Lichtverhältnissen durchgeführt. **Ab Schritt 3 wird unter gedämpften Lichtverhältnissen gearbeitet (siehe PRAKTISCHE ERWÄGUNGEN: Vor Licht schützen).**

HINWEIS: Die Farbintensität des NADH-Assays ist im Allgemeinen geringer als bei NAD⁺, da die NADH-Konzentration in den Standards und im Vollblut geringer sind. Befolgen Sie die empfohlenen Inkubationszeiten für NAD⁺ und NADH. Die Reaktion kann jedoch beendet werden, wenn ein auffälliger Farbunterschied in den Standards und ein Unterschied in der Farbintensität zwischen den Proben mit hinzugefügtem Enzyme und den Leerproben vorhanden ist. Je länger die Reaktionszeit, desto intensiver wird das beobachtete Signal sein.

HINWEIS: Verwenden Sie verschiedene Reservoirs für den Master Mix und die STOP SOLUTION.

Materialien:

| | |
|-----------------------------------|---|
| Spektralphotometrisches Lesegerät | Siehe Tabelle NOTWENDIGE MATERIALIEN |
| ASSAY BUFFER C | Raumtemperatur |
| ASSAY COLOR REAGENT | Raumtemperatur |
| NAD ENZYME | Vor Gebrauch auftauen. Vor dem Öffnen von bei niedriger Geschwindigkeit herunterzentrifugieren. |
| STOP SOLUTION | Raumtemperatur |

Protokoll (Führen Sie die NAD⁺- und NADH-Assays auf separaten Platten durch. Arbeiten Sie nur mit einem Assay auf einmal):

- Standards, stabilisierte Probenextrakte und stabilisierte Positivkontrollen 10 min lang bei Raumtemperatur äquilibrieren und danach auf die Platte pipettieren.
- Entsprechend der empfohlenen Plattenanordnung (siehe nächste Seite), Folgendes in die 96-Wells-Platte pipettieren:
 - 20 µl Standards (ST1-5), doppelt
 - 20 µl stabilisierte Positivkontrolle und stabilisierte Probenextrakte, doppelt, (Unbekannt, UNK)
 - 20 µl ausgewählter Leerproben (BL UNK1-4) wie oben angegeben.

HINWEIS: Arbeiten Sie ab diesem Schritt bei gedämpften Lichtverhältnissen.

- Bereiten Sie den Master Mix vor, indem Sie **ASSAY COLOR REAGENT** in **ASSAY BUFFER C** geben und durch vorsichtige Rotation mischen.

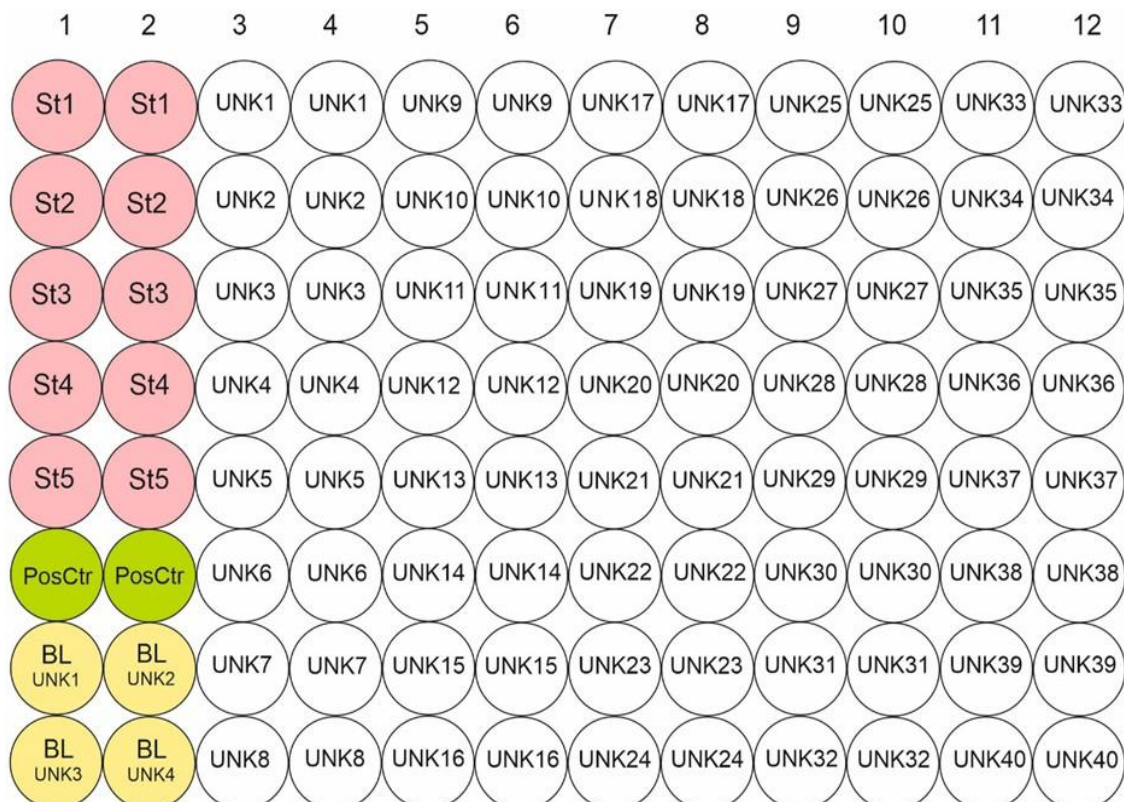
HINWEIS: Schützen Sie den Master Mix im Reservoir und auf der Platte beim Pipettieren mit einer

Abdeckung aus Aluminiumfolie.

4. Geben Sie 190 µl des Master Mixes OHNE NAD-ENZYME in jedes der vier Leerproben-Wells (BL UNK1-4).
5. Geben Sie 40 µl NAD-**ENZYME** in die Flasche mit dem verbleibenden Master Mix. Vorsichtig vermischen und Schaumbildung vermeiden. Geben Sie den Master Mix mit den hinzugefügten Enzymen in das Reservoir.
6. Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette 190 µl des Master Mixes MIT NAD-ENZYME in alle verbleibenden Wells. Schaumbildung und Licht vermeiden. Bedecken Sie die gebrauchsfertige Platte sofort mit Aluminiumfolie.
7. **NAD⁺-Assay:** die abgedeckte Platte 4 - 6 min bei Raumtemperatur inkubieren.
NADH-Assay: die abgedeckte Platte 6 - 10 min bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Stoppen Sie die Reaktionen, indem Sie mit einer Mehrkanalpipette 10 µl **STOP SOLUTION** in jedes Well in der gleichen Reihenfolge wie beim Master Mix hinzugeben. Schaumbildung vermeiden. Schwenken Sie die Platte vorsichtig mit der Hand auf der Arbeitsfläche hin und her und entfernen Sie etwaige Blasen mit einer Nadel.
9. Messen Sie die Lichtabsorption bei 573 nm unverzüglich nach Hinzufügung der STOP SOLUTION. Sofern möglich, schütteln Sie die Platte im Mikroplattenlesegerät für 5 Sekunden vor der Messung.

HINWEIS: Nach dem Hinzugeben der STOP SOLUTION kann die Farbintensität langsam gleichmäßig in allen Wells zunehmen. Dies liegt an den nichtenzymatischen Hintergrundvorgängen im Master Mix.

EMPFOHLENE PLATTENANORDNUNG ZUR NAD⁺- ODER NADH-MESSUNG



Plattenanordnung für NAD⁺- oder NADH-Assays: St = Standard, BL = Leerprobe (blank), PosCtr - stabilisierte Positivkontrolle, UNK = stabilisierte Proben mit unbekannter Metabolitenkonzentration. Beachten Sie, dass Leerproben (blanks) der ausgewählten Proben im Master Mix ohne NAD ENZYME-Zusatz analysiert werden.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

POSITIVKONTROLLE (ASSAY-QUALITÄTSKONTROLLE)

Die Positivkontrolle ist kein Referenzwert, sondern hat den Zweck, die Effektivität der Stabilisierungsschritte für NAD⁺ und NADH und den kolorimetrischen Assay zu überwachen. Vor der Berechnung der Probenergebnisse, bestätigen Sie, dass Ihre Positivkontrollen erwartungsgemäß funktionieren.

NAD⁺:

Im NAD⁺-Assay sollte die Menge des von der stabilisierten NAD⁺-Positivkontrolle absorbierten Lichts voraussichtlich im beobachteten Bereich der Standards ST3 und ST4 liegen. Der Absorptionsbereich entspricht einer NAD⁺-Konzentration von 23 - 27 µM (nach der Korrektur der 10fachen Verdünnung).

NADH:

Im NADH-Assay sollte die Menge des von der stabilisierten NADH-Positivkontrolle absorbierten Lichts gleich ST2 sein (+/-0,05 optische Einheiten). Der Absorptionsbereich entspricht einer NADH-Konzentration von 1,7 - 2,3 µM (nach der Korrektur der 10fachen Verdünnung).

PROBENERGEBNISSE

Berechnen Sie die Ergebnisse getrennt für jede Platte, wie unten angegeben. Im nachfolgenden Abschnitt TYPISCHE DATEN finden Sie Beispiele für Standardkurven und für die Berechnung der Ergebnisse für Kontrollteilnehmer.

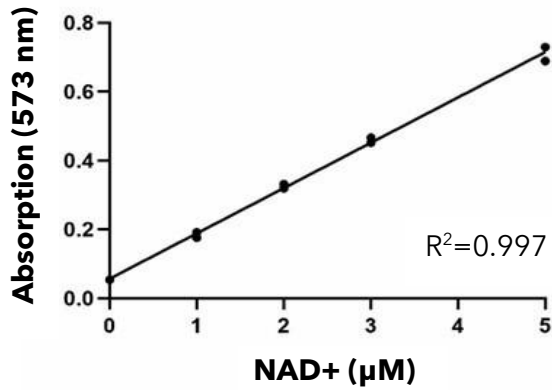
1. Berechnen Sie den Durchschnitt der Absorptionswerte für jeden Standard (ST1 - ST5).
2. Erstellen Sie eine Standardkurve, indem Sie die mittlere Absorption für jeden Standard auf der Y-Achse gegen die bekannte Standardkonzentration (in µM) auf der X-Achse eintragen. Führen Sie eine einfache lineare Regressionsanpassung der Standardkurve durch.
3. Berechnen Sie mithilfe der Formel für die lineare Regression der Standardkurve die Konzentration in den Wells für jede Probe und jede Leerprobe (UNK und BL UNK).
4. Berechnen Sie den Durchschnitt der Duplikate für jeden stabilisierten Probenextrakt.
5. Berechnen Sie den Durchschnitt der Leerproben (BL UNK 1 - 4). Der errechnete Wert repräsentiert ein unspezifisches Signal der stabilisierten Extrakte, der für die Probennormalisierung verwendet wird.
6. Korrigieren Sie die unspezifischen Signale, indem Sie den Durchschnitt der Leerproben vom Durchschnitt der Probenkonzentrationen subtrahieren.
7. Multiplizieren Sie mit 10, um die Konzentration (µM) von NAD⁺ und NADH im Blut zu erhalten.

HINWEIS: Wenn NAD⁺ stabilisierte Extrakte aufgrund der bekannten Anreicherung mit Vorläufern zusätzlich verdünnt wurden, muss die Konzentration mit einem zusätzlichen Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

TYPISCHE DATEN

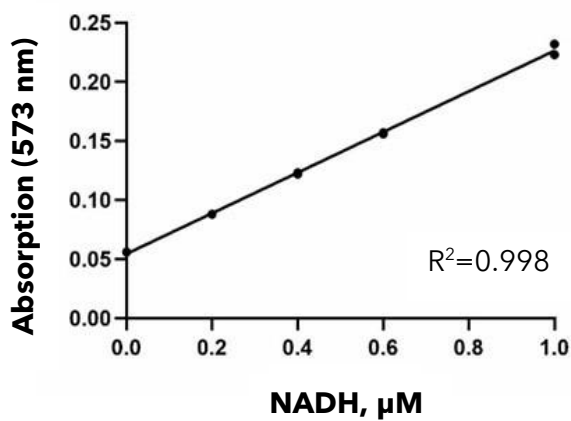
Die Standardkurve und die Konzentrationen der stabilisierten Probenextrakte werden nur zu Demonstrationszwecken bereitgestellt und sollten niemals statt der Echtzeit-Kalibrationskurve verwendet werden.

A) STANDARDKURVE FÜR NAD⁺



| Standard | NAD ⁺ (µM) | Absorption (573 nm) Assay-Zeit: 4 min |
|----------|-----------------------|--|
| ST1 | 0 | 0.054 |
| ST2 | 1 | 0.176 |
| ST3 | 2 | 0.319 |
| ST4 | 3 | 0.452 |
| ST5 | 5 | 0.689 |
| | | 0.730 |

B) STANDARDKURVE FÜR NADH



| Standard | NADH (µM) | Absorption (573 nm) Assay-Zeit: 6 min |
|----------|-----------|--|
| ST1 | 0 | 0.056 |
| ST2 | 0,2 | 0.088 |
| ST3 | 0,4 | 0.122 |
| ST4 | 0,6 | 0.156 |
| ST5 | 1 | 0.223 |
| | | 0.232 |

C) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE FÜR NAD+

Die Werte für die Konzentrationen in den stabilisierten Probenextrakten (UNK) und Leerproben (BL UNK 1 - 4) werden mit der linearen Anpassungsformel der NAD⁺-Standardkurve ermittelt.

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

*Korrigiert mittels Verdünnungsfaktor x 10

D) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE FÜR NADH

Die Werte für die Konzentrationen in den stabilisierten Probenextrakten (UNK) und Leerproben (BL UNK 1 - 4) werden mit der linearen Anpassungsformel der NADH-Standardkurve ermittelt.

| Unbekannt | Konzentration in stabilisierten Extrakten (µM) | Konzentration in stabilisierten Extrakten korrigiert mittels Durchschnitt der Leerproben (BL UNK 1 - 4, µM) | Endgültige NADH-Konzentration in der ursprünglichen Probe (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 | | |

*Korrigiert mittels Verdünnungsfaktor x 10

LEISTUNG UND GRENZEN

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 |
| NADH | 2.10 \pm 0.5 |

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

| Nachweisgrenze (μ M in Vollblut) | |
|---------------------------------------|-----------------|
| NAD+ | 0.33 \pm 0.2 |
| NADH | 0.19 \pm 0.05 |

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 |
| NADH | 0.40 \pm 0.1 |

PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT

Die Intra-Assay-Variationen bei der Messung wurde durch die Genauigkeit der Assayleistung 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 |
| NADH | 3.33 \pm 1.5 |

In der nachfolgenden Tabelle ist die Reproduzierbarkeit der Assay-Ergebnisse zusammengefasst.

Reproduzierbarkeit

| Probe | NAD+ | | | NADH | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|------|------|------|
| | Ctr1 | Ctr2 | Ctr3 | Ctr1 | Ctr2 | Ctr3 |
| N der Messungen* | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| Mittelwert (μ M) | 27.41 | 29.41 | 22.00 | 0.55 | 0.71 | 0.64 |
| Standardabweichung | 0.62 | 1.31 | 0.87 | 0.03 | 0.05 | 0.05 |
| VK (%) | 2.28 | 4.45 | 3.95 | 5.20 | 7.06 | 8.45 |

(N = Anzahl, * 3 Aliquots derselben Probe wurde als Triplikate analysiert).

GENAUIGKEIT

Die Testgenauigkeit wurde anhand von Proben mit bekannten Mengen an reinem NAD⁺ und NADH berechnet. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst (Testgenauigkeit +/- SD).

| Genauigkeit (%) | | |
|------------------|--------|---------------|
| NAD ⁺ | N = 32 | 97.13 ± 7.6 |
| NADH | N = 25 | 104.22 ± 16.5 |

CUT-OFF-WERT DES ASSAYS

Die niedrigsten und höchsten Cut-off-Werte repräsentieren die kleinsten und höchsten Konzentrationen, die bei 5 bis 7 % von Finnen in einem gegebenen Populationsausschnitt beobachtet wurden. In der Tabelle sind die Cut-off-Werte zusammengefasst.

| | Cut-off-Werte | |
|-----------------------|---------------|------|
| | Niedrig | Hoch |
| NAD ⁺ (µM) | 20 | 36 |
| NADH (µM) | 0.6 | 1.8 |

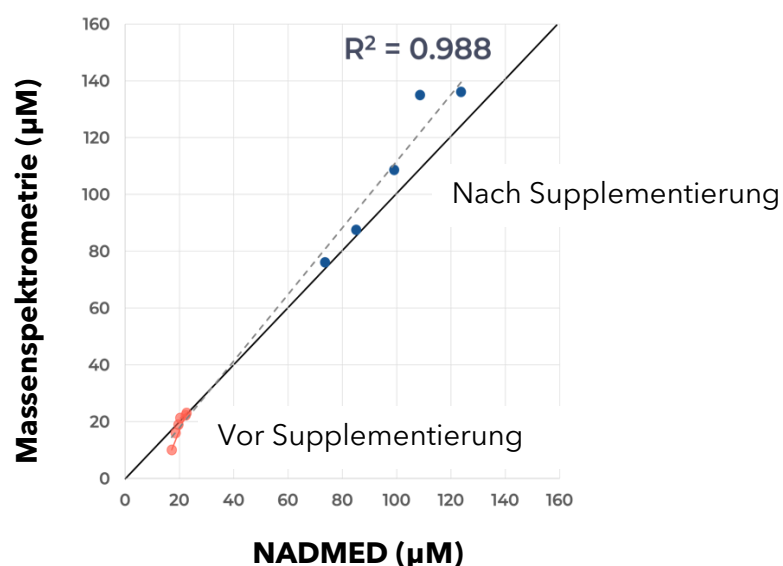
LEISTUNGSMERKMALE

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

Warnhinweis: Kaliumsorbat, Borat, Pyridin und Wismut in einer Probe können die Hemmung der Enzyme und damit eine Unterschätzung der Ergebnisse bewirken.

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 Patienten (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.



PLATTENANORDNUNG

Verwenden Sie diese Plattenanordnung, um Ihre Proben auf der Platte zu erfassen.

