

Q-NADMED BLOOD

Kit de ensayos de NAD+ y NADH

Q40 NAD+ & NADH Blood Kit (CE)

**Kit de ensayo cuantitativo para 40 muestras de
sangre total**

Versión 10.0

DE UN SOLO USO

Estas instrucciones deben leerse en su totalidad antes de usar este producto.

CE **IVD** **USO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO**

INFORMACIÓN GENERAL

Nombre comercial:

Kit de ensayo Q-NADMED Blood NAD⁺ y NADH: kit de ensayo cuantitativo para sangre total

Número de catálogo:

IVD_001; IVD_001/TH

Almacenamiento:

Entre -85 °C y -70 °C a la llegada

Fecha de publicación de las instrucciones:

Febrero de 2026

Fabricante:

NADMED Ltd / Oy

www.nadmed.com

info@nadmed.com

Tukholmankatu 8

Biomedicum 2U

00290 Helsinki

FINLANDIA

SÍMBOLOS DEL ENVASE



Contiene líquidos y vapores inflamables. Consultar PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS



Advertencia/Peligro. Consultar PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS



Consultar las instrucciones de uso



Fecha de caducidad



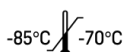
Número de catálogo



Código de lote



Fabricante



Límite superior de temperatura de almacenamiento



No usar si el paquete está dañado



Número de reacciones



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



Proteger de la luz directa



Mantener seco

ÍNDICE

INFORMACIÓN GENERAL	2
SÍMBOLOS DEL ENVASE.....	2
USO PREVISTO	4
ANTECEDENTES CLÍNICOS.....	4
PRINCIPIO DEL ENSAYO	4
MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS	5
ALMACENAMIENTO, ESTABILIDAD Y PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	7
PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS.....	8
RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS.....	8
MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS EN EL KIT.....	9
CONSIDERACIONES PRÁCTICAS	10
FLUJO DE TRABAJO CON EL KIT DE ENSAYO Q-NADMED BLOOD NAD ⁺ Y NADH.....	11
EXTRACCIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE NAD ⁺ Y NADH	12
PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES	14
PREPARACIÓN DEL CONTROL POSITIVO	16
MÉTODO DEL ENSAYO	17
CÁLCULO DE LOS RESULTADOS.....	19
EFICACIA Y LIMITACIONES	22
NOTAS	24
DISPOSICIÓN DE LA PLACA	25

USO PREVISTO

Q-NADMED Blood, un dispositivo médico para diagnóstico in vitro, es un kit de ensayo analítico para medir las concentraciones de los metabolitos NAD⁺ y NADH en sangre total humana. El ensayo es cuantitativo. Los usuarios previstos del kit de ensayo Q-NADMED son personal de laboratorio con formación. El principal uso previsto es detectar los cambios sistémicos de NAD⁺ y NADH. Los principales usuarios previstos de los resultados del ensayo son profesionales de la salud que interpretan los resultados obtenidos en el contexto del estado de salud o enfermedad del paciente. Los resultados del kit de ensayo de Q-NADMED pueden usarse para tomar decisiones sobre tratamientos de suplementación con precursores de NAD. El segundo uso previsto del kit de ensayo Q-NADMED es controlar los niveles de NAD⁺ y NADH en pacientes que reciben tratamientos como suplementación de precursores de NAD y para ajustar su dosis.

ANTECEDENTES CLÍNICOS

Los metabolitos NAD⁺ y NADH desempeñan un papel fundamental en la regulación del metabolismo humano y en la homeostasis energética como respuesta a diversos estímulos internos y externos. La investigación ha demostrado que los niveles sistémicos de NAD⁺ disminuyen en relación con la aparición de enfermedades, lo que indica una alteración del equilibrio energético del organismo (Covarrubias et al. 2021 [doi:10.1038/s41580-020-00313-x](https://doi.org/10.1038/s41580-020-00313-x)). La magnitud de esta reducción de NAD⁺ no es uniforme y varía entre distintas personas y enfermedades. La disminución significativa de NAD⁺ perjudica a la capacidad del organismo para mantener las funciones metabólicas básicas, una situación que persiste incluso con tratamiento instaurado. La investigación actual sobre la contribución de NAD⁺ y NADH en los mecanismos y la progresión de diferentes enfermedades es muy activa. La lista de patologías con sospecha de cambios en la concentración de NAD⁺ y NADH no deja de aumentar con pruebas publicadas para la enfermedad mitocondrial, el envejecimiento, la sepsis, las infecciones víricas, las enfermedades cardiovasculares y hepáticas, la diabetes de tipo 1 y de tipo 2, las enfermedades neurológicas y el cáncer (por ejemplo, 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 y Carnero 2021 [doi:10.1038/s41392-020-00354-w](https://doi.org/10.1038/s41392-020-00354-w)).

El ensayo Q-NADMED facilita el cribado de los pacientes, con el fin de detectar los déficits de NAD⁺ y NADH y permitir una intervención específica que corrija estas carencias y mejore la efectividad de los regímenes terapéuticos.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit mide el contenido intracelular de NAD⁺ y NADH. El principio del ensayo es una reacción enzimática cíclica con una detección colorimétrica del punto final. Primero, los metabolitos NAD⁺ y NADH se extraen juntos de una muestra de sangre total en un solo paso. Durante el proceso analítico, la muestra extraída se somete a mediciones independientes de NAD⁺ y NADH. En el primer segmento, el procedimiento se centra en estabilizar NAD⁺ mientras elimina activamente NADH. Por el contrario, en el segundo segmento, se da importancia a la estabilización de NADH y, de forma simultánea, se asegura la eliminación de NAD⁺. Los extractos estabilizados de NAD⁺ y NADH se analizan en dos placas separadas con una reacción enzimática acoplada a un cambio de color. La intensidad del cambio de color en el ensayo es directamente proporcional a la concentración de NAD⁺ o NADH en la mezcla de reacción.

MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Requisitos y limitaciones:

- Este kit se ha diseñado para medir NAD⁺ y NADH en sangre total. El ensayo NO es apto para medirlos en plasma o suero ni en células o tejidos cultivados.
- Para medir NAD⁺ y NADH, se necesitan 100 µL de sangre total. Sin embargo, un volumen de 150-200 µL es óptimo para realizar el ensayo de manera confiable.
- Las muestras se pueden analizar tanto frescas como congeladas.
 - a) La sangre fresca se puede analizar durante las primeras 72 horas desde la recogida. Después de la extracción, se debe conservar entre 4 y 8 °C hasta el análisis.
 - b) Las muestras congeladas deben almacenarse congeladas todo el tiempo antes del ensayo. No se permiten los ciclos continuos de congelación y descongelación. El tiempo de almacenamiento de las muestras congeladas es de un mes a -20 °C o de un año a -80 - -70 °C.
- En ensayos clínicos y estudios longitudinales, es importante tener prácticas preanalíticas consistentes. Procure la coherencia en el muestreo, la manipulación, el almacenamiento y el tipo de análisis (fresco o congelado). Las instrucciones para la extracción de sangre y las precauciones importantes aparecen a continuación.

Recogida de sangre:

Recogida: las muestras de sangre total extraídas de una vena (mediante métodos como la venopunción) y las muestras de sangre extraídas de otras partes del cuerpo (mediante un dispositivo de tipo lanceta) son válidas. En la página <https://www.nadmed.com/documents/> aparecen las instrucciones detalladas sobre la distribución en alícuotas y la congelación de muestras.

Volumen de muestra: el análisis propiamente dicho requiere un volumen pequeño de sangre total. Por lo tanto, si se analizan muestras congeladas, recomendamos dividir un volumen mayor de sangre total (por ejemplo, 2 o 3 ml) en alícuotas de 150 o 200 µL antes de congelarlas. Es fundamental que la sangre se recoja directamente en un tubo con anticoagulantes para mantener la concentración objetivo de anticoagulantes en la muestra.

Anticoagulantes: por lo general, las muestras de sangre total se deben recoger en tubos específicos con anticoagulantes como K2 EDTA o heparina de litio (HL) y se deben mezclar adecuadamente mediante inversión. La concentración definitiva de anticoagulantes debe encontrarse entre 1,2 y 2 mg de K2 EDTA por 1 ml de sangre recogida, o entre 17 y 18 IU de HL por 1 ml de sangre recogida. Para la recogida de sangre venosa, recomendamos tubos para extracción por sistema de vacío con un recubrimiento de K2 EDTA o HL pulverizados diseñados para dar lugar a las concentraciones de anticoagulantes indicadas anteriormente (por ejemplo, BD Vacutainer® o Vacuette®).

Precauciones importantes para garantizar la integridad y la fiabilidad de los resultados:

Mezcla de la muestra: si la sangre total permanece estable, se separa en dos fases diferentes. Durante el procesamiento, una muestra fresca debe mezclarse minuciosamente y frecuentemente.

Temporización del análisis y de la división en alícuotas: si no puede analizar la muestra de sangre inmediatamente después de la recogida, asegúrese de que la divide en partes (alícuotas) durante las primeras 72 horas en el volumen preferido de 150-200 µL.

Almacenamiento de las alícuotas: guarde las alícuotas en microtubos de polipropileno transparente, con pared sencilla y no estériles. Los tubos deben tener una capacidad de entre 0,5 y 2 ml. Después de dividirlos en alícuotas, congele rápidamente las muestras. Para la congelación utilice recipientes de muestra previamente enfriados a temperaturas de -80 °C a -20 °C.

Prácticas no recomendadas: no congele grandes volúmenes (2-3 ml) de sangre directamente en los tubos de recolección. Se desaconseja el uso de microtubos con faldón y doble pared. Estas prácticas pueden aumentar significativamente el tiempo necesario para congelar y descongelar. Unos tiempos largos de descongelación pueden dar lugar a una gran variabilidad en los resultados del ensayo, lo que repercute en la precisión y en la fiabilidad de los análisis.

ALMACENAMIENTO, ESTABILIDAD Y PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Antes de abrirlo, todos los componentes del kit deben estar almacenados a entre -85 °C y -70 °C. Evite las fluctuaciones de temperatura en el congelador.

REACTIVO	DESCRIPCIÓN (*)	PREPARACIÓN (**)	ESTABILIDAD (**)
BUFFER DE EXTRACCIÓN A	28 ml Suficiente para 40 muestras	Equilibrar a temperatura ambiente. Listo para su uso.	Estable durante dos semanas a temperatura ambiente desde la descongelación.
ESTABILIZADOR DE NAD+	8 ml Suficiente para 40 muestras		
ESTABILIZADOR DE NADH	8 ml Suficiente para 40 muestras		
POSITIVE CONTROL (BUFFER)	200 µL Suficiente para dos placas		
AGUA DESIONIZADA	10 ml Suficiente para dos placas		
STOP SOLUTION	3 ml Suficiente para dos placas	Equilibrar a temperatura ambiente. Listo para su uso. Si se han formado precipitados, caliente la solución a +37 °C y déjala enfriar a temperatura ambiente antes del ensayo.	
BUFFER DE ENSAYO C	2 × 19 ml Una alícuota por cada placa de 96 pocillos	Equilibrar a temperatura ambiente. BUFFER DE ENSAYO C + ASSAY COLOR REAGENT = Mezcla maestra del ensayo. Véase la guía de preparación en la página 17.	Estable durante 12 horas a temperatura ambiente desde la descongelación. Debe conservarse en la botella de color ámbar.
ASSAY COLOR REAGENT	2 × 3 ml Una alícuota por cada placa de 96 pocillos		Estable durante 3 horas a temperatura ambiente desde la descongelación. Debe conservarse en la botella de color ámbar.
NAD+ STANDARD STOCK	40 µL (1 mM) Suficiente para estándares y control positivo	Véase guía de preparación en la página 14.	Se debe utilizar inmediatamente después de la descongelación. Debe protegerse de la luz.
NADH STANDARD STOCK	40 µL (1 mM) Suficiente para estándares y control positivo		
NAD ENZYME	2 × 40 µL Una alícuota por cada placa de 96 pocillos	Añadir a la mezcla maestra del ensayo solo después de haber procesado los blancos de la placa.	Se debe utilizar inmediatamente después de la descongelación.

* Variación aceptada del volumen de relleno del 5 %.

** Temperatura ambiente: ENTRE 15 °C Y 25 °C

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Uso exclusivo para *diagnóstico in vitro*. Para uso exclusivo de personal cualificado. No fumar, beber, comer ni maquillarse en el área de trabajo. Usar guantes de protección, ropa protectora y protección ocular. Lavarse bien las manos después de su manejo.

El **BUFFER DE EXTRACCIÓN A** puede causar irritación de los ojos. Manejar con cuidado, usar gafas de protección.

El **ESTABILIZADOR DE NAD⁺** puede causar irritación en la piel y los ojos. Manejar con cuidado; usar guantes y gafas de protección.

El **ESTABILIZADOR DE NADH** puede causar irritación de la piel, los ojos y las vías respiratorias. Evitar la inhalación de los vapores.

La **STOP SOLUTION** puede causar irritación de la piel, los ojos y las vías respiratorias. Evitar la inhalación de los vapores.

El **ASSAY COLOR REAGENT** puede causar irritación de la piel. Manejar con cuidado, usar guantes.

En la ficha de datos de seguridad ([FDS](#)) de Q-NADMED aparecen los peligros que comportan los químicos que hay en este kit y la información de advertencia pertinente asociada a esos peligros.

En la ficha de datos de seguridad ([FDS](#)) de Q-NADMED se describe la eliminación de los componentes usados del kit.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Si surgen dificultades durante la extracción o la ejecución del ensayo, consulte la guía de resolución de problemas en <https://www.nadmed.com/documents/>.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS EN EL KIT

CATEGORÍA	ELEMENTO	ESPECIFICACIONES/REQUISITOS
Fungible	Microtubos, 1.5 mL transparente/natural	Utilice tubos de microcentrífuga no estériles hechos de material de polipropileno (PP) de color destinado al diagnóstico in vitro (p. ej., ref. Sarstedt 72.690.001). <u>NO</u> son compatibles con el ensayo NADMED: a) los microtubos estériles de grado biología molecular, libres de endotoxinas, pirógenos y ADN humano, de baja retención y esterilizados mediante métodos químicos. b) los microtubos destinados a trabajos con proteínas con la marca "LoBind".
	Placas de 96 pocillos (2 unidades.)	Utilice placas no estériles, transparentes, de poliestireno y con el fondo plano con propiedades de fijación media de proteínas diseñadas para ensayos de colorimetría (por ejemplo, Revvity, ref. 6055640).
	Reservorios de líquidos para pipetas multicanal (2 unidades)	Utilice plástico de poliestireno no estéril. Use reservorios separados para la mezcla maestra del ensayo y la STOP SOLUTION.
	Puntas de pipeta	Utilice puntas de pipeta no estériles, biseladas, con baja retención.
	Hielo (baño de agua con hielo)	Llene un recipiente con hielo de laboratorio envasado y vierta agua fría del grifo hasta alcanzar un estado similar al granizado. El agua añadida es suficiente cuando la parte líquida de la muestra está sumergida en agua pero el hielo mantiene firmemente los tubos insertados en posición vertical (evite que las muestras floten en el agua).
	Papel de aluminio	Utilice cubiertas de aluminio para proteger las muestras, los estándares y las placas de la luz durante la ejecución del ensayo como se indica en las instrucciones.
Equipamiento y maquinaria	Pipetas calibradas	Pipetas monocanal para volúmenes de, por ejemplo, 5-50 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL. Pipetas multicanal para volúmenes de, por ejemplo, 5-50 µL y 30-300 µL.
	Microcentrífuga	Utilice una centrífuga con refrigeración a 4 °C y velocidad de 20 000 × g
	Lector de microplacas espectrofotométrico	a) Capaz de medir la absorbancia en una longitud de onda de 570-573 nm. b) Brillo/intensidad de escaneo ajustable. Seleccionar "bajo" o, de manera alternativa, ajustar el brillo en función del número de flashes por medición a 5-10 flashes.
	Baño seco con bloque de calor apto para 1,5 ml Microtubos	Se requiere una temperatura ajustable de hasta 80 °C. Para garantizar resultados fiables y consistentes, compruebe la transmisión de calor y calibre la temperatura: 1. Configure el bloque de calor en 80 °C y espere a que alcance una temperatura entre 75 °C y 80 °C. 2. Añada 500 µL de agua en un microtubo y coloque el tubo en el bloque de calor. Asegúrese de que el microtubo encaja bien en el bloque. 3. Introduzca un termómetro convencional de laboratorio en el microtubo con agua. 4. Mida el tiempo necesario para que alcance 75 °C. Se considera que la transmisión de calor es suficiente si se alcanza la temperatura en 5 minutos. En caso de que NO se alcance la temperatura correcta con la configuración de 80 °C en 5 minutos: a) asegúrese de que los tubos encajan bien en el bloque b) aumente la temperatura objetivo del dispositivo. Efectúe una recalibración.
Especial	Posibilidad de trabajar en la penumbra para la parte del ENSAYO de la medición. Consulte los capítulos CONSIDERACIONES PRÁCTICAS y FLUJO DE TRABAJO CON EL ENSAYO Q-NADMED BLOOD NAD+ Y NADH.	

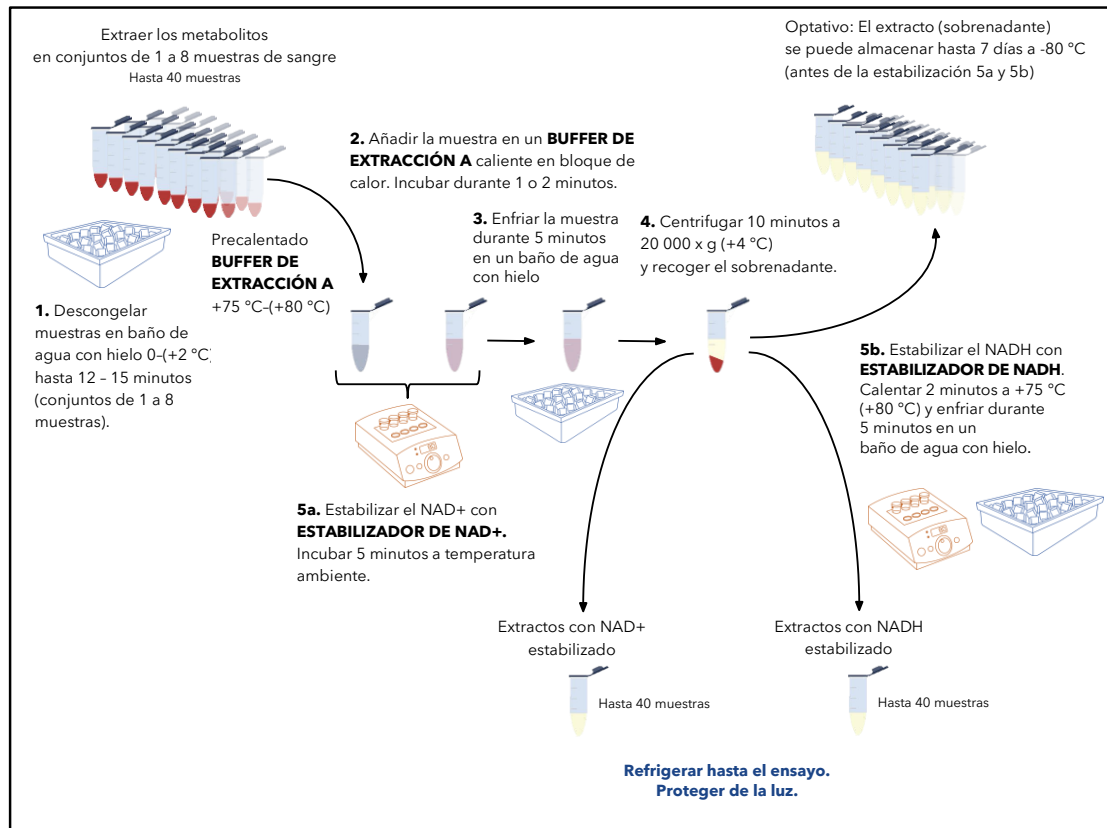
CONSIDERACIONES PRÁCTICAS

 Puede consultar las instrucciones con imágenes en <https://www.nadmed.com/products/nad-nadh-kit/>

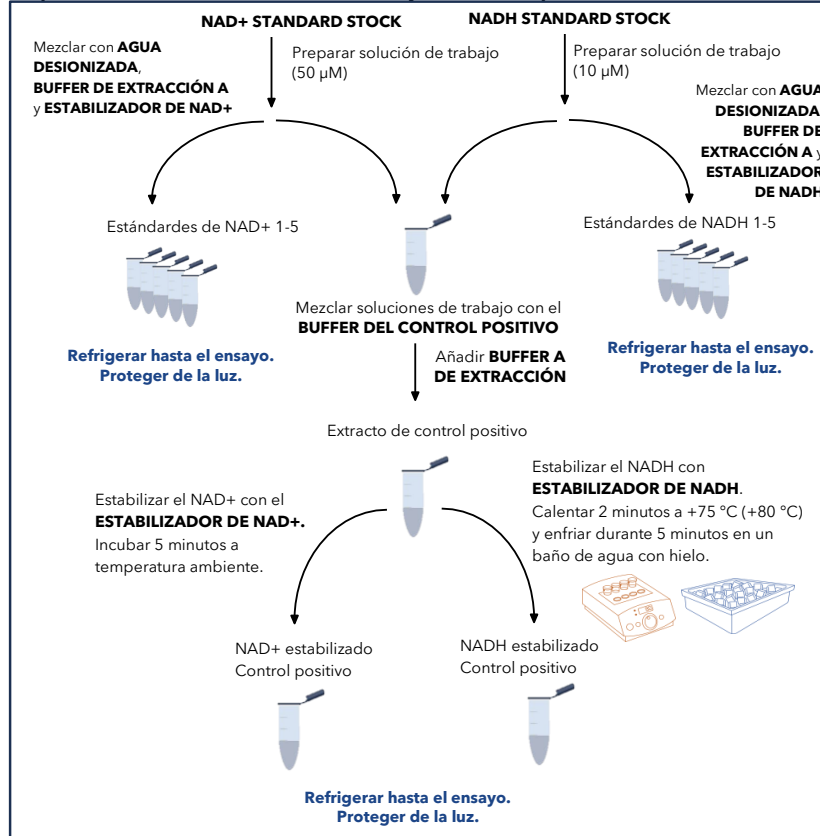
CATEGORÍA	INSTRUCCIONES
Limitaciones	Lea detenidamente el capítulo MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS. El ensayo se ha diseñado para sangre total y NO es apto para medir el NAD⁺ o NADH en plasma o suero ni en células o tejidos cultivados. No use los componentes del kit pasada la fecha de caducidad. No mezcle materiales de kits de diferente lote. No se permiten los ciclos continuos de congelación y descongelación de reactivos.
Usabilidad	Mezcle bien los reactivos con un suave movimiento circular. Debe centrifugar los microtubos sin demora a baja velocidad antes de abrirse. Recomendamos llevar el AGUA DESIONIZADA, el BUFFER DE EXTRACCIÓN A, el ESTABILIZADOR DE NAD⁺, el ESTABILIZADOR DE NADH y la STOP SOLUTION a temperatura ambiente un día antes del ensayo. Deje que el BUFFER C y el ASSAY COLOR REAGENT alcancen una temperatura ambiente el día del ensayo. Estas botellas necesitan entre 2 y 3 horas para descongelarse.
Precisión	Los análisis de NAD⁺ y NADH se llevan a cabo en dos placas separadas. Recomendamos que ambos ensayos se efectúen el mismo día. Para evitar la contaminación cruzada, utilice puntas de pipeta nuevas cuando se añadan el estándar, las muestras y los reactivos. Evite tocar el contenido de los pocillos con las puntas de pipeta cuando trabaje con pipetas multicanal. Las pipetas de alta precisión y las puntas biseladas de baja retención mejorarán la precisión. El BUFFER C y la STOP SOLUTION contienen detergentes. Para evitar la formación de burbujas, pipetee la mezcla maestra y la STOP SOLUTION presionando la pipeta solo hasta la primera posición de parada. Elimine cualquier burbuja que hubiera en los pocillos con una aguja pequeña antes de introducir la placa en el lector.
Protección contra la luz	Proteja contra la luz los extractos de muestra, los estándares y los controles positivos estabilizados cuando no se estén procesando activamente. No obstante, por conveniencia, la extracción, la preparación y el pipeteado en las placas de 96 pocillos pueden llevarse a cabo en condiciones lumínicas normales. El ASSAY COLOR REAGENT es un compuesto amarillo sensible a la luz que se vuelve marrón si se da una reacción enzimática del ensayo. Una exposición prolongada a luz natural o artificial directa produce una alteración de color inespecífica que deriva en verde. Para minimizar la interferencia de la luz con el ensayo, el protocolo especifica los pasos que exigen un entorno de penumbra. Para proteger las reacciones tanto de la luz natural como de la luz artificial directa, recomendamos lo siguiente: • Apague todas las fuentes de luz artificial que iluminen directamente el banco. Cierre las persianas o sepárese de las ventanas. • Tape con papel de aluminio la placa y los reservorios de la pipeta siempre que trabaje con el ASSAY COLOR REAGENT y la mezcla maestra. • Cubra con papel de aluminio las placas de 96 pocillos durante las fases de incubación hasta que se introduzca la placa en el lector (no la envuelva).

FLUJO DE TRABAJO CON EL KIT DE ENSAYO Q-NADMED BLOOD NAD⁺ Y NADH

1. Extracción de los metabolitos y estabilización de NAD⁺/NADH



2. Preparación de estándares de NAD⁺/NADH y de controles positivos de NAD⁺/NADH



3. Ensayos de NAD⁺ y NADH

- Equilibre los reactivos, extractos de las muestras, extractos de controles positivos y estándares a temperatura ambiente.
 - Pipetee los estándares, los extractos de las muestras y los extractos de controles positivos en las placas de NAD y NADH según la disposición de la placa.
- Trabaje en una placa a la vez. Trabaje en condiciones de penumbra. Proteja de la luz los reservorios de la placa y el reactivo.**
- Prepare el buffer del ensayo (**BUFFER C** y **ASSAY COLOR REAGENT**). Añada el buffer del ensayo a los pocillos en blanco.
 - Añada la **ENZYME** al buffer del ensayo (**BUFFER C** y **ASSAY COLOR REAGENT**). Añada el buffer del ensayo (+Enzyme) a los pocillos del estándar, el positivo control y la muestra.
- NAD+ 4 - 6 min
- NADH 6 - 15 min
- Agregue la **STOP SOLUTION** y mida la absorbancia a 573 nm.
 - Calcule los resultados y confirme la calidad del ensayo (lectura de controles positivos).

EXTRACCIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE NAD⁺ Y NADH

Esta sección ofrece las directrices para extraer NAD⁺ y NADH de la sangre total. Después de la extracción, se estabilizan NAD⁺ y NADH de forma individual en preparaciones para ensayos de colorimetría independientes. Los extractos (después del centrifugado) se pueden almacenar entre -80 °C y -70 °C durante una semana, antes de estabilizarlos el día de los ensayos.

CONSEJO: Puede consultar las instrucciones en vídeo en <https://www.nadmed.com/products/nad-nadh-kit/>

NOTA: La dilución final de la muestra original de sangre total será 1:10. En caso de que el sujeto tome suplementación con precursores de NAD, es posible que se incrementen los niveles sanguíneos de NAD⁺. Por lo tanto, el extracto estabilizado de NAD⁺ debe diluirse adicionalmente en una proporción 1:2 con AGUA DESIONIZADA (proporcionada) antes del ensayo colorimétrico. En este caso, la dilución de la muestra original de sangre será 1:20 para NAD⁺. Los extractos de NADH estabilizados no requieren dilución.

Materiales:

Baño seco con bloque de calor configurado a 75 °C - 80 °C	Consulte la tabla MATERIALES NECESARIOS
Baño de agua helada	Consulte la tabla MATERIALES NECESARIOS
Microcentrífuga	Consulte la tabla MATERIALES NECESARIOS
Microtubos	Marcados para todos los pasos
BUFFER DE EXTRACCIÓN A	Temperatura ambiente
ESTABILIZADOR DE NAD ⁺	Temperatura ambiente
ESTABILIZADOR DE NADH	Temperatura ambiente
AGUA DESIONIZADA	Temperatura ambiente

Extracción:

1. Pipetee 500 µL del **BUFFER DE EXTRACCIÓN A** en microtubos de 1,5 ml para todas las muestras. Cierre las tapas.
2. a) Si se trabaja con sangre fresca, se debe continuar con la extracción con el BUFFER DE EXTRACCIÓN A.
b) Si trabaja con muestras de sangre total congeladas, descongélelas en el baño de agua helada de la siguiente manera:
 - Trabaje con grupos de entre 1 y 8 muestras a la vez.
 - Durante los primeros minutos de descongelación, retire el hielo que se haya formado en las paredes del tubo.
 - La descongelación debe terminar en un plazo de entre 12 y 15 minutos. Supervise la descongelación y facilítela si es necesario: sujete la muestra durante 2 o 3 segundos y vuélvala a dejar en el baño de agua con hielo; repita la operación cada 2 minutos.

3. Precaliente el BUFFER DE EXTRACCIÓN A (en grupos de entre 1 y 8 muestras) en el baño seco con bloque de calor configurado a 80 °C, hasta alcanzar la temperatura objetivo calibrada de 75-80 °C (véase el apartado MATERIALES NECESARIOS).
4. Mezcle la sangre total descongelada con algunos ciclos de pipeteado ascendente y descendente para evitar que se forme espuma.
5. Sin extraer el microtubo del BUFFER DE EXTRACCIÓN A del bloque de calor, inyecte la muestra de esta forma:
 - Pipetee 100 µL de sangre en el BUFFER DE EXTRACCIÓN A sin tocar el fondo del tubo.
 - Mezcle rápidamente con 5 a 7 ciclos intensos de pipeteado ascendente y descendente y rote simultáneamente la punta para mezclar eficientemente la muestra fría con el BUFFER DE EXTRACCIÓN A caliente.
6. Incube cada una de las reacciones entre 75 °C y 80 °C durante 1 o 2 minutos. Mantenga constante el tiempo de incubación de todas las muestras.
7. Enfríe el extracto en el baño de agua con hielo durante un mínimo de 5 minutos. Compruebe que la muestra se ha extraído satisfactoriamente. Después de haberla enfriado en el hielo, el homogeneizado debería polimerizarse sin dejar líquido.
- ↻ Repita la extracción con los siguientes lotes de entre 1 y 8 muestras.
8. Centrifugue los extractos a 20 000 × g durante 10 minutos a 4 °C. Transfiera el sobrenadante a un microtubo limpio y deseche el pellet.
9. Proteja de la luz los extractos de muestra (sobrenadantes) y refrigérelos (entre 4 °C y 8 °C) **durante 1 hora antes de proceder con los pasos de estabilización.**
- ↗ Optativo: Los sobrenadantes pueden almacenarse a una temperatura de entre -80°C y -70°C durante una semana. En este caso, descongele los extractos congelados a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de proceder con la estabilización que se explica a continuación.

Estabilización:

10. Equilibre el extracto a temperatura ambiente y prepare dos alícuotas de 150 µL en dos microtubos limpios.
11. En la primera alícuota de 150 µL, añada 100 µL de **ESTABILIZADOR DE NAD⁺**. Agítela en vórtex e incúbela a temperatura ambiente durante 5 minutos.
12. A la segunda alícuota de 150 µL añada 100 µL de **ESTABILIZADOR DE NADH**. Agítela en vórtex e incúbela durante 2 minutos en un baño seco a 80 °C. Enfríela en hielo durante 5 minutos.
13. Proteja de la luz los extractos de muestra estabilizadas y manténgalos refrigerados (entre 4 °C y 8 °C) antes de pipetearlos en las placas del ensayo.

PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES

Prepare los estándares el día del ensayo. Prepare los conjuntos de estándares de uno en uno, empezando por NAD+. Las soluciones estándar de trabajo preparadas aquí se emplean para preparar la mezcla de controles positivos.

NOTA: Utilice la misma pipeta para el AGUA DESIONIZADA y para las soluciones estándar de trabajo para mejorar la precisión.

Materiales:

NAD+ STANDARD STOCK a 1 mM	Descongelar después de usar. Centrifugar a baja velocidad antes de abrir
NADH STANDARD STOCK a 1 mM	Descongelar después de usar. Centrifugar a baja velocidad antes de abrir
BUFFER DE EXTRACCIÓN A	Temperatura ambiente
ESTABILIZADOR DE NAD+	Temperatura ambiente
ESTABILIZADOR DE NADH	Temperatura ambiente
AGUA DESIONIZADA	Temperatura ambiente

Protocolo:

- Descongele los microtubos con NAD+ STANDARD a 1 mM y NADH STANDARD a 1 mM durante 5 minutos a temperatura ambiente. Proteja de la luz con una tapa de papel de aluminio mientras se descongela.
- Prepare **solución de trabajo de NAD+ a 50 mM** añadiendo 25 µL de NAD+ STANDARD STOCK a 1 mM en 475 µL de AGUA DESIONIZADA. Agítela en vórtex. Continúe con la preparación de los estándares de NAD+ de acuerdo con la siguiente tabla y pipetee los reactivos en el orden indicado.

PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES DE NAD+					
ID DEL ESTÁNDAR	CONCENTRACIÓN DE NAD+ (µM)	AGUA DESIONIZADA (µL)	Solución de trabajo de NAD+ a 50 µL (µL)	BUFFER DE EXTRACCIÓN A (µL)	ESTABILIZADOR DE NAD+ (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

- Prepare **solución de trabajo de NADH a 10 mM** añadiendo 10 µL de NADH STANDARD STOCK a 1 mM en 990 µL de AGUA DESIONIZADA. Agítela en vórtex. Continúe con la preparación de los estándares de NADH de acuerdo con la siguiente tabla y pipetee los reactivos en el orden indicado.

PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES DE NADH

ID DEL ESTÁNDAR	CONCENTRACIÓN DE NADH (μM)	AGUA DESIONIZADA (μL)	Solución de trabajo de NADH a 10 μL (μL)	BUFFER DE EXTRACCIÓN A (μL)	ESTABILIZADOR DE NADH (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. Agite en vórtex todos los estándares. Proteja de la luz los estándares y manténgalos refrigerados (entre 4 °C y 8 °C) antes de pipetearlos en las placas de ensayo.

PREPARACIÓN DEL CONTROL POSITIVO

El control positivo simula el nivel de metabolitos de NAD en una muestra de sangre de un sujeto humano sano. El control positivo se somete a los mismos pasos de extracción y estabilización que las muestras de sangre total. La concentración esperada de NAD⁺ en el control positivo es de $25 \pm 2 \mu\text{M}$, y la de NADH es de $2 \pm 0,3 \mu\text{M}$, según el cálculo de los resultados.

NOTA: El control positivo se prepara el día del ensayo –justo después de preparar los estándares– debido a la estabilidad limitada de la solución de trabajo de NADH a $10 \mu\text{M}$.

Materiales:

Baño seco con bloque de calor configurado a $75^\circ\text{C} - 80^\circ\text{C}$	Consulte la tabla MATERIALES NECESARIOS
Baño de agua helada	Consulte la tabla MATERIALES NECESARIOS
Solución de trabajo de NAD ⁺ a $50 \mu\text{M}$	A partir de la preparación de estándares; temperatura ambiente
Solución de trabajo de NAD ⁺ a $10 \mu\text{M}$	A partir de la preparación de estándares; temperatura ambiente
POSITIVE CONTROL (BUFFER)	Temperatura ambiente
BUFFER DE EXTRACCIÓN A	Temperatura ambiente
ESTABILIZADOR DE NAD ⁺	Temperatura ambiente
ESTABILIZADOR DE NADH	Temperatura ambiente

Protocolo:

1. Prepare la muestra de control positivo en un microtubo. Agítela en vórtex.

45 μL de **POSITIVE CONTROL (BUFFER)**
75 μL de **solución de trabajo de NAD⁺ a $50 \mu\text{M}$**
30 μL de **solución de trabajo de NADH a $10 \mu\text{M}$**

2. Pipetee 500 μL del **BUFFER DE EXTRACCIÓN A** en un microtubo limpio.
3. Añada 100 μL de la mezcla de control positivo en el BUFFER DE EXTRACCIÓN A. Agítela en vórtex.

NOTA: El control positivo se extrae con el BUFFER DE EXTRACCIÓN A a temperatura ambiente (no se necesita calentamiento).

4. Prepare dos alícuotas de 150 μL del extracto de control positivo en microtubos limpios.
5. En la primera alícuota de 150 μL , añada 100 μL de **ESTABILIZADOR DE NAD⁺**. Agítela en vórtex e incúbela a temperatura ambiente durante 5 minutos.
6. A la segunda alícuota de 150 μL añada 100 μL de **ESTABILIZADOR DE NADH**. Agítela en vórtex e incúbela durante 2 minutos en un bloque de calor de baño seco a 80°C . Enfríela en hielo durante 5 minutos.
7. Proteja de la luz los extractos del control positivo de NAD⁺ y NADH estabilizados y manténgalos refrigerados (entre 4°C y 8°C) antes de pipetearlos en las placas de ensayo.

MÉTODO DEL ENSAYO

El método del ensayo es el mismo para las mediciones de NAD⁺ y NADH.

Los blancos se utilizan para corregir las señales de fondo debidas a interacciones inespecíficas entre los componentes del extracto y el ASSAY COLOR REAGENT en la mezcla maestra. Todas las muestras en blanco están incubadas con la mezcla maestra sin NAD ENZYME añadida. El control positivo no necesita un blanco separado. Los blancos se deben preparar (como mínimo) a partir de cuatro extractos de muestra estabilizados representativos. Si los sujetos analizados tienen registros de suplementación con NAD, recomendamos utilizar muestras con y sin suplementación como blancos (dos pocillos por condición, como mínimo).

NOTA: Los pasos 1 y 2 se llevan a cabo en condiciones lumínicas normales. **A partir del paso 3, los pasos se llevan a cabo en condiciones de penumbra (consulte las CONSIDERACIONES PRÁCTICAS: Protección contra la luz).**

NOTA: La intensidad de color en el ensayo de NADH es, por lo general, menor que en el de NAD⁺, debido a la menor concentración de NADH en los estándares y la sangre total. Siga los tiempos de incubación sugeridos para NAD⁺ y NADH. No obstante, la reacción puede detenerse una vez que se haya desarrollado un gradiente de color definido en los estándares y se observe una diferencia clara en la intensidad del color entre las muestras con enzima añadida y los blancos. Cuanto más largo sea el tiempo de reacción, más intensa es la señal que se observa.

NOTA: Use reservorios separados para la mezcla maestra y la STOP SOLUTION.

Materiales:

Lector espectrofotométrico	Consulte la tabla MATERIALES NECESARIOS
BUFFER DE ENSAYO C	Temperatura ambiente
ASSAY COLOR REAGENT	Temperatura ambiente
NAD ENZYME	Descongelar después de usar. Centrifugar a baja velocidad antes de abrir.
STOP SOLUTION	Temperatura ambiente

Protocolo (lleve a cabo los ensayos NAD⁺ y NADH en placas separadas. Trabaje con un ensayo cada vez):

1. Equilibre los estándares preparados, los extractos de muestra estabilizados y el control positivo durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de pipetearlos en la placa.
2. Según la distribución de la placa recomendada (véase la siguiente página), pipetee en la placa de 96 pocillos:

20 µL de estándares (ST1-5) en duplicado

20 µL de control positivo estabilizado y extractos de muestra estabilizados en duplicado (desconocidos, UNK), y

20 µL de blancos seleccionados (BL UNK1-4), según se indicó anteriormente.

NOTA: A partir de este paso, trabaje en condiciones de penumbra.

3. Prepare la mezcla maestra añadiendo el **ASSAY COLOR REAGENT** al **BUFFER C** y mézclela con suavidad con movimientos rotatorios.

NOTA: Proteja con un papel de aluminio la mezcla maestra del reservorio y la placa durante el pipeteado.

- Añada 190 µL de la mezcla maestra SIN NAD ENZYME a cada uno de los cuatro pocillos de blancos (BL UNK1-4).
- Añada 40 µL de NAD **ENZYME** a la botella con la mezcla maestra restante. Mezcle con cuidado evitando la formación de espuma. Vierta la mezcla maestra con la enzima añadida en el reservorio.
- Añada 190 µL de la mezcla maestra CON NAD ENZYME a todos los pocillos restantes mediante una pipeta multicanal. Evite que se forme espuma y la exposición a la luz. Cubra inmediatamente la placa preparada con la tapa de papel de aluminio.
- Ensayo de NAD⁺:** incube la placa cubierta durante 4-6 minutos a temperatura ambiente.
Ensayo de NADH: incube la placa cubierta entre 6 y 15 minutos a temperatura ambiente.
- Detenga las reacciones añadiendo 10 µL de **STOP SOLUTION** a cada pocillo en el mismo orden que la mezcla maestra con una pipeta multicanal. Evite que se forme espuma. Agite suavemente la placa con la mano en una superficie plana y elimine las burbujas con una aguja.
- Mida la absorbancia de la luz a 573 nm inmediatamente después de añadir la STOP SOLUTION. Si es posible, agite la placa dentro del lector de microplacas durante 5 segundos antes de la medición.

NOTA: Después de añadir la STOP SOLUTION, la intensidad de color puede aumentar de manera uniforme en todos los pocillos. Esto es esperado debido a la reacción de fondo no enzimática en la mezcla maestra.

DISPOSICIÓN DE PLACA RECOMENDADA PARA LAS MEDICIONES DE NAD⁺ Y 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

Disposición de la placa para el ensayo de NAD⁺ o NADH: St = estándar, BL = blanco, PosCtr = control positivo estabilizado, UNK = muestras estabilizadas con concentración de metabolitos desconocida. Tenga en cuenta que los blancos (BL) de las muestras seleccionadas se analizan en la mezcla maestra sin NAD ENZYME añadida.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

CONTROL POSITIVO (CONTROL DE CALIDAD DEL ENSAYO)

El control positivo no es una referencia, sino que tiene como objetivo controlar la eficiencia de la estabilización de NAD⁺ y NADH y del ensayo de colorimetría. Antes de calcular los resultados de las muestras, confirme que los controles positivos presentan el resultado previsto.

NAD⁺:

En un ensayo de NAD⁺, la cantidad de luz absorbida por el control positivo de NAD⁺ estabilizado debería encontrarse en el intervalo observado para los estándares ST3 y ST4. Este intervalo de absorbancia corresponde a una concentración de NAD⁺ de 23-27 μM (después de corregir una dilución de 10:1).

NADH:

En un ensayo de NADH, la cantidad de luz absorbida por el control positivo de NADH estabilizado debería ser igual a ST2 (+/-0,05 unidades ópticas). Esta absorbancia corresponde a una concentración de NADH de 1,7-2,3 μM (después de corregir una dilución de 10:1).

RESULTADOS DE LA MUESTRA

Calcule los resultados de cada placa por separado como se indica a continuación. El capítulo DATOS TÍPICOS, a continuación, presenta ejemplos de las curvas estándar y el cálculo de los resultados para los sujetos de control.

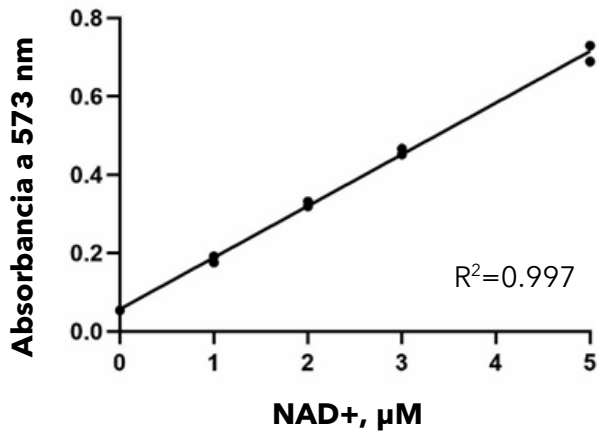
1. Calcule la media de las lecturas de absorbancia para cada estándar (ST1-ST5).
2. Cree una curva estándar graficando la absorbancia media de cada estándar en el eje Y contra la concentración conocida del estándar (en μM) en el eje X. Calcule una regresión lineal sencilla basada en la curva estándar.
3. Usando la fórmula de regresión lineal de la curva estándar, calcule la concentración en cada uno de los pocillos de muestras y blancos (UNK y BL UNK).
4. Calcule la media de los duplicados para cada extracto de muestra estabilizado.
5. Calcule la media de los blancos (BL UNK1-4). El valor obtenido representa la señal inespecífica del extracto estabilizado utilizado para la normalización de la muestra.
6. Corrija las señales inespecíficas restando la media de los blancos de la media de las concentraciones de las muestras.
7. Multiplicar por 10 para obtener la concentración (μM) de NAD⁺ y NADH en sangre.

NOTA: Si los extractos estabilizados de NAD⁺ han sido diluidos adicionalmente debido al consumo conocido de suplementos, la concentración calculada deberá multiplicarse por el factor de dilución correspondiente.

DATOS TÍPICOS

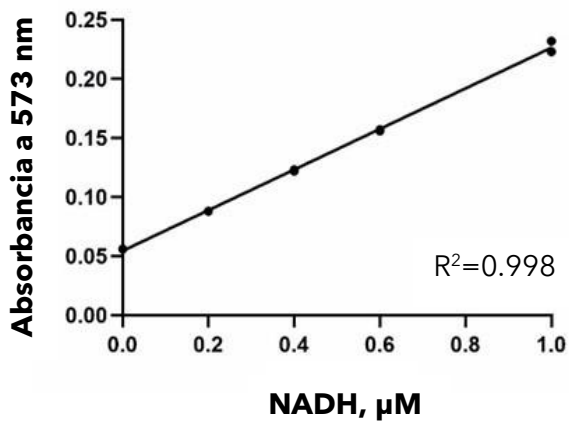
La curva estándar y los valores de concentración en los extractos de muestra estabilizados se proporcionan únicamente como demostración y no deberían usarse nunca en lugar de la curva de calibración en tiempo real.

A) CURVA ESTÁNDAR PARA NAD⁺



Estándar	NAD ⁺ (μM)	Absorbancia (573 nm)
		Tiempo de ensayo: 4 minutos
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) CURVA ESTÁNDAR PARA NADH



Estándar	NADH (μM)	Absorbancia (573 nm)
		Tiempo de ensayo: 6 minutos
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) CÁLCULO DE RESULTADOS PARA NAD⁺

Los valores de concentración en los extractos de muestra estabilizados (UNK) y los blancos (BL UNK1-4) se determinan por la fórmula de ajuste lineal de la curva estándar de NAD⁺.

Desconocidos	Concentración en extractos estabilizados (µM)	Concentración en extractos estabilizados corregida por el promedio de los blancos (BL UNK 1-4, µM)	Concentración final de NAD ⁺ en la muestra original (µM)*
UNK 1	2.944 3.151	3.008	30.08
UNK 2	2.841 3.129	2.945	29.45
UNK 3	2.686 2.730	2.668	26.68
UNK 4	1.895 1.999	1.907	19.07
UNK 5	2.346 2.420	2.343	23.43
UNK 6	3.432 3.499	3.425	34.25
BL UNK 1	0.040	-	
BL UNK 2	0.048		
BL UNK 3	0.026		
BL UNK 4	0.048		

*Corregida por un factor de dilución 10:1

D) CÁLCULO DE RESULTADOS PARA NADH

Los valores de concentración en los extractos de muestra estabilizados (UNK) y los blancos (BL UNK1-4) se determinan por la fórmula de ajuste lineal de la curva estándar de NADH.

Desconocidos	Concentración en extractos estabilizados (µM)	Concentración en extractos estabilizados corregida por el promedio de los blancos (BL UNK 1-4, µM)	Concentración final de NADH en la muestra original (µM)*
UNK 1	0.239 0.239	0.086	0.86
UNK 2	0.284 0.290	0.133	1.33
UNK 3	0.228 0.234	0.077	0.77
UNK 4	0.234 0.239	0.083	0.83
UNK 5	0.200 0.195	0.044	0.44
UNK 6	0.228 0.245	0.083	0.83
BL UNK 1	0.156	-	
BL UNK 2	0.161		
BL UNK 3	0.150		
BL UNK 4	0.150		

*Corregida por un factor de dilución 10:1

EFICACIA Y LIMITACIONES

LÍMITES DE DETECCIÓN

El límite de blanco (LoB) para Q-NADMED Blood se presenta en la siguiente tabla (LoB $\pm$ desviación estándar [DE]).

Límite de blanco (pmol/pocillo)	
NAD+	1.84 $\pm$ 0.9
NADH	2.10 $\pm$ 0.5

El límite de detección (LoD) se ha calculado con las curvas estándar de NAD+ y NADH y se presenta en la siguiente tabla (LoD $\pm$ DE).

Límite de detección (μ M en sangre total)	
NAD+	0.33 $\pm$ 0.2
NADH	0.19 $\pm$ 0.05

El límite de cuantificación (LoQ) se presenta en la siguiente tabla (LoQ $\pm$ DE).

Límite de cuantificación (μ M en sangre total)	
NAD+	0.66 $\pm$ 0.3
NADH	0.40 $\pm$ 0.1

PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD

La precisión de la eficacia del ensayo se ha determinado por la variación de la medición intraanalítica. La precisión intraanalítica se presenta en la tabla inferior (CV = coeficiente de variación).

Precisión intraanalítica (CV [%] $\pm$ DE)	
NAD+	1.48 $\pm$ 0.8
NADH	3.33 $\pm$ 1.5

La siguiente tabla resume los resultados de la reproducibilidad del ensayo.

Reproducibilidad	NAD+			NADH		
	Ctr1	Ctr2	Ctr3	Ctr1	Ctr2	Ctr3
Muestra	Ctr1	Ctr2	Ctr3	Ctr1	Ctr2	Ctr3
N de mediciones *	9	9	9	9	9	9
Media (μ M)	27.41	29.41	22.00	0.55	0.71	0.64
Desviación estándar	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 = número; * se analizaron 3 alícuotas de la muestra, cada una en triplicado).

PRECISIÓN

La precisión del ensayo se ha calculado a partir de las muestras con cantidades establecidas de NAD⁺ y NADH puras. La siguiente tabla resume los resultados (precisión del ensayo +/- DE).

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

CORTE DEL ENSAYO

Los valores de corte máximos y mínimos representan la concentración máxima y mínima observada en el 5-7 % de las personas de Finlandia en un extracto concreto de la población. La siguiente tabla resume los valores de corte.

Valor de corte		
	Bajo	Alto
NAD ⁺ (μM)	20	36
NADH (μM)	0.6	1.8

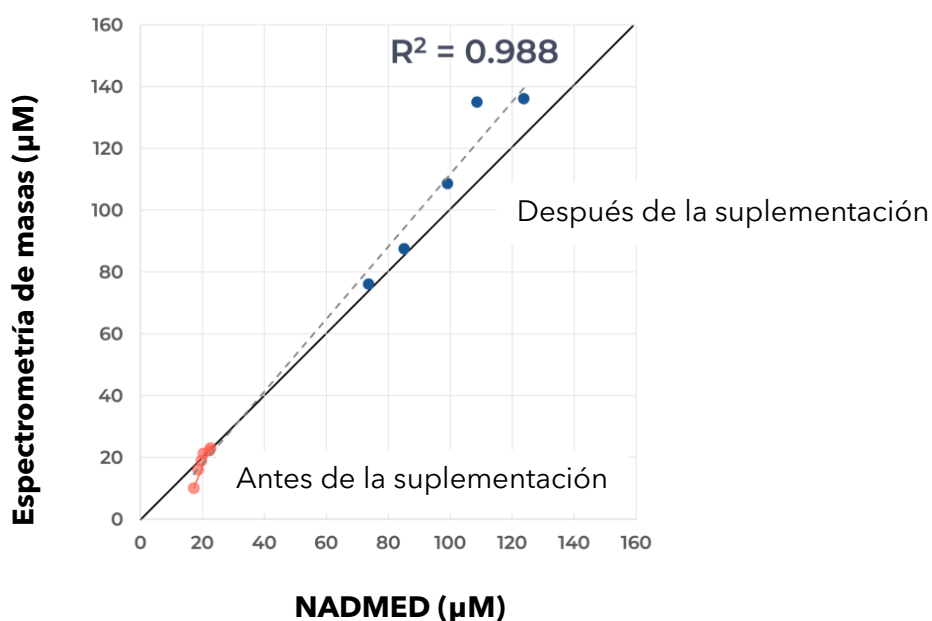
CARACTERÍSTICAS DE EFICACIA

La interferencia de otros metabolitos en el extracto no se ha investigado de manera separada ya que su contribución ha sido baja y se ha tenido en cuenta al llevar a cabo la corrección en blanco sin la enzima añadida.

Advertencia: La presencia de sorbato potásico, borato, piridina y bismuto en una muestra puede causar la inhibición de la enzima y, por tanto, provocar una subestimación de los resultados.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para validar la eficacia de Q-NADMED, se ha medido la concentración de NAD⁺ en un conjunto de muestras control de sangre humana que también se ha analizado por espectrometría de masas. Las muestras de sangre congeladas de cinco sujetos sanos, antes y después de 16 semanas de suplementación con ácido nicotínico, se han analizado de forma paralela con Q-NADMED y espectrometría de masas. Los resultados de Q-NADMED han coincidido con los obtenidos por la espectrometría de masas.



NOTAS

[illegible]

DISPOSICIÓN DE LA PLACA

Utilice esta distribución de la placa para registrar las muestras de la placa.

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