

512

# Validatie rapport van de ER-CALUX® assay voor sediment-extracten

**Rijkswaterstaat**  
Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ  
Bibliotheek (Middelburg)

C-14070 612

Auteurs: Dr.Ir. H.T. Besselink  
Prof.Dr. A. Brouwer

Uitvoering: Ir. S. C van der Linden  
Ing. Y.L. Chan  
Ir. E.C. Felzel

Rapport: BDS-137-118-final-val-a

Datum: 10 december 2001

## Validatie rapport van de ER-CALUX<sup>®</sup> assay voor sediment-extracten

Opdrachtgever: RIKZ Jacobahaven Veldstation  
C.A. Schipper  
Jacobaweg 2  
4493 MX Kamperland  
Tel. 0113 - 377007

BioDetection Systems b.v. (BDS)  
*De Boelelaan 1115*  
1081 HV Amsterdam  
Tel.: +31 (0)20 6614444  
Fax: +31 (0)84 8739161  
E-mail: [calux@biodetectionsystems.com](mailto:calux@biodetectionsystems.com)

Copyright © 2001, BioDetection Systems



Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de houder van het auteursrecht.

RIKZ zal BDS niet aansprakelijk stellen voor en vrijwaart BDS tegen alle directe of indirecte schade die zou kunnen ontstaan door toepassing van de meetresultaten door RIKZ, alsmede tegen eventuele schadeclaims van derden voortvloeiende uit het gebruik/toepassing van de meetresultaten door of namens RIKZ.

## Inhoudsopgave

1.	Inleiding	3
2.	Materiaal / methode	4
3.	Resultaten en discussie	5
3.1	Berekening eindparameter	5
3.2	Randvoorwaarden	5
3.3	Detectielimiet	7
3.4	Herhaalbaarheid	8
3.5	Bepaling lineariteit	8
3.6	Stabiliteit cellijn	10
3.7	Bepaling invloed serum en kweekmedium op de ER-CALUX®	12
3.8	Implementatie referentiemateriaal	12
3.9	Instrumentele QC borging	13
3.10	Opstellen Shewhart controlekaarten	14
4.	Conclusies	15

## Samenvatting

In opdracht van RIKZ is het RIKZ/Standaardvoorschrift SPECIE-08 voor de ER-CALUX<sup>®</sup> (Estrogen Receptor mediated - Chemical Activated Luciferase gene eXpression) bioassay opgesteld (Legler *et al.*, 2001) en is een analytische validatie uitgevoerd om de analysekarakteristieken van de *in vitro* bioassay te verkrijgen.

Voor validatie van de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay is een door het RIVO geëxtraheerd en in DMSO opgelost sediment tien maal geanalyseerd m.b.v. de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay. Het afrondingsgetal en de herhaalbaarheid konden niet bepaald worden aan de hand van dit extract omdat de respons in zeven van de tien gevallen beneden de detectielimiet van de bioassay lag. Om deze reden is het blootstellingmedium verrijkt met estradiol (zie Hermans *et al.*, 1998) waarna hieraan het sediment extract is toegevoegd. De herhaalbaarheid en het afrondingsgetal zijn vervolgens bepaald aan de hand van 10 analyses die zijn uitgevoerd met het verrijkte blootstellingmedium. Ondanks het feit dat de op deze wijze bepaalde herhaalbaarheid en afrondingsgetal betrouwbaar en toepasbaar zijn, wordt aangeraden de bepaling van te herhalen met een geëxtraheerd sediment welke een respons heeft die in ieder geval boven de minimale detectielimiet ligt en waaraan geen analyt hoeft worden toegevoegd.

Als kwaliteitscontrole wordt aanbevolen per analyse de uitkomst van de 3 pM estradiol (E2) calibratie concentratie uit de E2 calibratie-curve te noteren op een Shewhart controlekaart. Om een goede analyse gang verder te garanderen wordt aanbevolen om naast de 3 pM E2 calibratie concentratie uit de E2 calibratie-curve een intern referentie materiaal (IRM) op een Shewhart controlekaart te noteren. Van dit IRM dient voldoende materiaal aanwezig te zijn om gedurende langere tijd dit materiaal als IRM te kunnen gebruiken. De toegevoegde waarde van het IRM boven het gebruik van de 3 pM E2 calibratie concentratie is dat het IRM het gehele proces van extractie, opschoning en analyse doorloopt. Voordat een materiaal gebruikt kan worden als IRM, dient te worden vastgesteld of de toegepaste extractiemethode voldoet en of voldoende gehomogeniseerd materiaal voorhanden is.

Voor het uitplaten van microtiterplaten met cellen vanuit een volle kweekfles, is het belangrijk om de cellen goed te homogeniseren voor en tijdens het uitplaten van meerdere microtiterplaten.

De analysekarakteristieken (Vijverberg *et al.*, 1997) die zijn vastgesteld bij de uitvoering van het opgesteld RIKZ protocol voor de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay, leveren de volgende resultaten:

- De minimale detectielimiet van de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay voor sediment extracten is bepaald op 0.025 pmol EEQ (Estradiol Equivalenten) per gram sediment. Deze limiet geldt op voorwaarde dat ongeveer 2 gram droog sediment wordt opgewerkt en is opgelost in 100 µl DMSO.
- Van de voor de kwaliteitscontrole geanalyseerde 3 pM E2 calibratie concentratie, is een Shewhart controlekaart opgesteld. Bij het gebruik van de 10 waarnemingen was de onderste grenswaarde 2.10 pM EEQ/well en de bovenste grenswaarde 4.07 pM EEQ/well.
- De herhaalde meting van de 3 pM E2 calibratie concentratie voldoet aan de eisen van een Shewhart controlekaart (Vijverberg en Vriezekolk, 1998). Hiermee is aangetoond dat de cellijn over het tijdsbestek van de bepalingen stabiel is.
- De herhaalbaarheid van het verrijkte monster bedraagt 55%. De gemiddelde EEQ van het monster bedraagt 0.140 pmol per gram sediment met een afrondingsgetal van 0.01 pmol / gram sediment.

# 1. Inleiding

In het kader van het te implementeren chemisch-biologisch beoordelingsinstrumentarium voor het project WT\*2-BCI, heeft het RIKZ de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay laten standaardiseren en een analytisch-biologische validatie van de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay uit laten voeren.

De ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay maakt gebruik van humane borst adenocarcinoma (T47D) cellen die stabiel getransfecteerd zijn met een plasmide dat het gen van het vuurvliegje (*Photinus pyralis*) bevat als reporter gen voor de aanwezigheid van (pseudo)estrogenen, gekoppeld aan ERE's (estrogen responsive elements).

*De validatie is door drie personen uitgevoerd die ieder onafhankelijk de bioassay hebben uitgevoerd. Hiertoe zijn alle handelingen die in het voorschrift zijn beschreven, apart uitgevoerd (het maken van het blootstellingmedium, blootstellen van de platen, het oogsten van de cellen en het meten van de luciferase activiteit).*

De validatie heeft betrekking op de volgende onderdelen:

- berekening eindparameters
- randvoorwaarden
- detectielimiet
- herhaalbaarheid
- bepaling lineariteit
- cellijn stabiliteit
- bepaling invloed serum en kweekmedium op de ER-CALUX<sup>®</sup>
- implementatie referentiemateriaal
- instrumentele QC borging
- opstellen Shewhart controlekaart

## 2. Materiaal / methode

- *Extractie en opwerking van het sediment*

De extractie en opwerking van het sedimenten is uitgevoerd door het RIVO. Er is hierbij 2 gram sediment gesoxhleteerd met als extractiemiddel hexaan/acetone (3:1).

- *Bepaling van EEQs in sedimenten m.b.v. de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay*

De bepaling van EEQs in geëxtraheerde en opgewerkte sedimenten dient te worden uitgevoerd volgens het RIKZ/Standaardvoorschrift SPECIE-08 (Legler *et al.*, 2001).

- *Randvoorwaarden*

Voor de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay geldt dat deze moet worden uitgevoerd volgens het RIKZ/Standaardvoorschrift SPECIE-08. Voor het standaardvoorschrift is onderzocht wat de invloed is van de dichtheid van de cellen bij het uitplaten van microtiterplaten.

- *Implementatie referentiemateriaal*

Bij iedere extractie en opwerking dient een intern referentiemonster te worden meegenomen. Dit interne referentiemateriaal (IRM) wordt vervolgens op iedere 96 wells microtiterplaat geanalyseerd. De resultaten dienen te worden genoteerd op Shewhart controlekaarten. Aanbevolen wordt als IRM een grote batch geëxtraheerd sediment te gebruiken (zie voor opwerking Leonards *et al.*, 2001) die is opgenomen in DMSO en verdeeld in kleine porties.

- *Instrumentele QC borging*

Aanbevolen wordt de luminometer jaarlijkse te controleren (neem hiertoe contact op met de leverancier).

### 3. Resultaten en discussie

#### 3.1 Berekening eindparameter

De resultaten van de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay worden uitgedrukt in pM EEQ/well door de RLU waarde van het monster te interpoleren in de calibratiecurve (voor berekening calibratie-curve, zie bepaling lineariteit). Vervolgens wordt de eindparameter berekend (NOOT: Dit gebeurt automatisch in het opgestelde excel spreadsheet):

$$\text{Eindparameter monster} = \frac{p\text{MCALUX} * \text{verduningCALUX} * \text{verduningMonster} * \text{HoeveelheidDMSO}}{\text{gramse diment}}$$

$$\text{Eindparameter monster} = \frac{p\text{MCALUX} * \text{stap1} * \text{stap2} * \text{stap3} *}{\text{stap4}}$$

**Tabel 1** Voorbeeld hercalculatie ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay resultaten: pM → pmol/gram sediment

Stap 1	1,3*10 <sup>-12</sup> mol/l	maal 1000	Verduning in de ER-CALUX <sup>®</sup> (1 µl van het DMSO-monster wordt opgelost in 1000 µl kweekmedium voor blootstellen).
Stap 2	1,3 *10 <sup>-9</sup> mol/l	maal 3	Verduning van het originele monster. (in dit voorbeeld is een driemaal verduning getest)
Stap 3	3,9*10 <sup>-9</sup> mol/l	maal 100*10 <sup>-6</sup>	Hoeveelheid DMSO waarin het originele monster is opgelost. (in dit voorbeeld is het monster opgelost in 100 µl DMSO).
Stap 4	3,9 *10 <sup>-13</sup> mol	delen door 2.001	De hoeveelheid materiaal dat is gebruikt voor de extractie. (in dit voorbeeld is er geëxtraheerd met 2.001 gram sediment).
Stap 5	1.95 <sup>-13</sup> mol EEQ/gram sediment	maal 10 <sup>12</sup>	Omrekening naar pmol EEQ/gram sediment. (1*10 <sup>-12</sup> mol= pmol)
Resultaat	0.195 pmol EEQ/gram sediment		

#### 3.2 Randvoorwaarden

Bestudeerd is of een verschil in dichtheid van cellen tijdens het uitplaten van microtiterplaten leidt tot verschillen in inductiefactor bij een calibratie concentratie van 30 pM E2 niveau. Wells van een microtiterplaat zijn uitgeplaat met een dichtheid van respectievelijk 5000, 2500 en 1700 cellen per well. De wells zijn daarna in triplo blootgesteld aan 30 pM E2 en DMSO. De inductiefactor is bepaald door de gemiddelde RLU waarde van de E2 concentratie te delen door de gemiddelde RLU waarde van DMSO. Uit de resultaten (zie tabel 2) blijkt dat er een duidelijk verschil in respons bestaat tussen de verschillende dichtheden waarin de cellen zijn uitgeplaat. De beste respons wordt waargenomen bij een uitgeplaatte dichtheid van 5000 cellen per well. Geadviseerd wordt om voor het uitplaten van cellen deze goed te homogeniseren. Indien er meer dan 1 microtiterplaat moet worden gevuld met cellen, dan wordt aanbevolen tussentijds de cellen in de celkweekfles goed te homogeniseren om te voorkomen dat de cellen uitzakken en te garanderen dat de dichtheid tussen de verschillende gevulde platen identiek is.

**Tabel 2** Luciferase activiteit bij verschillende dichtheden van de cellen tijdens het uitplaten van de microtiterplaat.

Aantal cellen per well	Gemiddelde RLU DMSO	Gemiddelde RLU 30 pM E2	Inductie factor
5000	1.56	27.51	18
2500	0.79	12.06	15
1700	0.65	8.09	12

Om de ER-CALUX<sup>®</sup> respons van hoge concentraties E2 te bestuderen, is een bioassay uitgevoerd met de volgende concentraties E2 in de well: 0, 1, 3, 6, 10, 30, 100 en 1000 pM E2/well. In tabel 3 is te zien dat de ER-CALUX<sup>®</sup> repons afneemt wanneer de concentratie E2 hoger wordt dan 30 pM. Dit wordt vermoedelijk veroorzaakt door een down-regulatie van de receptor. Op de data zijn 2 curve-fits uitgevoerd: een curve-fit met alle beschikbare data en een curve-fit met data tot en met de 30 pM E2/well blootstelling (zie figuur 1). Aanbevolen wordt om een fit te gebruiken tot en met de 30 pM E2/well concentratie.

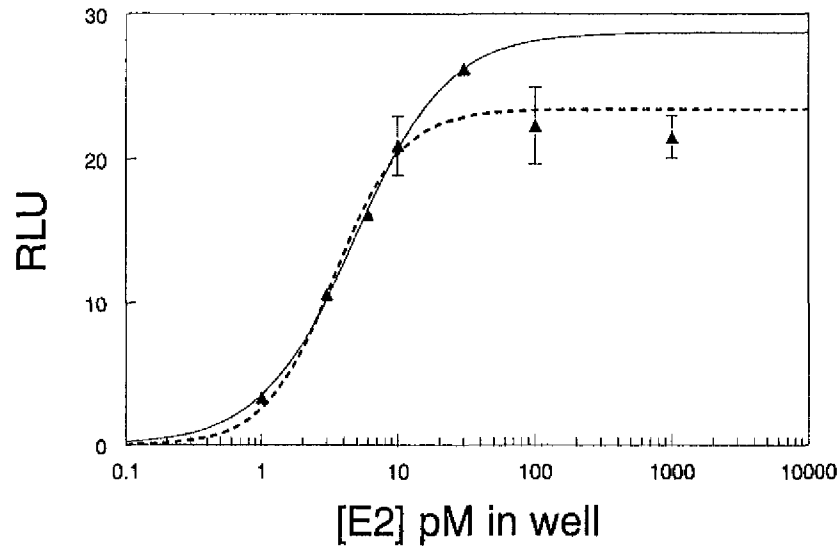
**Tabel 3** ER-CALUX<sup>®</sup> respons van E2 concentraties (0 t/m 1000 pM E2/well).

E2 concentratie (pM/well)	RLU1	RLU2	RLU3	Gem. RLU	stdev	%stdev
0	1.674	1.739	1.928	1.780	0.132	7.4
1	4.995	5.077	5.129	5.067	0.068	1.3
3	12.88	12.02	12.252	12.384	0.445	3.6
6	17.648	18.063	18.109	17.940	0.254	1.4
10	20.157	24.114	23.814	22.695	2.203	9.7
30	27.454	28.057	28.475	27.995	0.513	1.8
100	20.793	25.523	25.895	24.070	2.844	11.8
1000	21.53	24.517	23.903	23.317	1.577	6.8

**Tabel 4** Gegeneerde fit waarden van de gemiddelde RLU waarden zoals bepaald in tabel 2.

Parameter	Gevonden waarde met curve-fit t/m 30 pM E2/well	Gevonden waarde met curve-fit t/m 1000 pM E2/well
A <sub>0</sub> van fit	28.70	23.44
A <sub>1</sub> van fit	4.73	3.36
A <sub>2</sub> van fit	-1.28	-1.74
R <sup>2</sup> van fit	0.999	0.956





**Figuur 1** E2 calibratie curve. Curve-fits zijn uitgevoerd met alle beschikbare data (-----) en data t/m de 30 pM E2 concentratie (—).

### 3.3 Detectielimiet

Voor de bepaling van de detectielimiet (voor formule zie Hermans *et al.*, 1998) van de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay, is een DMSO-blanco 10 keer in triplo gemeten. Per triplo bepaling van de DMSO-blanco is een detectielimiet bepaald door het gemiddelde van de triplo's plus 3\* de standaarddeviatie te berekenen en vervolgens te interpoleren in de afzonderlijke E2 calibratie-curves. Tenslotte is de gemiddelde detectielimiet van de 10 afzonderlijke waarnemingen berekend (tabel 5).

Op basis van de uitgevoerde analyses ter bepaling van de detectielimiet van de bioassay, wordt aanbevolen om als gemiddelde detectielimiet 0.5 pM EEQ/well aan te houden.

Aanbevolen wordt als minimale detectielimiet van de eindparameter 0.025 pmol EEQ/gram sediment aan te houden op voorwaarde dat 2 gram geëxtraheerd sediment wordt opgenomen in 100 µl DMSO en onverdund wordt geanalyseerd met behulp van de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay.

Er wordt aanbevolen om tevens een bepalinggrens te bepalen zodat kan worden vastgesteld boven welke concentratie een kwantitatieve uitspraak kan worden gedaan over de aanwezige hoeveelheid estradiol equivalenten in een monster.

**Tabel 5** Berekening van de gemiddelde detectielimiet.

Datum bepaling	Detectielimiet (pM EEQ/well)	Persoon
14-11-01	0.653	A
15-11-01	0.395	B
14-11-01	0.603	A
14-11-01	0.236	C
15-11-01	1.066	B
14-11-01	0.292	C
14-11-01	0.170	A
15-11-01	1.169	B
14-11-01	0.332	C
27-11-01	0.313	B
gemiddelde	0.523	

### 3.4 Herhaalbaarheid

Voor de bepaling van de herhaalbaarheid van de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay wordt gebruik gemaakt van een door het RIVO in opdracht van het RIKZ aangeleverd sediment extract. Aan dit extract zijn 10 onafhankelijke ER-CALUX<sup>®</sup> bepalingen uitgevoerd. Het monster is onverdund en drie-maal verdund getest. Tijdens analyse van het onverdunde monster trad celdood op, vermoedelijk veroorzaakt door de aanwezigheid van zwavel. Daarom is besloten om de drie maal verdunning te gebruiken voor het berekenen van de herhaalbaarheid. De respons van 7 van de 10 analyses was beneden de gemiddelde detectielimiet (zie tabel 3). Als gevolg hiervan kon niet worden voldaan aan het criterium van zeven metingen zoals vermeld in het RIKZ voorschrift i013.90 (Hermans *et al.*, 1998) en kon de herhaalbaarheid niet worden bepaald. Om toch een uitspraak te kunnen doen over de herhaalbaarheid van de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay, is het blootstellingmedium verrijkt met estradiol waarna het sediment extract is toegevoegd (RIKZ voorschrift i013.90; Hermans *et al.*, 1998). De herhaalbaarheid van het verrijkt monster was 55% met een afrondingsgetal van 0.01 pmol / gram sediment bij een gemiddeld niveau van 0.14 pmol EEQ/ gram sediment.

Om de herhaalbaarheid van de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay te bepalen, uitgaande van niet verrijkt materiaal, wordt aanbevolen de metingen te herhalen met een door het RIKZ aan te leveren of een door BDS geproduceerd sediment extract waarin een respons te meten is, liggende boven de gemiddelde detectielimiet.

**Tabel 6** ER-CALUX<sup>®</sup> analyse resultaten (pmol / gram sediment) van sediment extract en verrijkt sediment extract.

	EEQ monster (pmol/gram sediment)	EEQ monster met extra E2 (pmol/gram sediment)
Meting 1	n.d.	0.128
Meting 2	n.d.	0.111
Meting 3	n.d.	0.130
Meting 4	n.d.	0.144
Meting 5	0.142	0.195
Meting 6	n.d.	0.082
Meting 7	n.d.	0.095
Meting 8	0.112	0.253
Meting 9	n.d.	0.085
Meting 10	0.077	0.148
gemiddelde		0.14
standaard deviatie		0.053
bovengrens		0.026
afrondingsgetal		0.01
herhaalbaarheid		55%

n.d.: niet detecteerbaar; respons van het monster is kleiner dan de detectielimiet van 0.5 pM E2/well. Bovengrens: berekend volgens formule 4 standaard voorschrift i020.90 (Vijverberg, 1997). Herhaalbaarheid: bepaald volgens formule 6 standaard voorschrift i013.90 (Hermans *et al.*, 1998).

### 3.5 Bepaling lineariteit

Voor de bepaling van de "lineariteit" van de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay, zijn in totaal 12 triplo ER-CALUX<sup>®</sup> analyses van de E2 calibratie-curve (0, 0.3, 0.6, 1.0, 3.0, 6.0, 10, 30 pM E2/well) uitgevoerd. Per triplo bepaling van de E2 calibratie concentraties, is de gemiddelde respons (RLU) berekend. Vervolgens is van deze gemiddelde RLU de gemiddelde RLU van de DMSO-blanco afgetrokken (zie tabel 7).

**Tabel 7** Voorbeeld berekening ER-CALUX<sup>®</sup> E2 calibratie concentraties.

Concentratie (pM E2/well)	RLU1	RLU2	RLU3	Gem. RLU	Gecorrigeerde meting
0	3.158	3.442	4.09	3.562	0.000
0.3	4.026	3.75	3.87	3.883	0.320
0.6	5.416	5.173	7.10	5.898	2.335
1	4.784	6.033	5.65	5.490	1.927
3	12.683	12.426	12.513	12.541	8.978
6	16.414	15.745	18.89	17.015	13.453
10	19.403	23.107	21.30	21.270	17.708
30	22.654	22.615	24.25	23.174	19.611

Het verband tussen de E2 concentratie en de ER-CALUX<sup>®</sup> respons vertoont een sigmoïde verloop. De respons van de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay is beoordeeld aan de hand van het gemiddelde van de 12 keer geanalyseerde calibratie-curve (tabel 8). Deze gemiddelden zijn gefit in het programma slide-write, gebruik makend van de fit zoals beschreven in het RIKZ/standaardvoorschrift SPECIE-08.

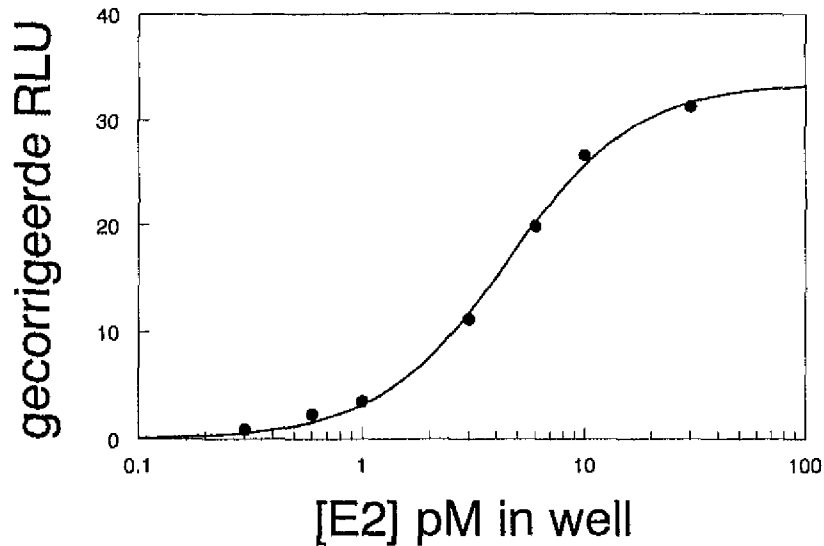
De gegenereerde curve-fit is weergegeven in figuur 2. De  $R^2$  van de fit is 0.99 (tabel 9). Hoewel het verband tussen de E2 calibratie concentratie en de ER-CALUX<sup>®</sup> respons (RLU) niet lineair kan worden beschreven, is de relatie tussen concentratie en respons goed en nauwkeurig te beschrijven met een dose-respons functie.

**Tabel 8** Gecorrigeerde gemiddelde RLU's van alle E2 calibratie concentraties.

Bioassay	E2 calibratie concentratie						
	0.3	0.6	1	3	6	10	30
Bioassay 1	0.320	2.335	1.927	8.978	13.453	17.708	19.611
Bioassay 2	-0.146	2.289	2.887	10.610	13.429	21.289	28.867
Bioassay 3	0.543	1.748	3.243	7.324	14.552	16.108	17.025
Bioassay 4	0.612	2.100	3.531	9.579	14.641	23.309	32.833
Bioassay 5	0.816	3.471	2.357	11.971	17.187	26.801	33.596
Bioassay 6	0.314	0.912	0.602	7.356	22.945	27.512	32.870
Bioassay 7	2.632	2.003	6.619	17.454	40.032	45.730	46.441
Bioassay 8	0.551	2.002	4.273	12.259	25.965	32.660	29.449
Bioassay 9	1.080	1.876	5.149	8.995	12.776	23.827	28.953
Bioassay 10	1.511	2.891	4.093	11.844	25.467	32.036	40.910
Bioassay 11	0.899	2.772	3.045	12.537	16.369	23.529	32.175
Bioassay 12	1.559	2.884	3.802	15.590	21.766	29.312	32.925
gemiddelde	0.891	2.274	3.461	11.208	19.882	26.652	31.305

**Tabel 9** Gegeneerde fit waarden van de gemiddelde RLU waarden zoals bepaald in tabel 8.

parameter	Gevonden waarde
A <sub>0</sub> van fit	33.56721
A <sub>1</sub> van fit	4.534886
A <sub>2</sub> van fit	-1.49938
R <sup>2</sup> van fit	0.997675



**Figuur 2** E2 Calibratie curve van de gemiddelde waarden van tabel 8.

### 3.6 Stabiliteit cellijn

Voor het monitoren van de stabiliteit van de cellen, wordt de 3 pM E2 calibratie concentratie uit de calibratie-curve in de loop van de tijd geregistreerd en op een Shewhart controlekaart (Vijverberg en Vriezekolk, 1998).

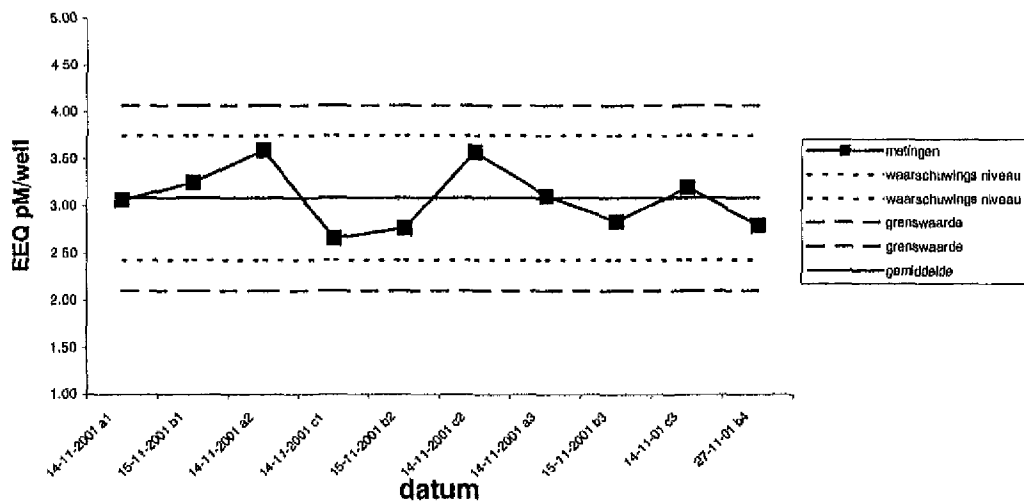
Deze Shewhart controlekaart dient als QC om vast te stellen of de cellijn stabiel is (< 3S grens). Bij afwijkende resultaten wordt aanbevolen een nieuwe batch ER-CALUX<sup>®</sup> cellen te ontdoien en in gebruik te nemen (zie RIKZ/Standaardvoorschrift SPECIE-08).

De cellijn kan zonder problemen 22 passages worden doorgezet (tabel 11 ; figuur 4).

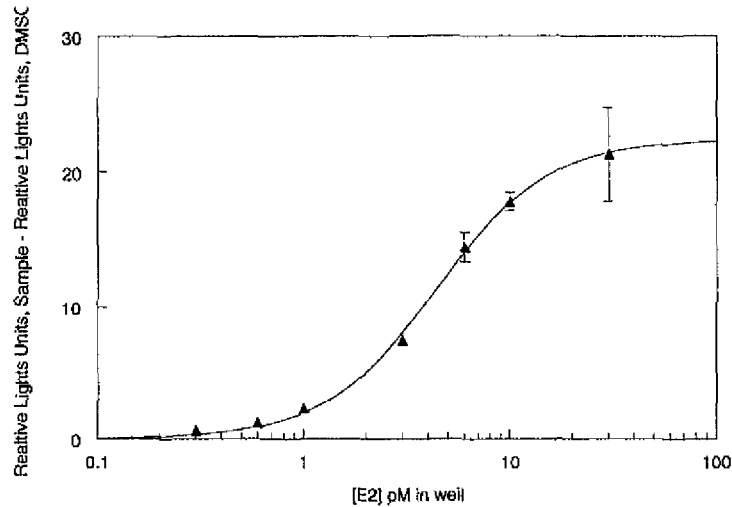
Tabel 10 ER-CALUX<sup>®</sup> respons (pmol EEQ/ well) van de 3 pM E2 calibratie concentratie .

	datum	EEQ (pM / well)	persoon
Waarde 1	14-11-01	3.07	A
Waarde 2	15-11-01	3.25	B
Waarde 3	14-11-01	2.85	A
Waarde 4	14-11-01	3.60	C
Waarde 5	15-11-01	2.66	B
Waarde 6	14-11-01	2.77	C
Waarde 7	14-11-01	3.57	A
Waarde 8	15-11-01	3.11	B
Waarde 9	14-11-01	2.84	C
Waarde 10	27-11-01	3.20	B
gemiddelde		3.09	
standaard deviatie		0.33	
onderste grenswaarde		2.10	
bovenste grenswaarde		4.07	

Shewhartkaart controlekaart 3 pM estradiol



Figuur 3. Shewhart controlekaart van de 3 pM E2 calibratie concentratie.



**Figuur 4.** E2 calibratie curve v.d. ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay, uitgevoerd met een cellijn in passage 22.

**Tabel 11** Gegeneerde curve-fit waarden v.d. E2 calibratie curve met een cellijn in passage 22 uitgevoerd op 27-11-2001.

Parameter	Gevonden waarde
A <sub>0</sub> van fit	22.4
A <sub>1</sub> van fit	4.3
A <sub>2</sub> van fit	-1.6
R <sup>2</sup> van fit	0.998

### 3.7 Bepaling invloed serum en kweekmedium op de ER-CALUX<sup>®</sup>

Toevoeging van serum aan het kweekmedium is essentieel voor de kweek van cellen. Het serum bevat essentiële stoffen voor de groei van de cellen. Het serum dat gebruikt wordt voor het kweken van ER-CALUX<sup>®</sup> cellen is foetaal kalf serum (FCS). In eerste instantie is FCS gebruikt afkomstig uit Zuid-Amerika. De cellen groeien redelijk goed op dit serum en de respons op blootstelling aan dioxine en/of dioxine-achtige verbindingen is eveneens redelijk goed. Uit verkregen informatie bleek dat runderen in Zuid-Amerika antibiotica krijgen toegediend. Antibiotica die vervolgens in het serum terechtkomen kunnen vervolgens een achtergrond in de ER-CALUX<sup>®</sup> bioassay geven. Derhalve zijn sera afkomstig uit andere landen/bronnen getest. Uit dit onderzoek is gebleken dat Foetal Calf Serum (FCS) van Gibco een hoger inductie factor gaf dan FCS van Intergo (Dennekamp, 1998). Daarnaast is serum getest afkomstig uit Zuid-Amerika (Gibco) en serum van Australisch origine (Gibco). Het Australische serum geeft een betere inductie. Aanbevolen wordt daarom een serum te gebruiken van Gibco dat uit Australisch afkomstig is.

### 3.8 Implementatie referentiemateriaal

Als kwaliteitscontrole wordt aanbevolen per analyse de uitkomst van de 3 pM E2 calibratie concentratie uit de E2 calibratie-curve te noteren op een Shewhart controlekaart. Om een goede analyse gang verder te garanderen wordt aanbevolen om naast de 3 pM E2 calibratie concentratie uit de E2 calibratie-curve een intern referentie materiaal (IRM) op een Shewhart controlekaart te noteren. Het gebruik van een IRM levert naast informatie over de uitvoering van de ER-

CALUX<sup>®</sup> bioassay tevens informatie over de uitvoering van de extractie. De IRM doorloopt het gehele traject van extractie, opschoning tot en met analyse. Dit in tegenstelling tot het gebruik van de 3 pM E2 calibratie concentratie. Voorwaarde voor het gebruik van een IRM zijn dat van het IRM dient voldoende materiaal aanwezig moet zijn om gedurende langere tijd dit materiaal als IRM te kunnen gebruiken. Voordat een materiaal gebruikt kan worden als IRM, dient te worden vastgesteld of de toegepaste extractiemethode voldoet en of voldoende gehomogeniseerd materiaal voorhanden is.

### 3.9 Instrumentele QC borging

Het goed functioneren van de gebruikte luminometer wordt gecontroleerd aan de hand van de ER-CALUX<sup>®</sup> activiteit gemeten bij verschillende luciferase concentraties. Een luciferase stock-oplossing is gemaakt door 1 µl van een luciferase oplossing (Promega, E170, Lot No. 102595, 13 mg luciferase/ml) te pipetteren in 1 ml lysis-mix, aangevuld met 1 mg BSA (Bovine albumine). Van de stock zijn vervolgens een vijftal verdunningen gemaakt waarvan vervolgens de luciferase activiteit is bepaald (tabel 12). De resultaten zijn grafisch weergegeven in figuur 5.

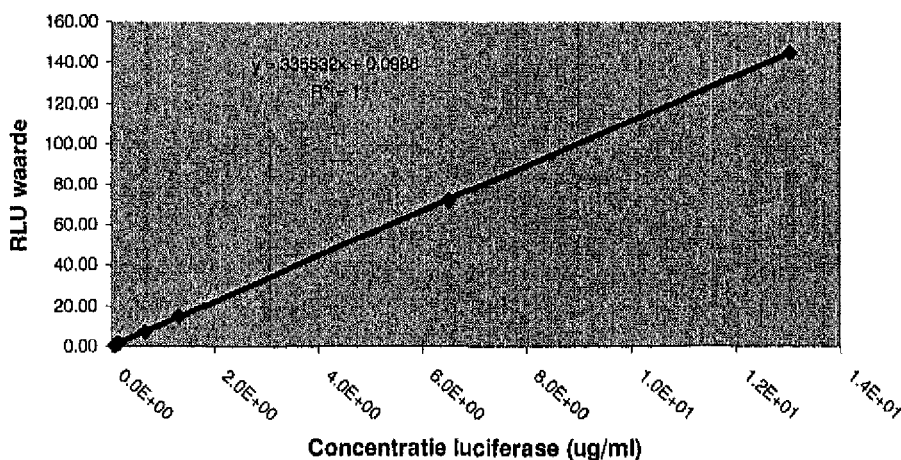
De R<sup>2</sup> van de calibratie-lijn was groter dan 0.999 en dus functioneert de luminometer naar behoren.

Aanbevolen wordt de lineariteit van de luminometer 2 keer per jaar te controleren. Indien tijdens de controles afwijkingen worden waargenomen, dient contact te worden gezocht met de leverancier van de luminometer voor onderhoud.

**Tabel 12** Gemeten Relative Light Units (RLU) als functie van de luciferase concentratie.

Lucifease concentratie (µg/ml)	RLU1	RLU2	RLU3	Gem. RLU	% stdev
0.065	0.778	0.814	0.765	0.79	3.23
0.13	1.698	1.592	1.508	1.60	5.95
0.65	7.355	7.228	6.808	7.13	4.01
1.30	15.557	15.055	14.541	15.05	3.38
6.50	72.401	70.97	72.224	71.87	1.09
13.00	146.054	144.239	144.539	144.94	0.67

luciferase calibratie curve



**Figuur 5** Relative Light Units (RLU) als functie van de luciferase concentratie ter bepaling van de lineariteit van de gebruikte luminometer.

### 3.10 Opstellen Shewhart controlekaarten

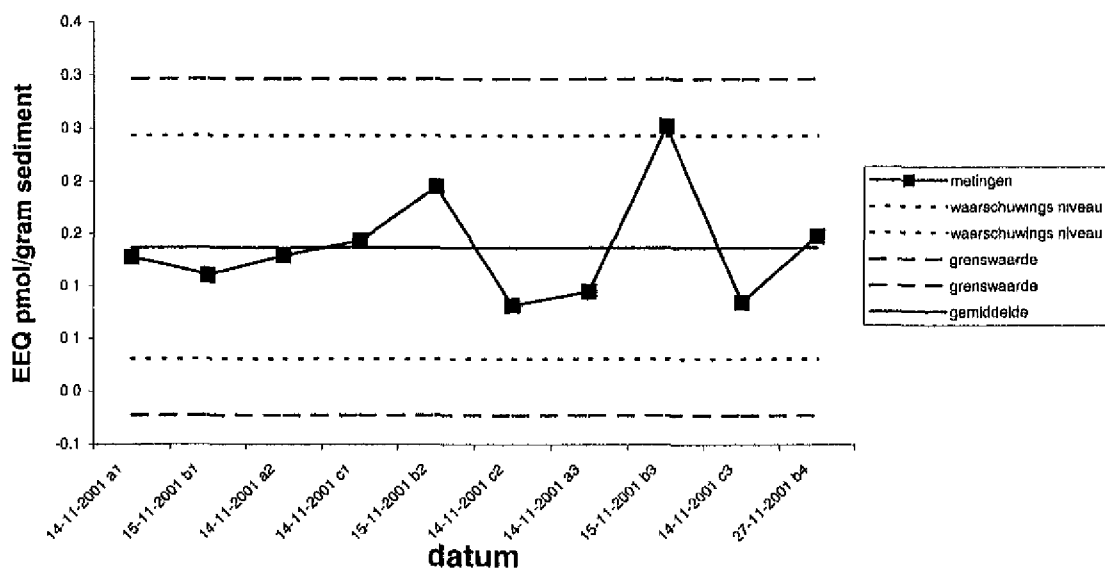
De Shewhart controlekaarten dienen als QC om vast te stellen of de resultaten de grenzen van de Shewhart controlekaarten overschrijden. Voor de constructie van Shewhart controlekaarten (Vijverberg en Vriezolk, 1998) wordt gebruikt gemaakt van het verrijkt monster. Hiertoe zijn 10 ER-CALUX<sup>®</sup> analyses uitgevoerd van het verrijkte extract.

Uit de Shewhart controlekaart (figuur 6) blijkt dat één waarneming boven de waarschuingswaarde ligt. Gezien dit feit is het niet wenselijk om dit monster direct toe te passen als controle omdat eigenlijk eerst moet worden bekeken of dit verschijnsel bij volgende metingen weer optreedt. Tevens levert de Shewhart controlekaart een negatieve grenswaarde (zie tabel 13) wat mogelijk wordt veroorzaakt doordat de respons van het monster niet 10 maal boven de detectielimiet is. Aanbevolen wordt om de metingen te herhalen met extract met een voldoende hoge respons.

**Tabel 13** ER-CALUX<sup>®</sup> respons (pmol EEQ/gram sediment) van het verrijkte monster.

	datum	ER-CALUX <sup>®</sup> respons (pmol EEQ/gram sediment)	persoon
Waarde1	14-11-01	0.128	A
Waarde2	15-11-01	0.111	B
Waarde3	14-11-01	0.130	A
Waarde4	14-11-01	0.144	C
Waarde5	15-11-01	0.195	B
Waarde6	14-11-01	0.082	C
Waarde7	14-11-01	0.095	A
Waarde8	15-11-01	0.253	B
Waarde9	14-11-01	0.085	C
Waarde10	27-11-01	0.148	B
gemiddelde.		0.14	
standaard deviatie		0.053	
onderste grenswaarde		-0.023	
bovenste grenswaarde		0.297	

**Shewhart controlekaart verrijkt monster**



**Figuur 6** Shewhart controlekaart van ER-CALUX<sup>®</sup> analyses met het verrijkte monster.



## 4. Conclusies

- Indien er meer dan 1 microtiterplaat moet worden gevuld met cellen, dan wordt aanbevolen tussentijds de cellen in de celkweekfles goed te homogeniseren om te voorkomen dat de cellen uitzakken en te garanderen dat de dichtheid tussen de verschillende gevulde platen identiek is.
- Aanbevolen wordt om een fit te gebruiken tot en met de 30 pM E2/well concentratie.
- Op basis van de uitgevoerde analyses ter bepaling van de detectielimiet van de bioassay, wordt aanbevolen om als gemiddelde detectielimiet 0.5 pM EEQ/well aan te houden.
- Hoewel het verband tussen de E2 calibratie concentratie en de ER-CALUX<sup>®</sup> respons (RLU) niet lineair kan worden beschreven, is de relatie tussen concentratie en respons goed en nauwkeurig te beschrijven met een dose-respons functie.
- De cellijn kan zonder problemen 22 passages worden doorgezet.
- Aanbevolen wordt om een serum te gebruiken dat een Australisch origine heeft.
- De  $R^2$  van de calibratie-lijn was groter dan 0.999 en dus functioneert de luminometer naar behoren.

## Literatuurlijst

- Dennekamp, M. (1998); Effecten van (metabolieten van) pseudo-oestrogenen. Landbouw Universiteit Wageningen, vakgroep toxicologie.
- Hermans, J.H., van de Zande, A.E. en Wilts, W. (1998) Validatie van analysemethode; Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ; nr. I013.90; versie 1.0.
- Legler J., Jonas, A., Besselink, H. en Felzel, E.C. (2001) Standaardvoorschrift RIKZ/ER-CALUX® (Estrogen Receptor mediated - Chemical Activated Luciferase gene expression) bioassay; BioDetection Systems; versie a.
- Leonards P.E.G., Lamoree M., Booy P., Horst A. van der, Veen I. van der (2001); Validatie van analysemethoden in sediment voor de toepassing van de ER-CALUX en de DR-CALUX en de bepaling van milieucontaminanten in sediment.
- Vijverberg, F.A.J.M. (1997) Het opstellen van analyse karakteristieken; Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ; nr. I020.90; versie 2.0.
- Vijverberg, F.A.J.M., Vriesevink, G.H. (1998) Het opstellen en toepassen van de Shewhart controlekaarten; Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ; nr. I009.90; versie 1.0.

## Bijlage 1

## Analyse karakteristieken

01	Parameter Matrix	EEQ's in sediment
02	Analysevoorschrift	Nummer :RIKZ SPECIE-08 Versie :a Datum :november 2001
03	Testcode	
04	Beginsel van de methode	In genetische gemodificeerde cellen die bloot worden gesteld aan het opgewerkte extract, kan onder invloed van de aanwezigheid van estrogeen en/of estrogeen-achtige verbindingen, het enzym luciferase tot expressie komen. De test wordt uitgevoerd in een 96 well microtiterplaat waarbij naast de te testen monsters een standaard estradiol concentratiereeks wordt meegenomen. Door interpolatie van de respons van een monster in de estradiol calibratiecurve, kan de hoeveelheid EEQs in het monster (pmol EEQ/g droog sediment) worden bepaald.
05	Configuratie apparatuur	Luminometer: Anthos Lucy2 Dataverwerking: PC met Microsoft windows en excel
06	Monster voorbereiding	Soxhlet extractie of ASE extractie gevolgd door GPC opschoning met 2 gram gevriesdroogd materiaal.
07	Monsteropslag	Na opwerking en opgenomen in DMSO, een half jaar op kamertemperatuur. Opm: de vials dienen goed te zijn afgesloten!
08	Meetbereik	Van detectielimiet tot EC <sub>50</sub>
09	Calibratie	estradiol: 8 concentraties
10	Detectielimiet	ER-CALUX <sup>®</sup> bioassay: 0.5 pM estradiol/well Eindparameter: 0.025 EEQ pmol per gram sediment (bij 2 gram sediment)
12	Afrondingsgrens LABINSYS	0.01 pmol/gram sediment (bij toevoeging van estradiol)
13	Herhaalbaarheid	55% bij een gemiddelde waarde van 0.14 pmol / gram sediment onder toevoeging van extra estradiol.
14	Reproduceerbaarheid	n.v.t.
15	Terugvinding	n.v.t.
16	Referentiemateriaal	
17	Controlekaarten	-3 pM punt van de calibratie-curve
18	1 <sup>o</sup> lijn controle	Sediment extract ;
	2 <sup>o</sup> lijn controle	
	3 <sup>o</sup> lijn controle	
19	Storende componenten	Sedimenten kunnen een dusdanig hoeveelheid zwavel bevatten dat deze cytotoxisch is voor de cellen hiertoe moeten het sediment ontzaveld worden

## Bijlage 2

*Ruwe data E2 calibratie concentraties (resultaat in RLU's).*

Datum	persoon	0 pM	0.3 pM	0.6 pM	1 pM	3 pM	6 pM	10 pM	30 pM
14-11-01	A	3.158	4.026	5.416	4.784	12.683	16.414	19.403	22.654
		3.442	3.75	5.173	6.033	12.426	15.745	23.107	22.615
		4.087	3.872	7.104	5.652	12.513	18.887	21.301	24.252
15-11-01	B	2.561	2.698	5.105	5.617	19.561	18.821	28.682	22.965
		3.31	4.728	7.218	5.249	14.553	22.938	37.554	49.873
		2.963	3.857	6.925	5.039	10.633	18.637	23.001	36.783
14-11-01	C	2.139	1.796	3.271	4.238	15.576	14.193	22.731	32.436
		3.496	2.687	5.487	6.945	13.237	13.95	18.512	35.172
		2.486	3.2	6.231	5.599	11.137	20.266	30.744	27.114
14-11-01	C	2.746	4.643	6.414	6.302	14.8	30.957	32.749	42.023
		2.464	3.569	5.016	5.995	14.355	25.171	34.432	43.945
		2.563	4.095	5.017	7.754	14.15	28.046	36.7	44.535
15-11-01	B	5.045	6.493	5.88	9.501	20.501	42.541	41.148	37.891
		4.438	7.508	6.242	10	23.264	38.691	48.526	47.63
		3.438	6.816	6.807	13.277	21.518	51.786	60.437	66.722
14-11-01	C	2.883	3.781	6.398	6.109	19.853	21.347	29.287	36.022
		2.435	3.486	5.095	5.79	13.651	18.348	24.243	33.998
		2.116	2.864	4.256	4.669	11.54	16.847	24.492	33.939
14-11-01	A	1.371	2.004	3.2	4.655	11.623	16.23	24.702	35.203
		1.335	1.796	3.882	4.873	11.273	15.886	24.947	33.296
		1.101	1.842	3.026	4.872	9.648	15.615	24.085	33.807
15-11-01	B	4.344	5.709	5.618	8.731	17.537	26.751	27.576	35.047
		4.947	5.222	7.501	8.38	13.953	31.869	40.642	38.071
		3.707	3.72	5.885	8.707	18.286	32.273	42.76	28.228
14-11-01	C	2.604	4.638	5.721	6.699	16.1	31.524	36.27	36.077
		2.616	3.305	5.16	5.845	18.801	21.582	31.447	39.7
		1.986	3.941	4.976	6.069	19.074	19.399	27.425	30.204
27-11-01	B	0.724	1.207	1.99	3.05	8.665	16.014	19.426	18.148
		0.84	1.536	1.984	3.307	7.727	15.835	18.184	24.267
		0.945	1.615	2.207	3.053	8.511	14.019	18.338	23.987

## Bijlage 3

*Ruwe data monsters (resultaat in RLU's).*

Datum	persoon	Procedure DMSO	M-118-1110	verrijkt M-118-1110
14-11-01	A	1.119	2.243	3.223
		1.075	2.275	3.538
		0.916	2.017	2.54
15-11-01	B	2.134	3.623	6.08
		4.674	3.421	6.442
		5.738	4.35	7.285
14-11-01	A	1.591	2.562	3.682
		1.576	3.591	3.63
		1.829	2.546	6.725
14-11-01	C	1.86	3.975	5.549
		1.528	2.961	4.877
		2.159	3.251	4.907
15-11-01	B	5.015	8.95	12.764
		5.257	7.002	8.903
		5.816	4.285	6.1
14-11-01	C	1.73	3.241	4.848
		1.859	2.665	4.295
		3.053	3.856	4.168
14-11-01	A	1.512	1.905	3.744
		1.729	2.384	3.519
		2.102	2.695	3.838
15-11-01	B	4.68	3.244	8.249
		3.61	3.125	9.546
		4.691	3.425	8.468
14-11-01	C	1.401	2.955	5.748
		2.543	2.689	3.744
		3.467	3.506	4.607
27-11-01	B	1.787	2.608	3.54
		1.897	3.03	3.868
		2.418	2.69	4.398