

Standaardvoorschrift RIKZ/ER-CALUX[®] (Estrogen Receptor mediated - Chemical Activated LUciferase gene eXpression) bioassay

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: P-BDS-028a/ RIKZ-SPECIE-08

Datum: 10 december 2001



Standaardvoorschrift RIKZ/ER-CALUX[®] (Estrogen Receptor mediated - Chemical Activated LUciferase gene eXpression) bioassay.

Trefwoorden: estrogen receptor, reportergen, ER-CALUX[®], estradiol

Inhoudsopgave

1	Onderwerp	4
2	Toepassingsgebied	4
3	Principe van de ER-CALUX® bioassay	4
4	Afkortingen en Definities	6
5	Materialen	8
5.1	Reagentia	8
5.2	Apparatuur	10
6	Algemene kweektechnieken	12
7	Het kweken en onderhouden van ER-CALUX® cellen.	13
7.1	Principe	13
7.2	Vorbewerkingen	13
7.3	Werkwijze	16
7.4	Kwaliteitszorg	19
8	De bepaling van de ER-gemedieerde luciferase-activiteit in de ER-CALUX® assay.	20
8.1	Principe	20
8.2	Vorbewerkingen voor de methode	20
8.3	Bereiding van gestripte FCS	21
8.4	Bereiding van assay-medium	22
8.5	Werkwijze	25
8.6	Kwaliteitszorg	31
9	Analyse, beoordeling en controle van de ER-CALUX®-analyse resultaten.	31
9.1	Principe	31
9.2	Vorbewerking	31
9.3	Werkwijze	32
9.4	Kwaliteitszorg	34
10	Identificering en kwantificering	35
11	Kengetallen	36
12	Rapportage	36
13	Kwaliteitszorg	37

13.1	Blancos en referentie materiaal	37
13.2	Blancos en referentie materiaal	37
13.3	Kwaliteitszorg bij het kweken en onderhouden van ER-CALUX [®] cellen.....	38
13.4	Kwaliteitszorg bij de bepaling van de ER-gemedieerde luciferase-activiteit in de ER-CALUX [®] assay.....	38
13.5	Kwaliteitszorg bij de analyse, beoordeling en controle van de ER-CALUX [®] -analyse resultaten.....	39
13.6	Algehele Kwaliteitsborging.....	40
14	Veiligheid	41
15	Literatuur	42
16	Bijlagen.....	43

1 Onderwerp

Dit voorschrift beschrijft de bepaling van 17β -estradiol equivalenten (EEQ) in opgewerkte sediment extracten met behulp van de ER-CALUX[®] (Estrogen Receptor mediated - Chemical Activated Luciferase gene eXpression) assay. In de assay wordt gebruik gemaakt van humane borst adenocarcinoma cellen (T47D), die zijn getransfecteerd met het plasmide pERetataLuc. Dit plasmide bevat onder andere drie ERE's (Estrogen Responsive Elements) en als reporter gen het luciferase gen afkomstig van het vuurvliegje *Photinus pyralis* (Legler *et al.*, 1999).

2 Toepassingsgebied

Dit voorschrift is van toepassing op opgewerkte extracten (volgens Leonards *et al.*, 2001) die zijn opgenomen in dimethylsulfoxide (DMSO) en waarin geen cytotoxische bestanddelen, zoals zwavel, aanwezig zijn.

De in dit voorschrift beschreven handelingen mogen uitsluitend worden uitgevoerd in ruimtes die minimaal aan de VMT (veilig microbiologische technieken) eisen voldoen (zie "besluit genetisch gemodificeerde organismen"). Alle personen die in deze ruimte werken moeten bekend zijn met het VMT reglement.

3 Principe van de ER-CALUX[®] bioassay

De ER-CALUX[®] bioassay is gebaseerd op het gemeenschappelijke werkingsmechanisme van estrogenen. (Xeno-)estrogene stoffen binden na binnenkomst in de cel aan een cytosolaire receptor, de estrogeen receptor (ER). Na activatie van deze receptor en vorming van het ligand-ER complex, verhuist het complex naar de kern van de cel en bindt aan specifieke DNA sequenties, de zogenaamde estrogen responsive elements (ERE's). De binding van het ligand-ER receptor complex aan de ERE's resulteert in de verandering van de expressie van de aan ERE's geassocieerde genen. Deze verandering in gen expressie kan resulteren in een verstoring van normale fysiologie en toxiciteit.

In de ER-CALUX[®] assay wordt gebruik gemaakt van de humane borst adenocarcinoma cellijn T47D. De cellijn is genetisch gemodificeerd waarbij door middel van transfectie het

pEREtataLuc plasmide is ingebracht. Dit plasmide bevat 3 ERE's en de uit het *Photinus pyralis* afkomstige luciferase gen. Door recombinatie is dit plasmide ingebouwd in het DNA van de T47D cellen. Hierdoor is een stabiele cellijn ontstaan welke na blootstelling aan estrogene of estrogeen-achtige (xeno-estrogene) luciferase produceert. Na toediening van het substraat luciferine vindt lichtproductie plaats. De hoeveelheid geproduceerd licht wordt gemeten met een luminometer en is een maat voor de hoeveelheid 17 β -estradiol equivalenten waaraan de genetisch gemodificeerde T47D cellen zijn blootgesteld.

De ER-CALUX[®] bioassay bestaat uit drie functionele gedeelten die in aparte hoofdstukken zijn beschreven:

- Hfdst 7 Het kweken en onderhouden van ER-CALUX[®] cellen.
- Hfdst 8 De bepaling van de ER-gemedieerde luciferase-activiteit in de ER-CALUX[®] assay.
- Hfdst 9 Analyse, beoordeling en controle van de ER-CALUX[®]-analyse resultaten.

4 Afkortingen en Definities

AA sup.	Aminozuur sup.plement
ATP	Adenosine-5'-TriPhosphate.
$C_4H_2Mg_5O_{14}$	Magnesiumhydroxidecarbonaat penta hydraat.
CALUX [®]	Chemical Activated LUciferase gene eXpression.
CDTA	trans-1,2-diaminocyclohexaan-N,N,N',N'-tetraazijnzuur monohydraat.
DMEM-F12	Dulbecco's modified eagle's medium met F12
DMSO	DiMethylSulfOxide.
DTT	1,4-DiThioThreitol.
EDTA	EhtyleenDiamineTetraAzijzuur.
E2	17 β -estradiol
EEQ	17 β -estradiol equivalenten
ER	Estrogeen receptor.
ERE's:	Estrogeen Responsieve Elementen.
FCS	Foetal Calf Serum.
HBSS	Hank's Basic Salt Solution.
IRM	Intern referentie materiaal.
PBS	Phosphated Bufferd Saline.
RLU	Relative Light Units.
VMT	Veilig Microbiologische Technieken.
Afgerond	Enkelvoudige, ronde cellen die niet meer gehecht zijn aan de bodem van een kweekfles.
Assay-medium	Kweekmedium zonder fenol rood met 5% gestripte FCS.
Blootstellingmedium	Assaymedium waaraan (xeno-)estrogeen of het te analyseren monster/extract is toegevoegd.
Confluent	Een aaneengesloten monolaag cellen.
Cellijn	Cellen verkregen uit één stamcel welke zich continu delen.
Cytosol	Cytoplasma
Cytotoxisch	Celdood veroorzaakt door een toxische stof.

CALUX [®]	De naam CALUX is een geregistreerd woordmerk in o.a. de Benelux.
ER-CALUX [®]	ER-CALUX [®] assay ter bepaling van ER gemedieerde luciferase activiteit.
ER-CALUX [®] assay:	In vitro reporter gen assay met luciferase als stabiel getransfecteerde reporter.
ER-CALUX [®] cellen	Stabiel getransfecteerde T47D cellen welke gebruikt worden in de ER-CALUX [®] assay. De officiële aanduiding voor deze cellen is T47D pERetata-Luc cellen.
EC ₅₀ :	De concentratie waarbij 50% van het maximale effect optreedt.
Inductie	De RLU van een E2-concentratie/monster gedeeld door de RLU van DMSO.
Invriesmedium	Kweekmedium met daarin 20% DMSO. Dit medium wordt gebruikt bij het invriezen van cellen.
Kweekmedium	DMEM/F12 medium met daarin 7.5% FCS, aminozuur supplement en bicarbonaat. Kweekmedium voor T47D cellen.
Lyseren	Het vernietigen van de membraanstructuur van cellen o.i.v. chemische, fysische, of enzymatische behandeling
Monolayer	Aaneengesloten enkelvoudige laag cellen (zie confluent).
Oogsten	Het verwijderen van het blootstellingmedium uit een microtiterplaat en het lyseren van de cellen.
Passage	Het aantal malen dat een cellijn is overgezet.
Transfectie	Inbrengen van gemanipuleerde genen in een gastcel.
Trypsineren	Het onderling los maken van de cellen m.b.v. het proteïnase trypsine.
Uitplaten	Het overbrengen van celsuspensie in een microtiterplaat.
Vortexen	Homogeniseren m.b.v. een mengapparaat.

5 Materialen

5.1 Reagentia

- 5.1.1 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (TRIS).
- 5.1.2 70% alcohol.
- 5.1.3 Adenosine-5'-TriPhosphate (ATP).
- 5.1.4 CO₂-fles met reduceer-ventiel (kwaliteits-klasse 2.7).
- 5.1.5 Coenzym A, free acid grade I (NOOT: deze stof heeft een beperkte houdbaarheid).
- 5.1.6 Cysteine.HCL.
- 5.1.7 Demiwater.
- 5.1.8 Dimethylsulfoxide (DMSO; 99.7% puur).
- 5.1.9 Dithiothreitol (DTT).
- 5.1.10 DMEM-F12 medium met fenol rood als pH-indicator (Gibco, 31331-028).
- 5.1.11 DMEM-F12 medium zonder fenol rood als pH-indicator (Gibco, 21041-025).
- 5.1.12 Ehtyleendiaminetetraazijnzuur (EDTA).
- 5.1.13 FCS (merk en batch moet getest worden; zie 7.2.6).
- 5.1.14 HBSS met fenolrood als pH-indicator (Gibco, 24020-091)
- 5.1.15 HBSS zonder fenol rood (Gibco, 14025-050)
- 5.1.16 Hexaan (ultra pure)
- 5.1.17 L-Alanine.
- 5.1.18 L-Asparagine.
- 5.1.19 L-Aspartic acid.
- 5.1.20 L-Glutamic acid
- 5.1.21 L-Proline.
- 5.1.22 Luciferine (Duchefa, cas-[103404-75-7]).
- 5.1.23 Magnesiumhydroxidecarbonaat penta hydraat (C₄H₂Mg₅O₁₄).

- 5.1.24 Magnesiumsulfaat ($MgSO_4$).
- 5.1.25 Natriumhydroxide (NaOH).
- 5.1.26 Phosphate buffered saline (PBS-tabletten).
- 5.1.27 Standaard estradiol concentratiereeks (stock) in DMSO (concentraties 0; 0.3; 0.6, 1.0; 3.0; 6.0; 10; 30; nM E2).
- 5.1.28 Trans-1,2-diaminocyclohexaan-N,N,N',N'-tetraazijnzuur monohydraat (CDTA).
- 5.1.29 Trycine.
- 5.1.30 Trypsine poeder.
- 5.1.31 Vloeibaar stikstof.

5.2 Apparatuur

- 5.2.1 24 well platen (Costar 3524).
- 5.2.2 6 well platen (Costar 3506).
- 5.2.3 75 cm² kweekflessen (Costar 3275).
- 5.2.4 8-kanaals pipetapparaat voor 200µl.
- 5.2.5 8-kanaals pipetapparaat voor 30µl.
- 5.2.6 96 well platen (Nunc, 167008).
- 5.2.7 Afvalton voor chemisch / biologisch afval.
- 5.2.8 Autoclaafpan.
- 5.2.9 Bekerglas van 1 liter.
- 5.2.10 Bunsenbrander.
- 5.2.11 CO₂-incubator.
- 5.2.12 Combitips plus, 5 ml (Eppendorf)
- 5.2.13 Cryo-vials.
- 5.2.14 Emmer of ton met daarin een (autoclaafbare) zak waarin materiaal tijdelijk kan worden opgeslagen.
- 5.2.15 ER-CALUX[®] cellen (BioDetection Systems).
- 5.2.16 File CALUX6.par (BioDetection Systems).
- 5.2.17 File ER-CALUX6r.exe (BioDetection Systems).
- 5.2.18 Koel/vries combinatie.
- 5.2.19 Luminometer (Anthos, Lucy 2 met Mikrowin versie 2000 en Lucysoft programmatuur; deze luminometer wordt gebruikt door BioDetection Systems, indien een andere luminometer wordt gebruikt gelieve contact op te nemen met BioDetection Systems).
- 5.2.20 Magneetroerder.
- 5.2.21 Magneetroerstaafje.
- 5.2.22 Mengapparaat.

- 5.2.23 Mouwbeschermers
- 5.2.24 Nitril handschoenen.
- 5.2.25 Omkeerlichtmicroscop met fasecontrast, 4*maal objectief en 10*maal objectief.
- 5.2.26 Onderlegger.
- 5.2.27 Pincet.
- 5.2.28 Pipetteerapparaten met een bereik van 4 μ l tot en met 1000 μ l.
- 5.2.29 Pipetman.
- 5.2.30 Pipetten van 10 ml, steriel.
- 5.2.31 Pipetten van 25 ml, steriel.
- 5.2.32 Plastic buizen van 50 ml met dop, steriel.
- 5.2.33 Plastic flessen van 1 liter met dop.
- 5.2.34 Punt-vials (Phase-sep, psl400222).
- 5.2.35 Punt-vials dopjes met teflon inlay voor vials (Phase sep, psl 408151)
- 5.2.36 Reagent-reservoirs.
- 5.2.37 Repeteerpipet.
- 5.2.38 Software pakket Microsoft excel '2000, engelse versie (Microsoft).
- 5.2.39 Software pakket SlideWrite 4.1 (www.slidewrite.com).
- 5.2.40 Spuit van 10 ml, steriel.
- 5.2.41 Spuit van 50 ml, steriel.
- 5.2.42 Steriele glazen flesjes met dop (teflon inlay, steriel, inhoud minimaal 60 ml).
- 5.2.43 Steriele Pipetpunten met watjes en een bereik van 1 tot en met 1000 μ l.
- 5.2.44 Vacuümpomp met reservoir en 8-kanaals aspirator (facultatief).
- 5.2.45 Vaten voor vloeibaar stikstof.
- 5.2.46 Veiligheidskabinet.
- 5.2.47 Wegwerp steriele 0,2 μ m membraanfilter in houder, voor spuit.
- 5.2.48 Wijdhals HDPE fles van 125 ml met dop.

6 Algemene kweektechnieken

- 6.1.1 Steriele handelingen worden altijd uitgevoerd in een veiligheidskabinet. Start hiertoe een veiligheidskabinet en maak het oppervlak schoon met 70% alcohol. Doe dit voor en na iedere handeling.
- 6.1.2 Homogeniseer flessen voor openen. Maak hiertoe rustige cirkelvormige bewegingen met de fles. De vloeistof mag hierbij niet klotsen.
- 6.1.3 Droog de buitenkant van op kamertemperatuur gebrachte flessen en neem ze eventueel af met 70% alcohol.
- 6.1.4 Na het steriel openen van flessen moeten de doppen met de opening naar beneden op het werkoppervlak worden geplaatst.
- 6.1.5 Plaats (kweek)flessen altijd zover mogelijk achter in een veiligheidskabinet.
- 6.1.6 Controleer voor het steriel gebruik van een pipet altijd de verpakking op scheuren, gaten e.d.
- 6.1.7 Flambeer elke pipet voor gebruik in een veiligheidskabinet door deze kort in een gasvlam te houden.
- 6.1.8 Bij twijfel over de steriliteit van materialen is het aan te bevelen om nieuw materiaal te pakken.
- 6.1.9 Voorkom ten alle tijde dat er lichaamsdelen of andere niet steriele voorwerpen boven geopende steriele flessen, microtiterplaten, etc. komen.
- 6.1.10 Respundendeer celsuspensie door deze voorzichtig minmaal tien maal op te zuigen en weer uit te blazen.
- 6.1.11 Vloeistoffen kunnen filtergesteriliseerd worden door de vloeistof m.b.v. een spuit door een steriel membraanfilter te drukken.
- 6.1.12 Draai de dop van een kweekfles die in de CO₂-incubator wordt geplaatst altijd een kwart slag open.
- 6.1.13 Gevulde microtiterplaten mogen nooit boven op elkaar in de CO₂-incubator worden geplaatst. Plaats gevulde microtiterplaten naast elkaar met een kleine tussenruimte in de CO₂-incubator.
- 6.1.14 Zorg er altijd voor dat de doppen van vials weer goed worden dichtgedraaid.

7 Het kweken en onderhouden van ER-CALUX[®] cellen.

7.1 Principe

ER-CALUX[®] cellen worden onder optimale en gecontroleerde omstandigheden gekweekt in kweekflessen. Om dit te bewerkstelligen worden de cellen gekweekt in een CO₂-incubator (instellingen: 37^oC; 7.5%CO₂; 100% luchtvochtigheid).

Wanneer de cellen (bijna) confluent zijn, worden zij overgezet in een nieuwe kweekfles. De cellen worden bij het overzetten eerst gespoeld met HBSS. Vervolgens worden de cellen getrypsineerd. Zodra de cellen los zijn wordt een deel van de gevormde celsuspensie verdund met kweekmedium en in een nieuwe kweekfles overgebracht.

Cellen worden tevens opgeslagen in vloeibaar stikstof. Wanneer een lopende cellijn bacterieel besmet raakt, moet de cellijn opnieuw worden opgestart met ingevroren cellen.

7.2 Voorbewerkingen

Het kweekmedium voor de cellen bestaat uit DMEM-F12, aangevuld met FCS (7.2.3) en AA sup. FCS wordt door de fabrikant aangeleverd in 500 ml flessen en bewaard bij -20^oC. Om de kans op besmetting van FCS te minimaliseren en om het regelmatig ontdooien en invriezen van FCS te voorkomen, wordt een nieuwe fles FCS verdeeld in porties van 37.5 ml welke eenmalig te gebruiken zijn (7.2.1). Trypsine-oplossing wordt na het bereiden evenals FCS in porties van 30 ml verdeeld en ingevroren (7.2.4).

Een nieuwe batch FCS dient te worden getest ter beoordeling van de kwaliteit. Dit gebeurt door ER-CALUX[®] cellen te kweken met de nieuwe batch FCS naast de cellijn met de oude FCS, waarna vervolgens de luciferase-activiteit van de cellen wordt getest m.b.v. ER-CALUX[®] assay (hfst 8).

Bij de voorbehandeling/bereiding van kweekmedium, trypsine-oplossing en HBSS bestaat de mogelijkheid van introductie van een besmetting. Om deze reden dienen deze oplossingen voor gebruik te worden getest op steriliteit (7.2.5).

7.2.1 Gebruiksklaar maken van FCS.

- 7.2.1.1 Ontdooi en homogeniseer een fles FCS.
- 7.2.1.2 Vul FCS uit in batches van 37.5 ml in plastic buisjes.
- 7.2.1.3 Noteer op de flesjes de inhoud (FCS) en de datum van uitvullen.
- 7.2.1.4 Bewaar maximaal 3 maanden opslaan bij -20°C.

7.2.2 Bereiding van aminozuur supplement (AA sup.)

Stof	Gewicht (g) ^a
Cysteine.HCL	4.80
L-Alanine	3.56
L-Asparagine	6.00
L-Aspartic acid	5.32
L-Proline	4.60
L-Glutamic acid	5.88

^ahoeveelheid nodig voor 1 liter AA sup.

- 7.2.2.1 Los de bovengenoemde aminozuren op in ongeveer 800 ml demiwater. Stel de pH op ong. 9.
- 7.2.2.2 Vul aan tot 1 liter met demiwater.
- 7.2.2.3 Verdeel de AA sup., na filtersterilisatie, in batches van 30-40 ml in 50 ml buisjes.
- 7.2.2.4 Bewaar maximaal 6 maanden bij -20°C.

7.2.3 Bereiding van kweekmedium.

- 7.2.3.1 Ontdooi een flesje FCS (37.5 ml) en AA sup. bij kamertemperatuur.
- 7.2.3.2 Open een nieuwe steriele fles DMEM/F12 medium.
- 7.2.3.3 Verwijder 50 ml DMEM/F12 medium; breng 10 ml van dit medium over in een buis.
- 7.2.3.4 Los 0.63 g NaHCO_3 g in de buis met 10 ml medium. Filter steriliseer de NaHCO_3 -mengsel terug in het medium fles.
- 7.2.3.5 Voeg 2.5 ml van de AA sup. steriel toe aan het medium.
- 7.2.3.6 Breng na filtersterilisatie de 37.5 ml FCS over in de fles DMEM/F12 medium en homogeniseer de fles.
- 7.2.3.7 Noteer op de fles de inhoud (DMEM/F12 +7.5% FCS) en de datum waarop dit is aangemaakt.
- 7.2.3.8 Bewaar maximaal 2 maanden bij 4°C.

7.2.4 Trypsine oplossing.

- 7.2.4.1 Los 10 PBS-tabletten op in 1 liter demi water.
- 7.2.4.2 Los 0.2 gram EDTA en 0.5 gram trypsine op in de PBS-oplossing.
- 7.2.4.3 Open het juiste aantal 50 ml plastic buizen in een veiligheidskabinet.
- 7.2.4.4 Filter steriliseer de trypsine oplossing in de plastic buizen door 30-40 ml over te brengen in de buizen.
- 7.2.4.5 Herhaal totdat alle trypsine oplossing is verdeeld over de buizen.
- 7.2.4.6 Noteer op de buizen de inhoud en de datum waarop het is aangemaakt.
- 7.2.4.7 Bewaar maximaal 1 maand bij -20°C.

7.2.5 Steriliteit van HBSS, kweekmedium en trypsine-oplossing.

- 7.2.5.1 Breng een fles HBSS, trypsine-oplossing en kweekmedium op kamertemperatuur.
- 7.2.5.2 Vul de wells van een steriele 6 well microtiterplaat als volgt:
 - 2 wells → 4 ml HBSS en 1 ml kweekmedium.
 - 2 wells → 2 ml trypsine en 3 ml kweekmedium.
 - 2 wells → 5 ml kweekmedium.

7.2.5.3 Plaats de microtiterplaat vervolgens gedurende 3 dagen in de CO₂-incubator.

7.2.5.4 Beoordeel de microtiterplaat onder de microscoop op besmetting (zie 7.3.2).

7.2.6 Uittesten van nieuwe FCS.

7.2.6.1 Kweek in een kweekfles cellen met kweekmedium dat het nieuwe FCS bevat en een 2^{de} kweekfles cellen van kweekmedium met oud FCS.

7.2.6.2 Zet de cellen minimaal 3 maal over. Beoordeel de cellen gekweekt in kweekmedium met nieuw FCS ten opzichte van cellen gekweekt in kweekmedium met oud FCS. De nieuwe batch FCS dient te worden afgekeurd indien de cellen gekweekt in kweekmedium met nieuw FCS er abnormaal uitzien of wanneer zij afwijkende groeikarakteristieken hebben.

7.2.6.3 Voer een ER-CALUX[®] assay uit (Hfdst 8) waarbij gebruikt gemaakt wordt van kweekmedium met oud FCS. Voer tevens een ER-CALUX[®] assay uit waarbij gebruik gemaakt wordt van kweekmedium met nieuw FCS. Gebruik voor beide assays dezelfde glowmix, lysis reagens, temperatuur etc.

7.2.6.4 Controleer of de resultaten van de standaard E2 concentratiereeks voldoen aan de kwaliteitsnormen (Hfdst 13).

7.2.6.5 Als de batch voldoet aan de hierboven gestelde voorwaarden, kunnen er meerdere flessen FCS met hetzelfde batch-nummer worden besteld.

7.3 Werkwijze.

Het ontdooien van cellen (zie punt 7.3.1) is voornamelijk van toepassing bij het opstarten van een cellijn. Na het ontdooien worden de cellen verdeeld over drie kweekflessen, in verschillende concentraties. Dit wordt gedaan om het risico van besmetting te spreiden. Voordat de cellen verder kunnen worden gekweekt (overzetten), moeten de cellen eerst visueel beoordeeld worden op besmetting (zie punt 7.3.2). Alleen als de cellen geen besmetting vertonen kan er verder worden gegaan met de kweek van de cellen (zie punt 7.3.3). Indien de kwaliteit van de gestarte cellen goed is, dan kunnen er weer nieuwe batches met deze cellen worden ingevroren (zie 7.3.4).

7.3.1 Het ontdooien van de cellen.

- 7.3.1.1 Breng een fles kweekmedium op kamertemperatuur.
- 7.3.1.2 Pipetteer 3 maal 10 ml kweekmedium steriel in 3 aparte kweekflessen.
- 7.3.1.3 Plaats de kweekflessen gedurende 4 uur in de CO₂-incubator..
- 7.3.1.4 Ontdooi snel een cryovial met cellen uit de vloeibare stikstof. Draag een veiligheidsbril en warmte bestendigde handschoenen.
- 7.3.1.5 Verdeel de inhoud van de cryovial steriel als volgt over de kweekflessen:
- kweek-fles 1: → ongeveer 100 µl cel suspensie (10%).
- kweek-fles 2: → ongeveer 300 µl cel suspensie (30%).
- kweek-fles 3: → ongeveer 600 µl cel suspensie (60%)
- 7.3.1.6 Plaats de kweeklessen in de CO₂-incubator. Laat de dop van de fles een kwartslag geopend.
- 7.3.1.7 Beoordeel de kweekflessen regelmatig op besmettingen (7.3.2).
- 7.3.1.8 Een volle kweekfles kan worden overgezet als er geen besmetting waarneembaar is.
- 7.3.1.9 In geval van besmetting dienen de cellen te worden vernietigd.

7.3.2 Beoordeling van de cellen.

- 7.3.2.1 Haal de te beoordelen kweekfles uit de CO₂-incubator.
- 7.3.2.2 Beoordeel de cellen onder de microscoop en tegen het licht.
- 7.3.2.3 Cellen dienen te worden vernietigd indien:
- de cellen 100 % confluent zijn en er veel drijvende cellen aanwezig zijn.
 - het kweekmedium troebel is.
 - er grote bacteriële vlokken of schimmels zichtbaar zijn.
 - er microscopisch duidelijke bacteriële besmettingen zichtbaar zijn.
- 7.3.2.4 Bij een confluentie van 80-100% moeten de cellen worden overgezet
- 7.3.2.5 Voordat een vers ontdooide batch cellen kan worden gebruikt voor het uitvoeren van een ER-CALUX[®]-assay, moeten de cellen eerst minimaal drie keer zijn overgezet in nieuwe kweekflessen.

7.3.3 Overzetten van de cellen

- 7.3.3.1 Breng een fles trypsine-oplossing en HBSS op kamertemperatuur.
- 7.3.3.2 Plaats en open een fles waarin afval-vloeistof kan worden verzameld in een veiligheidskabinet (dit kan bijvoorbeeld een oude lege kweekmedium-fles zijn).
- 7.3.3.3 Breng het kweekmedium uit een volle kweekfles over in de afval-fles.
- 7.3.3.4 Spoel de cellen voorzichtig met 5 ml HBSS.
- 7.3.3.5 Trypsineer de cellen met 0.5 ml trypsine-oplossing (2 ml opbrengen, 1.5 ml verwijderen) ongeveer 5 minuten in de CO₂ incubator.
- 7.3.3.6 Klop de cellen los en beoordeel de cellen onder de microscoop. Meer dan 90% van de celkweek moeten afgeronde, individuele cellen zijn.
- 7.3.3.7 Resuspendeer de cellen in 10 ml kweekmedium.
- 7.3.3.8 Breng 2-3,5 ml celsuspensie over in nieuwe kweekflessen en vul aan tot 10 ml met kweekmedium (zie Tabel 7.1).

Tabel 7.1 *Leidraad voor verdunning van cellen bij overzetten.*

Confluentie	Dagen tot hernieuwd overzetten	Hoeveelheid celsuspensie	Hoeveelheid kweekmedium
80-90%	4	2	8
60-80%	4	3	7
80-90%	3	2,5	7,5
60-80%	3	3,5	6,5

- 7.3.3.9 Plaats de kweekfles in de CO₂-incubator.
- 7.3.3.10 Noteer de datum van het overzetten (zie bijlage 1)

7.3.4 Het invriezen van de cellen

- 7.3.4.1 Trypsineer 60-90% confluente cellen met 0.5 ml trypsine-oplossing (2ml opbrengen, 1.5 ml verwijderen) ongeveer 3 minuten bij kamertemperatuur.
- 7.3.4.2 Resuspendeer de cellen steriel in 3 ml kweekmedium.
- 7.3.4.3 Verdeel geresuspendeerde cellen in kleine batches van 0.5 ml in steriele cryovials. Laat de cellen 15 minuten uitzakken.
- 7.3.4.4 Voeg ongeveer 0.5 ml invriesmedium (2 ml DMSO + 8 ml kweekmedium) toe aan elke cryovial en meng voorzichtig na sluiten van de vials.
- 7.3.4.5 Markeer 6 cryovials met het celtype, passagenummer, datum en uitvoerder. Bescherm de beschreven tekst met Scotch tape.
- 7.3.4.6 Vries de cellen 1 dag in bij -80°C en plaats de cellen vervolgens in vloeibaar stikstof.
- 7.3.4.7 Noteer hoeveel, welke en waar de cryovials bewaard worden.
- 7.3.4.8 Incubeer het invriesmedium bij 37°C om de steriliteit te controleren.
- 7.3.4.9 Ontdooi de volgende dag 1 cryovial volgens punt 7.3.1.

7.4 Kwaliteitszorg

Zie hfdst 13.3

8 De bepaling van de ER-gemedieerde luciferase-activiteit in de ER-CALUX[®] assay.

8.1 Principe

Bij het uitvoeren van een ER-CALUX[®] assay worden ER-CALUX[®] cellen uitgeplaat in 96-wells microtiterplaten. Na 24 uur conditionering in een CO₂-incubator, wordt het medium ververs, en kan na de volgende incubatie van 24 uur de assay worden uitgevoerd. Direct voor het blootstellen van de geconditioneerde plaat wordt het blootstellingmedium klaar gemaakt. Bij het blootstellen worden de te analyseren monsters en de standaard E2-concentratierreeks in triplo op de microtiterplaten gebracht. Na 24 uur incubatie wordt het blootstellingsmedium van de cellen gehaald, de cellen gelyseerd en de platen gemeten of ingevroren bij -20°C. Voor het meten van de luciferase activiteit wordt aan de (ontdooide) platen het substraat luciferine toegevoegd. Luminescentie kan met behulp van een luminometer worden gekwantificeerd.

8.2 Voorbewerkingen voor de methode

Omdat estrogene de respons in de ER-CALUX kunnen activeren, wordt FCS "gestript" van natuurlijke hormonen. De pH-indicator fenol rood kan de detectie en kwantificering van luminescentie verstoren en is bovendien een ER-CALUX[®] agonist. Hierom worden de cellen gespoeld met HBSS zonder fenol rood voor het trypsineren, en worden uitgeplaat in DMEM/F12 medium zonder fenol rood. Om de geïnduceerde luciferase-activiteit te kunnen meten, wordt aan gelyseerde cellen een op pH gestelde substraat (8.4.6) toegevoegd waarin naast co-factoren luciferine aanwezig is. Luminescentie wordt na kwantificering gedoofd met een 0.2 M NaOH-oplossing.

8.3 Bereiding van gestripte FCS.

- 8.3.1 Los 0.6 gram Tris op in 50 ml demiwater en stel de pH op 8.0.
- 8.3.2 Voeg 450 ml demiwater toe.
- 8.3.3 Los 0.25 gram Dextran T500 op in de Tris buffer en voeg 2.5 gram actief kool toe.
- 8.3.4 Voeg een roervlo toe aan de oplossing en sluit de fles goed af. Meng de oplossing overnacht bij 4° C.
- 8.3.5 Ontdooi de volgende dag een fles met FCS.
- 8.3.6 Pipetteer steriel 200 ml FCS in een glazen fles.
- 8.3.7 Hitte inactiveer de FCS gedurende 30 min. bij 56° C in een waterbad.
- 8.3.8 Verdeel de actief kool oplossing over 12 plastic centrifuge buizen van 50 ml.
- 8.3.9 Centrifugeer de buizen 20 min. bij 1000 g.
- 8.3.10 Verwijder zorgvuldig het supernatant door de buizen leeg te schenken. Overige supernatant kan met een pasteurpipet zorgvuldig worden verwijderd, zonder de pellets aan te raken.
- 8.3.11 Verdeel de FCS over 6 buizen met kool pellets. Meng goed en breng over in een schone glazen fles.
- 8.3.12 Incubeer de kool-FCS oplossing in een water bad voor 45 min. bij 45° C. Laat de oplossing zachtjes schudden zodat het in beweging blijft.
- 8.3.13 Verdeel de kool-FCS oplossing over de 6 buizen gebruikt in 8.3.11. Centrifugeer voor 20 min. bij 1000 g.
- 8.3.14 Breng het serum supernatant over naar de 6 overige buizen met kool pellets, meng en herhaal de procedure (8.3.11 tot 8.3.12).
- 8.3.15 Breng het serum supernatant naar 6 schone buizen en centrifugeer voor 20 min. bij 1000 g om het laatste beetje kool te verwijderen.
- 8.3.16 Pool het serum supernatant in een schone glazen fles en filter steriliseer het gestripte serum in porties in steriele 25 ml glazen flessen.
- 8.3.17 Bewaar maximaal 3 maanden bij -20°C.

8.4 Bereiding van assay-medium

- 8.4.1 Ontdooi een fles met 25 ml gestripte FCS en AA sup.
- 8.4.2 Verwijder 47.5 ml van een nieuwe fles DMEM/F12 zonder fenol rood. Breng 20 ml van dit medium over in een steriele plastic buis van 50 ml. Breng het resterende medium van de nieuwe fles in keer over in een steriele glazen fles.
- 8.4.3 Los 0.63 g NaHCO_3 in 20 ml medium. Filter steriliseer deze oplossing terug in de glazen medium-assay fles.
- 8.4.4 Pipetteer steriel 25 ml gestripte FCS en 2.5 ml AA sup. in de fles.
- 8.4.5 Bewaar maximaal 1 maand bij 4°C.

8.4.6 Bereiding van glowmix.

- 8.4.6.1 Bereid 1 liter glowmix. 1 liter glow-mix is genoeg voor 150 microtiterplaten.
- 8.4.6.2 Los in \pm 500 ml demi-water (zie tabel 8.1): tricine en magnesiumhydroxidecarbonaat penta hydraat op.
- 8.4.6.3 Los daarna magnesiumsulfaat, EDTA en DTT op. Stel de pH op 7.8.
- 8.4.6.4 Los co-enzym A en luciferine op. Noteer het batch-nummer van co-enzym A en controleer of de houdbaarheid niet is overschreden.
- 8.4.6.5 Voeg ATP toe en breng volume op ongeveer 0.9 liter met demi-water. Stel de pH op 7.8.
- 8.4.6.6 Vul aan tot 1 liter met demi-water en verdeel de oplossing na homogeniseren in porties van 100 ml in HDPE flessen.
- 8.4.6.7 Bewaar maximaal 6 maanden bij -20°C.

8.4.7 Bereiding van lysis reagens.

- 8.4.7.1 Bereid 1 liter lysis reagens. 1 liter lysis reagens is genoeg voor 500 microtiterplaten.
- 8.4.7.2 Los in 500 ml demi-water: Tris, DTT en CDTA op. Stel de pH op 7.8.
- 8.4.7.3 Voeg de glycerol en triton toe en vul aan tot 1 liter met demi-water. Stel de pH op 7.8.
- 8.4.7.4 Verdeel de oplossing over 50 ml buizen.
- 8.4.7.5 Bewaar maximaal 1 jaar bij -20°C.

Tabel 8.1 Samenstelling van 1 liter glow-mix.

Stof	Mol. Massa (g/mol) ^a	Afwegen (g) ^b	Molariteit
Tricine	179.2	3.58	20,0mM
C ₄ H ₂ Mg ₅ O ₁₄	485.69	0.520	1.07 mM
MgSO ₄	228.46	0.601	2.67 mM
EDTA	372.23	0.037	0.10 mM
DTT	154.2	5.135	33.30 mM
Co-enzym A	767.6	0.207	270 μM
Luciferine	320.32	0.151	470 μM
ATP	551.1	0.29	530 μM

^a: Controleer of de molecuulmassa die staat aangegeven op de verpakking van de stof overeenkomt in met het getal in de tabel, zo niet pas dan de hoeveelheid materiaal aan.

^b: De af te wegen hoeveelheid voor 1 liter glow-mix. Een liter is genoeg voor 150 microtiterplaten.

Tabel 8.2 Samenstelling van 1 liter lysis reagens.

Stof	Mol. Massa (g/mol) ^a	Afwegen (g) ^b	Volume (ml)	Concentratie
Tris	121.1	3.028		25 mM
DTT	154.2	0.31		2 mM
CDTA	364.35	0.729		2 mM
Glycerol	-		100	10%
Triton [®] -x-100	-		10	1%

^a: Controleer of de molecuulmassa zoals aangegeven op de verpakking van de stof overeenkomt met het getal in de tabel, zo niet pas dan de hoeveelheid materiaal aan.

^b: De af te wegen hoeveelheid voor 1 liter lysis reagens. Een liter is genoeg voor 500 microtiterplaten.

8.5 Werkwijze.

Vul voor het uitvoeren van ER-CALUX[®] analyses, de analyse gegevens in (bijlage 2).

8.5.1 Uitplaten microtiterplaten

- 8.5.1.1 Voor het trypsineren van 60-90% confluente cellen, spoel cellen met HBSS zonder fenol rood. Na het trypsineren, resuspendeer de cellen zorgvuldig in 10 ml assaymedium en breng deze cel suspensie over in een steriel 50 ml buisje.
- 8.5.1.2 Tel de cellen (zie bijlage 8)
- 8.5.1.3 Verdun de celsuspensie met assaymedium tot een concentratie van $5.0 \cdot 10^4$ cellen per ml.
- 8.5.1.4 Vul de buitenste rijen van een 96 wells microtiterplaat met 200 μ l HBSS zonder fenol rood (zie Figuur 8.1)
- 8.5.1.5 Vul de resterende wells met 100 μ l gehomogeniseerde celsuspensie (zie 8.5.1.3).
- 8.5.1.6 Homegeniseer de cellen goed tussen het uitplaten van verschillende microtiterplaten.
- 8.5.1.7 Vul de analyse gegevens in (zie bijlage 2).
- 8.5.1.8 Noteer op de deksel van de gevulde microtiterplaten de plaatnummers (= filename; zie analyse gegevens).
- 8.5.1.9 Conditioneer de platen maximaal 24 uur in de CO₂ incubator. De cellen moeten ongeveer 50% confluent zijn. Verwijder voorzichtig het assaymedium met een 8-kanaals pipet (of met een vacuüm pomp) en voeg 100 μ l vers assaymedium toe. Zorg dat de cellen niet langer dan 2 minuten zonder medium staan.
- 8.5.1.10 Incubeer de platen voor 24 uur in de CO₂ incubator.
- 8.5.1.11 Controleer de microtiterplaat op besmettingen en cytotoxiciteit. Besmette microtiterplaten moeten worden vernietigd.

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

Figuur 8.1 Schematische indeling van een microtiterplaat.
 H = 200 μ l HBSS zonder fenol rood; C = 100 μ l celsuspensie.



Figuur 8.2 Positionering van een repetierpipet tijdens het uitvullen van microtiterplaten.

8.5.2 Bereiding van estradiol blootstellingsmedium.

- 8.5.2.1 Breng assaymedium op kamertemperatuur.
- 8.5.2.2 Leg een onderlegger op het werkoppervlak van een veiligheidskabinet.
- 8.5.2.3 Pak de benodigde well platen (zie tabel 8.3).
- 8.5.2.4 Noteer op de deksel van de well platen welke E2 concentraties in welke wells zullen worden overgebracht (de standaard E2 concentratiereeks bestaat uit 8 concentraties).
- 8.5.2.5 **BELANGRIJK!** Draag nitril handschoenen en mouwbeschermers.
- 8.5.2.6 Pipetteer assaymedium in de 8 gelabelde wells.
- 8.5.2.7 Pipetteer E2 vanuit de standaard E2 concentratiereeks stock in gelabelde wells.
- 8.5.2.8 **LET OP!** Neem de benodigde hoeveelheid E2 in 1 keer op in de pipetpunt. Spoel de pipetpunt niet voor. DMSO is viskeus. Spoel de pipetpunt na overbrengen van E2 in het assaymedium door het medium enkele malen op te nemen en weer uit te pipetteren.
- 8.5.2.9 Schud de well plaat (10 minuten; 400 toeren per minuut; 37°C).

Tabel 8.3 De bereiding van het E2-blootstellingsmedium.

Aantal bloot te stellen platen	Te gebruiken wellplaat voor de bereiding van E2-blootstellingsmedium	Hoeveelheid assaymedium per well (ml)	Hoeveelheid E2 uit de standaard concentratiereeks per well (μ l)
1-2	24 well	1 ml	1 μ l
3-4	24 well	1.5ml	1.5 μ l
6-8	6 well	2.5ml	2.5 μ l
9-11	6 well	3.5ml	3.5 μ l
13-16	6 well	5 ml	5 μ l

8.5.3 **Bereiding van de DMSO-blanco en IRM-blootstellingsmedia.**

- 8.5.3.1 DMSO-blanco en IRM wordt binnen een meetserie op iedere plaat in triplo meegenomen. De hoeveelheid DMSO-blanco en IRM die nodig is voor het uitvoeren van de ER-CALUX[®] assay is daarom gelijk aan de hoeveelheid van een E2 concentratie uit de standaard concentratiereeks. Voor de bereiding van DMSO-blanco en IRM wordt het protocol gevolgd als gegeven onder 8.5.2.. Gebruik voor de bereiding van DMSO-blanco dezelfde batch DMSO als waarin de monsters zijn opgenomen en doorverdund na extractie. Gebruik voor de bereiding van IRM het in DMSO opgewerkte intern referentie extract.

8.5.4 **Bereiding het monster- en procedure-blanco-blootstellingsmedium.**

- 8.5.4.1 Breng assaymedium op kamertemperatuur.
- 8.5.4.2 Noteer op de deksel van een 24 well plaat welke te analyseren monsters in welke wells zullen worden overgebracht.
- 8.5.4.3 Pipetteer 1 ml assaymedium in de gelabelde wells.
- 8.5.4.4 Vortex de monsters zorgvuldig.
- 8.5.4.5 Pipetteer 1 µl monster of procedure-blanco uit in de corresponderende gelabelde well.
- 8.5.4.6 **LET OPI!** Neem de benodigde hoeveelheid monster en procedure-blanco in 1 keer op in de pipetpunt. Spoel de pipetpunt niet voor. DMSO is viskeus. Spoel de pipetpunt na overbrengen van het monster in het assaymedium door het medium enkele malen op te nemen en weer uit te pipeteren.
- 8.5.4.7 Schud de 24 well plaat (10 minuten; 400 toeren; 37°C).

8.5.5 **Het vullen van de microtiterplaat.**

- 8.5.5.1 De indeling van microtiterplaten staat weergegeven in figuur 8.3. Monsters, blancsos en referentie materiaal worden in triplo gemeten.
- 8.5.5.2 Noteer op de deksel van een 24 wells microtiterplaat welke blootstellingsmedia in welke wells zullen worden overgebracht.
- 8.5.5.3 Verwijder voorzichtig het assaymedium boven de cellen en pipetteer steriel 100 µl van in 7.6.2, 7.6.3 en 7.6.4 bereidde blootstellingsmedia uit in de corresponderende gelabelde

wells. Zorg dat de cellen niet langer dan 2 min. zonder medium droog staan door b.v. slechts 2-4 kolommen per keer leeg te halen.

8.5.5.4 Incubeer de platen voor 24 uur in de CO₂ incubator.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	D	I	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	D	I	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	D	I	
E		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	
F		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	
G		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	
H												

Figuur 8.3 Een schematische indeling van de 96 well plaat na blootstellen. De C = standaard E2 concentratiereeks, D = DMSO-blanco; I = IRM; M = te analyseren monster (binnen 1 meetserie wordt 1 monsterpositie ingenomen door de procedure blanco!).

8.5.6 Het oogsten van de cellen

8.5.6.1 Breng lysis reagens op kamertemperatuur.

8.5.6.2 Controleer na 24 uur blootstelling de microtiterplaten op cytotoxiciteit/besmetting. Noteer op het desbetreffende formulier (bijlage 2) als er bijzonderheden te melden zijn.

8.5.6.3 Verwijder het blootstellingsmedium en breng dit over in een reagensreservoir. Hou hiertoe de blootstellingsplaat enigszins schuin en schuif de pipetpunten langzaam langs de wanden van de wells naar beneden, daarbij de vloeistof opzuigend.

8.5.6.4 Controleer de monolaag cellen op schade door deze tegen het licht te houden en noteer eventuele schade (bijlage 2).

8.5.6.5 Vul alle wells met 30 µl lysis reagent en plaats deze minstens 15 min in de koelkast en laat ze daarna weer op kamertemperatuur komen als de meting nog dezelfde dag wordt gedaan. Als de meting op een later tijdstip gebeurt moeten de platen worden bewaar bij –20°C. Voor metingen moeten de platen worden ontdooid en op kamertemperatuur worden gebracht.

8.5.7 Bepaling van de luminescentie.

De hier beschreven methode geldt voor de Anthos Lucy 2 luminometer. Voor luminometers van andere fabrikanten, raadpleeg de betreffende handleiding!

- 8.5.7.1 Breng glowmix en de blootstellingsplaten op kamertemperatuur.
Zet de aan de luminometer gekoppelde computer en de Lucy 2 aan.

Primen: plaats de slanguiteinde van dispenser 1 in de glowmix en de slanguiteinde van dispenser 2 in de 0.2 N NaOH oplossing.

Open het programma "lucysoft" zorg ervoor dat de macro's worden geactiveerd.

Klik in de menubalk op "lucysoft" en selecteer "init".

Haal de dispenser uit het apparaat en hou deze boven een bekeerglas.

Klik in de menubalk op "lucysoft" en selecteer "Prime".

Selecteer in het popup-menu "D1" en zet het aantal cyclus op "20" en klik dan op "run".

Selecteer in het popup-menu "D2" en zet het aantal cyclus op "20" en klik dan op "run".

Sluit het programma "lucysoft"

- 8.5.7.2 Schud de ontdooide blootstellingsplaten (2 minuten; 300 toeren; kamertemperatuur).
- 8.5.7.3 Open de file "CALUX6.par" in het programma mikrowin 2000 en plaats de blootstellingsplaat in de luminometer (zie bijlage 9 voor instellingen).
- 8.5.7.4 Klik in de menubalk van het programma Mikrowin op <read>.
- 8.5.7.5 Vul de filenaam (links onder in het scherm) van de file in waarin de resultaten moeten worden opgeslagen (zie bijlage 2, "file name") en klik op <start>.
- 8.5.7.6 Klik in de menubalk van Mikrowin op <file> wanneer de luminometer klaar is met meten.
- 8.5.7.7 Selecteer <export> en sla de file op onder dezelfde naam als opgegeven onder 8.5.7.5.
- 8.5.7.8 Verwijder de plaat uit de Lucy 2.
- 8.5.7.9 Herhaal stap 8.5.7.3– 8.5.7.8 totdat alle platen zijn doorgemeten.
- 8.5.7.10 Sluit het programma Mikrowin.
- 8.5.7.11 *Spoelen van de dispenser.* Herhaal de procedure van het primen plaats daarbij de slanguiteinde bij het primen in demi-water. Zet de Lucy 2 uit en sluit de computer af.

8.6 Kwaliteitszorg

Zie hfdst 13.1 en 13.4

9 Analyse, beoordeling en controle van de ER-CALUX[®]-analyse resultaten.

9.1 Principe

Bij de ER-CALUX[®] assay wordt op elke microtiterplaat een standaard E2-concentratiereeks meegenomen. Deze wordt gebruikt voor de constructie van een E2 calibratie curve. Hiervoor wordt het software pakket Slidewrite gebruikt. De data wordt gecorrigeerd voor de achtergrond RLU (DMSO-blanco). Vervolgens kan door interpolatie de hoeveelheid EEQs (pM E2/well) in de geanalyseerde monsters worden berekend. Ten slotte worden de resultaten uitgedrukt in picomol E2 per gram sediment

9.2 Voorbewerking

Om de ruwe data te kunnen verwerken moet een werkdirectory (9.2.1) worden aangemaakt met daarin een excel-file en een slidewrite-file. Beide files worden eenvoudig in de directory gezet door de file ER-CALUX6r.exe te runnen.

9.2.1 Aanmaken van een werkdirectory (eenmalig per computer).

9.2.2 Start een computer (gebruik deze pc in het vervolg voor de verwerking van data).

9.2.3 Open de file "ER-CALUX.exe" (aangeleverd door BDS).

9.2.4 Controleer of "unzip to folder" op "c:\ER-CALUX" staat en klik op <unzip>.

9.2.5 Klik op <ok> en daarna op <close>.

9.2.6 Controleer of de directory "c:\ER-CALUX" bestaat en of de files "ER-CALUX6r.xls" en "E26.tc" in deze directory staan.

9.3 Werkwijze.

De output van de luminometer wordt ingelezen in excel. De te gebruiken excel-files hebben een standaard opmaak. Na verwerking van resultaten worden de data van de standaard E2 concentratiereeks getransporteerd naar het software programma SlideWrite. In SlideWrite wordt deze dataset gefit (aangepaste dose response, zie hfdst 10) ter verkrijging van een estradiol calibratiecurve. De curvefit data worden vervolgens in excel ingelezen waarna de resultaten van de te analyseren monsters kunnen worden verwerkt en de hoeveelheid EEQs in de monsters kan worden berekend. De tabbladen van de excel file zijn beschermd met het paswoord "calux"

9.3.1 Dataverwerking

- 9.3.1.1 Open de file "er-calux6r.xls".
- 9.3.1.2 Selecteer het tabblad "data form" (zie voor voorbeeld bijlage 5).
- 9.3.1.3 Controleer of de gebruikte concentraties kloppen in ([C6] tot en met [J6] zoniet pas deze aan.
- 9.3.1.4 Vul de gebruikte monstercode in ([C9] tot en met [L9]) (zie formulier analyse gegevens; bijlage 2).
- 9.3.1.5 Vul de gebruikte verdunning in ([C20] tot en met [L20]) (zie formulier analyse gegevens; bijlage 2).
- 9.3.1.6 Vul eventuele opmerkingen met letter code in ([C32] tot en met [L32]) (zie formulier analyse gegevens; bijlage 2).
- 9.3.1.7 Vul de blootstellingsduur (24) in ([B2]) (zie formulier analyse gegevens; bijlage 2).
- 9.3.1.8 Vul het percentage DMSO in de well in [E2] (bij normaal gebruik is dit 0.1).
- 9.3.1.9 Vul de blootstellingdatum in [H2].
- 9.3.1.10 Vul de gemiddelde detectielimiet in [K2].
- 9.3.1.11 Selecteer het tabblad "raw data".
- 9.3.1.12 Vul de hoeveelheid DMSO (μL) in die gebruikt is voor het oplossen van de opgewerkte monsterextracten ([E13] tot en met [E22]) (zie formulier analyse gegevens; bijlage 2).
- 9.3.1.13 Vul de eenheid in van het monster waar het extract van gemaakt is, bijvoorbeeld gram sediment ([F13] tot en met [F22]).
- 9.3.1.14 Vul de hoeveelheid in die gebruikt is voor de extractie ([D13] tot en met [D22]).
- 9.3.1.15 Open op de aan de luminometer gekoppelde pc de te verwerken file (directory "C:\") (voor filenaam zie formulier analyse gegevens; bijlage 2).
- 9.3.1.16 Selecteer het data gebied.
- 9.3.1.17 Kopieer het geselecteerde gebied naar het clipboard.
- 9.3.1.18 Selecteer in de file "er-calux6r.xls" het tabblad "raw-data" en plak de data in ([C3] tot en met [L9]).
- 9.3.1.19 Selecteer in de file "er-calux6r.xls" het tabblad "summary raw-data" en vul de juiste concentraties als alleen getal in ([C4] tot en met [C11]).
- 9.3.1.20 Controleer of in ([I4] tot en met [I23]) de juiste RLU waarde van de DMSO staat. NOOT: het kan voorkomen dat er een monster wordt getest waarvoor de juiste DMSO niet op de plek

van de DMSO staat. In dat geval moet de juiste waarde van de DMSO worden gekopieerd van uit kolom H naar kolom I.

- 9.3.1.21 Selecteer het tabblad "data calibration" en selecteer [B4-D10].
- 9.3.1.22 Kopieer het geselecteerde gebied naar het clipboard.
- 9.3.1.23 Open in SlideWrite de file "e26.tc" en druk tegelijk op "ctrl" en "E"
- 9.3.1.24 Selecteer veld [X1], kies in het menu <edit> "paste" en druk op de linker muisknop.
- 9.3.1.25 Kies in het menu $$ "curve fitter" en druk op de linker muisknop.
- 9.3.1.26 Kies onder "Fit Option" voor "User-Defined" en klik op <select>.
- 9.3.1.27 Selecteer onder "Equations" de "User-Defined #1" en klik op <ok>.
- 9.3.1.28 Klik op <calculate>, vervolgens op <save> en tenslotte twee keer op <ok>. Noot de fit is nu opgeslagen als lijn in de grafiek en kan naar punt 9.3.1.31 worden bekijken door tegelijk op "ctrl" en "D" te drukken.
- 9.3.1.29 Vink "fit statistics" aan onder <options>.
- 9.3.1.30 Klik op <ok> en daarna op <copy to clipboard>.
- 9.3.1.31 Klik op <cancel> en daarna op <done>.
- 9.3.1.32 Bewaar de file (zelfde filenaam als de geopende asc-file) en sluit SlideWrite.
- 9.3.1.33 Selecteer in de file "er-calux6r.xls" het tabblad "fit calibration".
- 9.3.1.34 Selecteer [A1] en plak de gekopieerde fit-data uit SlideWrite.
- 9.3.1.35 Bewaar de file (zelfde filenaam als de geopende asc-file)
- 9.3.1.36 Selecteer het tabblad "analysed EEQ".
- 9.3.1.37 Klik op <print> en sluit excel.
- 9.3.1.38 Herhaal stap 7.4.1.1 - 7.4.1.31 voor de verwerking van overige blootstellingsplaten.

9.4 Kwaliteitszorg

Zie hfdst 13.5

10 Identificering en kwantificering.

Bij de ER-CALUX[®] assay wordt op elke microtiterplaat een standaard E2 concentratiereeks meegenomen. Na meten van de luminescentie wordt de standaard E2 concentratiereeks gebruikt voor het construeren van een E2 calibratiecurve m.b.v. het software pakket Slidewrite. Hierbij wordt er gebruikt gemaakt van een aangepaste dose response curve met

de formule: $y = \frac{a_0}{1 + \left(\frac{x}{a_1}\right)^{a_2}}$ (zie figuur voor grafisch voorbeeld).

Waarbij::

Y = De gemeten RLU

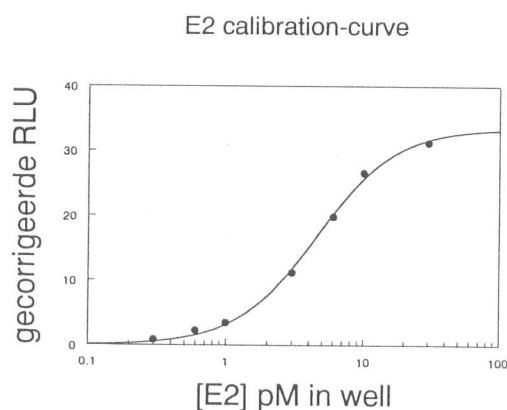
a_0 = De maximale RLU respons

x = De EEQ concentratie

a_1 = De EC_{50}

a_2 = De hellingsfactor van de curve

Data worden gecorrigeerd voor de achtergrond RLU (DMSO-blanco). Door interpolatie van gecorrigeerde monster data, kan de hoeveelheid EEQ de well (pM EEQ/well) worden bekend. Herberekening geeft de hoeveelheid EEQ per gram sediment (pmol EEQ/g droog sediment).



11 Kengetallen

Bij rapportage van de ER-CALUX[®] analyse resultaten, worden ook de prestatie kenmerken van de analyse weergegeven in de analysekarakteristiek. (Zie bijlage 3)

12 Rapportage

De volgende informatie moet worden gerapporteerd:

- 12.1.1 Analysekaracteristiek ER-CALUX[®]-assay.
- 12.1.2 De monstercode en de filenaam waarin de analysegegevens staan.
- 12.1.3 De hoeveelheid EEQ van het geanalyseerde monster (pmol EEQ/g droog sediment) na 24 uur blootstelling.
- 12.1.4 Shewhart controlekaart van het IRM sediment.
- 12.1.5 Shewhart controlekaart van referent toxicant-1.

13 Kwaliteitszorg

13.1 Blancos en referentie materiaal

13.2 Blancos en referentie materiaal

13.2.1 Procedure-blanco

13.2.1.1 Bij de extractie van een serie sedimenten dient een procedure-blanco te worden meegenomen. De procedure-blanco is een blanco monster welke alle stappen, inclusief de extractie, heeft doorlopen. De procedure-blanco wordt binnen een meetserie eenmalig op een microtiterplaat meegenomen.

13.2.2 DMSO-blanco

13.2.2.1 Na opname van de opgewerkte monsters in DMSO dient tevens een vial gevuld te worden met alleen DMSO (zelfde batch). Deze dient binnen een meetserie op iedere plaat te worden meegenomen. Het resultaat van de ER-CALUX[®] analyse van de DMSO-blanco (uitgedrukt in RLU) wordt gebruikt als correctie op achtergrondsignaal van de monsters.

13.2.3 Intern referentie materiaal

13.2.3.1 Bij de extractie en clean-up van sedimenten dient een intern referentie materiaal (IRM) meegenomen te worden. Deze dient binnen een meetserie op iedere microtiterplaat te worden meegenomen. Het resultaat van de ER-CALUX[®] analyse van het IRM (uitgedrukt in pmol EEQ/g sediment) dient te worden genoteerd op de shewhart-kaart.

13.2.4 Referent toxicant.

13.2.5 Als referent toxicant wordt gebruik gemaakt van 1 E2 concentratie (3 pM EEQ/ well) en de maximale inductie van de calibratie-curve berekend bij de 30 pM E2 calibratie concentratie. Deze zijn op elke plaat aanwezig en dienen ter controle van de respons van ER-CALUX[®] cellen (referent toxicant-1; 3 pM E2/well) en ter controle van de vitaliteit van de ER-CALUX[®] cellen (maximale inductie; 30 pM E2/well). Referent toxicant-1 (3 pM E2/well) wordt genoteerd op een shewhart-kaart.

13.3 Kwaliteitszorg bij het kweken en onderhouden van ER-CALUX[®] cellen.

- 13.3.1 De cellen moeten één keer per maand gecontroleerd worden op het afwezig zijn van mycoplasma.
- 13.3.2 De gekweekte cellen moeten minimaal één keer per week worden overgezet.
- 13.3.3 Er moet altijd minimaal één goed ingevroren partij van 5 cupjes cellen aanwezig zijn.
- 13.3.4 Een cellijn kan maximaal 22 maal worden overgezet.

13.4 Kwaliteitszorg bij de bepaling van de ER-gemedieerde luciferase-activiteit in de ER-CALUX[®] assay.

- 13.4.1 Voordat een vers ontdooide batch cellen kan worden gebruikt bij de uitvoering van een ER-CALUX[®]-assay, moeten de cellen eerst minimaal drie keer zijn overgezet in een nieuwe kweekfles.

13.5 Kwaliteitszorg bij de analyse, beoordeling en controle van de ER-CALUX[®]-analyse resultaten

- 13.5.1 Per blootstellingsplaat wordt automatisch in het tabblad "Analysed EEQ" (zie bijlage 6 voor voorbeeld) van de betreffende excel-file gecontroleerd of de inductiefactor van de calibratie curve ([B5]) hoger is dan 6. Is dit niet het geval, dan is het aan te raden de meting in z'n geheel te herhalen na overleg met de projectleider. NOOT: waarden zullen als "false" worden betiteld in kolom D.
- 13.5.2 Per blootstellingsplaat wordt automatisch in de excel file gecontroleerd of het percentage standaard-deviatie van de monsters niet groter is dan 15%. Is de standaard-deviatie groter, dan moet de meting van het betreffende monster herhaald worden. NOOT: Het resultaat zal als "false" worden beoordeeld in kolom D.
- 13.5.3 Per blootstellingsplaat wordt automatisch in de excel file gecontroleerd of de R^2 groter of gelijk is aan 0.98. Als niet aan deze voorwaarde wordt voldaan, dan moet de gehele plaat herhaald worden. NOOT: Het resultaat zal als "false" worden beoordeeld in kolom D.
- 13.5.4 Noteer per blootstellingsplaat de referent toxicant-1 (tabblad "analyzed EEQ", [B5]) op de Shewhartkaart (pM E2/well) en controleer of de waarde voldoet aan de eisen (zie 13.6).
- 13.5.5 Noteer per blootstellingsplaat het IRM (tabblad "analyzed EEQ", [cel F54]) op de Shewhartkaart (pmol EEQ/g sediment) en controleer of de uitkomst voldoet aan de eisen.
- 13.5.6 Per blootstellingsplaat van de ER-CALUX[®] wordt automatisch gecontroleerd of de resultaten (uitgedrukt in pM E2/well) van de geanalyseerde monsters (tabblad "analyzed EEQ", [C28-D37]) tussen de detectielimiet en de EC_{50} (tabblad "Analysed EEQ", [B4]) liggen. NOOT: Het resultaat zal als "false" worden beoordeeld in kolom D indien niet aan deze voorwaarde wordt voldaan. Liggen de resultaten onder de detectielimiet, dan moet er minder verdund worden. Liggen de resultaten boven de EC_{50} , dan moet het monster meer worden verdund en nogmaals worden geanalyseerd.

13.6 Algehele Kwaliteitsborging

De ER-CALUX[®] bepaling kan als geldig worden beschouwd als aan de volgende kwaliteitscriteria (QA) wordt voldaan:

Kwaliteitsborging

Controlesediment (IRM)

Referent toxicant-1	3 pM E2 in de well (3 nM E2 stock concentratie) Controle via shewhart kaart
Opslagtijd extract	maximaal 4 weken in koeling
Testdataformulier	zie bijlage 2
Analysekaracteristiek	Noteren van o.a. herhaalbaarheid, detectiegrens, afrondingsinterval, 1 ^o /2 ^o /3 ^o -lijns borging.
Overschrijding van criteria:	Overleg met betrokken projectleider wanneer overschrijding plaats vindt van:
Test verwerpen:	<ul style="list-style-type: none"> ■ opslagtijd extract ■ Bij overschrijding van de 3s-grens van het 3 pM calibratiepunt ■ inductiefactor < 6 ■ Respons boven EC₅₀ ■ Overleg met projectleider bij overschrijding van de 3s-grens van het IRM ■ R² < 0.98

14 Veiligheid

Bij het gebruik van de ER-CALUX[®] cellen moeten de regels voor VMT worden nageleefd. De ER-CALUX[®]-assay maakt gebruik van genetisch gemodificeerde cellen. Daarnaast wordt er omgegaan met milieugevaarlijk stoffen. Om het risico van contaminatie voor de mens en het milieu zoveel mogelijk te beperken, dient men zich strikt aan de in 6 gegeven algemene technieken te houden. **Indien een werkoppervlak is verontreinigd met extracten of overige potentieel milieugevaarlijke stoffen, dan moet deze direct worden afgenomen met zeep. Bescherm hierbij jezelf goed. Draag in ieder geval twee paar handschoenen en mouwbeschermers en verwijder bij de geringste twijfel over contaminatie, de handschoenen direct. Indien een werkoppervlak is besmet met biologische materiaal, dan moet deze worden afgenomen met 70 % alcohol.** Voor SMDS data sheet, zie <http://www.state.nj.us/health/eoh/rtkweb/rtkhsfs.htm>.

15 Literatuur

- 15.1.1 Legler J, Van den Brink CE, Brouwer A, Murk AJ, Van der Saag P, Vethaak AD, Van der Burg B. 1999. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol Sci* 48:55-66.
- 15.1.2 Gilson Protocol calibratie pipetten Gilson Medical Electronic 802675B (1989).
- 15.1.3 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.

16 Bijlagen

Bijlage 1	celregistratie
Bijlage 2	analyse gegevens
Bijlage 3	Analyse karakteristiek
Bijlage 4	Algemene VMT regels
Bijlage 5	Tabblad "data form" (voorbeeld)
Bijlage 6	Tabblad "summary raw data" (voorbeeld)
Bijlage 7	Tabblad "analysed EEQ" (voorbeeld)
Bijlage 8	Het tellen van cellen
Bijlage 9	Instellingen luminometer

Bijlage 1 Celregistratie

Gebruikte gastheer	T47D humane adenocarcinoma cellen.					
Gebruikte genetisch materiaal voor	Reporter-gen van de vuurvlieg.					
Gebruikte donor	PGL 2 basic (luc).					
Naam van de cellen	pEREtata-Luc					
Projectnummer						
Nummer kennisgeving						
Naam cel-gebruiker						
Toeziether cel-gebruiker						
Cellen verkregen van						
Kweeklijn begonnen op						
Cellen overgezet op						
Kweeklijn beëindigd op						
Reden beëindiging						

Bijlage 2 Analyse gegevens

Algemene gegevens ER-CALUX [®] -assay	
Naam uitvoerder:	
Celtype:	
Passage cellen	
Plaatype:	
Plaat / filenaam:	
Concentratie-reeks:	
Datum uitplaten	
Datum verversen	
Datum blootstelling:	
Blootstellingsduur (hr)	
Datum-oogsten	
Meetdatum:	
Referentie monster(s):	

Monster indeling

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

Verdunning monster

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

C=cytotoxiciteit B=besmetting N=neerslag

Bijzonderheden:

Bijlage 3

01	Parameter Matrix	EEQ's in sediment
02	Analysevoorschrift	Nummer : Versie : Datum :
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 estrogene 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 (E2) concentratiereeks wordt meegenomen. Door interpolatie van de respons van een monster in de E2 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	
07	Monsteroepslag	Half jaar na opwerking en indien in DMSO
08	Meetbereik	Van detectielimiet tot EC ₅₀
09	Kalibratie	E2: 8 concentraties
10	Gemiddelde Detectielimiet	In bioassay: 0.5 pM/well Voor sediment extracten: 0.025 pmol/gram droog sediment
11	Afrondingsgrens LABINSYS	0.01 pg/g bij 0.14 pmol/gram droog sediment
12	Herhaalbaarheid	<55%
13	Reproduceerbaarheid	n.v.t.
14	Terugvinding	n.v.t.
15	Referentiemateriaal	Sediment extract:
16	Controlekaarten	-3 pM punt van de calibratie-curve -Intern Referentie Materiaal
17	1 ^e lijn controle	Sediment extract ;
	2 ^e lijn controle	
	3 ^e lijn controle	
18	Storende componenten	Sedimenten kunnen een dusdanig hoeveelheid zwavel bevatten dat deze cytotoxisch is voor de cellen hiertoe moeten het sediment ontzwaveld worden

Bijlage 4 Algemene VMT regels.

- Tijdens werkzaamheden zijn deuren en ramen van de werkruimte gesloten.
- De werkruimte dient schoon en netjes te worden gehouden.
- De werkoppervlakken moeten worden ontsmet met 70% alcohol voor en aan het eind van de werkzaamheden en aan het einde van iedere werkdag.
- Bij besmetting van de werkruimte dienen de besmette oppervlakken direct te worden ontsmet met 70% alcohol.
- Tijdens de werkzaamheden wordt een laboratoriumjas of andere beschermende kleding gedragen. Het dragen van de werkkleding buiten de VMT werkruimte is slechts daar toegestaan waar onderdelen van het betreffende experiment worden uitgevoerd. Met genetisch gemodificeerde organismen besmette werkkleding wordt voor het wassen gesteriliseerd of ontsmet. In de werkruimte aanwezige eigen kleding wordt gescheiden van de werkkleding bewaard. De eigen kleding wordt buiten de VMT ruimte bewaard.
- Het is ten strengste verboden te eten, drinken, roken, het aanwezig hebben van eet- of drinkgerei en het opslaan van voedsel en dranken in de werkruimte.
- Bij het verlaten van de werkruimte moeten de handen worden gewassen.
- **Het is ten strengste verboden te pipetteren met de mond.**
- Materiaal dat in aanraking is geweest met genetisch gemodificeerde organismen wordt afgevoerd als potentieel biologische gevaarlijk materiaal of na sterilisatie als gewoon afval afgevoerd.
- Biologisch gevaarlijk afval wordt verzameld in daarvoor bestemd containers die eenmalig kunnen worden gesloten.
- Ook bij werkzaamheden met niet genetisch gemodificeerde organismen in VMT ruimtes moeten de VMT werkvoorschriften in acht worden genomen.

Bijlage 5 Tabblad "data form" (voorbeeld)

1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
2	version 6.2/09-07-01												
3	Exposure time	Percent DMSO			Date of exposure				detection limit		limit of quantitation		
4	Template	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	A												
6	B	E2-0	E2-0.3	E2-1.0	E2-3.0	E2-6	E2-10	E2-30	E2-100	DMSO	ref		
7	C	E2-0	E2-0.3	E2-1.0	E2-3.0	E2-6	E2-10	E2-30	E2-100	DMSO	ref		
8	D	E2-0	E2-0.3	E2-1.0	E2-3.0	E2-6	E2-10	E2-30	E2-100	DMSO	ref		
9	E												
10	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	H												
13													
14	Dilution	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
15	A												
16	B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
17	C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
18	D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
19	E												
20	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	H												
23													
24													
25													
26	Additional information	C=Cytotoxic			CO=Contamination			D=Deposit		F=Fault in pipetting			
27		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
28	A												
29	B												
30	C												
31	D												
32	E												
33	F												
34	G												
35	H												

Bijlage 6 Tabblad "summary raw data" (voorbeeld)

1	A	B	C	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
2				RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	AVG-				
3	Sample	Dilution	[E2] (pM)	Well-1	Well-2	Well-3	AVG	DMSO	DMSO	STDEV	%STDEV	Induction	Measured pM in well
4	E2-0	1		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
5	E2-0.3	1		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
6	E2-1.0	1		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
7	E2-3.0	1		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
8	E2-6	1		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
9	E2-10	1		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
10	E2-30	1		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
11	E2-100	1		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
12	DMSO	1		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
13	ref	0		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
14	0	0		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
15	0	0		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
16	0	0		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
17	0	0		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
18	0	0		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
19	0	0		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
20	0	0		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
21	0	0		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
22	0	0		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
23	0	0		0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
24													
25													
26													
27													
28													
29													
30													
31													
32													
33													

Bijlage 7 Tabblad "analysed EEQ" (voorbeeld)

Engineering limit		0															
Calculated detection limit		0.000000	0.000000														
Calculated limit of quantitation		0.000000	0.000000														
ECL		0.000000	0.000000														
actual concentration for industrial		0.000000	0.000000														
actual concentration for industrial		0.000000	0.000000														
? Conf Det of fill		0.000000	0.000000														
Date of passage																Industrialisation of	
General Information		0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0	0	0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
		0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0	0	0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
		0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0	0	0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
		0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0	0	0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
		0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0	0	0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
		0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0	0	0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
		0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0	0	0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
		0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0	0	0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
		0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0	0	0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
		0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0	0	0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0	0	0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000		
Rozuiktr in smalt/DMSO		Dilution	EEQ [µg/l in smalt]	TRUE/FALSE	Sample code	EEQ in sample	STDEV	Half		Additional remarks		Explanation					
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / liter sediment									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / liter sediment									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / liter sediment									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / liter sediment									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / liter sediment									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / liter sediment									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / liter sediment									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / liter sediment									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / liter sediment									
Rozuiktr in smalt? soil dependent matrix		Dilution	EEQ [µg/l in smalt]	TRUE/FALSE	Sample code	EEQ in sample	STDEV	Half		Additional remarks		Explanation					
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pmol EEQ / l									
Rozuiktr in smalt? smelted for blank procedure		Dilution	EEQ [µg/l in smalt]	TRUE/FALSE	Sample code	Corrected EEQ in sample	STDEV	Half		Additional remarks		Explanation					
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pg 2,3,7,8 TCDD TEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pg 2,3,7,8 TCDD TEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pg 2,3,7,8 TCDD TEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pg 2,3,7,8 TCDD TEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pg 2,3,7,8 TCDD TEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pg 2,3,7,8 TCDD TEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pg 2,3,7,8 TCDD TEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pg 2,3,7,8 TCDD TEQ / l									
		0	0.000000	0.000000	0	0.000000	0.000000	pg 2,3,7,8 TCDD TEQ / l									

Bijlage 8 Het tellen van cellen

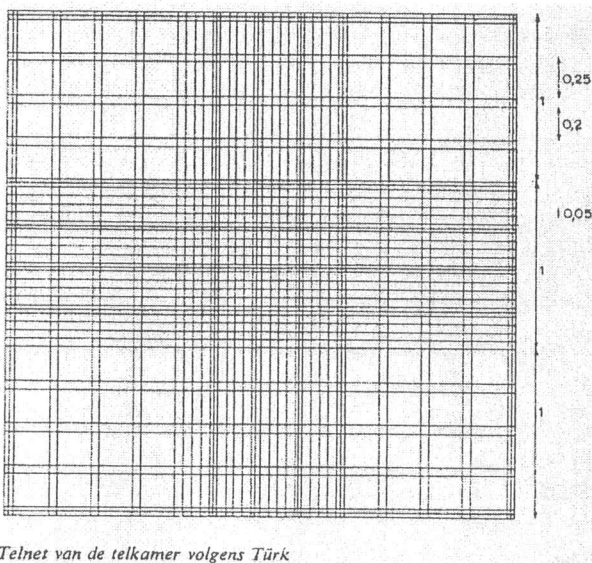
Tellen van cellen m.b.v. Türk telkamer

Principe

Voor het tellen van cellen heeft men een telkamer nodig, bijvoorbeeld met een indeling volgens Türk (zie figuur 1). Een telkamer heeft twee compartimenten die omgeven zijn door groeven. Naast de zijdelingse groeven zijn twee plateaus aanwezig, die iets hoger zijn dan het niveau van de compartimenten. Bij de Türk telkamer bedraagt het niveauverschil 0.1 mm.

Op een zijvlak van de telkamer zijn de maten aangegeven van de verschillende door de lijnen gevormde vierkantjes en van de diepte van de telkamer. De maten zijn aangegeven in mm. Op de plateaus komt een dekglas te rusten. De ruimte tussen het dekglas en het plateau in combinatie met het oppervlakte van het raster waarin de cellen worden geteld bepaald het volume waarin het aantal getelde cellen zich bevinden. Dit geeft het aantal cellen per μl . (bv $(0,2 \text{ mm} \times 0,25 \text{ mm}) \times 0,1 \text{ mm} = 0,005 \text{ mm}^3 = 5 \times 10^{-3} \text{ mm}^3 = 0,005 \mu\text{l}$)

Figuur 1; telnet van de telkamer volgens Türk



Telnet van de telkamer volgens Türk

Opmerking

De telkamer + dekglas moet na gebruik goed worden schoongemaakt, en bij tellen van humane cellen eerst in RBS50 worden geweekt.

Literatuur

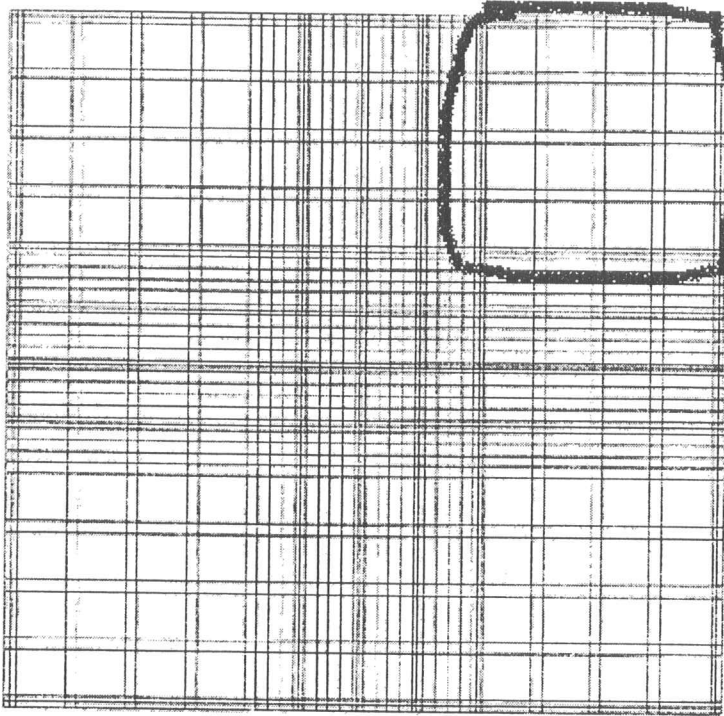
Dr. P.W. Helleman et al, Agor Elsevier Amsterdam (1975), 42-73, Hematologie.

Materiaal

- Türk telkamer
- Celoplossing met getrypsineerde cellen.

Werkwijze

- Maak de telkamer goed stofvrij
- Leg het dekglasje op de telkamer, zodat je het interferentiepatroon kan zien onder de microscoop.
- Homogeniseer de celsuspensie
- Breng 0.5 ml op steriel wijze van celsuspensie naar een epje (deze hoeft niet steriel te zijn)
- Homogeniseer het gesloten epje door tegen de onderkant van het epje te tikken.
- Breng ongeveer 7.5 μ l van de celsuspensie tussen het dekglasje en het plateau van de telkamer. Door de capillaire werking zal de druppel onder het dekglasje worden gezogen.
- De telkamer is in negen grote vakken opgedeeld, waarvan iedere weer in zestien hokjes is verdeeld.
- Tel het aantal cellen binnen het omcirkelde gebied in onderstaand figuur. **LET OP:** Om beslissing moeilijkheden te voorkomen moet de telling in de vierkantjes steeds als volgt gebeuren, de cellen die op de **rechter en de onderste** lijn van een vierkantje liggen worden **niet meegeteld** en die op de **linker en bovenste** lijn van een vierkantje liggen worden **wel meegeteld**.



Telnet van de telkamer volgens Türk

- Tel nogmaals een gebied van dezelfde grootte en middel deze twee waarden.
- Het volume onder dit gebied is $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3 = 0.1 \mu\text{l}$. Het gemiddelde getelde aantal cellen is dus 10^4 per ml.

Bijlage 9 Instellingen luminometer

Dispenser 1:

Volume: 100 μ l

Meettijd: 4 seconden

Dispenser 2

Volume: 100 μ l

Meet-template:

Alles behalve buitenste rijen en van links naar rechts.