

DIN EN ISO 19040-3



ICS 13.060.70

**Wasserbeschaffenheit –
Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser –
Teil 3: In vitro-Reportergentest mit humanen Zellen
(ISO 19040-3:2018);
Deutsche Fassung EN ISO 19040-3:2022**

Water quality –
Determination of the estrogenic potential of water and waste water –
Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay (ISO 19040-3:2018);
German version EN ISO 19040-3:2022

Qualité de l'eau –
Détermination du potentiel oestrogène de l'eau et des eaux résiduaires –
Partie 3: Essai in vitro sur cellules humaines avec gène rapporteur (ISO 19040-3:2018);
Version allemande EN ISO 19040-3:2022

Gesamtumfang 51 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 19040-3:2018 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ als EN ISO 19040-3:2022 übernommen, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 119-01-03-05-09 AK „Hormonelle Wirkungen (Xenohormone)“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) erarbeitet.

Bezeichnung des Verfahrens:

Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser — Teil 3: In vitro-Reporteragentest mit humanen Zellen (T 9):

Verfahren DIN EN ISO 19040-3 —T 9

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5667-16	siehe	DIN EN ISO 5667-16
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 6107-6:2004	siehe	DIN ISO 6107-6:2017-11
ISO 7405:2008*	siehe	DIN EN ISO 7405:2009-06*
ISO 11074:2015	siehe	DIN EN ISO 11074:2015-11
ISO 15839:2003	siehe	DIN EN ISO 15839:2007-02
ISO 20079:2005	siehe	DIN EN ISO 20079:2006-12
ISO 21427-2:2006	siehe	DIN EN ISO 21427-2:2009-08

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

* Die Norm wurde inzwischen zurückgezogen und durch ISO 7405:2018 bzw. DIN EN ISO 7405:2019-03 ersetzt.

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasserchemischen Gesellschaft — Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) —gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser —Teil 3:
In vitro-Reportergentest mit humanen Zellen (T 9).

Die als DIN-Normen veröffentlichten Deutschen Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Deutschen Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA publiziert.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung* sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V. oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin, Auskunft.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 5667-16, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 16: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren*

DIN EN ISO 7405:2009-06, *Zahnheilkunde — Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten (ISO 7405:2008); Deutsche Fassung EN ISO 7405:2008*

DIN EN ISO 15088:2009-06, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio) (ISO 15088:2007); Deutsche Fassung EN ISO 15088:2008*

DIN EN ISO 15839:2007-02, *Wasserbeschaffenheit — Online-Sensoren/Analysengeräte für Wasser — Spezifikationen und Leistungsprüfungen (ISO 15839:2003); Deutsche Fassung EN ISO 15839:2006*

DIN EN ISO 20079:2006-12, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (Lemna minor) — Wasserlinsen-Wachstumshemmtest (ISO 20079:2005); Deutsche Fassung EN ISO 20079:2006*

DIN EN ISO 21427-2:2009-08, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der Gentoxizität mit dem In-vitro-Mikrokerntest — Teil 2: Verwendung einer nicht-synchronisierten V79-Zellkulturlinie (ISO 21427-2:2006); Deutsche Fassung EN ISO 21427-2:2009*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

DIN ISO 6107-6:2017-11, *Wasserbeschaffenheit — Wörterbuch — Teil 6 (ISO 6107-6:2004); Text Deutsch, Englisch, Französisch und Russisch*

Deutsche Fassung

Wasserbeschaffenheit —
Bestimmung des estrogenen Potentials
von Wasser und Abwasser —
Teil 3: In vitro-Reportergentest mit humanen Zellen
(ISO 19040-3:2018)

Water quality —
Determination of the estrogenic potential
of water and waste water —
Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay
(ISO 19040-3:2018)

Qualité de l'eau —
Détermination du potentiel oestrogénique
de l'eau et des eaux résiduaires —
Partie 3: Essai in vitro sur cellules humaines
avec gène rapporteur (ISO 19040-3:2018)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 19. September 2022 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Störungen	9
5 Grundlage des Verfahrens	9
6 Geräte und Materialien	9
7 Reagenzien, Zellen und Medien	10
8 Probenahme und Proben	14
8.1 Allgemeines	14
8.2 Flaschen und Materialien für die Probenahme	14
8.3 Vorbereitung von Flaschen und Geräten für die Probenahme	14
8.4 Probenahmeverfahren	14
8.5 Probentransport	14
8.6 Vorbehandlung der Probe	15
8.7 Lagerung der Proben	15
9 Testverfahren	15
9.1 Erhaltung der Zellkultur	15
9.1.1 Einfrieren der Zellen	15
9.1.2 Ansetzen einer neuen Zellkultur	15
9.1.3 Kultivierung der Zellen	16
9.2 Reporter-Testverfahren mit humanen Zellen	16
9.2.1 Einsaat der Zellen (Tag 1)	16
9.2.2 Herstellung der E2-Referenz (Tag 2)	16
9.2.3 Herstellung der Probenverdünnungen (Tag 2)	17
9.2.4 Feldblindwert	18
9.2.5 Exposition der Zellen (Tag 2)	18
9.2.6 Ernten der Zellen (Tag 3)	18
9.2.7 Messung der Lumineszenz (Tag 3)	18
9.3 Datenauswertung	19
9.3.1 Berechnung der Reporter-Induktion	19
9.3.2 Berechnung des Prozentsatzes der maximalen Wirkung	19
9.3.3 Berechnung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung	20
10 Gültigkeitskriterien	20
10.1 Gültigkeitskriterien für den Test	20
10.2 Gültigkeitskriterien für die Proben	20
11 Bewertungskriterien	20
12 Untersuchungsbericht	21
Anhang A (informativ) Konfiguration des Luminometers	22
Anhang B (informativ) Testplattenbelegung	23
Anhang C (informativ) Eigenschaften und Einzelheiten des Biotests	24
Anhang D (informativ) Testung von Chemikalien und Extrakten	26
D.1 Allgemeines	26
D.2 Extraktion von Wasserproben	26
D.3 Test mit verdünnten organischen Lösungen oder Extrakten	26
D.4 Daten aus der Literatur	26
Anhang E (informativ) Herstellung von Verdünnungsreihen	28
Anhang F (informativ) Verfahrenskennndaten	29
F.1 Beschreibung des Ringversuchs	29
F.1.1 Allgemeines	29

F.1.2	Beschreibung der Proben und teilnehmende Laboratorien	29
F.1.3	Zusammenfassung der 17β -Estradioläquivalentkonzentrationen (EEQ)	30
F.1.4	Zusammenfassung der geringsten nicht wirksamen Verdünnungen LID (<i>G</i> -Wert)	34
F.1.5	Richtigkeit der Ergebnisse	37
Anhang G	(informativ) Statistische Bewertung	41
Anhang H	(informativ) Berechnung von 17β -Estradiol-Äquivalenten	42
H.1	Allgemeines	42
H.2	Modellierung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung	42
H.3	Berechnung von 17β -Estradiol-Äquivalenten für Proben	43
H.4	Angaben von 17β -Estradiol-Äquivalenten für Proben	43
Anhang I	(informativ) Bestimmung der geringsten nicht wirksamen Verdünnung (<i>G</i> -Wert) — Vereinfachte Auswertung für die Abwassertestung	44
I.1	Allgemeines	44
I.2	Grundlage des Verfahrens	44
I.3	Herstellung von Verdünnungen zur Bestimmung des <i>G</i> -Werts	44
I.4	Test zur Bestimmung des <i>G</i> -Werts	44
I.5	Ergebnisbewertung — <i>G</i> -Wert, Abwässer	44
I.6	Dokumentation der Ergebnisse	45
Literaturhinweise		46

Bilder

Bild 1	— Schematische Darstellung der Mikrotiterplatte nach der Subkultivierung	16
Bild B.1	— Testplattenbelegung für eine Probe mit 10 sukzessiven Verdünnungsstufen (in dreifacher Ausführung)	23
Bild C.1	— Testprinzip	24
Bild F.1	— Zusammenfassung der 17β -Estradiol Äquivalentkonzentrationen (EEQ) [ng/l] der wässrigen Proben S1, S2, S3 und S5	34
Bild F.2	— Zusammenfassung der bestimmten geringsten nicht wirksamen Verdünnung (<i>G</i> -Wert) der wässrigen Proben S1, S2, S3 und S5	37
Bild F.3	— Zusammenfassung der Richtigkeit für die Proben S2 und S5 (ausgedrückt in absoluten Differenzen zum angenommenen Wert)	40

Tabellen

Tabelle 1	— Herstellung des Substratgemisches (1 000 ml)	13
Tabelle 2	— Zusammensetzung des Zelllyse-Gemisches (1 000 ml)	13
Tabelle 3	— Verdünnungsstufen für die Referenzverbindung 17β -Estradiol (E2)	17
Tabelle 4	— Verdünnungsstufen für die Wasserproben	17
Tabelle C.1	— Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis	25
Tabelle C.2	— Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis	25
Tabelle C.3	— Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis	25
Tabelle D.1	— Zusammenfassung relativer Potenzen (P_r) im Vergleich zu 17β -Estradiol für ausgewählte Verbindungen	27
Tabelle F.1	— Beschreibung der Proben	29
Tabelle F.2	— Überblick über die Proben, die jedes Labor getestet hat	30
Tabelle F.3	— Zusammenfassung der EEQ-Ergebnisse des <i>In-vitro</i> -Reporteragentest mit humanen Zellen	31
Tabelle F.4	— Zusammenfassung der geringsten nicht wirksamen Verdünnungen (LID, <i>G</i> -Wert)	35
Tabelle F.5	— Zusammenfassung der Schätzung der Richtigkeit für die Proben S2 und S5	38

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 19040-3:2018 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC 230 Wasseranalytik“ als EN ISO 19040-3:2022 übernommen, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis März 2023, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis März 2023 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 19040-3:2018 wurde von CEN als EN ISO 19040-3:2022 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147, *Water quality*, Unterkomitee SC 5, *Biological methods* erarbeitet.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 19040 ist auf der ISO Internetseite abrufbar.

WARNUNG — Anwender dieses Dokuments sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Arbeitgebers, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen.

WICHTIG — Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach diesem Dokument Fachleute oder Fach-einrichtungen einzuschalten.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser mittels eines Reporter-Gen-Tests unter Verwendung stabil transfizierter, humaner Zellen fest. Dieser Reporter-Gen-Test beruht auf der Aktivierung des humanen Estrogenrezeptors alpha.

Dieses Verfahren ist anwendbar auf:

- Süßwasser;
- Abwasser;
- wässrige Extrakte und Sickerwasser;
- Eluate von Sedimenten (Süßwasser);
- Porenwasser;
- wässrige Lösungen von Einzelsubstanzen oder von chemischen Gemischen;
- Trinkwasser;

Die Bestimmungsgrenze (LOQ) dieses Verfahrens zur direkten Analyse von Wasserproben liegt zwischen 0,3 ng/l und 1 ng/l 17 β -Estradiol-Äquivalenten (EEQ). Diese Werte wurden in einem internationalen Ringversuch ermittelt (siehe Anhang F). Der obere Arbeitsbereich wurde bis zu einem Gehalt von 75 ng EEQ/l bewertet [basierend auf einem internationalen Ringversuch (siehe Tabelle F.3)]. Proben, die ein estrogenes Potenzial oberhalb dieser Schwelle zeigen, müssen für eine gültige Quantifizierung verdünnt werden. Eine Extraktion und Anreicherung von Wasserproben kann notwendig sein, wenn ihr estrogenes Potential unter der oben angegebenen Bestimmungsgrenze liegt.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

Kulturmedium

flüssige oder verfestigte Nährstoffe, die Zellwachstum fördern

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 24, modifiziert — „mikrobielles Wachstum“ durch „Zellwachstum“ ersetzt]

3.2

Verdünnungsstufe

G

Volumenverhältnis einer Mischung von Wasser oder Abwasser (mit dem Zähler 1) und dem Verdünnungswasser als ganze Zahl

Anmerkung 1 zum Begriff: Für unverdünntes Wasser oder Abwasser ist dieser Koeffizient per Definition $1 \rightarrow 1$. Der entsprechende und kleinstmögliche Wert von *G* ist 1. In diesem Dokument zeigt der Pfeil den Übergang vom anfänglichen Gesamtvolumen zum endgültigen Gesamtvolumen an.

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 28]

3.3

Verdünnungswasser

Wasser, welches zur Untersuchungsprobe hinzugegeben wird, um eine Serie definierter Verdünnungen herzustellen

[QUELLE: ISO 20079:2005, 3.7]

3.4

EC₅₀

Konzentration einer Verbindung, die 50 % einer Wirkung verursacht

Anmerkung 1 zum Begriff: Im Sinne dieses Dokuments ist der EC₅₀ die Konzentration einer Verbindung, die 50 % der maximalen Reportergenaktivität induziert, die durch diese Verbindung erreicht werden kann.

3.5

Extrakt

Probe nach Extraktion und eventueller Entfernung des Lösemittels

3.6

Feldblindwert

im Labor vorbereiteter mit Wasser oder anderer Blindwertmatrix befüllter Behälter, der durch das Probenahmepersonal während der Probenahme am Ort der Probenahme ausgebracht wird, um mögliche Kontaminationen während der Probenahme zu verifizieren

[QUELLE: ISO 11074:2015, 4.5.3]

3.7

Induktionsrate

Quotient zwischen dem Mittelwert der in mit Testsubstanz oder mit einer Positivkontrolle versetzten Platten gemessenen Vertiefungen einer Platte mit erhöhter Reportergenaktivität und dem Mittelwert der entsprechenden, mit einer Negativkontrolle behandelten Vertiefungen einer Platte unter Einsatz der gleichen Zellen und identischen Aktivierungsbedingungen

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 43, modifiziert — „gemessenen Vertiefungen einer Platte mit erhöhter Reportergenaktivität“ ersetzt „gezählten mutanten Kolonien“; „entsprechenden ... Vertiefungen einer Platte“ ersetzt „entsprechenden ... Platten“; „Quotient“ ersetzt „Differenz“; „der gleichen Zellen“ ersetzt „des gleichen Stamms“.]

3.8

Bestimmungsgrenze

LOQ (en: limit of quantification)

kleinster Wert eines Determinanten, der mit einem vertretbaren Niveau an Genauigkeit und Präzision bestimmt werden kann

[QUELLE: ISO 15839:2003, 3.18]

3.9

geringste nicht wirksame Verdünnung

Verdünnungsstufe

G-Wert

LID (en: lowest ineffective dilution)

geringste nicht wirksame Verdünnung des Testansatzes, d. h. kein statistisch signifikanter Anstieg der Reporterogenaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle

[QUELLE: ISO 11350:2012, 3.4, modifiziert — „Anstieg der Reporterogenaktivität“ ersetzt „Zunahme der Anzahl der Reaktionskammern (Wells) mit Wachstum von Revertanten“]

3.10

Negativkontrolle

Verdünnungswasser ohne Probe

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 51]

3.11

Passagezahl

Anzahl der Subkulturen von Zellen in einem neuen Kulturgefäß (Zellkulturflasche oder Mikrotiterplatte)

3.12

Referenzverbindung

Verbindung mit einem oder mehreren Eigenschaftswerten, die ausreichend reproduzierbar quantifiziert und gut etabliert sind, um die Kalibrierung des Messverfahrens zu ermöglichen

[QUELLE: ISO 7405:2008, 3.6, modifiziert — „Verbindung“ ersetzt „Material“; „Kalibrierung des Messverfahrens“ ersetzt „Verwendung des Materials oder Stoffes für die Kalibrierung einer Apparatur, die Bewertung einer Messmethode oder die Zuordnung von Werten zu Materialien“.]

3.13

relative Lichteinheiten

RLU (en: relative light units)

Maß der Reporterogenaktivität durch Messung von Licht unter Verwendung eines Luminometers, angegeben als relative Lichteinheiten

3.14

Reporterogenaktivität

quantitative Aktivität eines Gens, das an die Promotorsequenz eines anderen Gens fusioniert ist

3.15

Stammkultur

gefrorene Zellkultur zur Erhaltung der Eigenschaften der Zelllinie

[QUELLE: ISO 21427-2:2006, 13, modifiziert — „Zelllinie“ ersetzt „V79-Zellen“]

3.16

Subkultivierung

Überführung eines Teils einer Zellkultur in ein neues Zellkulturgefäß während einer Zellkultivierung

3.17

Probe

unverdünnter, verdünnter oder anderweitig behandelter Teil einer zu prüfenden Probe nach Abschluss aller Vorbereitungsschritte wie Zentrifugation, Filtration, Homogenisierung, pH-Einstellung und Bestimmung der Ionenstärke

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 92]

4 Störungen

In den Proben vorhandene toxische Effekte können zu einer Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen und damit zu einer Verringerung der gemessenen Zellreaktion führen. Folglich können estrogene Effekte einer Probe durch akute toxische Effekte maskiert werden, was zu falsch negativen Testergebnissen führt (weitere Informationen siehe Abschnitt 9). In diesem Fall sollte die Probe soweit verdünnt werden, bis keine Zytotoxizität mehr beobachtet wird (siehe Anleitung des angewendeten Zytotoxizitätstests).

Die Verwendung unangemessener Probenahmegeräte und/oder Probenflaschen kann aufgrund der möglichen Adsorption aktiver Verbindungen auf den Oberflächen das Testergebnis beeinflussen, was zu falsch negativen Ergebnissen führt. Andererseits könnten aktive Verbindungen aus den Probenflaschen in die Probe freigesetzt werden, insbesondere bei Verwendung von Kunststoffgefäßen, und somit falsch positive Ergebnisse erzeugt werden. Weitere Informationen in Abschnitt 7.

Ein hoher Salzgehalt kann aufgrund des resultierenden osmotischen Drucks toxische Effekte verursachen. Die ER(α) CALUX-Zellen ([10] bis [16]) tolerieren eine Leitfähigkeit der Probe bis zu 34 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (1,0 % *m/m* Salzgehalt). Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen können die Reaktion der Zellen negativ beeinflussen. Aus diesem Grund werden dem Zellkulturmedium Antibiotika zugesetzt. Die Kontamination der Zellen wird beim Testen der Probe durch visuelle Beobachtung (Mikroskop) beurteilt. Weitere Informationen in Abschnitt 9.

Wenn gefilterte Proben getestet werden, um Bakterien aus der Probe zu entfernen, werden auch feste Partikel von der Probe abgetrennt. Daher können Substanzen mit estrogener Aktivität, die an Partikel adsorbiert sind, möglicherweise nicht detektiert werden.

Anti-estrogene Verbindungen und andere nichttoxische Hemmstoffe können estrogene Wirkungen maskieren. Das Vorhandensein von Störverbindungen kann mittels Proben beurteilt werden, die mit einer bestimmten Menge an estrogenen Verbindungen mit definierten Eigenschaften (z. B. 17 β -Estradiol) dotiert wurden, was zu einer bekannten Induktion des Testsystems führt.

Verbindungen mit estrogenen Eigenschaften können als inaktive Konjugate vorliegen. Eine chemische Dekonjugation kann notwendig sein, um das estrogene Gesamtpotential einer Probe quantitativ zu bestimmen.

5 Grundlage des Verfahrens

Estrogenrezeptor (ER) – vermittelte Signalübertragung ist bei der Estrogenwirkung wesentlich, und der Mechanismus der Estrogenrezeptor-Signalübertragung ist bestens bekannt. Bei der Estrogenbindung wird der Estrogenrezeptor aktiviert und lagert sich an Erkennungssequenzen in der Promoterregion der Zielgene, den sogenannten estrogen-responsiven Elementen (ERE), an. Diese ERE sind an ein Promoterelement und ein Gen zur Transkription für das leicht messbare Protein Luciferase gekoppelt. In diesen Zellen aktiviert der ligand-aktivierte Rezeptor die Luciferase-Transkription, und das transkribierte Luciferase-Protein sendet Licht aus, wenn ein Substrat hinzugegeben wird. Das Signal nimmt infolge der steigenden Ligandkonzentrationen konzentrationsabhängig zu. Die Luciferase-Aktivität in Zelllysaten wird mit einem Luminometer gemessen, das zuverlässige, empfindliche und quantitative Messungen zulässt.

6 Geräte und Materialien

Neben der Ausstattung, die üblicherweise in einem Labor für Zellkulturen vorhanden ist, werden folgende Geräte und Materialien benötigt. Geeignete Probenahmegeräte werden in Abschnitt 8 genannt.

6.1 Sterile Werkbank, Standard: „Biologische Gefährdung“.

6.2 Wasserbad, 37 °C.

6.3 CO₂-Inkubator, 5 % CO₂, 37 °C, Feuchte 100 %.

6.4 Invertes Phasenkontrastmikroskop.

- 6.5 **Gefrierschrank**, mindestens $\leq -18\text{ °C}$ und bei $\leq -70\text{ °C}$.
- 6.6 **Schüttelapparat für Mikrotiterplatten**.
- 6.7 **Zentrifuge**.
- 6.8 **Laborwaage**.
- 6.9 **Sterile Pipetten**, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml, aus Glas oder Kunststoff.
- 6.10 **Pipettierhelfer**.
- 6.11 **Zellkulturflaschen**, 75 cm² mit Filterdeckel.
- 6.12 **Sterile Kunststoffbehälter**, 12 ml und 50 ml mit sterilem Verschluss.
- 6.13 **Sterile Mikrotiterplatten mit 12 Vertiefungen in der Platte (Wells)**.
- 6.14 **Mehrkanal-Multistepper-Pipette (Repetierpipette)**, einschließlich 5-ml- und 10-ml-Spitzen.
- 6.15 **Pipetten**, 1 µl, 50 µl, 200 µl und 1 000 µl, mit sterilen Spitzen.
- 6.16 **Mehrkanalpipetten**, bis zu 50 µl und bis zu 300 µl.
- 6.17 **Sterile 96-Well-Platten aus Polystyren**, mit flachem, transparentem Boden und Deckel, geeignet für Zellkultur, Volumen 300 µl je Vertiefung.
- 6.18 **Mikrotiterplatten-Luminometer mit zwei Injektoren**, für die Zugabe des Substrats und Stoppreagens.
- 6.19 **Zellzähler oder Zählkammer (Hämocytometer)**.
- 6.20 **pH-Meter**.
- 6.21 **Kryoröhrchen**, steril, 2 ml.
- 6.22 **Flüssigstickstoffbehälter für längere Aufbewahrung der Zellen**.
- 6.23 **Filter**, Celluloseacetat, Porengröße 0,45 µm.

7 Reagenzien, Zellen und Medien

7.1 Reagenzien

Als Reagenzien so weit wie möglich solche des Reinheitsgrades „zur Analyse“ verwenden. Wenn (andere) Hydrate im Vergleich zu den festgelegten Verbindungen verwendet werden, sicherstellen, dass die richtige Masse der Hauptverbindung eingesetzt wird.

- 7.1.1 **Dimethylsulfoxid (DMSO)**.
- 7.1.2 **Glycerin für die Molekularbiologie**, $\geq 99\%$, Molekulargewicht: 92,09 g/mol, CAS-Nr.: 56-81-5.
- 7.1.3 **17 β -Estradiol**, $\geq 98\%$, (C₁₈H₂₄O₂), Molekulargewicht: 272,38 g/mol, CAS-Nr.: 50-28-2.
- 7.1.4 **Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA-Na)**, CAS-Nr.: 6381-92-6.
- 7.1.5 **Trypsin**, CAS-Nr.: 9002-07-7.

- 7.1.6 Fetales Kälberserum (FKS).**
- 7.1.7 DMEM/F12-Medium mit Phenolrot als pH-Indikator.**
- 7.1.8 Nicht-essenzielle Aminosäuren (100x).**
- 7.1.9 Penicillin-Streptomycin (100x),** verwendete Konzentration 5 000 Penicillineinheiten je ml/5 000 µg Streptomycin je ml).
- 7.1.10 Phosphat-gepufferte Salzlösung pH 7,2 (phosphate buffered saline, PBS),** ohne Calcium und Magnesium.
- 7.1.11 Adenosin-5'-triphosphat (ATP),** CAS-Nr.: 34369-07-8.
- 7.1.12 trans-1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N'-tetraessigsäure-Monohydrat (CDTA),** CAS-Nr.: 125572-95-4.
- 7.1.13 Dithiothreitol (DTT),** CAS-Nr.: 3483-12-3.
- 7.1.14 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (TRIS),** CAS-Nr.: 77-86-1.
- 7.1.15 Dextran T500.**
- 7.1.16 Aktivkohle.**
- 7.1.17 Coenzym A, als freie Säure,** CAS-Nr.: 85-61-0.
- 7.1.18 D-Luciferin-Natriumsalz,** CAS-Nr.: 103404-75-7.
- 7.1.19 Magnesiumhydroxidcarbonat-Pentahydrat,** $C_4H_2Mg_5O_{14}$, CAS-Nr.: 56378-72-4.
- 7.1.20 Magnesiumsulfat,** CAS-Nr.: 7487-88-9.
- 7.1.21 Natriumhydrogencarbonat,** CAS-Nr.: 144-55-8.
- 7.1.22 Zellkulturmedium-Pulver,** Sigma, D2902, ohne Phenolrot und Natriumhydrogencarbonat.^{N1}
- 7.1.23 Tricin,** CAS-Nr.: 5704-04-1.
- 7.1.24 Aceton,** (analysenrein), CAS-Nr.: 67-64-1.
- 7.1.25 Natriumhydroxid,** Molekulargewicht 40,00 g/mol, CAS-Nr.: 1310-73-2.
- 7.1.26 Triton X-100,** CAS-Nr.: 9002-93-1.
- 7.1.27 Verdünnte Salzsäure,** 1 mol/l (HCl), Molekulargewicht 36,46 g/mol, CAS-Nr.: 7647-01-0.

7.2 Wasser, Qualität 3 nach ISO 3696; Wasser mit einer Leitfähigkeit von bis zu 5 µS/cm ist geeignet.

Wenn nötig, Wasser durch Autoklavieren oder durch Filtration sterilisieren (Celluloseacetat, 0,2 µm). Wasser mit dieser Spezifikation auch für die schrittweise Verdünnung der Probe verwenden.

7.3 Zelllinie.

N1 Nationale Fußnote: Dulbecco's Modified Eagles Medium: mit 1 000 mg/l Glucose und L-Glutamine, ohne Phenolrot und Natriumhydrogencarbonat, geeignet für die Zellkultur.

Eine genetisch veränderte humane Zelllinie, die den menschlichen Estrogenrezeptor (hER α und/oder hER β) exprimiert und ein Reporterplasmid für Luciferase enthält. Genauere Beschreibungen der einzelnen Zelllinien sind in Anhang C enthalten.

7.4 Medien.

Immer sterile Lösungen, Glasgeräte usw. verwenden. Alle Verfahren unter aseptischen Bedingungen und in der sterilen Umgebung einer sterilen Werkbank (Standard: „Biologische Gefährdung“) durchführen. Falls Autoklavieren notwendig ist, immer für 20 min bei $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ autoklavieren. Die Gefäße lose abdecken, aber niemals luftdicht verschließen.

7.4.1 Zellkulturmedium.

5,4 ml nicht-essenzielle Aminosäuren (7.1.8), 42 ml FCS (7.1.6) und 1 ml Penicillin-Streptomycin (7.1.9) in eine Flasche mit 500 ml DMEM/F12-Medium mit Phenolrot geben. Das fertige Zellkulturmedium sollte bei 4°C und höchstens 8 Wochen aufbewahrt werden.

7.4.2 Gefriermedium.

1 ml nicht-essenzielle Aminosäuren, 10 ml DMSO, 20 ml FCS und 1 ml Penicillin-Streptomycin (7.1.9) zu 68 ml DMEM/F12-Medium mit Phenolrot geben. Chargen von 20 ml in steriler Weise auf sterile Röhrchen verteilen. Das fertige Gefriermedium sollte bis zur Verwendung bei $(-20 \pm 1)^\circ\text{C}$ aufbewahrt und bei der Verwendung mit Eis gekühlt werden.

7.4.3 Konzentriertes Testmedium.

7.4.3.1 3-fach konzentriertes Testmedium.

Den Inhalt eines Fläschchens Zellkulturmedium-Pulver (7.1.22) in 250 ml Wasser (bei Umgebungstemperatur) lösen und anschließend 3,7 g Natriumhydrogencarbonat (7.1.21) in derselben Lösung lösen. Den pH-Wert mit 1 mol/l HCl oder 1 mol/l NaOH-Lösung auf 7,4 einstellen. Mit Wasser auf ein Endvolumen von 300 ml auffüllen und anschließend mittels Filter sterilisieren. 12 ml nicht-essenzielle Aminosäuren (7.1.8), 55 ml gestripptes Serum (7.4.8) und 37 ml Penicillin-Streptomycin (7.1.9) zugeben. Fertige Medien sollten bei $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ und höchstens 8 Wochen aufbewahrt werden.

7.4.3.2 1-fach konzentriertes Testmedium.

100 ml des 3-fach konzentrierten Testmediums mit 200 ml Wasser verdünnen und mittels Filter sterilisieren. Fertige Medien sollten bei $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ und höchstens 8 Wochen aufbewahrt werden.

7.4.4 Trypsin-Lösung.

20 ml Trypsin (7.1.5) zu 980 ml PBS (7.1.10) geben und mit 0,2 g EDTA (7.1.4) versetzen. Die Trypsin-Lösung steril filtrieren und in Teilmengen von 50 ml aufteilen. Die Haltbarkeit beträgt 3 Monate ab Herstellungsdatum. Die Röhrchen mit Trypsin bei -20°C aufbewahren.

7.4.5 Stopp-Reagens.

8,0 g Natriumhydroxid in einem Liter demineralisiertem Wasser lösen, um eine Endkonzentration von 0,2 mol/l zu erhalten.

7.4.6 Substratgemisch.

Tricin (7.1.23) und Magnesiumsulfat (7.1.20) in 500 ml demineralisiertem Wasser vollständig lösen, bis die Lösung klar und farblos ist. Die übrigen Chemikalien aus Tabelle 1 und 400 ml Wasser zugeben. Den pH-Wert mit einer Lösung von 1 mol/l HCl und/oder NaOH auf 7,8 einstellen. Auf ein Endvolumen von 1 l auffüllen. Bei $(-20 \pm 1)^\circ\text{C}$ für höchstens 3 Monate oder bei $(-80 \pm 1)^\circ\text{C}$ für höchstens 12 Monate aufbewahren.