

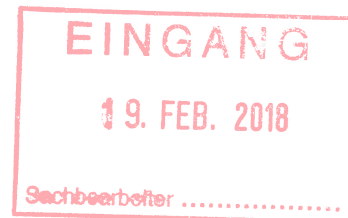
## HelmholtzZentrum münchen

Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

MOLECULAR EXPOSOMICS (MEX)

PROF. DR. DR. KARL-WERNER SCHRAMM

Frau Dipl.-Oecotroph. Anna Terschlüsen  
Referat 314  
Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung  
Deichmanns Aue 29  
53179 Bonn



14.02.2018

**Abschlussbericht für den Zeitraum 01.01.2017-19.02.2018 zum Projekt 2813HS021**

**„Anpassung des EROD-Bioassay und Überprüfung der Eignung als Methode für Screeningverfahren zum Nachweis von Dioxinen und dioxinähnlichen Verbindungen“**

### **Fachlicher Abschlussbericht**

#### **Zielsetzung**

Ziel des Forschungsantrages war es, einen vereinfachten EROD-Bioassay zu etablieren, der in Aufsichtsbehörden durchgeführt werden kann, in denen keine Expertise und Geräte für eine Zellkultur vorhanden sind. Hierzu sollten die Zellen auf Mikrotiterplatten eingefroren werden, so dass die Mikrotiterplatten direkt für die Bioassay verwendet werden können, ohne dass eine Dauerkultur der Zellen im Labor notwendig ist. Der Bioassay soll damit auf Abruf jederzeit ohne Vorlauf durchgeführt werden können.

Des Weiteren sollte der Bioassay durch das Einfrieren auf den Mikrotiterplatten besser standardisiert werden, so dass nur geringere Schwankungen zwischen Laboren und zu unterschiedlichen Zeiten auftreten. Dies gelingt in erster Linie dadurch, dass die Bedingungen in einer Charge von eingefrorenen Platten absolut identisch sind. Zuzüglich sollte natürlich die Varianz zwischen verschiedenen Chargen minimiert werden.

Letztlich wurde noch die Probenvorbereitung vereinfacht.

#### **Hintergrund**

Der Bedarf an Nahrungs- und Futtermittel steigt aufgrund der zunehmenden Weltbevölkerung stetig. Gleichzeitig sind die Ansprüche der Bevölkerung, vor allem in den westlichen Industrieländern, an die Qualität der Nahrungsmittel, bei gleichzeitigem Preisdruck, gestiegen. Damit es bei diesen

unterschiedlichen Interessenlagen nicht zu Problemen kommt, sind die Anforderungen an die staatlichen Überwachungsstellen und die Messtechniken ebenfalls gestiegen, was letztlich auch zu entsprechenden Richtlinien der Europäischen Union geführt hat. Hierdurch sollen Nahrungs- und Futtermittel auf Kontaminationen untersucht werden, damit diese sich in der Nahrungskette nicht anreichern und somit ein sicherer Verzehr gewährleistet ist.

Da die Vielfalt an Nahrungs- und Futtermitteln stetig zunimmt, werden deshalb einfache und kostengünstige Screening-Methoden benötigt, die schnell eine Aussage über biologisch-relevante Kontaminationen zulassen. Eine der wesentlichen Kontaminationen ist dabei Dioxin bzw. Dioxin-ähnliche polychlorierte Biphenyle (PCB). Diese Kontaminationen aktivieren das Enzym Cytochrom P450 über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR), so dass eine biologische Wirkung des Gemisches gemessen werden kann, anstatt die Konzentration der Einzelkomponenten. Im 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)-Assay wird dies ausgenutzt.

### **Etablierte Methode**

Über die Laufzeit des Projektes wurden zunächst die Bedingungen des Bioassays, die Einfriermethode und die Probenaufbereitung optimiert. Dies ist entsprechend in den Zwischenberichten beschrieben worden. Nach den Austestungen hat sich ein EROD-Bioassay mit der H4IIE-Hepatomzelllinie als optimal herausgestellt und wurde an ein serumfreies Medium angepasst.

Der im Folgenden dargestellte kryokonservierte Mikrotiterplatten EROD-Bioassay stellt die finale Version des entwickelten Bioassays dar, der die Qualitätsansprüche gemäß EU-Richtlinien erfüllt und auf verschiedenen biologischen Proben (Tabelle 1) evaluiert wurde.

### *Probenvorbereitung*

100ml flüssige Proben (z.B. Muttermilch) wurden mit 8ml gesättigtem Kaliumoxalat versetzt und stark geschüttelt. Anschließend wurden zur Extraktion 80ml Ethanol, 40ml Diethylether, 60ml n-Pentan hinzugegeben. Danach wurde nochmals 2-mal 60ml n-Pentan extrahiert. Abschließend wurde mit 100ml destilliertem Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat dehydriert.

40g der Feststoffproben wurden mit Hydromatrixmaterial gemischt und auf einem ASE300 extrahiert mit zwei Zyklen von 10 Minuten bei 120°C und 120 Bar. Als Lösungsmittel dient ein Gemisch aus n-Hexan/Aceton (3:1, V/V).

Zum Schluss wurden die Proben auf einem Rotationsverdampfer auf 2-3ml bei 450mBar und 60°C eingengt.

Zum Vorreinigen (clean-up) wurden folgende Komponenten in eine Säule gegeben: 10g aktiviertes Silica-Gel, 20g sulfatiertes Silica-Gel (44% Schwefelsäure, W/V), 40g inaktiviertes Silica-Gel (4% Wasser, W/V) und 10g wasserfreies Natriumsulfat. Die konzentrierten Extrakte wurden mit einem Gemisch aus n-Hexan/Dichlormethan (100:1, V/V) eluiert und mit dem Rotationsverdampfer auf 2-3ml bei 550mBar und 60°C eingengt. In Abhängigkeit vom Fettgehalt der Probe wurde das Vorreinigen gemäß der Standardprozedur des Europäischen Referenzlabors für Dioxine bei einem Fettgehalt von mehr als 0,5%/g Probe angepasst.

Für den Bioassay wurden die Extrakte abschließend mit Dimethylsulfoxid (DMSO) unter einem Stickstoffstrom eingetrocknet und in 500µl DMSO/Isopropanol (4:1, V/V) aufgenommen.

#### *Vorbereitung der Mikrotiterplatten*

H4IIEC/T3 Rattenhepatomazellen wurden in exponentieller Wachstumsphase geerntet. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann mit Accutase für 3 Minuten von den Platten verdaut. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4 Minuten bei 80 x g) und in NFM-G2 (Serum-freies Einfriermedium von acCELLerate) aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und 10µl Zellsuspension je Loch auf eine 96-Lochplatte ausgesät. Die Platten wurden dann unter geringem Vakuum in eine Folie verpackt und bei -80°C eingefroren.

#### *EROD-Bioassay*

Für die Versuche wurde der EROD-Bioassay mit den eingefrorenen Zellen als auch mit H4IIEC/T3 Rattenhepatomazellen aus der Dauerkultur durchgeführt. Im Gegensatz zu den eingefrorenen Zellen (Zelldichte 30.000 Zellen/Loch) wurden bei den Dauerkulturzellen nur 10.000 Zellen pro Loch ausgesät. Der EROD-Bioassay wurde dabei auf eine Serumersatzlösung (Panexin, PAN Biotech) umgestellt, damit Dioxineinträge aus dem Kälberserum und Schwankungen in den Serumchargen ausgeschlossen wurden, so dass die Experimente in unterschiedlichen Laboren einheitliche Bedingungen haben. Das Kulturmedium DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) mit 1g/L Glucose, Natriumcarbonat (3.7g/L) und Natriumpyruvat (1mM) wurde mit 2mM L-Glutamin, 50 Einheiten/mL Penicillin/Streptomycin und 10% Panexin versetzt.

Die Dauerkulturzellen wurden mit 100µL/Loch ausgesät und die kryokonservierten Platten wurden zunächst direkt in den Inkubator bei 37°C gestellt und dann nach 20 Minuten mit 90µL Kulturmedium versetzt, so dass beide Ansätze mit 100µL Endvolumen liefen. Danach wurden die Standards und Proben in Kulturmedium aufgenommen und 100µL der Proben in Kulturmedium zu den Löchern gegeben und für 72 Stunden inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt und 100µL Reaktionslösung/Loch (8µL 7-Ethoxyresorufin, 10µL Dicumarol ad 100µL PBS) hinzugegeben und 30 Minuten inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion mit 75µL Ethanol/Loch gestoppt und 10 Minuten geschüttelt (Titrimax). Das entstandene Resorufin wurde auf einen Fluoreszenz-Reader quantifiziert (Absorptionswellenlänge 535nm/Emissionswellenlänge 590nm). Zur Normalisierung wurde die Proteinkonzentration pro Loch mittels der Pierce Protein-Assay Methode bestimmt.

#### **Ergebnisse**

Zur Evaluierung des EROD-Bioassays mit kryokonservierten Zellen wurden Proben unterschiedlicher Zusammensetzung zum einen mit Dauerkulturzellen und gefrorenen Zellen gemessen und zum anderen unabhängig in 2 Laboren bestimmt. Des Weiteren wurden die Tests mehrfach mit Zellen aus unterschiedlichen Einfrierchargen wiederholt. So konnten für den Test die Intra- und Interassayvarianz bestimmt werden und somit die Erfüllung der Ansprüche an Testqualitäten gemäß

EU-Richtlinien (Nr. 644/2017) evaluiert werden. Über Standardreihen wurde zudem die untere Nachweisgrenze („limit of detection“ LOD) bestimmt.

Die Ergebnisse der unabhängigen Messungen in den beiden Laboren der unterschiedlichen Proben sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Aus den Ergebnissen ergibt sich bei konservativer Berechnung über alle Probenmaterialien eine LOD von 0,1 BEQ pg/g Probe (BEQ = bioanalytisches Äquivalent), womit die Voraussetzungen für die Lebens- und Futtermittelanalyse gemäß EU-Richtlinien gegeben ist (EU Nr. 1259/2011, EU Nr. 277/2012, EU Nr. 1067/2013). Richtlinienkonform wurde ebenfalls die Nachweisgrenze für die quantitative Bestimmung („limit of quantification“ LOQ) ermittelt. Diese lag in beiden Laboren im Mittel bei  $0,26 \pm 0,07$  BEQ pg/g Probe bei hoher Reproduzierbarkeit, und war damit übereinstimmend mit dem Ergebnis der chemischen Analyse von 0,3 WHO<sub>2005</sub>-TEQ pg/g Probe (TEQ = toxisches Äquivalent). Somit kann den LOQ ebenfalls auf 0,3 BEQ pg/g Probe festgelegt werden.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse über die Lagerungsdauer der kryokonservierten Mikrotiterplatten bei -80°C lag innerhalb von 4 Monaten bei Abweichungen unter 15% und entspricht somit den offiziellen Qualitätsanforderungen. Erst Lagerungsdauern von über 4 Monaten führen zum Verlust der Sensitivität (Abbildung 1). Es muss dabei betont werden, dass zu Gunsten der Anwenderfreundlichkeit im Hinblick auf nicht spezialisierte Kontrolllabore die Lagerung in einem handelsüblichen -80°C Gefrierschrank gewählt wurde, anstatt der üblichen Lagerung von gefrorenen Zellen unter flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Die Übereinstimmung der beiden Labore für die insgesamt 31 unterschiedlichen Proben zeigte dabei einen Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0,89$  und damit eine hohe unabhängige Reproduzierbarkeit der LOD und LOQ (Abbildung 2).

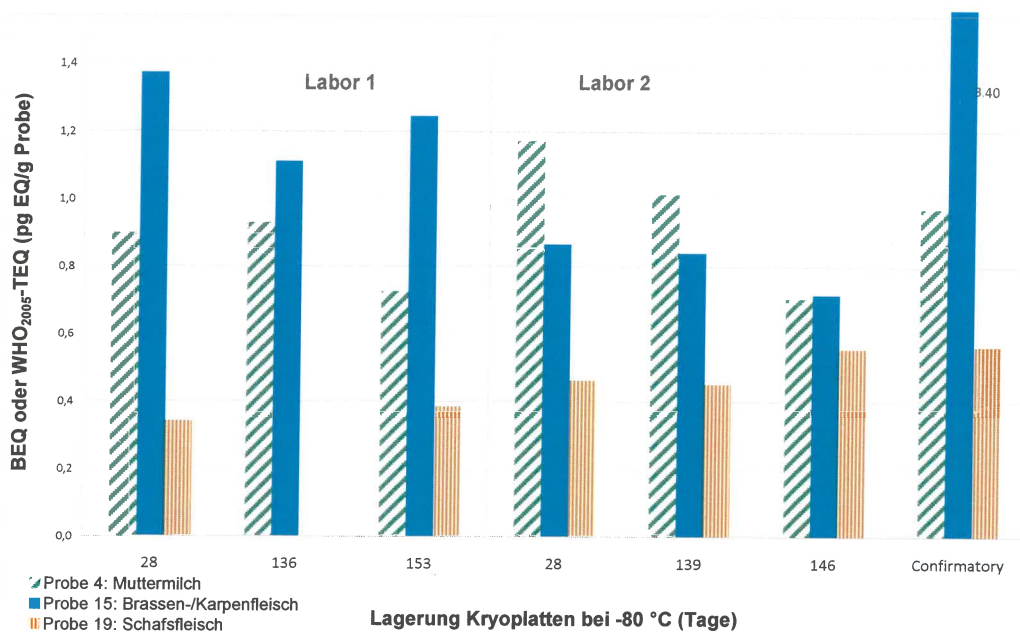


Abbildung 1: EROD Ergebnisse (pg BEQ/g Probe) für 3 Proben über die Lagerungsdauer (in Tagen) in zwei unabhängigen Laboren bei -80 °C. Die Ergebnisse wurden über die chemische Analyse bestätigt (pg WHO<sub>2005</sub>-TEQ/g Probe).

Tabelle 1: EROD Bioassay Ergebnisse (pg BEQ/g Probe) anhand von kryokonservierten Mikrotiterplatten (n=3) und permanent kultivierten Zellen. HRGC/HRMS Ergebnisse als Summe von PCDD/F und Dioxin-ähnlichen PCB (pg WHO<sub>2005</sub>-TEQ/g Probe) sind dargestellt. n.d.: nicht detektierbar.

Nr.	Matrix	EROD Bioassay mit kryokonservierten Mikrotiterplatten		Analytisches Ergebnis	EROD Bioassay mit Dauerkulturzellen
		Durchschnitt Labor 1 ± SD	Durchschnitt Labor 2 ± SD		
1	Lachsfleisch	3.86 ± 0.44	3.30 ± 0.24	8.01	6.57
2	Brassen-/Karpfenfleisch	0.84 ± 0.28	1.53 ± 0.59	3.60	3.89
3	Hühnerfleisch	0.70 ± 0.23	1.11 ± 0.30	0.68	2.67
4	Muttermilch	0.90 ± 0.23	1.17 ± 0.34	0.97	2.01
5	Muttermilch	0.05 ± 0.03	0.20 ± 0.06	0.13	n.d.
6	Rinderleber	0.45 ± 0.04	0.24 ± 0.19	0.56	<0.20
7	Rinderleber	0.19 ± 0.01	0.31 ± 0.05	0.30	0.40
8	Rinderleber	0.16 ± 0.03	0.34 ± 0.07	0.27	<0.20
9	Leerwert von Nr. 1, 2 und 10 bis 15	n.d.	n.d.	-	n.d.
10	Guarkermehl	0.09 ± 0.05	0.10*	0.08	n.d.
11	Guarkermehl	2.39 ± 0.64	2.63 ± 0.46	71	122
12	Brassen-/Karpfenfleisch	2.24 ± 0.94	1.73 ± 0.86	4.32	2.43
13	Rindfleisch	0.03*	0.06 ± 0.05	0.08	1.60
14	Rindfleisch	0.05*	0.13 ± 0.04	0.06	1.05
15	Brassen-/Karpfenfleisch	1.37 ± 0.25	0.86 ± 0.40	3.40	2.78
16	Hühnerfleisch	0.33 ± 0.07	0.54 ± 0.18	0.89	2.30
17	Hühnerfleisch	0.46 ± 0.02	0.42 ± 0.19	0.86	2.35
18	Schafsleber	0.22 ± 0.03	0.29 ± 0.13	0.43	0.75
19	Schafsleber	0.34 ± 0.07	0.46 ± 0.25	0.56	1.17
20	Leerwert von Nr. 6, 7, 8, 21 und 22	n.d.	n.d.	-	n.d.
21	Schafsfleisch	0.90 ± 0.09	1.53 ± 0.54	1.42	1.62
22	Schafsfleisch	0.73 ± 0.15	1.14 ± 0.26	1.04	0.71
23	Leerwert von Nr. 24	n.d.	n.d.	-	n.d.
24	Muscheln	0.28 ± 0.11	0.85 ± 0.16	0.66	1.63
25	Leerwert von Nr. 4 und 5	n.d.	n.d.	-	n.d.
26	Leerwert von Nr. 27 und 28	n.d.	n.d.	-	n.d.
27	Robbenöl	2.90 ± 2.05	2.29*	2.30	10.8
28	Oliveneröl versetzt mit TCDD	1949 ± 110	1965 ± 115	1249	1338
29	Leerwert von Nr. 30	n.d.	n.d.	-	n.d.
30	Geflügel Testmaterial	0.33 ± 0.05	0.41 ± 0.12	0.21	n.d.
31	Leerwert von Nr. 3 und 16 bis 19	n.d.	n.d.	-	n.d.

Fußnote: \* nur einmal innerhalb von 3 Wiederholungen nachgewiesen.

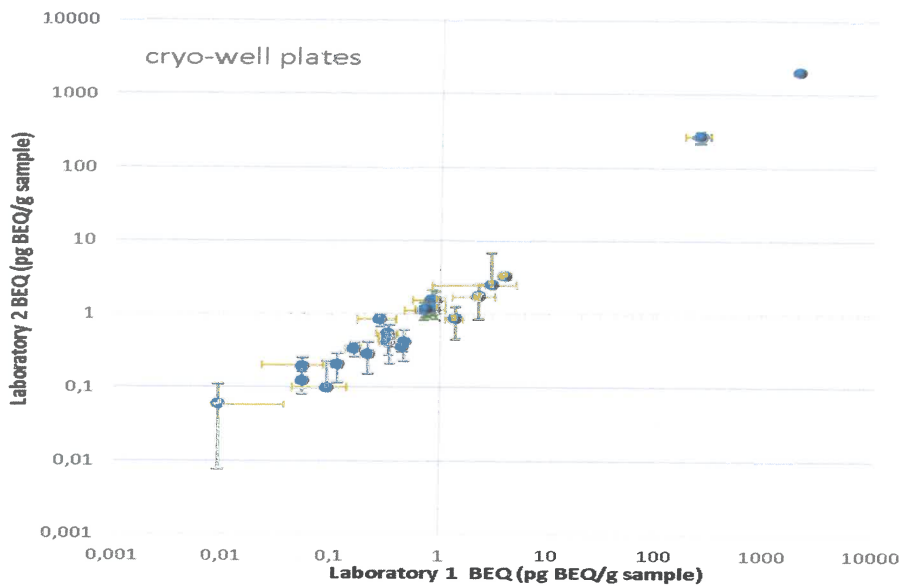


Abbildung 2: Übereinstimmung der bioanalytischen Äquivalente (BEQ pg/g Probe) in 31 Proben die in je 3 Replikaten (n=3) in zwei Laboren unabhängig gemessen wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) (n=3).

Eine Limitation der Methode ergibt sich bei Proben, in denen zu viel Dioxin ist (Abbildung 3) bzw. bei Proben, die antagonistische bzw. zytotoxische Substanzen enthalten (Tabelle 2). Die zu stark belasteten Proben kann man durch eine Titrationsreihe valide ausschließen, während antagonistische bzw. zytotoxische Substanzen ein generelles Problem für Bioassays sind. Dieses Problem könnte jedoch durch den zusätzlichen Einsatz der Proben in dotierter Form, d.h. nach Zusatz einer definierten Menge von Dioxin, umgangen werden, da so falsch negative bzw. falsch zu niedrige Werte identifiziert werden können.

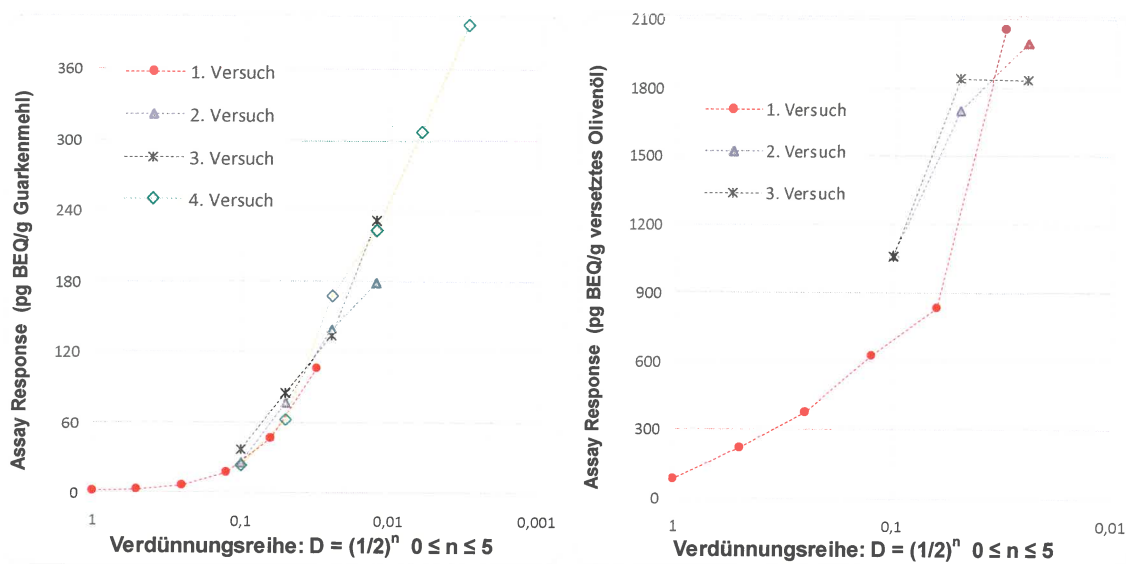


Abbildung 3: Titrationsreihe zur Ermittlung der bioanalytischen Äquivalente (BEQ pg/g) in Guarkernelmehl (links) und Olivenöl (rechts) welches mit TCDD (2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin) in bekannter Konzentration versetzt wurde.

**Tabelle 2: Nachweisgrenze, Übereinstimmung, Streuung (RSD<sub>L</sub>), und Reproduzierbarkeit (RSD<sub>R</sub>) der Probenanalyse in 2 Laboren.**

Nr. Probe	Matrix Art des Probenmaterials	Fettgehalt (%)	Maximalwert (ML) TEQ <sup>2</sup> pg/g w.w. oder fat	Nachweis- grenze TEQ 2/3 of ML	Übereinstimmung: BEQ- und TEQ- Wert der Probe beide ≤ oder > Nachweisgrenze		HRGC/HRMS WHO <sub>2005</sub> -TEQ  (pg/g Probe)	Streuung RSD <sub>L</sub> (%)		Reproduzier- barkeit RSD <sub>R</sub> (%)
					Labor 1	Labor 2		Labor 1	Labor 2	
1	Lachsfleisch	6.20	6.5 w.w.	4.3	Falsch positiv	Falsch positiv	8.01	11%	7%	11%
2	Brassen-/Karpfenfleisch	2.90	6.5 w.w.	4.3	-	-	3.60	33%	38%	42%
3	Hühnerer	8.30	5.0 fat	3.3	-	-	0.68	33%	27%	32%
4	Muttermilch	4.51	5.5 fat	3.7	-	-	0.97	26%	29%	19%
5	Muttermilch	3.55	5.5 fat	3.7	-	-	0.13	58%	30%	81%
6	Rinderleber	unbekannt	0.5 w.w.	0.33	-	-	0.56	10%	16%	13%
7	Rinderleber	unbekannt	0.5 w.w.	0.33	-	-	0.30	3%	17%	41%
8	Rinderleber	unbekannt	0.5 w.w.	0.33	-	-	0.27	16%	22%	49%
9	Leerwert von Nr. 1, 2 und 10 bis 15	0	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Guarkermehl	0	1.5 w.w.	1.0	-	-	0.08	52%	0%	7%
11	Guarkermehl	0	1.5 w.w.	1.0	-	-	71	27%	17%	7%
12	Brassen-/Karpfenfleisch	2.00	6.5 w.w.	4.3	-	Falsch negativ	4.32	42%	50%	18%
13	Rindfleisch	0.90 <sup>1</sup>	0.08 w.w.	0.05	Falsch positiv	-	0.08	***	87%	-
14	Rindfleisch	2.20	4.0 fat	2.7	Falsch positiv	-	0.06	***	34%	57%
15	Brassen-/Karpfenfleisch	2.30	6.5 w.w.	4.3	-	Falsch negativ	3.40	18%	46%	32%
16	Hühnerer	8.20	5.0 fat	3.3	-	-	0.89	22%	33%	34%
17	Hühnerer	8.40	5.0 fat	3.3	-	-	0.86	4%	45%	7%
18	Schafsleber	3.70	2.0 w.w.	1.3	Falsch negativ	Falsch negativ	0.43	13%	46%	19%
19	Schafsleber	5.90	2.0 w.w.	1.3	Falsch negativ	Falsch negativ	0.56	20%	54%	21%
20	Leerwert von Nr. 6,7,8, 21 und 22	0	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Schafsfleisch	33.7	4.0 fat	2.67	-	-	1.42	10%	35%	36%
22	Schafsfleisch	37.7	4.0 fat	2.67	-	Falsch negativ	1.04	21%	23%	31%
23	Leerwert von Nr. 24	0	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Muscheln	unbekannt	6.5 w.w.	4.3	-	-	0.66	39%	18%	71%
25	Leerwert von Nr. 4 und 5	0	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Leerwert von Nr. 27 und 28	0	-	-	-	-	-	-	-	-
27	Robbenöl	100	2.5 fat	1.7	-	-	2.30	71%	173%	12%
28	Olivenöl versetzt mit TCDD	100	1.25 fat	0.8	-	-	1249	6%	6%	1%
29	Leerwert von Nr. 30	0	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Geflügel Testmaterial	8.80	3.0 fat	2.0	-	-	0.21	16%	32%	15%
31	Leerwert von Nr. 3 und 16 bis 19	0	-	-	-	-	-	-	-	-

**Fußnote:** w.w. = Nassgewicht, fat = Fett, <sup>1</sup>Proben mit Fettgehalt < 2 % wurden mit der Nachweisgrenze in Nassgewicht angegeben, in der Annahme von 2 % Fettgehalt (gemäß EU Nr. 1259/2011). <sup>2</sup>: Maximale Obergrenzen basieren auf den Regularien (EC) Nr 1259/2011, 1881/2006 und EC Nr 1067/2013 für Leber Proben. \*\*\*: Nur ein Nachweis in drei Replikaten.

Die kompletten detaillierten Daten sind vom Konsortium zur Veröffentlichung eingereicht und werden so der Allgemeinheit frei zur Verfügung gestellt. Der Bioassay in der beschriebenen Form wird nicht patentiert und es bestehen keine Schutzrechte, so dass er für Wissenschaft und Aufsichtsbehörden kostenfrei zur Verfügung steht. Die beteiligte Firma acCELLerate wird den Bioassay aber zusätzlich für Labore anbieten, die nicht die Kapazität haben, die Mikrotiterplatten selbst herzustellen.

### **Kosten**

Die Materialkosten für die Herstellung der kryokonservierten Mikrotiterplatten sind ca. 25€ pro Platte in Eigenherstellung und ca. 50€ versandfertig, vakuumverpackt und eingefroren, wenn man diese in einem größeren Maßstab herstellt. Diese Kosten beinhalten Kulturmedium, Chemikalien, Plastikmaterial und Verpackung. Nicht einberechnet sind dabei die Personalkosten von ebenfalls ca. 50€. Somit wäre dies ein günstiger Screeningassay mit ca. 50Cent pro Probe Fixkosten (ohne Personal) bei Eigenherstellung.

Die Firma acCELLerate würden den Assay für ca. 230€/Mikrotiterplatte und entsprechenden Nachlässen bei größeren Mengen anbieten, womit für kleinere Labore ohne Selbstherstellung immer noch ein vertretbarer Testpreis von 4,60€ pro Probe entsteht.

Für die Testdurchführung fallen nur geringe Kosten von 3,50 pro Platte (ca. 7Ct/Probe bei voller Belegung und Doppelbestimmung) an Materialkosten an. Die Personalkosten belaufen sich auf ca. 30€, wobei während dieser Zeit mehrere Platten bearbeitet werden können, der Test also bei größerem Probenaufkommen günstiger wird.

Ein wesentlich größerer Kostenfaktor ist die Probenvorbereitung in der vereinfachten Form. Diese kostet zwar ca. 35€ pro Probe an Materialkosten, beträgt damit aber nur ca. 75% der Kosten, die für die Vorbereitung der chemischen Analyse anfallen würden. Die Personalkosten belaufen sich auf ca. 65€, wobei auch diese sich durch die gleichzeitige Bearbeitung mehrerer Proben verringern würden.

Im Rahmen der Versuchsdurchführung kamen in den Laboren noch ca. 30% Overhead (Aufschlag für Stellengemeinkosten und Verwaltungsgemeinkosten) hinzu.

Bei einer Plattenbelegung von 40 Proben (Doppelbestimmung je Probe plus Standardreihe) wäre man damit bei Gesamtkosten von ca. 24€/Probe bei Eigenherstellung bzw. ca. 30€/Probe bei Zukauf der fertigen Mikrotiterplatten. Mit diesen Kosten hätte man aber eine Gesamtaussage über die biologische Gefährdung, die bei der chemischen Analyse erst durch die Bestimmung vieler Einzelkomponenten zu ermitteln wäre und somit um ein Vielfaches höher.

### **Ausblick**

Der jetzt etablierte Bioassay hat noch zwei Schwachstellen, zum einen das nicht rein synthetische bzw. pflanzliche Medium, zur Vermeidung von Dioxineinträgen und zum anderen das Problem mit Kontaminationen.

Für diese beiden Problemfelder würden wir gern folgende Lösungen durch unseren Verbund vorschlagen und in einem Anschlussprojekt in Angriff nehmen:

1. Etablierung des Assays in Protein-freiem oder Serum-freiem Medien ohne tierische Proteinkomponenten. Dies setzt wiederum erhebliche Anforderungen und Anpassungen bei



der Einfrierprozedur voraus. Zudem darf die Empfindlichkeit des Assays nicht unter der Veränderung des Mediums leiden. Im besten Fall kann aber die Nachweisgrenze sogar weiter gesenkt werden, da die pflanzlichen Proteine weniger Lipide enthalten.

2. Für die störenden Kontaminationen gibt es zwei Lösungsmöglichkeiten. Zum Einen kann die Aufbereitung der Proben so verändert werden, dass Dioxine und PCBs getrennt werden, so dass diese separat gemessen werden können. Zum anderen können im Assay Referenzproben mitgeführt werden, um die inhibierende Wirkung des Untersuchungsmaterials zu untersuchen. Dazu müssten Anpassungswerte bestimmt werden, damit später bei Vorliegen von inhibierenden Kontaminationen, auf die Wirkkonzentration von Dioxinen umgerechnet werden kann.

### **Zusammenfassung**

Wie geplant konnten wir einen kryokonservierten EROD-Bioassay entwickeln, der auf vorgefertigten Mikrotiterplatten an die Endverbraucher ausgeliefert werden kann. Diese Mikrotiterplatten können dann direkt und ohne ein spezielles Zellkulturlabor für den Dioxinnachweis eingesetzt werden. Die Nachweisgrenzen  $LOD = 0,1 \text{ BEQ pg/g Probe}$  und  $LOQ 0,3 \text{ BEQ pg/g Probe}$  entsprechen dabei den Vorgaben der EU, genauso wie die Intra- und Interassayvarianz von unter 15%. Mit einer Lagerungsdauer von bis zu 4 Monaten bei  $-80^\circ\text{C}$  ist der Bioassay auch im Haltbarkeitsbereich der gängigen vorgefertigten Enzymassays für die Routinediagnostik.

Alle Details zum kryokonservierten Mikrotiterplatten EROD-Bioassay sind zur Veröffentlichung eingereicht und somit ohne Kosten und Schutzrechte für die Allgemeinheit frei verfügbar.

Mit den besten Grüßen,



Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Lothar Rink

Prof. Dr. Dr. Karl-Werner Schramm

