

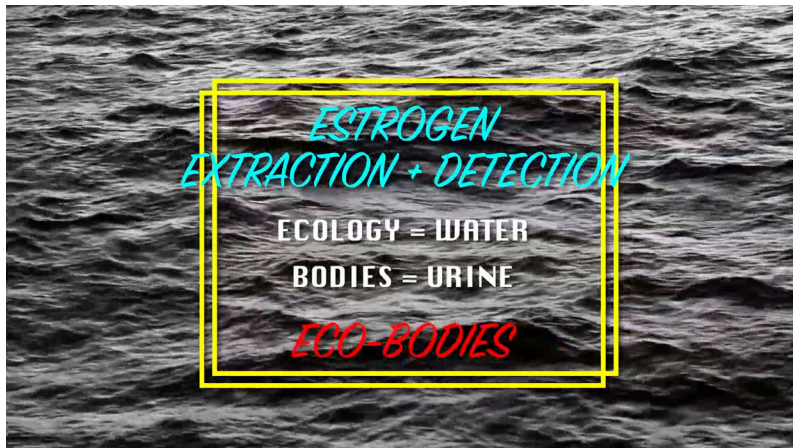


XENO
WATERS
DETECTION
RIVER
GYNECOLOGY

Capitulo 4/Chapter 4

CAN WE EXTEND FEMINIST HEALTH CARE TO BODIES OF NON-HUMAN SPECIES, CREATING A SORT OF GYNECOLOGICAL CLINIC FOR WATER BODIES?

¿PODEMOS EXTENDER EL AUTO CUIDADO FEMINISTA A LOS CUERPOS DE ESPECIES NO HUMANAS, CREANDO UNA SUERTE DE CENTRO GINECOLÓGICO PARA CUERPOS ACUÁTICOS?



Estrogen is the most ancient of sex hormones. Therefore the mutagenic effects of environmental estrogens disrupt species across all animal taxa. In response to the ongoing molecular colonization of xeno-estrogens on human and non-human species, the project aims to demonstrate how our collective mutagenesis necessitates civil action.

Los estrógenos son las más antiguas hormonas sexuales. Sin embargo, los efectos mutagénicos de los estrógenos medioambientales perturban a las especies mediante los taxones animales. En respuesta a la colonización en curso de xenoestrógenos tanto en humanos como en especies no humanas, el proyecto trata de demostrar que nuestra mutagénesis colectiva requiere de la acción civil.

DAY THREE:

First check cell density using spectrophotometer @600nm.

0.2% sarkosyl & Z buffer stock preparation: Measure and dissolve 2g sarkosyl in 10mL Z buffer.

10X ONPG preparation: (**needs refrigeration 4C) Measure and dissolve 0.4g ONPG in 10mL Z buffer.

this is good for 8 assays Mix-mix 200uL 10x ONPG + 1.8mL Z buffer + 2uL 1M DTT = 2mL TOTAL (for example, 12 assays = 400uL 10x ONPG + 3.6mL Z buffer + 4uL 1M DTT = 4mL TOTAL).

Put 225uL of this mix-mix with 25uL of yeast. Incubate in 37C water bath for 30-60min. When you see yellow color change, add 100 uL 1M sodium carbonate to stop the reaction. Read color change using spectrophotometer @405nm (measuring the nitrophenol product).

DÍA TRES:

Comprueba primero la densidad celular mediante un espectrómetro a 600nm

0.2% sarkosyl & Z buffer stock preparation: Mide y disuelve 2g de sarkosyl en 10mL Z buffer.

10X ONPG preparation: (**necesita estar refrigerado a 4C) Mide y disuelve 0.4g ONPG en 10mL Z buffer.

bueno para 8 ensayos Mezcla-mezcla 200uL 10x ONPG + 1.8mL Z buffer + 2uL 1M DTT = 2mL TOTAL (por ejemplo, 12 ensayos = 400uL 10x ONPG + 3.6mL Z buffer + 4uL 1M DTT = 4mL TOTAL).

Pon 225uL de esta mezcla-mezcla con 25uL de levadura. Incúbala a 37C en un baño de agua por 30-60min. Cuando veas el cambio a color amarillo, añade 100 uL 1M de carbonato sódico para parar la reacción. Lee el cambio de color usando un espectrómetro @405nm (midiendo el nitrofenol)

DAY TWO:

Make a 100-fold dilution of your overnight culture by taking 50uL and diluting in 5mL of SC(-)TRP.

If you want to test the transformed yeast for the first time, it's recommended to work with KNOWN amounts of estrogen, such as purchasing pure estradiol from Sigma Aldrich chemical company. Make logarithmic estrogen dilutions by dissolving in DMSO (organic solvent) and give 1uL to 100uL of yeast. Incubate overnight at 30C, no need for rotating. If you want to test on environmental water samples, is recommended to perform SOLID PHASE EXTRACTION to concentrate the water sample.

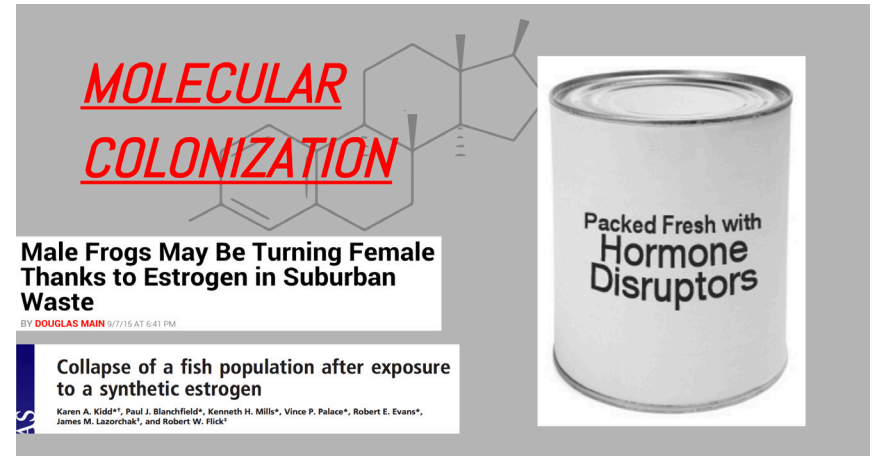


DÍA DOS:

Crea una disolución de 100ml del cultivo nocturno tomando 50uL y disolviéndolos en 5mL de SC(-)TRP.

Si se quiere testar la levadura transformada por primera vez, se recomienda trabajar con cantidades conocidas de estrógenos, como estradiol puro de Sigma Aldrich. Crea una disolución logarítmica de estrógenos disolviéndolos en DMSO e incorpora de 1uL a 100uL de levadura. Incúbalo toda la noche a 30C. no necesita mezclarse.

Si se quiere comprobar en muestras de agua extraídas del medio ambiente, se recomienda realizar un FASE DE EXTRACCIÓN SÓLIDA para concentrar el agua de muestra.



MOLECULAR
COLONIZATION

Male Frogs May Be Turning Female Thanks to Estrogen in Suburban Waste

BY DOUGLAS MAIN 9/7/15 AT 6:41 PM

Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen

Karen A. Kidd*, Paul J. Blanchfield*, Kenneth H. Mills*, Vince P. Palace*, Robert E. Evans*, James M. Lazorchak*, and Robert W. Flick*

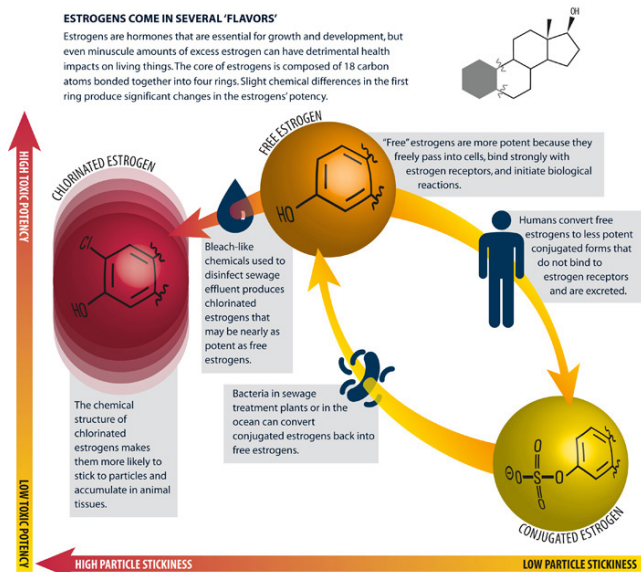
Packed Fresh with
Hormone Disruptors

Because endocrine disrupting compounds are usually found in minimal amounts (ng/L^{-1}) in the water, one of the most common techniques for their detection is liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS). But this approach is very expensive to perform on a routine basis, requiring both skilled personnel and a robust quality assurance/control program. Maybe biology is the answer... The YES yeast are a genetically modified strain of *Saccharomyces cerevisiae* (W303) that contain Human Estrogen Receptor (HER). They act as a biosensor: the input is estrogen and the output is a yellow color change. Basically, the YES yeast are extensions of our bodies: what binds to their receptors also binds to ours. This bioassay detection method is more sensitive than the chemical approach either detecting estrogenic target compounds at lower concentrations, other non-target compounds, and synergistic effects that chemical methods and machines fail to detect.

ESTROGENICITY IS BEST TESTED IN VIVO!

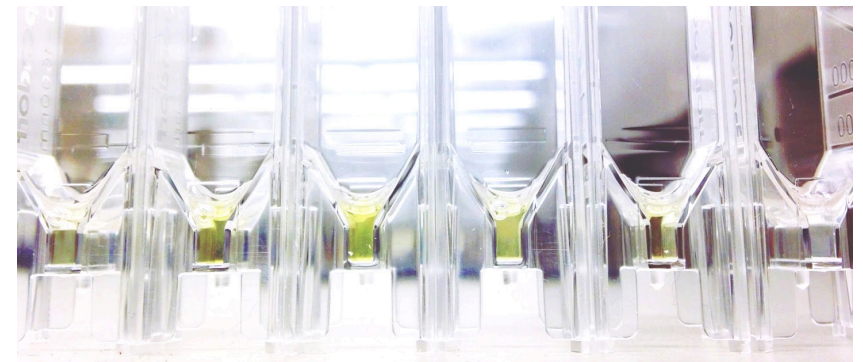
Como las perturbaciones de los compuestos endocrinos se encuentran en pequeñas cantidades en el agua (ng/L^{-1}), una de las técnicas más comunes para su detección es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa LC-MS). Pero este método es muy caro para llevarlo a cabo, pues requiere tanto de personal cualificado como de un programa de control robusto. Quizá la biología es la solución. La levadura YES es una cepa genéticamente modificada de *Saccharomyces cerevisiae* (W303) que contiene un receptor de estrógenos humanos (HER). Actúa como un biosensor. La entrada es estrógeno y la salida un cambio de color al amarillo. Básicamente, las levaduras YES son una extensión de nuestros cuerpos: lo que afecta a sus receptores también afecta a los nuestros. Este método de bio ensayo es más sensible que un método químico, detectando los componentes a baja concentración que se buscan, otros componentes no buscados, y efectos sinérgicos que los métodos químicos y las máquinas no pueden detectar.

ES MEJOR DETECTAR LOS ESTRÓGENOS EN VIVO!



NOW FOR XENOESTROGEN BIOSENSING DOES IT SAY [YES] TO [HER] ?

**ENTONCES CON EL BIO SENSOR DE
XENOESTRÓGENOS
DICE [YES] A [HER]?**



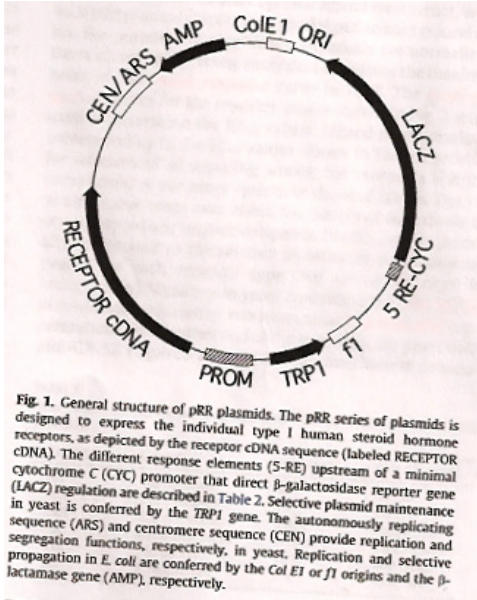
DAY ONE:

take a transformed yeast colony and make a liquid culture with 10mL SC(-)TRP (This is the selective media containing no tryptophan. The transformed yeast should survive without trp, other strains cannot). Incubate overnight @30C with tube shaking.

DÍA UNO:

toma una colonia de levadura transformada y crea un cultivo líquido con 10 mL de SC(-)TRP (Este es un medio selectivo que no contiene tryptophan. La levadura transformada debería sobrevivir sin trp, mientras otras cepas no pueden) Incubarlo durante una noche a 30C con agitación regular del tubo de ensayo.

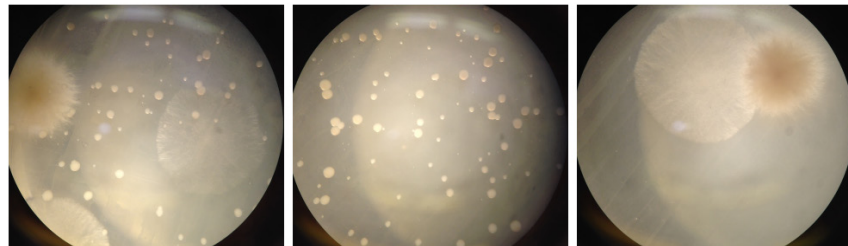
YES
YEAST ESTROGEN
SENSOR



HER
HUMAN ESTROGEN
RECEPTOR

You can purchase the YES plasmid for \$65 from Addgene, a gene repository. It arrives in an agar stab of *e. coli*, which you have to grow up to amplify the plasmid inside. Then you break open the bacteria and purify the DNA (miniprep with centrifuge is recommended technique).

Puede adquisirs el plásmido YES por 65 dólares en Addgene, un suministrado genético. Lo envían en una muestra agar de *e. coli* que debe cultivarse para que crezca y así amplificar el plásmido. Entonces se puede extraer la bacteria y purificar el ADN (se recomienda una técnica de centrifugado)



SYNERGISTIC INTERACTIONS

EUKARYOTE
MODEL ORGANISM
FUNGUS
SACCHAROMYCES CEREVISIAE
BREWER'S YEAST
FERMENTATION

ESTROGENICITY IS BEST TESTED IN VIVO

GROWING YEAST BIOSENSORS

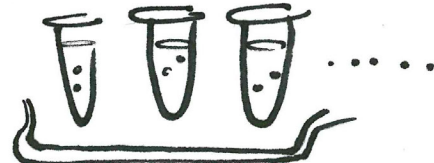
DAY #1

LIQUID CULTURE

10 mL
SC-TRP
(MEDIA)

INCUBATE
OVERNIGHT
30°C
ROTATING

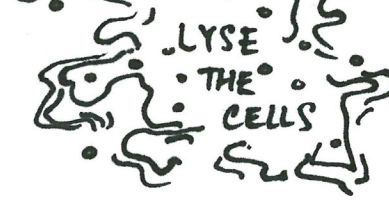
DAY #2



INCUBATE
18 HOURS
30°C
(NO ROTATING)

CHECK CELL
DENSITY
SPECTROPHOTOMETER @ 600nm

"LAC Z REPORTER ASSAY"



DAY #3

MIX-MIX

- ① LAC Z BUFFER
 - ② ONPG (SUBSTRATE)
 - ③ DTT
- NEED REFRIG



25 μL YEAST
225 μL of MIX-MIX

INCUBATE
30-60 min
37°C WATER BATH

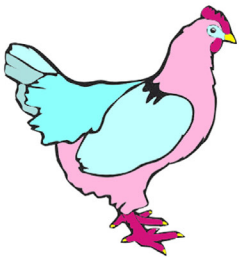
DOES IT SAY
[YES] TO [HER]
???

READ COLOR
YELLOW INTENSITY
COLORIMETER
or
SPECTROPHOTOMETER @ 405nm

STOP THE REACTION
100 μL 1M
SODIUM
CARBONATE

*
ESTROGEN
SAMPLES

CONCENTRATE
THE SAMPLE BY
SOLID PHASE EXTRACTION!



50 μL YEAST
5 mL MEDIA

100-FOLD
DILUTION



ONE
COLONY