

## Solución Salina de Transporte (0.9%)

Solución salina al 0.9% (NaCl 9 g por litro) en agua tridestilada. Colocar una etiqueta con: "Solución Salina al 0.9% y la fecha de elaboración", se puede almacenar indefinidamente a 4°C.

## Medio de Colección de Ovocitos (Cuerpos Cúmulos Ovocitos (OCM))

1. Disolver el TCM-199 (sin rojo de fenol, y sin el glutamina) **Hyclone** para 10 Litros, 3.50 g NaHCO<sub>3</sub> en 9 Litros agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.2-7.4, (ajustar el volumen a 10 litros), este volumen debe ser filtrado y esterilizado. El medio se colocara en botellas estériles de medio litro con 400 ml cada botella colocando etiquetas, con el contenido, fecha e iniciales del técnico que lo elaboro, este medio se puede conservar a 4°C indefinidamente.

2. La noche antes de usar, agregar lo siguiente:

Una solución # 4: **BSS + Heparina**, 1 solución # 11: **glutamina** (4 ml), y 1 solución # 15: **Penicilina/Estreptomicina** (4 ml). Cambiar la etiqueta + suplementos, cambiar la fecha y utilizarla el mismo día o hasta en una semana como máximo.

## Medio de Maduración de Ovocitos (CCOs)

1. Preparar una solución de 87 ml de **TCM-199**. Almacenarla a 4°C hasta su uso.

2. la noche antes de usar, agregar lo siguiente a una solución de **TCM-199**:

Solución # 3: **BSS**

Solución # 8: gentamicina

125 microlitros solución # 6: **Folltropin**

200 microlitros solución # 5: **Estradiol**

1 ml solución # 2: **Pyruvato de Sodio**

1 ml solución # 10: **Glutamina**. Cambiar la etiqueta (tcm-199) por Medio de Maduración de Ovocitos y podrá ser usada en un plazo de 1 semana.

## Soluciones de TL – Preparación de TALPs.

Estos medios se pueden comprar en **Caisson**, **Tecnologías Celular y Molecular**, o **Biowhittaker**. Tecnologías Celular y Molecular mantienen su sitio Web para consulta, información, o hacer pedidos de soluciones de TL. Y las instrucciones para la preparación de los medios

1. Para preparar medios, mezclar los ingredientes como se describe en la tabla 1 (todos los volúmenes están en mililitros), ajustar el pH, comprobar osmolaridad (si el osmómetro está disponible) y esterilizar - filtrar la solución.

2. Escribir la fecha y el vencimiento en la etiqueta (usarse en un plazo de una semana) y deberán estar almacenados a 4°C.

**Tabla 1.** Formulación para la preparación de las soluciones del TL

Ingrediente	Sp-TL	HEPES-TL	IVF-TL
Agua (ml)	79.232	177.0	40.157
<u>Solución 17:</u> NaCl (ml)	4.34	10.0	2.5
<u>Solución 18:</u> KCl (ml)	1.96	4.0	1.0
<u>Solución 19:</u> bicarb (ml)	10.00	1.6	5.0
<u>Solución 20:</u> phosphate (ml)	1.0	2.0	0.50
<u>Solución 1:</u> Na-lactate (ml)	0.368	0.372	0.093
<u>Solución 21:</u> HEPES (ml)	1.0	2.0	0
<u>Solución 22:</u> Ca chloride (ml)	1.0	2.0	0.50
<u>Solución 23:</u> Mg chlor (ml)	1.10	1.0	0.25
pH	7.4	7.3	7.4
Osmolaridad (mOsm)	295-305	275-285	290-300

Medios TALP (Tyrode's Albúmina Lactato Pyruvato )

Elaboración 1: usar medios **Caisson**.

1. Para preparar medios, mezclar los ingredientes según lo descrito en la tabla 2 y esterilizar - filtrar la solución.

2. Escribir la fecha de vencimiento en la etiqueta almacenarla a 4°C. (Usar en un plazo de una semana como máximo)

**Tabla 2.** Formulación para preparar los medios TALP, usando suplementos **Caisson**.

Ingrediente	Sp-TALP	HEPES-TALP	IVF-TALP
TL (ml)	76.0***	500.0	100.0
BSA, Fracción V (g)	0.48	1.5	0
BSA, EFAF (g)*	0	0	0.6
<u>Solución 2:</u> pyruvato (ml)	4.0	5.0	1.0
<u>Solución 8:</u> gentamicina (µl)	160	750	100
<u>Solución 7:</u> heparina (µl)	0	0	500***

Elaboración 2: usar la formula de **Tecnologías Celular y Molecular**.

1. Para preparar medios, mezclar los ingredientes según lo descrito en la tabla 3. Esterilizar –filtrar las soluciones.

2. Escribir la fecha de vencimiento en la etiqueta (usar en un plazo de una semana), mientras tanto se almacenan a 4°C.

**Tabla 3.** Formulación para los medios de TALP usando suplementos y soluciones de **Tecnologías Celular y Molecular**.

Ingredient	Sp-TALP	HEPES-TALP	IVF-TALP
TL (ml)	38.0**	100.0	50.0
BSA, Fracción V (mg)	240	300	0
BSA, EFAF (mg)*	0	0	300
Solución 2: piruvato (ml)	2.0	1.0	0.5
Solución 8: gentamicina (μl)	80	150	50
Solución 7: heparina (μl)	0	0	250***

\*BSA, EFAF Albumina Sérica Bovina, Esencial Acido-Graso, libre de la fracción V

\*\*Guarde los 12 ml restantes después de la preparación del medio, para ser utilizado en la formulación de Percoll.

\*\*\*La concentración óptima de heparina varía entre toros - si un toro se utiliza con frecuencia, las concentraciones de heparina se comprueban en un experimento preliminar.

### 10X SP-TL

Preparar la solución común de 10x SP-TL disolviendo lo siguiente; en 100 ml de agua:

NaCl - 4.675 g

KCl - 0.23 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>O - 0.40 g

HEPES 2.38 g

2. Ajustar el pH a 7.3, filtrar para esterilizar y almacenarlos indefinidamente a 4°C.

### Percoll 90%

1. Colocar 4 ml de 10X SP-TL en un vaso volumétrico pequeño y agregar 0.084 gr de bicarbonatos de sodio y 90 microlitros de lactato de sodio (solución 1).

2. Revolver hasta que el bicarbonato se disuelva.

3. Agregar 36 ml Percoll.

4. Agregar 158 microgramos de MgCl<sub>2</sub> (solución 12) y 78 microgramos de CaCl<sub>2</sub> (solución 13).

5. Mientras que revuelve, ajustar el pH a 7.3-7.45 y filtrar, con filtro de 0.45 micras (en un tubo filtrante de 50 ml o filtro similar de botella filtro con tapa). Si se forma un precipitado en la solución de Percoll, continuar revolviendo. Si los compuestos no se disuelven, entonces recomenzar el proceso. Es muy fácil la precipitación si el ácido o la base se agregan rápidamente durante el ajuste del pH. Por lo tanto, se recomienda que este paso se ejecute lentamente.

## **KSOM-BE (Medio Optimizado Potasio simple - Bovino Modificado Embrión 2)**

**Formulación 1- Usar KSOM+AA de Caisson** (contiene Penicilina/Estreptomicina). **Presione para formulación.**

1. Comprar KSOM de los laboratorios **Caisson**, consérvese congelado. Una vez que esté descongelado, se debe guardar a 4°C hasta por 2 semanas.

2. Agregar 1ml de Penicilina/Estreptomicina a la botella nueva de KSOM descongelado.

3. Para preparar 5 ml de KSOM agregar:

Albumina sérica bovina fracción libre de grasa 15 microgramos (3 microgramos/ml)

Gentamicina (solución 8A) 2.5 microlitros (0.5 microlitros/ml)

Aminoácidos no esenciales, 100X - 25 microlitros (5 microlitros /ml)

4. Este medio se filtra con un micropore de 0.22 micras utilizando una jeringuilla de 10 ml como recipiente intermedio, estéril. Este medio debe ser usado inmediatamente.

**Formulación 2 - con KSOM de Tecnologías Celular y Molecular** (contiene Penicilina/Estreptomicina)

1. Compra KSOM MR-106 de Tecnologías Celular y Molecular y almacénese congelado. Tener precaución con la fecha de vencimiento. Una vez que esté descongelado, guardar a 4°C por 2 semanas.

2. Para preparar 5 ml de de KSOM agregar:

**Albumina Sérica bovina** fracción libre de grasa 15 microgramos (3.00 microgramos/ml)

**Gentamicina solución 8A** - 2.5 microlitros (0.5 microlitros/ml)

**Aminoácidos no esenciales**, 100X - 25 microlitros (5 microlitros/ml)

Nota: Esta formulación es diferente a lo descrito previamente en esta página Web. Tecnologías Celulares y Moleculares, ha desarrollado una nueva formulación de KSOM que contiene los aminoácidos esenciales y la mitad de la concentración requerida de aminoácidos no esenciales.

3. Esterilizar el medio filtrando a través de un filtro de 0,22 micras utilizando una jeringuilla de 10 ml estéril. Usar inmediatamente.

### **CR1aa (un medio de cultivo alternativo)**

Nota: la patente para este medio pertenece a **Infigen**

1.- Para preparar la solución CR1aa (prepararla en un frasco volumétrico de 100 ml):

NaCl 0.670 g

KCl 0.023 g

NaHCO<sub>3</sub> 0.220 g

Pyruvato de sodio 0.004 g

Glutamina 0.015 g

Hemi-Ca lactato 0.055 g

2.- Agregar los primeros 5 ingredientes al frasco volumétrico. Agregar agua bi o tri destilada (90 ml). Disolver a fondo los componentes y después agregar el lactato Hemi-Ca. Agregar el agua restante (para completar los 100 ml). Almacenar por hasta 2 días a 4°C.

Nota: los componentes de este medio no se deben precipitar. Reducir al mínimo las posibilidades de que esto ocurra, cerciorarse de que todos los componentes estén disueltos antes de agregar el Lactato Hemi-Ca y utilizar inmediatamente después de la preparación. Si un medio aparece blanco y turbio, desechar y comenzar otra vez.

2. Para preparar CR1aa, agregar a 5 ml de la solución **CR1aa**:

EFAF BSA - 15 mg (3.00 mg/ml)

Gentamicina (**solución 8A**) - 2.5 microlitros (0.5 ml/ml)

Aminoácidos no esenciales, 100X - 50 microlitros

Aminoácidos esenciales, 50X - 100 microlitros

Se esteriliza el medio pasándolo a través del filtro millipore de 0.22 micras utilizando una jeringuilla de 10 ml de receptáculo, intermedio entre el recipiente donde se preparo y filtro, usar inmediatamente.

### **SOF (Fluido Sintético de Oviducto)**

Esto se basa en la formulación de **Fischer-Brown et. al. Zygote 10:341-348 (2002)** excepto que la concentración de gentamicina se modifican y la

concentración de Albumina Sérica Bovina Libre de Acido Graso. Compramos el medio como formulación de **Tecnologías Celular y Molecular**. Suplementamos el medio con 0.4 ml de pyruvato del sodio, 20 microlitros de Aminoácidos no Esenciales, 10 microlitros de Aminoácidos Esenciales, y 0.025 mg/ml sulfato de gentamicina (es decir, 10x más que lo utilizado para KSOM-BE2 no está claro que ésta sea la concentración óptima). También agregamos Albumina Sérica Bovina Libre de Acido -Graso para alcanzar una concentración final de 8 mg/ml BSA.

Para hacer 200X de Pyruvato de sodio:

0.88gr → 100 ml H<sub>2</sub>O → Esterilizar Filtrando almacenar por un mes a 4°C. (Se debe cubrir el frasco con papel aluminio que no reciba luz.

Para preparar 50 ml (modificados) SOF modificado agregar:

0.25 ml 200X de Pyruvato del sodio

Aminoácidos no esenciales 1.0 ml

Aminoácidos Esenciales 0.5 ml

Gentamicina (sulfato) 0.25 ml

EFAF-BSA 400 mg

La formulación: para SOF es como sigue (todas las concentraciones están en mililitros a menos que estén indicadas):

CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.17
KCL	7.16
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.49
NaCl	107.70
NaHCO <sub>3</sub>	25.07
Lactato de sodio (60%)	3.3
Pyruvato de sodio	0.4
BSA (mg/l)	8000
Gentamicina (U/l)	500 000
Amino Ácidos esenciales	(ml/l) 10
Amino Ácidos no esenciales	(ml/l) 20

[Ir al Principio](#)

El material original de esta página web pertenece © Rocio Rivera, [Peter J. Hansen](#) et al. 2000-2002. Traducción Mayo 2007 por Luis A. Dávila F. Las ligas a los sitios comerciales no constituyen el endoso de los Autores o la Universidad de Florida.





UNIVERSITY OF  
FLORIDA

Institute of Food and  
Agricultural Sciences

Department of Animal Sciences

*Dairy Research*