



**Protocolo de meio para embriões, KSOM e FHM**

Componente	Estoque concentrado (g) para diluir em 5 ml	KSOM final (10ml)	FHM final (20ml)
NaCl (1M) (e.g., Sigma S5886)	0,2922 (0,5844 em 10 ml)	950 µl	1.900 µl
KCl (0,1M) (e.g., Sigma P5405)	0,0373	250 µl	500 µl
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,1M) (e.g., Sigma P5655)	0,0681	35 µl	70 µl
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,1M) (e.g., Sigma 63140-F)	0,1232	20 µl	40 µl
Lactato de sódio (100X) (e.g., Sigma L1375)	0,71 ml de xarope 60 %	100 µl	200 µl
Glicose (0,1M) (e.g., Sigma G6152)	0,0901	20 µl	40 µl
Piruvato de sódio (0,1M) (e.g., Sigma P4562)	0,0550	20µl	40 µl
NaHCO <sub>3</sub> (0,1M) (e.g., Sigma S5761)	0,0420	2,5 ml	–
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (0,1M) (e.g., Sigma C7902)	0,1257	100 µl	200 µl
Glutamina (e.g., Sigma G8540)	0,0731	100 µl	200 µl
EDTA (0,01M) (e.g., Sigma E6635)	0,0186	10 µl	20 µl
BSA (e.g., Sigma A3311)		0,01 g	0,02 g
Aminoácido essencial (e.g., Sigma B6766)		100 µl	200 µl
Aminoácido não essencial (e.g., Gibco 1140-050)		50 µL	100 µl

Componente	Estoque concentrado (g) para diluir em 5 ml	KSOM final (10ml)	FHM final (20ml)
Penicilina G / (e.g., Sigma P7794) Estreptomicina (100X) (e.g., Sigma S1277)	0,0300 Penicilina 0,0250 Estreptomicina	100 µl	200 µl
HEPES 0,1 M (e.g., Sigma H4034) /NaHCO <sub>3</sub> (e.g., Sigma S5761)	0,1192 (ver observação abaixo)	–	4 ml
H <sub>2</sub> O ultra pura (e.g., Sigma W1503)		5.645 µl	12.290 µl (12.090 e 200 p/ pH)

#### Para o KSOM

1. Pesar cada um dos ingredientes indicados na tabela e eluir em 5 ml de água ultra pura (e.g., Sigma W1503).
2. Juntar os volumes recomendados em um tubo de 15 ml no qual o BSA foi pesado. É importante esperar um tempo, cerca de 30 min, entre a eluição dos sais e o preparo dos meios finais para possibilitar que os mesmos entrem completamente em solução. Sais como o EDTA demoram para entrar em solução. Sugere-se que o CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O seja o último a ser adicionado.
3. Homogeneizar por inversão.
4. Filtrar em filtro de membrana PES com 0,22 µm.
5. Guardar em alíquotas de 1 ml a 4°C por no máximo 2 semanas.

#### Para FHM (KSOM + HEPES)

1. Pesar cada um dos ingredientes indicados na tabela e eluir em 5 ml de água ultra pura (e.g., Sigma W1503). Para o HEPES, pesar 0,1192 g, eluir com 1 ml de NaHCO<sub>3</sub> a 0,1 M e adicionar 4 ml de água. De tal mistura deve-se usar 4 ml para 20 ml de FHM.
2. Preparar as demais soluções e adicionar todas, exceto a água, nas quantidades recomendadas em um tubo de 50 ml no qual a BSA foi pesada.
3. Adicionar 12 ml de água, acerte o pH para 7,3-7,4 (adicionar 200 µl de NaOH a 1 M) e complete o volume para 20 ml com água ultra pura.
4. Filtre a solução final em filtro de membrana PES com 0,22 µm.
5. Guardar em alíquotas de 1 ml a 4°C por no máximo duas semanas.

Obs.: as soluções estoque de NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e EDTA podem ser estocadas por um mês a 4°C. As soluções estoque de glutamina e penicilina/estreptomicina podem ser estocadas em alíquotas de 350 µl a -20°C por 3 meses. As demais soluções devem ser preparadas toda vez que o meio for feito.