



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM  
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

**Jméno:**

**Datum:**

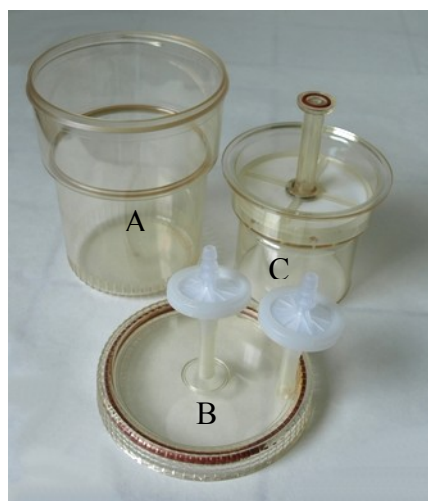
### **Téma 11: Založení dočasně zaplavované kultury v bioreaktoru RITA®**

Bioreaktorový systém RITA® pracuje na principu opakovaného částečného ponořování explantátů („temporary immersion“) do tekutého živného média.

Jednotlivé bioreaktory jsou nádoby z trvanlivého autoklávovatelného plastu (polysulfon) o celkovém objemu 1l, ve kterých je na perforovaném košíku připevněna síťka pro umístění explantátů. Na víku bioreaktoru (Obr. 1) jsou přívody pro umístění 2 vzduchových filtrů, které zajišťují sterilitu kultivační nádoby v průběhu celého kultivačního období.

Kultivace v těchto bioreaktorech prochází 4 fázemi. Systém je tvořen kultivačními nádobami, které jsou napojeny na společný rozvod se vzduchovým čerpadlem, které v nastavených intervalech zvyšuje tlak vzduchu v bioreaktorech a tekuté kultivační médium vytlačováno ze spodní části bioreaktoru podél vnější strany zvonu do svrchní části kultivační nádoby přes síťku s explantáty, které jsou médiem ovlhčovány. Současně dochází k provzdušnění kultivačního média i k výměně plynů v kultivační nádobě a nedochází tak k hromadění oxidu uhličitého a etylénu v plynné fázi kultivační nádoby. Po ukončení tlakování se médium samovolně vrací zpět do spodní části bioreaktoru.

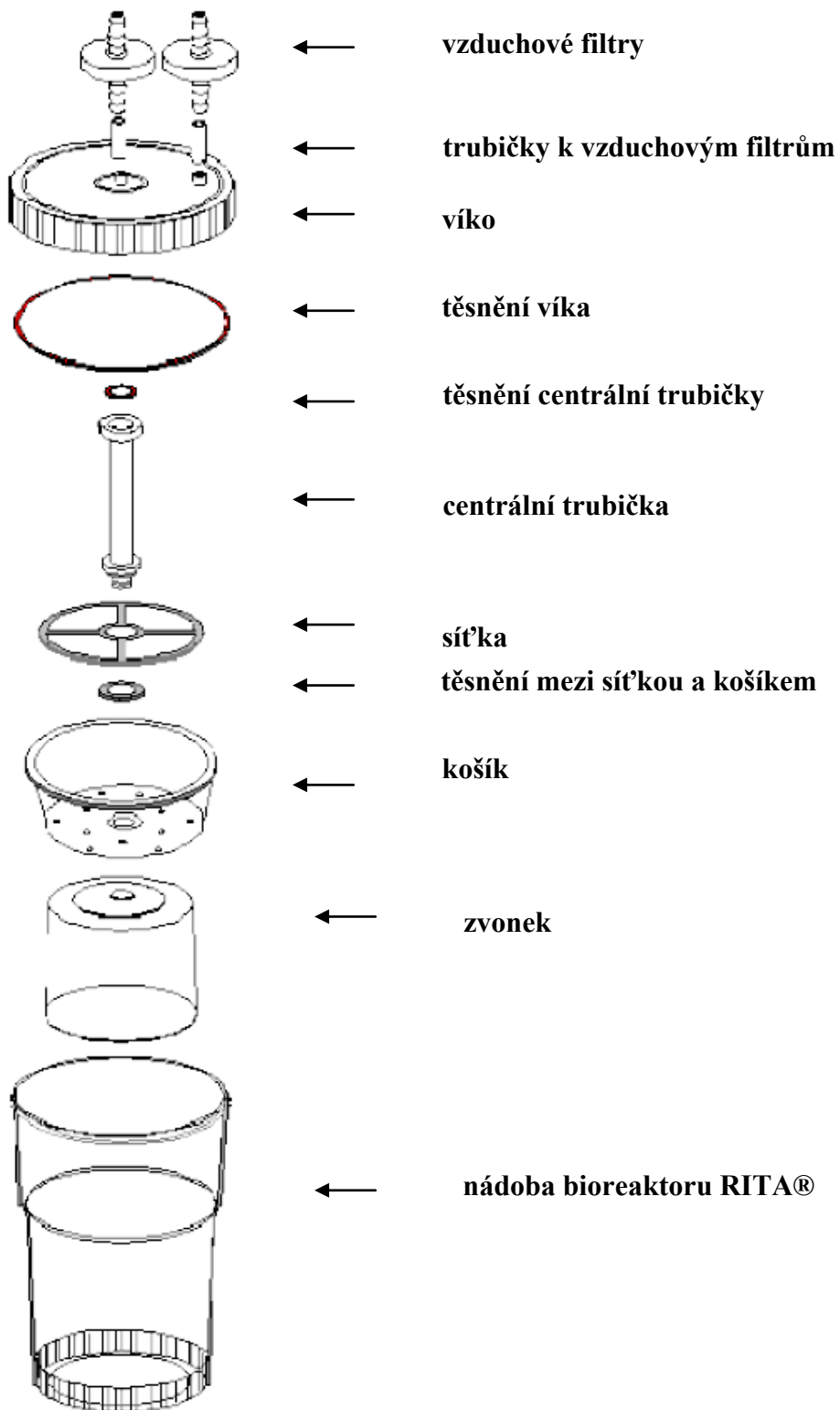
Manipulace s bioreaktory je jednoduchá. Výhodou je možnost odpojení individuálního bioreaktoru a jeho přenos z kultivační místnosti do laminárního boxu v transferové místnosti k dalším manipulacím ve sterilním prostředí.



**Obr. 1.** Ukázka součástí bioreaktoru RITA®:

(A) vlastní nádoba, (B) víko se vzduchovými filtry, (C) vnitřní část se sítkou, košíkem a zvonem spojená centrální trubičkou

Jednotlivé komponenty bioreaktoru RITA® jsou znázorněny na obr. 2.



POSTUP PRÁCE:

### **Čištění dílů bioreaktoru RITA®**

1. Pro dostatečné umytí bioreaktoru je nutno celý systém rozložit a jednotlivé díly šetrně mýt samostatně s použitím detergentů, které nesmějí obsahovat aromatické uhlovodíky snižující trvanlivost plastu.
2. **Nepoužíváme žádné abrazivní prostředky!** Vhodné je šetrné použití utěrky z mikrovlákna.
3. Po opláchnutí mycího roztoku čistou vodovodní vodou opláchneme díly bioreaktoru v destilované vodě a usušíme při laboratorní teplotě.

### **Sterilizace bioreaktoru RITA®**

1. Sterilizujte sestavený bioreaktor s nasazenými vzduchovými filtry (neutahujte víko nádoby příliš těsně, aby nedošlo k deformaci v průběhu sterilizace).
2. Před sterilizací v autoklávu přidejte do nádoby několik mililitrů destilované vody.
3. Vzduchové filtry chraňte aluminiovou fólií před vlhkostí. Na filtrech označujte počet cyklů sterilizace (výrobce doporučuje filtry autoklávovat maximálně 10x).
4. Médium sterilizujte odděleně a vlévejte do bioreaktoru až v laminárním boxu.

### **Iniciace kultury v bioreaktoru RITA®**

1. Vysterilizovaný sestavený bioreaktor s nasazenými vzduchovými filtry přeneste do laminárního boxu.
2. Po otevření víka bioreaktoru vlijte připravené sterilní tekuté živné médium do nádoby (víko si v laminárním boxu odložte na sterilní Petriho misku).
3. Na síťku vložte explantáty a zpět nasadte a zašroubujte víko bioreaktoru.
4. Přeneste bioreaktor do kultivační místnosti a připojte střední vzduchový filtr pomocí hadičky ke vzduchovacímu systému. Zkontrolujte funkčnost filtrů.

### **Pasážování kultur v bioreaktoru RITA®**

1. Bioreaktor RITA® s kulturou přeneste do laminárního boxu a pečlivě desinfikujte jeho povrch, zejména okraj víka.
2. Vysterilizujte si novou nádobu RITA® s víkem (bez vnitřní části) a přeneste ji do laminárního boxu.
3. Připravte si tekuté sterilní živné médium podle potřeby pasážované kultury a vlijte je v laminárním boxu po otevření víka bioreaktoru do nádoby.
4. Přeneste sterilně celou vnitřní část s explantáty do nové nádoby, uzavřete víkem. Přeneste bioreaktor zpět do kultivační místnosti a připojte přes střední filtr hadičkou ke vzduchovacímu zařízení. Zkontrolujte funkčnost filtrů.

### HODNOCENÍ

V následujících týdnech kontrolujeme čistotu kultur a vývoj explantátů. Srovnajte s vývojem stejných explantátů na ztuženém médiu.

LITERATURA: [www.vitropic.fr](http://www.vitropic.fr)