

ネットモールド・スターターキット V7

ウイズ デインプルプレート(2サイズ)

取扱い説明書

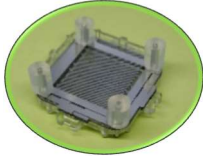





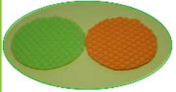


ティシューバイネット株式会社
〒115-0041 東京都北区岩淵町 24-27-804
Web: www.tissuebynet.com
Email: info@tissuebynet.com
Tel +81-(0)90-1760-3603

作成日 : 2020/11/22

注意事項

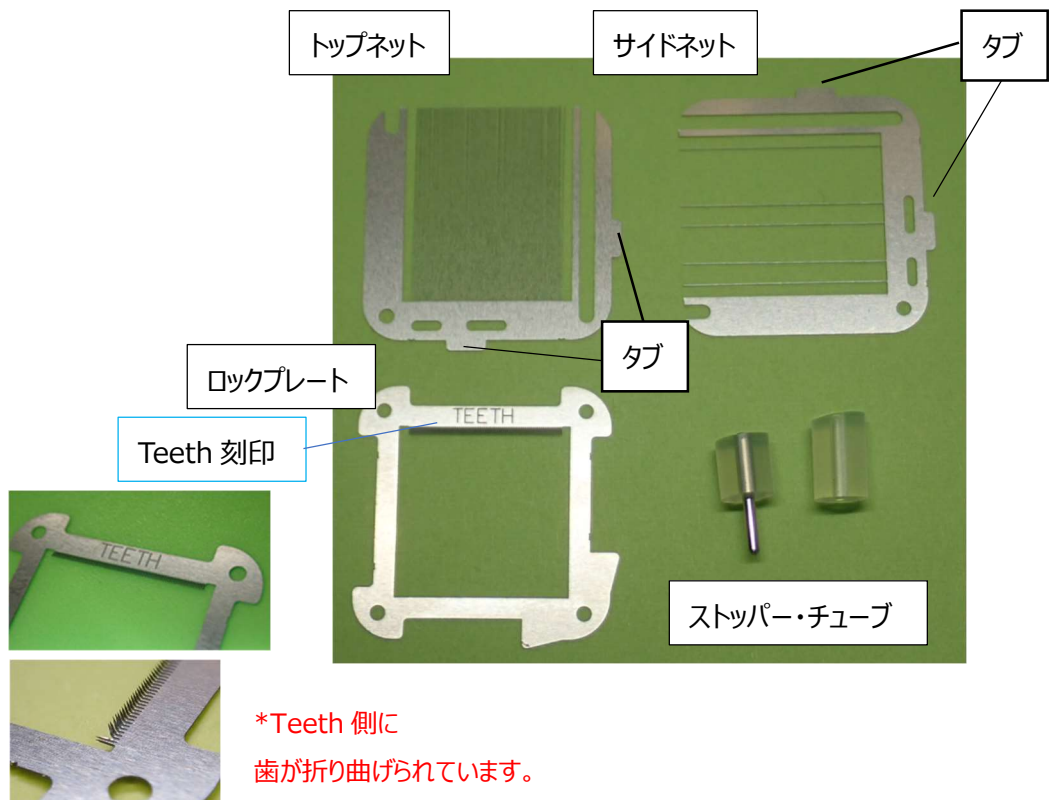
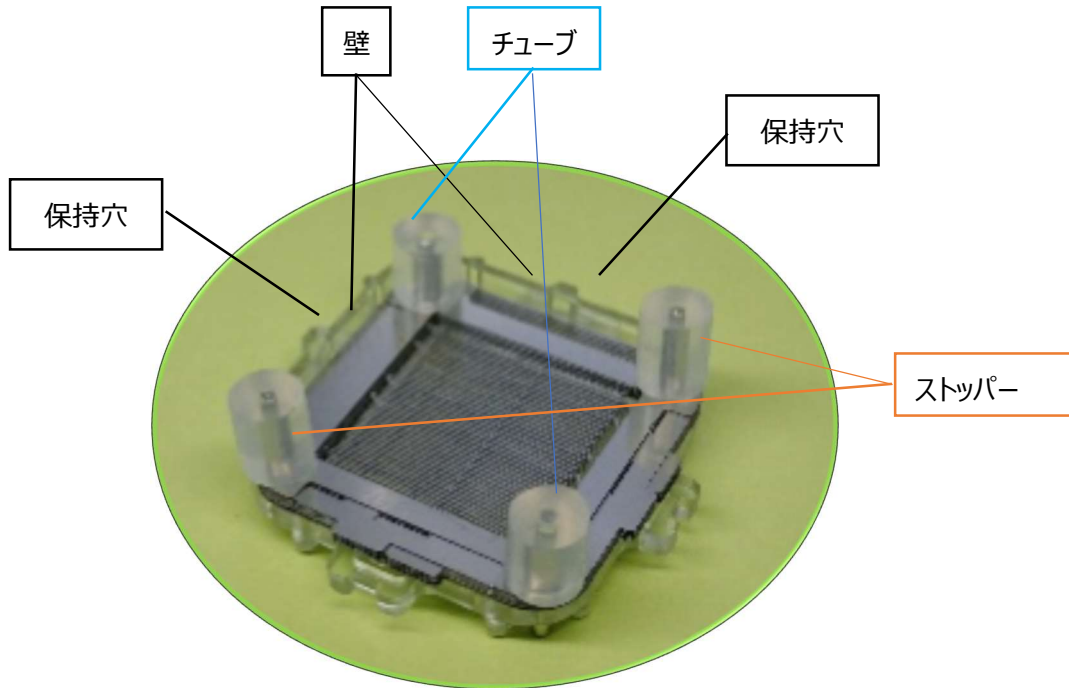
- 本製品は研究用で、試験・研究の目的のみに使用されるものであり、いかなる形でも医療向け、食用向け、などとしては使用できません。
- 細胞の状態や培地との相性などで作製状況は異なるため、細胞ブロック作製を保証するものではありません。
- 必要に応じオートクレーブなどの滅菌処理をしてお使いください。
- 鋭利な部品がありますので、取扱い時には指などに刺さないよう気を付けて作業してください。

同梱品

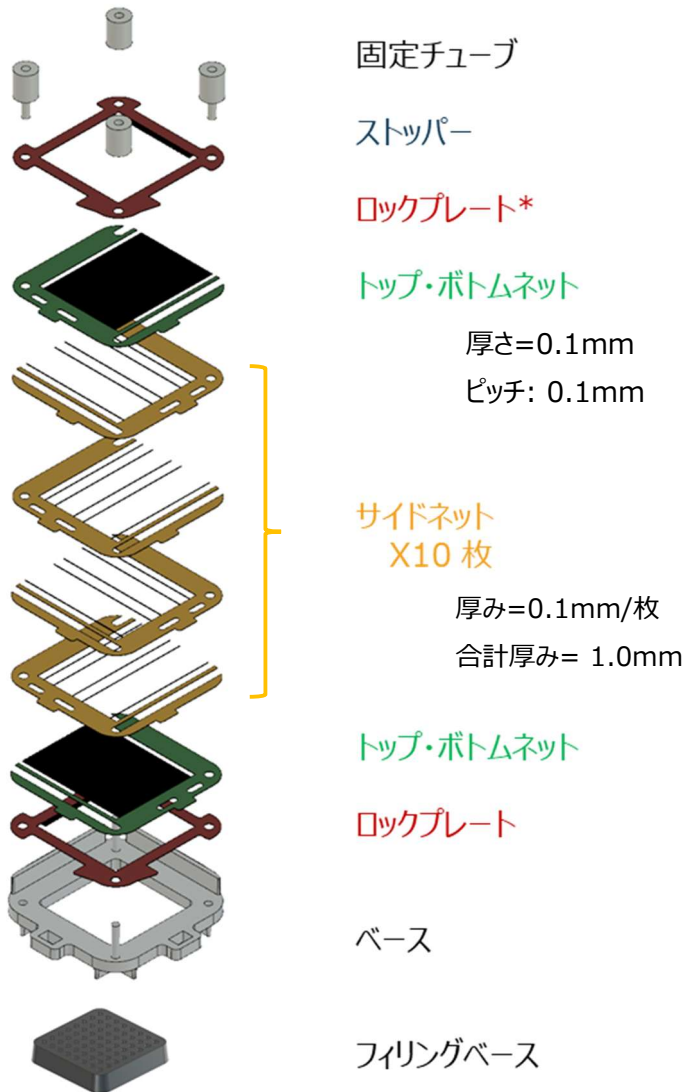
	品名	数量	外寸	材質
	NM14-2	1 個	32x32x12mm	ベース：ポリカーボネート ネット：ステンレス チューブ：シリコン ストッパー：シリコン/ステンレス
	フイリングベース	1 個	12 x 12 x 3mm	ポリカーボネート
	スペアネット (トップ, サイド, ロック, チューブ, ストッパー)	各 3 枚		ネット：ステンレス チューブ：シリコン ストッパー：シリコン&ステンレス
	DP10-1	2 枚	Φ82mmx14mm	シリコン
	DP03-1	6 枚	Φ34mmx12mm	シリコン
	ピンセット	2 個	115mm	ステンレス
	マット	2 枚	Φ82 mm x4mm	シリコン
	120ml コンテナ	2 個	Φ58mm x 80mm	ポリプロピレン
	ウォッシュ・ベース	1 個	35x35x5mm	ポリカーボネート ステンレス

各部の名称

ネットモールド : NM14-2



NM14-2 の構成

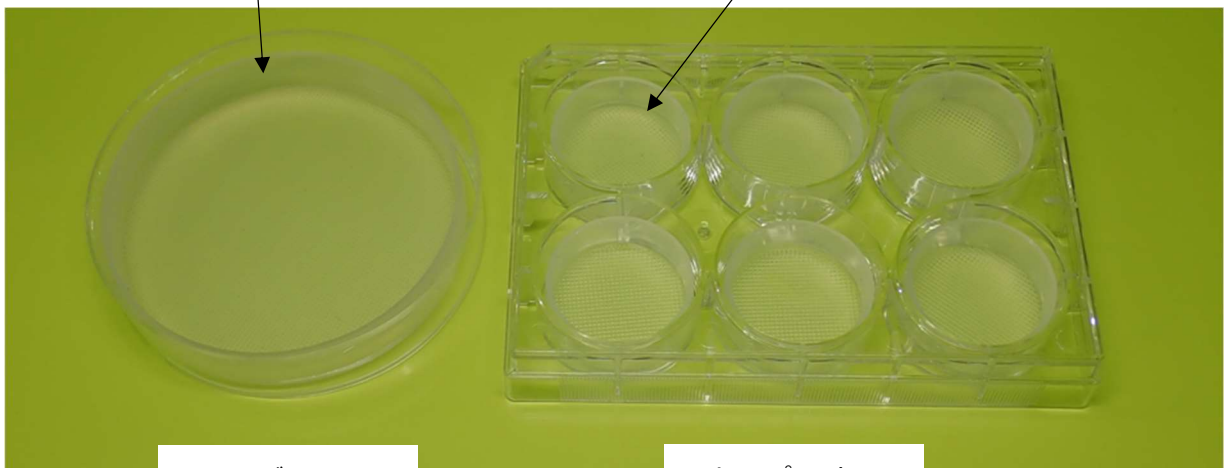


ディンプルプレートについて

DP10-1



DP03-1



10cm ディッシュ




6 ウェルプレート

NM14-2 使い方

1. デインプルプレートへ細胞懸濁液の投入

	<p>柔らかい歯ブラシなどを使い、中性洗剤で洗浄。</p>
	<p>純水内でオートクレーブ。 121℃ 30分。</p>
	<p>デインプルプレートを 10 c mディッシュにセット。</p>
	<p>乾かないように すぐに培地を 10ml 程度投入</p>
	<p>細胞懸濁液を満遍なく投入。投入後に前後、左右にゆっくり振とうさせて均一化。</p>
	<p>インキュベーター (37℃ CO25%) で培養。6 H 程度以上で凝集が認められる。</p>

2. スフェロイドの回収


	<p>デインプル内に細胞が沈降後、凝集。</p>
	<p>1000ul チップで培地を吹き付けることでスフェロイドを浮き上がらせる。 まずは中心部を 5~6 回。その後周辺部を回転させながら。</p>
	<p>スフェロイドが浮き上がった。 ゆっくり回転させることで中央部に集結させる。</p>
	<p>25ml ピペットで中央部のスフェロイドを回収。</p>
	<p>残りのスフェロイドを回収。 ディッシュを傾けて、数回流し取る。</p>
	<p>少量 (DP 数枚程度) は 10 cm ディッシュにスフェロイドを投入。 ゆっくり回転で中央に集結する。</p>
	<p>大量 (DP5 枚以上) はリザーバーを使うと効率が良い。</p>

3. ネットモードへの投入

	<p>ディッシュ上に ①ネットモード ②フィードベース を設置。 ネットモードの壁が上 & 左に来るように。</p>
	<p>別のディッシュにマットを設置。</p>
	<p>チューブが固着しているので、左右から両方のチューブをつかみ、回転させ、固着を解除。 ネットに触らないように注意！ その後 チューブ、ストッパーを外す</p>
	<p>ロックプレートを外す。 Teeth 印がある面に、歯が曲げられている。 Teeth 部分を挟まないように注意！</p>
	<p>トップネットも取り外す。 部品はハンドリングマット上に置くことで、次作業時に取り上げやすくなる。</p>
	<p>本作業は、次作業でスフェロイド投入をしやすくするために行う。 フィード・ベースに培地を滴下。上部に玉状になる。透過してしまっても問題なし。</p>
	<p>ネットモードを水平にしたまま、（ネットがずれないように）、フィードベースにはめ込む。</p>

	<p>ネットモールドのスフェロイドを投入するキャビティ部分に培地を滴下して濡らす。最初は玉状になるが、多少吹き付けると透過する。使わない部位は濡らさないこと。（ボトムネットが寄ってしまう原因になる）</p>
	<p>培地が透過。濡れていればよい。 なかなか透過しない場合は多少勢いをつけて吹き付ける。</p>
	<p>1000um ピペットでスフェロイドを吸引。 できるだけ多くのスフェロイドを回収。 （その後の投入がやり易い）</p>
	<p>重要！ ピペットを垂直でしばらく保持。 スフェロイドが先端に沈降するのを待つ。</p>
	<p>スフェロイドが沈降したら、スフェロイドを狙ったキャビティにゆっくりと投入。</p>
	<p>枠上にはみ出す程度投入する。高さ方向で 120%程度入れるイメージ。 （量が少ないと枠内で動いてしまい融合しない原因になる） スフェロイド量が足りない場合はサイドネットを抜き取って高さを減らすことで対応。</p>

 <p>開口部</p>	<p>トップネットを取付。 (濡れてしまうと針が寄ってしまうので、ストンと落とす感覚で)</p>
 <p>歯部 Teeth面下向き</p> <p>タブ部</p>	<p>ロックプレートを取付。 歯 (Teeth 印) を下向きに。 歯がトップネットの開口部に重なるように設置。</p>
	<p>①ストッパー、②チューブの順で取付。</p>
	<p>重要！ フィードベースを取り外す事を忘れずに！ (忘れると、培地循環が阻害されて、融合が進みません)</p>
	<p>コンテナを使う場合</p>
	<p>120ml コンテナの換気孔をテープでふさぐ。 培地を投入。</p>
	<p>スフェロイド投入したネットモールドをピンセットでつまんで、培地内にゆっくり投入する。 同時に複数個を投入してもよい。</p>
	<p>ディッシュを使う場合は、5 個まで同時投入が可能。</p>

	<p>インキュベーター内でシェーカーで振とうしながら培養。 標準的には 45rpm で振とう。</p>
---	---

4. ネットモールドからの抜去

	<p>数週間の培養後、スフェロイドが融合し細胞ブロックに。産出された ECM がネット全体を覆っている。</p>
	<p>ベースの保持穴を使って保持しながらチューブ、ストッパーの順で取り外す。</p>
	<p>トップネットをゆっくりと除去。 細胞がかなり強くネットに固着している場合もある。ゆっくりと押し引きを繰り返すことで、抜去できる。</p>
	<p>ロックプレートを取り外す。</p>
	<p>サイドネットを全て抜き取る。</p>

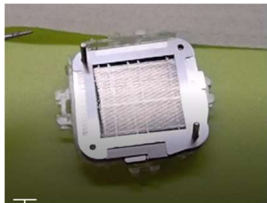
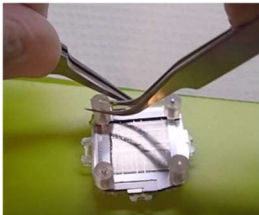

 A photograph showing two white plastic side nets and their associated components laid out on a light-colored surface.	<p>全てのサイドネットを抜去。</p>
 A close-up photograph of a white plastic top net being lifted from a container using tweezers.	<p>トップネットを取り外す。</p>
 A close-up photograph of tweezers being used to lift a small, rectangular, light-brown cell block from a white plastic net.	<p>ピンセットでネットを挟み、そぎ取るように細胞ブロックを抜去。</p>
 A photograph of a single, isolated, light-brown, rectangular cell block resting on a light-colored surface.	<p>抜去後の細胞ブロック。</p>

5. 洗浄

<p>ネットモールド</p>	
	<p>ベースを歯ブラシなどで、中性洗剤で洗浄。</p>
	<p>ウオッシュベースにネットをセット。</p>
	<p>柔らかいブラシ（歯ブラシなど）で 中性洗剤で洗浄。 重要！ ブラッシングは1方向のみで！</p>
	<p>よく乾燥させる。</p>
<p>ディンプルプレート</p>	
	<p>ディンプルプレートの内部を柔らかい歯ブラシなどで、中性洗剤で洗浄。</p>
	<p>アルカリ性洗浄剤（SCAT 20X-AB など）でディンプルプレート内部を漬けおき洗い。 （例：10 倍希釈液を一晩漬けおき）</p>
	<p>再度 洗浄し、乾燥させて保管。</p>

6. ネットモールドの組立

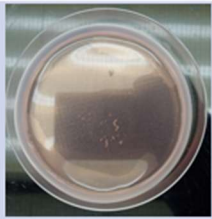
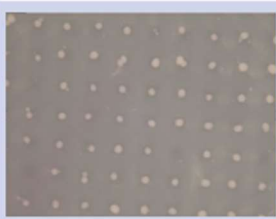
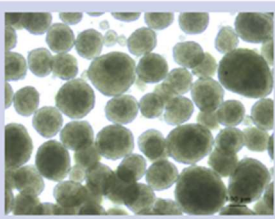

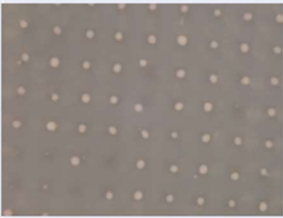
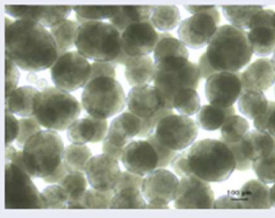
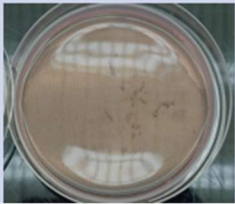

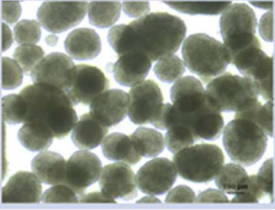
	<p>必要な枚数のネットを準備</p>
	<p>ベースをホームポジション（壁が左&上）に。</p>
	<p>ロックプレートの“Teeth”が上部（歯が上向き） & 上になるように設置。</p>
	<p>トップネットを設置。 開口部がロックネットの歯と重なるように。</p>
	<p>サイドネットを設置。 トップネットと 90°交差するように。</p>
	<p>次のサイドネットを 90°交差するように設置。 所望の数まで繰り返す。</p>
	<p>トップネットを設置。 開口部が左向きになるように。</p>

 A white plastic lock plate with a central mesh area, shown from a top-down perspective on a green surface.	<p>ロックプレートを設置。 Teeth 刻印が 下向き（歯が下向き） & 左側になるように。</p>
 A close-up view of a person's hands using tweezers to attach a small black stopper and a clear tube to the lock plate assembly.	<p>ストッパー、チューブ、を取り付けて完成。</p>
 A clear plastic bag containing the assembled device, with a small black stopper visible inside. The bag is placed on a light-colored surface.	<p>滅菌。</p>



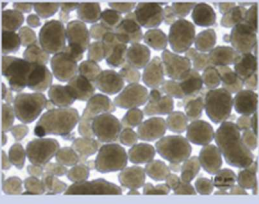


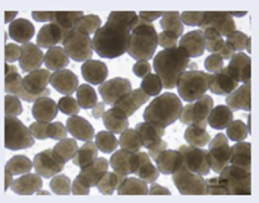


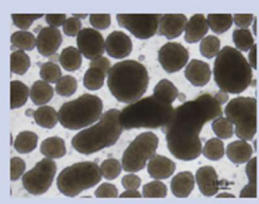
技術データ

ディンプルプレートによるスフェロイド作製 :

DP10-1 : Cell:NHDF, Medium:FKCM+ FBS10%, 37°C、CO2:5%, 24hour

Cell	Top View	Plate(2x)	Spheroid (4 x)
2 X10E7			
2.5X10E7			
3 X10E7			


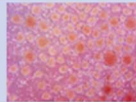

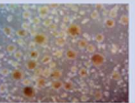

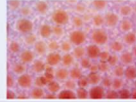

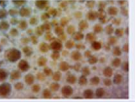

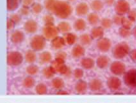

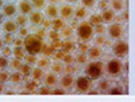
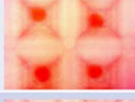
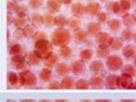

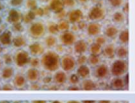

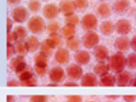

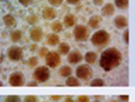

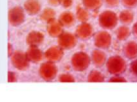

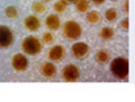
DP10-1 : Cell:NHDF, Medium:DMEM+ FBS10%, 37°C、CO2:5%, 24hour

Cell	Top View	Plate(2x)	Spheroid (4 x)
2 X10E7			
2.5X10E7			
3 X10E7			

DP03-1

Cell: NHDF
 Plate: 6 Well
 Temp: 37°C
 CO₂ : 5%
 Time: 18 hours



Cell	DMEM+FBS10%		FKCM201T+FBS2%	
1X10 ⁶				
2X10 ⁶				
3 X10 ⁶				
4 X10 ⁶				
5 X10 ⁶				
6X10 ⁶				

標準的作業例

細胞：ヒト新生児皮膚由来線維芽細胞

培地：FKCM201T（フコク）

細胞数 vs スフェロイドサイズ相関のチェック

T175 フラスコに、 1×10^6 の細胞、FKCM+FBS10% 20ml を投入し、コンフルまで培養すると、 2×10^7 程度の細胞数が得られる。

D P 03-1 に $1 \sim 6 \times 10^6$ の細胞量を投入（培地量は 3ml）し、スフェロイドサイズを検証する。
200-400um 程度になる細胞投入量を見つける。

拡大培養：

T175 フラスコに、 1×10^6 の細胞、FKCM+FBS10% 20ml を投入し、コンフルまで培養。 2×10^7 程度の細胞数が得られる。

スフェロイド作製：

上記スフェロイドサイズ相関で得られた分量をディンプルプレートに投入する。（D P 10-1 の底面積は 6.4 倍なので、細胞量も 6.4 倍とする）

培地は FKCM+FBS10%20mL

ネットモールド投入：

得られたスフェロイドをネットモールドに投入。細胞の状況によるが、 $4 \times 4 \times 1\text{mm} \sim 6 \times 6 \times 1\text{mm}$ のキャビティ分に該当する。