

Net Mold Starter Kit V7

with **Dimple Plate**(2 sizes)

ネットモールド・スターターキット V7

ウイズ **ディンプルプレート**(2サイズ)

Instruction Manual

取扱い説明書

TissueByNet Corporation ティッシュバイネット株式会社

〒115-0041

24-27-804 Iwabuchimachi, Kita-Ku, Tokyo 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

Date : 2020/11/22

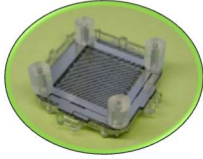





Warning

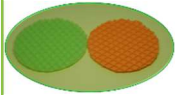


- This product is research purpose only and can not be used for clinical, food or any other purposes.
- As cell culture condition may vary, there is no guarantee of success in Cell Block fabrication.
- Wash and Autoclave products as necessary.
- Be careful not to hurt yourself by sharp edge.

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。

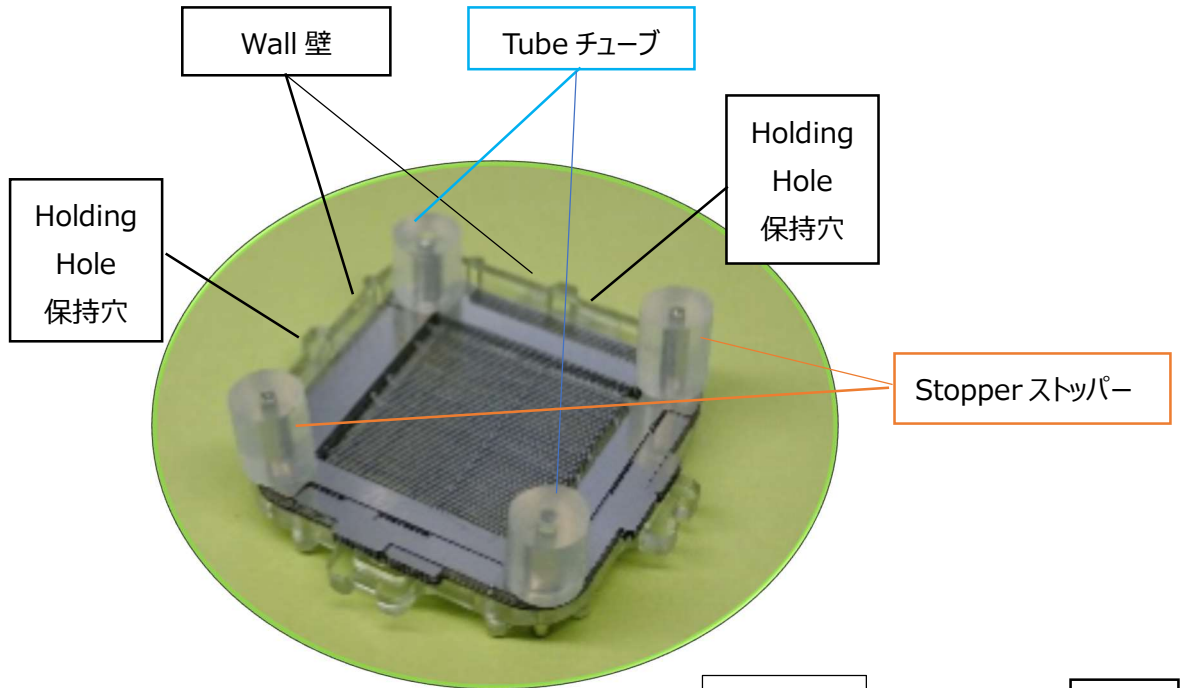
Included Items 同梱品

	Name 品名	Qty 数量	Size 外寸	Material 材質
	Net Mold NM14-2	1pc 1 個	32x32x12mm	Base: Polycarbonate Net: Stainless Steel Tube: Silicone Stopper: Silicone/SUS 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
	Filling Base フイリングベース	1Pc 1 個	12 x 12 x 3mm	Polycarbonate ポリカーボネート
	Spare Net スペアネット (Top, Side, Lock, Tube, Stopper) トップ、サイド、ロ ック、チューブ、ストッ パー)	各 3 枚		Net: Stainless Steel Tube: Silicone Stopper: Silicone/SUS 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
	Dimple Plate デインプルプレート DP10-1	2 p c s 2 枚	Φ82mmx14mm	Silicone シリコン
	Dimple Plate デインプルプレート DP03-1	6pcs 6 枚	Φ34mmx12mm	Silicone シリコン
	Tweezer ピンセット	2pcs 2 個	115mm	Stainless Steel ステンレス

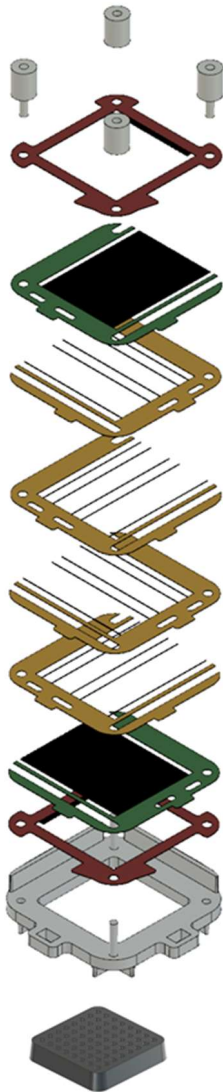
	Mat マット	2pcs 2 枚	$\Phi 82 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$	Silicone シリコン
	120ml Container 120ml コンテナ	2pcs 2 個	$\Phi 58 \text{ mm} \times 80 \text{ mm}$	PP ポリプロピレン
	Wash Base ウォッシュ・ベース	1pc 1 個	$35 \times 35 \times 5 \text{ mm}$	Polycarbonate ポリカーボネート SUS ステンレス

Nomenclature 各部の名称

Net Mold ネットモールド : NM14-2



NM14-2 Assembly 構成



固定チューブ Tube

ストッパー Stopper

ロックプレート* Lock Plate

トップ・ボトムネット Top/Bottom Net

厚さ=0.1mm Thickness=0.1mm

ピッチ: 0.1mm Pitch=0.1mm

サイドネット
X10 枚 Side Net x 10 pcs

厚み=0.1mm/枚 Thickness=0.1mm

合計厚み= 1.0mm Total Thickness = 1.0mm

トップ・ボトムネット Top/Bottom Net

ロックプレート Lock Plate

ベース Base

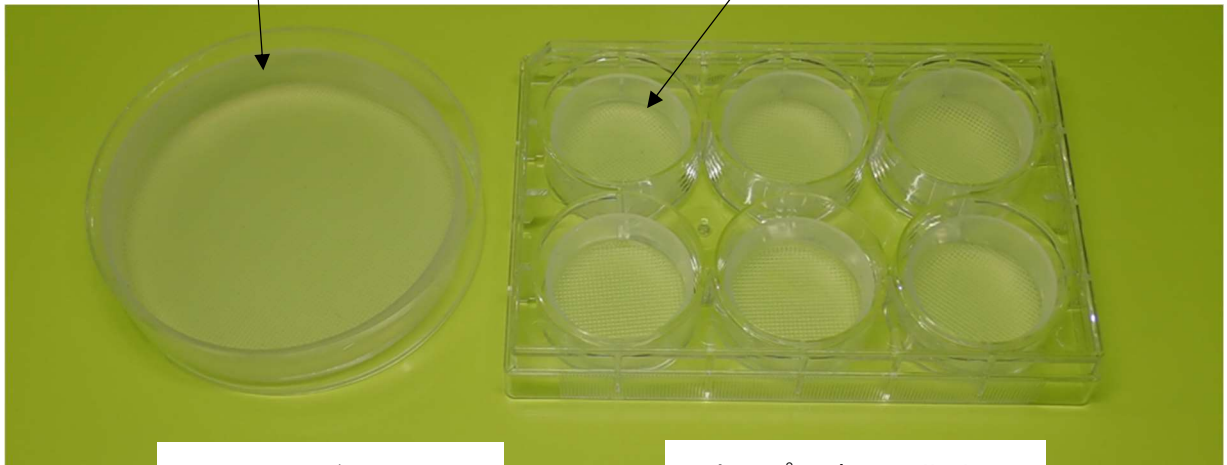
フィリングベース Filling Bawe

Dimple Plate ディンプルプレート

DP10-1



DP03-1





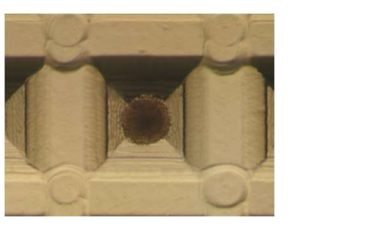


10cmDish ディッシュ

6 ウェルプレート 6Well Plate

NM14-2 Instruction 使い方

1. Feed Cell Suspension into Dimple Plate ディンプルプレートへ細胞懸濁液の投入


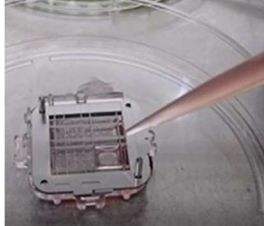

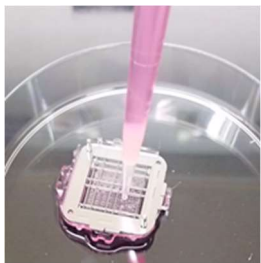
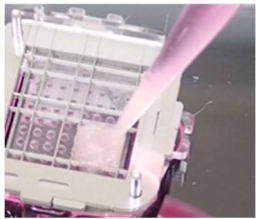
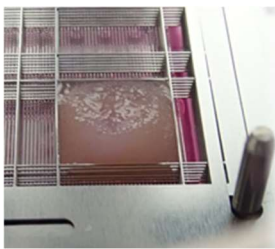
	<p>Wash Dimple Plate with soft brush and natural detergent. 柔らかい歯ブラシなどを使い、中性洗剤で洗浄。</p>
	<p>Autoclave dipped in Pure Water. 121°C 30min. 純水内でオートクレーブ。 121°C 30分。</p>
	<p>Set Dimple Plate in 10cm Dish. ディンプルプレートを 10 c mディッシュにセット。</p>
	<p>Feed medium (10ml or so) to avoid drying. 乾かないように すぐに培地を 10ml 程度投入</p>
	<p>Feed cell suspension. Homogenize by shaking back and forth. 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>Culture in Incubator (37°C CO25%) . Cell aggregate in 6 hour+. インキュベーター (37°C CO25%) で培養。6 H 程度以上で凝集が認められる。</p>

2. Collect Spheroids スフェロイドの回収

	<p>Cell aggregate in dimples. デインプル内に細胞が沈降後、凝集。</p>
	<p>Apply medium by 1000 chip gently to float spheroids. Start from center, and all around the edge by rotating the dish. 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>Spheroid detached. Rotate slowly to collect at the center. 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>Collect spheroid with 25ml Pipette. 25ml ピペットで中央部のスフェロイドを回収。</p>
	<p>Collect the rest. Tilt dish and wash down with medium. 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>Collecting Spheroid from Dish スフェロイドの回収</p>	
	<p>Dimple Plate Less than 5 pcs: Use 10cm Dish. Rotate slowly to collect at the center. 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>Dimple Plate more than 5 pcs: Use reservoir. 大量 (DP5 枚以上) はリザーバーを使うと効率が良い。</p>

3. Feed Spheroid into Net Mold ネットモールドへの投入

	<p>Please Net Mold at home position. Walls at the top and left. ディッシュ上に ①ネットモールド②フィードベースを設置。 ネットモールドの壁が上 & 左に来るように。</p>
	<p>Place mat on other dish. 別のディッシュにマットを設置。</p>
	<p>Tube may be stuck. Hold both tubes and twist to loosen. DO NOT TOUCH NET! Remove Tube and Stopper. 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>Remove Lock Plate. Teeth bent to engraved side. DO NOT CRAMP TEETH! 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>Remove Top Net. Placing nets on Mat makes picking up easier. 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>Wet Filling Base with medium. This helps feeding spheroid easier. Medium may drop through holes. 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>Place Net Mold on Feed Base. Be careful not to drop nets. ネットモール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>Wet Net Mold by applying some medium. Medium forms sphere at first and go through net. Wet only targeted cavity. (Net may gather when wet) 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>Medium went through net. Apply with pressure if not. 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>Collect spheroids with 1000um chip. Collect as much as possible, which makes feeding easier. 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>Important! Hold pipette upright until spheroids sink to the tip. 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>After Spheroids sunk to the tip, slowly feed spheroids into the cavity. 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>Feed approx. 120% in height. Insufficient volume cause spheroids move around in the cavity which prevent fusion. Remove side nets if spheroid is not enough. 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>Install Top Net. (Set quickly to avoid net getting wet. Net may gather when wet) 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>Opening</p> 	<p>Install Lock Plate. Teeth (Engraved Side) to bottom. Teeth to the opening side so that teeth interlock with net. 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>Install Stopper and Tube. ①ストッパー、②チューブの順で取付。</p>
	<p>Important! Remove Feed Base! (Feed Back will block medium access if not removed.) 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>With Container コンテナを使う場合</p>	
	<p>Cover Hole with Tape as shown. 120ml コンテナの換気孔の上をテープでふさぐ。 培地を投入。</p>
	<p>Place Net Mold into the container very slowly. Several Net Mold can be cultured in one container. 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>10cm Dish may hold up to 5 Net Molds. デイッシュを使う場合は、5 個まで同時投入が可能。</p>



Incubate in Incubator on Shaker. Rotary or See-Saw. Approximately 45 rpm.

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。

4.Remove Net ネットモールドからの抜去

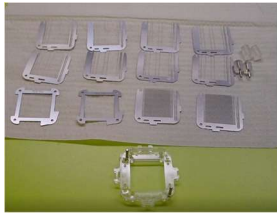
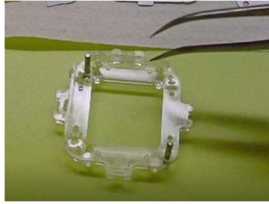
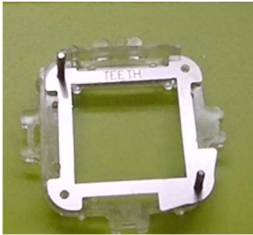


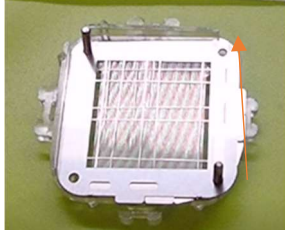

	<p>After a couple of weeks culture, Spheroids fuse together and become Cell Block. Secreted ECM cover may whole molds. 数週間の培養後、スフェロイドが融合し細胞ブロックに。産出された ECM がネット全体を覆っている。</p>
	<p>Hold Base using holding hole, remove tube and then stopper. ベースの保持穴を使って保持しながらチューブ、ストッパーの順で取り外す。</p>
	<p>Slide out Top Net slowly. Cell may be stucked firmly. Move net back and forth slowly. 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>Remove Lock Plate ロックプレートを取り外す。</p>
	<p>Remove all Side Nets. サイドネットを全て抜き取る。</p>

	<p>All Side Nets are removed. 全てのサイドネットを抜去。</p>
	<p>Remove Top Net トップネットを取り外す。</p>
	<p>Hold with Tweezer, and remove cell block slowly. 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>
	<p>Cell Block right after the removal. 抜去後の細胞ブロック。</p>

5. Cleaning 洗浄

<p>Net Mold ネットモールド</p>	
	<p>Wash bash with brush and natural detergent. ベースを歯ブラシなどで、中性洗剤で洗浄。</p>
	<p>Set net on Wash Base ウオッシュベースにネットをセット。</p>
	<p>Use soft brush and wash only one way! 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>Dry well よく乾燥させる。</p>
<p>Dimple Plate ディンプルプレート</p>	
	<p>Wash with soft brush and natural detergent. 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>Use Alkaline Detergent (SCAT 20X-AB) or similar. (soak in x10 diluted detergent >2hour) 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>Wash well and dry. 再度 洗浄し、乾燥させて保管。</p>

6. Assemble Net Mold ネットモールドの組立

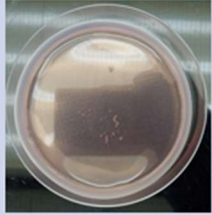
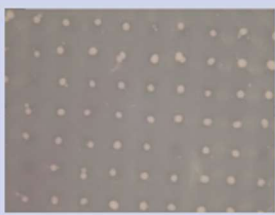
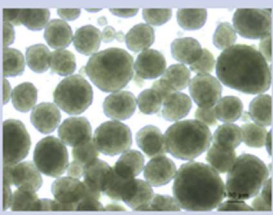


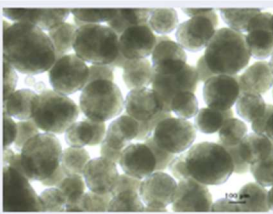


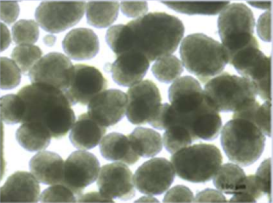
	<p>Prepare necessary number of Nets. 必要な枚数のネットを準備</p>
	<p>Place the base at home position. (wall at top & Left) ベースをホームポジション（壁が左&上）に。</p>
	<p>Install Lock plate Teeth engraving face up and top. ロックプレートの“Teeth”が上部（歯が上向き）&上になるように設置。</p>
	<p>Place Top Net. Opening to the top so that net interlock with teeth. 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>Place Side Net at 90 deg. rotated angel. 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>Place next side net at 90 deg. rotated angel. Repeat all side nets. 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>Place Top Net. Opening to the left. トップネットを設置。 開口部が左向きになるように。</p>

	<p>Install Lock Plate. Teeth engraving facing down and to the left. 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>
	<p>Install stopper and tube ストッパー、チューブ、を取り付けて完成。</p>
	<p>Autoclave. 滅菌。</p>


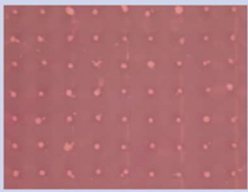
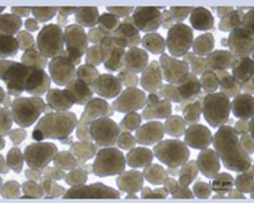


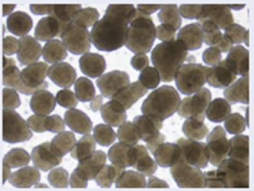


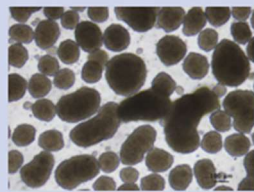
Technical Data 技術データ

Spheroid Preparation with Dimple Plate デインブ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			


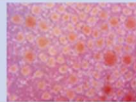

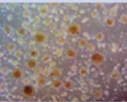

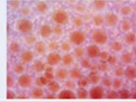

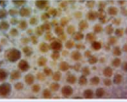

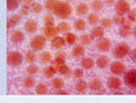

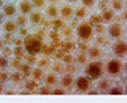
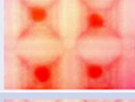
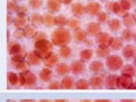

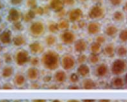

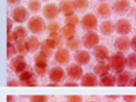

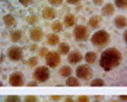
DP10-1 : Cell:NHDF, Medium:DMEM+ FBS10%, 37°C、CO2:5%, 24hour

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	