COSMO BIO CO., LTD.
Inspiration for Life Science

For research use only. Not for clinical diagnosis.

Macrokiller V300

Catalog No. MKV300

April 14, 2020

Introduction

Macrokiller V300 is liposomes containing clodronic acid, which has the cytocidal effect of macrophages (e.g. osteoclast and microglia). Due to the low cell permeability by itself, clodronic acid was contained into liposome to increase phagocytic efficiency of macrophages. In recent years, there are reports those macrophages play roles in many kind of diseases such as allergy, Alzheimer's disease and cancer, furthermore, in tissue regeneration. Macrokiller V300 will be a useful tool for researching these diseases by inhibiting macrophage activity.

Components

Description	Amount	Quantity	Storage Conditions	Stability
Macrokiller V300	1 mL/vial	1 vial	4°C	1 year
Empty liposomes for control				

***Shipping: 4°C**

Specifications

Concentration of clodronic acid	10 mg/mL (40.8 mmol/L)
Molecular Mass of clodronic acid	244.89
Average particle size	300 nm

Notice

1. **Avoid oxidization of liposomes (i.e. Tightly close the vial cap each time opened.)**
2. **Do NOT freeze. The freezing process destroys liposome structure.**
3. **Microscopic observation of cells will NOT be possible due to resulting cloudiness by the addition of liposomes,**

Protocol (Application Example)

A) For the primary rat microglia
   1) Culture primary rat microglia as 1×10^3 cells/well in 96 well plate.
   2) Incubate for 24 hours at CO_2 5%, 37°C.
   3) After removing supernatant, add 0.3, 1.0, 2.0 mM clodronic acid (make Macrokiller V300 in culture medium to 1/136, 1/41, 1/20 dilutions respectively). Add empty liposomes as a control in the same manner.
   4) Incubate for 1 hour at CO_2 5%, 37°C.
   5) After removing supernatant, add 200 µL culture medium heated to 37°C. Repeat supernatant removal.
   6) After adding 100 µL culture medium heated to 37°C, incubate for 48 hours at CO_2 5%, 37°C.
   7) Measure cell viability by the XTT assay (See example of results shown in figure 1.).

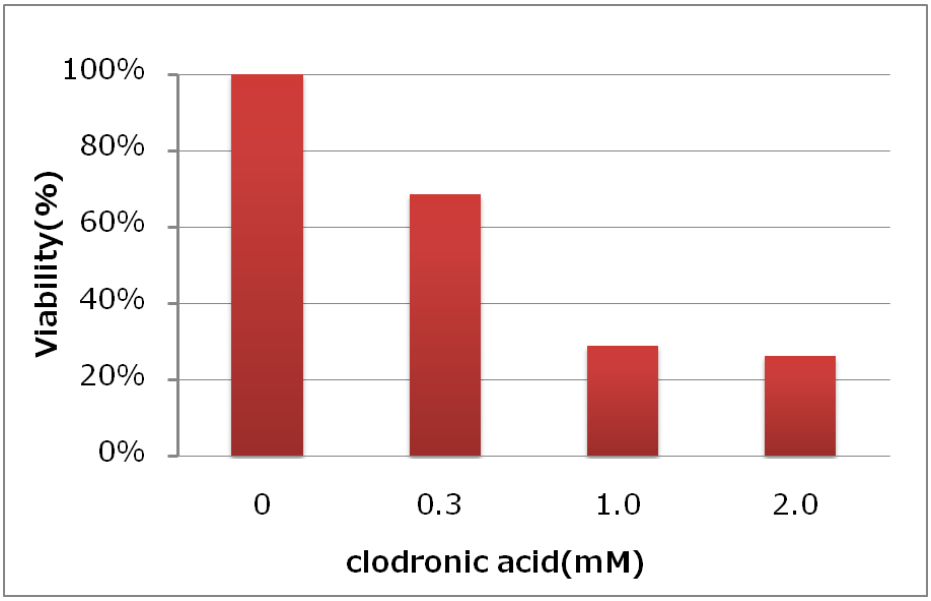


Figure 1 Cytocidal effect of Macrokiller V300 against primary rat microglia.
Dose-dependent cytocidal effect of Macrokiller V300 against primary rat microglia.
A cell viability determined by the XTT assay after 48 hours treated with Macrokiller V300.

B) For the primary rat visceral adipocyte

1) Culture visceral adipocyte as 7.5×10^4 cells/well in 48 well plate.
2) Incubate for 9 days at CO_2 5%, 37°C.
3) After removing supernatant, add 1.0 mM clodronic acid (make Macrokiller V300 in culture medium to 1/41 dilution). Add empty liposomes as a control in the same manner.
4) Incubate for 1 hour at CO_2 5%, 37°C.
5) After removing supernatant, add 500 µL culture medium heated to 37°C. Repeat supernatant removal.
6) Add 500 µL culture medium heated to 37°C and incubate for 48 hours at CO_2 5%, 37°C.
7) Add 100 ng/mL Lipopolysaccharide (LPS) into appropriate wells (See Table 1.).
8) After adding LPS, incubate for 48 hours at CO_2 5%, 37°C.
9) Remove supernatant prior to extraction of cellular TotalRNA.
10) Perform gene expression analysis (See example of results shown in figure 2.).

Table 1 Assay Example (48 well plate)

Control	-Macrokiller V300		+Macrokiller V300				
	-LPS	+LPS	-LPS	+LPS			

: Wells seeding primary rat visceral adipocyte cells

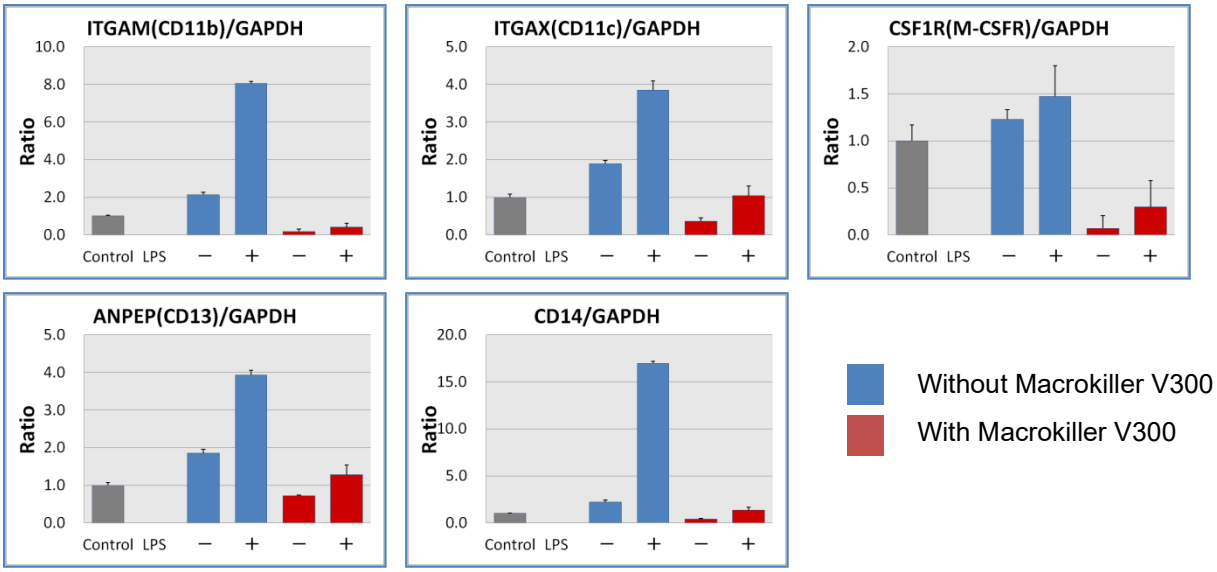


Figure 2 Selective elimination of adipose tissue macrophages from primary rat visceral adipocyte culture. Macrokiller V300 selectively decreases relative mRNA levels of macrophage marker genes

COSMO BIO CO., LTD.

【JAPAN】
TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,
KOTO-KU. TOKYO 135-0016, JAPAN
Phone: +81-3-5632-9610
FAX: +81-3-5632-9619
URL: https://www.cosmobio.co.jp/

COSMO BIO USA

【Outside Japan】
2792 Loker Ave West, Suite 101
Carlsbad, CA 92010, USA
email: info@cosmobiousa.com
Phone/FAX: (+1) 760-431-4600
URL: www.cosmobiousa.com

For research use only. Not for clinical diagnosis.

一般研究用試薬

マクロキラーV300

【MacrokillerV300, Code No. MKV300 】

2022 年 10 月 5 日改訂

※本マニュアルをご精読の上、研究目的にのみご使用ください。

本試薬は、クロドロン酸を内包したリポソームで、破骨細胞・ミクログリア等のマクロファージへの殺細胞効果を示します。クロドロン酸単剤では細胞透過率が低いため、リポソームに内包することでマクロファージ貪食効率を促進させました。近年、癌、アルツハイマー、アレルギーなど多くの疾患、さらには組織再生におけるマクロファージの関与が報告されており、マクロキラーV300 をそれらの疾患研究ツールとしてご活用ください。

《Ⅰ-1. 商品構成》

商品構成	容　量	本　数	輸送温度	保存温度
マクロキラーV300 MacrokillerV300	1mL	1 本	冷蔵	冷蔵（4℃）
コントロール用空リポソーム Empty liposomes for control	1mL	1 本		

《Ⅰ-2. 商品仕様》

クロドロン酸濃度：10mg/mL
クロドロン酸分子量：244.89
クロドロン酸モル濃度：40.8mM
平均粒子径：300nm

《Ⅰ-3. 注意事項》

・リポソームの酸化を防ぐために容器の蓋をしっかりと閉めて保管してください。
・リポソームは凍結により、形態が壊れる可能性がありますので、凍結を避けて保管してください。
・リポソームを添加すると、リポソームにより白濁してしまうため、細胞の観察は困難となります。

《Ⅱ-1. 試験方法実施例－初代ミクログリアー》

1. 96well plate に初代ミクログリアを 1×10^3 cells/well で播種する。

2. CO_2 インキュベーターで 24 時間培養する。

3. 上清を除去し、各 well にマクロキラーV300 をクロドロン酸濃度として、0.3，1.0、2.0mM（マクロキラーを培地で 136 倍、41 倍、20 倍希釈）で添加する。Control にはコントロール用空リポソームを添加する。

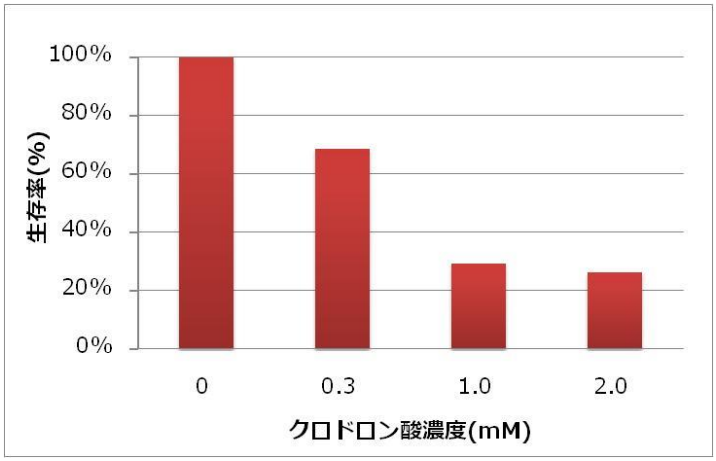
4. CO_2 インキュベーターで 1 時間培養する。

5. 培養後、上清を除去し、37℃に温めた培養用のメディウムを 200μL を加える。再度、上清を除去する。

6. 37℃に温めた培養用メディウムを 100μL 加え、CO_2 インキュベーターで 48 時間培養する。

7. XTT assay 法にて生存率を測定する（結果の例を図 1 に示す）。

図１．初代ミクログリアに対するマクロキラーV300 の殺細胞効果



《Ⅱ-2. 試験方法実施例－内臓脂肪細胞－》

1. 48well plate に内臓脂肪細胞を 7.5×10^4cells/well で播種する。

2. CO_2インキュベーターで 9 日間培養する。

3. 上清を除去し、各 well にマクロキラーV300 をクロドロン酸濃度として、1.0mM（マクロキラーを培地で 41 倍希釈）で添加する。Control にはコントロール用空リポソームを添加する。

4. CO_2インキュベーターで 1 時間培養する。

5. 培養後、上清を除去し、37℃に温めた培養用のメディウムを 500μL を加える。再度、上清を除去する。

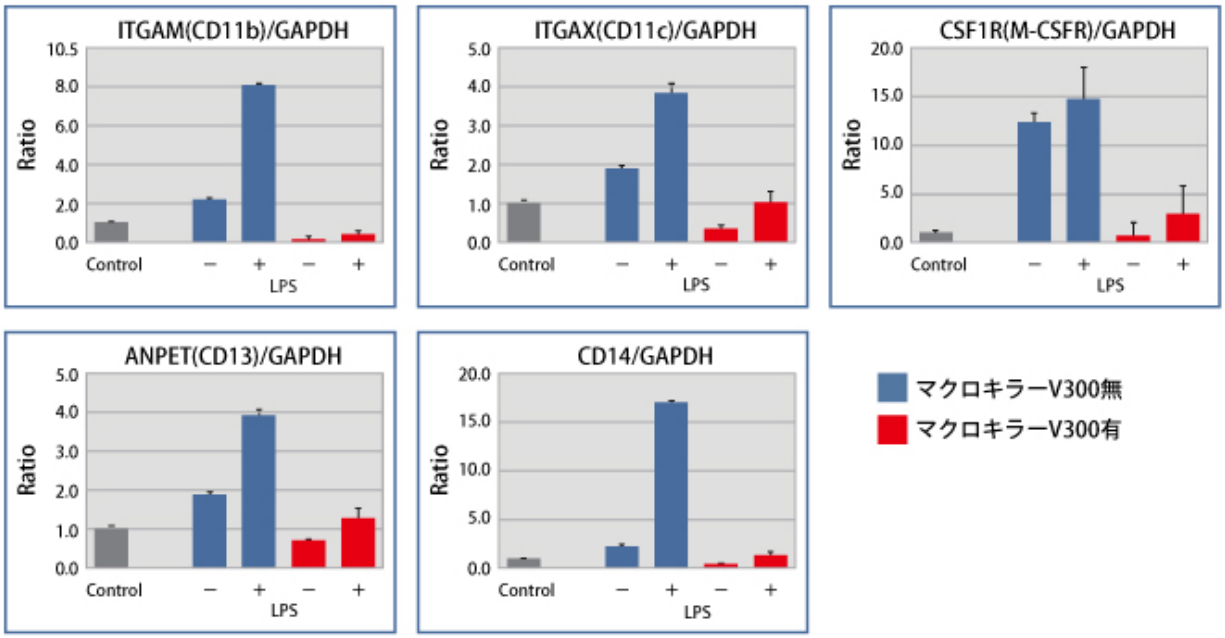
6. 37℃に温めた培養用メディウムを 500μL 加え、CO_2インキュベーターで 48 時間培養する。

7. 一部の well に LPS を 100ng/mL で添加する。

8. LPS 添加後、CO_2インキュベーターで 48 時間培養する。

9. 上清を除去し、細胞を TRIzol®で溶解し、RNA 抽出後、遺伝子発現解析を行う（結果の例を図 2 に示す）。

図 2.　マクロキラーV300 による内臓脂肪細胞・マクロファージ共培養系における遺伝子発現の変化



《Ⅲ. 関連製品》

表に記載した培養細胞は一部になります。詳しくはweb からご覧ください。

品 名	商品コード	キット構成
初代ミクログリア培養キット(SD ラット)	MGSD	ミクログリアを含む混合培養系:75cm^{2}フラスコ×2 枚 初代ミクログリア用メディウム:250mL×1 本
内臓脂肪細胞培養キット	VACH2	内臓脂肪前駆細胞(凍結細胞):1.5x10^{6}cells/tube×2 本 内臓脂肪分化メディウム ver.1(凍結):250mL×1 本

《本製品をご利用になられた文献、発表データ 》

本製品をご利用いただいて投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付先：〒047-0261　北海道小樽市銭函 3 丁目 513 番 2
コスモ・バイオ株式会社　札幌事業部　あて郵送
または　primarycell@cosmobio.co.jp　あて PDF ファイル送信

コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

〒135-0016　東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : http://www.cosmobio.co.jp/

● 営業部（お問い合わせ）
TEL：(03) 5632-9610　FAX：(03) 5632-9619
TEL：(03) 5632-9620

● 札幌事業部（技術的なお問い合わせ）
TEL：(0134) 61-2301　FAX：(0134) 61-2295
E-mail : primarycell@cosmobio.co.jp