

## 产品手册

H\_IL1RAP IL1R1 KO Reporter HEK-293 Cell Line

H\_IL1RAP IL1R1 KO Reporter HEK-293 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.1

## 目录

|         |                         |   |
|---------|-------------------------|---|
| 一、      | 产品基本信息及组分 .....         | 3 |
| 二、      | 包装、运输及储存 .....          | 3 |
| 三、      | 材料准备 .....              | 3 |
| 1.      | 细胞培养、冻存、复苏试剂准备 .....    | 3 |
| 2.      | 试剂耗材准备 .....            | 3 |
| 四、      | 细胞复苏、传代、冻存 .....        | 4 |
| 1)      | 细胞复苏 .....              | 4 |
| 2)      | 细胞传代（以 10 cm 皿为例） ..... | 4 |
| 3)      | 细胞冻存 .....              | 4 |
| 附录 1    | IL1RAP 测序验证结果 .....     | 5 |
| 附录 2    | 功能验证结果 .....            | 6 |
| 附录 3    | 流式验证结果 .....            | 7 |
| 相关产品：   | .....                   | 7 |
| 使用许可协议： | .....                   | 8 |

## 一、产品基本信息及组分

### 基本信息

| 产品编号      | 产品名称                                         | 规格           |
|-----------|----------------------------------------------|--------------|
| GM-C44839 | H_IL1RAP IL1R1 KO Reporter HEK-293 Cell Line | 5E6 Cells/mL |

### 组成成分

| 产品编号      | 产品名称                                         | 规格           | 数量  | 储存     |
|-----------|----------------------------------------------|--------------|-----|--------|
| GM-C44839 | H_IL1RAP IL1R1 KO Reporter HEK-293 Cell Line | 5E6 Cells/mL | 1 管 | -196°C |

## 二、包装、运输及储存

1. 细胞系产品干冰运输，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
2. 接触产品请带手套。请收到产品立即确认产品是否为冻存状态，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
3. 本产品相关实验，应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

## 三、材料准备

### 1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备

|          |                                         |
|----------|-----------------------------------------|
| 细胞复苏培养基: | DMEM+10% FBS+1% P.S                     |
| 细胞生长培养基: | DMEM+10% FBS+1% P.S+4 µg/mL Blasticidin |
| 细胞冻存液:   | 90% FBS+10% DMSO                        |

### 2. 试剂耗材准备

#### 试剂准备

| Reagent                                      | Specification | Manufacturer/Catalogue No. |
|----------------------------------------------|---------------|----------------------------|
| DMEM                                         | 500 mL        | Gibco/C11995500BT          |
| Fetal Bovine Serum                           | 500 mL        | ExCell/FSP500              |
| Pen/Strep                                    | 100 mL        | Thermo/15140-122           |
| Blasticidin                                  | 10 mg         | Genomeditech/GM-040404-1   |
| Human IL-1 alpha Protein; His Tag            | /             | Genomeditech/GM-88245RP    |
| Human IL-1 beta Protein; His Tag             | /             | Genomeditech/GM-88248RP    |
| Anti-IL1RAP hIgG1 Antibody (48D2_VH5.GL_VL4) |               | Genomeditech/GM-88388AB    |

#### 重要仪器

|       |                                    |
|-------|------------------------------------|
| 细胞计数仪 | ThermoFisher Scientific/Countess 3 |
| 流式细胞仪 | 安捷伦科技（中国）有限公司/2060R                |

## 四、 细胞复苏、传代、冻存

### 1) 细胞复苏

注：为确保最高存活率，应在收到冻存细胞后立即解冻并复苏培养。如果在收到细胞后需要继续储存，将其置于液氮罐中，严禁储存在 $-70^{\circ}\text{C}$ ，因为在 $-70^{\circ}\text{C}$ 下储存会导致活性丧失。

- 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅预热复苏培养基，加入预热后的复苏培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下轻轻摇动解冻，直到刚刚融化（通常 2-3 分钟）。
- 用 70%乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到步骤 a) 的离心管中，轻轻混匀，176  $\times$  g，离心 5 min，使细胞沉淀，弃上清。
- 使用 1 mL 复苏培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，活细胞  $\geq 3 \times 10^6$  cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到  $2-3 \times 10^5$  cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养皿中。

### 3) 细胞冻存

- 使用 176  $\times$  g，3 min 离心收集细胞。
- 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为  $5 \times 10^6$  cells/mL，每管 1 mL 分装到细胞冻存管中。
- 拧紧盖子，适当标记后，将冻存管置于梯度降温盒中， $-80^{\circ}\text{C}$ 下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

### 2) 细胞传代（以 10 cm 皿为例）

注：细胞复苏后的 1 至 2 代，使用复苏培养基，待细胞状态稳定后，再更换为含有抗生素的生长培养基。

- 细胞为上皮细胞，贴壁生长。培养箱中孵育 16-24 h 后，镜下观察细胞贴壁情况，当细胞密度达到 80%，需要进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，3 天传代。注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- 将皿或培养瓶中的培养液弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
- 弃 PBS，加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 消化液，37 $^{\circ}\text{C}$  消化 30-60 s，显微镜下观察。
- 待细胞变圆，细胞间隙明显，部分细胞刚开始脱离瓶壁时，加 2 mL 左右生长培养基混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，176  $\times$  g 室温离心 3 min。
- 弃上清，细胞沉淀用生长培养基重悬，根据传代前细胞密度分盘（根据培养皿面积和细胞密度计算，传代后细胞密度为 30-40%）。

注意事项：

- 细胞刚复苏，会有一定比例的死细胞，属于正常现象，经调整会有明显好转，状态稳定后，传代后死细胞会变少，细胞生长速度趋于稳定。
- 注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- FBS 需 56 $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 分钟，可热灭活补体和部分病毒，但不显著影响大多数生长因子和细胞因子活性。

## 附录 1 IL1RAP 测序验证结果



Fig 1. The Sanger sequencing of the H\_IL1RAP IL1R1 KO Reporter HEK-293 Cell Line (Cat. GM-C44839) showed successful knockout of IL1RAP.

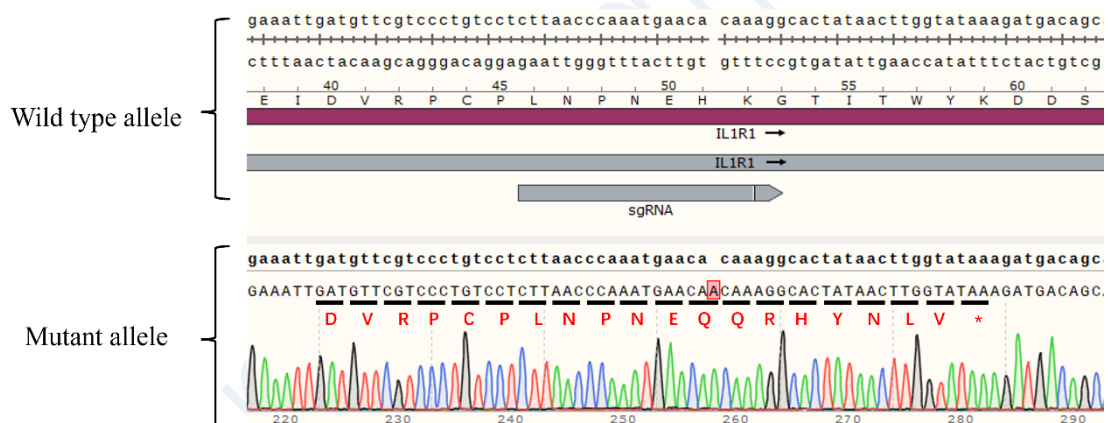


Fig 2. The Sanger sequencing of the H\_IL1RAP IL1R1 KO Reporter HEK-293 Cell Line (Cat. GM-C44839) showed successful knockout of IL1R1.

## 附录 2 功能验证结果

Activation and validation of four cell lines stimulated with 500 ng/mL Human IL-1 alpha Protein; His Tag.

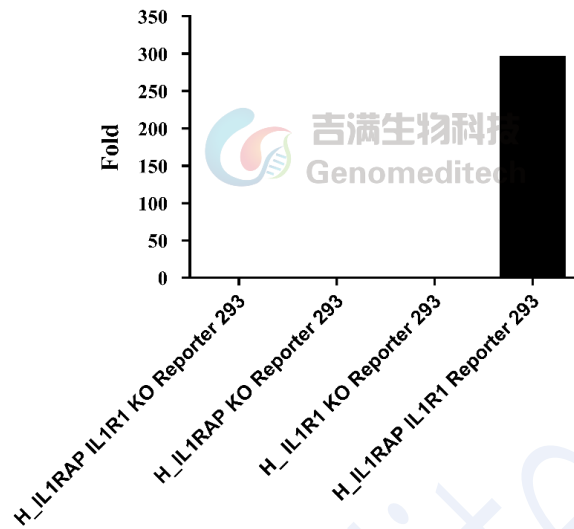


Fig 3. Response to IL-1 alpha Protein. The H\_IL1RAP IL1R1 KO Reporter 293 (Cat. GM-C44839) (IL1RAP/IL1R1 double KO), H\_IL1RAP KO Reporter 293(double KO + IL1R1 rescue), H\_IL1R1 KO Reporter 293(double KO + IL1RAP rescue), and H\_IL1RAP IL1R1 Reporter 293(double KO + IL1RAP/IL1R1 rescue) at a concentration of  $1.5 \times 10^4$  cells/well (96-well format) were stimulated with 500 ng/mL Human IL-1 alpha Protein (Cat.GM-88245RP) in assay buffer for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit. Only the cell line co-expressing both IL1RAP and IL1R1 (the H\_IL1RAP IL1R1 Reporter) exhibited significant activation, whereas the single-reconstituted lines (IL1RAP KO or IL1R1 KO) showed no response, confirming that intact IL-1 signaling requires both receptor components.

Activation and validation of four cell lines stimulated with 15 ng/mL Human IL-1 beta Protein; His Tag.

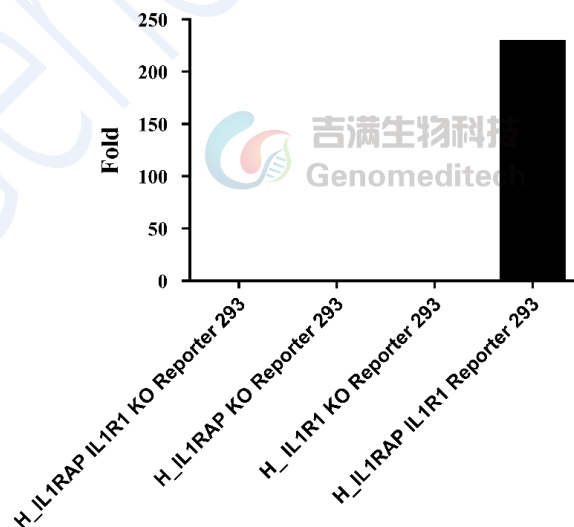


Fig 4. Response to IL-1 beta Protein. The H\_IL1RAP IL1R1 KO Reporter 293 (Cat. GM-C44839) (IL1RAP/IL1R1 double KO), H\_IL1RAP KO Reporter 293(double KO + IL1R1 rescue), H\_IL1R1 KO Reporter 293(double KO + IL1RAP rescue), and H\_IL1RAP IL1R1 Reporter 293(double KO + IL1RAP/IL1R1 rescue) at a concentration of  $1.5 \times 10^4$  cells/well (96-well format) were stimulated with 15 ng/mL Human IL-1 beta Protein

(Cat.GM-88248RP) in assay buffer for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit. Only the cell line co-expressing both IL1RAP and IL1R1 (the H\_IL1RAP IL1R1 Reporter) exhibited significant activation, whereas the single-reconstituted lines (IL1RAP KO or IL1R1 KO) showed no response, confirming that intact IL-1 signaling requires both receptor components.

### 附录 3 流式验证结果

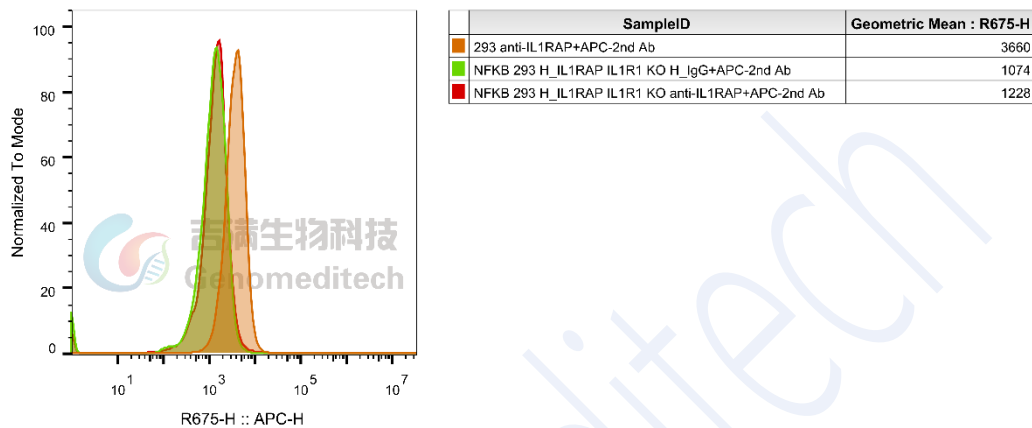


Fig 5. H\_IL1RAP IL1R1 KO Reporter HEK-293 Cell Line (Cat. GM-C44839) was determined by flow cytometry using Anti-IL1RAP hIgG1 Antibody (48D2\_VH5.GL\_VL4) (Cat. GM-88388AB).

### 相关产品:

| IL-1                                                  |                                                                 |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| H_IL1RAP KO HEK-293 Cell Line                         | H_IL-1 Reporter 293 Cell Line                                   |
| H_IL-1 Reporter 293 Cell Line (old version)           | Cynomolgus_IL-1R HEK-293 Cell Line                              |
| Cynomolgus_IL1RAP HEK-293 Cell Line                   | H_IL-1R CHO-K1 Cell Line                                        |
| H_IL-1R HEK-293 Cell Line                             | H_IL1RAP CHO-K1 Cell Line                                       |
| H_IL1RAP HEK-293 Cell Line                            | Membrane bound H_IL-1α CHO-K1 Cell Line                         |
| Membrane bound H_IL-1α HEK-293 Cell Line              | Membrane bound H_IL-1β CHO-K1 Cell Line                         |
| Membrane bound H_IL-1β HEK-293 Cell Line              | Mouse_IL1RAP HEK-293 Cell Line                                  |
| Rat_IL1RAP HEK-293 Cell Line                          |                                                                 |
| Anti-IL1B×IL1A hIgG1 Bispecific antibody(lutikizumab) | Anti-IL1R1 hIgG1 Antibody(AMG 108)                              |
| Anti-IL1RAP hIgG1 Antibody (Nadunolimab)              | Anti-IL-1β hIgG1 Antibody(Canakinumab)                          |
| Biotinylated Human IL-1 alpha Protein; His-Avi Tag    | Biotinylated Human IL-1 beta Protein; His-Avi Tag               |
| Cynomolgus IL-1 alpha Protein; His Tag                | Cynomolgus IL-1 beta Protein; His Tag                           |
| Human IL-1 alpha Protein; hFc Tag                     | Human IL-1 alpha Protein; His Tag                               |
| Human IL-1 beta Protein; hFc Tag                      | Human IL-1 beta Protein; His Tag                                |
| Human IL-1RAP Protein; His Tag                        | Human IL-1RI Protein; hFc Tag                                   |
| Human IL-1RI Protein; His Tag                         | Human IL-1RI&IL-1RAP Heterodimer Protein; hFc Tag (Goflikicept) |

## 使用许可协议：

凡购买及使用本细胞系产品，即表明使用者自愿接受并遵守以下相关使用政策：

- 本细胞系产品限于科研用途，不得被利用于任何商业用途。
- 本产品严禁用于人类或动物疾病诊治，也不得直接用于人体相关实验。
- 用户及为其利益服务的第三方承包商仅可在约定科研范围内使用本材料及其子代，不得进行修饰，亦不得向任何其他实体（包括关联机构）分发、销售、转让或以其他方式提供吉满生物材料。
- 如需将本产品用于本声明范围以外的用途，须事先获得吉满生物科技（上海）有限公司的书面许可，详情请联系吉满生物科技（上海）有限公司。