

ПРИЛОЖЕНИЯ

к статье А.С. Зуевой, А.И. Шевченко, С.П. Медведева, Е.А. Елисафенко, А.А. Слепцова, М.С. Назаренко, Н.А. Тмояна, С.М. Закияна, И.С. Захаровой «Изогенная линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi036-A-1 от пациента с семейной гиперхолестеринемией, созданная путем коррекции патогенного варианта гена *LDLR* с.530С>Т»

Таблица S1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Вид целевой последовательности	Локус	Размер продукта, п. н.	Прямой/обратный праймер (5'–3')
Анализ коррекции замены с.530С>Т	LDLR_18720F/	372	CTATAGAATGGGCTGGTGTGG/ CTTAGGCAGTGGAACCTCGAAGG
	LDLR_19091R		
Анализ коррекции замены с.1054Т>С	LDLR_24218F/	259	AGGGACCAACGAATGCTTGA/ GCAGGTGGAATCTCATGAAACCC
	LDLR_24476R		
Детекция эписомных векторов	<i>EBNA-1</i>	196	TCCCGCAGATCTTCCTGCTCCTGTTCCACCG/ CTCAAAGGATCCGGGGTGATAACCATGGACGA
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCT/ TGCACCATCTGCTACTCTGTAAACCTC
Референсный ген для количественной ОТ-ПЦР	<i>ACTB</i>	308	AGGCACCAGGGCGTGAT/ GATAGCACAGCCTGGATAGCA
	<i>B2M</i>	90	CACCCCACTGAAAAAGATG/ ATATTA AAAAGCAAGCAAGCAGAA
Маркеры плюрипотентности для количественной ОТ-ПЦР (RTqPCR)	<i>OCT4</i>	144	GGGAGATTGATAACTGGTGTGT/ GTGTATATCCCAGGGTGATCCTC
	<i>NANOG</i>	116	TTTGTGGGCCTGAAGAAAAC/ AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG
	<i>SOX2</i>	100	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAACCT

Таблица S2. Антитела, использованные в работе

Вид маркера	Антитело	Разведение	Производитель, каталожный номер	RRID
Маркеры плюрипотентности	Mouse IgG2b anti-OCT3/4	1:50	Santa Cruz Cat # sc-5279	RRID: AB_628051
	Rabbit IgG anti-NANOG	1:200	ReproCELL Cat # RCAB003P	RRID: AB_2714012
	Rabbit IgG anti-SOX2	1:400	Cell Signaling Cat # 2748	RRID: AB_823640
	Mouse IgG3 anti-SSEA4	1:200	Abcam Cat # ab16287	RRID: AB_778073
Маркеры дифференцированных производных	Mouse IgM anti-human PAX6	1:50	Santa Cruz Biotechnology Cat #sc-81649	RRID: AB_1127044
	Rabbit IgG anti-NF200	1:1000	Sigma Cat # N4142	RRID: AB_477272
	Mouse IgG2a anti- α SMA	1:100	Dako Cat # M0851	RRID: AB_2223500
	Mouse IgG1 anti-human CD90	1:100	eBioscience Cat # 14-0909-82	RRID: AB_763535
	Mouse IgG1 anti-CK18	1:100	Abcam Cat # ab668	RRID: AB_305647
Вторичные антитела	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific Cat #A11004	RRID: AB_2534072
	Goat anti-Mouse IgM Heavy Chain Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific Cat #A21043	RRID: AB_2535712
	Goat anti-Mouse IgG3 Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1:400	Thermo Fisher Scientific Cat #A21151	RRID: AB_2535784
	Goat anti-Mouse IgG1 Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific Cat #A21124	RRID: AB_2535766
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1:400	Thermo Fisher Scientific Cat #A11008	RRID: AB_143165

Таблица S3. Результаты анализа 26 локусов коротких tandemных повторов

Локус	Название линии ИПСК		
	ICGi036-A-1	ICGi036-A	Мононуклеарные клетки
AMEL	X,X	X,X	X,X
SRY	–	–	–
D3S1358	16,16	16,16	16,16
TH01	9,9,3	9,9,3	9,9,3
D12S391	20,24	20,24	20,24
D5S818	11,12	11,12	11,12
TPOX	11,11	11,11	11,11
Yindel	–	–	–
D2S441	11,11	11,11	11,11
D7S820	8,10	8,10	8,10
D13S317	8,9	8,9	8,9
FGA	21,21.2	21,21.2	21,21.2
D22S1045	11,15	11,15	11,15
D18S51	16,16	16,16	16,16
D16S539	11,12	11,12	11,12
D8S1179	13,15	13,15	13,15
CSF1PO	10,12	10,12	10,12
D6S1043	11,16	11,16	11,16
vWA	16,18	16,18	16,18
D21S11	29,31.2	29,31.2	29,31.2
SE33	19,28.2	19,28.2	19,28.2
D10S1248	14,17	14,17	14,17
D1S1656	15.3,17.3	15.3,17.3	15.3,17.3
D19S433	13,14	13,14	13,14
D2S1338	20,24	20,24	20,24
DYS391	–	–	–

Таблица S4. Паспорт клеточной линии ICGi036-A-1

Уникальный идентификатор	ICGi036-A-1
Альтернативное название линии	FH 1.3.1S_130S5
Учреждение	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия
Контактная информация для обращения по поводу клеточной линии	Ирина Захарова, zakharova@bionet.nsc.ru
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 32 Пол: женский Этническая принадлежность: неизвестно
Источник исходных клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Тип генетической модификации	Коррекция однонуклеотидной замены
Заболевание	OMIM 143890, семейная гиперхолестеринемия, тип IIa
Ген/локус, в котором произошла генетическая модификация	<i>LDLR</i> : c.530C>T (p.Ser177Leu), ClinVar ID 3686; rs121908026; OMIM:606945.0004
Метод внесения модификации/используемая сайт-специфическая нуклеаза	Системы редактирования оснований: xCas9(3.7)-ABE(7.10), addgene #108382; xCas9(3.7)-BE4, addgene #108381. Вектор, содержащий последовательности спейсера направляющей РНК, создан в рамках данной работы: pC9-sgRNA-mCherry. Программное обеспечение, используемое для выбора направляющих РНК, – PnB Designer (https://fgcz-shiny.uzh.ch/PnBDesigner/)
Способ доставки программируемых нуклеаз	Липофекция посредством Lipofectamine® 3000
Внесенный в клетки генетический материал	xCas9(3.7)-ABE(7.10) – плаزمида, содержащая аденин-дезаминазу и никазу xCas9n; xCas9(3.7)-BE4 – плазмида, содержащая цитозин-дезаминазу и никазу xCas9n; pC9-1054_2-mCherry, pC9-530-mCherry – плазмиды со встроенной последовательностью спейсера направляющей РНК
Метод анализа внесенной модификации	ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру участка 4-го экзона гена <i>LDLR</i>
Способ оценки нецелевой активности	Предсказание сайтов программой PnB Designer (https://fgcz-shiny.uzh.ch/PnBDesigner/)
Морфология	Колонии округлой формы, растущие монослоем, с четкими краями, по форме соответствующие плюрипотентным стволовым клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тесте на образование производных трех зародышевых листков в результате спонтанной дифференцировки
Кариотип	46,XX
Детекция контаминации	Бактерии, грибы, микоплазма не обнаружены
Область применения	Изучение влияния патогенного генетического варианта на свойства релевантных дифференцированных производных; исследование вклада оставшейся нескорректированной вероятно патогенной замены; создание системы изогенных клеточных линий для разработки тест-систем потенциальных лекарственных препаратов для лечения СГХС
Система культивирования	На основе эмбриональных фибробластов мыши
Среда культивирования	На основе среды DMEM/F12 и заменителя сыворотки KnockOut SR
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	Атмосферная (около 21 %)
Способ пересева	Рекомбинантный фермент TrypLE™ Express (ThermoFisher Scientific)
Кратность пересева	1:10
Криоконсервация	90 % FBS, 10 % DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi036-A-1
Дата паспортизации/депонирования	03.04.2024