

ПРИЛОЖЕНИЕ

к статье «Получение линий ИПСК RCPMi014-A и RCPMi014-B из Т-лимфоцитов здорового донора и верификация их моноклонального происхождения по V(D)J-перестройкам генов TCR»
Д.К. Шерман, М.Е. Богомякова, Э.А. Кастуева, И.В. Звягин, В.К. Руппель, Е.В. Барсова, А.Ю. Горбачев, Н.А. Кулемин, А.А. Баринаова, Е.А. Зеркаленкова, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова

Таблица S1. Праймеры, использованные в работе

Использование	Ген/локус	Размер продукта, п.н.	Прямой/обратный праймер (5'-3')
Анализ интеграции трансгенных конструкций	OCT3/4	106	CCCTGTCTCTGTCACCA/ CTCCACACCAGCCACCACCTTC
	KLF4	131	ATGCGACCCGAGCATTTC/CC/ CACACCAGCCACCACCTTC
	SOX2	107	CATGTCCCAGCACTACCAGAG/ TTTGTTTGACAGGAGCGACAAT
	LIN28	113	AGAAATCCACAGCCCTACCC/ CACACCAGCCACCACCTTC
	MYC	122	GGCTGAGAAGAGGATGGCTAC/ TTTGTTTGACAGGAGCGACAAT
	mp53DD	236	CGTAAACGCTTCGAGATGTTCC/ CACACCAGCCACCACCTTC
	EBNA1	122	CGGGGTAGAGGACGTGAAAG/ GGAGACCCGGATGATGATGAC
	B2M	105	AGATGAGTATGCCTGCCGTGTG/ GCGGCATCTTCAAACCTCCA
Референсный ген (ОТ-ПЦР)	GAPDH	402	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA/ TTCACACCCATGACGAACAT
Маркеры плюрипотентности (ОТ-ПЦР)	OCT3/4	887	CCTTCGCAAGCCCTCATTTCGCA/ AGTTTGAGCATCCCTCGC
	DPPA-5	313	AAGATGGGAAGTCTCCCGGC/ GCAAGTTTGAGCATCCCTCGC
	SALL-4	303	TGGCGGAGAGGGCAAATAAC/ ATGCTGAAGAAGTCCGCACA
Тест на микоплазменную инфекцию	16S rRNA	750	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA/ TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC

Таблица S2. Антитела, использованные в работе

Антитела	Разведение ИЦХ/ проточная цитометрия	Производитель, кат №	RRID
Первичные антитела			
Маркеры плюрипотентности			
Mouse IgG2b anti-OCT4	1:500/1:50	Abcam, #ab184665	RRID:AB_2895225
Mouse IgG3 anti-SSEA4	1:50/1:25	DSHB, #MC-813-70	RRID:AB_528477
Mouse IgM anti-TRA-1-81	1:500/1:50	Santa Cruz, #sc-21706	RRID:AB_628386
Rabbit IgG anti-SOX2	1:200	ABClonal, #A6181	RRID:AB_2766792
Мезодермальный маркер			
Mouse IgG2a anti-Troponin T	1:1000	Hytest, 4T19cc	RRID:AB_2889124
Эндодермальный маркер			
Rabbit IgG anti- HNF4-α	1:100	Abcam, #ab92378	RRID:AB_10562973
Mouse IgG2a PerCP/ Cyanine5.5 anti-human CD184 (CXCR4)	1:33	Sony, #2132575	RRID:AB_3714757
Эктодермальный маркер			
Mouse IgG1 anti Cytokeratin Pan	1:100	PrimeBioMed, #10-310015-01	RRID:AB_3097853
Вторичные антитела			
Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor Plus 555	1:1000	Thermo Fisher Scientific, #A32732	RRID:AB_2633281
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488	1:1000	Thermo Fischer Scientific, #A-11001	RRID:AB_2534069

Таблица S3. Реконструкция репертуара альфа-, бета-, гамма- и дельта-цепей TCR в клонах ИПСК PBM022E5, PBM022E7, PBM022E9 и PBM022E14. Зеленым выделены V(D)J-перестройки, характерные для моноклональных линий, желтым – множественные перестройки, свидетельствующие о поликлональном происхождении линии и/или контаминации.

Лocus	Число прочтений	Доля прочтений от общего числа прочтений локуса	Нуклеотидная последовательность региона CDR3	V-сегмент	J-сегмент	Аминокислотная последовательность региона CDR3
PBM022E5						
TRAD	7 469	76,36%	TGTGCTGTGCAGGCAGTAGCAATAACAATGACATCGCCTTT	TRAV20	TRAJ43	CAVQAASNNNDMRF
	2 015	20,60%	TCCCGCTAGGGGAGGAGGTGCTGACGGACTCACCTTT	TRAV35	TRAJ45	SRLGEE ADGLTF
	41	0,42%	TGTGCTGTGCAGGCAGTAGCAATAACAATGGATCGCCTTT	TRAV20	TRAJ43	CAVQAASNNNGMRF
	34	0,35%	TGTGCTGTGCAGGCAGTAGCAATAACAATGACATCGCCTTT	TRAV20	TRAJ43	CAVRAASNNNDMRF
	33	0,34%	CGTGCTGTGCAGGCAGTAGCAATAACAATGACATCGCCTTT	TRAV20	TRAJ43	RAVQAASNNNDMRF
TRB	4 604	76,77%	TGTGCCAGCAGGACCCGGGACAGGGGGTCCACCCCTCACTTT	TRBV3-1	TRBJ1-6	CASRTGTGGSPHLF
	1 149	19,16%	TGTGCCACCAGTGATTTGTCCCGAGGGATGTGCTGCGTGGGAGAGACCCAGTACTTC	TRBV24-1	TRBJ2-5	CATSDLSRG_MSLGETQYF
	84	1,40%	TGTGCCAGCAGGACCCGGGACAGGGGGTCCACCCCTCACTTC	TRBV3-1	TRBJ1-6	CASRTGTGGSPHLF
	23	0,38%	TGTGCCAGCAGGACCCGGGACAGGGGGTCCACCCCTCACTTT	TRBV3-1	TRBJ1-6	CASRTGTGGPPLHF
	21	0,35%	TGTGCCAGCAGGACCCGGGACAGGGGGTCCACCCCTCACTTT	TRBV3-1	TRBJ1-6	CASRTGTGGSPHLF
TRG	31 927	59,94%	TGTGCCCGATCATAAGAACTCTTT	TRGV9	TRGJ2	CAPI_KKLF
	18 614	34,95%	TGTGCCACTGGGACAGGCTCTTTAAGAAGAACTCTTT	TRGV7	TRGJ2	CATWDRLSYKKLF
	245	0,46%	TGTGCCCGATCATAAGAACTCTTT	TRGV9	TRGJ2	CAPI_KKRF
	183	0,34%	TGTGCCCGATCATAAGAACTCTTT	TRGV9	TRGJ2	CAPI_KKLV
	175	0,33%	TGTGCCCGATCATAAGAACTCTTT	TRGV9	TRGJ2	CAPI_KKPF
PBM022E7						
TRAD	4 788	79,61%	TGTGCTTATATCAACTCAGGCGGATCTGAAAAGCTGGTCTTT	TRAV38-2DV8	TRAJ57	CAYINSG_GSEKLVF
	1 063	17,68%	TGTGCTACTGACGCTGGTGGTACTAGCTATGGAAGCTGACATTT	TRAV17	TRAJ52	CATDAGGTSYGLKTF
	49	0,81%	TGTGCTTATATCAACTCAGGCGGATCTGAAAAGCTGACATTT	TRAV38-2DV8	TRAJ57	CAYINSG_GSEKLVF
	28	0,47%	TGTGCTTATATCAACTCAGGCGGATCTGAAAAGCTGGTCTTT	TRAV38-2DV8	TRAJ57	CAYTNSG_GSEKLVF
	25	0,42%	TGTGCTTATATCAACTCAGGCGGATCTGAAAAGCTGGTCTTT	TRAV38-2DV8	TRAJ57	CAYINSG_GSERLVF
TRB	10 718	95,64%	TGCGCCAGCAGCAGGAAAGACAGCAACTGAAGCTTTCTTT	TRBV5-1	TRBJ1-1	CASSRKDSNTEAFF
	61	0,54%	TGCGCCAGCAGCAGGAAAGACAGCAACTGAAGCTTTCTTT	TRBV5-1	TRBJ1-1	CASSRKDSNTEAFF
	46	0,41%	TGCGCCAGCAGCAGGAAAGACAGCAACTGAAGCTTTCTTT	TRBV5-1	TRBJ1-1	CASSRKDSNTEAFF
	45	0,40%	TGCGCCAGCAGCAGGAAAGACAGCAACTGAAGCTTTCTTT	TRBV5-1	TRBJ1-1	CASSRKDSNTEAFF
	44	0,39%	TGCGCCAGCAGCAGGAAAGACAGCAACTGAAGCTTTCTTT	TRBV5-1	TRBJ1-1	CASSGKDSNTEAFF
TRG	39 408	85,85%	TGTGCCACTGGGACAGGCTGGTTTGCATAAAGAACTCTTT	TRGV3	TRGJ1	CATWDRL_LHKKLF
	3 447	7,51%	TGTGCTGCTGGGATTAACACTTTCTTT	TRGV10	TRGJ2	CAAWD_NLFF
	247	0,54%	TGTGCCACTGGGACAGGCTGGTTTGCATAAAGAACTCTTT	TRGV3	TRGJ1	CATWDRL_LHKKRF
	244	0,53%	TGTGCCACTGGGACAGGCTGGTTTGCATAAAGAACTCTTT	TRGV3	TRGJ1	CAAWDRL_LHKKLF
	207	0,45%	TGTGCCACTGGGACAGGCTGGTTTGCATAAAGAACTCTTT	TRGV3	TRGJ1	CATWDRL_LHKKPF
PBM022E9						
TRAD	4 328	70,32%	TGCTCTGTGGTGATATGGGATAGCAACTACAGTAACTCTGG	TRAV4	TRAJ33	CLVGDGMG_SNYQLIW
	907	14,74%	TGTGCAGCCCTTAAGGCTGGCAGTCTCTATTTT	TRAV13-1	TRAJ49	CAALKVWQYF
	745	12,10%	TGTGCAGCAAGTATAATGGAGGAAGCAAGGAAATCTCATCTTT	TRAV13-1	TRAJ42	CAASIME_SQGNLIF
	32	0,52%	TGCGCGTGGTGATATGGGATAGCAACTACAGTAACTCTGG	TRAV4	TRAJ33	CRVGDGMG_SNYQLIW
	23	0,37%	TGCTCTGTGGTGATATGGGATAGCAACTACAGTAACTCTGG	TRAV4	TRAJ33	CLVGDGMG_SNYQLIW
TRB	59 755	80,08%	TGTGCCAGCAGGCTCGATGATCAGCCAGCAGTATTT	TRBV2	TRBJ1-5	CASRLDDQAQHF
	10 621	14,23%	TGTGCCAGCAGCAGGAAAGACAGCAACTGAAGCTTTCTTT	TRBV6-5	TRBJ1-1	CASSTKD_VDTEAFF
	254	0,34%	TGTGCCAGCTCACCACCCGGGACGAATGATAGATACGCAGTATTT	TRBV18	TRBJ2-3	CASSPPGRMIDTQYF
	254	0,34%	TGGGCCAGCAGGCTCGATGATCAGCCAGCAGTATTT	TRBV2	TRBJ1-5	WASRLDDQAQHF
	245	0,33%	TGTGCCAGCAGGCTCGATGATCAGCCAGCAGTATTT	TRBV2	TRBJ1-5	CASRLDDQAQHF
TRG	14 902	75,65%	TGTGCCACTGGGATAGCTTTGCTGATTATAAGAACTCTTT	TRGV8	TRGJ2	CATWDSFADYKRLF
	2 979	15,12%	TGTGCTGCTGGGACTGGTAAGAACTCTTT	TRGV10	TRGJ1	CAAWD_GKKLF
	704	3,57%	TGTGCCACTGGGACGAAGGGGAACTCTTT	TRGV2	TRGJ2	CATWD_GKGLF
	122	0,62%	TGTGCCACTGGGATAGCTTTGCTGATTATAAGAACTCTTT	TRGV8	TRGJ2	CATWDSFADYKRRF
	102	0,52%	TGTGCCACTGGGATAGCTTTGCTGATTATAAGAACTCTTT	TRGV8	TRGJ2	CAAWDSFADYKRLF
PBM022E14						
TRAD	30 384	73,52%	TGTGCAGAGAACTCAGGAGGAAGCTACATACCTACATTT	TRAV13-2	TRAJ6	CAENQE_SYIPTF
	3 751	9,08%	TGCGCTGTGAATCACTATGCTCAGAATTTGTCTTT	TRAV1-1	TRAJ26	CAVNHYGQNFVF
	3 293	7,97%	TGTGCAGCCCTTAAGGCTGGCAGTCTCTATTTT	TRAV13-1	TRAJ49	CAALKVWQYF
	2 321	5,62%	TGTGCAGCAAGTATAATGGAGGAAGCAAGGAAATCTCATCTTT	TRAV13-1	TRAJ42	CAASIME_SQGNLIF
	141	0,34%	TGTGCAGAGAAAGCAGGAGGAAGCTACATACCTACATTT	TRAV13-2	TRAJ6	CAEKQE_SYIPTF
TRB	6 845	66,98%	TGCCAGCCTCTCAACCCGGGACAGAGGAAAGAACAGCCACCCACCCGGGAGCTGTTT	TRBV7-7	TRBJ2-2	CASTSQPQRKEQPPTGELFF
	1 622	15,87%	CGTGCCAGCAGCTTAAGCTCTGAGAGAACTCTCAAGAGACCCAGTACTTC	TRBV7-3	TRBJ2-5	RASSLSSE_ELQETQYF
	734	7,18%	TGTGCCAGCTCACCACCCGGGACGAATGATAGATACGCAGTATTTT	TRBV18	TRBJ2-3	CASSPPGRMIDTQYF
	397	3,88%	TGTGCCAGCAGGCTCGATGATCAGCCAGCAGTATTTT	TRBV2	TRBJ1-5	CASRLDDQAQHF
	71	0,69%	TGTGCCAGCAGCAGGAAAGCAAGGCTCAGACTGAAGCTTTCTTT	TRBV6-5	TRBJ1-1	CASSTKD_VDTEAFF
TRG	22 981	53,64%	TGTGCCACTGGGGGATTATAAGAACTCTTT	TRGV8	TRGJ2	CATWG_YKKLF
	14 698	34,31%	TGTGCCACTGGGGCCGAAGAAATTTATAAGAACTCTTT	TRGV5	TRGJ2	CATWGRKNYKRLF
	2 327	5,43%	TGTGCCACTGGGACGAAGGGGAACTCTTT	TRGV2	TRGJ2	CATWD_GKGLF
	251	0,59%	TGTGCCACTGGGGGATTATAAGAACTCTTT	TRGV8	TRGJ2	CATWG_YKRRF
	177	0,41%	TGTGCTGCTAAATATAAGAACTCTTT	TRGV10	TRGJ2	CAA*_KKLF

Символы "*" и "_" введены в аминокислотную последовательность CDR3 для обозначения нефункциональных цепей в результате формирования стоп-кодона или сдвига рамки считывания в ходе VDJ-рекомбинации, соответственно.

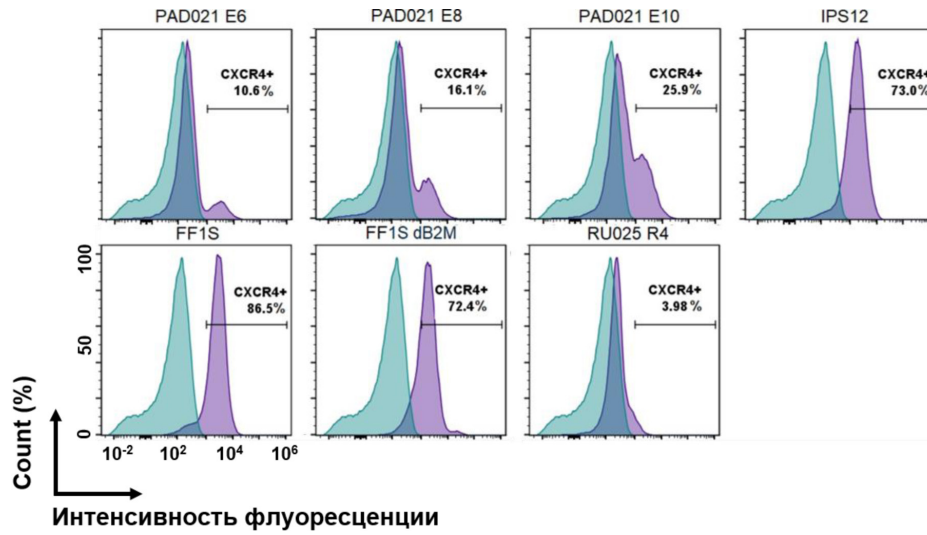


Рис. S1. Дифференцировочный потенциал разных линий ИПСК в definitivaльную эндодерму по маркеру CXCR4. Изотипический контроль (зеленый), окраска антителами (фиолетовый).