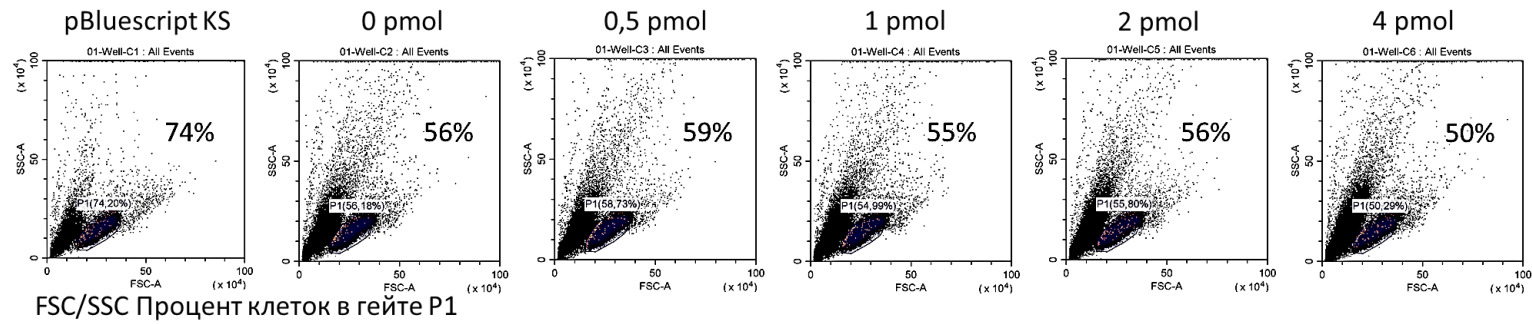


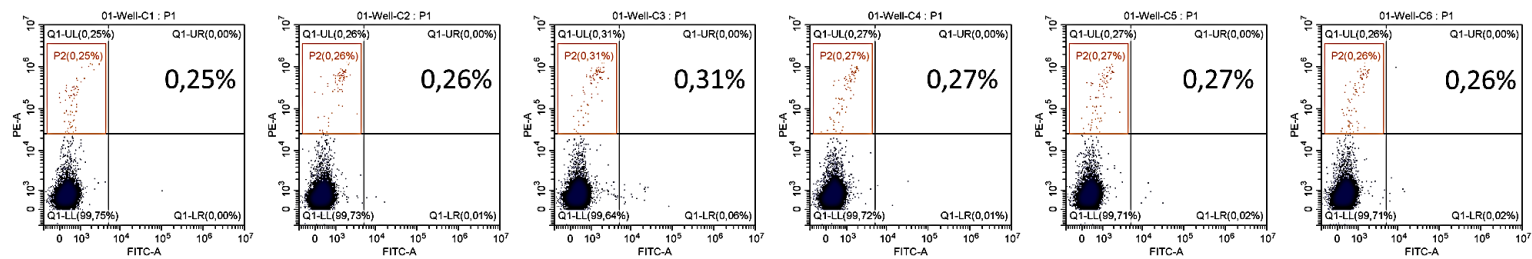
a

pcDNA-Cas9+pKSgRNA

pKS-don-X4



б



РЕ/ФИТС Процент клеток в гейте P2 (PI⁺)

В

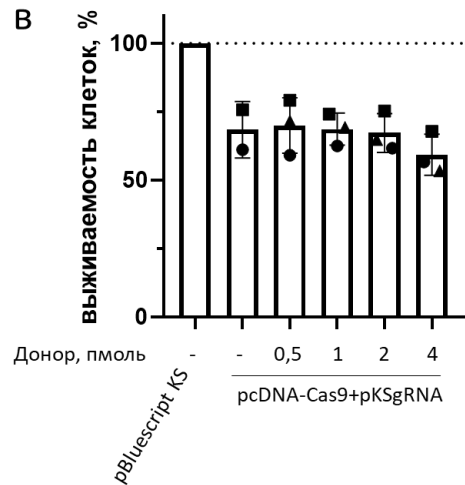


Рис. S1. Выживаемость клеток CEM/R5 после электропорации разным количеством донорной плазмиды. Клетки CEM/R5 электропорировали плазмидами, кодирующими Cas9 и gRNA, вместе с указанным количеством донорной ДНК или контрольной плазмидой pBluescript KS в количестве, равном сумме плазмид pcDNA-Cas9+pKSgRNA. Через 24 ч аликвоту клеток отмывали в PBS, смешивали с пропидием йодидом (PI) до конечной концентрации 1 мкг/мл и анализировали долю живых клеток с помощью проточной цитофлуориметрии. а – Распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию, б – оценка доли клеток, окрашенных PI (детекция в канале PE), для наглядности приведены дотплоты с распределением клеток по сигналу в каналах PE (PI) и FITC (пустой канал). в – Данные по выживаемости клеток по результатам трех экспериментов.

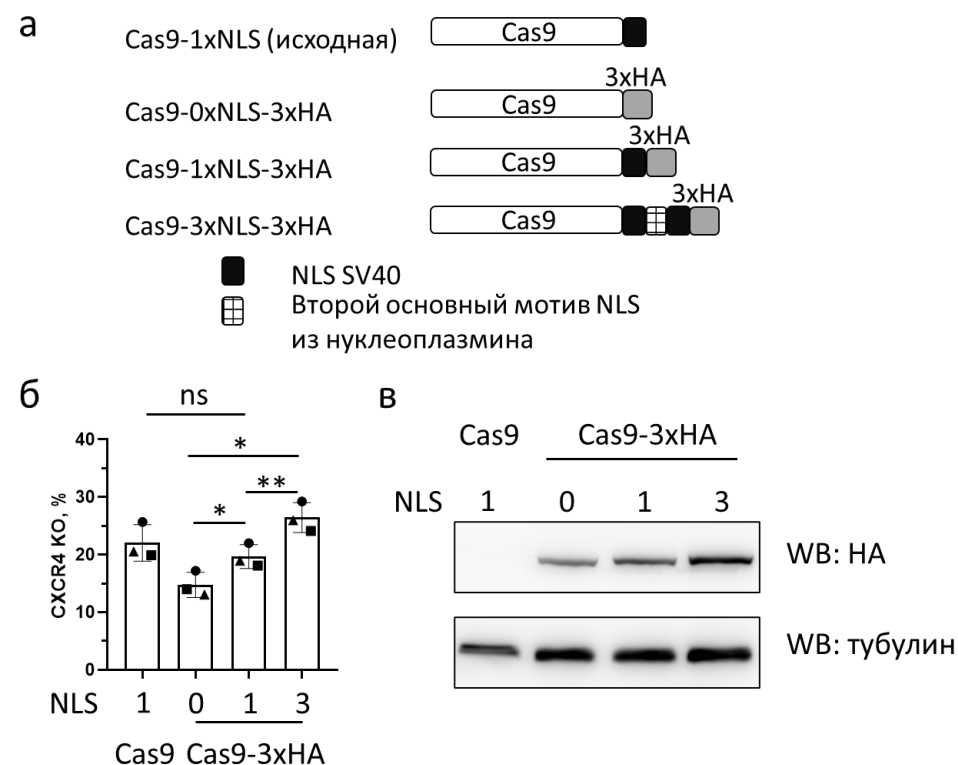


Рис. S2. Введение эпитопа 3xHA не влияет на уровень нокаута CXCR4 в Т клеточной линии CEM/R5. а – схемы конструкций: исходной, кодирующей Cas9 с 1xNLS(SV40), и трех полученных на ее основе конструкций, кодирующих Cas9 с 1xNLS и 3xNLS, а также дополнительной контрольной конструкции с 0xNLS. б – Уровень нокаута CXCR4 в клетках CEM/R5. Клетки CEM/R5 электропорировали одной из плазмид (а), кодирующих Cas9, и плазмидой,

кодирующей гидовую РНК. Через 5 сут клетки окрашивали антителами против CXCR4 и оценивали уровень нокаута с помощью проточной цитфлуориметрии. в – Уровень белка Cas9 с разным числом NLS в клетках 293Т, трансфицированных одной из конструкций (а) вместе с плазмидой рKS-gRNA-X4ex2. На следующий день после трансфекции клетки лизировали, белки лизатов разгоняли в 12% геле с помощью электрофореза в буферной системе Лэммли, затем белки переносили на PVDF мембрану, которую окрашивали на HA и α -тубулин.

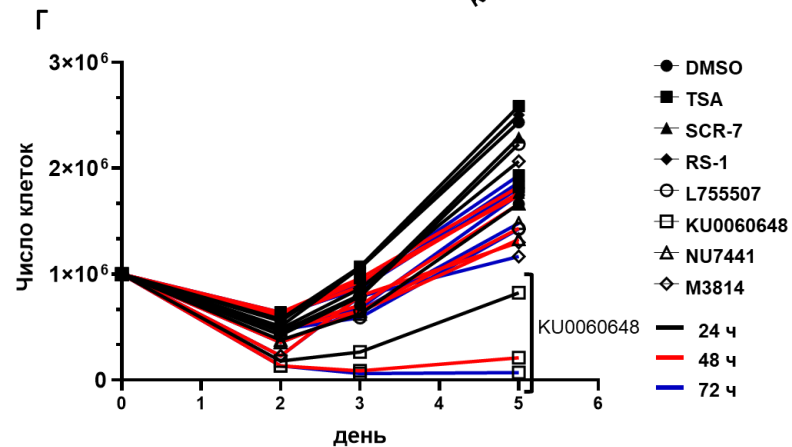
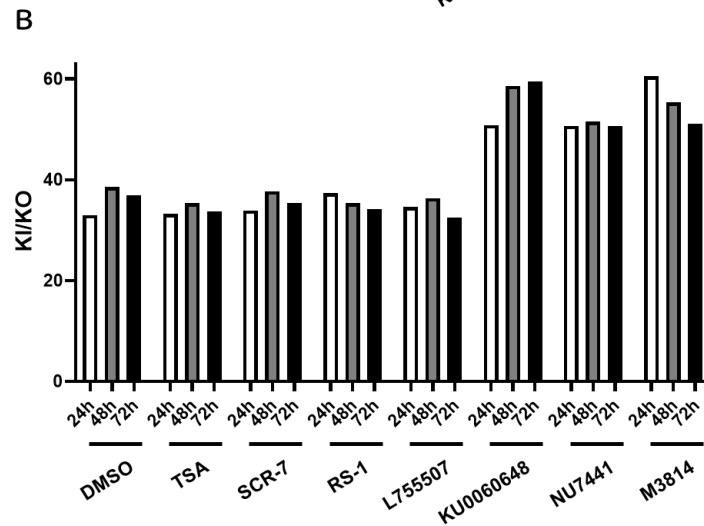
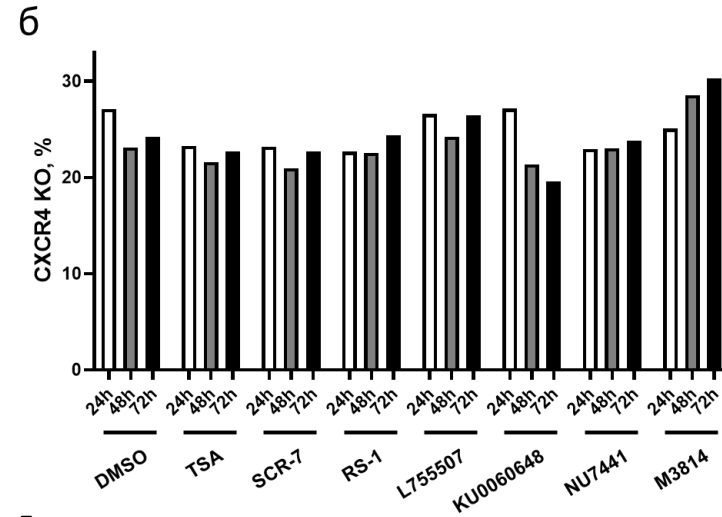
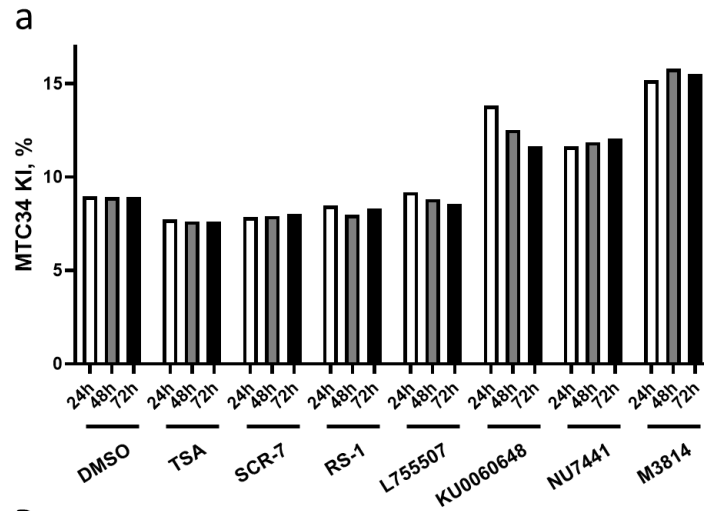


Рис. S3. Увеличение длительности инкубации клеток CEM/R5 с малыми молекулами, ингибиторами NHEJ и стимуляторами HDR, не позволяет повысить уровень нокина MT-C34. Уровень нокина MT-C34 (а), нокаута CXCR4 (б) и соотношение [нокин/нокаут] (в) в клетках CEM/R5. Клетки электропорировали плазмидами pcDNA3.3-hCas9, pKS-gRNA-X4 и pKS-don_MT-C34, через 24 ч, 48 ч или 72 ч среду меняли на свежую без малых молекул и на 5 сутки после электропорации оценивали уровень нокаута CXCR4 и нокина MT-C34 на поверхности клеток с помощью проточной цитофлуориметрии. KI/KO – соотношение нокина к нокауту. г – Влияние малых молекул на рост клеток.