

Приложение 1 | Supplementary material 1

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-159-170-annex1>

Последовательность 1. Кассета для экспрессии SMN. Кодировущая SMN последовательность выделена жирным шрифтом.

Sequence 1. SMN expression cassette. The SMN coding sequence is highlighted in bold.

CTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGT
TACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCA
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGT
ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTAT
TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT
CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACT
CTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTG
CAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGG
GGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTT
TTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGGCGGGCGGCTAGCGG
AGCGGGATCAGCCACCGCGGTGGCGGCCTAGAGTCGACGAGGAACGAAAAACCAGAAAGTTAA
CTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAA
GAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCT
AAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCGATCCACCGGTCCGGAATTCCCGGGATATCGTCGAGC
TCTTAAGCTTACCGCCACC**ATGGCTATGAGCAGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGTCCCTGAGCAG**
GAGGATTCCGTGCTGTTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGACATTTGGGATGATA
CAGCACTGATTAAAGCATATGATAAAGCTGTGGCTTCCTTTAAGCATGCTCTGAAGAATGGAGA
CATCTGTGAAACTTCCGGCAAACCAAAAACCACACCTAAAAGAAAACCTGCTAAGAAGAATAAA
AGCCAGAAGAAGAATACTGCAGCTTCCCTCCAGCAGTGGAAAGTCGGGGACAAATGTTCCGCCA
TTTGGTCCGAAGACGGTTGCATTTACCCAGCTACCATTGCTTCAATTGATTTTAAGAGAGAAAC
CTGTGTGGTTCGTGTACACTGGATATGGAAATAGAGAGGAGCAGAATCTGTCCGATCTGCTGTCC
CCAATCTGTGAAGTGGCTAATAATATTGAACAGAATGCTCAGGAGAATGAAAATGAAAGCCAGG
TGTCCACAGATGAAAGTGAGAACTCCAGGTCTCCTGGAAATAAATCAGATAACATCAAGCCCAA
ATCTGCTCCCTGGAACCTTTTTCTGCCTCCACCACCCCCCATGCCAGGGCCAAGACTGGGACCA
GGAAAGCCAGGGCTGAAATTCAATGGCCCTCCACCCCCACCTCCCCCTCCACCACCCCCACCTGC
TGTCATGCTGGCTGCCTCCATTTCTTCTGGACCACCAATCATTTCCCCCACCACCTCCCATCTG
TCCAGATTCTCTGGATGATGCTGATGCTCTGGGAAGTATGCTCATTTTCATGGTACATGAGTGGC
TATCATACTGGCTATTATATGGGGTTCAAGACAGAATCAGAAAGAAGGAAGGTGCTCACATTCCC
TCAATTAATCTAGACAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATG
CAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTTATAA
GCTGCAATAAACAAGTT

Методы

Схема исследования

Препарат рекомбинантного аденоассоциированного вируса (scrAAV) вводили внутривенно 2-дневным мышам. По прошествии 3, 6 и 12 нед. после инъекции, из образцов сердца, легких, печени, мозга, спинного мозга и четырехглавой мышцы бедра выделяли тотальную ДНК и РНК, которые затем анализировали на содержание вирусных геномов и транскриптов SMN соответственно с помощью количественной ПЦР.

Манипуляции с экспериментальными животными

Мышей (родительские пары) рассаживали по парам случайным образом, ежедневно отбирали самок с копулятивной пробкой. Таких самок отсаживали от самцов до родов и последующего вскармливания потомства. В эксперимент брали клинически здоровых мышей обоего пола массой $2,2 \pm 0,1$ г из пометов среднего размера по количеству приплода. На постнатальный день 2 (35–45 ч после родов) исследуемый препарат в дозе $1,0 \times 10^{14}$ вг/кг и стандартное (контрольное) вещество (буфер ГЛФ) вводили однократно в лицевую вену в объеме 15 мкл/мышь (15 и 5 мышам соответственно).

Инъекцию проводили под общей анестезией с использованием стереомикроскопа Stemi 2000-CS (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) со светодиодной осветительной системой проходящего света и стереотаксического инъектора Quintessential stereotaxic injector (Stoelting Co, США). Инъекцию производили в лицевую вену с помощью иглы 32 G со скоростью 1 мкл/сек. Ингаляционную анестезию осуществляли с помощью системы Univentor 410 (Univentor Ltd, Мальта) и препарата для ингаляционной анестезии Форан (Forane, Aesica Queenborough Ltd, Англия), действующее вещество – 2-хлор-2-(дифторметокси)-1,1,1-трифторэтан (изофлуран).

Животные были рандомизированы на группы выведения через 3, 6 и 12 нед. после инъекции (по 5 особей в каждой). Группу, получавшую буфер ГЛФ, выводили на 12 нед. Эвтаназию проводили при помощи ингаляции углекислого газа.

Забор образцов тканей и выделение нуклеиновых кислот

Образцы сердца, легких, печени, мозга, спинного мозга, четырехглавой мышцы бедра массой 10 ± 2 мг при отборе погружали в 100 мкл реагента для стабилизации РНК IntactRNA (Евроген, Россия) – по 3 образца на орган. Спинной мозг из-за малых размеров и малого количества выделяемых нуклеиновых кислот использовали целиком. Образцы инкубировали в стабилизирующем реагенте при температуре 4 °C в течение 24 ч, после чего реагент удаляли, а образцы тканей переносили в гомогенизационные пробирки (MP Biomedicals, США) с керамическим наполнителем Lysing matrix A (для мышечной ткани) и Lysing Matrix D (для остальных тканей). Пробирки с образцами хранили при температуре минус 80 °C до анализа. Гомогенизацию

образцов проводили на гомогенизаторе Precellys 24 (Bertin Technologies, Франция). Тотальную ДНК и РНК выделяли из гомогенизированных образцов с использованием набора AllPrep DNA/RNA/miRNA universal kit (Qiagen, Германия). Концентрацию нуклеиновых кислот оценивали спектрофотометрически (NanoDrop OneC, Thermo Fisher Scientific, США). Интактность ДНК и РНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле по отсутствию фрагментации и наличию четко видимых полос 28S и 18S рибосомальной РНК.

Количественная оценка вирусной ДНК и мРНК в образцах тканей

Оценку количества геномов rAAV в тканях проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием системы CFX96 Touch real-time PCR detection system (Bio-Rad, США) и готовой смеси для ПЦР 5× ПЦР-РВmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Пару праймеров для количественной оценки (*табл. S1*, Приложение 1) подбирали так, чтобы один праймер был комплементарен последовательности промотора, другой – кодирующей SMN последовательности. Подобранная пара праймеров обладала высокой специфичностью (детектируемые продукты в интактных пробах появлялись не ранее 38 цикла) и обеспечивала 98% эффективность реакции амплификации в условиях, указанных в *табл. S3* (Приложение 1). Объем образца ДНК составлял половину от общего объема реакции (20 мкл, *табл. S2*, Приложение 1). Схема заполнения планшета для проведения ПЦР-РВ представлена в *таблице S4* (Приложение 1). Каждый образец ДНК, разведенный до концентрации 5 нг/мкл, анализировали в трех повторях. Разведения линейаризованной плазмиды rAAV-CAG-SMN (шаг разведения 5, начиная с 2×10^6 копий на реакцию) в препарате ДНК из органов контрольных мышей (концентрация 5 нг/мкл) использовали для построения семиточечной стандартной (калибровочной) кривой для количественной оценки образцов в том же планшете. Концентрацию ДНК 5 нг/мкл выбрали на основании предварительных экспериментов, как концентрация, при которой для препаратов ДНК из всех органов не наблюдалось субстратного ингибирования. Аппроксимируя полученные значения Ct на стандартную кривую, определяли количество копий вирусной ДНК в 50 нг тотальной ДНК.

Количество транскриптов SMN оценивали аналогично, используя ту же пару праймеров, что и для измерения количества копий вирусных геномов. Препарат мРНК SMN для построения стандартной кривой синтезировали с применением набора для проведения T7-транскрипции *in vitro* (Биолабмикс, Россия) с использованием в качестве матрицы линейаризованной плазмиды рT7-SMN.

Каждый образец выделенной тотальной РНК, разведенный до концентрации 2,5 нг/мкл, анализировали в трех повторях. Разведения препарата синтезированной мРНК SMN (шаг разведения 5, начиная с 2×10^6 копий на реакцию) в препарате тотальной РНК из органов контрольных мышей (концентрация 2,5 нг/мкл) использовали для построения семиточечной стандартной (калибровочной) кривой для количественной оценки мРНК SMN в анализируемых

образцах в том же планшете. Каждый препарат РНК анализировали параллельно с использованием двух готовых смесей для одностадийной ПЦР-РВ: 5× Synta-F ОТ-ПЦР-мастермикс (с обратной транскриптазой, ОТ+) и 5× Synta-F ПЦР-мастермикс (без обратной транскриптазы, ОТ-) (SynGen, Россия) с добавлением раствора SYBR (Евроген, Россия). Для оценки количества копий транскриптов, значения, полученные с ОТ- вычитались из значений, полученных с ОТ+, для устранения потенциальной ошибки из-за присутствия остаточной ДНК в препаратах РНК.

Таблица S1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для ПЦР-РВ и ОТ-ПЦР

Table S1. Nucleotide sequences of primers used for qPCR and qRT-PCR

Последовательность праймеров / <i>Primer sequences</i>
AATTCCTGGGATATCGTC
GCGCCGGAACAGCACGGAAT

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Таблица S2. Состав реакционной смеси для ПЦР-РВ

Table S2. Composition of qPCR reaction mix

Компоненты на 1 реакцию, объемы (мкл) / <i>Components per single reaction, volumes (μL)</i>	
5× SYBR HS	4,0
10× смесь праймеров, 1 пМ / <i>10× primer mix, 1 pM</i>	2,0
H ₂ O	4,0
ДНК / <i>DNA</i>	10,0

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Таблица S3. Параметры реакции амплификации

Table S3. Amplification reaction parameters

Температура <i>Temperature</i>	Время (с) / <i>Time (s)</i>	Количество циклов / <i>Cycles</i>
95 °C	600	1
95 °C	30	40
60 °C	60	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Таблица S4. Схема внесения образцов в лунки планшетов

Table S4. Plate loading scheme

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Разведения стандарта (копии на реакцию) <i>Standard dilutions (copies per reaction)</i>	Образцы ДНК, 50 нг на реакцию <i>DNA samples, 50 ng per reaction</i>										
		3 недели <i>3 weeks</i>			6 недель <i>6 weeks</i>			12 недель <i>12 weeks</i>				
A	2×10 ⁶											
B	4×10 ⁵											
C	8×10 ⁴											
D	1,6×10 ⁴											
E	3,2×10 ³											
F	6,4×10 ²											
G	1,28×10 ²											
H	0											

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Таблица S5. Соотношения РНК:ДНК, использованные при расчетах активности промотора
Table S5. RNA:DNA ratios used in promoter activity calculations

Орган / <i>Organ</i>	Соотношение РНК:ДНК / <i>RNA:DNA ratio</i>
Головной мозг / <i>Brain</i>	1,44
Спинной мозг / <i>Spinal cord</i>	1,44
Печень / <i>Liver</i>	4,71
Сердце / <i>Heart</i>	1,7
Легкие / <i>Lungs</i>	0,56
Четырехглавая мышца бедра <i>Quadriceps femoris muscle</i>	2,424

Таблица составлена авторами на основании данных о соотношении РНК/ДНК для головного мозга, печени, легких и сердца из работы E.E. Schmidt и U. Schibler [30]. Для спинного мозга использованы те же значения, что и для головного мозга. Для четырехглавой мышцы бедра взяты усредненные данные, полученные W.M. Fowler с соавт. [34] для икроножной мышцы мышей в возрасте 4–13 нед. / The table was compiled by the authors based on RNA:DNA ratio data for the brain, liver, lungs, and heart from the work of E.E. Schmidt and U. Schibler [30]; the same values were used for the spinal cord as for the brain. For the quadriceps femoris muscle, the averaged data obtained by W.M. Fowler et al. [34] for the gastrocnemius muscle of 4–13-weeks-old mice were used.