

Материал и методы

Структура

- Материал – образцы
- Структура опыта – контроли, последовательность
- Методы – экспериментальные
- Методы - статистические

Материал

- Клетки –
 - источники, характеристики, условия культивирования
- Животные лабораторные
 - линии, источник, содержание, этические проблемы
- Животные из природы
 - место и время добычи, имя коллектора, закон об охране, этические проблемы
- Люди
 - место и время, информированное согласие, этические проблемы

Клетки

- **Cell culture and slides preparation**
- The human lymphoblastoid cell lines GM03714 and 4710-176, derived from a cytogenetically normal individual, and from a human with trisomy 21, respectively, were kindly donated by professor S. Antonarakis (University of Geneva, Switzerland). Cells were cultured in RPMI-Glutamax media containing 10 % fetal bovine serum and 1 % penicillin/streptomycin (Gibco Life Technologies, USA) at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere.

Животные лабораторные

- **Animals**
- Male and female mice homozygous for the paracentric inversion In(1)1Rk were a generous gift from Dr. T. Roderick (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). The inversion was transferred to the genetic background of the [C57BL/6J](#) strain using a series of consecutive backcrosses. This strain is currently maintained at the Institute of Cytology and Genetics as homozygous stock C57B1/6J-In(1)1Rk/lcg. Female embryos heterozygous for In(1)1Rk inversion were generated by crossing 3-month-old males of this stock to 3-month-old [C57BL/6J](#) females. [C57BL/6J](#) embryos homozygous for the standard chromosome 1 were used as control. The day the uterine plug was observed was considered day 0 of gestation.

Животные из природы

- Thirteen adult males of *C. talarum* were trapped during the breeding season in November 2012 in three localities along the Atlantic coast of Buenos Aires Province, Argentina: near to Cerro de la Gloria ($35^{\circ} 58.975' S$; $57^{\circ} 27.012' W$), Costa del Este ($36^{\circ} 37.076' S$; $56^{\circ} 42.119' W$), and Villa Gesell ($37^{\circ} 11.497' S$; $56^{\circ} 57.383' W$).
- Trapping, handling, and euthanasia of animals were performed according to the protocols approved by the Animal Care and Use Committees at the Institute of Cytology and Genetics of the Russian Academy of Sciences and the Bernardino Rivadavia Argentine Museum of Natural Sciences. All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed.

Животные из природы

- Метациркарии *Opisthorchis felineus* были выделены из подкожных мышечных тканей зараженных рыб, добытых в р.Обь.
- Затем 6-8 недельные хомяки *Mesocricetus auratus* подвергались заражению перорально 50-метацирکاریями.
- Взрослые черви *O.felineus* были извлечены из желчных протоков печени хомяков через 5 месяцев после заражения.
- Они были промыты более 10 раз в физиологическом растворе (0,9% ра-р NaCl) и использованы для дальнейших экспериментов.
- Протокол экспериментальных работ с хомяками был одобрен этической комиссией Ициг СО РАН.
- Для проведения эксперимента по со-культивированию взрослых марит *O.felineus* с клетками человека использовались клеточные линии U937(моноцитарно-макрофагальная линия) и Hs68 (фибробласты), предоставленные сотрудником института А.Г.Шиловым.

Люди

- **Subjects**
- The study sample consisted of participants from the Erasmus Rucphen Family (ERF) study. All individuals were members of one extended family spanning over 23 generations and including more than 23 000 individuals. The detailed information about the ERF study and Dutch isolated population can be found in the supplementary material and in our earlier publications.^[22 23] All study protocols were approved by the Medical Ethics Committee of Erasmus University and all participants gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

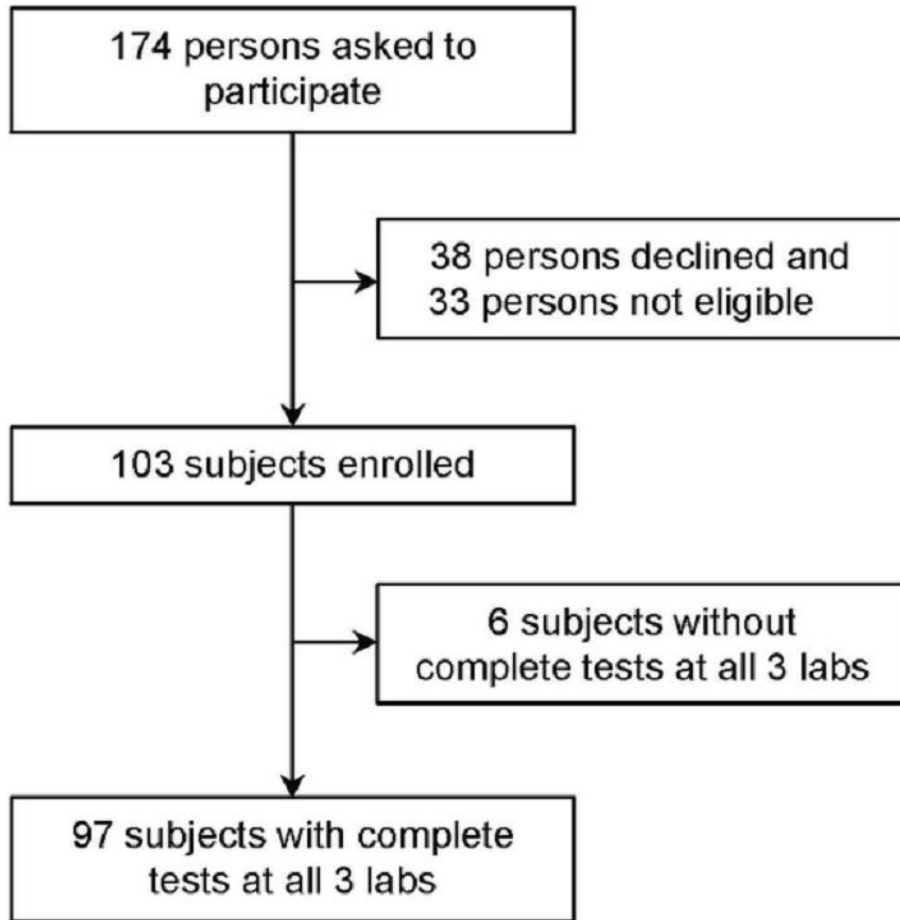
Люди

- Основным материалом исследования являются данные экзомного секвенирования 12 представителей якутского этноса. Сбор образцов крови для проведения секвенирования осуществлялся сотрудниками Лаборатории Фармакогеномики Института Химической и Фундаментальной Медицины. Образцы крови были взяты у людей, проживающих на территории Вилюйского улуса Республики Саха (Якутия). Собранные образцы были секвенированы в Пекинском Институте Геномики, (BGI, Beijing Genomics Institute) с помощью системы Illumina HiSeq2000.

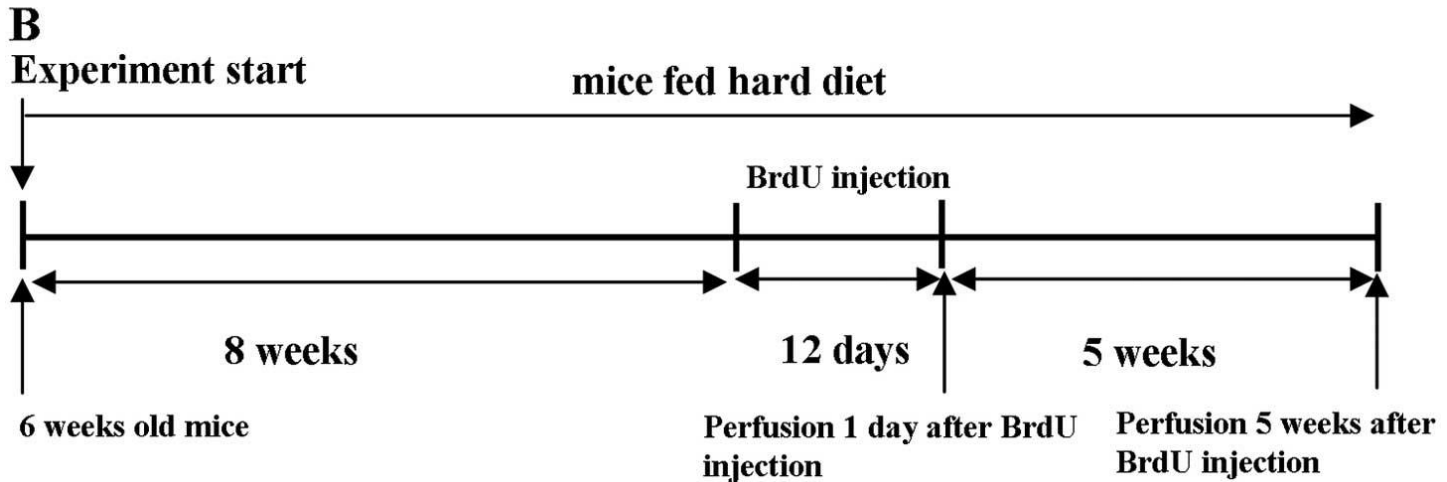
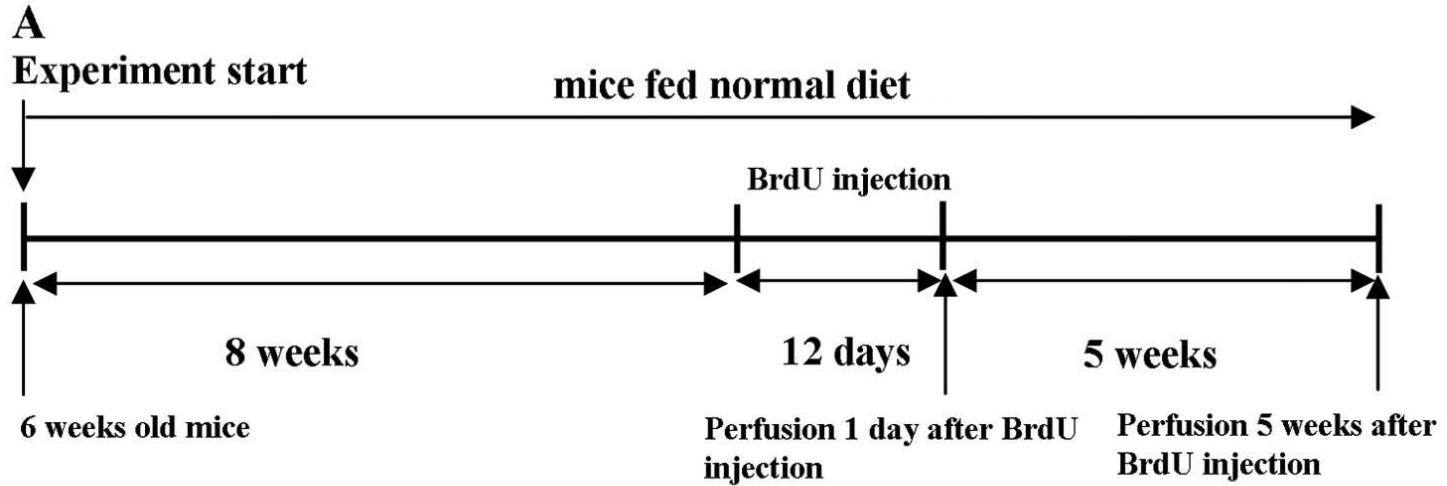
Структура опыта

- Опыт- контроли, шифрование
- Последовательность операций

План опыта

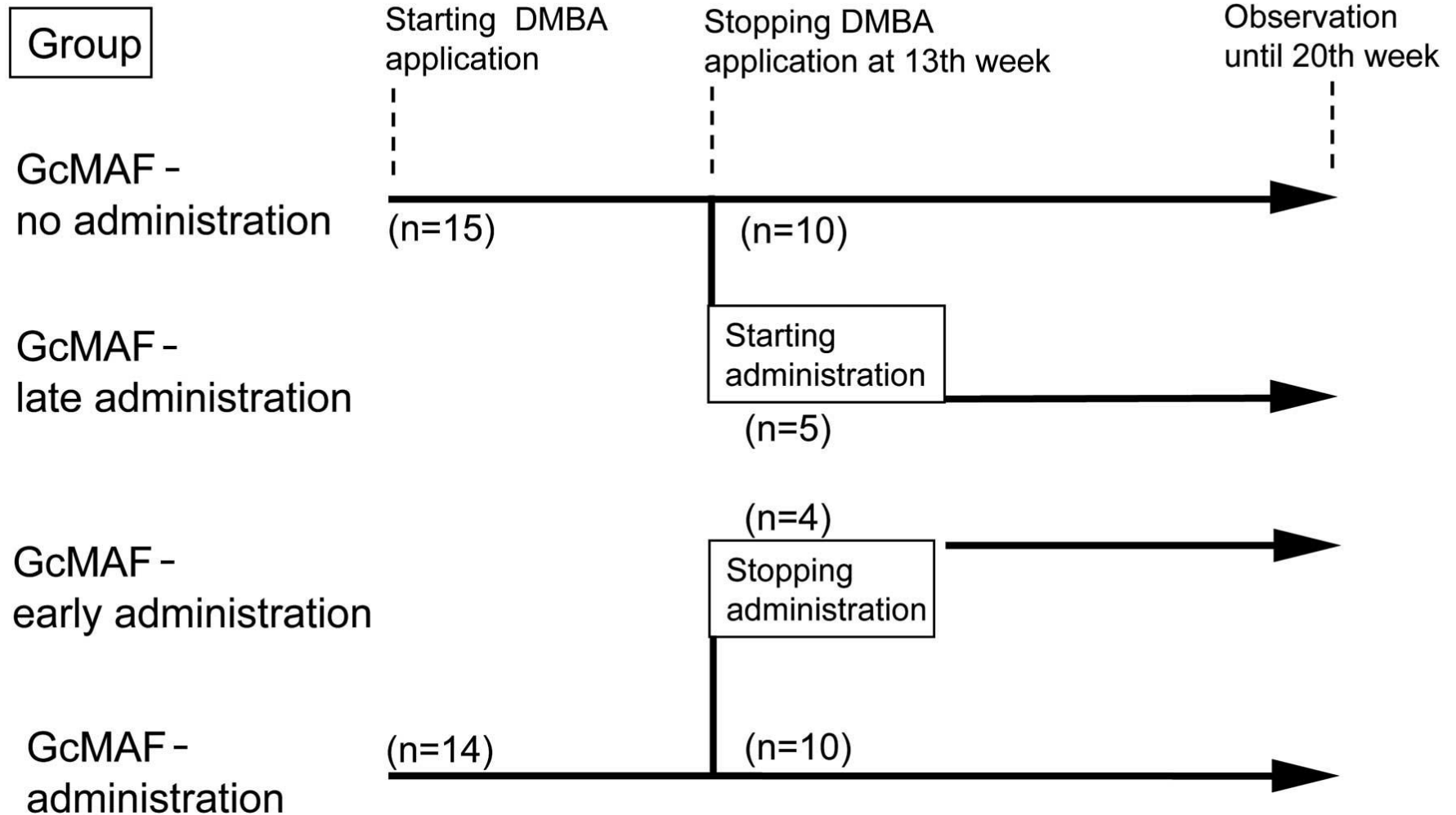


План опыта



План опыта

Schedule of the experiment



Эксперимент по моделированию окислительного стресса *in vitro*

	0 mM H ₂ O ₂	0,5 mM H ₂ O ₂	2,0 mM H ₂ O ₂	5,0 mM параквата	25,0 mM параквата
1 час	собрать 200 мкл среды (ЭСП);	собрать 200 мкл среды (ЭСП);	собрать 200 мкл среды (ЭСП);	собрать 200 мкл среды (ЭСП);	собрать 200 мкл среды (ЭСП);
4 часа	собрать 200 мкл среды (ЭСП); забрать 2-3 червей для приготовления лизата; перенести 3 червя в RNA later (200 мкл);	собрать 200 мкл среды (ЭСП); забрать 2-3 червей для приготовления лизата; перенести 3 червя в RNA later (200 мкл);	собрать 200 мкл среды (ЭСП); забрать 2-3 червей для приготовления лизата; перенести 3 червя в RNA later (200 мкл);	собрать 200 мкл среды (ЭСП); забрать 2-3 червей для приготовления лизата; перенести 3 червя в RNA later (200 мкл);	собрать 200 мкл среды (ЭСП); забрать 2-3 червей для приготовления лизата; перенести 3 червя в RNA later (200 мкл);
24 часа	собрать 200 мкл среды (ЭСП); забрать 2-3 червей для приготовления лизата; перенести 3 червя в RNA later (200 мкл);	собрать 200 мкл среды (ЭСП); забрать 2-3 червей для приготовления лизата; перенести 3 червя в RNA later (200 мкл);	собрать 200 мкл среды (ЭСП); забрать 2-3 червей для приготовления лизата; перенести 3 червя в RNA later (200 мкл);	собрать 200 мкл среды (ЭСП); забрать 2-3 червей для приготовления лизата; перенести 3 червя в RNA later (200 мкл);	собрать 200 мкл среды (ЭСП); забрать 2-3 червей для приготовления лизата; перенести 3 червя в RNA later (200 мкл);

Методы – экспериментальные

- This section should provide enough detail for reproduction of the findings.
- Protocols for new methods should be included,
- but well-established protocols may simply be referenced.
- While we do encourage authors to submit all appendices, detailed protocols, or details of the algorithms for newer or less well-established methods, please do so as Supporting Information files.

4.4. Вестерн-блот анализ.

- Белки разделяли в 10% SDS-полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Biosciences).
- Мембрана была блокирована в Трис-солевом буфере, содержащем 1% Tween-20 (TBST) и 5% обезжиренное молоко, в течение 1 часа при комнатной температуре.
- Затем мембрана была инкубирована с первичными антителами (анти-GST, антиТрх, соответственно) в разведение 1:1000 при +4°C в течение 24 часов и далее со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведение 1:10000 в течение 40-50 минут при комнатной температуре.
- Сигнал детектировали с использованием реагента для хемилюминесцентной реакции ECL (Amersham Biosciences).

4.5. Выделение РНК, синтез кДНК

- РНК из взрослых червей была выделена с помощью набора [Trizol Reagent](#) (Invitrogen) согласно рекомендациям производителя.
- Концентрация выделенной РНК была определена с помощью прибора NanoDrop. Для того, чтобы оценить степень очистки РНК от загрязняющих веществ, были рассчитаны параметры 260/230 и 260/280.
- Набор RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas) использовался для синтеза ДНК по методике производителя.
- В качестве амплификатора был применен Eppendorf Mastercycler Gradient.
- Термопрофиль реакции: 37°C – 1,5 часа; 90°C -10 мин.
- Продукты реакции хранили при - 20°C

Identification of tumor-associated DNA copy number aberrations

- oaCGH analysis was performed as described previously (Thomas et al. [2011](#)) using a ~180,000 feature microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) comprising repeat-masked ~60-mer oligonucleotides distributed at approximately 13 kb intervals throughout the dog genome sequence assembly (canFam version 2.0, May 2005, Lindblad-Toh et al. [2005](#)).
- To maximize continuity and aid data integration, tumor DNA from each case was hybridized against common reference DNA samples comprising equimolar quantities of constitutional DNA from ten clinical healthy GRs of the same gender as the patient.
- Array image files were processed using Feature Extraction version 10.10 and Genomic Workbench version 7 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and were then imported into [Nexus Copy Number](#) version 7 (Biodiscovery, El Segundo, CA).
- Raw data were filtered to exclude probes exhibiting non-uniform hybridization or signal saturation.

Методы - статистические

- We identified individual SCs by their relative lengths, centromeric index, and [DAPI](#) pattern.
- To generate recombination maps, we calculated the absolute position of each [MLH1](#) focus multiplying the relative position of each focus by the average absolute length for the appropriate chromosome arm.
- These data were pooled for each arm and graphed to represent a recombination map.
- We measured absolute distances between two [MLH1](#) foci across the centromere in homozygotes and heterozygotes for Robertsonian fusions and reciprocal translocations.
- The relative distances were calculated as fractions of metacentric chromosome length.
- Statistica 6.0 software package (StatSoft) was used for descriptive statistics, Fisher's exact test and [ANOVA](#).