

SUPPLEMENTARY MATERIALS

to the article A.V. Smirnov, T.A. Shnaider, A.N. Koroblev, A.M. Yunusova, I.A. Serova, N.R. Battulin

"A hypomorphic mutation in the mouse *Csn1s1* gene generated by CRISPR/Cas9 pronuclear microinjection"

Supplementary material 1. Cas9-induced mutations in the *Csn1s1* exon 2

F0 mice	Sequence of the first coding exon (exon 2) of the <i>Csn1s1</i> (Cas9 cut site – 1-2 bp after ATG)	Mutation in each allele
WT	ATCTTGGCAACC ATG AAACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	WT
#d1	ATCTTGGCA-----TCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 13 bp (KO)
	ATCTTGGCAACC ATG AACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 1 bp (KO)
#d2	-----TCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 97 bp (KO)
	ATCTTGGCAACC ATG A---TCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 3 bp
	Mosaic alleles (2)	–
#1	ATCTTGGCAACC ATG AAACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	WT
	ATCTTGGCAACC ATG AAACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	WT
#2	ATCTTGGCAACC ATG AACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 2 bp (KO)
	Mosaic alleles (2)	–
#3	ATCTTGGCAA-----CCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 10 bp (KO)
	ATCTTGGCAACC ATG AACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 1 bp (KO)
#4	ATCTTGGCAACC ATG AACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 1 bp (KO)
	ATCTTGGCAACC ATG ----- CC TCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 7 bp + 2 bp mut (KO)
#5	ATCTTGGCAACC ATG AAA-TCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 1 bp (KO)
	ATCTTGGCAA-----CCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 10 bp (KO)
	Mosaic allele (1)	–
#6	ATCTTGGCAACC ATG AAACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	WT
	ATCTTGGCAA-----CCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 25 bp (KO)
#7	ATCTTGGCAACC ATG AACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 1 bp (KO)
	ATCTTGGCAACCA---AACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 3 bp (KO)
	ATCTTGGCAACC ATG AACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 3 bp (SP mut)
#8	ATCTTGGCAACC AT -----CCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 12 bp (KO)
	-----	Not detected
#9	ATCTTGGCAACC AT -----CCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 12 bp (KO)
	Unknown insert	Insert ~ 50 bp

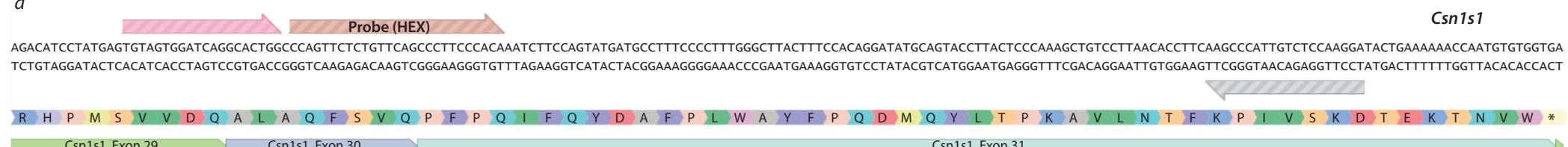
Supplementary material 1 (end)

F0 mice	Sequence of the first coding exon (exon 2) of the <i>Csn1s1</i> (Cas9 cut site – 1-2 bp after ATG)	Mutation in each allele
#10	ATCTTGGCAACC AT -----CCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 12 bp (KO)
	ATCTTGGCAACC ATGAA ACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	WT
#11	ATCTTGGCAACC ATG --ACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 2 bp (KO)
	Mosaic alleles (2)	-
#12	ATCTTGGCAAC-----TCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 8 bp (KO)
	ATCTTGGCAA-----CCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 10 bp (KO)
	-----	Del 275 bp (KO)
#13	ATCTTGGCAACC ATG GATCC ACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTTTGCTATGCC	Insert 3 bp (SP mut)
	-----	Large del (KO)
#14	ATCTTGGCAACC ATG G ACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	1 bp mut (SP mut)
	ATCTTGG C TCA -----TCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 8 bp + mut (KO)
#15	ATCTTGGCAACC AT -----CCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 12 bp (KO)
	ATCTTGGCAACC-----TCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 16 bp (KO)
	-----	Del 198 bp (KO)
#16	ATCTTGGCAACC ATGAA ACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	WT
	ATCTTGGCAACC ATGAA -CT G ACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 1 bp + 1 bp mut (KO)
#17	ATCTTGGCAACC ATG --AACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 1 bp (KO)
	ATCTTGGCA-----CTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 9 bp (KO)
#18	ATCTTGGCAACC ATG -----ATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 9 bp (SP mut)
	ATCTTGGCAACC ATG G ACTCCTCATCCTCACCTGCCTCGTGGCTGCTGCTTTGCTATGCC	Del 1 bp + 1 bp mut (KO)

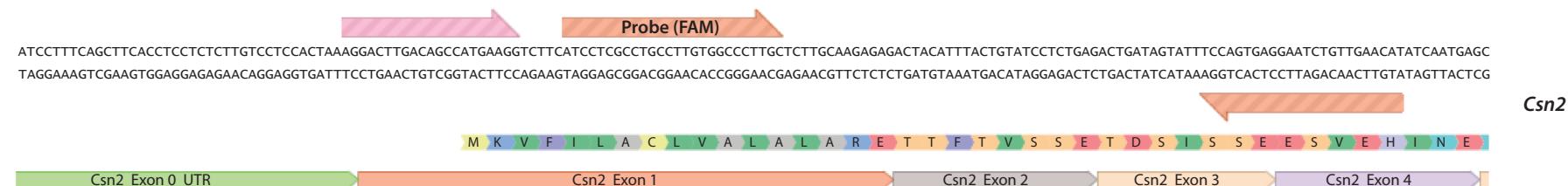
Note. Full sequence of the *Csn1s1* exon 2 is shown with corresponding mutations in each allele. Some mice had more than two mutant alleles due to tissue mosaicism. In some cases, mosaic alleles were hard to read and their presence is stated without showing mutated sequence. Color highlights: yellow – ATG start codon, green – nucleotide substitution, and blue – nucleotide insertion. Designations: KO – mutation causes knockout of the *Csn1s1* gene due to frameshift or start codon deletion; SP mut – mutation of the signal peptide sequence without a frameshift, #d1-2 – deadborn pups.

Supplementary material 2. Primers and probes for the *Csn1s1* and *Csn2* expression measurements using droplet digital PCR (ddPCR)

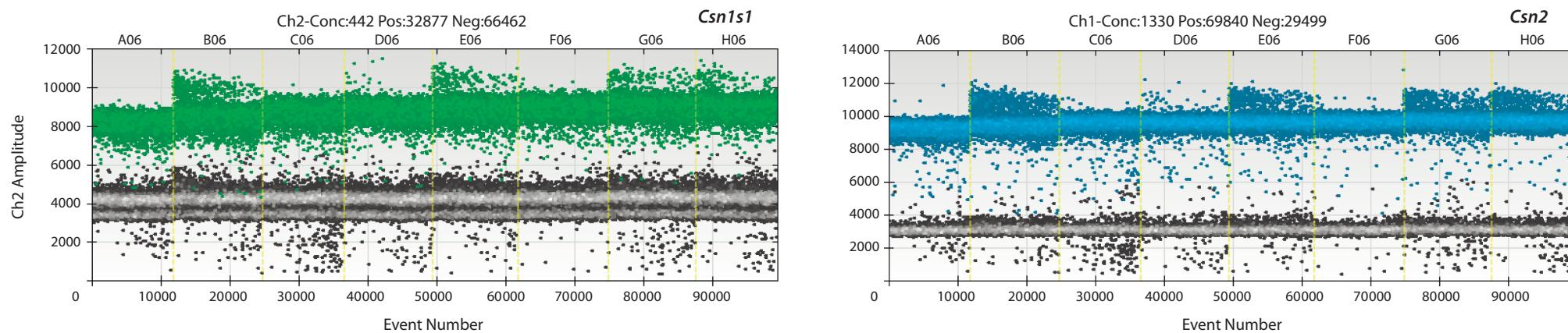
a



b



c



a – *Csn1s1* CDS target region for ddPCR; b – *Csn2* CDS target region for ddPCR; c – testing optimal annealing temperature for the two genes. Temperature varies from 63 °C (left) to 55 °C (right). The threshold for positive droplet measurement was set to 6000.