

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA iPS

Application Form to Deposit an iPS cell line of human origin

Documentos que se acompañan:

Attached documents:

- Copia de la autorización de derivación de la línea celular, junto con informe del Comité Ético del centro de procedencia.
A copy of the authorization for the derivation of the cell line, with the corresponding ethics committee approval
- Copia de cualquier publicación científica relacionada con la derivación y/o caracterización de la línea.
A copy of any relevant published scientific papers related to the derivation and/or characterization of the cell line
- C. V. del investigador principal (una página; formato libre).
A one page CV for the Principal Investigator
- Otros (especificar).
Others (specify)

SECCIÓN 1

Section 1

Información General

General Information

Nombre de la línea:

Name of the line:

IB SvC1

Investigador principal:

Principal Investigator: Rosario Sanchez Pernaute

Tipo de célula de la que se obtiene la línea: Fibroblastos humanos de piel

Cell type origin of the cell line: Adult human skin fibroblasts

¿El sujeto fuente tiene alguna patología?

Has the donor any pathological condition?

NO

No

SÍ (especificar)

Yes (specify)

¿La patología es de origen genético?

Is the pathological condition of genetic origin?

NO

No

SÍ (especificar)

Yes (specify)

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

Genetic identity of the cell line. Method and result

Para confirmar que la línea IB SvC1 era idéntica que sus fibroblastos de origen, realizamos *fingerprinting* del ADN. Se extrajo ADN de las muestras y se amplificó con 3 marcadores moleculares de tipo polimórfico: D10S1214, D17S1190 y D7S796. Ver ANEXO1.

To confirm that IB SVC1 was of identical origin to adult fibroblasts, we carried out DNA fingerprinting. Total genomic DNA was extracted from all samples and amplified with 3 microsatellite markers: D10S1214, D17S1190 and D7S796. See ANNEX 1.

Cariotipo/Karyotype

Euploide/Euploid Anormal/Atypical (especificar/specify)

Ver ANEXO 2/ See ANNEX2.

SECCIÓN 2

Section 2

Datos del Depositante

Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Rosario Sanchez Pernaute	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Paseo Mikeletegi 81, 20009 San Sebastián (Guipúzcoa)
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Fundación Inbiomed Laboratorio de células madre y reparación neural	Teléfono (phone): 94 3309064 x225 Fax: 94 3308222 E-mail: rpernaute@inbiomed.org

SECCIÓN 3

Section 3

Datos de la Línea Celular

Details of Cell Line

Tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica <i>Tissue of origin and anatomic location of the biological sample</i> Biopsia de piel del brazo Skin biopsy from the arm	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <input type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i> <input checked="" type="checkbox"/>	
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 08/03/2011	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 23/03/2012

Origen del soporte celular o acelular utilizado para la derivación, así como de los componentes de los medios de cultivo (si se describen en publicación, indicar además referencia)

Origin of the cellular or cellular free support used in derivation in addition to the components of the culture mediums (if they are described in a publication, please indicate the reference).

Support: Human Newborn foreskin fibroblast (HFF-1 ATCC SCRC-1041)

Culture medium: Knockout DMEM supplemented with 2mmol/l GlutaMAX (Invitrogen), 50 µM β-mercaptoethanol, 10ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Peprotech), 1% non-essential amino acids (Sigma-Aldrich), 20% Knockout Serum Replacement (Gibco) y 0.5% Penicilin-Streptomycin (Sigma-Aldrich)

Mantenimiento de la línea: Line maintenance en HFF / on HFF

Ratio de pase: *Passage ratio 1:2-1:3 cada 6-7 días; 1:2-1:3 every 6-7days*

Método de pase: *Passage method mecánico, mechanical*

Xenobióticos
Xenobiotics

si
Yes

no
No

Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo

(forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)

Description of the morphological characteristics of the line in culture (form and size of the colonies; form and size of the cells; nucleus/cytoplasm ratio; others)

Colonias grandes poligonales, ligeramente aplanadas, de un tamaño entre 1-3 mm de diámetro de diversas formas con bordes lisos. Células de tamaño uniforme y una elevada relación núcleo/citoplasma.

Large and flat polygonal colonies, with uniformly sized cells of 1-3 mm of diameter. They several forms and smooth edges. High nucleus/cytoplasm ratio

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

Bacteriología

(Bacteriology)

Micología

(Mycology)

Micoplasma: PCR

(Micoplasma: by PCR) negative

Marcadores: Ver anexo 3.*Markers: See annex 3.*

	Método (ARN/proteínas) Method (RNA/proteins)	nº pase Passage n.	resultado results	comentarios comments
Oct 4	RNA	27	+	
Nanog	Inmunofluorescencia/RNA	12/27	+	
Rex 1 (opcional/optional)	RNA	27	+	
Sox 2	RNA	27	+	
SSEA3				
SSEA4	Inmunofluorescencia	12	+	
TRA-1-60				
TRA-1-81				
Telomerasa/Telomerase (opcional/optional)				
Fosfatasa Alc. /Alkaline phosphatase				
Otros / Others				
Lin28A	RNA	27	+	
TERT	RNA	27	+	

Capacidad de diferenciación (Ver los anexos 5 y 6)*Differentiation capacity (See annex 5 and 6)*

	Ectodermo/ Ectoderm			Endodermo/Endoderm			Mesodermo/ Mesoderm		
	marcador marker	pase passage	resultado result	marcador marker	pase passage	resultado result	marcador marker	pase passage	resultado result
In Vitro	5HT	+		FOXA2	27	+	SMA	27	+
<i>In vitro</i>	Tau	+		AFP	27	+	SAct	27	+
	TH	+							
In vivo/ in vivo (anexo5)	Método: formación de teratomas en ratones SCID						Resultado: +		
	pasage: 13						Result: +		
	<i>Method: teratoma formation in SCID mice</i>								

OPCIONAL/OPTIONAL:**Reprogramación del perfil de expresión génica***Reprogramming of gene expression profile**Sí. Q-RT-PCR/RNA-seq de genes de pluripotencia (Oct4, Sox2, Nanog, Rex1, Lin28A, TERT)**Yes. Q-RT-PCR/RNA-seq of pluripotency genes (Oct4, Sox2, Nanog, Rex1, Lin28A, TERT)***Reprogramación del perfil de metilación del ADN***Reprogramming of DNA methylation profile**No***Longitud telomérica***Telomere length**NO*

Descripción de las características de diferenciación *in vitro*

Description of the differentiation characteristics in vitro

Los cuerpos embrioides (EBs) se cultivan en placas no adherentes en medio Knockout-DMEM, suplementado con 2 mM de l-glutamina, 10% de suero bovino fetal (FBS). Tras 4 días se transfieren a placas tratadas con gelatina para inducción de linajes meso/endo y ectodérmico en condiciones habituales. La caracterización se realizó mediante inmunofluorescencia. Anexo 5.

In vitro differentiation was done by embryoid body formation followed by induction of endo/meso and neuroectoderm derivatives using standard protocols. Characterization was performed by immunofluorescence. See Annex 5.

Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas

Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation

Inyección intramuscular en ratones NOD/SCID de clumps de células indiferenciadas y tras aproximadamente 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante H7E y técnicas de inmunohistoquímica para marcadores de ectodermo, mesodermo y endodermo (ver Anexo 6)

Clumps of undifferentiated cells were injected into the muscle of SCID mice. 9 weeks later teratomas were analyzed by H/E and immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (see Annex 6)

Datos de la tipificación HLA

HLA typification data

ANEXO 1

ANNEX 1

Integración de los transgenes de reprogramación: gPCR para integración de provirus

Integration of reprogramming transgenes: gPCR for provirus integration

La línea IB SVC1 ha sido generada utilizando una estrategia no integrativa basada en los vectores de sendai virus (Invitrogen-CytoTune-iPS Sendai Reprogramming kit, A1378001). El sendai virus es un virus RNA de cadena sencilla y orientación negativa, que permite la generación de iPSCs sin la integración del transgén en el genoma de las células infectadas.

IB SVC1 has been generated using a no-integrative strategy based on Sendai Virus (Invitrogen-CytoTune-iPS Sendai Reprogramming kit, A1378001). SeV is a negative sense, single strand RNA virus that allow the generation of iPSCs without the transgene integration in the genome of infected cells.

Silenciamiento de los transgenes de reprogramación: IF (y qRT-PCR)

Silencing of reprogramming transgenes: RT-PCR o Q-RT-PCR

La ausencia del sendai virus (SeV) en el genoma ha sido testada mediante Q-RT-PCR e inmunofluorescencia (anexo 4).

The absence of SeV genome has been tested by immunofluorescence (see annex 4) and Q-RT-PCR.

Mantenimiento a largo plazo en cultivo: > 20 pases

Long-term maintenance in culture: >20 passages

La línea se ha cultivado durante 31 pases

The line has been cultured during 31 passages

Pase en el momento del registro: P28

Passage at the time of the recording: P28

¿Ha sido la línea modificada genéticamente?

Has the line been genetically modified?

Sí Yes

No No

¿Se llevó a cabo un análisis clonal?

Has a clonal analysis been carried out?

Sí/ Yes No

Resultado / Result

Comentarios/ Comments:

Otras observaciones o información relevantes (a juicio del Investigador Principal):

Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigator):

Esta línea ha sido generada como control de Parkinson juvenil de un donante joven. La reprogramación con virus Sendai (CytoTune® kit) se realizó en la plataforma de reprogramación y diferenciación celular de la Fundación Inbiomed bajo la dirección de la Dra Xonia Carvajal-Vergara.

This line was generated as a control of juvenile Parkinson Disease from a young healthy donor. The reprogramming procedure with the CytoTune®-iPS Sendai Reprogramming kit, was carried out in the Reprogramming platform at Inbiomed Foundation by Dr Xonia Carvajal-Vergara.

Otras observaciones o información relevantes (a rellenar por el BNLC):

Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

Seguimiento de la línea (a rellenar por el BNLC):

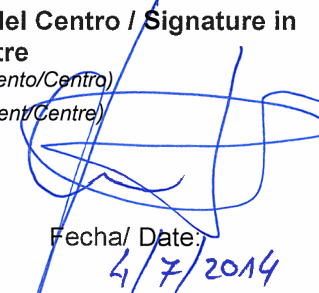
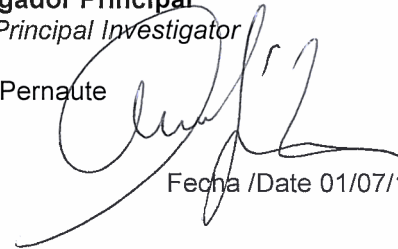
Follow up of the line (to be completed by BNLC)

SECCIÓN 4

Declaración

Confirmo que la información contenida en estos impresos es cierta y asumo total responsabilidad sobre la misma.

I confirm that the information contained in this form is true and I assume total responsibility for it.

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) (Legal Representative of the Department/Centre)  Fecha/ Date: 4/7/2014	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> Rosario Sánchez Pernaute  Fecha /Date 01/07/14
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i>	JOSE MANUEL FRANCO DIRECTOR GENERAL
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Paseo Mikeletegi 81 San Sebastián E 20009	Teléfono /Telephone: +34943309064x221 Fax: +34943308222 E-mail: jmfranco@inbiomed.org