

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)
National Bank of Stem Cell Lines
IMPRESO DE SOLICITUD DE REGISTRO Y DEPÓSITO DE UNA LÍNEA iPS HUMANA
Application Form to Register and Deposit of an human iPS cell line

FECHA: 23/02/2017

DOCUMENTOS QUE DEBEN ACOMPAÑAR LA SOLICITUD:

Attached documents:

- Copia de la autorización del proyecto en el cual se genera la línea celular, junto con informe favorable del Comité Ético del centro de procedencia.**
A copy of the project authorization in which the cell line is obtained along with a favourable report of the Clinical Research Ethics Committee
- Copia de cualquier publicación científica relacionada con la línea iPS generada.**
A copy of any relevant published scientific papers related to the iPS cell line generated
- C. V. del investigador principal (una página; formato libre).**
A one page CV for the Principal Investigator

SECCIÓN 1-INFORMACIÓN DE LA MUESTRA ORIGINAL Y DE LA iPS GENERADA.

Section 1-Information of the original cell line and the generated iPS

Nombre de la línea iPS <i>Name of the iPS line:</i>	Ctrl3-F-iPS-4F-1
Muestra original donada. Detallar tipo de célula, tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica de la que se obtiene la línea original. Si son células comerciales, detallar nombre, referencia y distribuidor comercial <i>Original sample donated.</i> <i>Detail cell type, tissue of origin and anatomic location of the biological sample from which the original line is obtained.</i> <i>If cells are commercial, detail name, reference and trade distributor.</i>	Biopsia cutánea de la cara ventral del brazo (diámetro 4-6 mm) Fibroblastos de la dermis Skin biopsy from the ventral side of the arm (4-6 mm diameter) Dermal fibroblasts
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Hombre 72 Male 72
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) No Yes (specify)
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) No Yes (specify)

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 26/04/2012	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 26/04/2012* Ver a continuación. See below.
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Aislamiento de fibroblastos mediante digestión enzimática (colagenasa, hialuronidasa y DNasa I). Los fibroblastos fueron congelados y, posteriormente, descongelados para realizar experimentos de reprogramación en diciembre-2014. El medio de cultivo empleado para su mantenimiento fue DMEM con 110mg/L de piruvato sódico y alto contenido en glucosa (4,5g/L) suplementado con 0.1mM de aminoácidos no esenciales, 10% de FBS y 50u/ml de penicilina y 50µg/ml de estreptomycin. Fibroblast isolation by enzymatic digestion (collagenase, hyaluronidase and DNase I). Fibroblasts were kept frozen and later thawed for reprogramming experiments in December-2014. The culture medium used for maintenance was DMEM with 110mg/L of pyruvate and high glucose (4,5g/L) supplemented with 0.1mM of nonessential amino acids, 10% of FBS and 50u/ml of penicillin and 50µg/ml of streptomycin.
¿Hay disponibilidad de viales congelados de las células de origen? ¿En qué pase? <i>Is there availability of frozen vials of original cells? At what passage?</i>	Si, en pase 6 Yes, at passage 6
Método utilizado en la generación de la línea iPSc. (Integrativa/ No-integrativa) Especificar factores y plásmidos de reprogramación utilizados. <i>Method used for the generation of iPSC line (Integrative / Non-integrative)</i> <i>Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	El método empleado es no integrativo, utilizando para ello los vectores virales Sendai (CytoTune - iPS Reprogramming Kit) que expresan los factores: hOCT3/4, hSOX2, hKLF4 y hc-MYC. The method is not integrative, using the sendai viral vectors (CytoTune - iPS Reprogramming Kit) expressing the factors: hOCT3/4, hSOX2, hKLF4 and hc-MYC.
Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia) <i>iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Las iPSCs generadas se cultivaron sobre células de soporte (fibroblastos embrionarios de ratón preparados en nuestro laboratorio), en un medio de cultivo KnockOut DMEM/F-12 sin glutamina suplementado con 0.1mM de aminoácidos no esenciales, 2mM de glutamax, 0.1mM de β-mercaptoetanol, 20% de KnockOut Serum Replacement, 6ng/ml FGF-2 y 100u/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomycin. The generated iPSCs were cultured on feeder cells (mouse embryonic fibroblasts prepared in our laboratory), in culture medium KnockOut DMEM/F-12 without glutamine and supplemented with 0.1mM of nonessential amino acids, 2mM of Glutamax, 0.1mM β-mercaptoethanol, 20% KnockOut Serum Replacement, 6 ng/ml FGF-2 and 100u/ml of penicillin and 100µg/ml of streptomycin
Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros) <i>Description of the morphological characteristics of the line in</i>	Planas, redondeadas o poligonales (la mayoría) y algunas alargadas y/o en forma de cuña. Bordes nítidos. Tamaño medio de las colonias: 1.24mm ± 0.11 Ratio núcleo/citoplasma elevada. Flat, round or polygonal (the majority) with some being elongated and/or wedge-like. Defined borders. Mean size of colonies: 1.24mm ± 0.11 High nucleus/cytoplasm ratio

<p><i>culture (form and size of the colonies; form and size of the cells; nucleus/cytoplasm ratio; others)</i></p>	
<p>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i></p>	<p>Congelación: 15-20 colonial/vial en 90% FBS y 10% DMSO Descongelación: En medio de cultivo de iPSCs : Medio iPSC condicionado de MEFs (1:1) suplementado con 8ng/ml de FGF-2 y 10µM de Y27.</p> <p>Freezing: 15-20 colonies/vial in 90% FBS and 10% DMSO Thawing: iPSCs medium : MEF conditioned iPSC medium (1:1) supplemented with 8ng/ml FGF-2 and 10µM Y27.</p>
<p>Pase de la línea celular en el momento del banqueo/registro. (Máximo: Pase 15) <i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i></p>	<p>Disponibilidad de células criopreservadas en Pases 8 y 11 Cells cryopreserved at Passages 8 and 11 are available.</p>
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes <input type="checkbox"/> No No <input checked="" type="checkbox"/> Comentarios/ Comments:</p>	<p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i> Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Resultado / Result</p>

SECCIÓN 2 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA iPS.
Adjuntar resultados (imágenes o gráficos) como anexo

Section 2 iPS Cell Line characterization results. Attach results (images and graphics) as an annex

Test de pluripotencia <i>Pluripotency test</i>	Método Comentarios	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	<i>Comments</i>
	Oct 4	qPCR	5-10	+	ver Anexo 1
	Nanog	Inmunofluorescencia/ qPCR	10/5-10	+	ver Anexo 1
	Sox 2	qPCR	5-10	+	ver Anexo 1
	SSEA3				
	SSEA4	Inmunofluorescencia	10	+	ver Anexo 1
	TRA-1-60	Inmunofluorescencia	10	+	ver Anexo 1
	TRA-1-81				
	Fosfatasa. Alk	Actividad	8	+	ver Anexo 1
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Método Comentarios	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	<i>Comments</i>
	Ectodermo	In vitro Dif.	PAX6/ TUJ1	8	+
	<i>Ectoderm</i>				ver Anexo 2
	Mesodermo	In vitro Dif.	DESMIN	8	+
	<i>Mesoderm</i>				ver Anexo 2
	Endoderm	In vitro Dif.	AFP	8	+
	<i>Endoderm</i>				ver Anexo 2
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida) <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	Diferenciación de cuerpos embrioides (EBs) hacia las tres capas germinales durante 14-16 días: - Ectodermo: cultivo de EBs en medio de iPSCs suplementado con Noggin y A83. Después de 11 días, cultivo en medio Neurobasal suplementado con B27, Glutamax, BDNF, GDNF, ácido ascórbico, cAMP y TGFbeta-3. - Mesodermo: cultivo de EBs en medio de iPSCs suplementado con ác. Ascórbico. - Endodermo: cultivo de EBs en medio de iPSCs. Differentiation of EBs to the three germ layers for 14-16 days: - Ectoderm: EBs in iPSCs culture medium supplemented with Noggin and A83. After 11 days, in Neurobasal medium supplemented with B27, Glutamax, BDNF, GDNF, ascorbic acid, cAMP and TGFbeta-3. - Mesoderm: EBs in iPSCs culture medium supplemented with ascorbic acid. - Endoderm: EBs in iPSCs culture medium.				

<p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="440 152 619 241">Comentarios</th> <th data-bbox="619 152 751 241">Método <i>Method</i></th> <th data-bbox="751 152 884 241">Marcador <i>Marker</i></th> <th data-bbox="884 152 1016 241">Nº pase <i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1016 152 1230 241">Resultado <i>Results</i></th> <th data-bbox="1230 152 1442 241">Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="440 241 619 405">Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="440 405 619 495">Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="440 495 619 600">Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Comentarios	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>						Mesodermo <i>Mesoderm</i>						Endodermo <i>Endoderm</i>					
Comentarios	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																				
Ectodermo <i>Ectoderm</i>																									
Mesodermo <i>Mesoderm</i>																									
Endodermo <i>Endoderm</i>																									
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>																									
<p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>46 XY; Pase 19, realizado con CytoScan HD. Ver Anexo 3</p> <p>46 XY; Passage 19, performed using CytoScan HD. See Annex 3</p>																								
<p>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the cell line</i></p>																									
<p>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>El método de reprogramación celular empleado es no integrativo. Ver a continuación.</p> <p>The cell reprogramming method used is not integrative. See next.</p>																								

<p>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>Mediante RT-PCR. Se ha analizado y detectado ausencia de expresión de los transgenes así como del genoma SeV en la línea Ctrl3. Ver Anexo 4</p> <p>By RT-PCR. We analyzed and detected the absence of transgene expression and SeV genome in line Ctrl3. See Annex 4</p>
<p>Confirmación del diagnóstico genotípico en las iPSC generadas a partir de muestras con mutación genética <i>Confirmation of genotypic diagnosis of the cell line generated from samples with genetic mutation</i></p>	
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Negativo por PCR. Ver Anexo 5</p> <p>Negative by PCR. See Annex 5</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Carlos Vicario Abejón</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avenida Doctor Arce 37 28002 Madrid, España</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Instituto Cajal-CSIC y CIBERNED</p>	<p>Teléfono (phone): 34-91-5854721</p> <p>Fax: 34-91-5854754</p> <p>E-mail: cvicario@cajal.csic.es</p>

SECCIÓN 4 INFORMACIÓN ADICIONAL (OPCIONAL)

Section 4 Additional information (optional)

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

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

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 5 DECLARACIÓN

Confirmando 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 <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre</i> Ignacio Torres Alemán <p style="text-align: right;">Fecha/ Date:</p> 23/02/2017	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> Carlos Vicario Abejón <p style="text-align: right;">Fecha /Date</p> 23/02/2017
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Ignacio Torres Alemán, Director	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Instituto Cajal-CSIC, Avenida Doctor Arce, 37 28002 Madrid España	Teléfono /Telephone: 34-91-5854721 Fax: 34-91-5854754 E-mail: cvicario@cajal.csic.es

SECCIÓN 5 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 <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre</i> Ignacio Torres Alemán  Fecha/ Date: 23/02/2017	 Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> Carlos Vicario Abejón  Fecha /Date 23/02/2017
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Ignacio Torres Alemán, Director	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Instituto Cajal-CSIC, Avenida Doctor Arce, 37 28002 Madrid España	Teléfono /Telephone: 34-91-5854721 Fax: 34-91-5854754 E-mail: cvicario@cajal.csic.es