

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: 01/09/2018

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>	Ctrl2-FiPS5F2		
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>	Fibroblastos del prepucio humano / The human foreskin fibroblasts ATCC CRL2429		
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Hombre Male	4 años Age 4	
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input checked="" type="checkbox"/> No	SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) Yes (specify)	
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input checked="" type="checkbox"/> No	SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) Yes (specify)	

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input checked="" 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>	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 13/01/2016
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	DMEM (Invitrogen 21969-035), 2mM Glutamax (Invitrogen #35050-038), 1x Penstrep, 20% FBS (Gibco #10270-106).
Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de las células de origen <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the original cells.</i>	Si (ver Anexo) Yes (see Annex)
¿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 pase 8 Yes passage 8
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) Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	mRNA Reprogramming Kit (Stemgent): OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, c-MYC mRNAs.
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>	Cultivo sobre fibroblastos humanos del prepucio. Medio de cultivo hESC: KO DMEM, KSR 20%, Glutamax 2mM, aminoácidos no esenciales 0.1mM, β-mercaptoetanol 0.23mM, basic FGF 10ng/mL, and penicilina/streptomycin. Pase manual cada 6-8 días. Culture on human foreskin feeders. Culture medium hESC: KO DMEM, KSR 20%, Glutamax 2mM, non essential amino acids 0.1mM, β-mercaptoethanol 0.23mM, basic FGF 10ng/mL and penicilina/streptomycin. Cells were mechanically passaged every 6-8 days.
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 culture (form and size of the colonies; form and size of the cells; nucleus/cytoplasm ratio;</i>	Colonias poligonales 1-2mm en diámetro. Elevada relación núcleo/ citoplasma. Polygonal colonies 1-2mm diameter large. High nucleus/cytoplasm ratio.

<p>others)</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>Solution A: 50% hESC medium, 50% KSR; Solution B: 80% hESC medium, 20% DMSO (Sol A:Sol B =1:1)</p> <p>Criopreservados en contenedor de isopropanol a -80°C y posteriormente en nitrógeno líquido. Descongelación rápida a 37°C. Cryopreserved in isopropanol container at -80°C, over night, and stored in liquid nitrogen the next day. Rapid thawing at 37°C.</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>Pase 12 Passage 12</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"/></p> <p>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

<p>Test de pluripotencia <i>Pluripotency test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Método <i>Method</i></th> <th>Nº pase <i>Passage n.</i></th> <th>Resultado <i>Results</i></th> <th>Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Oct 4</td> <td></td> <td>Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; RT-PCR</td> <td>(Annex)</td> </tr> <tr> <td>Nanog</td> <td></td> <td>Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry;</td> <td>(Annex)</td> </tr> <tr> <td>Sox 2</td> <td></td> <td>Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; RT-PCR</td> <td>(Annex)</td> </tr> <tr> <td>SSEA3</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA4</td> <td></td> <td>Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; Flow cytometry</td> <td>(Annex)</td> </tr> <tr> <td>TRA-1-60</td> <td></td> <td>Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry</td> <td>(Annex 2)</td> </tr> <tr> <td>TRA-1-81</td> <td></td> <td>Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry</td> <td>(Annex)</td> </tr> <tr> <td>Fosfatasa. Alk</td> <td></td> <td>Si/ Yes</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Método <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	Oct 4		Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; RT-PCR	(Annex)	Nanog		Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry;	(Annex)	Sox 2		Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; RT-PCR	(Annex)	SSEA3				SSEA4		Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; Flow cytometry	(Annex)	TRA-1-60		Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry	(Annex 2)	TRA-1-81		Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry	(Annex)	Fosfatasa. Alk		Si/ Yes	
Método <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																																		
Oct 4		Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; RT-PCR	(Annex)																																		
Nanog		Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry;	(Annex)																																		
Sox 2		Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; RT-PCR	(Annex)																																		
SSEA3																																					
SSEA4		Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; Flow cytometry	(Annex)																																		
TRA-1-60		Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry	(Annex 2)																																		
TRA-1-81		Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry	(Annex)																																		
Fosfatasa. Alk		Si/ Yes																																			
<p>Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Comentarios</th> <th>Método <i>Method</i></th> <th>Marcador <i>Marker</i></th> <th>Nº pase <i>Passage n</i></th> <th>Resultado <i>Results</i></th> <th>Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td>Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry</td> <td>TUJ-1</td> <td></td> <td>(Annex)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry</td> <td>SMA</td> <td></td> <td>(Annex)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endoderm <i>Endoderm</i></td> <td>Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry</td> <td>AFP</td> <td></td> <td>(Annex)</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>	Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry	TUJ-1		(Annex)		Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry	SMA		(Annex)		Endoderm <i>Endoderm</i>	Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry	AFP		(Annex)													
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>	Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry	TUJ-1		(Annex)																																	
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry	SMA		(Annex)																																	
Endoderm <i>Endoderm</i>	Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry	AFP		(Annex)																																	
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i></p> <p><i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i></p>	<p>Ensayo de EBs. Las colonias iPSC se levantaron manualmente y cultivaron en condiciones no adherentes en medio hESC desprovisto de bFGF, durante 7 días. Posteriormente, los EBs fueron sembrados sobre cubreobjetos tratados con 0.1% de gelatina durante 2h a temperatura ambiente y cultivados dos semanas en el mismo medio (ver Anexo).</p> <p>EB assay: the iPSC colonies were lifted manually and cultured in non-adherent conditions in hESC medium without bFGF the following 6 days. Thereafter, the EBs were seeded on glass coverslips treated with 0,1% gelatin for 2 h/RT and cultured during 2 weeks in the same cell culture medium (see Annex).</p>																																				

<p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Método</th> <th>Marcador</th> <th>Nº pase</th> <th>Resultado</th> </tr> <tr> <th>Comentarios</th> <th><i>Method</i></th> <th><i>Marker</i></th> <th><i>Passage n</i></th> <th><i>Results</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ectodermo (Annex) <i>Ectoderm</i></td> <td colspan="4">Teratoma análisis histológico/Histological analysis of teratoma</td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td colspan="4">Teratoma análisis histológico/Histologic analysis of teratoma(Annex)</td> </tr> <tr> <td>Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td colspan="4">Teratoma análisis histológico/Histologic analysis of teratoma(Annex)</td> </tr> </tbody> </table>		Método	Marcador	Nº pase	Resultado	Comentarios	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>	Ectodermo (Annex) <i>Ectoderm</i>	Teratoma análisis histológico/Histological analysis of teratoma				Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Teratoma análisis histológico/Histologic analysis of teratoma(Annex)				Endodermo <i>Endoderm</i>	Teratoma análisis histológico/Histologic analysis of teratoma(Annex)			
	Método	Marcador	Nº pase	Resultado																						
Comentarios	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>																						
Ectodermo (Annex) <i>Ectoderm</i>	Teratoma análisis histológico/Histological analysis of teratoma																									
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Teratoma análisis histológico/Histologic analysis of teratoma(Annex)																									
Endodermo <i>Endoderm</i>	Teratoma análisis histológico/Histologic analysis of teratoma(Annex)																									
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>	<p>Células iPSC resuspendidas en medio de cultivo se inyectan subcutáneamente en la espalda de ratón SCID. Tras 8 semanas se forman teratomas de 1 cm de diámetro, se analizan los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina.</p> <p>iPS cells resuspended in culture medium are injected subcutaneously in SCID mice. After 8 weeks teratomas are formed of 1cm of diameter, excised, fixed and stained by hematoxilin/eosin.</p>																									
<p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>Cariotipo normal masculino (ver Anexo) p.10 Normal male karyotype (see Annex) p.10</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>Si (ver Anexo) Yes (see Annex)</p> <p>Microsatélites analizados/Microsatellite markers analysed: TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818 y D21S11, Amelogenin</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>Método no integrativo Non-integrative method</p>																									

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	
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>	
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Negativo Negative

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
Section 3 Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Dr.Slaven Erceg Vukicevic	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> c/Eduardo Primo Yúfera 3, Valencia 46012
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> FCV Centro de Investigación Príncipe Felipe	Teléfono (phone): +963289680 Fax: E-mail: serceg@cipf.es

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

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>	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> Dr. Slaven Erceg Vukicevic  Fecha / Date: 01/09/2018
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Dña. Deborah Burks Directora 	 Fecha / Date 06/09/2018
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> FCV Centro de Investigación Príncipe Felipe C/ D' Eduardo Primo Yúfera, 3 46012 Valencia	Teléfono / Telephone ++34 963289680 Fax: E-mail: