

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA

Application Form to Deposit a Human Cell Line

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: pES[12]

Name of the line: pES[12]

Investigador principal: Juan Carlos Izpisúa Belmonte. Anna Veiga Lluch. Rita Vassena.

Principal Investigator:

Origen de la línea celular:

Origin of the cell line

Embrionario **Fetal** **Adulto**
Embryonic *Fetal* *Adult*

¿La línea celular ha sido derivada de un embrión con anomalía genética?

Has the cell line been derived from an embryo with genetic anomaly?

NO **SÍ** (especificar)
No *Yes* *(specify)*

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

Genetic identity of the cell line. Method and result

SECCIÓN 2

Section 2

Datos del Depositante

Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Juan Carlos Izpisúa Belmonte Anna Veiga Lluch Rita Vassena	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Dr Aiguader 88 08003 Barcelona
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona	Teléfono (phone): 93 3160360 Fax: 93 3160362 E-mail: blc@cmrb.eu

SECCIÓN 3

Section 3

Datos de la Línea Celular

Details of Cell Line

Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...) <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> Embrión humano partenogenético en estadio de blastocisto <i>Blastocyst-stage parthenogenetic human embryo</i>	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> <p style="text-align: right;">Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i> <input type="checkbox"/></p>	
Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> 27.01.2010	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 27.01.2010
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 27.01.2010	

Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto) <i>General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue)</i> <p>El ovocito donado fue activado mediante exposición secuencial a Ionomicina y 6DMAP. Tras 6 días de cultivo, se eliminó la zona pelúcida (ZP) del embrión mediante pronasa. Se sembró y co-cultivó el blastocisto desprovisto de ZP sobre una monocapa de fibroblastos irradiados y medio de cultivo hES.</p> <p><i>The donated oocyte was activated by sequential exposure to ionomycin and 6DMAP. After 6 days in culture, the embryo achieved the blastocyst stage. The zona pel-lucida (ZP) was removed using pronase. The blastocyst was seeded and cultured in hES medium on top of a irradiated feeder-layer.</i></p>

En caso de muestra embrionaria, indicar si se utilizaron blastómeros o células de la masa celular interna y el método de aislamiento utilizado

If of embryonic origin, indicate whether blastomeres or internal cell mass were used, as well as the isolation method

Se sembró el blastocisto entero desprovisto de la zona pelúcida, sin aislamiento de la masa celular interna.

The whole blastocyst was seeded without zona pel-lucida, without prior isolation of the inner cell mass.

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 foreskin fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, CCD1112Sk).

Culture medium: Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mmol/l

GlutaMAX (Gibco, InVitrogen corporation), 0,05mmol/l 2-mercaptoethanol (Gibco, InVitrogen corporation), 8

ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Cambrex), 20%

Knockout Serum Replacement (InVitrogen) y 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation).

Mantenimiento de la línea: Line maintenance

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

Método de pase: *Passage method mecánico y enzimático; mechanical and enzymatic*

Xenobióticos

Xenobiotics

si X

Yes X

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 have several forms and smooth edges. High nucleus/cytoplasm ratio.

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

Análisis de esterilidad, hongos, ureplasma y micoplasma. (ver Anexo 2)

Sterility analysis, fungi, ureplasm and mycoplasm. (see Annex 2)

Marcadores: ver Anexo 3*Markers: see Annex 3*

	Método (ARN/proteínas) Method (RNA/proteins)	nº pase Passage n.	resultado results	comentarios comments
Oct 4	inmunofluorescencia	11	+	
Nanog	inmunofluorescencia	11	+	
Rex				
Sox 2	inmunofluorescencia	11	+	
SSEA3	inmunofluorescencia	11	+	
SSEA4	inmunofluorescencia	11	+	
TRA-1-60	inmunofluorescencia	11	+	
TRA-1-81	inmunofluorescencia	11	+	
Telomerasa				
Fosfatasa Alk.	actividad	13	+	
Cariotipo / Karyotype		14	46,XX	(ver Anexo 4)
Otros / Others				

Capacidad de diferenciación*Differentiation capacity*

	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 <i>In vitro</i> Ver Anexo 5	Tuj1	10	+	α-feto proteina	10	+	ASMA	10	+
							AAS	10	+
							GATA4		+
In vivo/ in vivo Ver Anexo 6	Método: formación de teratomas en ratones SCID <i>Method: teratoma formation in SCID mice</i>						Resultado: + <i>Result: +</i>		

Descripción de las características de diferenciación *in vitro*

Description of the differentiation characteristics in vitro

Mesodermo: cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en medio de cultivo suplementado con ácido ascórbico.
Endodermo: cultivo de cuerpos embrioides. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27.

Mesoderm: Embryoids bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27..

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

Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation

Inyección intratesticular y subcutánea en ratones SCID de clumps de células indiferenciadas y tras aproximadamente 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo. (ver Anexo 6).

Clumps of undifferentiated cells were injected into the testis and under the skin of SCID mice. Around 8 weeks later teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (see Annex 6).

Datos de la tipificación HLA

HLA typification data

Ver Anexo 1

See Annex 1

Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.

Cell consistency after 6 passages of freezing and thawing. Results.

Se observa consistencia celular tras congelación y descongelación con crecimiento adecuado y características de indiferenciación.

Cellular consistency after freezing and thawing, with adequate growth and undifferentiation characteristics.

Pase en el momento del registro 18

Passage at the time of the recording

¿Ha sido la línea modificada genéticamente?

Has the line been genetically modified?

Sí Yes

No No

Comentarios/ Comments:

¿Se llevó a cabo un análisis clonal?

Has a clonal analysis been carried out?

Sí/ Yes No

Resultado / Result

Otras observaciones o información relevantes (a juicio del Investigador Principal):
Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigator):

Línea homocigota monoparental con únicamente marca materna epigenética en genes imprintados.
Homozygote monoparental line with maternal only epigenetic mark on imprinted genes.

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.

<p>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></p> <p>CMR[B]</p> <p><small>Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Center of Regenerative Medicine in Barcelona</small></p> <p>Dr. Aiguader, 88 08003 BARCELONA NIF G-63687222</p> <p>Fecha/ Date: 01/09/2010</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p></p> <p>Fecha /Date 01/09/2010</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Miguel Gómez Clares. Presidente de la Junta de Gobierno</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Dr. Aiguader, 88 08003. Barcelona</p>	<p>Teléfono /Telephone: + 34 93 316 03 00</p> <p>Fax: + 34 93 316 03 01</p> <p>E-mail: com@cmrb.eu</p>