

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: CBiPS32-2F-2

Name of the line: CBiPS32-2F-2

Investigador principal: Juan Carlos Izpisúa Belmonte, Anna Veiga, Alessandra Giorgetti

Principal Investigator:

Tipo de célula de la que se obtiene la línea:

Cell type origin of the cell line

Células CD133+ de sangre de cordón umbilical.

¿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

Cariotipo/Karyotype Ver Anexo 1/See Annex 1

Euploide/Euploid **Anormal/Atypical** (especificar/specify) 46,XX

Ver Anexo 1
See Annex1

SECCIÓN 2 Section 2

Datos del Depositante Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Juan Carlos Izpisua Belmonte, Anna Veiga, Alessandra Giorgetti	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

Tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica <i>Tissue of origin and anatomic location of the biological sample</i> Células madre de sangre de cordón umbilical (CD133+) CD133+ cells from cord blood	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>	
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 17.08.2009	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 17.08.2009

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).

Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Cord Blood Using OCT4 and SOX2.

A. Giorgetti, N.Montserrat, T.Aasen, F.Gonzalez, I.Rodriguez-Pizà, R.Vassena, A.Raya, S.Boué, MJ.Barrero, B.Aran, M.Torrabadella, A.Veiga, JC. Izpisua Belmonte.

Cell Stem Cell 2009, 5; 353-357.

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

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

Ver Anexo 2/See Annex 2

Bacteriología negativa

(Bacteriology)

Micología negativa

(Mycology)

Micoplasma: PCR negativa

(Mycoplasma: by PCR)

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	8	+	
Nanog	inmunofluorescencia	8	+	
Rex 1 (opcional/optional)				
Sox 2	inmunofluorescencia	8	+	
SSEA3	inmunofluorescencia	8	+	
SSEA4	inmunofluorescencia	8	+	
TRA-1-60	inmunofluorescencia	8	+	
TRA-1-81	inmunofluorescencia	8	+	
Telomerasa/Telomerase (opcional/optional)				
Fosfatasa Alc. /Alkaline phosp.	Actividad	6	+	
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	Tuj1	9	+	AFP	9	+	ASA	9	+
<i>In vitro</i>	AAS	9	+	FoxA2	9	+			
<i>Anexo 4</i>									

In vivo/ in vivo (ver Anexo 5)
*pase/passage 11***Método:** formación de teratomas en ratones SCID
*Method: teratoma formation in SCID mice***Resultado: +**
*Result: +***OPCIONAL/OPTIONAL:****Reprogramación del perfil de expresión génica***Reprogramming of gene expression profile*

Sí. Q-RT-PCR de 6 genes de pluripotencia (Oct4, Sox2, Klf4, C-Myc, Nanog, Rex1 y Cripto)

Yes. Q-RT-PCR of pluripotency genes (Oct4, Sox2, Klf4, C-Myc, Nanog, Rex1 and Cripto)

Reprogramación del perfil de metilación del ADN*Reprogramming of DNA methylation profile*

Sí. Análisis de metilación del DNA del promotor Oct4. El resultado indicó activación estable del gen.

Yes. Bisulfite mutagenesis DNA analysis of Oct4 promoter methylation. The result indicated stable activation of the gene.

Longitud telomérica*Telomere length*

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 en medio de cultivo. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27 sobre células PA6 (ver Anexo 4).

Mesoderm: Embryoids bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture in culture medium. Ectoderm: EBs culture in N2/B27 on PA6 cells (see Annex 4).

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

Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation

Inyección intratesticular 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 5).

Clumps of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. Around 8 weeks later teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (see Annex 5).

Datos de la tipificación HLA

HLA typification data

Se realizó estudio de HLA en solamente una de las líneas obtenidas a partir de la misma muestra, ya que el HLA no varía y es el mismo para todos los clones. En este caso se realizó estudio de HLA de la línea CBiPS32-3F-10.

HLA analysis was done only for one of the lines obtained from the same sample because it is the same in all the clones. In this case, HLA was done for CBiPS32-3F-10 line.

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

Integration of reprogramming transgenes: gPCR for provirus integration

La gPCR evidenció la integración de los 2 genes; OCT4 y SOX2

gPCR showed the integration of the 2 genes; OCT4 and SOX2

Silenciamiento de los transgenes de reprogramación: RT-PCR o Q-RT-PCR

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

Se evidenció la silenciación de los 2 genes utilizados en la reprogramación.

Silencing of both reprogramming genes has been shown

Mantenimiento a largo plazo en cultivo: > 20 pases

Long-term maintenance in culture: >20 passages

La línea se ha mantenido en cultivo durante 25 pases

The line has been cultured during 25 passages

Pase en el momento del registro

Passage at the time of the recording

25

<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i></p> <p>Sí Yes <input checked="" type="checkbox"/> No No <input type="checkbox"/></p> <p>Comentarios/ Comments:</p>	<p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i></p> <p>Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Resultado / Result</p>
---	---

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 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: 20/12/2010	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>  Fecha/ Date: 20/12/2010
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	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Dr. Aiguader, 88 08003. Barcelona	Teléfono / Telephone: +34 93 316 03 00 Fax: +34 93 316 03 01 E-mail: com@cmrb.eu