

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. Detail cell type, tissue of origin and anatomic location of the biological sample from which the original line is obtained. 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)</i> <i>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 (Annex)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Nanog</td> <td></td> <td>Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; (Annex)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sox 2</td> <td></td> <td>Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; RT-PCR (Annex)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA3</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA4</td> <td></td> <td>Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; Flow cytometry(Annex)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TRA-1-60</td> <td></td> <td>Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry (Annex 2)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TRA-1-81</td> <td></td> <td>Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry (Annex)</td> <td></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 (Annex)</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry</td> <td>SMA (Annex)</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endoderm <i>Endoderm</i></td> <td>Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry</td> <td>AFP (Annex)</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>	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 (Annex) <i>Mesoderm</i></td> <td colspan="4">Teratoma análisis histológico/Histologic analysis of teratoma</td> </tr> <tr> <td>Endodermo (Annex) <i>Endoderm</i></td> <td colspan="4">Teratoma análisis histológico/Histologic analysis of teratoma</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 (Annex) <i>Mesoderm</i>	Teratoma análisis histológico/Histologic analysis of teratoma				Endodermo (Annex) <i>Endoderm</i>	Teratoma análisis histológico/Histologic analysis of teratoma			
	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 (Annex) <i>Mesoderm</i>	Teratoma análisis histológico/Histologic analysis of teratoma																									
Endodermo (Annex) <i>Endoderm</i>	Teratoma análisis histológico/Histologic analysis of teratoma																									
<p>Descripción de las características de diferenciación in vivo <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 hematoxin/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>																									

<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>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 Negative</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
Section 3 Applicant Details

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

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: