

**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: 05/04/2019

**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*

<b>Nombre de la línea iPS</b> <i>Name of the iPS line:</i>	HDF-iPS-SV10
<b>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.</b> <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 dermales comerciales/ Human Dermal Fibroblast : HDFa cat # 2320 (old cat. no 2310) ScienCell Research Laboratory
<b>Sexo y edad del donante.</b> <i>Sex and age of the donor</i>	mujer                      edad desconocida (adulto) Al ser una línea comercial no indican edad female                      age unknown (adult) Because is a commercial line age is not indicated
<b>¿El donante tiene alguna patología?</b> <i>Has the donor any pathological condition?</i>	<b>NO</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>SÍ</b> <input type="checkbox"/> (especificar) No    Yes                      (specify)
<b>¿La patología es de origen genético?</b> <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	<b>NO</b> <input type="checkbox"/> <b>SÍ</b> <input type="checkbox"/> (especificar) No    Yes                      (specify)

<b>Muestra biológica recibida</b> <i>Biological sample</i>	<p style="text-align: center;"> <b>Fresco</b> <input type="checkbox"/>                      <b>Crioconservado</b> <input checked="" type="checkbox"/>  <i>Fresh</i>    <i>Cryopreserved</i> </p>
<b>Fecha de la donación de la muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i>	<b>Fecha del uso o descongelación</b> <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> <p>Las células se descongelaron el 19 de Julio de 2013, se expandieron y volvieron a congelar. Los crioviales se mantuvieron en nitrógeno líquido  Cells were thawed on July 19th, 2013, were expanded and frozen again.  Cryovials were maintained in liquid nitrogen.</p>
<b>Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario).</b> <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	<p>Los fibroblastos se mantuvieron en cultivo con medio DMEM high glucose, Glutamax, Pen/Strep, 10%FBS</p> <p>Dermal fibroblasts were maintained in culure using DMEM high glucose, glutamax 10%FBS</p>
<b>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de las células de origen</b> <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the original cells.</i>	<p>-Anexo 4. 9 loci de repeticiones cortas en tandem (SRT), más Amelogenina para determinar el sexo fueron amplificadas mediante PCR con el kit GenePrint 10 (Promega) La línea celular fue analizada con un ABI Prism 3730xl Genetic Analyzer. Los datos se analizaron usando un software Osiris v2.6 (NCBI,NIH).</p> <p>Annexe 4. 9 short tandem repeat (STR) loci, plus Amelogenin for gender determination, were PCR amplified with the GenePrint 10 kit (Promega). The cell line sample was subsequently analysed using an ABI Prism 3730xl Genetic Analyzer. Data were analyzed using Osiris v2.6 software (NCBI, NIH).  TH01: 6, 9;D21S11: 29, 32.2;D5S818: 11,12;D13S317: 9,10;D7S820: 11;D16S539: 9, 13;CSF1PO: 12,13;AMEL: X;vWA: 16,17;TPOX: 10,11-</p>
<b>¿Hay disponibilidad de viales congelados de las células de origen? ¿En qué pase?</b> <i>Is there availability of frozen vials of original cells? At what passage?</i>	<p>Hay disponibilidad de viales congelados de P6</p> <p>Frozen Vials are available at P6</p>
<b>Método utilizado en la generación de la línea iPSc. (Integrativa/ No-integrativa) Especificar factores y plásmidos de reprogramación utilizados.</b> <i>Method used for the generation of iPSC line (Integrative / Non-integrative) Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	<p>Sistema no integrativo de Invitrogen -Cytotune- iPS reprogramming Kit . Factores de reprogramación usados: CytoTune™ Sendai hOct3/4, CytoTune™ Sendai hSox2, CytoTune™ Sendai hKlf4, CytoTune™ Sendai hc-Myc.</p> <p>Non integrative methodology supplied from Invitrogen- Cytotune- iPS reprogramming Kit . Reprogramming factors were: CytoTune™ Sendai hOct3/4, CytoTune™ Sendai hSox2, CytoTune™ Sendai hKlf4, CytoTune™ Sendai hc-Myc.</p>
<b>Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia)</b> <i>iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	<p>Se han seguido las condiciones de cultivos descritas en el manual -Cytotune- iPS reprogramming Kit. Sucesivamente se siguieron protocolos de adaptación a medio E8-(Essential 8 medium de Thermo Fisher cat # A1517001 )</p> <p>Culture conditions were described by -Cytotune- iPS reprogramming Kit manual. The iPS cell line was succesively adapted to Essential 8 medium -Thermo Fisher cat#A1517001</p>



<p><b>Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)</b>  <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; others)</i></p>	<p>Las iPSCs generadas forman colonias grandes presentan morfología redondeada y ligeramente aplanada, con alta relación núcleo/citoplasma (Anexol)</p> <p>The generated iPSCs form big rounded and flat colonies with high nucleus/cytoplasm ratio</p>
<p><b>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación)</b>  <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i></p>	<p>La línea iPSCs generada se congela con el método descrito en el manual de Cytotune-ipS regramming Kit, con el kit de Thermo Fisher PSC Cryopreservation Kit cat # A2644601 o con FBS/10%DMSO. se descongelan añadiendo Rock Inhibitor 10µM al medio.</p> <p>The iPSCs is criopreserved following the protocol described in the Cytotune manual, or using the PSC Cryopreservation Kit cat#A2644601 from Thermo Fisher</p>
<p><b>Pase de la línea celular en el momento del banqueo/registro. (Máximo: Pase 15)</b>  <i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i></p>	<p>Hay viales congelados a partir de P11</p> <p>Frozen vials at different passages are available from P11</p>
<p><b>¿Ha sido la línea modificada genéticamente?</b>  <i>Has the line been genetically modified?</i>  <b>Sí Yes <input type="checkbox"/> No No <input type="checkbox"/></b></p> <p><b>Comentarios/ Comments:</b></p>	<p><b>¿Se llevó a cabo un análisis clonal?</b>  <i>Has a clonal analysis been carried out?</i></p> <p><b>Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Resultado / Result</b></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

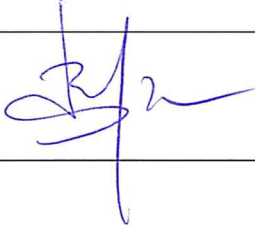
Test de pluripotencia <i>Pluripotency test</i>	Método <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	
<b>Oct 4</b>	RT-PCR/Inmunocitoq	p12/p26	+	Anexo1/Annex1	
<b>Nanog</b>	Inmunocitoq	p26	+	Anexo1/Annex1	
<b>Sox 2</b>	RT-PCR	p12	+	Anexo1/Annex1	
<b>SSEA3</b>	Inmunocitoq/ RT-PCR Klf4	p26/p12	+	Anexo1/Annex1	
<b>SSEA4</b>	RT-PCR/Inmunocitoq	p12/p26	+	Anexo1/Annex1	
<b>TRA-1-60</b>	Inmunocitoq/RT-PCR MYC	p26/p12	+	Anexo1/Annex1	
<b>TRA-1-81</b>	RT-PCR/Inmunocitoq	p18/p26	+	Anexo1/Annex1	
<b>Fosfatasa. Alk</b>	Actividad/activity	p12	+	Anexo1/Annex1	
Test de diferenciación <i>in vitro</i> <i>In vitro differentiation test</i>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
<b>Ectodermo</b> inmunocitoq <i>Ectoderm</i>	Tuj1/GFAP	p30	+		Anexo2/Annex2
<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq	SMA	p27	+	Anexo2/Annex2
<b>Endoderm</b> <i>Endoderm</i>	inmunocitoq	AFP	9	+	Anexo 2/Annex2
<b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida)</b>  <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	<p>Anexo 2. Generamos cuerpos embrioides como describe Giorgetti et al., 2009: Medio de endodermo: KODMEM (Gibco, Life Technologies), 10% FBS, 2mM Glutamax (Gibco, Life Technologies), 0.1 mM 2-β-mercaptoethanol, non-essential amino acids, and penicillinstreptomycin. Medio mesodermo: Medio endodermo + ácido ascórbico (0.5mM). Medio ectodermo: N2/B27 (Thermofisher scientific)</p> <p>Annex 2. We generated embrioid bodies as descrobed in Giorgetti et al., 2009 endoderm medium: KODMEM (Gibco, Life Technologies), 10% FBS, 2mM Glutamax (Gibco, Life Technologies), 0.1 mM 2-β-mercaptoethanol, non-essential amino acids, and penicillinstreptomycin. Mesoderm medium: endoderm medium + ascorbic acid (0.5mM). Ectoderm medium: N2/B27 medium (Thermofisher scientific)</p>				

<b>Test de diferenciación in vivo</b> <i>In vivo differentiation test</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="440 152 603 293">Comentarios</th> <th data-bbox="603 152 746 293">Método <i>Method</i></th> <th data-bbox="746 152 890 293">Marcador <i>Marker</i></th> <th data-bbox="890 152 1034 293">Nº pase <i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1034 152 1225 293">Resultado <i>Results</i></th> <th data-bbox="1225 152 1420 293">Resultados <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="440 293 603 405"><b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="440 405 603 517"><b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="440 517 603 607"><b>Endodermo</b> <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>	Resultados <i>Comments</i>	<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>						<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>						<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>					
Comentarios	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Resultados <i>Comments</i>																				
<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>																									
<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>																									
<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>																									
<b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i></b>  <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>																									
<b>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase)</b> <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	Anexo 3 /Annex 3 46,XX p21																								
<b>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular</b> <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the cell line</i>	<p>Anexo 4. 9 loci de repeticiones cortas en tandem (SRT), más Amelogenina para determinar el sexo fueron amplificadas mediante PCR con el kit GenePrint 10 (Promega) La línea celular fue analizada con un ABI Prism 3730xl Genetic Analyzer. Los datos se analizaron usando un software Osiris v2.6 (NCBI,NIH).</p> <p>Annexe 4. 9 short tandem repeat (STR) loci, plus Amelogenin for gender determination, were PCR amplified with the GenePrint 10 kit (Promega). The cell line sample was subsequently analysed using an ABI Prism 3730xl Genetic Analyzer. Data were analyzed using Osiris v2.6 software (NCBI, NIH).  TH01: 6, 9.3;D21S11: 29, 32.2;D5S818: 11,12;D13S317: 9,10;D7S820: 11;D16S539: 9, 13;CSF1PO: 12,13;AMEL: X;vWA: 16,17;TPOX: 10,11</p>																								
<b>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b> <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	Anexo 5. La integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación del Sendai Virus (OCT4, KLF4, SOX2, MYC) se confirmó mediante RT-PCR utilizando los primers endógenos o con secuencia del SeV según el manual CytoTune iPS Reprogramming Kit. La integración se confirmó con la reexpresión de los genes endógenos de pluripotencia. Se consideraron silenciados cuando su expresión era indetectable comparada con la de GAPDH.																								



<p><b>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b>  <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>Annexe 5. Integration/silencing of SeV transgenes (OCT4, KLF4, SOX2, MYC) was confirmed by RT-PCR using endogenous primers or with SeV sequence following CytoTune iPS Reprogramming Kit manual. Integration was confirmed with reexpression of endogenous pluripotency genes .Transgenes were considered silenced when expression levels were undetectable refer to GAPDH expression levels.</p>
<p><b>Confirmación del diagnóstico genotípico en las iPSC generadas a partir de muestras con mutación genética</b>  <i>Confirmation of genotypic diagnosis of the cell line generated from samples with genetic mutation</i></p>	<p>La línea HDF-iPS-SV10 procede de fibroblastos humanos dermales WT  HDF-iPS-SV10 line is derived from WT human dermal fibroblast</p>
<p><b>Test de micoplasma</b>  <b><i>Mycoplasma Test</i></b></p>	<p>La línea HDF-iPS-SV10 fue analizada utilizando el Kit MycoAlert PLUS Mycoplasma Detection y resultó estar libre de micoplasma.  HDF-iPS-SV10 line was analysed using Kit MycoAlert PLUS Mycoplasma Detection Kit and resulted free for mycoplasma</p>

**SECCIÓN 3      DATOS DEL DEPOSITANTE**  
*Section 3      Applicant Details*

<p><b>Investigador Principal:</b>  <i>Principal Investigator:</i>  Juan Antonio Bernal Rodríguez</p> 	<p><b>Dirección Postal:</b>  <i>Postal address:</i>  Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid SPAIN</p>
<p><b>Centro de Trabajo:</b>  <i>Institution:</i>  CNIC</p>	<p><b>Teléfono (phone):</b> +34-91-4531200 (3307)  <b>Fax:</b> +34-91-4531240  <b>E-mail:</b> juanantonio.bernal@cnic.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.*

<p><b>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre</b> (Representante legal del Departamento/Centro) Legal Representative of the Department/Centre)</p> <p>Alberto Sanz Belmar</p> <p>08/03/2019</p> 	<p><b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p>Juan Antonio Bernal Rodríguez</p> <p>08/03/2019</p>  <p>Fecha /Date</p>
<p><b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i></p> <p>Alberto Sanz Belmar Director Gerente</p>	
<p><b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i></p> <p>Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid SPAIN</p>	<p><b>Teléfono /Telephone:</b> +34-91-4531200</p> <p><b>Fax:</b> +34-91-4531240</p> <p><b>E-mail:</b> juanantonio.bernal@cnic.es</p>