



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **BS PBiPS46-Sv4F-10** EN EL
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Cariotipo

Anexo 4: Resultados microsatélites

Anexo 5: Silenciamiento de los transgenes de reprogramación

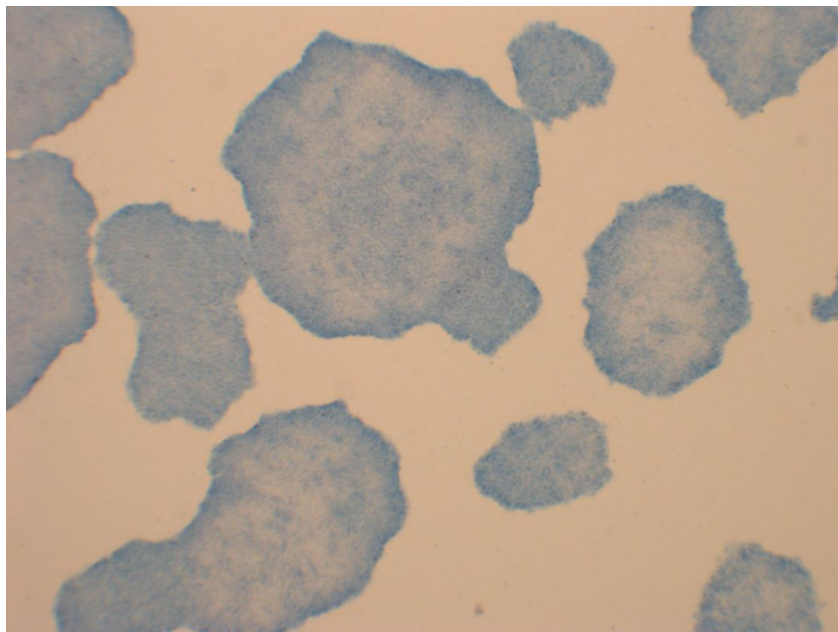
Anexo 6: Confirmación de la presencia de la mutación

Anexo 7: Resultado test de micoplasma

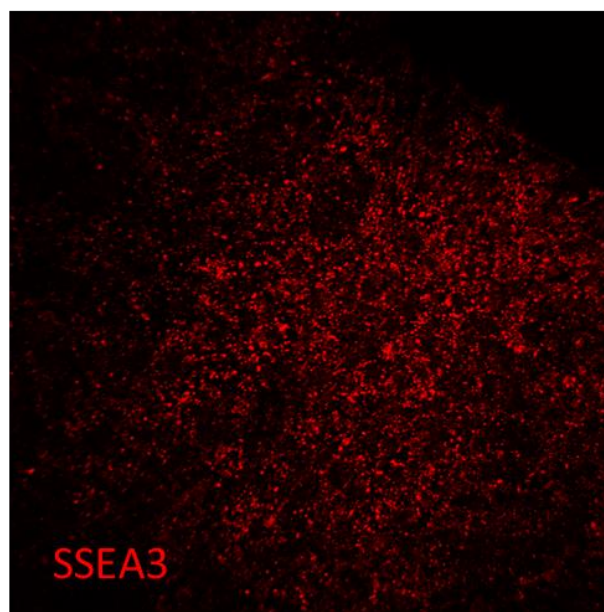
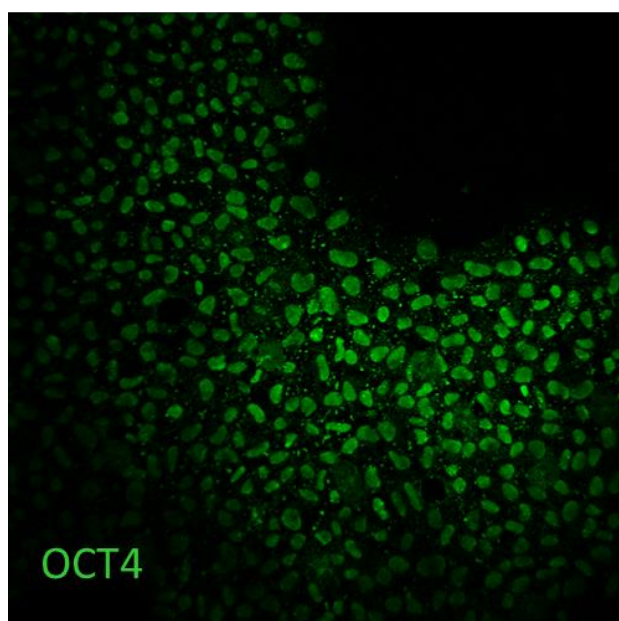
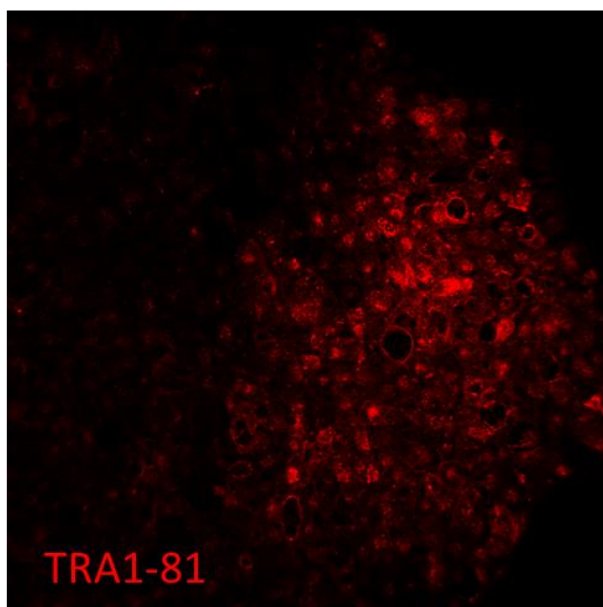
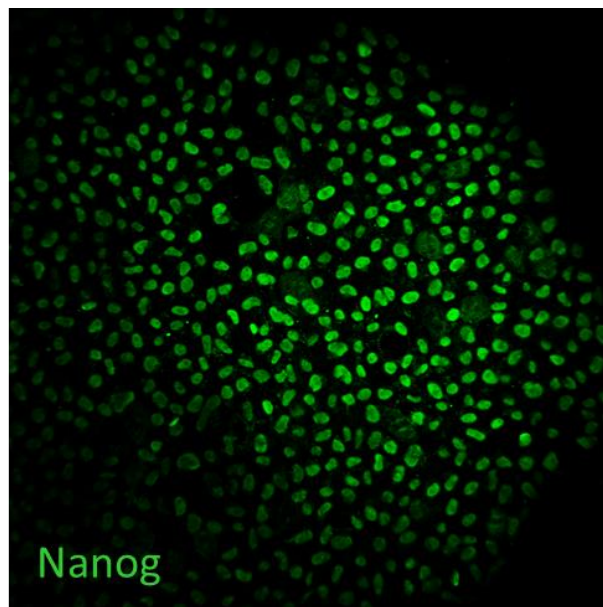


Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

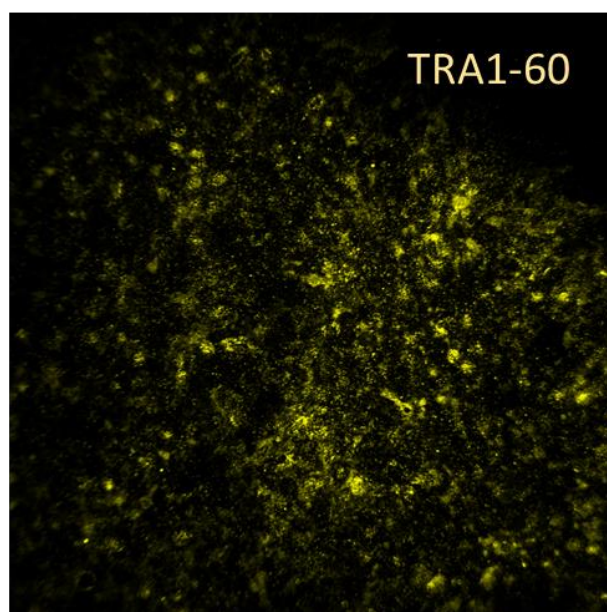
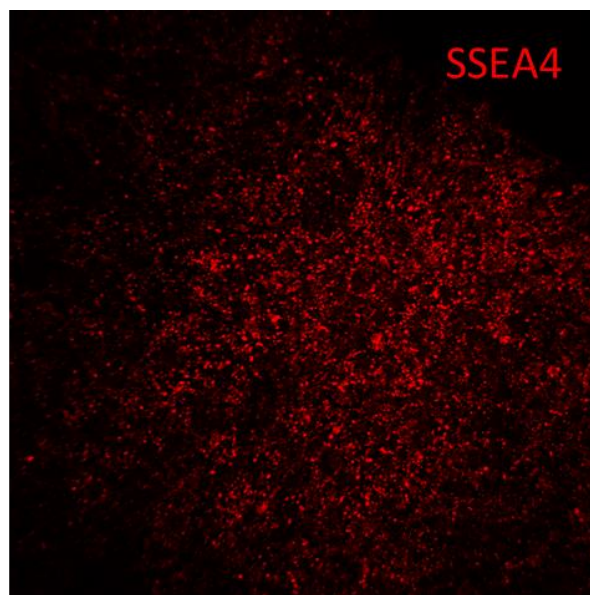
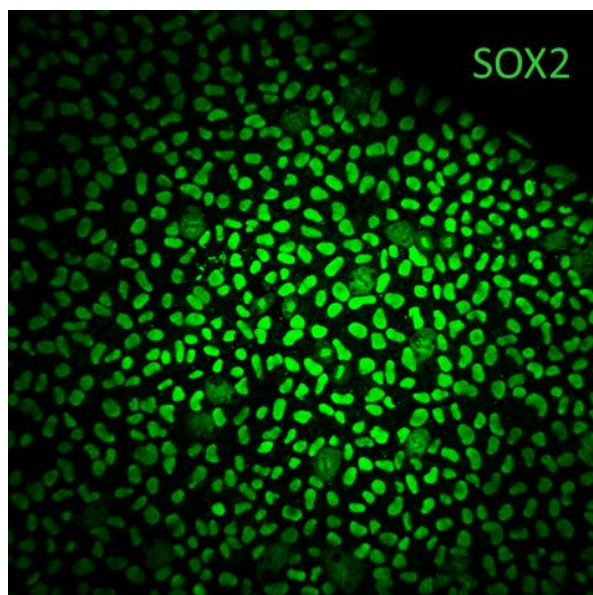


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog, TRA1-81, OCT4 y SSEA3.



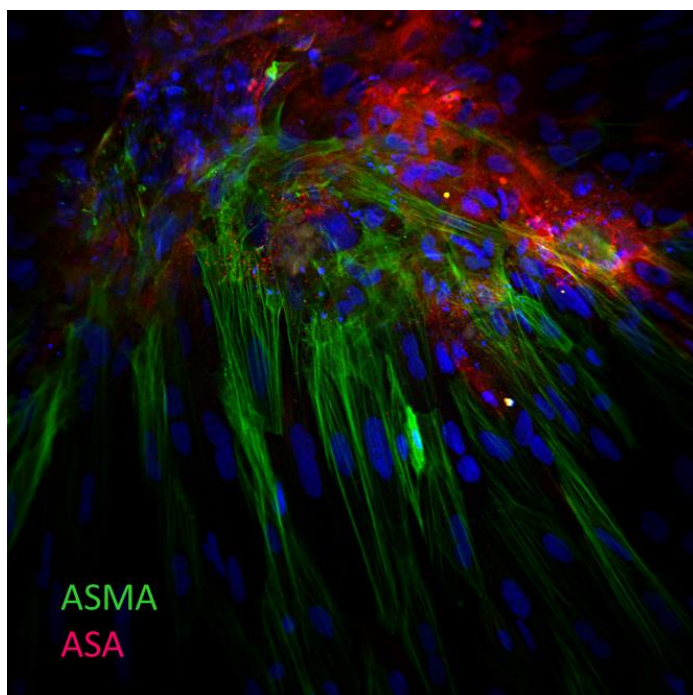
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

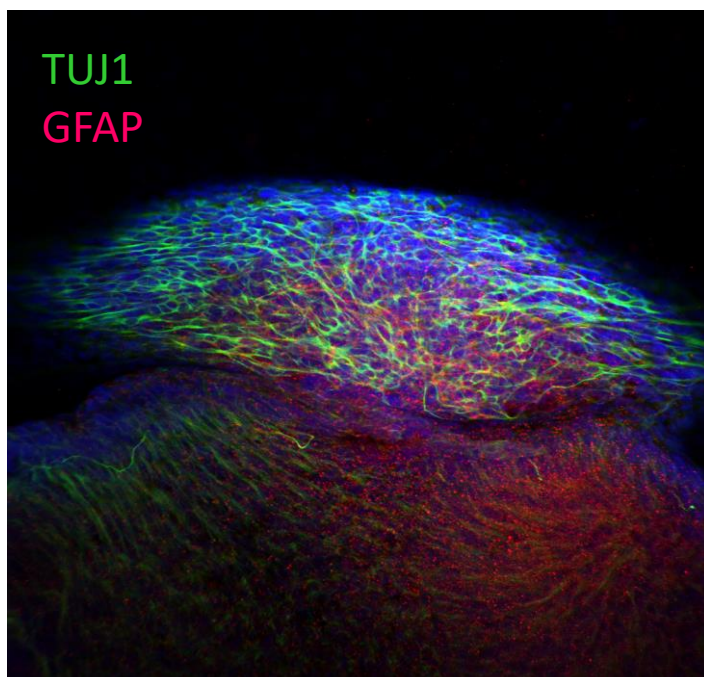


Anexo 2

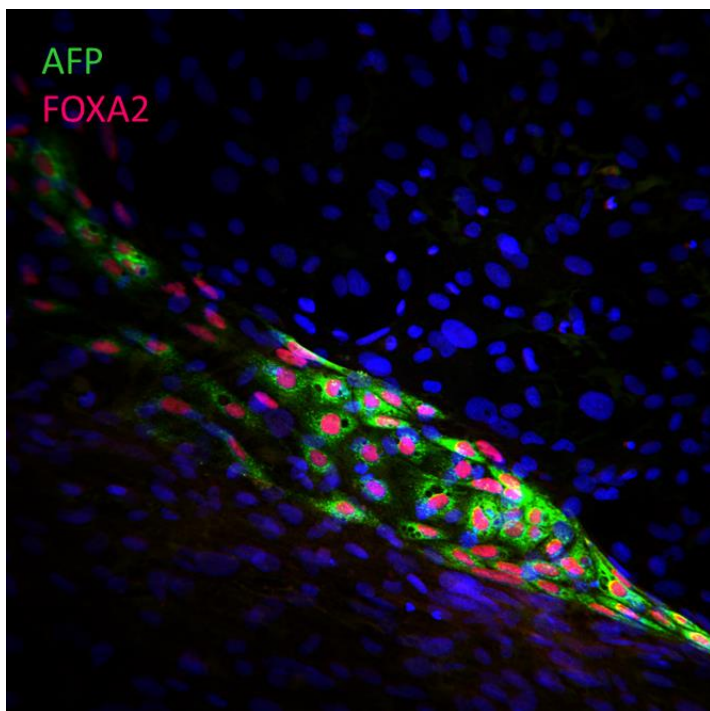
Diferenciación *in vitro*



Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para **ASMA y ASA**



Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1 y GFAP**



Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**



Anexo 3

Cariotipo

ESTUDI CITOGENETIC

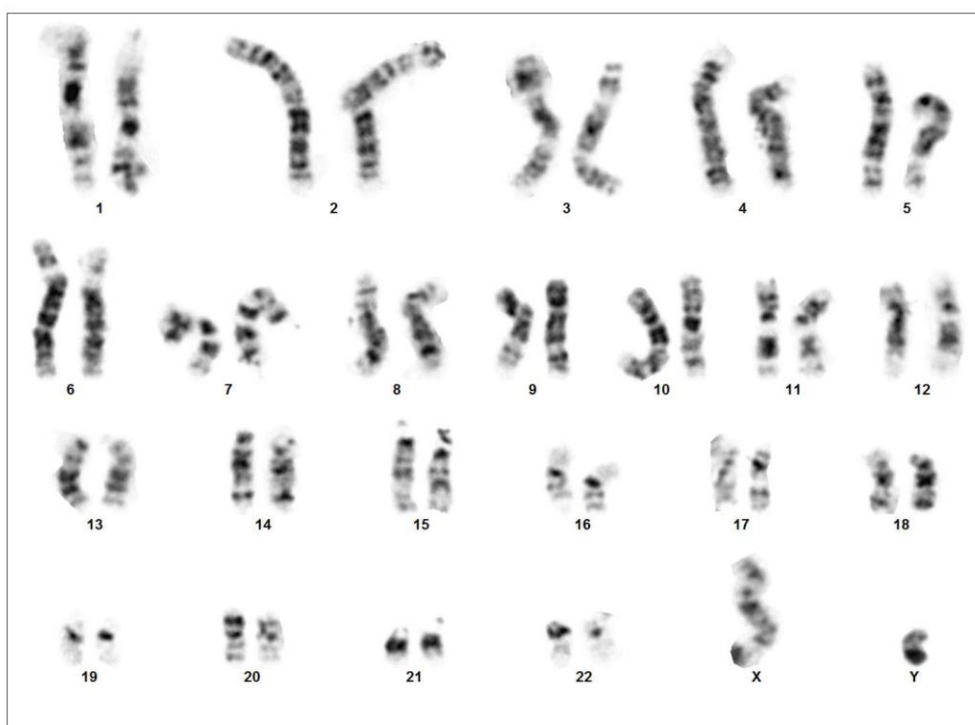
Case name: 92410481

NHC: CT0107

Nombre y Apellidos: BS PBiPS46 Sv4F-10 p14

Tipo de muestra: CM

Servicio: CMRB



Case: 92410481 Slide: 1 Cell: 6

Resultado: 46,XY



Anexo 4

Resultado microsatélites

Los resultados obtenidos son estudiados mediante el programa informático GeneMapper® 3.2. De acuerdo con la información suministrada por Promega® sobre su kit de amplificación GenePrint® 10 System, estos son los datos correspondientes de los alelos existentes para cada uno de los diferentes loci STR (figura1):



Table 5. The GenePrint® 10 System Allelic Ladder Information.

STR Locus	Label	Size Range of Allelic Ladder Components ^{1,2} (bases)	Repeat Numbers of Allelic Ladder Components
TH01	FL	156–195	4–9, 9.3, 10–11, 13.3
D21S11	FL	203–259	24, 24.2, 25, 25.2, 26–28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36–38
D5S818	JOE	119–155	7–16
D13S317	JOE	176–208	7–15
D7S820	JOE	215–247	6–14 ³
D16S539	JOE	264–304	5, 8–15
CSF1PO	JOE	321–357	6–15
Amelogenin	TMR	106, 112	X, Y
vWA	TMR	123–171	10–22
TPOX	TMR	262–290	6–13

¹The length of each allele in the allelic ladder has been confirmed by sequence analysis.

²When using an internal lane standard, such as the Internal Lane Standard 600, the calculated sizes of allelic ladder components may differ from those listed. This occurs because different sequences in allelic ladder and ILS components may cause differences in migration. The dye label also affects migration of alleles.

³HeLa cells have a microvariant allele 13.3 at the D13S317 locus. This will appear as an off-ladder allele (see www.cstl.nist.gov/strbase/var_D13S317.htm#Tri).

Figura 1. Información de la casa comercial Promega sobre la relación entre cada uno de los loci STR amplificados y las repeticiones (en rangos de tamaño y número) que pueden estar presentes en dichos productos de PCR.

RESULTADOS:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

Código biobanco	Código origen del ADN de la línea celular	Loci STRs analizados									
		TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
INVN02519A555ADNA002	BS PBiPS 46-Sv4F-10 p12	6, 8	29	11	12, 13	9, 11	9, 11	11, 12	X, Y	15, 17	8, 11

Granada, a 15 de Noviembre de 2019

Laboratorio de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

RESULTADOS:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

Código biobanco	Código origen del ADN de la línea celular	Loci STRs analizados									
		TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
INVN02519A525ADNA002	Brugada S RB12146	6, 8	29	11	12, 13	9, 11	9, 11	11, 12	X, Y	15, 17	8, 11

Granada, a 15 de Octubre de 2019

Laboratorio de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en las células originales de las que procede.



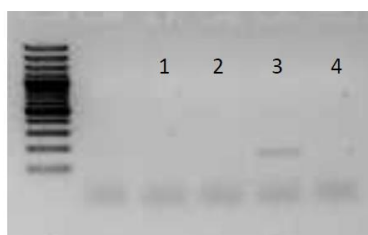
Anexo 5

Silenciamiento de los transgenes de reprogramación

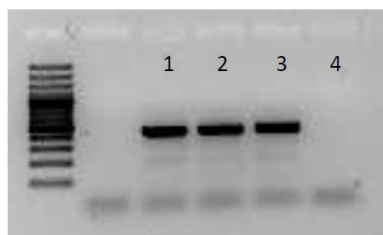
RT-PCR SENDAI 26/07/2019

1. BS PBiPS46 Sv4F-10, P7, 15.07.19
2. BS PBiPS46 Sv4F-13, P7, 09.07.19
3. Ctrl.BS PBiPS37 Sv4F-1, P8, 11.07.19
4. H2O

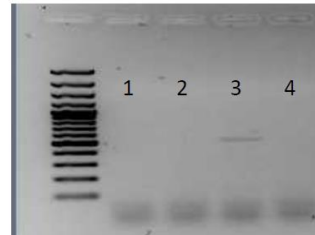
SeV (181pb)



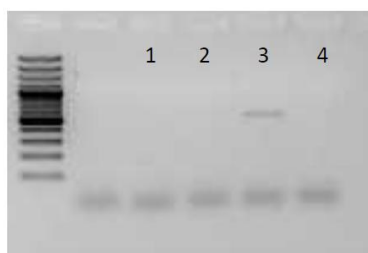
GAPDH



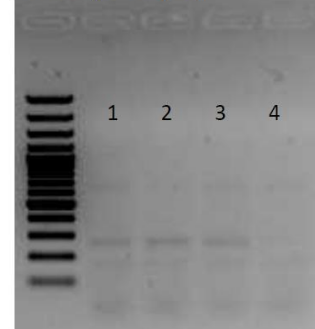
KOS (528 pb)



C-Myc (532 pb)



Klf4 (410 pb)



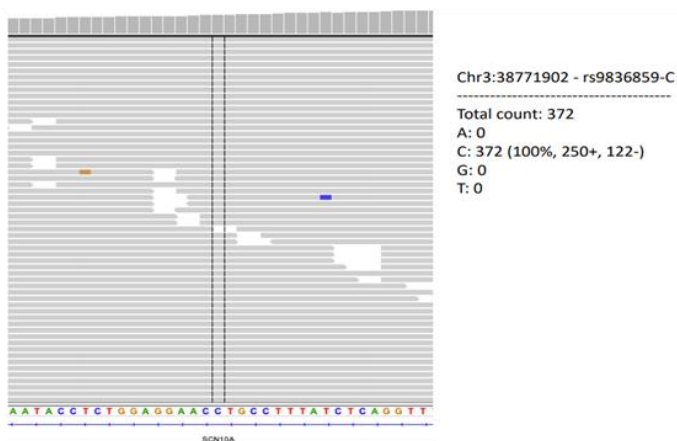
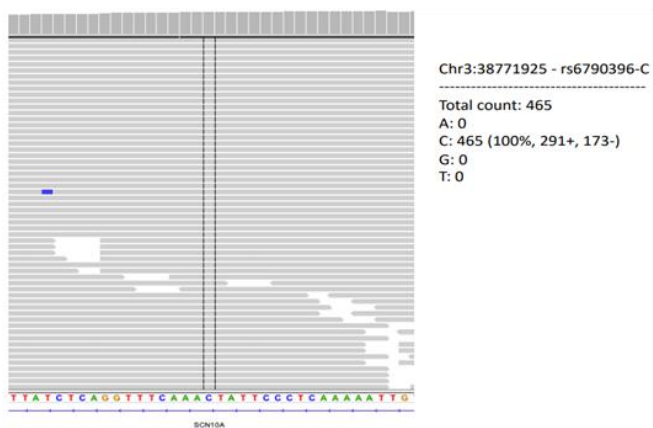
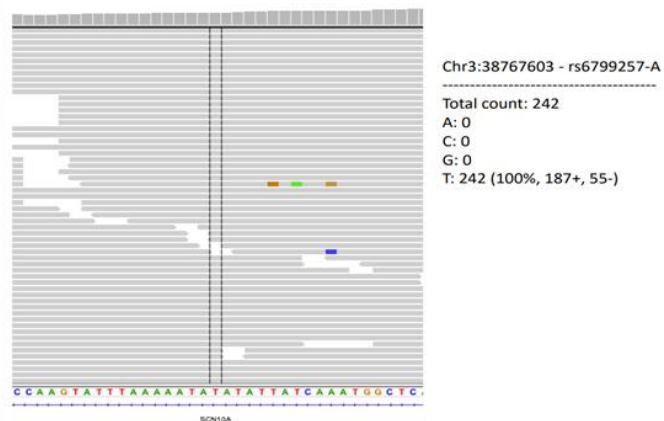
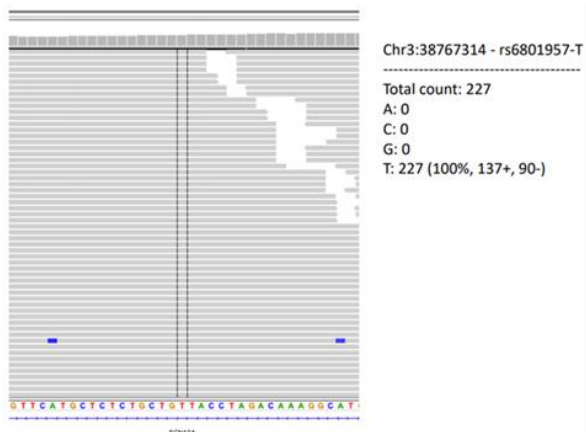
Silenciamiento de los transgenes de reprogramación
Análisis RT-PCR que muestra los niveles de expresión de mRNA de los marcadores de pluripotencia endógenos



Anexo 6

Confirmación de la presencia de la mutación

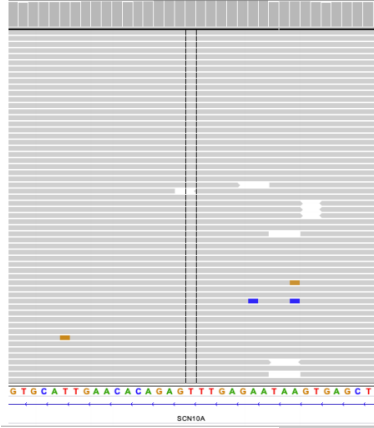
Sequencing Brugada syndrome patient RB12146 using short-read sequencing





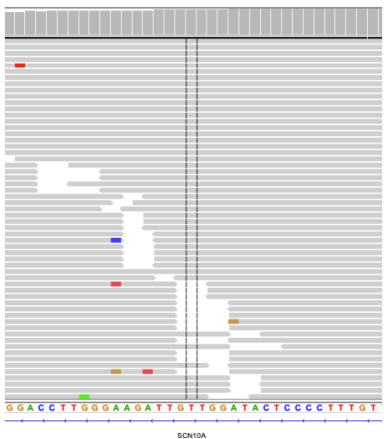
Chr3:38771994 - rs9874633-A

Total count: 469
A: 469 (100%, 176+, 293-)
C: 0
G: 0
T: 0



Chr3:38777554 - rs10428132-T

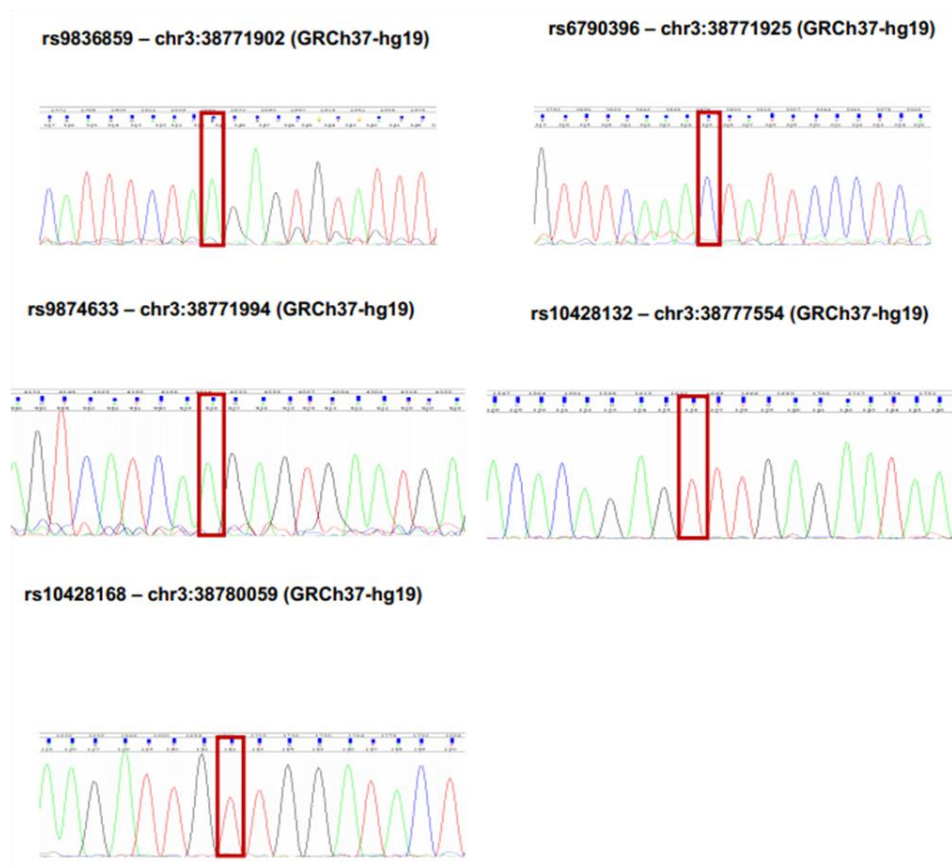
Total count: 627
A: 0
C: 0
G: 4 (1%, 1+, 3-)
T: 623 (99%, 313+, 310-)



Chr3:38780059 - rs10428168-T

Total count: 697
A: 0
C: 0
G: 0
T: 697 (100%, 403+, 294-)

Sequencing hiPSC from Brugada syndrome patient RB12146 using Sanger sequencing



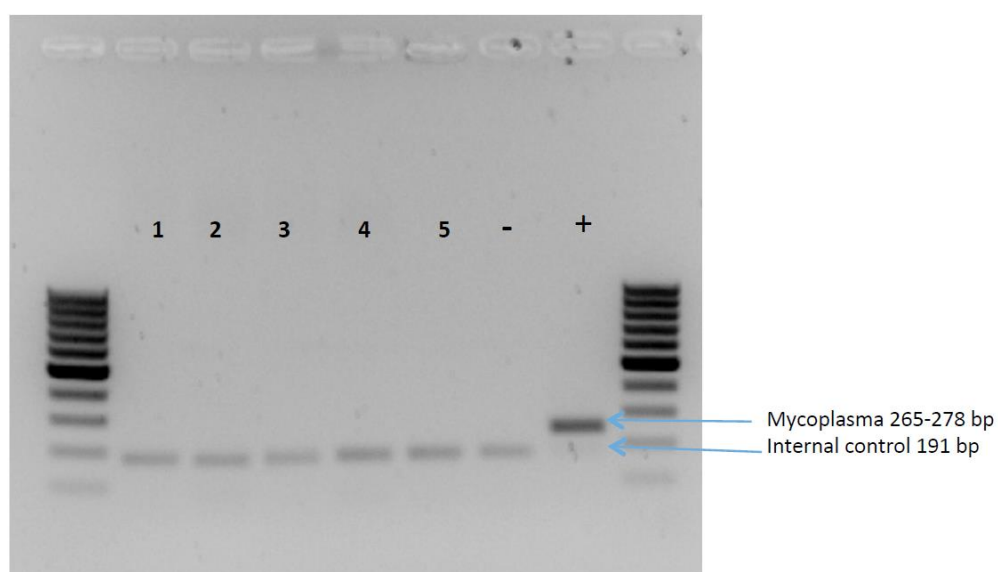
Se presentan los resultados de la secuenciación en células del paciente con Síndrome de Brugada y la comprobación de las mismas en la iPSC generada



Anexo 7

Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 02/10/2019



5. BS PBiPS 46-Sv4F-10 p10