

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR [MS] FiPS2-R4F-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

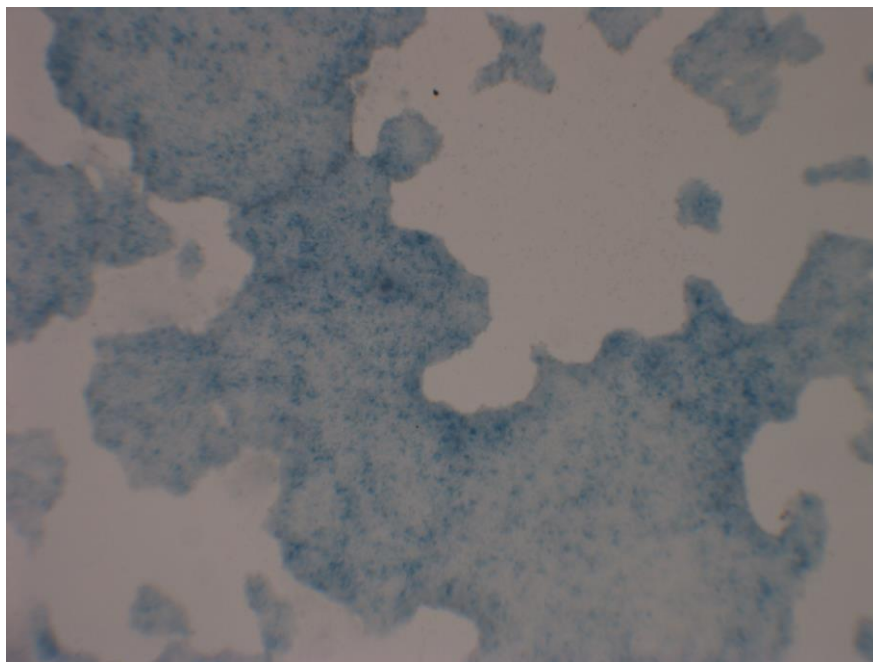
Anexo 5: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Anexo 6: Genotipado

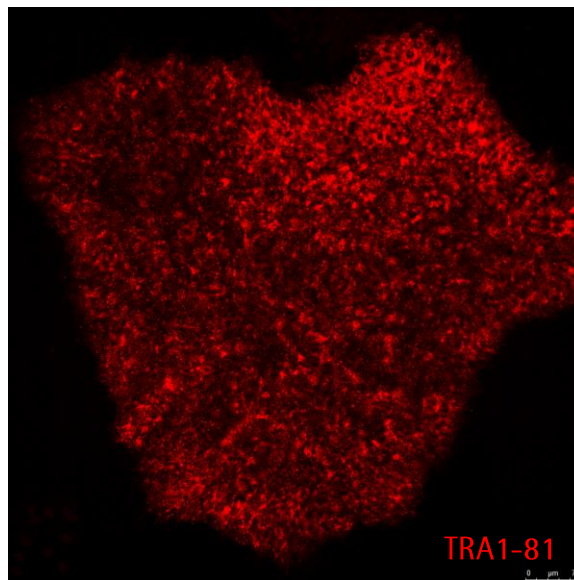
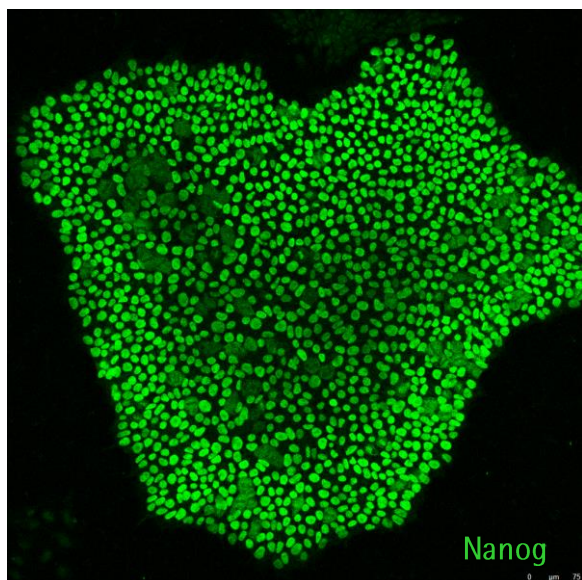
Anexo 7: Resultado test de micoplasma

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

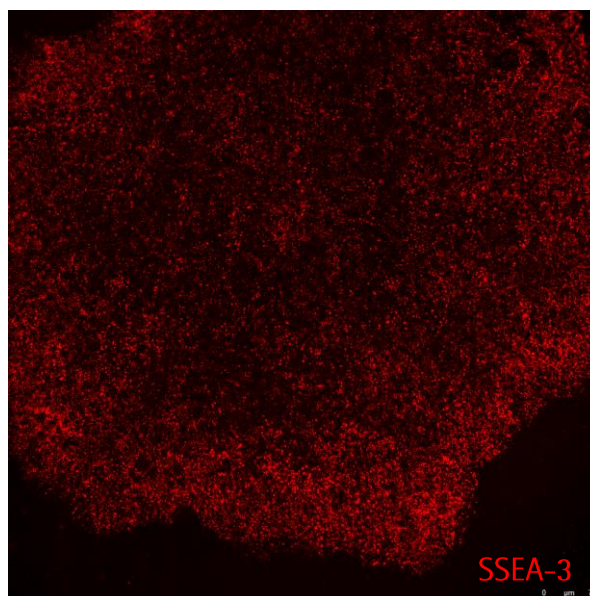
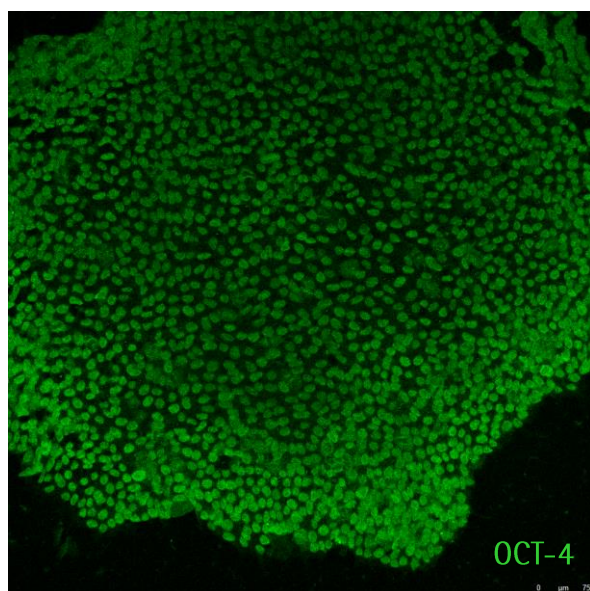


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



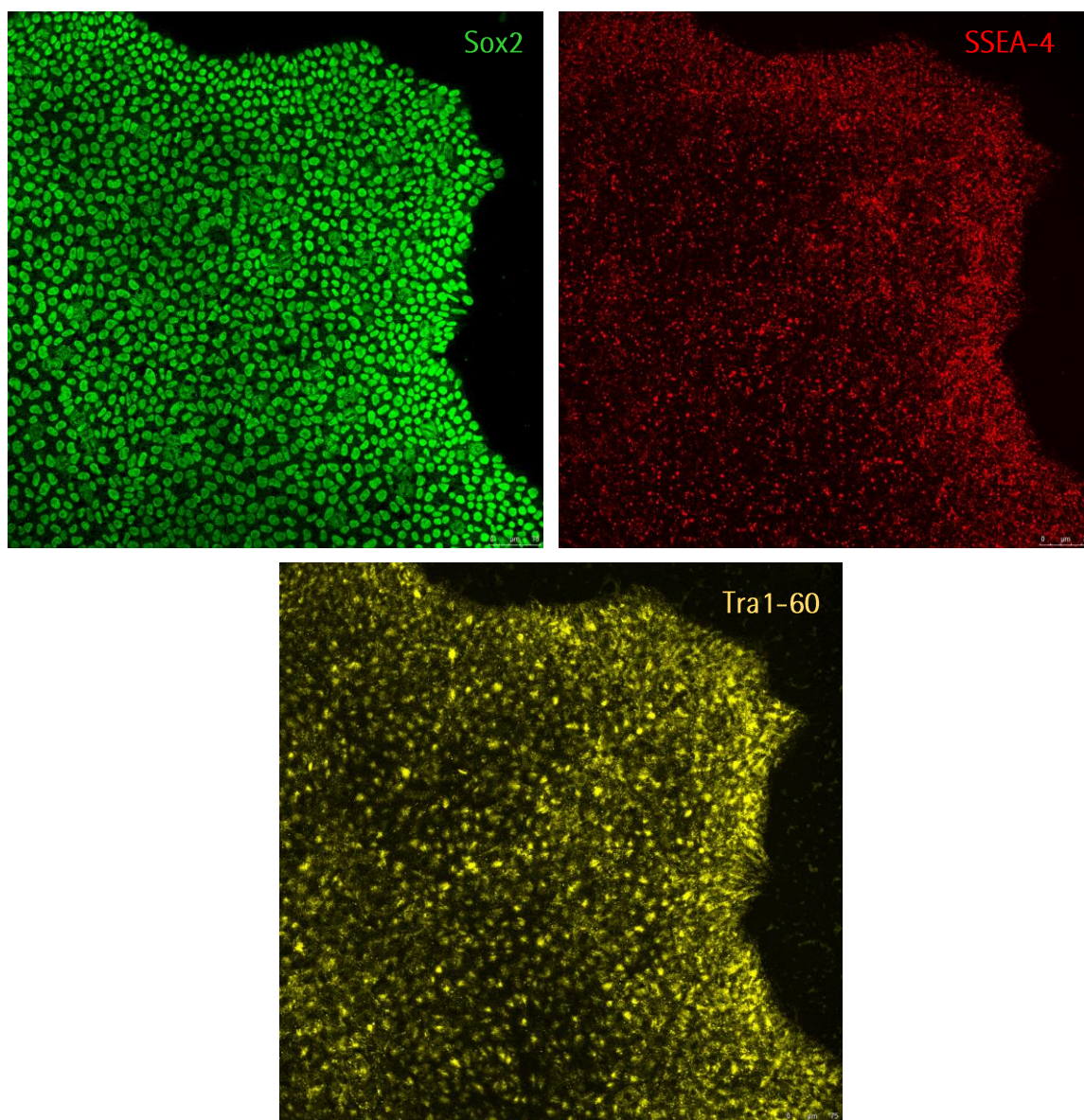
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3

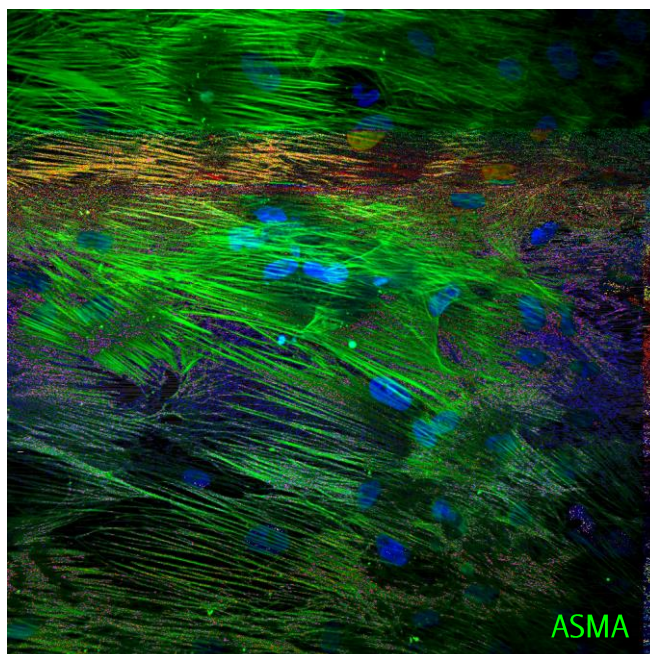


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

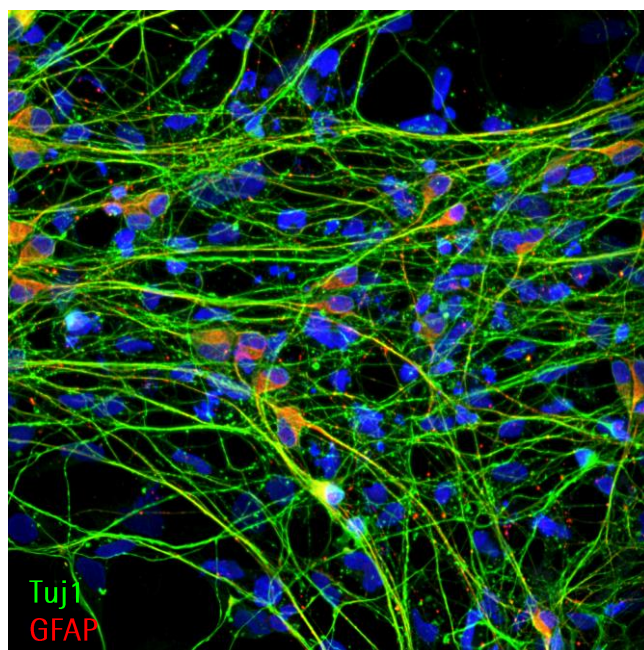
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

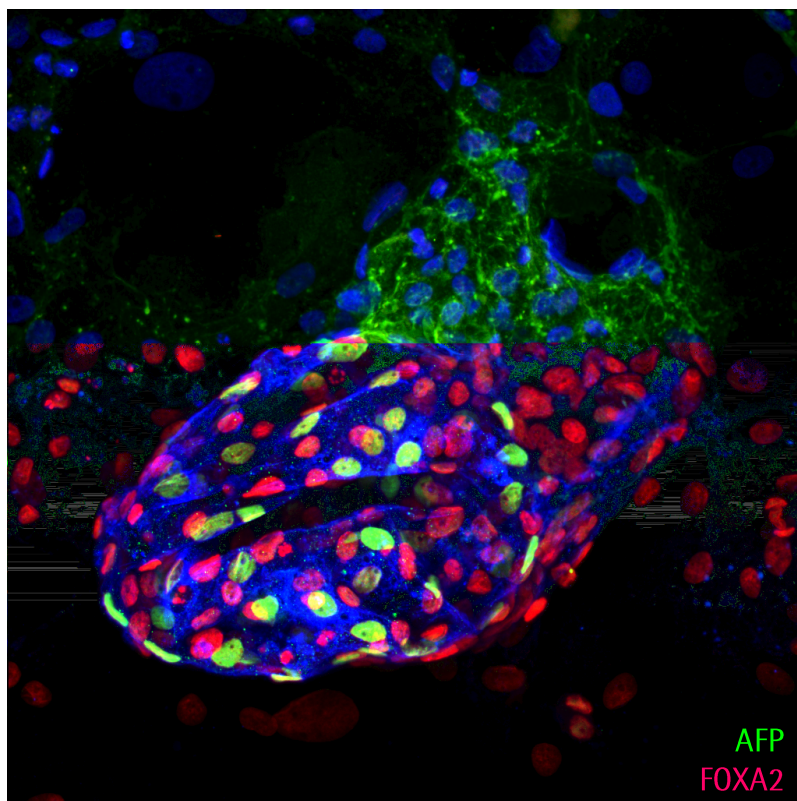
Diferenciación *in vitro*



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



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

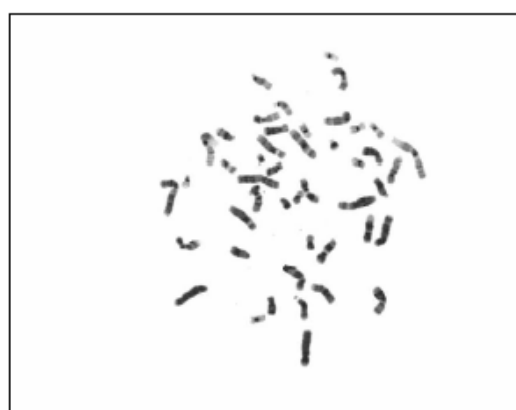
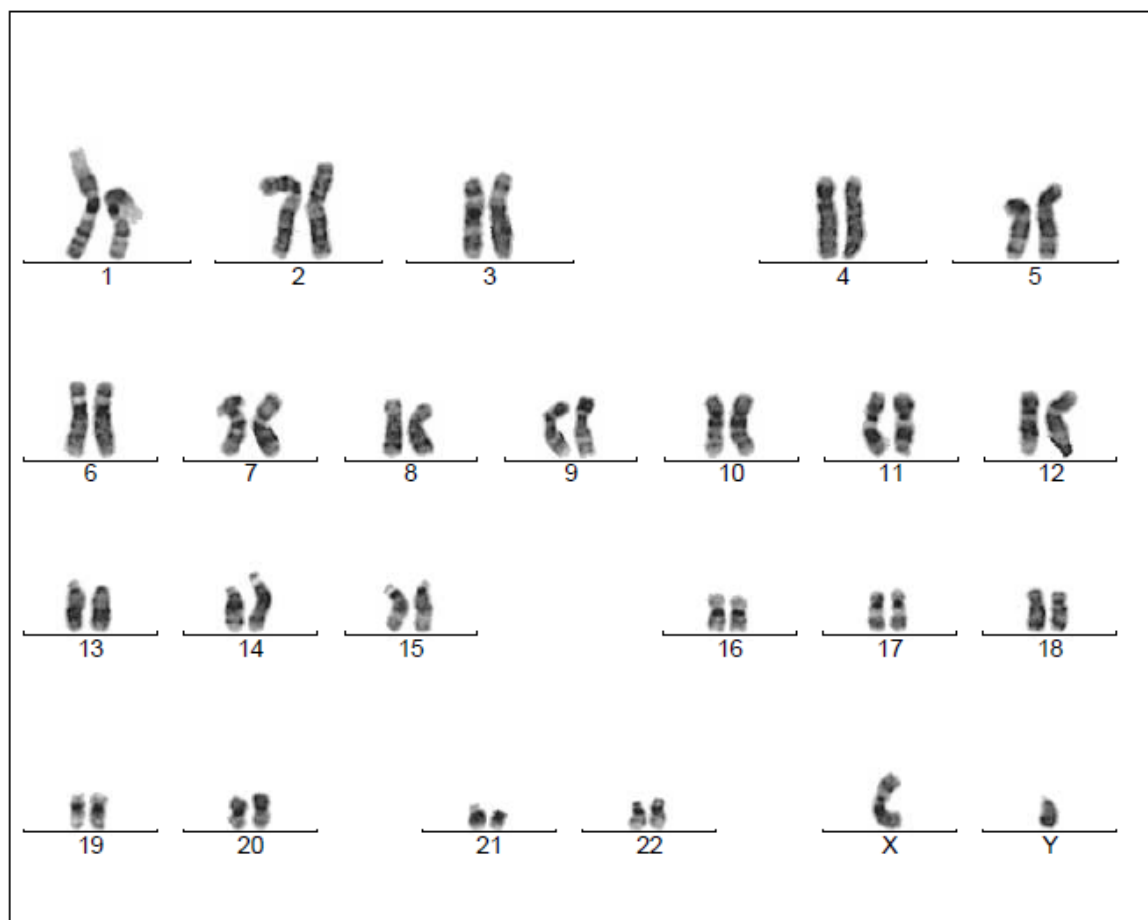


Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP** y **FOXA2**

Anexo 3

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Case name: A161160

Patient name: [MS] Fips 2 RAF-10 P10

Specimen type: stem cells

Result: 46,XY

Anexo 4

Resultado microsatélites



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:

A continuación se detalla la correlación entre el código de muestra de Biobanco y la línea celular procesada:

código Biobanco	Línea celular
32160023014	MS FiPS 2 R4F-10 p18

En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a los alelos encontrados para cada uno de los marcadores microsatélites analizados.

Loci STR analizados										
Línea celular	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
MS FiPS 2 R4F-10 p18	X, Y	10, 11	11	12	31	11, 13	9	6, 7	9, 10, 12.5	14, 15

Granada, a 28 de Enero de 2016

Área de Biología Molecular

RESULTADOS:

A continuación se detalla la correlación entre el código de muestra de Biobanco y la línea celular procesada:

código Biobanco	Línea celular
32151906040	EM2F-ODB p4

En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a los alelos encontrados para cada uno de los marcadores microsatélites analizados.

Línea celular	Loci STR analizados									
	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
EM2F-ODB p4	X, Y	10, 11	11	12	31	11, 13	9	6, 7	9, 10, 12, 5	14, 15

Granada, a 11 de Diciembre de 2015



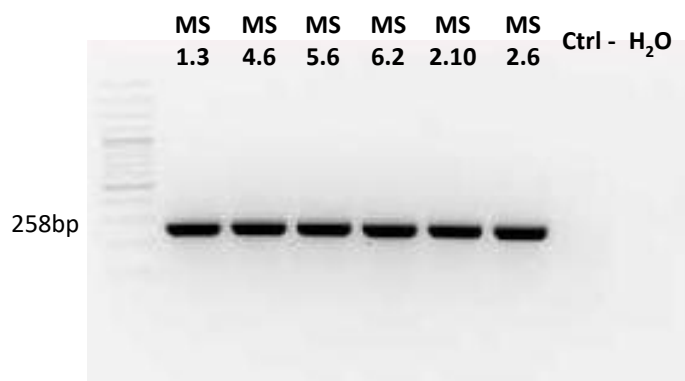
Área de Biología Molecular

Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes [MS] FiPS2-R4F-10 y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

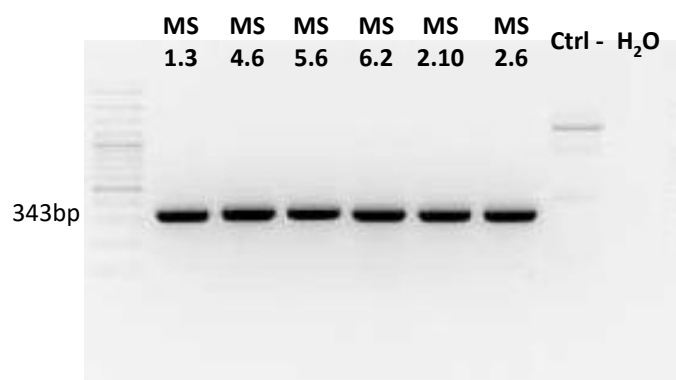
Anexo 5

Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

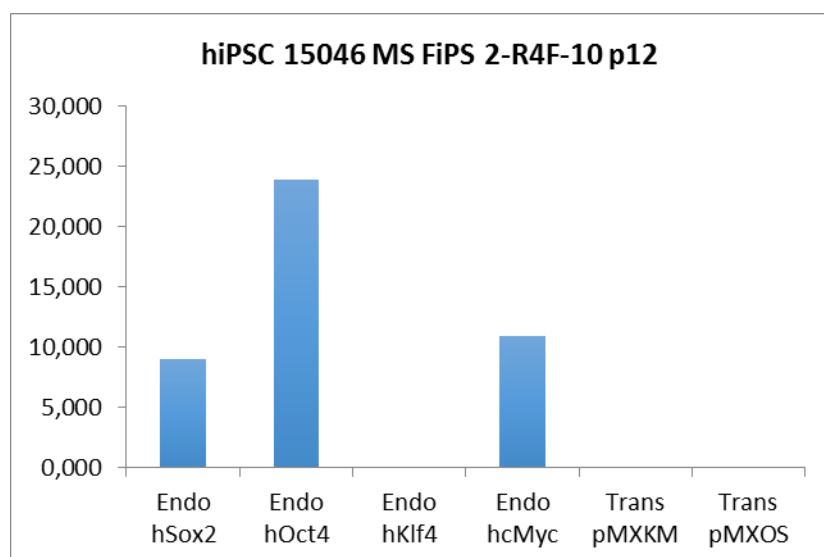
pMXs-(fl-mOct4_Vp16_PTV_HA-mSox2_mOrange



pMXs-Klf4-cMyc-GFP



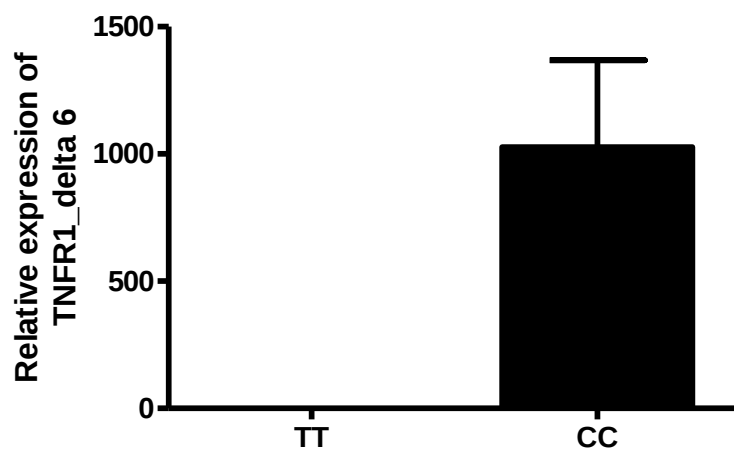
Análisis gPCR mostrando las integraciones genómicas de los gene Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-Myc utilizados para generar la línea



Silenciamiento de los transgenes de reprogramación. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH

Anexo 6

Genotipado



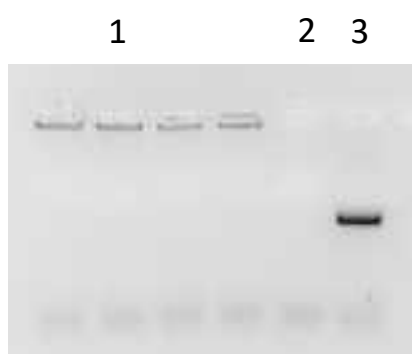
La línea **MS FiPS2-R4F-10** presenta el genotipo TT en el polimorfismo rs1800693 de TNFRSF1A, comparado con 3 controles de genotipo CC.

Anexo 7

Resultado test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST

10-02-2016



1. MS FiPS2-R4F-10 p19

2. CT -

3. CT +