



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR **NW FiPS 10II.3-R4F-1** EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES



ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Diferenciación *in vivo*

Anexo 4: Cariotipo

Anexo 5: Resultados microsatélites

Anexo 6: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

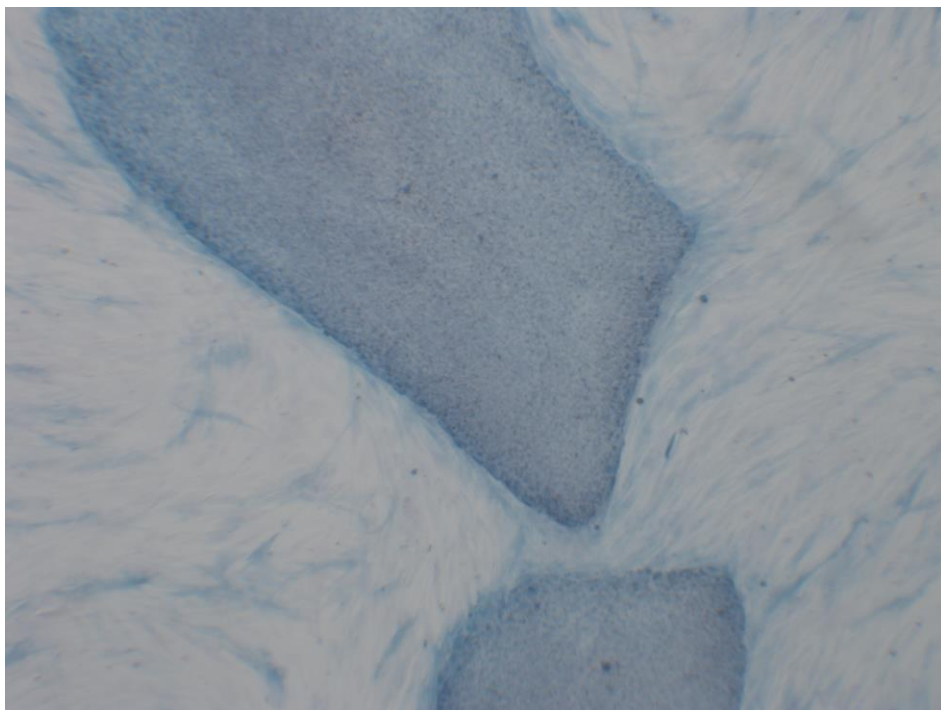
Anexo 7: Genotipado

Anexo 8: Resultado Test de micoplasma

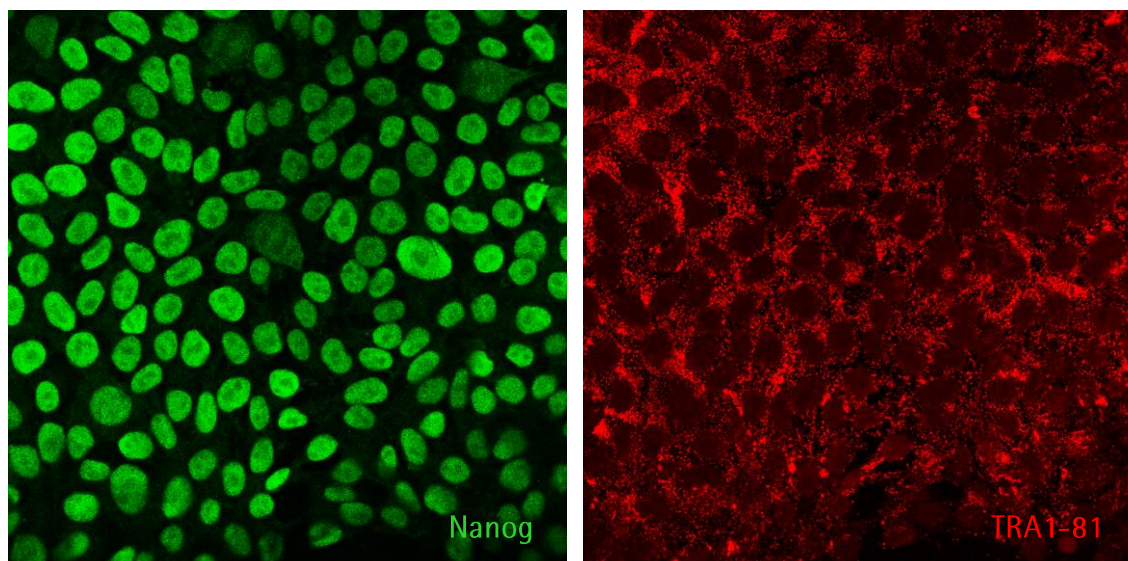


Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

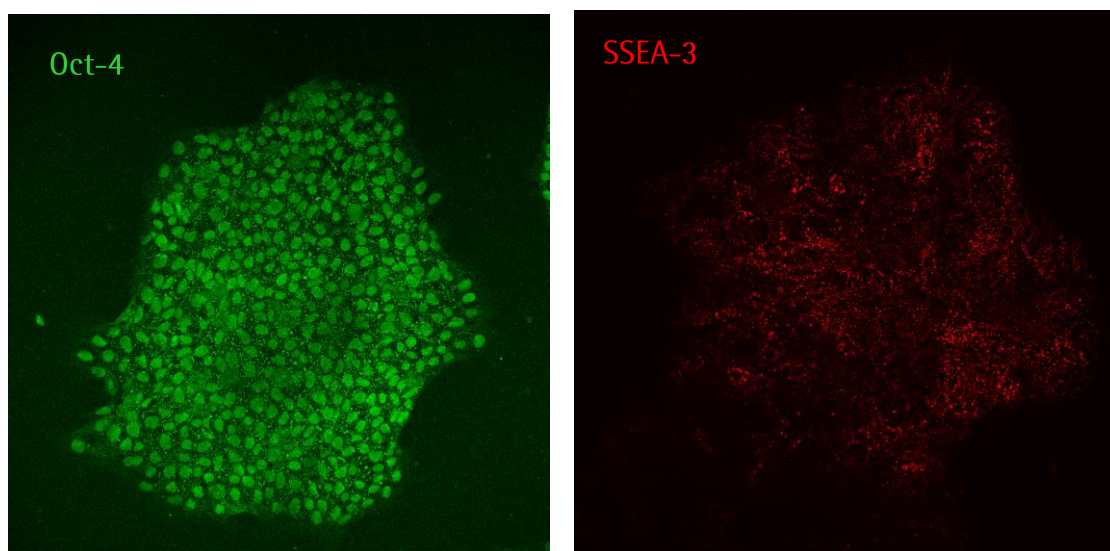


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



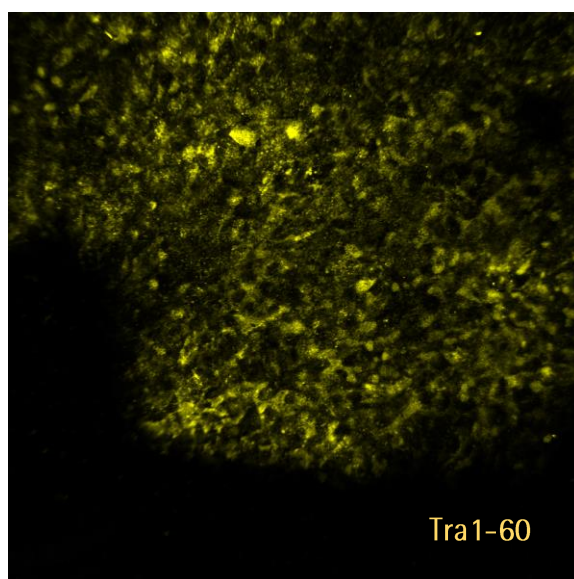
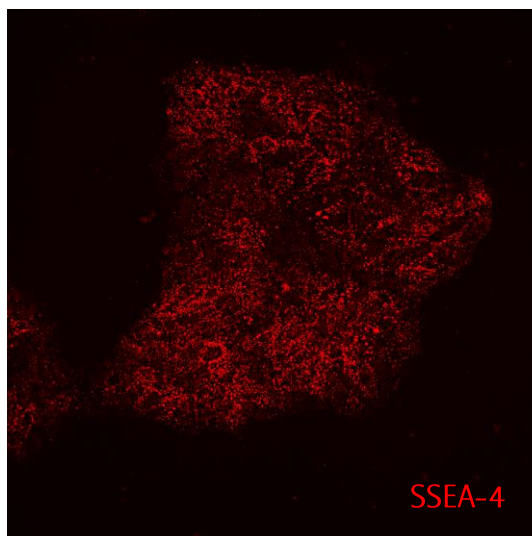
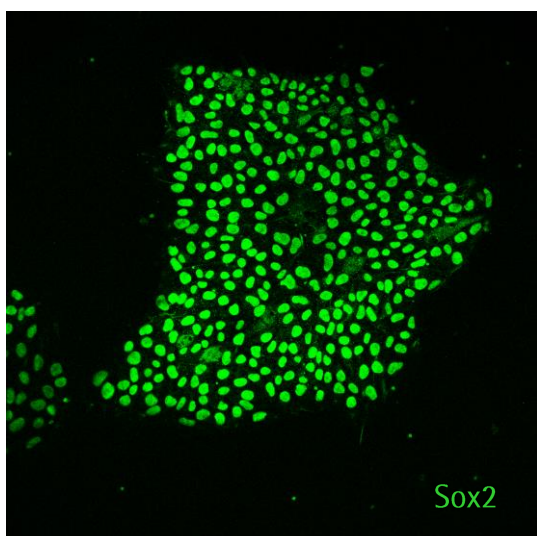
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3

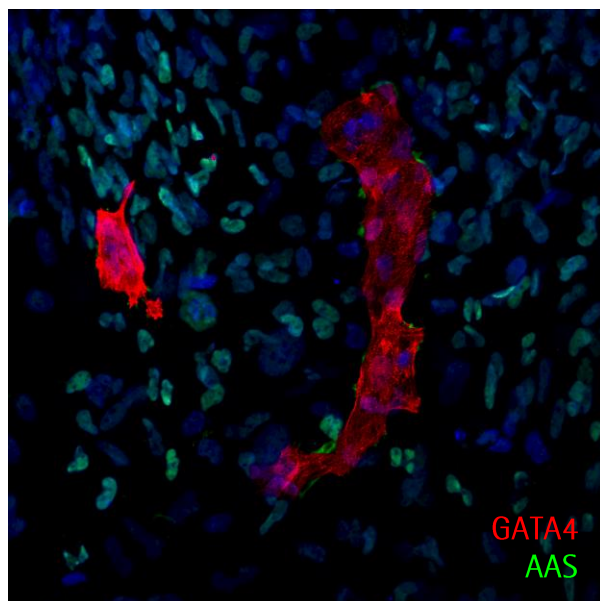


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

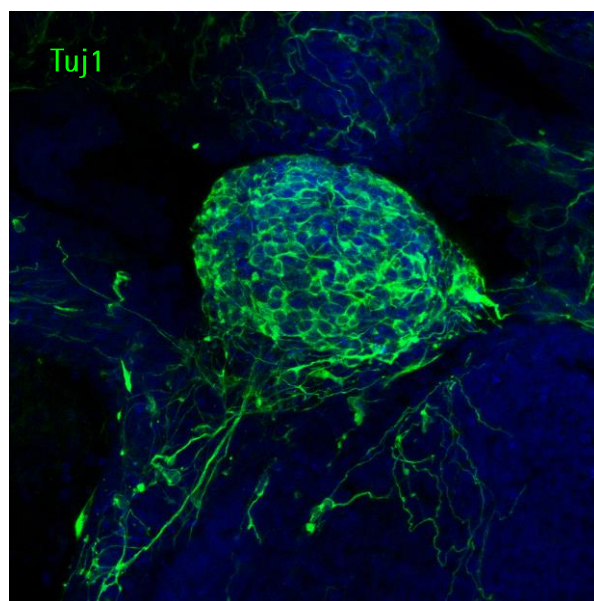


Anexo 2

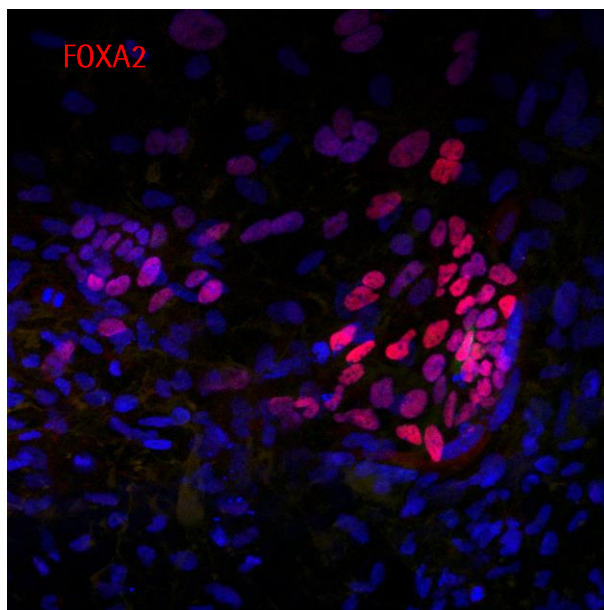
Diferenciación *in vitro*



Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para **GATA4** y **AAS**



Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **TuJ1**

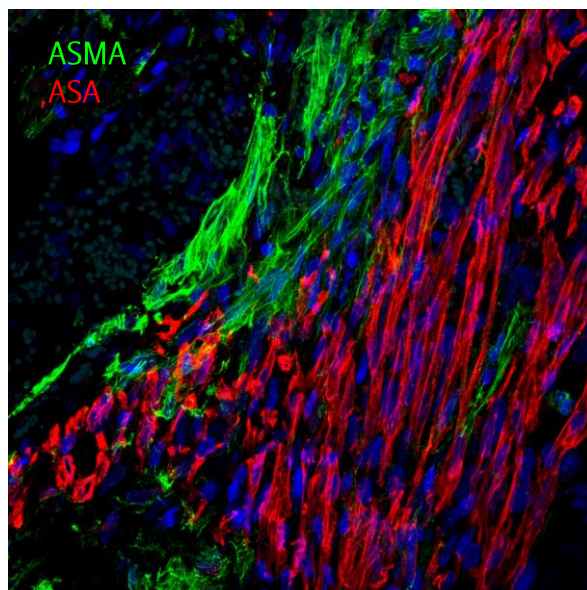


Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **FOXA2**

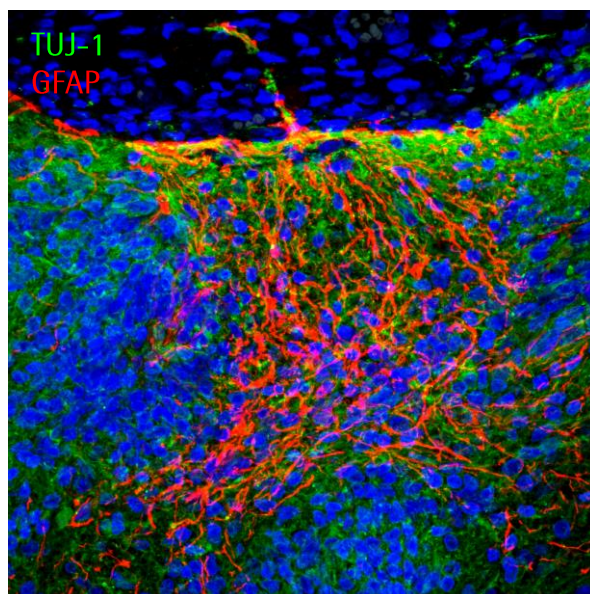


Anexo 3

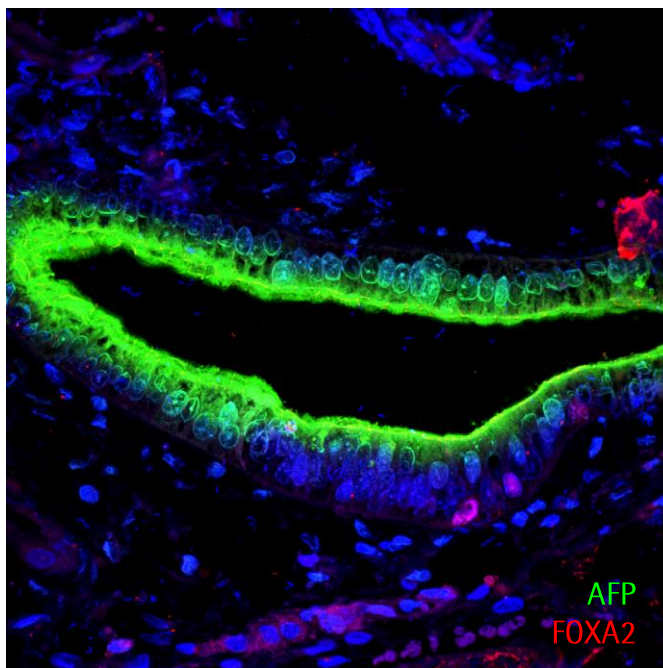
Diferenciación *in vivo*



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



Diferenciación *in vivo* a ectodermo: Células positivas para **TUJ1 y GFAP.**



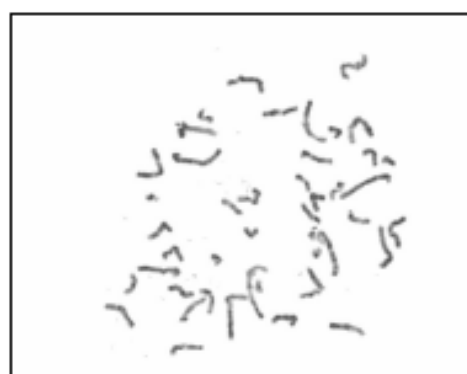
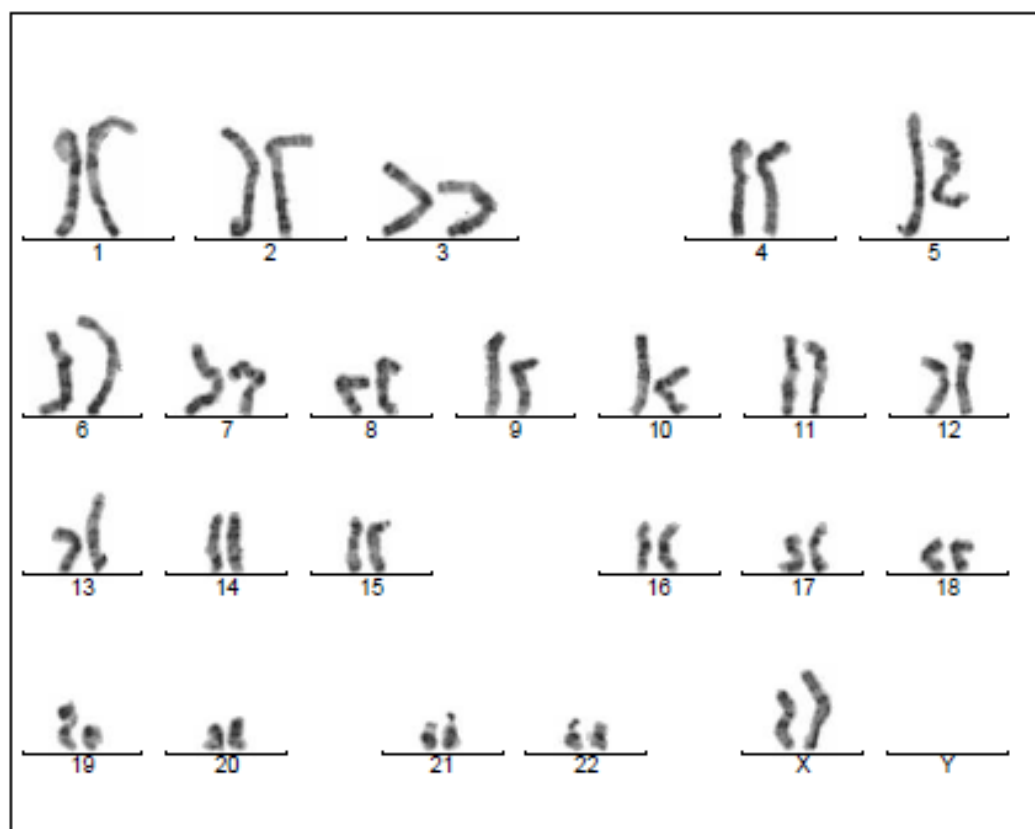
Diferenciación in vivo a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**



Anexo 4

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Case name: A191104

Patient name: NW FiPS 10II.3-R4F-H1 p14

Specimen type: stem cells

Result: 46,XX



Anexo 5

Resultado microsátélites

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 3. The GenePrint® 10 System Allele Ladder Information.

STR Locus	Label	Size Range of Allele Ladder Components ¹ (bases)	Repeat Numbers of Allele Ladder Components
TH01	FL	156–185	4–8, 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	119–135	7–16
D13S317	JOE	176–208	7–15
D7S820	JOE	215–247	6–14 ²
D16S539	JOE	264–284	5, 8–13
CSF1PO	JOE	321–357	6–15
Amelogenin	TMR	106, 112	X, Y
vWA	TMR	125–171	10–22
TPOX	TMR	262–280	6–13

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

²When using an internal lane standard, such as the Internal Lane Standard 600, the calculated sizes of allele ladder components may differ from those listed. This occurs because different sequences in allele 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.ncbi.nlm.nih.gov/strbase/locus_D13S317.html).

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 indica el código de Biobanco para la muestra analizada y el código origen del ADN procesado de la línea celular:

Código Biobanco	Código origen de ADN
32170479002	NW FiPS10.II.03 R4F-H1 p12

En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR.

Código origen del ADN de la línea celular	Loci STR analizados									
	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
NW FiPS10.II.03 R4F-H1 p12	X	10, 13	11, 12	10, 12	30	11, 12	8, 10	7, 9.3	8	15, 18

Granada, a 31 de Julio de 2017

Laboratorio de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

RESULTADOS:

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

código Biobanco	Línea celular
32170136002	Fibroblasts NW10.II.3 p3

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
Fibroblasts NW10.II.3 p3	X	10, 13	11, 12	10, 12	30	11, 12	8, 10	7, 9.3	8	15, 18

Granada, a 14 de Marzo de 2017



Área de Biología Molecular
Biobanco del ISPA

Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes NW FiPS 10II.3-R4F-1 y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.



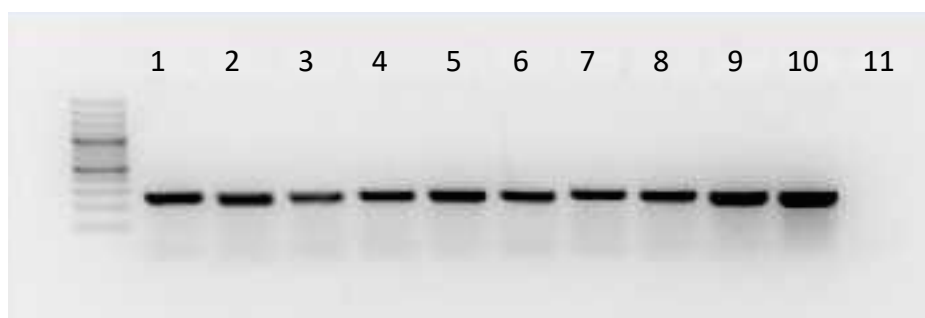
Anexo 6

Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

PCR Integration

4/5/2017

pMXs(FIOctVPHASoxVP-Or)

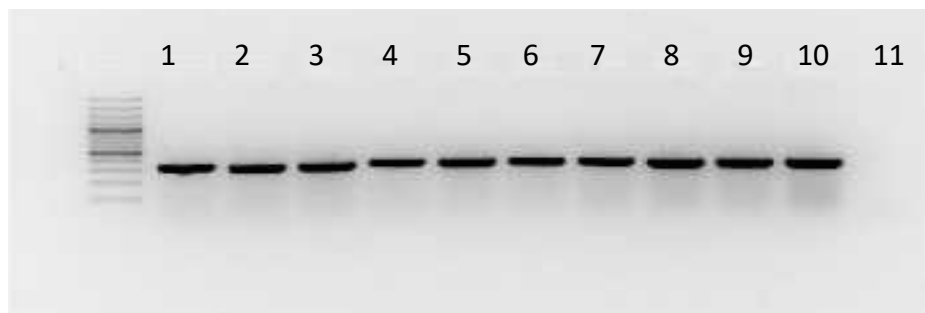


1 NW FiPS10.II.3 R4F-H1, P4

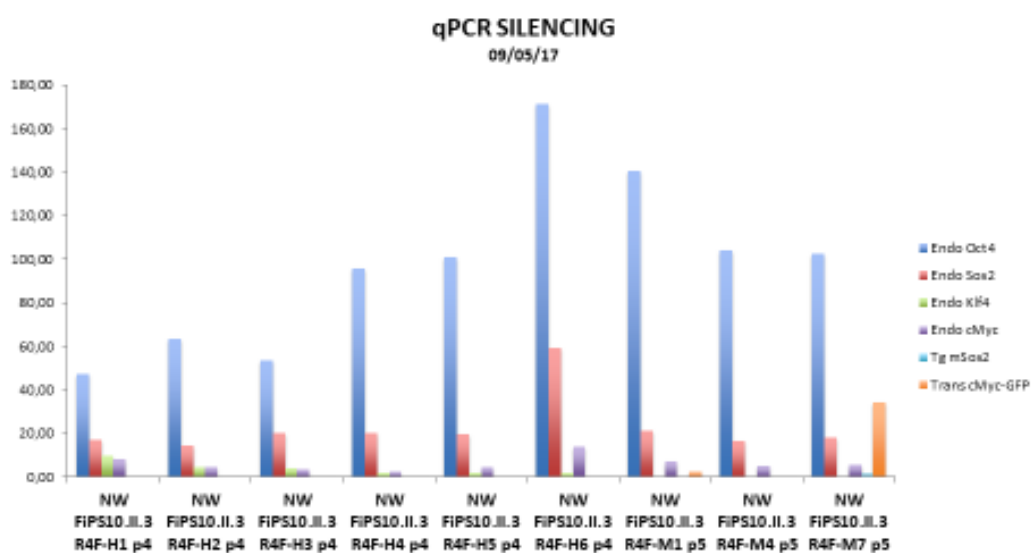
10. Positive Control

11. Negative Control (H₂O)

pMXs-KM-GFP



Análisis gPCR mostrando las integraciones genómicas de los genes utilizados para generar la línea

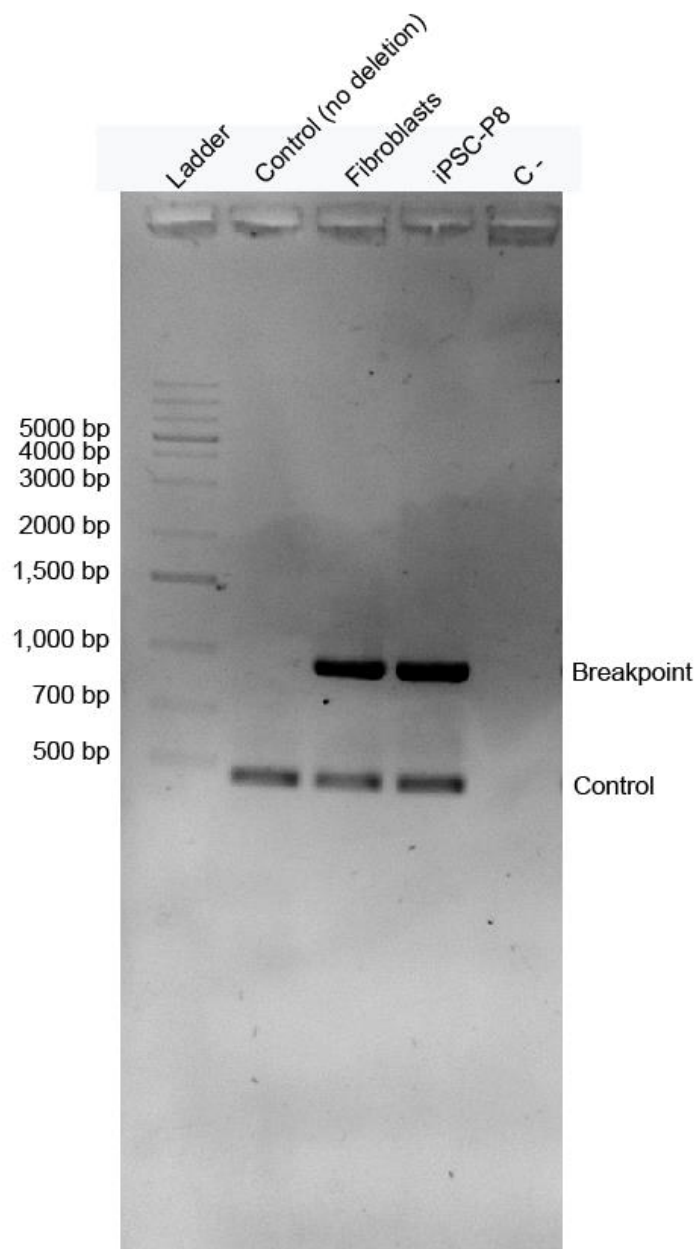


Silenciamiento de los transgenes de reprogramación. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de expresión de los transgenes indicados.



Anexo 7

Genotipado



Se presenta la amplificación por PCR del punto de rotura en muestras de DNA de un individuo control, de fibroblastos del paciente con la deleción de 817kb en 7q11.23 y de la línea del iPSC procedente de este individuo.

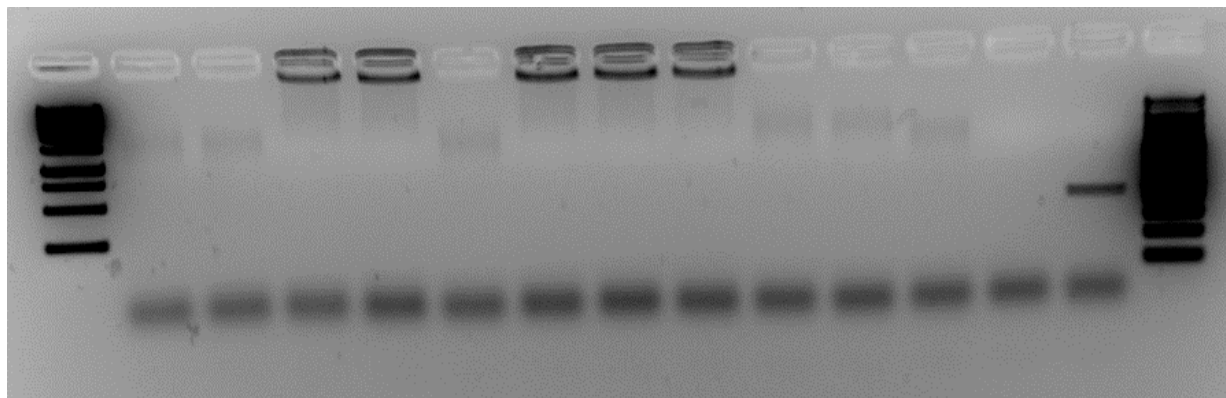


Anexo 8

Test de micoplasma

NWH1

- +



NWH1: NW FiPS10.II.03 R4F-H1, p10, 07.07.17