

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR [AS] FiPS 2-Ep6F-28 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

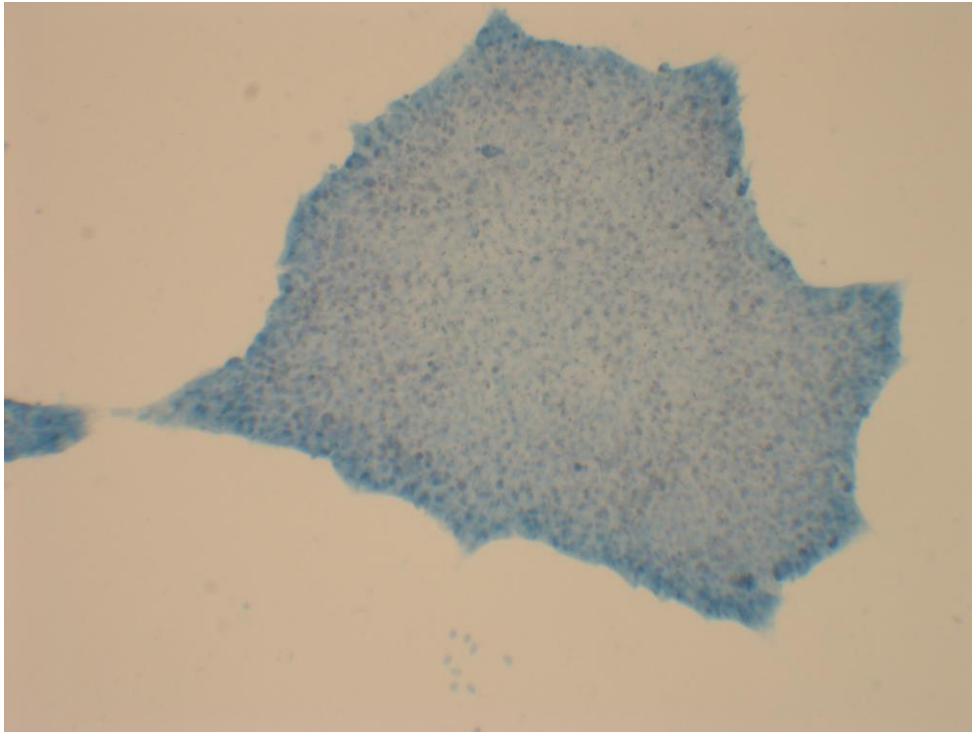
Anexo 5: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Anexo 6: Genotipado

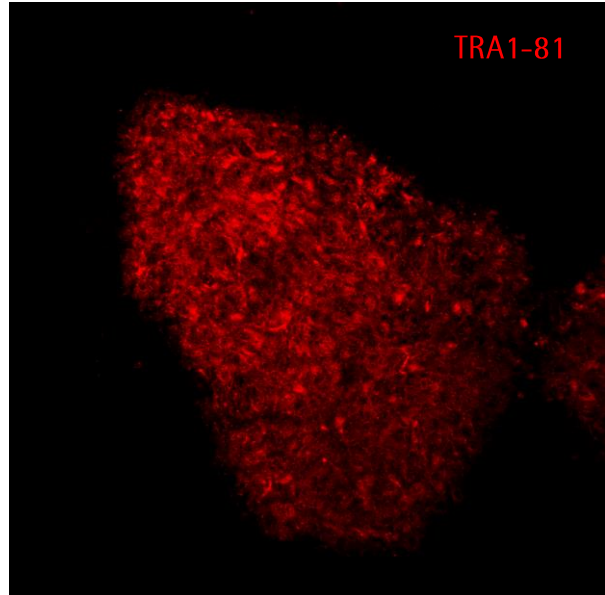
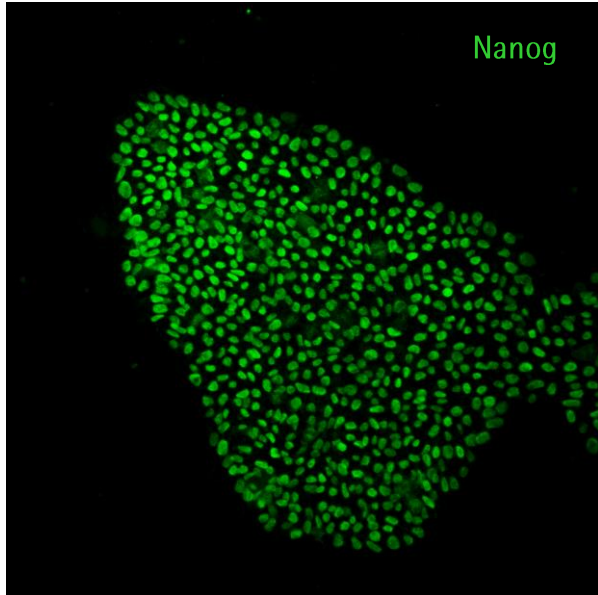
Anexo 7: Resultado Test de micoplasma

Anexo 1

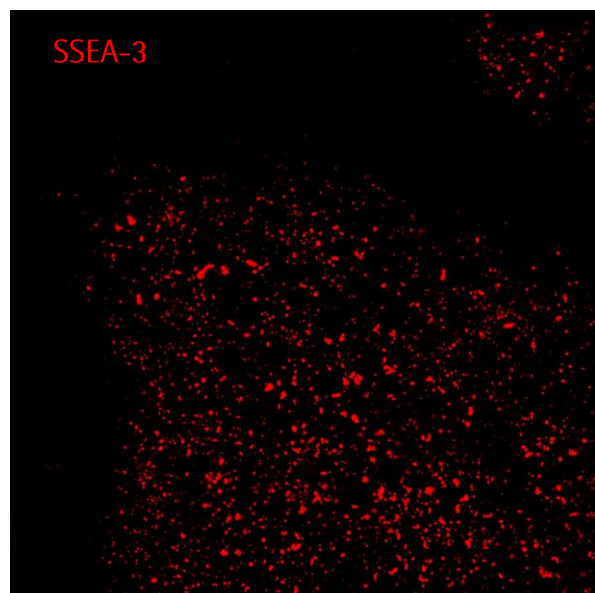
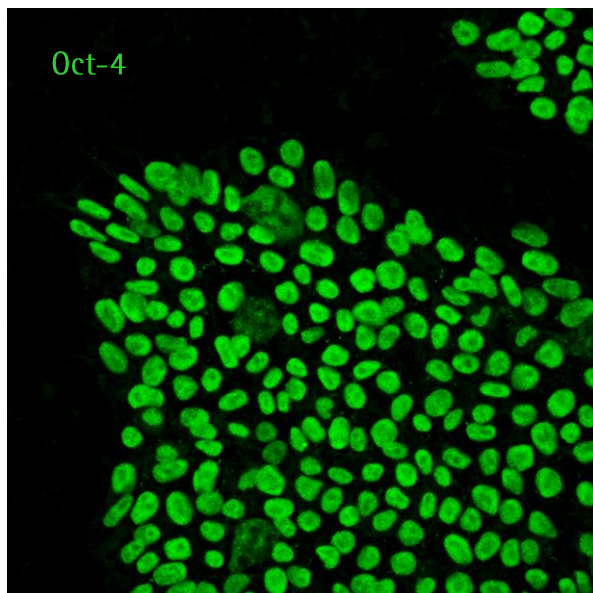
Fenotipo. Marcadores de pluripotencia



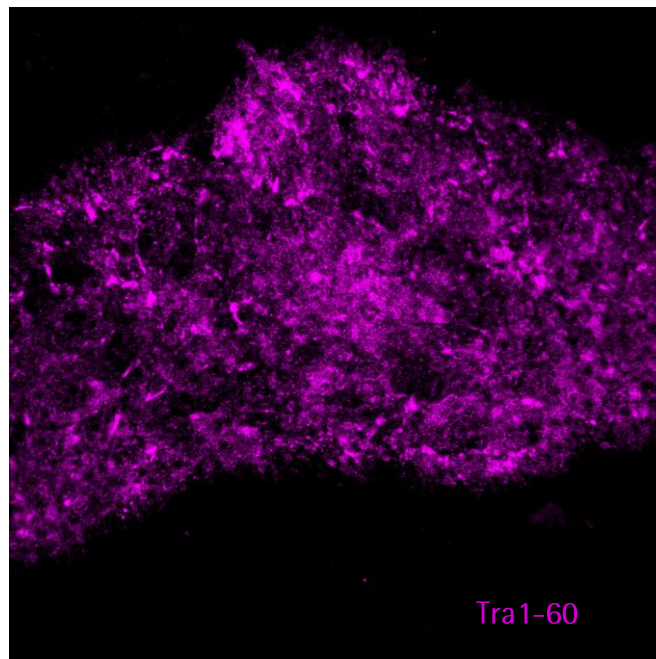
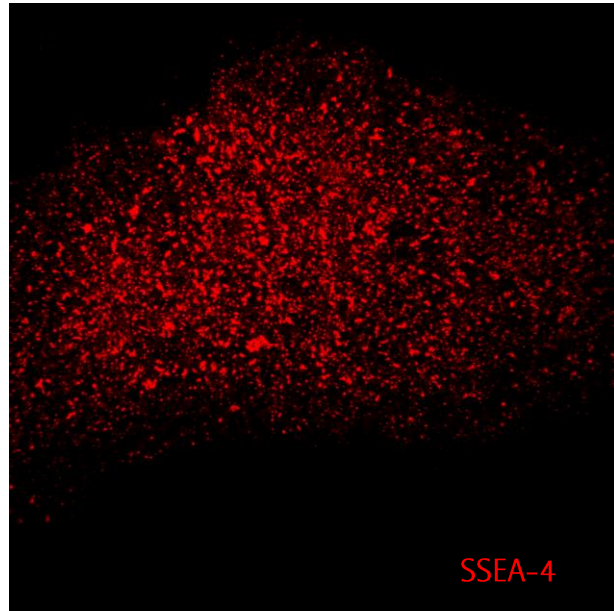
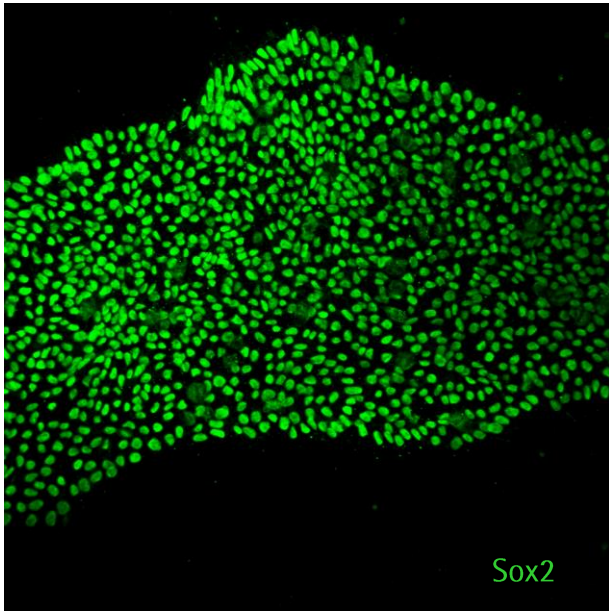
Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Nanog y TRA1-81



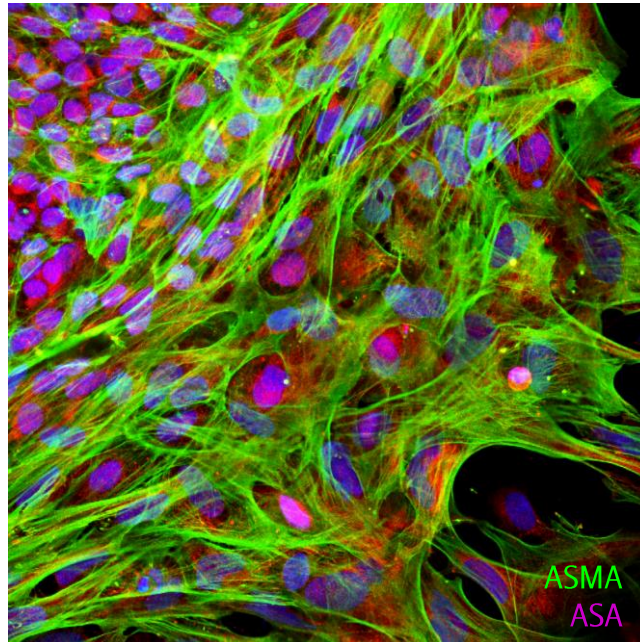
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Oct-4 y SSEA-3



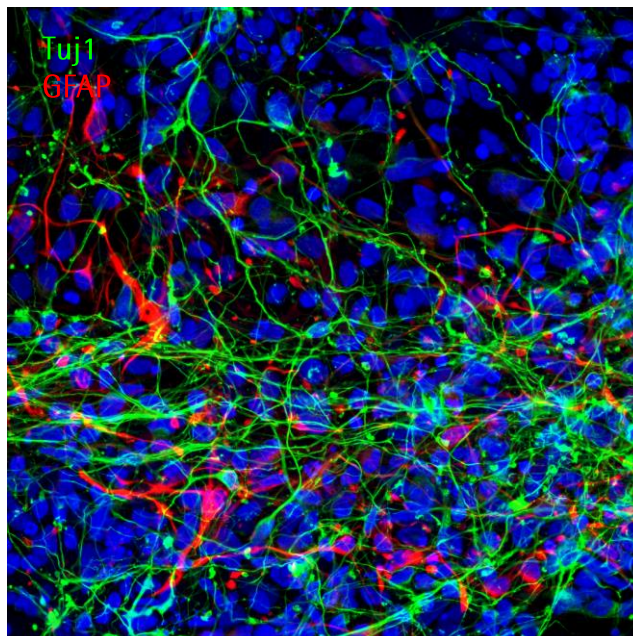
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

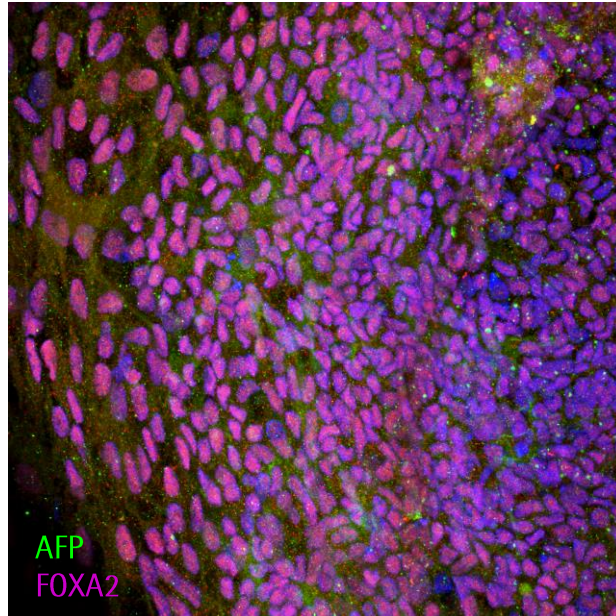
Diferenciación *in vitro*



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



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

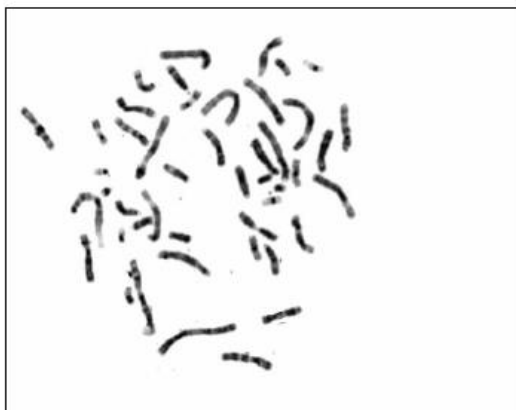
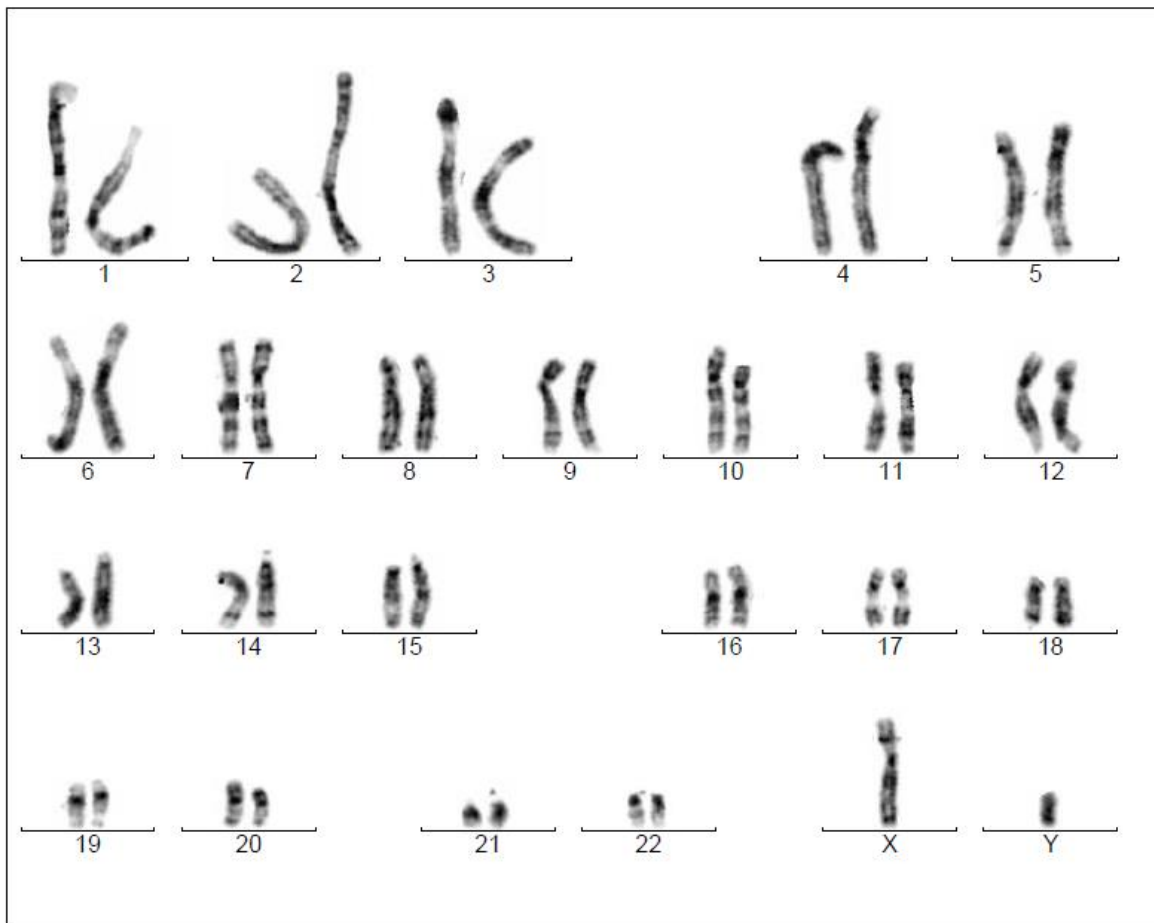


Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

Anexo 3

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Case name: A179621

Patient name: AS FiPS2-Ep6F-28 p18

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
32160023036	[AS] FiPS2-Ep6F-28 p7

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
[AS] FiPS2-Ep6F-28 p7	X, Y	11	8, 12	11	28, 29	11, 13	12	6, 9.3	9, 12.5	15, 18

Granada, a 21 de Marzo de 2016

Área 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
32160023009	AS 2F 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
AS 2F p3	X, Y	11	8, 12	11	28, 29	11, 13	12	6, 9.3	9, 12.5	15, 18

Granada, a 28 de Enero de 2016

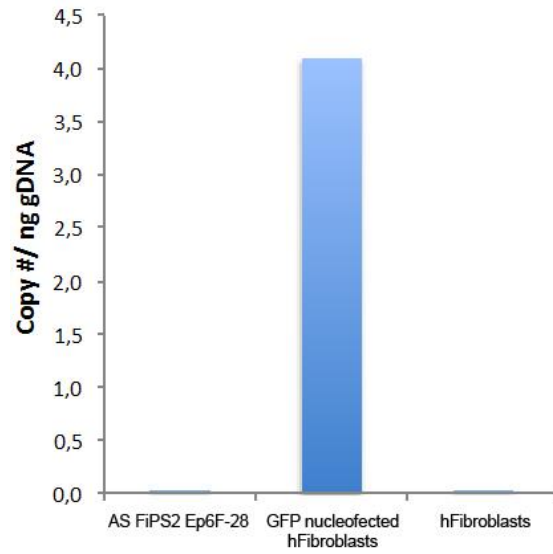


Área de Biología Molecular

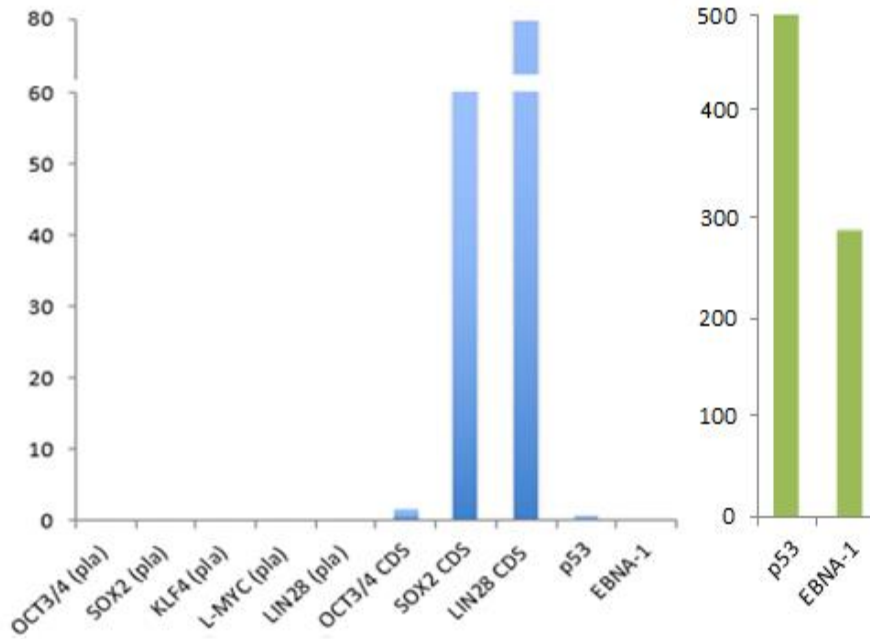
Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes [AS] FiPS2-Ep6F-28
y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

Anexo 6

Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación



QRT-PCR donde se muestra la ausencia de plásmidos episomales en la línea de iPSC y en fibroblastos control no-nucleofectados y la presencia de plásmidos en fibroblastos control GFP-nucleofectados 72h después de la nucleofección



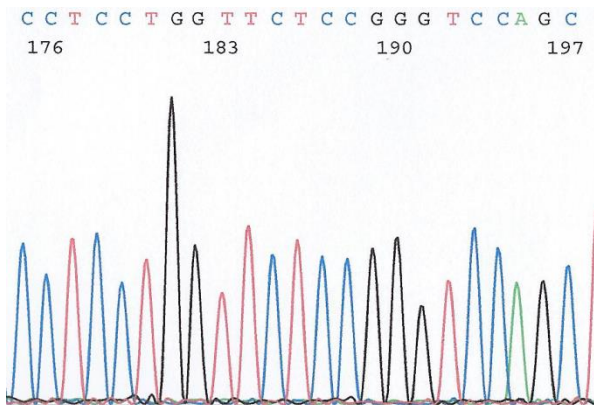
Niveles de expresión de mRNA de transgenes (pla) y marcadores de pluripotencia endógenos (CDS, azul) y expresión de p53 y EBNA-1 de fibroblastos GFP-nucleofectados control 72h después de la nucleofección

Anexo 8

Genotipado

WT exon 41 COL4A5 gene

GCCAAAAGGGTGATGGAGGATTACCTGGGATTCCAGGAAATCCTGGCCTTCCAGGT
CCAAAGGGCGAACCAGGCTTTCACGGTTTCCCTGGTGTGCAGGGTCCCCCAGGCCC
TCC**TG**TTCTCCGGGTCCAGCTCTGGAAGGACCTAAAGGCAACCCTGGGCCCCAAG
GTCCTCCTGGGAGACCAG



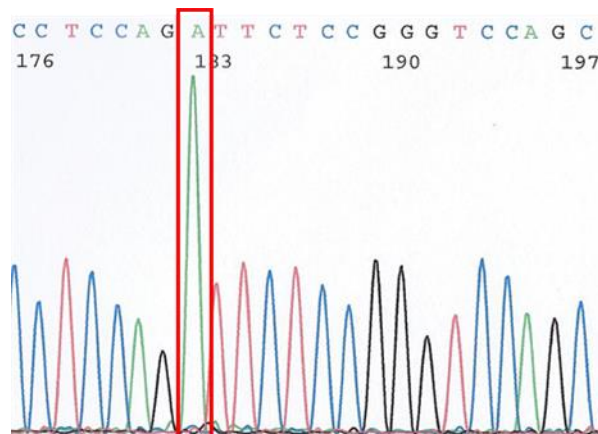
Samples

Mutation COL4A5 gene: c.3722G>A, p.(G1241D) hemizygous

Synonymous change (polymorphism) = c.3720T>A hemizygous

GCCAAAAGGGTGATGGAGGATTACCTGGGATTCCAGGAAATCCTGGCCTTCCAGGT
CCAAAGGGCGAACCAGGCTTTCACGGTTTCCCTGGTGTGCAGGGTCCCCCAGGCCC
TCC**AG**ATTCTCCGGGTCCAGCTCTGGAAGGACCTAAAGGCAACCCTGGGCCCCAAG
GTCCTCCTGGGAGACCAG

AS2-28

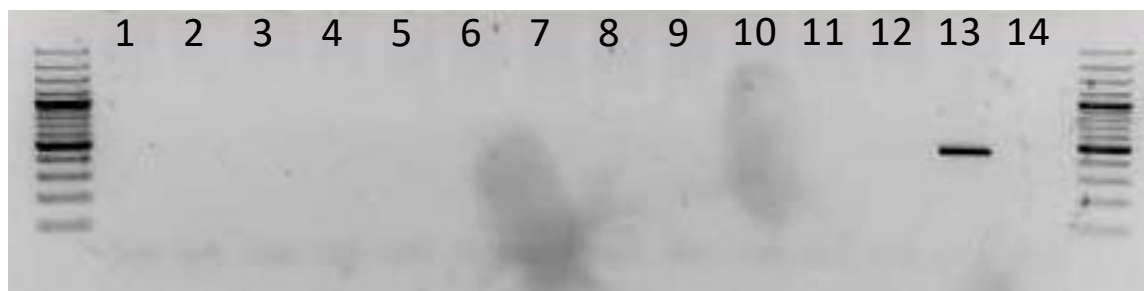


Anexo 7

Resultado test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST

17-02-2016



5- hiPSC 15056 [AS] FiPS2-Ep6F-28 p7

13- Positive Control

14- Negative Control