

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR SWB FiPS 159-R4F-4 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

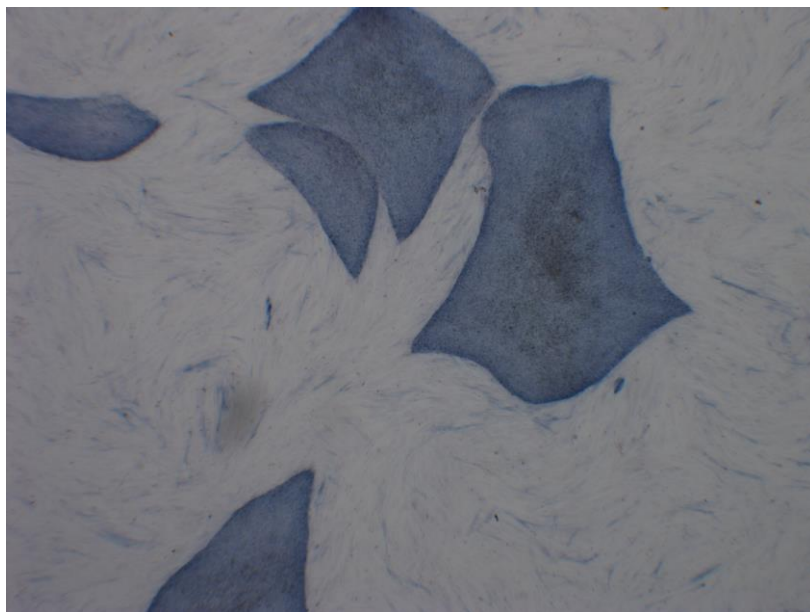
Anexo 6: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Anexo 7: Genotipado

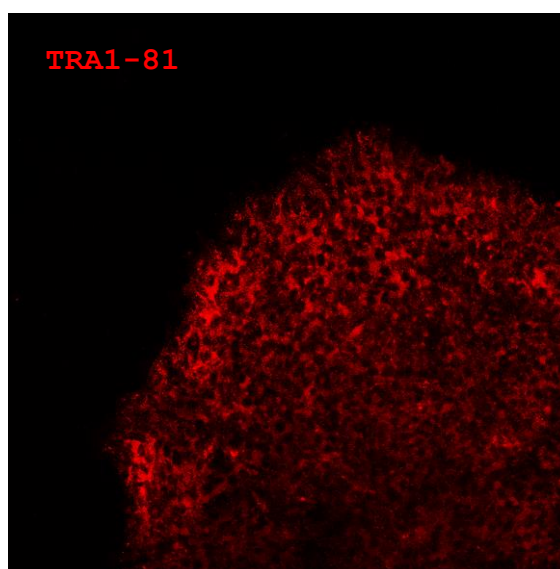
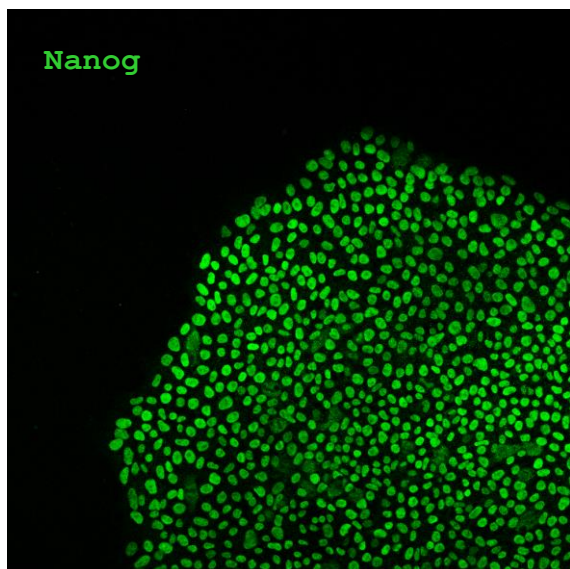
Anexo 8: Resultado Test de micoplasma

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

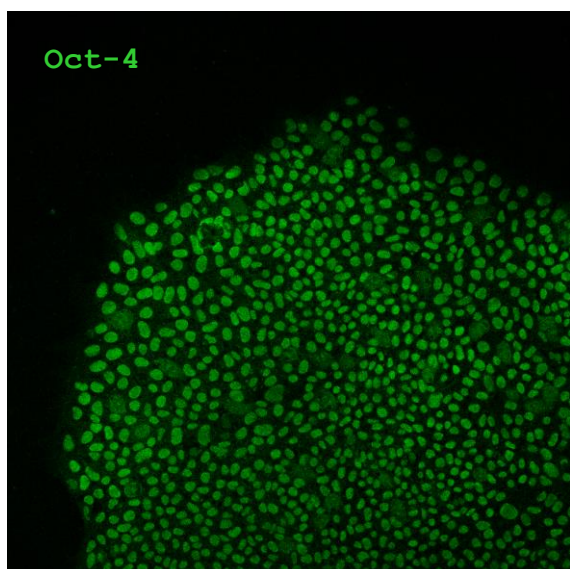


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



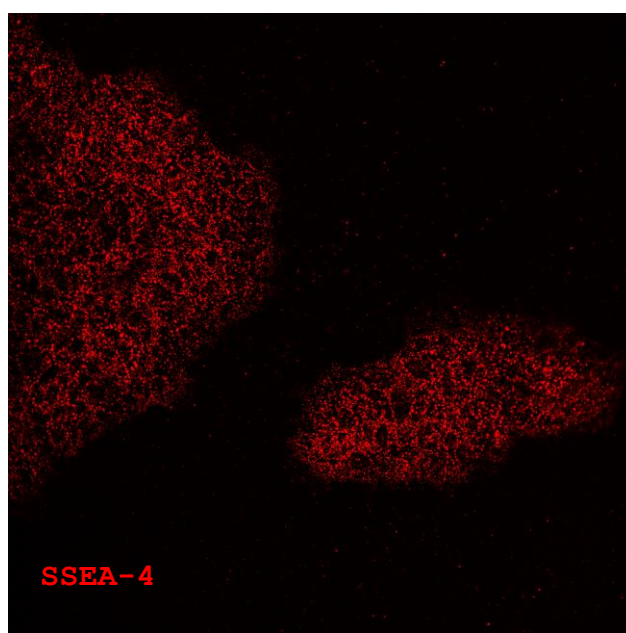
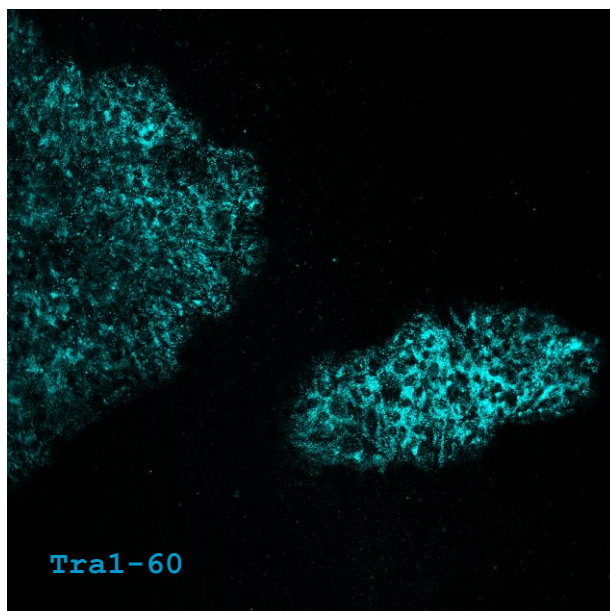
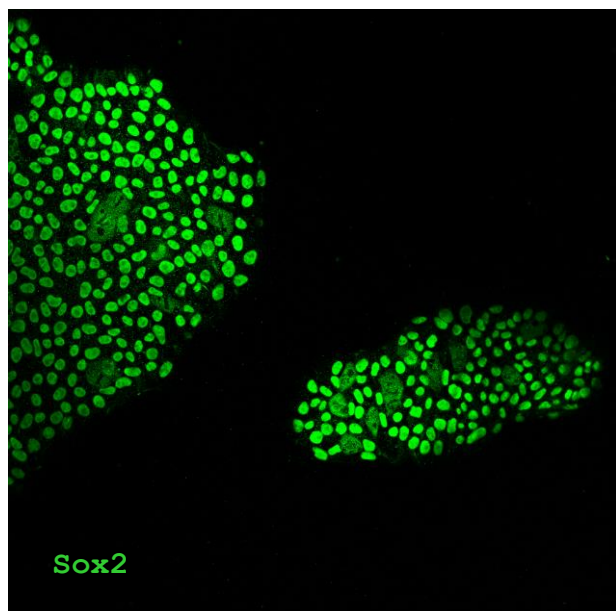
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3

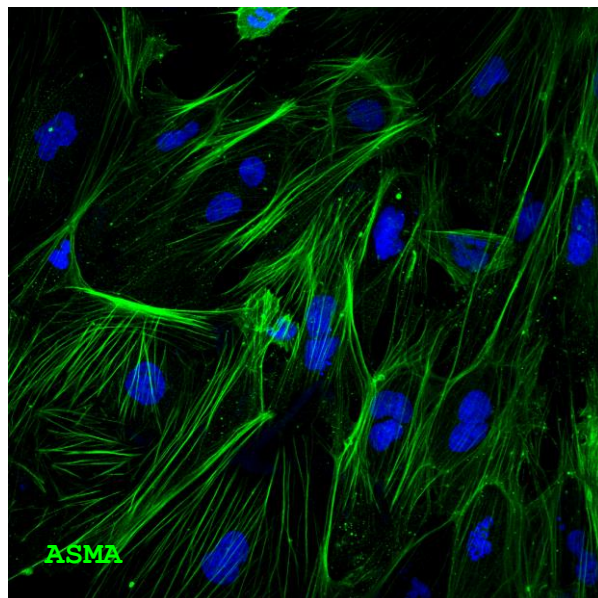


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

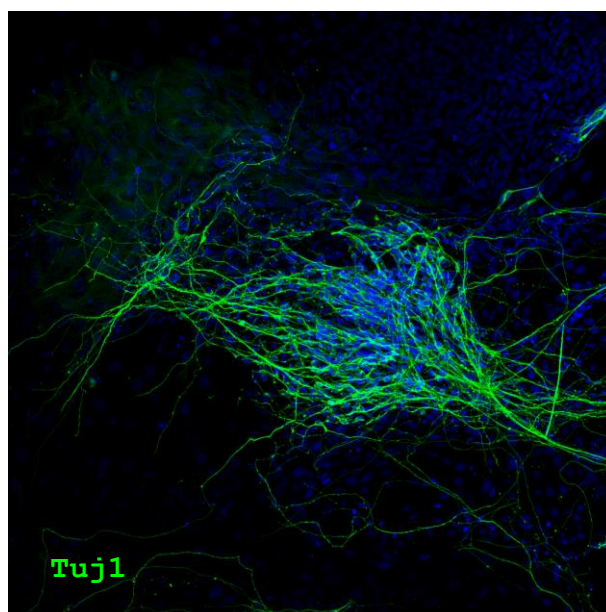
Sox-2, TRA1-60 y SSEA-4

Anexo 2

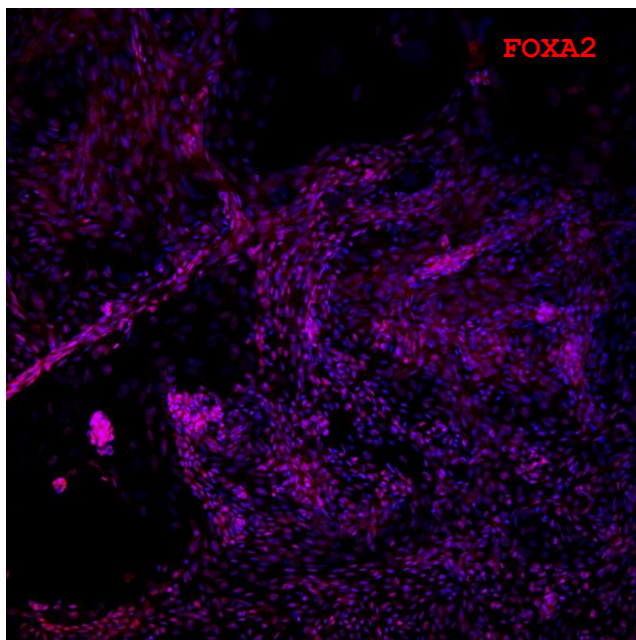
Diferenciación *in vitro*



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



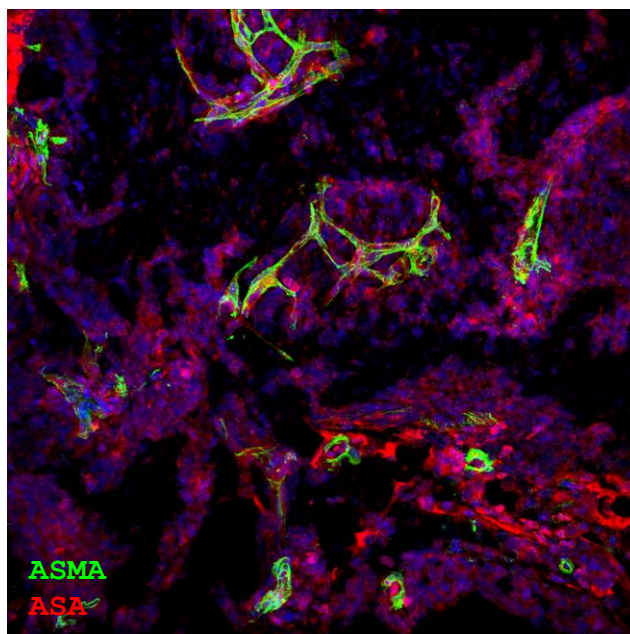
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1**



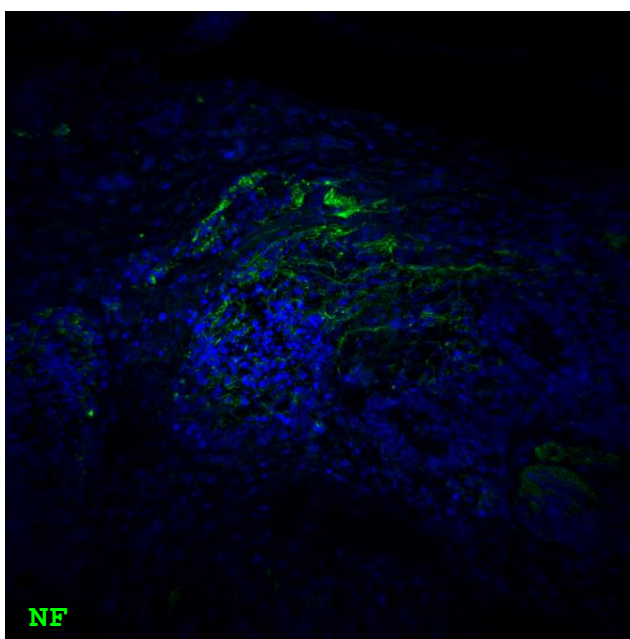
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **FOXA2**

Anexo 3

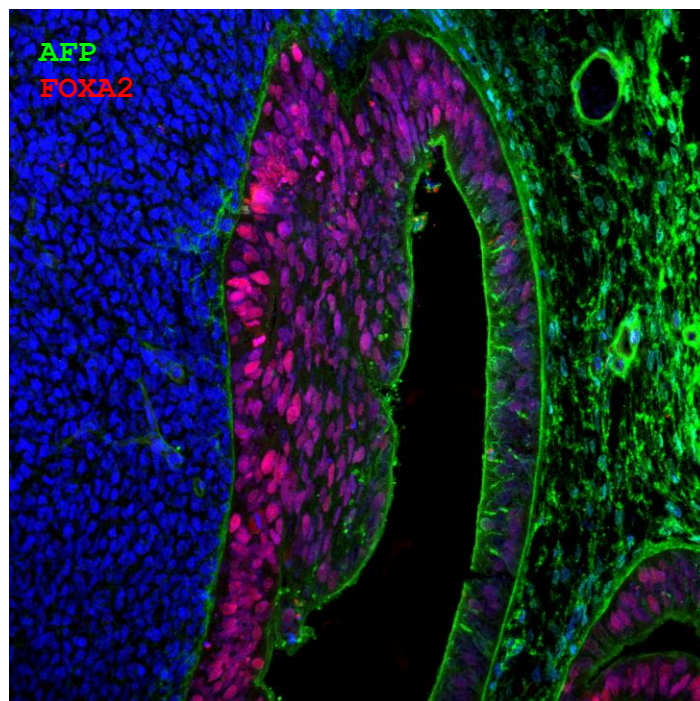
Diferenciación *in vivo*



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



Diferenciación *in vivo* a ectodermo: Células positivas para Neurofilamento.

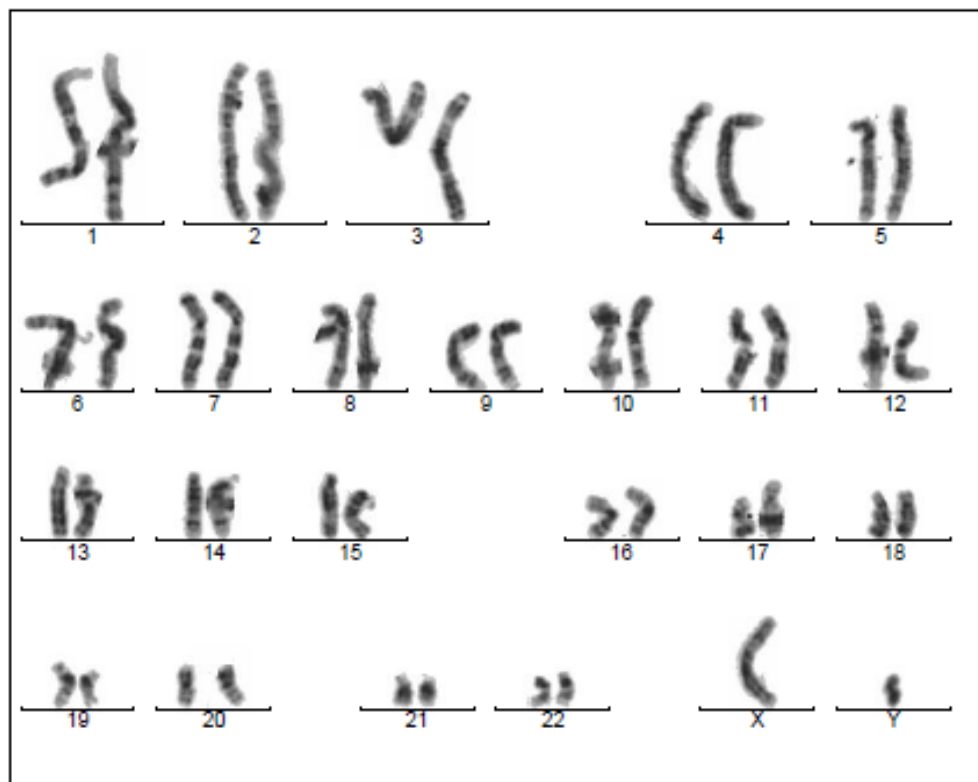


Diferenciación in vivo a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

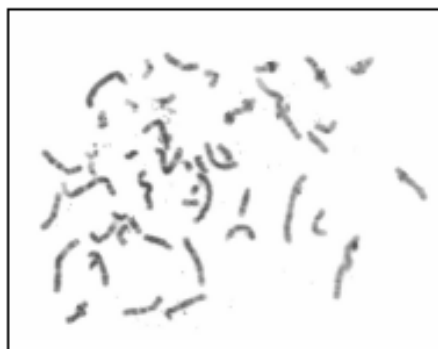
Anexo 4

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Anàlisi Mèdica Barcelona, S.L. C.I.F. B55010054 R.M. Barcelona, Tònic 431 00, Fèrrer 139, Mòbil 425675, Inscrit en 1^a



Case name: A180411

Patient name: SWB FiPS 159-R4F-4 p10

Specimen type: Stem cells

Result: 46,XY

Anexo 5

Resultado microsatélites



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

STR Locus	Label	Size Range of Allelic Ladder Components ^{a,b} (bases)	Repeat Numbers of Allelic Ladder Components
TH01	FL	136–195	4–9, 9.3, 10–11, 11.3
D21S11	FL	205–259	35, 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	AOE	119–133	7–16
D13S317	AOE	176–206	7–15
D7S820	AOE	215–247	6–14 ^c
D16S539	AOE	244–304	5, 6–15
CSF1PO	AOE	321–357	6–13
Amelogenin	THR	106, 112	X, Y
vWA	THR	125–171	10–22
TPOX	THR	282–290	6–13

^aThe length of each allele in the allelic ladder has been confirmed by sequence analysis.

^bWhen using an internal lane standard, such as the Internal Lane Standard 400, the observed 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.

^cHela cells have a microvariant allele 13.3 at the D13S317 locus. This will appear as an off-ladder allele (see www.csl.nist.gov/strbase/var_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 detalla la correlación entre el código de muestra de BioBANCO y la línea celular procesada:

código BioBANCO	Línea celular
32161595002	SWB FiPS159 R4F-4, P10

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
SWB FiPS159 R4F-4, P10	X, Y	10, 32	11, 12	11, 12	29, 32.2	11	9, 11	6	8, 10	14, 16

Granada, a 28 de Diciembre 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
32161591002	SWB 159.01 F

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
SWB 159.01 F	X, Y	10, 12	11, 12	11, 12	29, 32.2	11	9, 11	6	8, 10	14, 16

Granada, a 28 de Diciembre de 2016



Área de Biología Molecular
Biobanco de ISSRA

Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes SWB FiPS 159-R4F-4
y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

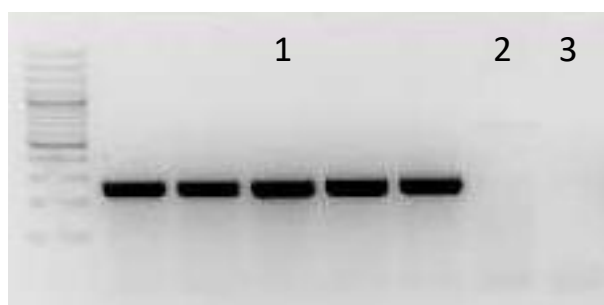
Anexo 6

Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

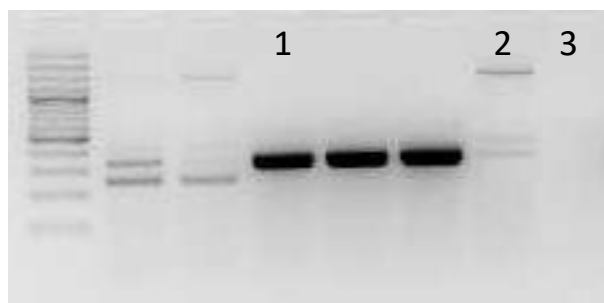
Integration

20/10/2016

pMXs(FIOctVPHASoxVP-Or)n4



pMXs-KM-GFP



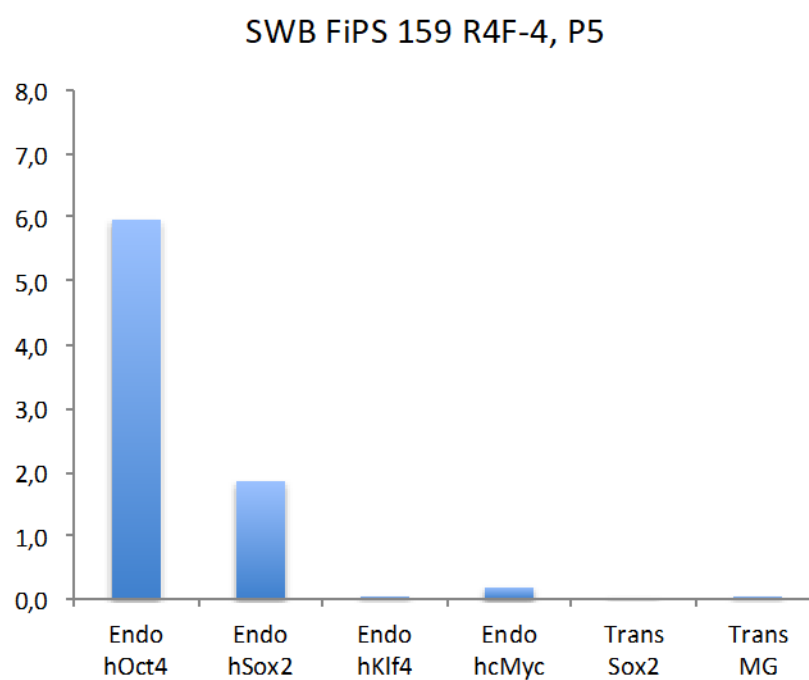
1. SWB FiPS 159 R4F-4, P5
2. Negative Control (non reprogrammed cells)
3. Negative Control (water)

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

Silencing

17/10/2016

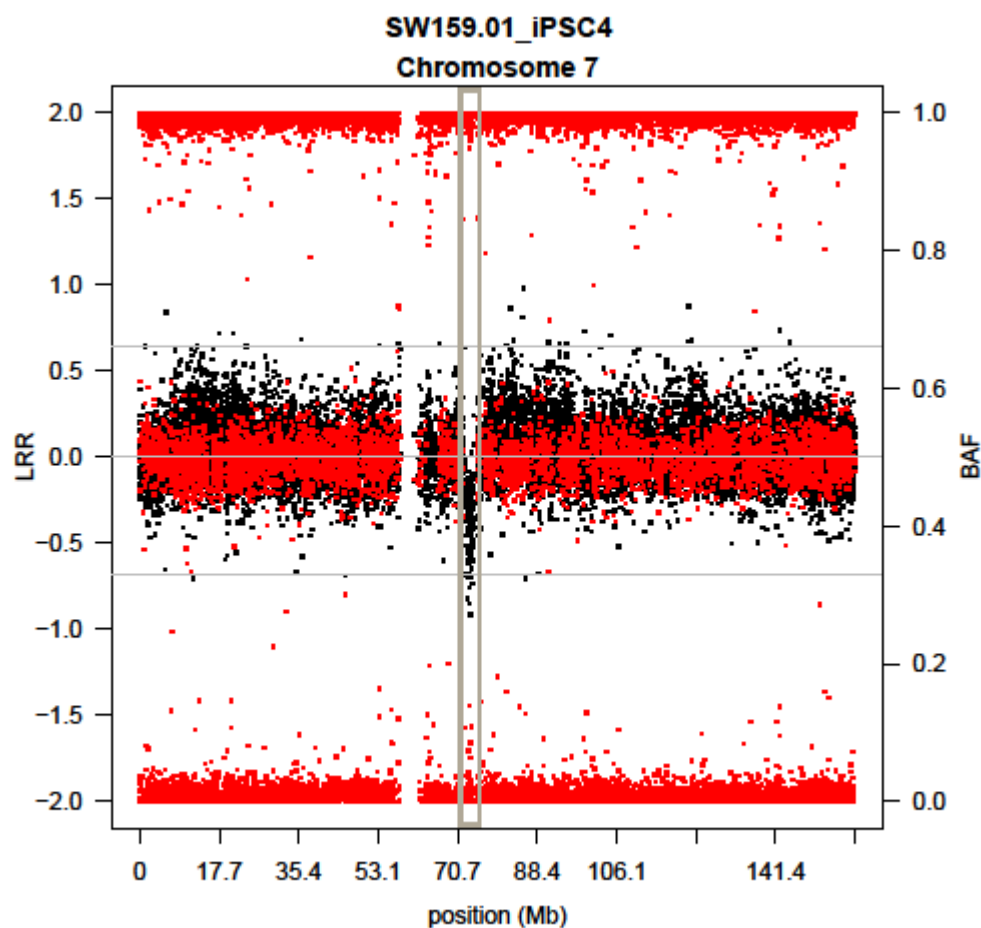
	mRNA levels relative to GAPDH
Endo hOct4	6,0
Endo hSox2	1,8
Endo hKlf4	0,0
Endo hcMyc	0,2
Trans Sox2	0,0
Trans MG	0,0



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 7

Genotipado



SNP-array mostrando la presencia de la delección de la región 7q11.23 en la línea de hiPSC.

Anexo 8

Resultado Test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST

14/12/2016



1. SWB FiPS159 R4F-4, p9
2. Negative control (water)
3. Positive control