

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA iPS

Application Form to Deposit an iPS cell line of human origin

Documentos que se acompañan:

Attached documents:

- ☒ Copia de la autorización de derivación de la línea celular, junto con informe del Comité Ético del centro de procedencia.

A copy of the authorization for the derivation of the cell line, with the corresponding ethics committee approval

- ☐ Copia de cualquier publicación científica relacionada con la derivación y/o caracterización de la línea.

A copy of any relevant published scientific papers related to the derivation and/or characterization of the cell line

- ☒ C. V. del investigador principal (una página; formato libre).

A one page CV for the Principal Investigator

- ☐ Otros (especificar).

Others (specify)

SECCIÓN 1

Section 1

Información General

General Information

Nombre de la línea: CBI_{PS}1sv-4F-40

Name of the line: CBI_{PS}1sv-4F-40

Investigador principal: Alessandra Giorgetti

Principal Investigator:

Tipo de célula de la que se obtiene la línea:

Cell type origin of the cell line

Células CD133+ de sangre de cordón umbilical

CD133+ cells from cord blood

¿El sujeto fuente tiene alguna patología?

Has the donor any pathological condition?

NO ☒

No

SÍ ☐ (especificar)

Yes (specify)

¿La patología es de origen genético?

Is the pathological condition of genetic origin?

NO ☐

No

SÍ ☐ (especificar)

Yes (specify)

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

Genetic identity of the cell line. Method and result

Cariotipo/Karyotype

Euploide/Euploid ☒

Anormal/Atypical ☐

(especificar/specify)

Ver Anexo 3

See Annex 3

SECCIÓN 2

Section 2

Datos del Depositante

Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Alessandra Giorgetti	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Paseo Mikeletegi 81, 20009 San Sebastián (Guipúzcoa)
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Fundación Inbiomed Plataforma de reprogramación y diferenciación celular	Teléfono (phone): 94 3309064 Fax: 94 3308222 E-mail: inbiobank@inbiomed.org

SECCIÓN 3

Section 3

Datos de la Línea Celular

Details of Cell Line

Tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica <i>Tissue of origin and anatomic location of the biological sample</i> Células CD133+ de sangre de cordón CD133+ cells from cord blood	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> Fresco ☐ <i>Fresh</i> Crioconservado ☒ <i>Cryopreserved</i>	
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 23/03/2012	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 28/05/2012

Origen del soporte celular o acelular utilizado para la derivación, así como de los componentes de los medios de cultivo (si se describen en publicación, indicar además referencia)

Origin of the cellular or cellular free support used in derivation in addition to the components of the culture mediums (if they are described in a publication, please indicate the reference).

Support: mouse embryonic fibroblasts (GlobalStem, CF-1 MEF, GSC-6001G).

Culture medium: Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mmol/l GlutaMAX (Gibco,, Invitrogen corporation), 0,05%mmol/l 2-mercaptoethanol (Gibco, InVitrogen corporation), 10ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Peprotech), 1% non- essential amino acids (Sigma-Aldrich), 20% Knockout Serum Replacement (Gibco) y 0.5% Penicilin- Streptomycin (Sigma-Aldrich).

Mantenimiento de la línea: Line maintenance

Ratio de pase: *Passage ratio* 1:2- 1:3 cada 6/7 días; 1:2- 1:3 every 6/7 days

Método de pase: *Passage method* mecánico; mechanical

Xenobióticos
Xenobiotics

si
Yes

no
No

**Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo
(forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)**

Description of the morphological characteristics of the line in culture (form and size of the colonies; form and size of the cells; nucleus/cytoplasm ratio; others)

Colonias grandes poligonales, ligeramente aplanadas, de un tamaño entre 1-3 mm de diámetro de diversas formas con bordes lisos. Células de tamaño uniforme y una elevada relación núcleo/ citoplasma.

Large and flat polygonal colonies, with uniformly sized cells of 1-3 mm of diameter. They have several forms and smooth edges. High nucleus/ cytoplasm ratio.

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

Bacteriología negativo
(Bacteriology)

Micología negativo
(Mycology)

Micoplasma: PCR negativo
(Micoplasma: by PCR)

Marcadores: <i>Markers</i>		Método (ARN/proteínas) <i>Method</i> (RNA/proteins)	nº pase <i>Passage n.</i>	resultado <i>results</i>	comentarios <i>comments</i>
Oct 4	Inmunofluorescencia/RNA		8	+	
Nanog	Inmunofluorescencia/RNA		8	+	
Rex 1 (opcional/ <i>optional</i>)	RNA		8	+	
Sox 2	Inmunofluorescencia/RNA		8	+	
SSEA3	Inmunofluorescencia		8	+	
SSEA4					
TRA-1-60	Inmunofluorescencia		8	+	
TRA-1-81					
Telomerasa/ <i>Telomerase</i> (opcional/ <i>optional</i>)					
Fosfatasa Alc. / <i>Alkaline phosphatase</i>	Actividad		6	+	
Otros / <i>Others</i>					
TERT	RNA		8	+	

Capacidad de diferenciación <i>Differentiation capacity</i>									
Ectodermo/ <i>Ectoderm</i>				Endodermo/ <i>Endoderm</i>				Mesodermo/ <i>Mesoderm</i>	
marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>		marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>		marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>
In Vitro	Tuj1	12	+	FoxA2	12	+		SMA	12
In vitro	Pax6	12	+	Alpha-fetoprotein	12	+		MEOX	12
	NeuroD3	12	+	Sox17	12	+			
	Sox1	12	+						
Anexo 4 Annex 4									
In vivo/ <i>in vivo</i> (Anexo 5) Pase/passage 18			Método: formación de teratomas en ratones SCID <i>Method: teratoma formation in SCID mice</i>				Resultado: + <i>Result: +</i>		

OPCIONAL/OPTIONAL:

Reprogramación del perfil de expresión génica

Reprogramming of gene expression profile

Si. Q-RT-PCR de 5 genes de pluripotencia (Oct4, Sox2, Nanog, Rex1 y Tert)

Yes. Q-RT-PCR of pluripotency genes (Oct4, Sox2, Nanog, Rex1 and Tert)

Reprogramación del perfil de metilación del ADN

Reprogramming of DNA methylation profile

No

Longitud telomérica

Telomere length

No

Descripción de las características de diferenciación *in vitro*

Description of the differentiation characteristics in vitro

Los cuerpos embrioides (EBs) se cultivan en placas *ultra low-binding* en medio StemPro 34 (Invitrogen) suplementado con 2mM L-Gln, 4×10^{-4} monotioglicerol (MTG), 50µg/ml ácido ascórbico (Sigma) y 150µg/ml transferrina (Sigma). Tras ocho días de diferenciación, los EBs se transfieren a placas tratadas con gelatina en presencia de medio DMEM al 10% FBS.

Embryoids bodies (EBs) has been cultured in StemPro 34 (Invitrogen) medium containing 2mM L-Gln, 4×10^{-4} monothioglycerol (MTG), 50µg/ml ascorbic acid (Sigma) and 150µg/ml transferrin (Sigma) in ultra low-binding plates. After eight days of differentiation the EBs has been transferred to gelatin-coated dishes in the presence of DMEM 10% FBS.

Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas

Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation

Inyección intratesticular en ratones SCID de *clumps* de células indiferenciadas y tras aproximadamente 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo. (ver Anexo 5)

Clumps of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. Around 8 weeks later teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (see Annex 5).

Datos de la tipificación HLA

HLA typification data

Anexo 1

Annex 1

Integración de los transgenes de reprogramación: gPCR para integración de provirus

Integration of reprogramming transgenes: gPCR for provirus integration

La línea CBiPS1sv-4F-5 ha sido generada utilizando una estrategia no integrativa basada en los vectores de sendai virus (Invitrogen-CytoTune® -iPS Sendai Reprogramming Kit, A1378001). El sendai virus es un virus RNA de cadena sencilla y orientación negativa, que permite la generación de iPSCs sin la integración del transgén en el genoma de las células infectadas.

CBiPS1sv-4F-5 has been generated using a no-integrative strategy based on Sendi Virus (Invitrogen-CytoTune® -iPS Sendai Reprogramming Kit, A1378001). SeV is a negative sense, single strand RNA virus that allow the generation of iPSCs without the transgene integration in the genome of infected cells.

Silenciamiento de los transgenes de reprogramación: RT-PCR o Q-RT-PCR

Silencing of reprogramming transgenes: RT-PCR o Q-RT-PCR

La ausencia del sendai virus (SeV) en el genoma ha sido testada mediante Q-RT-PCR y inmunofluorescencia.

The absence of SeV genome has been tested by Q-RT-PCR and staining

Mantenimiento a largo plazo en cultivo: > 20 pases

Long-term maintenance in culture: >20 passages

La línea se ha cultivado durante 36 pases

The line has been cultured during 36 passages

Pase en el momento del registro

Passage at the time of the recording

36

¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes ☐ No No ☒ Comentarios/ Comments:	¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i> Sí/ Yes ☐ No ☒ Resultado / Result
--	--

Otras observaciones o información relevantes (a juicio del Investigador Principal):
Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigator):

Otras observaciones o información relevantes (a rellenar por el BNLC):
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

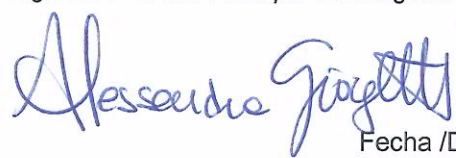
Seguimiento de la línea (a rellenar por el BNLC):
Follow up of the line (to be completed by BNLC)

SECCIÓN 4

Declaración

Confirmo que la información contenida en estos impresos es cierta y asumo total responsabilidad sobre la misma.

I confirm that the information contained in this form is true and I assume total responsibility for it.

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) (Legal Representative of the Department/Centre)  Fecha/ Date: 26/03/2013	Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator  Fecha /Date 26/03/2013
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Jose Manuel Franco Ruiz. Director Gerente	
Dirección Postal: Postal Address: Fundación Inbiomed Paseo Mikeletegi, 81 20009, San Sebastián (Guipúzcoa)	Teléfono /Telephone: 94 3309064 Fax: 94 3308222 E-mail: inbiobank@inbiobank.org