

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR CT PBiPS1-Sv4F-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

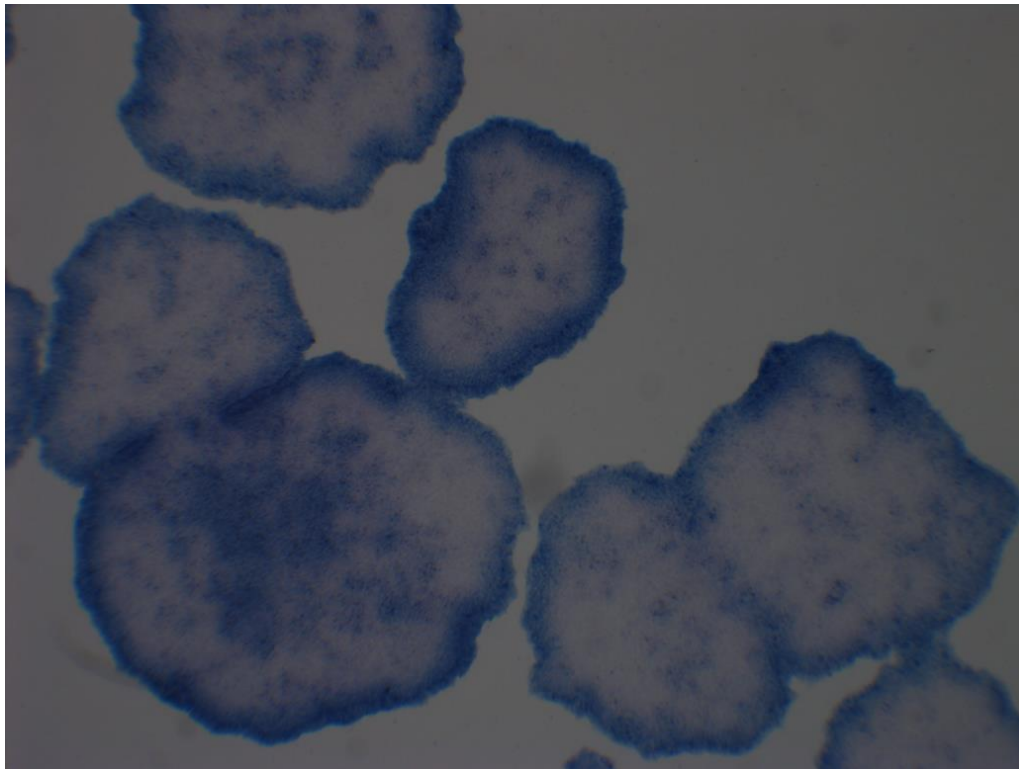
Anexo 5: Resultados microsatélites

Anexo 6: Ausencia de los transgenes de reprogramación

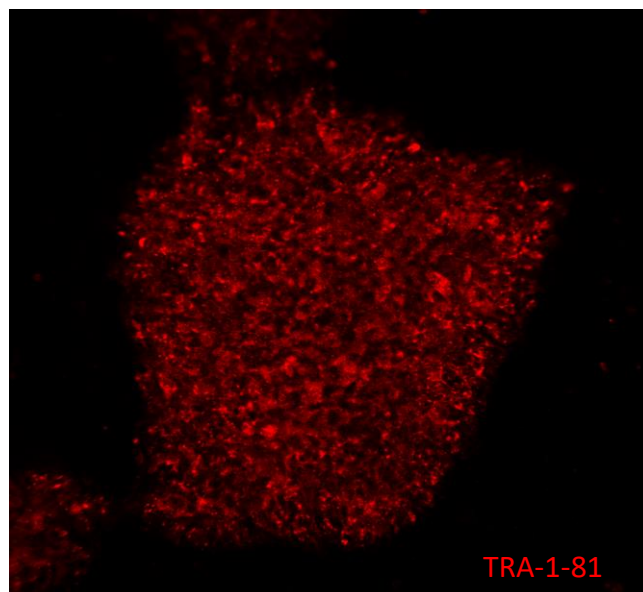
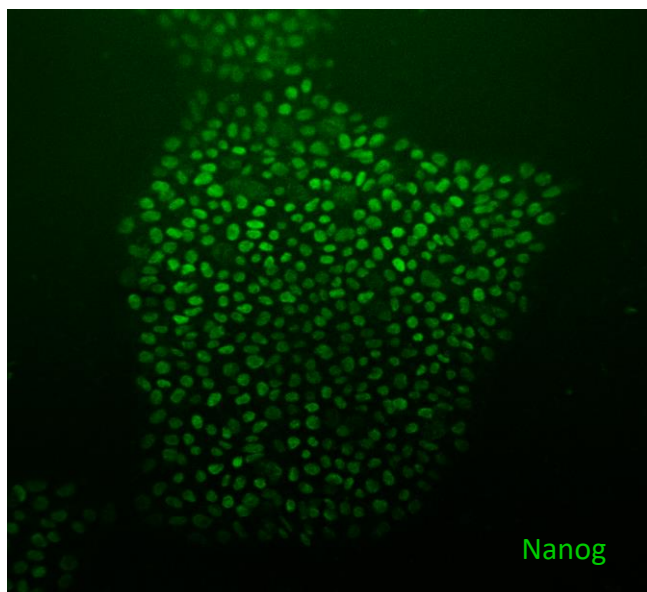
Anexo 7: Resultado Test de micoplasma

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

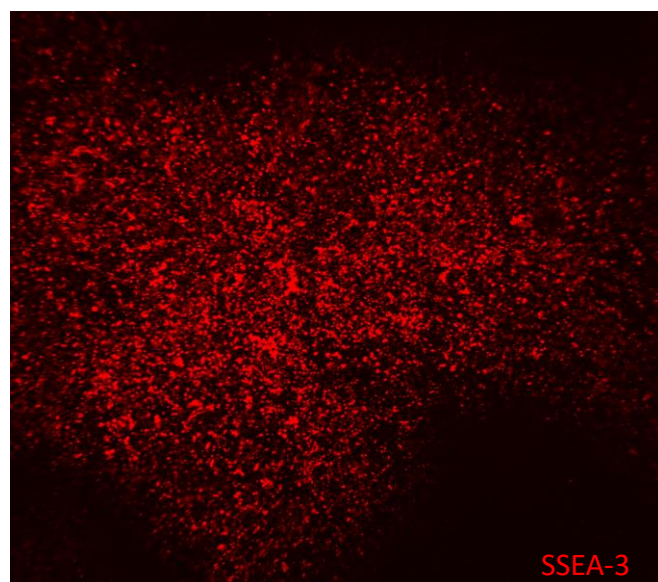
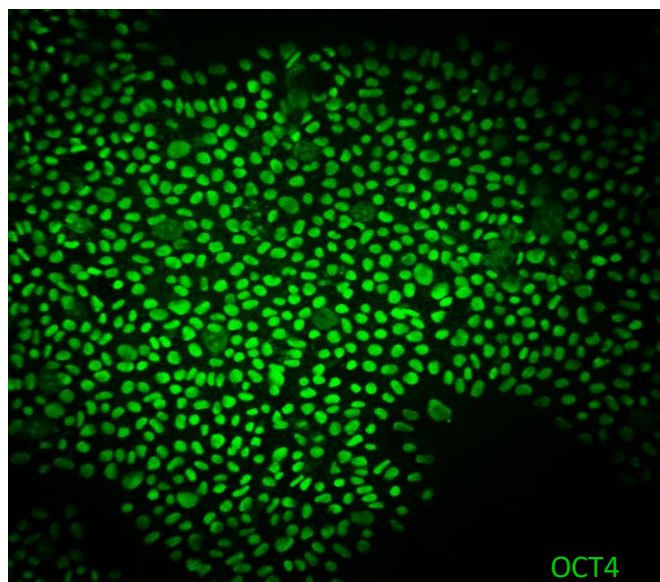


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



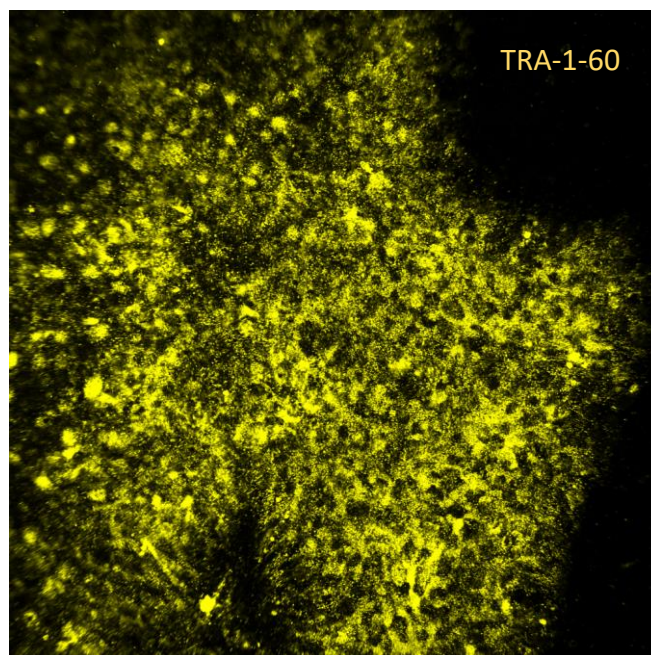
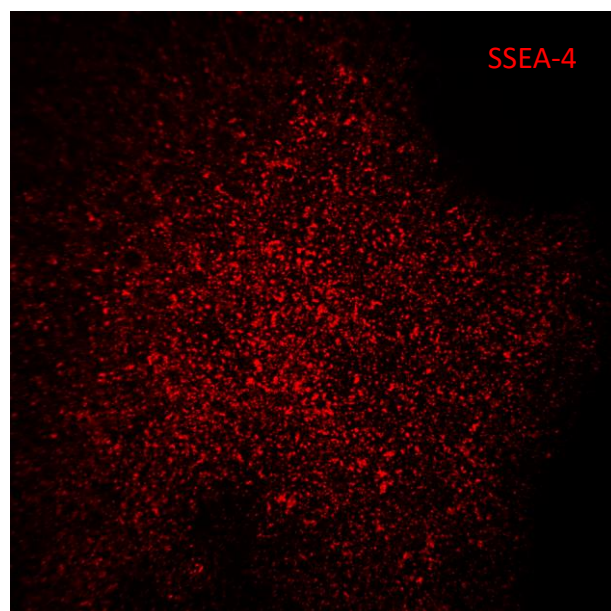
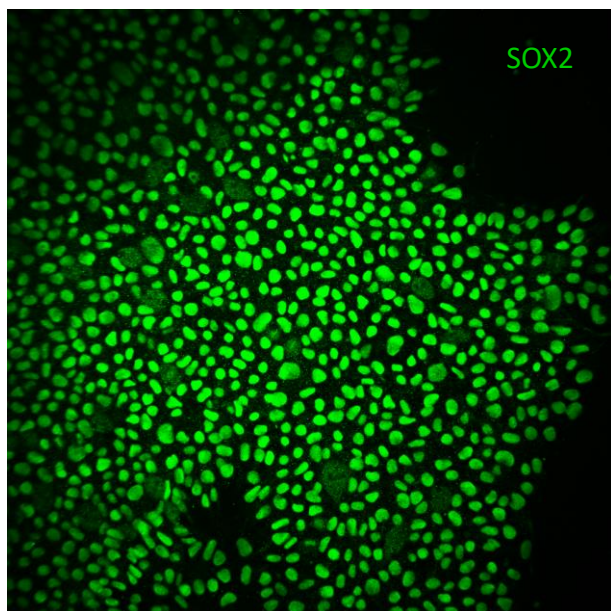
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3

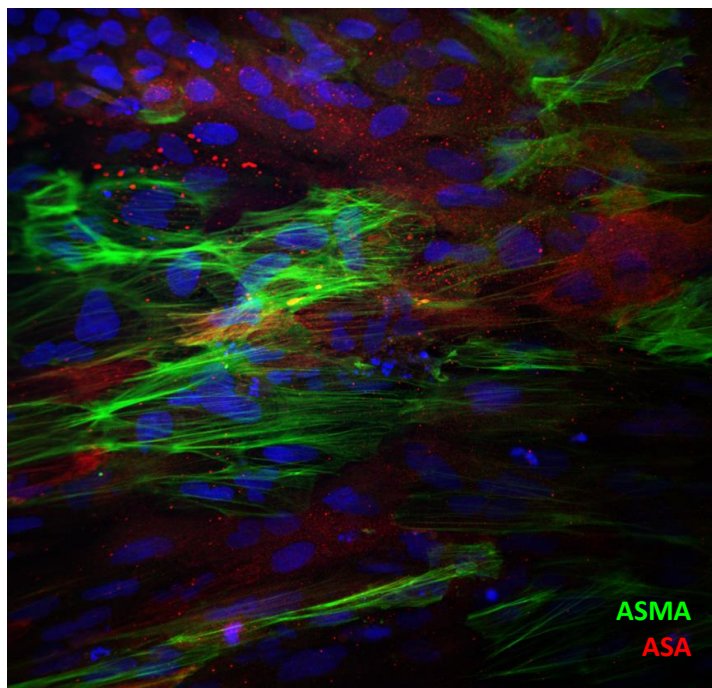


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

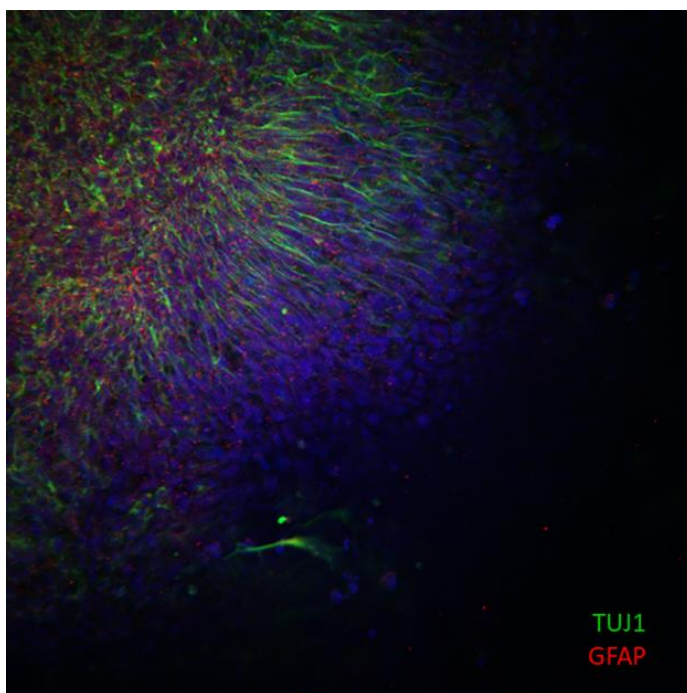
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

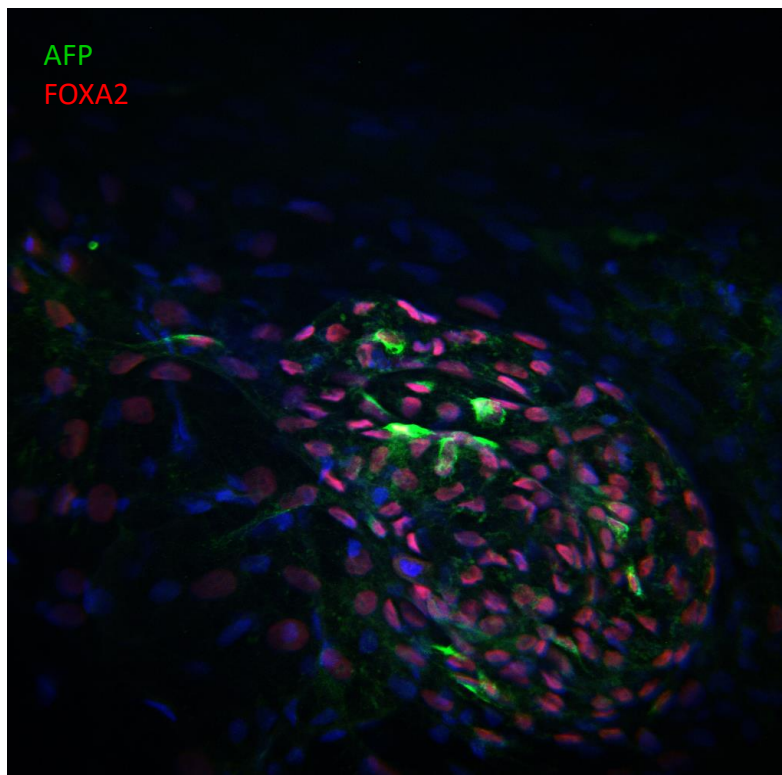
Diferenciación *in vitro*



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



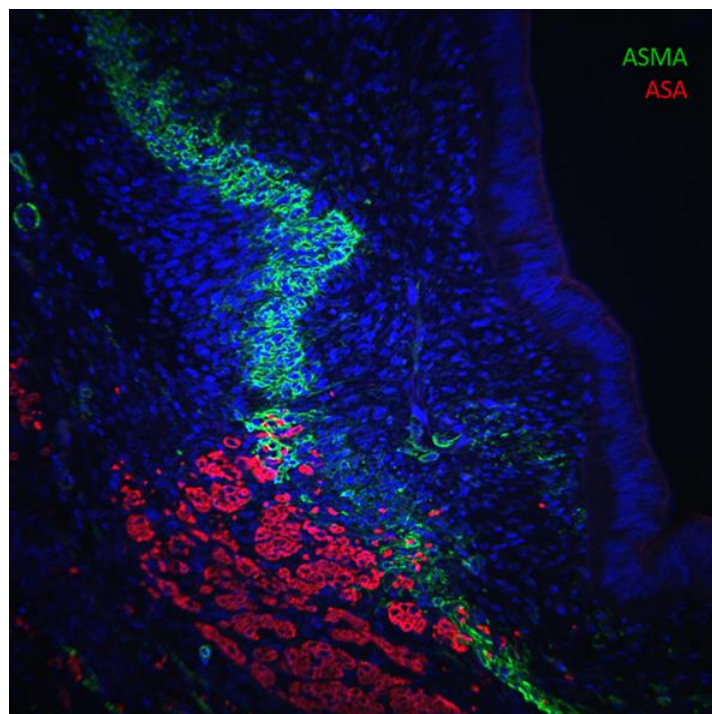
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1 Y GFAP**



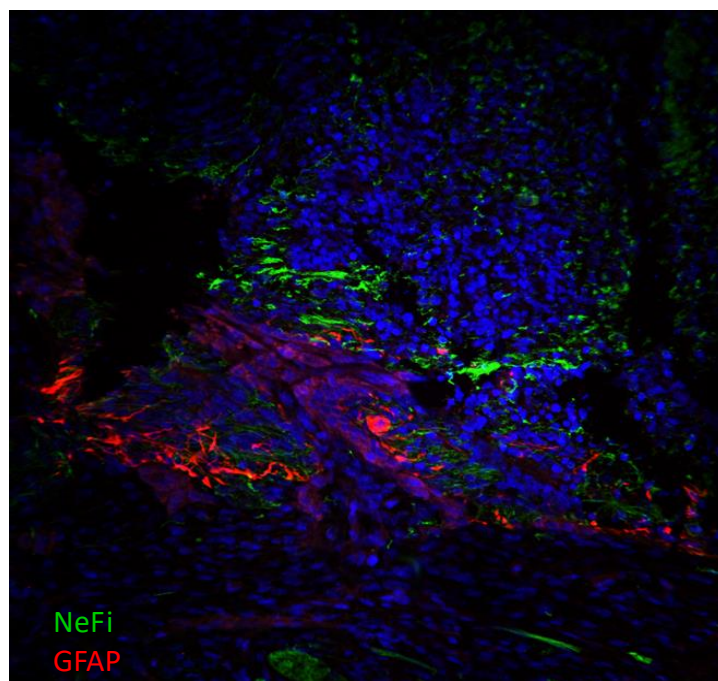
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

Anexo 3

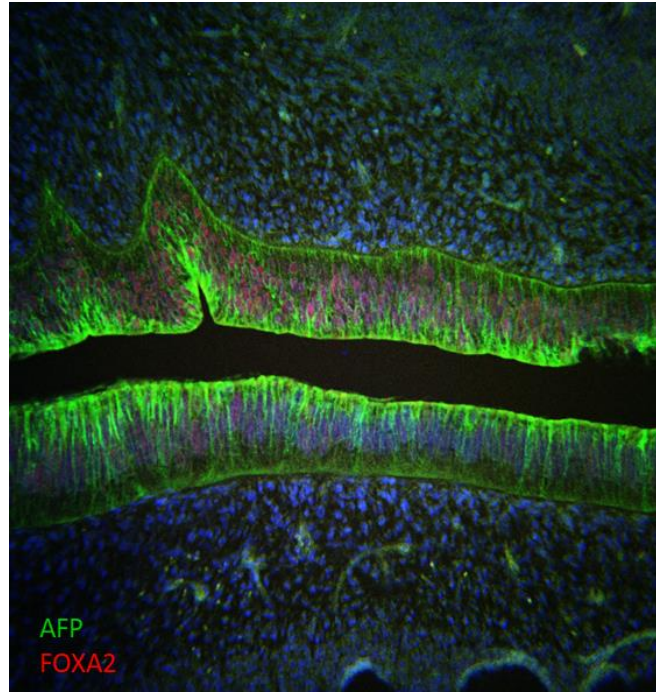
Diferenciación *in vivo*



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



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



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

Anexo 4

Cariotipo

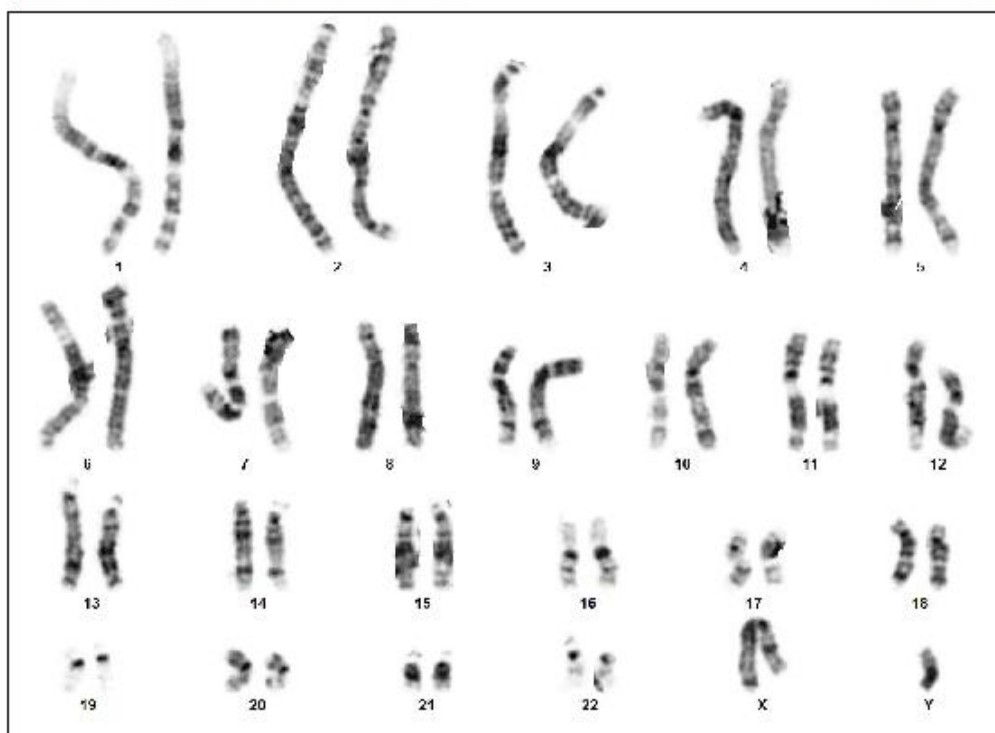
ESTUDIO CITOGENETICO

Case name: 82880652

Nombre y Apellidos: CT PBiPS1-Sv4F-1 p16

NHC: CT0042

Servicio: CMRB



Resultado: 46,XY

Anexo 5

Resultado microsatélites



Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
CONSEJERÍA DE SALUD

v.04

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 Allelic Ladder Information.

STR Locus	Label	Size Range of Allelic Ladder Components (bases)	Repeat Numbers of Allelic Ladder Components
TH01	SL	136-192	4-9, 9.5, 10-11, 13.5
D21S11	SL	205-293	24, 24.5, 25, 25.5, 26-28, 28.5, 29, 29.5, 30, 30.5, 31, 32, 32.5, 33, 33.5, 34, 34.5, 35, 35.5, 36-38
D5S818	JOE	119-153	6-13
D13S317	JOE	136-168	7-15
D7S820	JOE	210-237	6-14
D16S539	JOE	247-301	5-8, 15
CSP1PO	JOE	171-197	6-13
Amelogenin	TMR	116, 112	X, Y
vWA	TMR	125-171	10-22
TPOX	TMR	202-290	6-15

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

**When using an internal lane standard, such as the Internal Lane Standard (ILS), the calculated sizes of allelic ladder components may differ from those listed. This occurs because different sequences in allelic ladder and ILS amplicons may cause interference in fragment sizing. The allelic ladder has been designed to be free of this.

*Linkage disequilibrium is observed between D21S11 and TH01. This will appear as a heteroduplex band. See www.promega.com/resources/faq/faq_01135117.htm for details.

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:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

Código biobanco	Código origen del ADN de la línea celular	Loci STRs analizados									
		TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
32180369027	CT PBiPS1-Sv4F-1	9, 9.3	31, 31.2	12, 13	11, 12	10, 12	13	12	X, Y	14, 17	8

Granada, a 31 de Octubre de 2018

Laboratorio de Biología Molecular
Biobanco del SSPA



RESULTADOS:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

Código biobanco	Código origen del ADN de la línea celular	Loci STRs analizados									
		TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
32180369032	CT1	9, 9.3	31, 31.2	12, 13	11, 12	10, 12	13	12	X, Y	14, 17	8

Granada, a 31 de Octubre de 2018

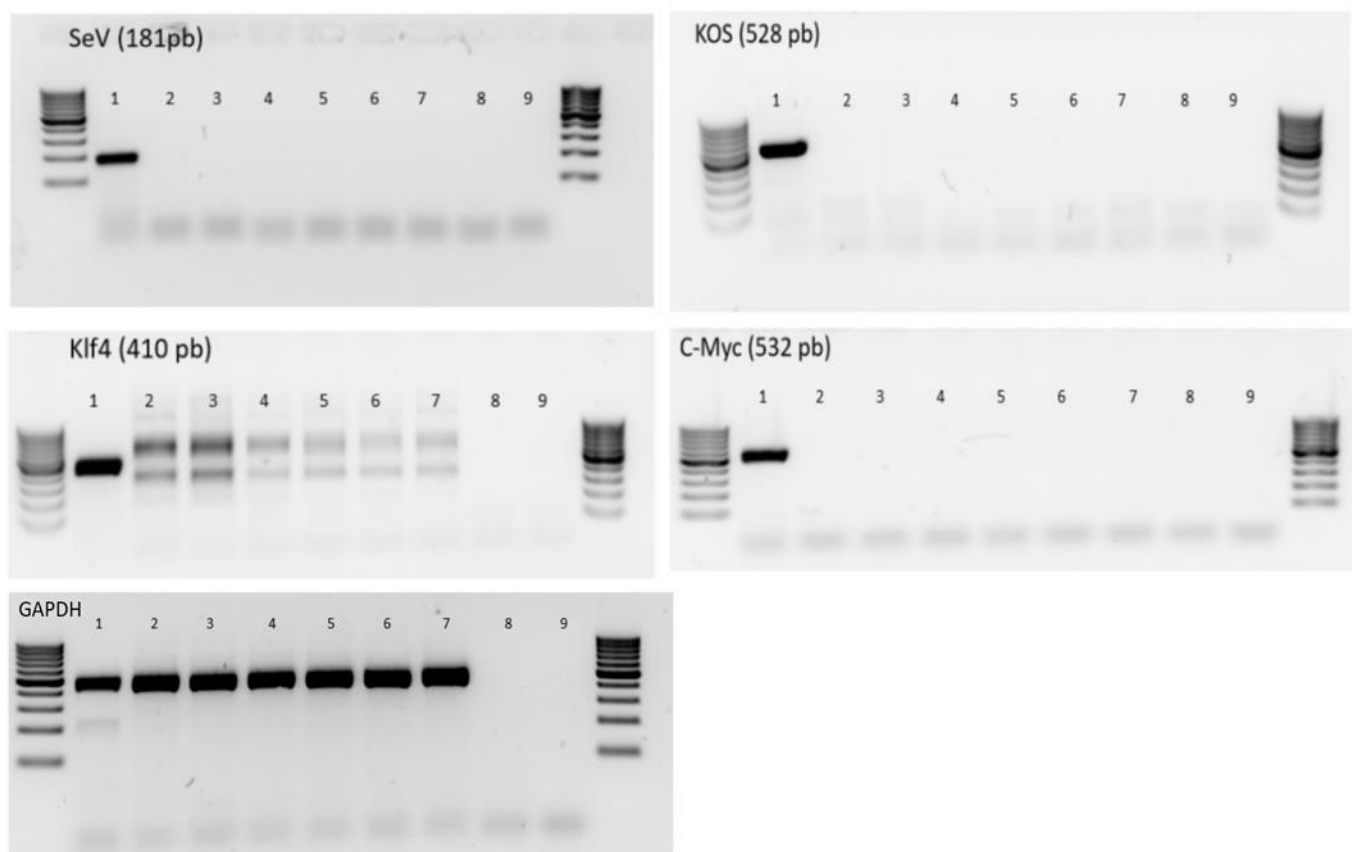
Laboratorio de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes CT PBiPS1-Sv4F-1 y en las células sanguíneas de las que proceden.

Anexo 6

Ausencia de los transgenes de reprogramación

RT-PCR SENDAI 8.8.18



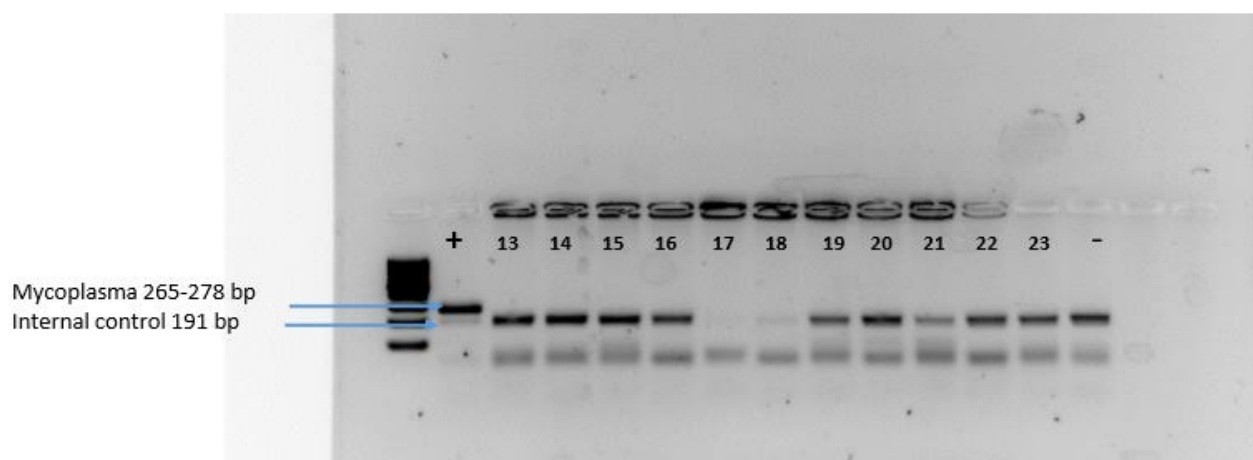
1. Sendai transduced NF ST25 cells, 0,1M, 13.01.18 (positive control)
2. CT PBiPS1 Sv4F-1, P6, 31.07.18
8. Sample 3 (without RT)
9. H2O

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

Anexo 7

Resultado Test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 31/10/2018



22:CT PBiPS1-Sv4F-1 p19