

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE REGISTRO Y DEPÓSITO DE UNA LÍNEA EMBRIONARIA-FETAL

Application Form for the Registration and Deposit of an Embryonic-Fetal Cell Line

FECHA: 15/10/2015

DOCUMENTOS QUE DEBEN ACOMPAÑAR LA SOLICITUD:

Attached documents:

- Copia de la autorización del proyecto en que se deriva la línea celular, junto con informe favorable 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

SECCIÓN 1-INFORMACIÓN DE LA MUESTRA ORIGINAL Y DE LA LÍNEA GENERADA.

Section 1-Information of the original cell line and the generated.

Nombre de la línea Name of the line:	AND1 EGFP-2A-SCL (AND1 pRRRL-EF1a-EGFP-2A-SCL-PGK-Neo)	
Origen de la línea celular: Origin of the cell line:	Embrionario Embryonic <input checked="" type="checkbox"/>	Fetal Fetal <input type="checkbox"/>
Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...) Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)	Modificación genética de la línea AND1, desarrollada previamente por el BACM en Granada. Genetic modification from AND1 hESC line, previously developed by the BACM in Granada.	
¿La línea celular ha sido derivada de un embrión con anomalía genética? Has the cell line been derived from an embryo with genetic anomaly?	NO <input checked="" type="checkbox"/> No	SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) Yes (specify)
Muestra biológica recibida Biological sample	Fresco <input type="checkbox"/> Fresh	Crioconservado <input checked="" type="checkbox"/> Cryopreserved
Fecha de la obtención/generación de la muestra biológica Date of obtaining/generation of the biological sample	Fecha del uso o descongelación (si congelado) Date used or thawed (if frozen) Enero 2011 January 2011	

Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i>	
Descripción general del procesamiento previo de la muestra biológica de origen (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal, ...) <i>General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample, ...)</i>	La Línea AND1 fue obtenida del Banco Nacional de Líneas Celulares (BNLC) tras la aprobación del comité pertinente para la ejecución del proyecto Implicación de los Factores Transcripcionales hematopoyéticos RUNX1 y SCL en la diferenciación de las células embrionarias humanas a linaje hematopoyético. Las células fueron cultivadas tal y como se describe en la bibliografía adjunta (Real PJ et al. Molecular Therapy 2012; 20(7):1443-53). AND1 cell line was obtained from the BNLC after the approval by the corresponding ethic committee for the execution of the project entitled: Implication of the hematopoietic transcription factors RUNX1 and SCL in hematopoietic differentiation from hESCs. Cells were cultured as described in the bibliography (Real PJ et al Molecular Therapy 2012; 20(7):1443-53).
En caso de muestra embrionaria, indicar si se utilizaron blastómeros o células de la masa celular interna y el método de aislamiento utilizado <i>If of embryonic origin, indicate whether blastomeres or internal cell mass were used, as well as the isolation method</i>	Se utilizó la línea AND1 generada previamente por el BACM como se describe en Cortes JL et al . Human Reprod 2009; 24: 1844. Se generó a partir de un stock de pase 37 de línea celular AND1 parental. AND1 hES cell line was generated by the BACM as described in Cortes JL et al . Human Reprod 2009; 24: 1844. AND1 Neo was derived from p37 from the original AND1 hES cell line.
Condiciones de cultivo y método utilizado en el proceso de derivación. <i>Culture conditions and method used in the derivation process</i>	Soporte: Células stem mesenquimales humanas irradiadas (ihMSCs). Medio Cultivo: KO-DMEM suplementado con 20% KO Serum Replacement, 1% aminoacidos no esenciales, 1 mM L-glutamina, 0.1 mM β-mercptoetanol y 4 ng/ml bFGF. Las AND1 Neo fueron mantenidas en ihMSCs hasta su estabilización y caracterización. Las iPSCs también han sido adaptadas a cultivo libre de feeders en matriz (Corning BD) con medio condicionado de ihMSCs +4 ng/ml bFGF. Feeders: Irradiated human mesenchymal stem cells (ihMSCs). Culture medium: KO-DMEM supplemented with 20% KO Serum Replacement, 1% non-essential amino acids, 1 mM L-glutamine, 0.1 mM β-mercptoethanol and 4 ng/ml of bFGF. AND1 Neo cells have been cultured over ihMSCs until stabilization and characterization. iPSCs had been also adapted to feeder-free cultures on matrigel (Corning BD) with ihMSCs condition medium+4 ng/ml bFGF.
Condiciones de cultivo de la línea de ESc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia) <i>Culture conditions of the ESc line generated (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Las células fueron cultivadas tal y como se describe en la bibliografía adjunta (Real PJ et al. Molecular Therapy 2012; 20(7):1443-53) Cells were cultured as described in the bibliography (Real PJ et al Molecular Therapy 2012; 20(7):1443-53).

<p>Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros) <i>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)</i></p>	<p>Células pequeñas y apretadas con una alta relación núcleo/citoplasma y un nucléolo prominente, que crecen en colonias circulares con bordes definidos. Small, tightly packed cells with a high nucleus/cytoplasm ratio and prominent nucleoli, circular colonies growing with defined edges.</p>
<p>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i></p>	<p>Método de congelación: Las colonias de AND1 EGFP-2A-SCL son levantadas, peleteadas y resuspendidas en primer lugar en 0,5ml de suero bovino fetal (SBF) pre-enfriado y después en 0,5ml de SBF con 20%DMSO pre-enfriado. La congelación se realiza de manera gradual utilizando contenedores para congelación contenido isopropanol a -80°C. Método de descongelación: La descongelación se realiza introduciendo el vial congelado en un baño de agua a 37°C. Cuando la muestra está casi descongelada, se pasa la solución a medio de cultivo atemperado (10 volúmenes), se centrifuga (1200rpm, 3 min.) y el pellet se pone en cultivo con su medio correspondiente.</p> <p>Freezing method: AND1 EGFP-2A-SCL colonies are splited, pelleted and resuspended first in 0,5ml of pre-chilled fetal bovine serum (FBS) and then in 0,5ml of pre-chilled FBS with 20%DMSO solution. Freezing process takes place in a gradual manner using freezing container with isopropanol from RT to -80°C. Thawing method: Thawing process takes place in a fast manner, putting the crioval in a water bath at 37°C. When the solution is almost thawed, add a 10x volume of pre-warmed medium, centrifugate the mix (1200rpm, 3 min.) and cultivate the pellet in the appropriate medium.</p>
<p>Pase de la línea celular en el momento del banqueo/registro. (Máximo: Pase 15) <i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i></p>	
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i></p> <p>Sí Yes <input checked="" type="checkbox"/> No No <input type="checkbox"/></p> <p>Comentarios/ Comments:</p>	<p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i></p> <p>Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Resultado / Result Realizamos una selección polyclonal. We performed a polyclonal selection.</p>

SECCIÓN 2 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA. Adjuntar resultados (imágenes o gráficos) como anexo

Section 2 Cell Line characterization results. Attach results (images and graphics) as an annex

Test de pluripotencia: Pluripotency test:	Método Method	Marcador Marker	Nº pase Passage n.	Resultado N results	Comentarios Comments
	Oct 4	qPCR y Citometría de Flujo/ p 9 y 12 / Positivo			
	Nanog	qPCR/ p10 / Positivo			
	Sox 2	qPCR/ p10 / Positivo			
	SSEA3	Citometría de Flujo/ p 12 / Positivo			
	SSEA4	Citometría de Flujo/ p 12 / Positivo			
	TRA-1-60	Citometría de Flujo/ p 12 / Positivo			
	TRA-1-81	Citometría de Flujo/ p 12 / Positivo			
	Fosfatasa. Alk				
Test de diferenciación <i>in vitro</i> <i>In vitro differentiation</i> test	Método Method	Marcador Marker	Nº pase Passage n	Resultado Results	Comentarios Comments
	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Inmunofluorescencia/ tubulina/ pasos 10-30/Positivo			
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Citometría de flujo/ CD31, CD34, CD45/ pasos 10-30/Positivo			
	Endodermo <i>Endoderm</i>				
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida) <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	La diferenciación inducida hacia linaje hematopoyético está descrita en la bibliografía adjunta (Real PJ et al Molecular Therapy 2012; 20(7):1443-53). La diferenciación inducida hacia motoneuronas ha sido publicada recientemente (Amoroso MW et al. J Neurosci 2013; 33: 574-86). Induced hematopoietic differentiation is described in Real PJ et al Molecular Therapy 2012; 20(7):1443-53. Induced motor neuron differentiation from hESCs has been recently described (Amoroso MW et al. J Neurosci 2013; 33: 574-86),				

Test de diferenciación <i>in vivo</i> <i>In vivo differentiation test</i>	Método / Method	Marcador / Marker	Nº pase / Passage n	Resultado / Results	Comentarios / Comments
	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Inmunohistoquímica/ b-III-Tubulina/ p10 / Positivo			
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Inmunohistoquímica/ smooth-muscle actina/ p10 / Positivo			
	Endodermo <i>Endoderm</i>	Inmunohistoquímica/ pan-CK/ p10 / Positivo			
Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>		Se inyectaron AND1 EGFP-2A-SCL por vía subcutánea en flancos dorsales de ratones NOD-SCID. 12-16 semanas post-inyección, los teratomas fueron fijados e incluidos en parafina. El examen histológico de las preparaciones de hematoxilina-eosina mostró diferenciación hacia las tres capas germinales (Anexo 4). AND1 EGFP-2A-SCL cells were injected subcutaneously into dorsal flanks of NOD-SCID mice. 12-16 weeks post-injection teratomas were fixed and embedded in paraffin. Histological examination of hematoxilin-eosin preparations showed differentiation towards the three germ layers (Annex 4).			
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>		47,XY,-1, +der(1)dup(1q11->1qter::1q11->1qter),-7,+i(7) +13 pase 18 (p18) desde que se originó la línea AND1 EGFP-2A-SCL, partiendo de AND1 wt p37 (Anexo 5). La estabilidad de la línea se evaluó también a largo plazo (p66) (Anexo 5). 47,XY,-1, +der(1)dup(1q11->1qter::1q11->1qter),-7,+i(7) +13 pass 18 (p18). AND1 EGFP-2A-SCL was generated from AND1 wt p37 (Annex 5). Genetic stability was evaluated at p66 (Annex 5).			
<i>cariotípic</i>					
Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the cell line</i>		Se empleó el análisis de 5 regiones de microsatélites diferentes para la identificación de las células de estudio (AND1 EGFP-2A-SCL) con respecto a otra línea transgénica generada al mismo tiempo (AND1 NEO) (Anexo 6). 4 loci están ligados al cromosoma X (GATA31E08, DXS6789, GATA175D03 y DXS7132) y un locus ligado al cromosoma Y (DYS390) (Type-it Microsatellite PCR Kit, Qiagen). AND1 EGFP-2A-SCL se encuentran en los carriles 3 y 4, mientras que la referencia se sitúa en las posiciones 1 y 2. 5 independent microsatellites regions were used for cell identity (Annex 6). 4 loci are linked to X chromosome (GATA31E08, DXS6789, GATA175D03 and DXS7132) and another linked to Y chromosome (DYS390) (Type-it Microsatellite PCR Kit, Qiagen). AND1 EGFP-2A-SCL cells were loaded into lanes 3 and 4, while AND1 NEO samples were loaded into lanes 1 and 2.			

<p>Confirmación del diagnóstico genotípico de la línea celular generada a partir de muestras con mutación genética <i>Confirmation of genotypic diagnosis of the cell line generated from samples with genetic mutation</i></p>	
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Test de Mycoplasma NEGATIVO determinado por PCR (Anexo 7) Mycoplasma test NEGATIVE as determined by PCR (Annex 7)</p>

SECCIÓN 3

Section 3

DATOS DEL DEPOSITANTE*Applicant Details**Applicant Details*

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> PABLO MENENDEZ BUJAN (IJC) PEDRO JOSÉ REAL LUNA (FPS-GENyO)	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Carrer Casanova 143. Barcelona 08036. (IJC) PTS-Granada. Avda. Ilustracion 114. Granada 18016. (FPS-GENyO).
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras (IJC) (Pablo Menéndez Buján). Fundación Pública Progreso y Salud-GENyO (Pedro José Real Luna)	Teléfono (phone): 93 5572809/ 958 715500 Fax: 958 637071 E-mail: pmenendez@carrerasresearch.org/ pedro.real@genyo.es

SECCIÓN 4

Section 4

INFORMACIÓN ADICIONAL (OPCIONAL)*Additional information (optional)***Otras observaciones o información relevantes** (a juicio del Investigador Principal):

Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigator):

Esta línea celular sobreexpresa el cDNA de EGFP-2A-SCL de manera constitutiva. Esto hace que tenga determinadas propiedades específicas sobre la línea celular parental AND1 de la que procede.

This hES cell line overexpress EGFP-2A-SCL in a constitutive way. This overexpression promotes several functional properties in comparison with the parental hES cell line AND1.

Otras observaciones o información relevantes (a llenar por el BNLC):

Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

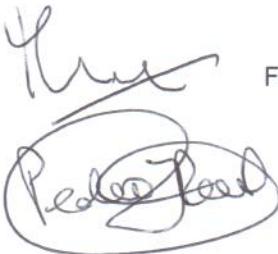
Seguimiento de la línea (a llenar por el BNLC):

Follow up of the line (to be completed by BNLC)

SECCIÓN 5 DECLARACIÓN

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

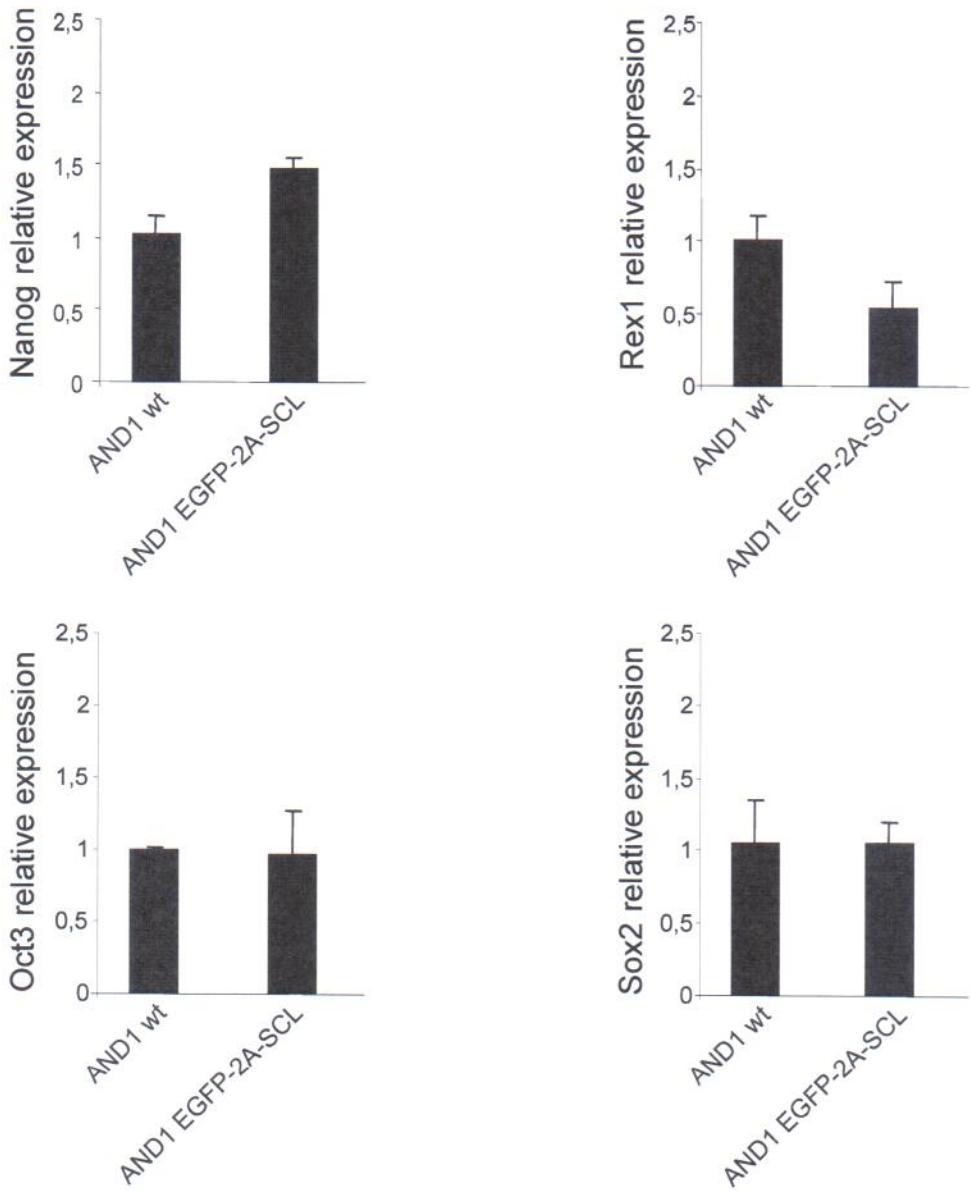
I confirm that the information contained in this form is true and I assume total responsibility for it.

<p>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre)</i></p> <p>José Antonio Lorente  15/10/15</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p>Pablo Menendez Buján Pedro José Real Luna  Fecha / Date 15/10/15</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Director Científico/ Scientific Director</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO). Avda. de la Ilustración 114 • 18016 Granada Carrer Casanova 143. Barcelona 08036. (IJC)</p>	<p>Teléfono / Telephone: 958 715500/ 93 5572809 Fax: 958 637 071 E-mail: pmenendez@carrerasresearch.org/ pedro.real@genyo.es</p>

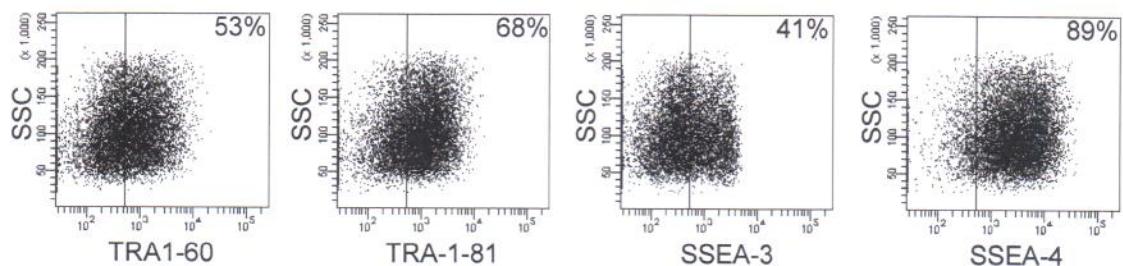
ANEXOS: RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR EMBRIONARIA AND1 EGFP-2A-SCL/ANNEXES: CHARACTERIZATION RESULTS FOR hESC LINE AND1 EGFP-2A-SCL.

- ✓ ANEXO 1/ANNEX 1. Resultados del test de pluripotencia mediante RT-PCR/Pluripotency test results by RT-PCR.
- ✓ ANEXO 2/ANNEX 2. Resultados del test de pluripotencia mediante citometría de flujo/Pluripotency test results by flow cytometry.
- ✓ ANEXO 3/ANNEX 3. Resultados del test de diferenciación in vitro/In vitro differentiation test results.
- ✓ ANEXO 4/ANNEX 4. Resultados del test de diferenciación in vivo/In vivo differentiation test results.
- ✓ ANEXO 5/ANNEX 5. Cariotipo/Karyotype.
- ✓ ANEXO 6/ANNEX 6. Análisis de STRPs por PCR/ STRPs (short tandem repeat polymorphisms) analysis by PCR.
- ✓ ANEXO 7/ANNEX 7. Resultados test de micoplasma/Mycoplasm test results.

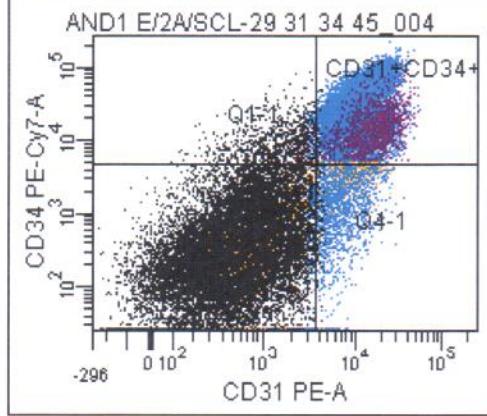
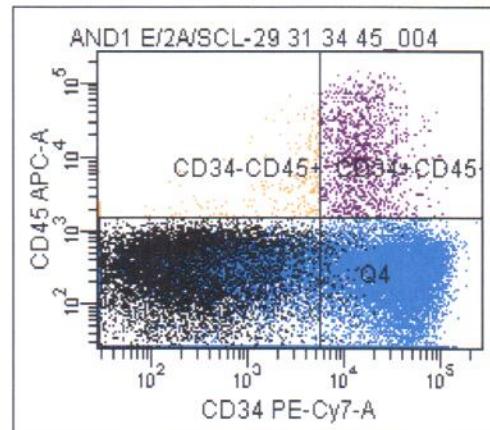
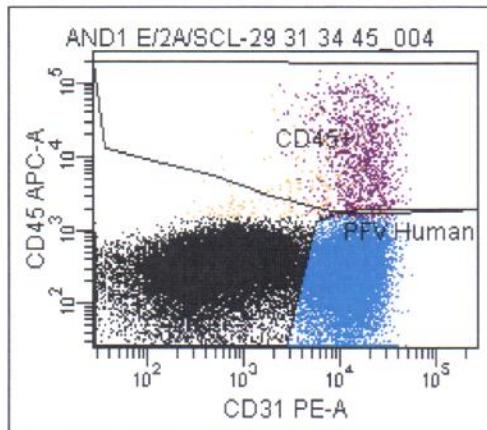
- ✓ ANEXO 1/ANNEX 1. Resultados del test de pluripotencia mediante RT-PCR/Pluripotency test results by RT-PCR.



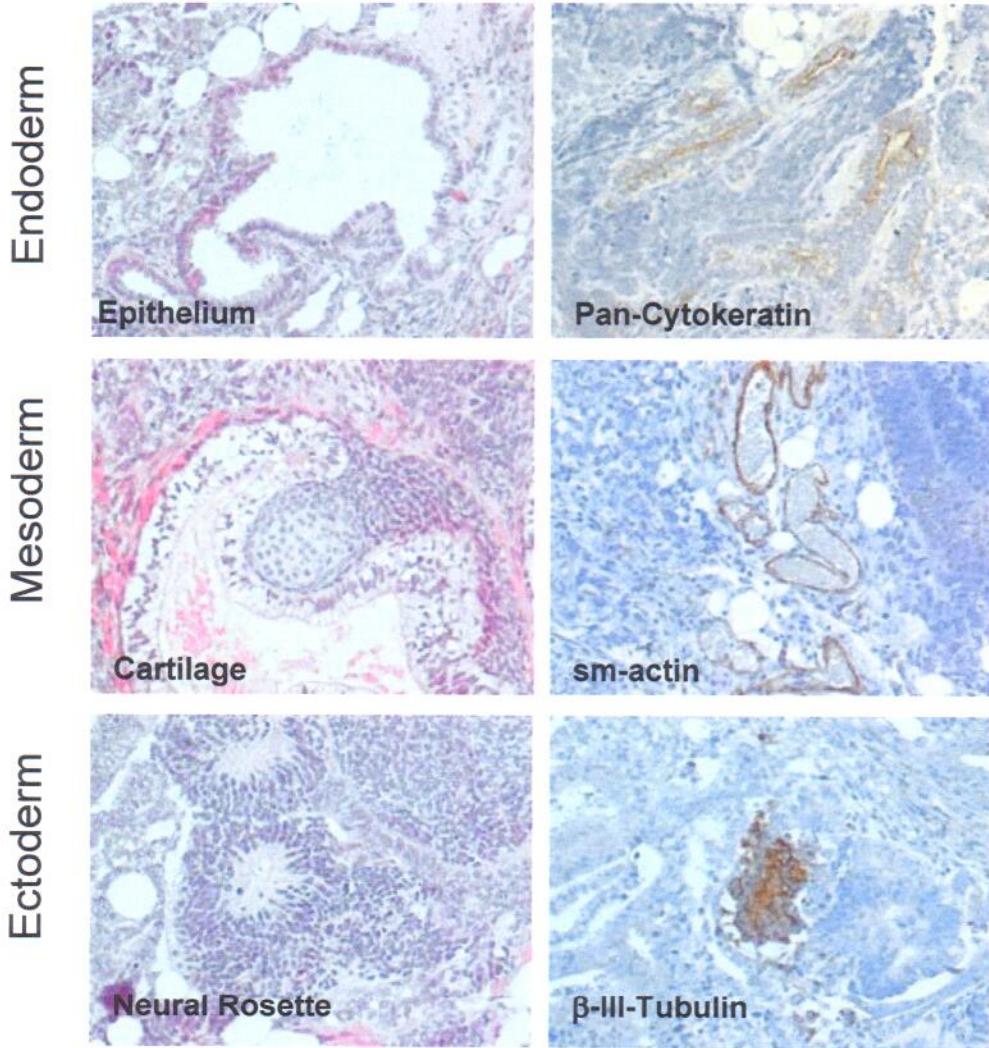
- ✓ ANEXO 2/ANNEX 2. Resultados del test de pluripotencia mediante citometría de flujo/Pluripotency test results by flow cytometry.



✓ ANEXO 3/ANNEX 3. Resultados del test de diferenciación in vitro/in vitro differentiation test results.



- ✓ ANEXO 4/ANNEX 4. Resultados del test de diferenciación in vivo/In vivo differentiation test results.



✓ ANEXO 5/ANNEX 5. Cariotipo/Karyotype.



Banco Andaluz de Células Madre
Consejería de Salud. Junta de Andalucía
Avda del Conocimiento s/n
Tel. 958894672 Fax 958894652
GRANADA

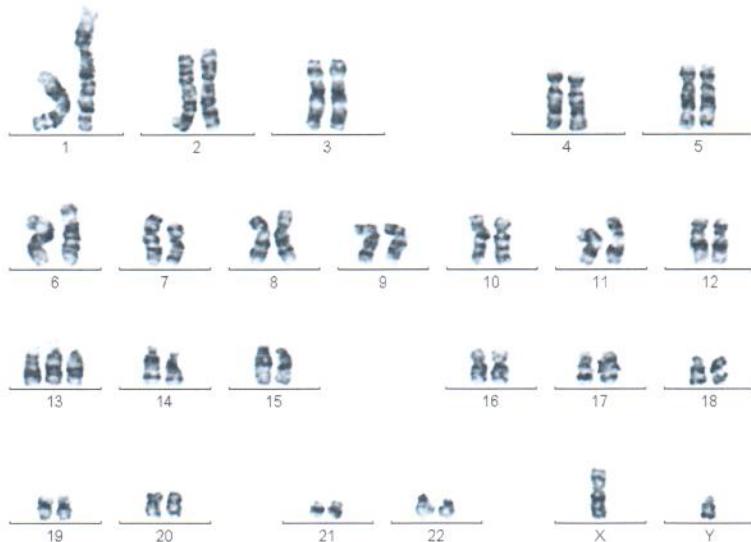
BANCO ANDALUZ DE CÉLULAS MADRE

Unidad de Citogenética

Nº de muestra: AND1 PRRL NEO
Área solicitante: Cultivos Celulares
Paciente: , And1 Prrl Neo.2a.scl P37+18
Hospital: BANCO ANDALUZ CELULAS MADRE

Fecha de entrada: 20/01/2011
Tipo de muestra: Línea celular
Técnica: Bandas G

RESULTADOS ANÁLISIS CITOGENÉTICO



Cariotipo: 47,XY,-1,+der(1)dup(1q11->1qter::1q11->1qter),-7,+i(7)p,+13

Diagnóstico citogenético: Línea celular cromosomicamente alterada.

Comentarios cariotipo: El resultado del estudio está limitado por la sensibilidad de la técnica.

P. Catalina - P.E. Leone

01/02/2011



Citogenética

Código de Biobanco: 32140112008

Fecha de entrada:

30/04/2014

Código de Origen: And1 C2a Scl P103 (+ Replica)

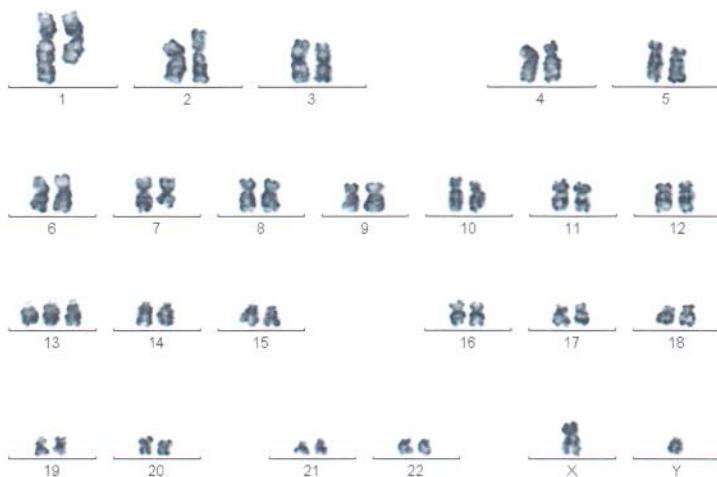
Tipo de muestra:

hESCs

Petición de servicio: 32140030pc01

Técnica: Bandas G

RESULTADOS ANÁLISIS CITOGENÉTICO



Cariotipo: 47,XY,-1,+der(1),dup(1q11->1qter)7,+i(7)(p10),+13.

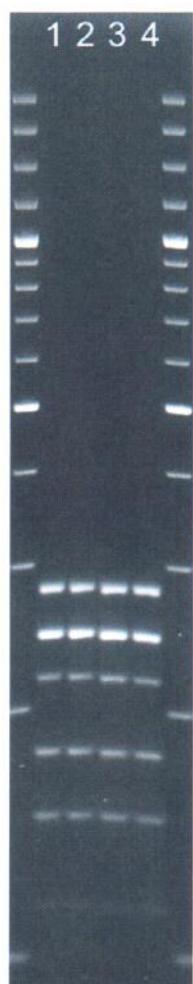
Diagnóstico citogenético: Línea celular cromosomicamente alterada.

Comentarios cariotipo: El resultado del estudio está limitado por la sensibilidad de la técnica.

Purificación Catalina PhD

11/06/2014

✓ ANEXO 6/ANNEX 6. Análisis de STRPs por PCR/ STRPs (short tandem repeat polymorphisms) analysis by PCR.



✓ ANEXO 7/ANNEX 7. Resultados test de micoplasma/Mycoplasma test results.



RESULTADO TEST DE MYCOPLASMA PARA LA LÍNEA CELULAR AND1 SCL

RESULTADOS DE LA MUESTRA RECOGIDA EL **03/04/2014**

IDENTIFICACIÓN MUESTRA	RESULTADO ESPECIES MIX	RESULTADO M. PNEUMONIAE	RESULTADO A.LAIDLAWII
AND 1 SCL	negativo	negativo	negativo

La detección de contaminación por mycoplasma se ha realizado mediante qPCR en la Unidad de Genómica y Genotipado de GENyO.

Kit comercial:

Venor GeM-qEP

Mycoplasma Detection Kit for qPCR

Version 1.2

Minerva Biolabs

Este kit detecta la siguiente variedad de especies:

Detectable species:

<i>A. laidlawii*</i>	<i>M. cloacale</i>	<i>M. glycophilum</i>	<i>M. pneumoniae*</i>
<i>M. agalactiae</i>	<i>M. collis</i>	<i>M. gypsis</i>	<i>M. pulmonis</i>
<i>M. agassizii</i>	<i>M. columbinasale</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. salivarium</i>
<i>M. alkalescens</i>	<i>M. columbinum</i>	<i>M. hyopharyngis</i>	<i>M. simbae</i>
<i>M. anseris</i>	<i>M. columborale</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. sp.ovine/caprine</i>
<i>M. arginini</i>	<i>M. cricetuli</i>	<i>M. hyosynoviae</i>	<i>M. spermatophilum</i>
<i>M. arthritidis</i>	<i>M. cynos</i>	<i>M. iguanae</i>	<i>M. sphenisci</i>
<i>M. bovigenitalium</i>	<i>M. edwardii</i>	<i>M. indienne</i>	<i>M. spumans</i>
<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. equirhinis</i>	<i>M. Iners</i>	<i>M. sualvi</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. falconis</i>	<i>M. lagogenitalium</i>	<i>M. subdolum</i>
<i>M. buccale</i>	<i>M. faecium</i>	<i>M. lipofaciens</i>	<i>M. synoviae</i>
<i>M. buteonis</i>	<i>M. felifacium</i>	<i>M. lipophilum</i>	<i>M. testudineum</i>
<i>M. californicum</i>	<i>M. fermentans</i>	<i>M. maculosum</i>	<i>M. timone</i>
<i>M. canadense</i>	<i>M. gallinaceum</i>	<i>M. meleagridis</i>	<i>M. tumidae</i>
<i>M. capricolum</i>	<i>M. gallinarum</i>	<i>M. moatsii</i>	<i>M. verecundum</i>
<i>M. caviae</i>	<i>M. gallopavonis</i>	<i>M. opalescens</i>	<i>M. zalophi</i>
<i>M. citelli</i>	<i>M. gateae</i>	<i>M. orale</i>	

*Detection with A/I Mix / Mp Mix

Granada, 15 Octubre 2015

Unidad de Cultivos Celulares

Responsable técnico, Víctor García Cabrera



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA

Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud
Avda. de la Ilustración 114 | 18007 Granada