

Fecha de recepción (Date received):

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE REGISTRO Y DEPÓSITO DE UNA LÍNEA iPSC HUMANA

Application Form to Register and Deposit of an human iPSC cell line

FECHA:

DOCUMENTOS QUE DEBEN ACOMPAÑAR LA SOLICITUD:

Attached documents:

- ☒ **Copia de la autorización del proyecto en el cual se genera la línea celular, junto con informe favorable del Comité de Ética de la Investigación del centro de procedencia.**
A copy of the project authorization in which the cell line is obtained along with a favourable report of the Clinical Research Ethics Committee
- ☐ **Copia de cualquier publicación científica relacionada con la línea iPS generada.**
A copy of any relevant published scientific papers related to the iPS cell line generated
- ☐ **C. V. del investigador principal (una página; formato libre).**
A one page CV for the Principal Investigator
- ☐ **Número de registro del proyecto**

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

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

Nombre de la línea iPSC Name of the iPSC line:	CT ADF1-iPS3F6	
Nº de registro en el Human Pluripotent Stem Cell Registry (1)		
Muestra original donada. Detallar tipo de célula, tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica de la que se obtiene la línea original. Si son células comerciales, detallar nombre, referencia y distribuidor comercial Original sample donated. Detail cell type, tissue of origin and anatomic location of the biological sample from which the original line is obtained. If cells are commercial, detail name, reference and trade distributor.	Fibroblastos dérmicos adultos (FDA) Adult dermal fibroblast (ADF)	
Sexo y edad del donante. Sex and age of the donor	MUJER/WOMAN	38
¿El donante 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)

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco ☒ <i>Fresh</i> Crioconservado ☐ <i>Cryopreserved</i>																						
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i>	28/06/16																						
Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i>	Mayo 2021																						
Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR/otros marcadores de las células de origen <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR/ other markers of the original cells.</i>	Muestra inicial: ADN_g de la muestra somática original. La caracterización de las muestras se lleva a cabo mediante el análisis genético de 10 marcadores STRs: TH01, TPOX, vWA, Amelogenina (marcador sexual), CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818 y D21S11. <table border="0" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Marcadores STRs</th> <th style="text-align: left;">Alelos</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>TH01</td><td>6, 9</td></tr> <tr><td>D21S11</td><td>29</td></tr> <tr><td>D5S818</td><td>11, 13</td></tr> <tr><td>D13S317</td><td>11, 12</td></tr> <tr><td>D7S820</td><td>9, 13</td></tr> <tr><td>D16S539</td><td>11, 12</td></tr> <tr><td>CSP1PO</td><td>11</td></tr> <tr><td>AMEL</td><td>X, X</td></tr> <tr><td>vWA</td><td>17, 18</td></tr> <tr><td>TPOX</td><td>10, 11</td></tr> </tbody> </table>	Marcadores STRs	Alelos	TH01	6, 9	D21S11	29	D5S818	11, 13	D13S317	11, 12	D7S820	9, 13	D16S539	11, 12	CSP1PO	11	AMEL	X, X	vWA	17, 18	TPOX	10, 11
Marcadores STRs	Alelos																						
TH01	6, 9																						
D21S11	29																						
D5S818	11, 13																						
D13S317	11, 12																						
D7S820	9, 13																						
D16S539	11, 12																						
CSP1PO	11																						
AMEL	X, X																						
vWA	17, 18																						
TPOX	10, 11																						
Método utilizado en la generación de la línea iPSC. (Integrativa/ No-integrativa) Especificar factores y plásmidos de reprogramación utilizados. <i>Method used for the generation of iPSC line (Integrative / Non-integrative)</i> <i>Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Las iPSC fueron generadas mediante la sobreexpresión de los factores Oct3/4-Sox2 y KLF4 usando vectores retrovirales (pMXs) individuales para cada factor. The iPSC were generated by overexpression of the reprogramming factors Oct3/4, Sox2, Klf4 and cMyc using single retroviral vectors (pMXs) for each factor.																						
Condiciones de cultivo de la línea de iPSC generada. (si se describen en publicación, indicar referencia) <i>iPSC Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Soporte: Fibroblastos embrionarios murinos inactivados mitóticamente con mytomycinC (iMEFs). Medio Cultivo: Medio DMEM-F12 suplementado con 20% KO Serum Replacement, 1% aminoácidos no esenciales, 1 mM L-glutamina, 0.1 mM β-mercaptoetanol y 8 ng/ml bFGF. Las iPSCs fueron mantenidas en iMEFs hasta su estabilización y caracterización. Feeders: Mouse embryonic fibroblasts mitotically inactivated with mytomycinC (iMEFs). Culture media: DMEM-F12 supplemented with 20% KO Serum Replacement, 1% non essential amino acids (NEAA), 1mM L-Glutamin, 0.1 mM β-mercaptoetanol and 8 ng/ml bFGF																						

Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	Método de congelación: Las colonias de iPSCs son levantadas, peleteadas y resuspendidas en primer lugar en 0,5ml de suero bovino fetal (FBS) pre-enfriado y después en 0,5ml de FBS con 20%DMSO pre-enfriado. La congelación se realiza de manera gradual utilizando Mr Frostie a -80°C. Método de descongelación: La descongelación se realiza de modo rápido introduciendo vial congelado en baño a 37°C. Cuando está casi descongelada, se pasa la solución a medio de cultivo atemperado, se centrifuga (1200rpm, 3 min.) y el pellet se pone en cultivo con medio correspondiente suplementado con Rock inhibitor Y27632 10uM. Freezing method: iPSCs 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 Mr Frosties to -80°C. Thawing method: Thawing process takes place in a fast manner, putting the criovial in a bath with 37°C. When the solution is almost thawed, put it with pre-warmed medium, centrifuge (1200rpm, 3 min.) and cultivate the pellet in the appropriate medium supplmented with Rock inhibitor Y27632 10uM.
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>	P6 crecidas sobre feeders. P6 grown on feeders.
¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i>	Sí Yes ☐ No No ☒ Especificar: Specify:

SECCIÓN 2 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA iPSC.

Adjuntar resultados (imágenes o gráficos) como anexo

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

Test de pluripotencia <i>Pluripotency test</i>	Método <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	
Se informará de al menos 5 de los siguientes marcadores <i>At least 5 of the following test will be reported</i>	Oct 4	RT-PCR y inmunocitoquímica (p4) positivo. Anexo 1/2			
	Nanog	RT-PCR y inmunocitoquímica (p4) positivo. Anexo 1/2			
	Sox 2	RT-PCR y inmunocitoquímica (p4) positivo. Anexo 1/2			
	SSEA3				
	SSEA4	Inmunocitoquímica (p4) positivo. Anexo 1/2			
	TRA-1-60	Inmunocitoquímica (p4) positivo. Anexo 1/2			
	TRA-1-81	Inmunocitoquímica (p4) positivo. Anexo 1/2			
	Fosfatasa. Alk				
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
Cuerpos embrioides <i>Embryoid bodies</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	RT-PCR/ Nestin, NCAM	/ p4	/ Positivo	/ Anexo 1
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	RT-PCR/ Brachyury RUNX1	/ p4	/ Positivo	/ Anexo 1
	Endoderm <i>Endoderm</i>	RT-PCR/ AFP, GATA4	/ p4	/ Positivo	/ Anexo 1
Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
Teratomas <i>Teratomas</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Tinción general H/E	/ p9	/ positivo	
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Tnción general H/E	/ p9	/ positivo	
	Endodermo <i>Endoderm</i>	inción general H/E	/ p9	/ positivo	

Cariotipo (pase) <i>Karyotype (passage)</i>	46XX (p 3) (Anexo 1 /Annex 1)
Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR/ otros marcadores de la línea celular/ Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR/ other cell line markers	Los marcadores de los microsatelites de la muestra inicial coinciden con los de la línea iPS generada (anexo 4) Marcadores STRs Alelos TH01 6, 9 CSP1PO 11 D21S11 29 AMEL X, X D5S818 11, 13 vWA 17, 18 D13S317 11, 12 TPOX 10, 11 D7S820. 9, 13 D16S539 11, 12
Test de integración) <i>Integration Test)</i>	
Test de silenciamiento) <i>Silencing Test)</i>	PCR cuantitativa para la detección de la expresión retroviral de los transgenes en las células iPS generadas, las ADF y las ADF 6 días después de la transducción con los tres factores (Anexo 2) Quantitative PCR for expression of retroviral transgenes in human iPS cells, ADF, and ADF 6 days after the transduction with the four retroviruses (ADF-6d). (Annex 2)
Confirmación de la presencia de la mutación de las células de origen <i>Confirmation of the mutation in the original cells</i>	
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Test de Mycoplasma negativo determinado por PCR (Anexo 3). Mycoplasma test negative as determined by PCR (Annex 3).

SECCIÓN 3 **DATOS DEL DEPOSITANTE**
Section 3 *Applicant Details*

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Elena Gonzalez Muñoz	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> calle Severo Ochoa, 35. Malaga
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Universidad de Malaga/BIonand	Teléfono (phone): +34 952 367 616 Fax: E-mail: egonmu@uma.es

SECCIÓN 4 **INFORMACIÓN ADICIONAL (OPCIONAL)**
Section 4 *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):

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

SECCIÓN 5 DECLARACIÓN

Confirmando 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 <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre</i>	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>
Fecha/ Date:	Fecha /Date
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> D. José Miguel Guzmán de Damas, Director Gerente	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> C/ Severo Ochoa nº 35 (PTA), 29590 Campanillas, Málaga.	Teléfono /Telephone: 951 44 02 60 Fax: E-mail: gestiondeproyectos@ibima.eu

Firma del responsable de la generación de las iPSC/Centro de generación <i>Signature of the responsible for the iPSC generation/ Generation center</i>	
Fecha/ Date:	
Nombre y Cargo del responsable de la generación: <i>Name and Position of the responsible for the iPSC generation</i> Elena González Muñoz. Investigadora responsable grupo HE01 IBIMA-plataforma Bionand	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> C/ Severo Ochoa nº 35 (PTA), 29590 Campanillas, Málaga.	Teléfono /Telephone: (+34) 952 367 616 Fax: E-mail: egonmu@uma.es

(1) Instrucciones para la realización del registro de líneas hESC y hiPSC generadas en España en el Human Pluripotent Stem Cell Registry

Entre en la página web: <https://hpscereg.eu/>

Cree su perfil rellenando el formulario on-line Sign up form. Después de hacer click en Sign up, recibirá el mensaje de confirmación de los datos y se le enviará el correo electrónico de confirmación.

Registro de líneas:

- Register Cell Line> Create a standard cell line name> Generator Institution: Assign an existing institution: Introducir: Spanish Stem Cell Bank
- hPSCreg Team <hpscereg-info@charite.de> le confirmará la asignación de Spanish Stem Cell Bank a su perfil por correo electrónico. En este momento su estado en Dashboard (My institutions) de Applicant cambiará a Registrant para esta institución.
- Volver a Generator Institution> seleccionar en el desplegable Spanish Stem Cell Bank.
- El nombre provisional (Provisional name) debe de empezar por ES.
- En Alternative names introduzca el nombre de la línea con el que se deposita en el BNLC, según las indicaciones de Nomenclatura del BNLC:

<https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/BIOBANCOS/BNLC/Paginas/SolicitudDeposito.aspx>