

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)
National Bank of Stem Cell Lines
IMPRESO DE SOLICITUD DE REGISTRO Y DEPÓSITO DE UNA LÍNEA iPS HUMANA
Application Form to Register and Deposit of an human iPS cell line

FECHA: 10 Abril 2017

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 Ético 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

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 iPS <i>Name of the iPS line:</i>	PBMC2-iPS4F8
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 <i>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.</i>	Células mononucleares de sangre periférica (CMSPs). Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs).
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	MUJER / WOMAN 45
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) No Yes (specify)
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) No Yes (specify)

<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 iPSCs son levantadas, peleteadas y resuspendidas en medio E8 pre-enfriado suplementado con 10%DMSO. La congelación se realiza de manera gradual utilizando Mr Frostie a -80°C. Tras 24 horas, los viales congelados se almacenan en N2 líquido. 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.</p> <p>Freezing method: iPSCs colonies are splitted, pelleted and resuspended in pre-chilled E8 medium with 10%DMSO. Freezing process takes place in a gradual manner using Mr Frosties to -80°C. After 24 hours, frozen vials were stored in liquid nitrogen. Thawing method: Thawing process takes place in a fast manner, putting the vial 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.</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>P 14 crecidas en E8. p14 grown with E8.</p>
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes <input type="checkbox"/> No No <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Comentarios/ Comments:</p>	<p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i> Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Resultado / Result</p>

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

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

<p>Test de pluripotencia <i>Pluripotency test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Método <i>Method</i></th> <th>Marcador <i>Marker</i></th> <th>Nº pase <i>Passage n.</i></th> <th>Resultado <i>Results</i></th> <th>Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Oct 4</td> <td colspan="5">RT-PCR (p4) y Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 1/2</td> </tr> <tr> <td>Nanog</td> <td colspan="5">RT-PCR (p4) / Positivo / Anexo 1</td> </tr> <tr> <td>Sox 2</td> <td colspan="5">RT-PCR (p4) / Positivo / Anexo 1</td> </tr> <tr> <td>SSEA3</td> <td colspan="5">Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 2</td> </tr> <tr> <td>SSEA4</td> <td colspan="5">Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 2</td> </tr> <tr> <td>TRA-1-60</td> <td colspan="5">Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 2</td> </tr> <tr> <td>TRA-1-81</td> <td colspan="5">Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 2</td> </tr> <tr> <td>Fosfatasa. Alk</td> <td colspan="5">Detección actividad enzimática (kit Merck Millipore) (p7) / Positivo / Anexo 3</td> </tr> </tbody> </table>		Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	Oct 4	RT-PCR (p4) y Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 1/2					Nanog	RT-PCR (p4) / Positivo / Anexo 1					Sox 2	RT-PCR (p4) / Positivo / Anexo 1					SSEA3	Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 2					SSEA4	Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 2					TRA-1-60	Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 2					TRA-1-81	Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 2					Fosfatasa. Alk	Detección actividad enzimática (kit Merck Millipore) (p7) / Positivo / Anexo 3				
	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																																																		
Oct 4	RT-PCR (p4) y Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 1/2																																																						
Nanog	RT-PCR (p4) / Positivo / Anexo 1																																																						
Sox 2	RT-PCR (p4) / Positivo / Anexo 1																																																						
SSEA3	Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 2																																																						
SSEA4	Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 2																																																						
TRA-1-60	Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 2																																																						
TRA-1-81	Citometría de flujo (p7) / Positivo / Anexo 2																																																						
Fosfatasa. Alk	Detección actividad enzimática (kit Merck Millipore) (p7) / Positivo / Anexo 3																																																						
<p>Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Método <i>Method</i></th> <th>Marcador <i>Marker</i></th> <th>Nº pase <i>Passage n</i></th> <th>Resultado <i>Results</i></th> <th>Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td colspan="5">Inmunohistoquímica / B-III-tubulina / p10 / Positivo / Anexo 4</td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td colspan="5">Inmunohistoquímica / Vimentina / p10 / Positivo / Anexo 4</td> </tr> <tr> <td>Endoderm <i>Endoderm</i></td> <td colspan="5">Inmunohistoquímica / CKAE1AE3 / p10 / Positivo / Anexo 4</td> </tr> </tbody> </table>		Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Inmunohistoquímica / B-III-tubulina / p10 / Positivo / Anexo 4					Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Inmunohistoquímica / Vimentina / p10 / Positivo / Anexo 4					Endoderm <i>Endoderm</i>	Inmunohistoquímica / CKAE1AE3 / p10 / Positivo / Anexo 4																																		
	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																																																		
Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Inmunohistoquímica / B-III-tubulina / p10 / Positivo / Anexo 4																																																						
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Inmunohistoquímica / Vimentina / p10 / Positivo / Anexo 4																																																						
Endoderm <i>Endoderm</i>	Inmunohistoquímica / CKAE1AE3 / p10 / Positivo / Anexo 4																																																						
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i></p> <p><i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i></p>	<p>Se realizó diferenciación espontánea in vitro, mediante la formación de cuerpos embrionarios (EBs), que fueron cultivados durante 21 días en medio de cultivo sin bFGF. Tras su cultivo, los EBs fueron peletados, fijados, incluidos en parafina y secciones de los mismos se tiñeron para valoración inmunohistoquímica de expresión de marcadores de pluripotencia (anexo 4).</p> <p><i>In vitro spontaneous differentiation was achieved by embryoid bodies (EBs) formation, cultured for 21 days in culture medium without bFGF. After culture, EBs were pelleted, fixed, embedded in paraffin and sections were stained to confirm three germ layers differentiation (annex 4).</i></p>																																																						

<p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Método</th> <th>Marcador</th> <th>Nº pase</th> <th>Resultado</th> <th></th> </tr> <tr> <th>Comentarios</th> <th><i>Method</i></th> <th><i>Marker</i></th> <th><i>Passage n</i></th> <th><i>Results</i></th> <th><i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td>Imunohistoquímica</td> <td>GFAP / p11</td> <td>Positivo</td> <td>Anexo 5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>Imunohistoquímica</td> <td>Vimentina / p11</td> <td>Positivo</td> <td>Anexo 5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td>Imunohistoquímica</td> <td>CKAE1AE3 / p11</td> <td>Positivo</td> <td>Anexo 5</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Método	Marcador	Nº pase	Resultado		Comentarios	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Imunohistoquímica	GFAP / p11	Positivo	Anexo 5		Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Imunohistoquímica	Vimentina / p11	Positivo	Anexo 5		Endodermo <i>Endoderm</i>	Imunohistoquímica	CKAE1AE3 / p11	Positivo	Anexo 5	
	Método	Marcador	Nº pase	Resultado																											
Comentarios	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>																										
Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Imunohistoquímica	GFAP / p11	Positivo	Anexo 5																											
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Imunohistoquímica	Vimentina / p11	Positivo	Anexo 5																											
Endodermo <i>Endoderm</i>	Imunohistoquímica	CKAE1AE3 / p11	Positivo	Anexo 5																											
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>	<p>Células iPS se inyectaron por vía subcutánea en flancos dorsales de ratones NOD-SCID. 22 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 5).</p> <p>iPS cells were injected subcutaneously into dorsal flanks of NOD-SCID mice. 22 weeks post-injection teratomas were fixed and embedded in paraffin. Histological examination of hematoxylin-eosin preparations showed differentiation towards the three germ layers (Annex 5).</p>																														
<p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>46XX (p7) (Anexo 6 / Annex 6).</p>																														
<p>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></p>	<p>La identificación celular de la iPS se realizó mediante STR (Short Tandem Repeats) (Anexo 7). Este mismo análisis se realizó sobre la muestra celular de partida (CMNSPs) confirmando el origen de ambas muestras.</p> <p>Cell identity was achieved by STR (Short Tandem Repeats) (Annex 7). Similar analysis was achieved in the original sample (PBMCs) validating the same origin of both samples.</p>																														
<p>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>El tipo de reprogramación celular utilizado (CytoTune®-iPS 2.0 Sendai kit) es un método no integrativo.</p> <p>Cell reprogramming used (CytoTune®-iPS 2.0 Sendai kit) is a non-integrating method.</p>																														

<p>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>El test de silenciamiento de los transgenes de SeV utilizados para la reprogramación se realizó según indicaciones del kit de reprogramación CytoTune®-iPS 2.0 Sendai mediante RT-PCR (Anexo 8).</p> <p>SeV transgenes silencing test was made following CytoTune®-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit instructions by RT-PCR (Annex 8).</p>
<p>Confirmación del diagnóstico genotípico en las iPSC generadas 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 9).</p> <p>Mycoplasma test negative as determined by PCR (Annex 9).</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> JL Fernandez, R Montes, P Real, V Ramos, D Gonzalez</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Unidad de Genética. Avda Valdecilla s/n. Torre D, planta 1. 30008 Santander</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL</p>	<p>Teléfono (phone): 942 315271</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail: fluna@humv.es,rosa.montes@genyo.es, pedro.real@genyo.es,veronica.ramos@genyo.es</p>

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)

Seguimiento de la línea (a rellenar 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>Galo Peralta</p> <p>10/04/17 Fecha / Date:</p> 	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p>Jose Luis Fernandez Luna Rosa Montes Lorenzo Pedro Real Luna Verónica Ramos Mejía Domingo González-Lamuño</p>  
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Galo Peralta, Director de Gestión del Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL)</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>IDIVAL, Avda Cardenal Herrera Oria s/n, planta 3. 39011 Santander</p>	<p>Teléfono / Telephone: 942203709</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail: rosa.montes@genyo.es, pedro.real@genyo.es, veronica.ramos@genyo.es, fluna@humv.es, domingo.gonzalez-lamuno@unican.es, direccion@idival.org</p>