

# 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: 15/01/2018

### **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*

<b>Nombre de la línea iPS</b> <i>Name of the iPS line:</i>	IDISi001-A IDISi001-A
<b>Muestra original donada.</b> <b>Detallar tipo de célula, tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica de la que se obtiene la línea original.</b> <b>Si son células comerciales, detallar nombre, referencia y distribuidor comercial</b> <i>Original sample donated.</i> <i>Detail cell type, tissue of origin and anatomic location of the biological sample from which the original line is obtained.</i> <i>If cells are commercial, detail name, reference and trade distributor.</i>	Muestra original donada: Sangre periférica. Tipo celular, tejido y localización: Célula mononuclear de sangre periférica.  Original sample donated: Peripheral blood Cell type, tissue and location: Peripheral blood mononuclear cells.
<b>Sexo y edad del donante.</b> <i>Sex and age of the donor</i>	Varón 67 Male 67
<b>¿El donante tiene alguna patología?</b> <i>Has the donor any pathological condition?</i>	<b>NO</b> <input type="checkbox"/> No <b>SÍ</b> <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) CADASIL Yes (specify)
<b>¿La patología es de origen genético?</b> <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	<b>NO</b> <input type="checkbox"/> NOTCH3. 19p13.12 No <b>SÍ</b> <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Arg1242Cys/normal Exon 23 Yes (specify)

<b>Muestra biológica recibida</b> <i>Biological sample</i>	<b>Fresco</b> <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i>	<b>Crioconservado</b> <input type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i>
<b>Fecha de la donación de la muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i>	<b>Fecha del uso o descongelación (si congelado)</b> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 22/03/2017	
<b>Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario).</b> <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Cultivo primario. Muestra de sangre periférica con menos de 24 horas desde la extracción hasta su manipulación. Medio de cultivo: StemPro 34 SFM con L-Glutamina (2mM), P/S (1%). Echar StemSpanCC100 (StemCell Tech.) al 1% cada vez que se use el medio. Primary culture. Peripheral blood sample with less than 24 hours from extraction to its manipulation . Culture medium: StemPro 34 SFM with L-Glutamine (2mM), P/S(1%). Use StemSpanCC100 (StemCell Tech) 1% everytime medium is used.	
<b>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de las células de origen</b> <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the original cells.</i>	Si. Combinación de 10 STRs habituales a la hora de realizar análisis de huella genética. Yes. Combination of 10 usual STRs when performing a human fingerprinting by STRs.	
<b>¿Hay disponibilidad de viales congelados de las células de origen? ¿En qué pase?</b> <i>Is there availability of frozen vials of original cells? At what passage?</i>	No No	
<b>Método utilizado en la generación de la línea iPSc. (Integrativa/ No-integrativa)</b> <i>Method used for the generation of iPSC line (Integrative / Non-integrative)</i> <b>Especificar factores y plásmidos de reprogramación utilizados.</b> <i>Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Método No-integrativo mediante infección por virus Sendai (CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen)). Se utilizaron un plásmido portador de Klf4, Oct4 y Sox2 a un MOI=5; otro plásmido portador de c-Myc a un MOI=5 y otro plásmido portador de más Klf4 a un MOI de 3. Non-integrative method by Sendai virus infection (cytotune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen)). Three plasmids were used. One carrying Klf4, Oct4 and Sox2 at a MOI=5; another plasmid carrying c-Myc at MOI=5 and a third plasmid carrying more Klf4 at MOI=3.	
<b>Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada.</b> <i>iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	iPSCs cultivadas en medio mTeSR1 (StemCell Tech). Primer y segundo pase, las células se cultivaron en placas de 12. En el tercer pase, se cultivaron en placas de 6 pocillos, y a partir del cuarto pase, cultivadas en Petris de 35mm. Todos los pocillos y placas fueron recubiertos con MatrigelTM (Corning). Para el primer y segundo pase, las colonias fueron seleccionadas y recogidas con la ayuda de una Origio Stripper (Origio) con puntas Stripper (Origio) de 175um de diámetro. Los siguientes pasos se realizaron mecanicamente, con ayuda de un cell lifter.  Cells were cultured in mTeSR1 media (StemCell Technologies). On the first and second passage, cells were maintained into wells of a 12-well plate. On the third passage, they were cultured into wells of a 6-well plate, and from passage four and next, they were cultured into 35 mm Petri dishes. All wells and dishes were coated with MatrigelTM matrix (Corning). For the first and second passages, colonies were selected and picked with the help of an Origio Stripper (Origio) with Stripper tips (Origio) of 175µm of diameter. Later passages were performed mechanically, using cell lifters.	

<b>Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma;otros)</b> <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>	Colonias redondeadas de unas 20-30 células el primer día después del pase y muy grandes ya a los 5-7 días, con crecimiento en 2D y borde refractario. Células redondeadas, pequeñas, con ratio núcleo/citoplasma muy alto, núcleo visible. Crecen compactas, sin dejar huecos entre ellas. Round-shaped colonies, with 20-30 cells per colony at the first day after passage and quite big at day 5-7, growing in 2D and with refractory edges. Small round-shaped cells, with high nucleus/cytoplasm ratio and visible nucleus. Compact growth, with no gaps between them.
<b>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación)</b> <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	En medio de congelado BAMBANKER (NipponGenetics). Se cortan las colonias y se levantan las células, se centrifugan a 1000 rpm, 4' a 24°C, se resuspende el pellet en 1mL de BAMBANKER. El criovial se almacena a -80°C en isopentano durante un día y posteriormente se guardan en un tanque de nitrógeno líquido. Freezing medium: BAMBANKER. Colonies are cut and lifted, and centrifuged at 1000 rpm, 4', 24°C. Pellet resuspended in 1mL of BAMBANKER. Criovial stored at -80°C with isopentane and moved on the next day to a liquid N2 container.
<b>Pase de la línea celular en el momento del banqueo/registro. (Máximo: Pase 15)</b> <i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i>	Varios viales con colonias de Pase<15 (anotado individualmente en cada vial) Several vials with colonies of Passage<15 (noted individually on each vial)
<b>¿Ha sido la línea modificada genéticamente?</b> <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/>	<b>¿Se llevó a cabo un análisis clonal?</b> <i>Has a clonal analysis been carried out?</i> Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> <b>Resultado / Result</b>
<b>Comentarios/ Comments:</b>	

## 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*

<b>Test de pluripotencia Pluripotency test</b>	<b>Método Method</b>	<b>Nº pase Passage n.</b>	<b>Resultado Results</b>	<b>Comentarios Comments</b>
	<b>Oct 4</b> Inmuno + qPCR.	Pas. 10	Positivo/positive	
	<b>Nanog</b> Inmuno + qPCR.	Pas. 10	Positivo/positive	
	<b>Sox 2</b> Inmuno + qPCR.	Pas. 10	Positivo/positive	
	<b>SSEA3</b> No realizado/Not performed			
	<b>SSEA4</b> Inmuno	Pas. 10	Positivo/positive	
	<b>TRA-1-60</b> Inmuno	Pase 10	Positivo/positive	
	<b>TRA-1-81</b> No realizado/not performed			
	<b>Fosfatasa. Alk</b> Realizado/performe	Pas. 6	Positivo/positive	

<b>Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i></b>	<b>Comentarios</b>	<b>Método Method</b>	<b>Marcador Marker</b>	<b>Nº pase Passage n</b>	<b>Resultado Results</b>	<b>Comentarios Comments</b>
	<b>Ectodermo</b> Cuerpos embrionarios. Nestina. P15. Positivo <i>Ectoderm</i>					
	<b>Mesodermo</b> Cuerpos embrionarios. Vimentina. P15. Positivo <i>Mesoderm</i>					
	<b>Endoderm</b> Cuerpos embrionarios. FOXA2. P15. Positivo <i>Endoderm</i>					

<b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida)</b>  <i>Description of the differentiation characteristics <i>in vitro</i> (spontaneous/induced)</i>	Formación de cuerpos embrionarios inducida usando un medio específico (DMEM-F12 con Glutamax, FBS 20%, non-essential aminoacids 1X (Gibco), P/S 1X y β-mercaptoethanol 50 mM (Gibco)) en placas no adherentes. Además el primer día de formación se añadió Rock Inhibitor (StemCell Technologies) 10uM. La diferenciación fue espontánea, con el mismo medio pero en placas de adherencia.  Embryoid bodies formation induced with a specific media (DMEM-F12 with Glutamax, FBS 20%, non-essential aminoacids 1X (Gibco), P/S 1X and β- mercaptoethanol 50 mM (Gibco), in ultra-low attachment plates. Also, 10uM Rock Inhibitor (StemCell Technologies) was added the first day of induction. Differentiation occurred spontaneously, using the same media, but within adherent plates.
--	--

<b>Test de diferenciación <i>in vivo</i></b> <i>In vivo differentiation test</i>	<b>Comentarios</b> <i>Method</i>	<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<b>Comments</b> <i>Comments</i>
	<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	No realizado/Not performed				
	<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	No realizado/Not performed				
	<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>	No realizado/Not performed				
<b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i></b> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>	N/A					
<b>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase)</b> <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	Fórmula: 46,XY. Pase 15 29 Metafases analizadas. Sin anomalías. Formula: 46, XY Passage 15 29 analyzed metaphases, no anomalies.					
<b>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular</b> <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the cell line</i>	Si. Combinación de 10 STRs habituales a la hora de realizar análisis de huella genética. La misma combinación que para las células de origen.  Yes. Combination of 10 usual STRs when performing a fingerprinting by STRs. Same combination as for the original cells.					
<b>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b> <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	Realizado por PCR. Al día siguiente de la infección con Sendai Virus se le extrajo el RNA a las PBMCs. Se realizó una retrotranscripción para posteriormente realizar una PCR para el fragmento vírico. Después se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y se reveló bajo luz UV. Como control negativo se utilizó un línea de fibroblastos humanos no infectada.  Performed by PCR. The next day after Sendai Virus infection, RNA was extracted from PBMCs. RT-PCR was done to subsequently perform a PCR for the viric fragment. After that, an electrophoresis was run in a 2.5% agarose gel and revealed with UV. A non-infected human fibroblast cell line was used as negative control.					

<b>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b> <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	Realizado por PCR. A pase 5 se extrajo RNA de varios clones. Se realizó retrotranscripción y PCR. Se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 2.5% y se reveló bajo luz UV. Como control positivo se empleó una muestra de otra línea de fibroblastos humanos infectados. By PCR. RNA from several clones was extracted. RT-PCR and PCR were performed and samples were run in a 2.5% agarose gel and revealed with UV. An infected human fibroblast cell line by Sendai Virus was used as positive control.
<b>Confirmación del diagnóstico genotípico en las iPSC generadas a partir de muestras con mutación genética</b> <i>Confirmation of genotypic diagnosis of the cell line generated from samples with genetic mutation</i>	El fragmento de NOTCH3 que contenía la mutación fue amplificado por PCR. Las muestras fueron secuenciadas por New Generation Sequencing usando un analizador SOLID 5500XL. El resultado fue contrastado con la secuenciación previa del mismo fragmento de las PBMCs originales y de un control sano (también PBMCs). NOTCH3 fragment containing the mutation was amplified by PCR. The samples were sequenced by New Generation Sequencing using a SOLID 5500XL genetic analyzer. The result was contrasted against the previous sequencing of the same fragment in the PBMCs (original cell line) and against a healthy control (also PBMCs).
<b>Test de micoplasma</b> <i>Mycoplasma Test</i>	Se realizó por amplificación por PCR y electroforesis, a través de un servicio externo al laboratorio que proporcionó los primers. Performed by PCR amplification and electrophoresis, through an external service that provided the Mycoplasma primers.

### SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

<b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i> Dr. Francisco Campos Pérez	<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal address:</i> Travesía da Choupana s/n, 15706.
<b>Centro de Trabajo:</b> <i>Institution:</i> Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) Health Research Institute of Santiago de Compostela	<b>Teléfono (phone):</b> +34 981951086 <b>Fax:</b> +34 981951098 <b>E-mail:</b> francisco.campos.perez@sergas.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):  
No hay ninguna observación o información relevante a mayores.  
There are no more observations or information to note.

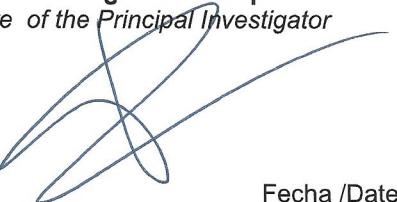
**Otras observaciones o información relevantes** (a llenar por el BNLC):  
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

**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.

<b>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre</b> <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre)</i>   15/01/2018	<b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i>   15/01/2018
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i>  <b>JOSÉ CASTILLO SÁNCHEZ, DIRECTOR CIENTÍFICO DEL IDIS</b>	
<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i>  Clinical Neurosciences Research Laboratory (LINC) Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS) Clinical University Hospital (CHUS), SERGAS Travesía da Choupana, s/n, Santiago de Compostela E15706 A Coruña, Spain	<b>Teléfono /Telephone:</b> +34 981951097  <b>Fax:</b> +34 981951086  <b>E-mail:</b> francisco.campos.perez@sergas.es