

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR [DUP7]FiPS4-R4F-2 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

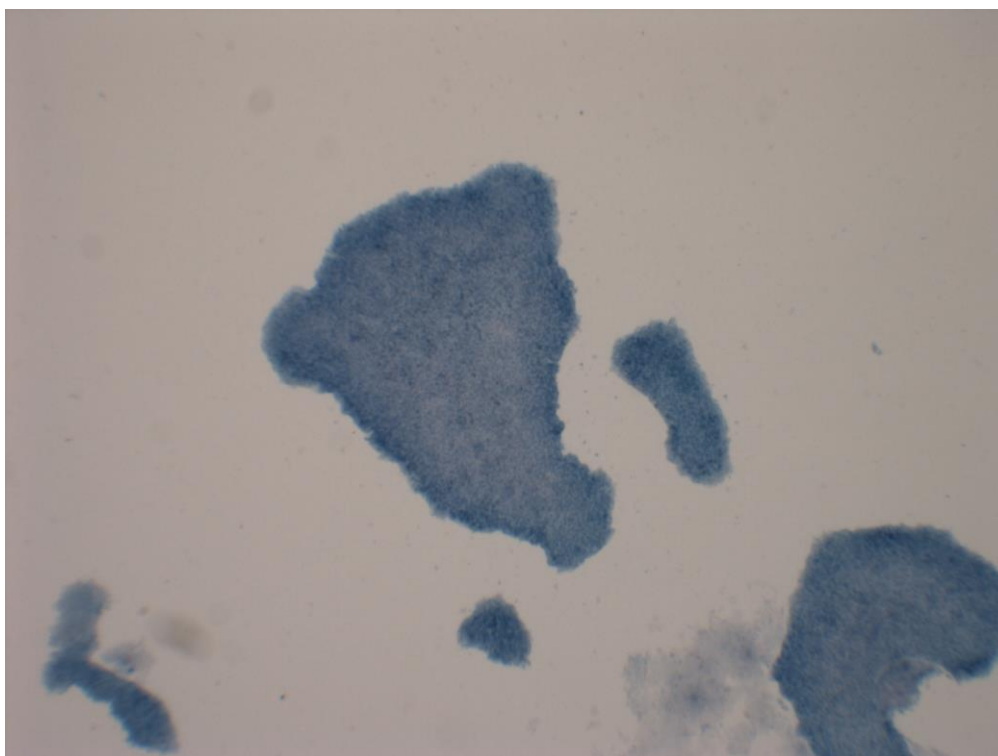
Anexo 6: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Anexo 7: Genotipado

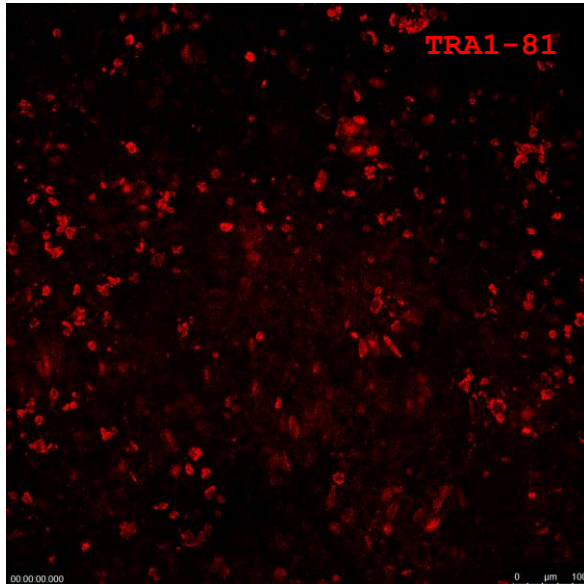
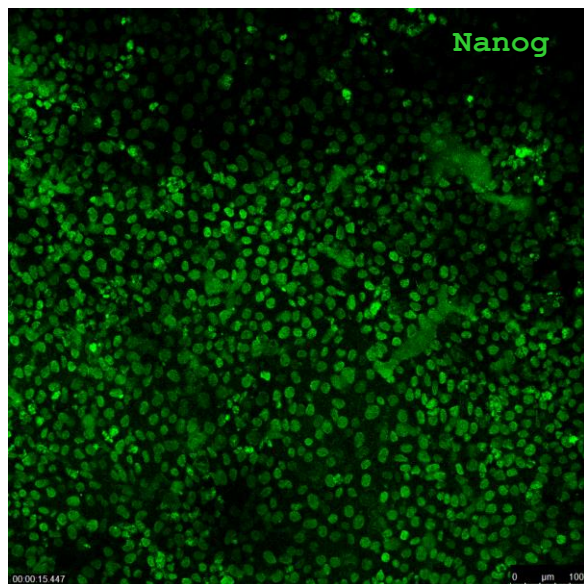
Anexo 8: Resultado test de micoplasma

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

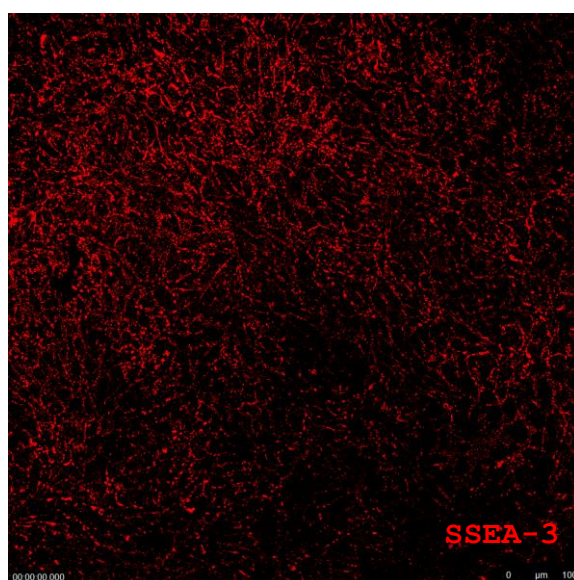
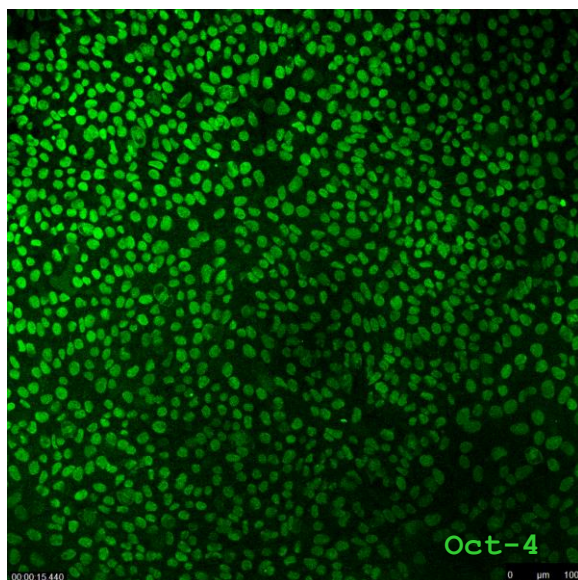


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



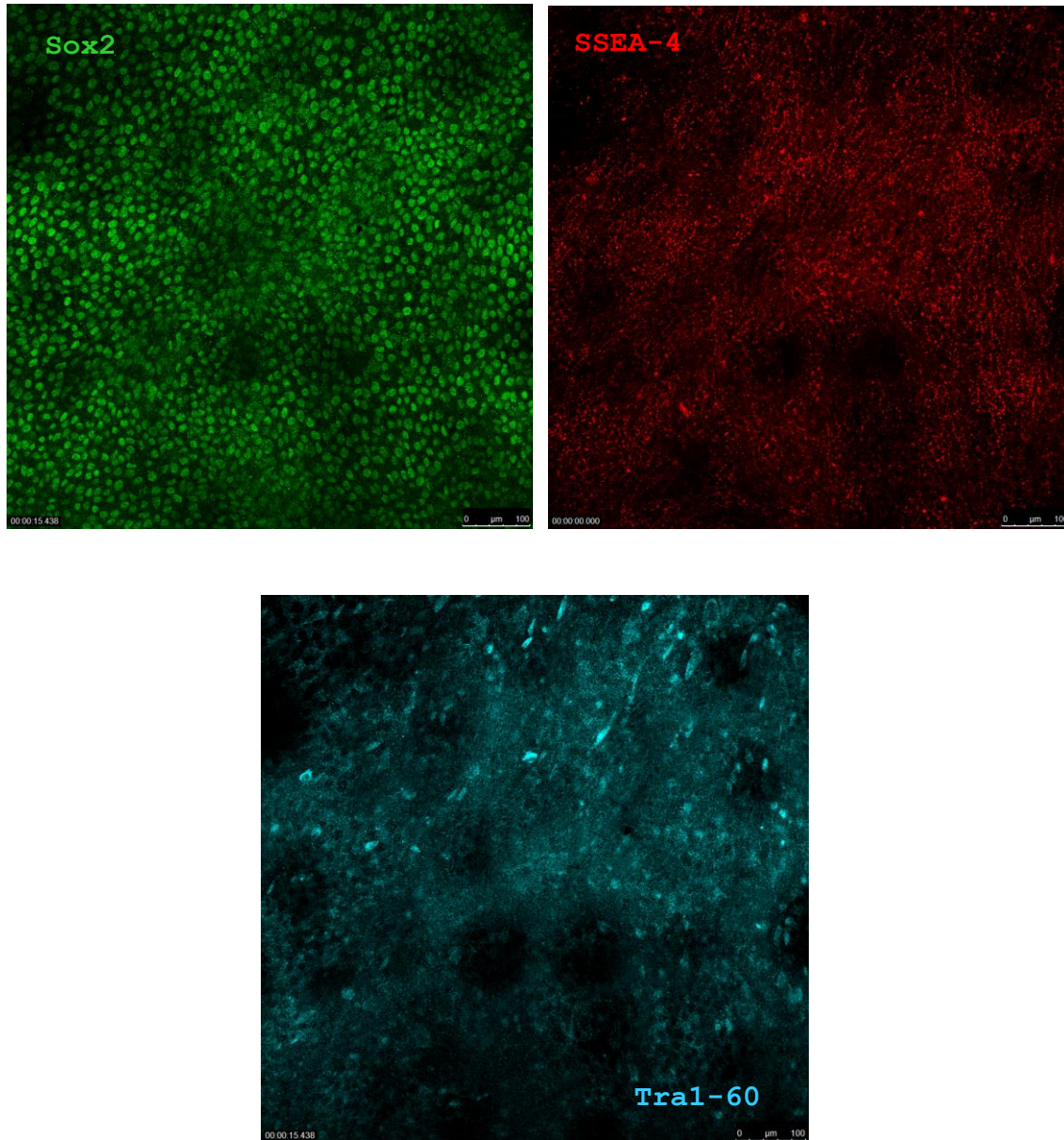
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3

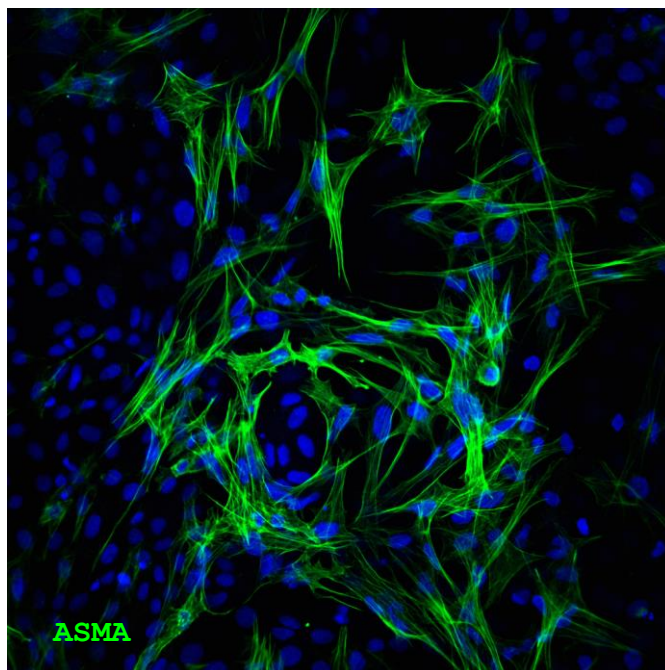


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

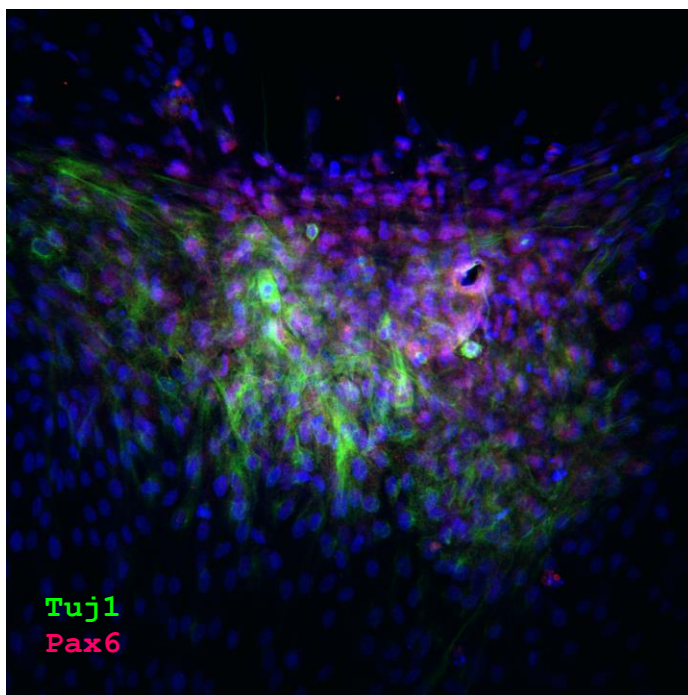
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

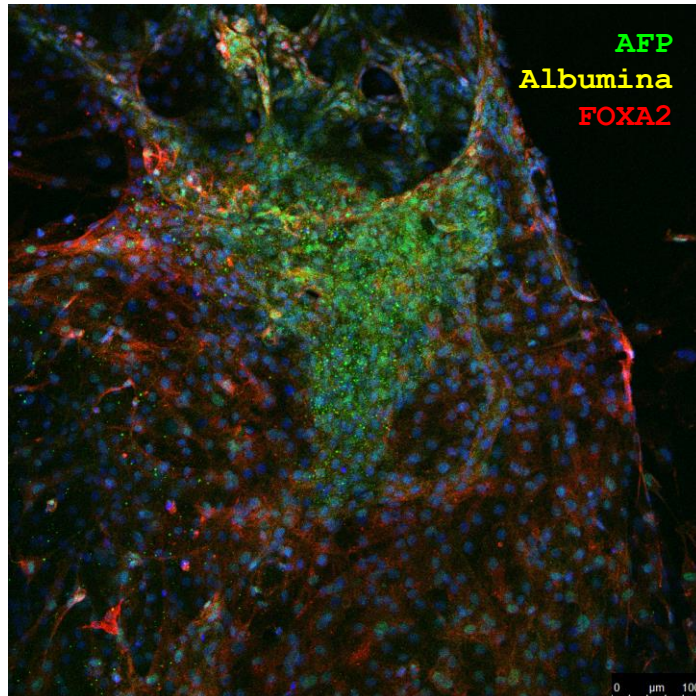
Diferenciación *in vitro*



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



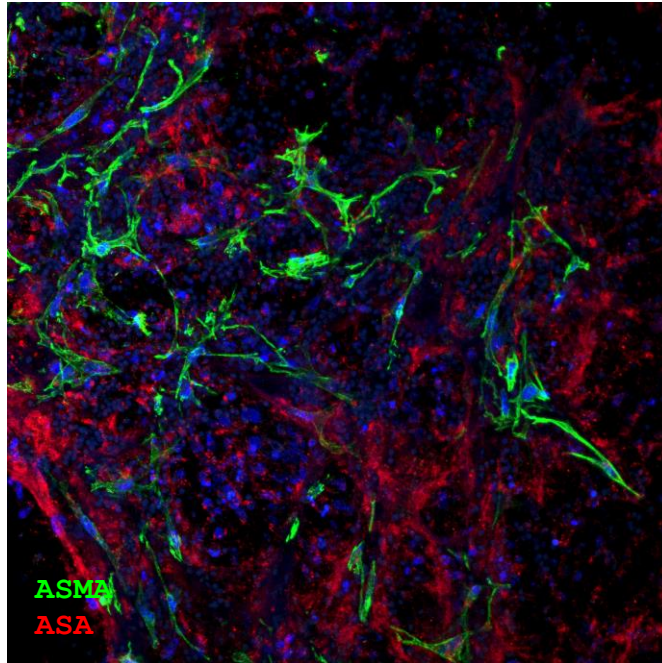
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1 y Pax6**



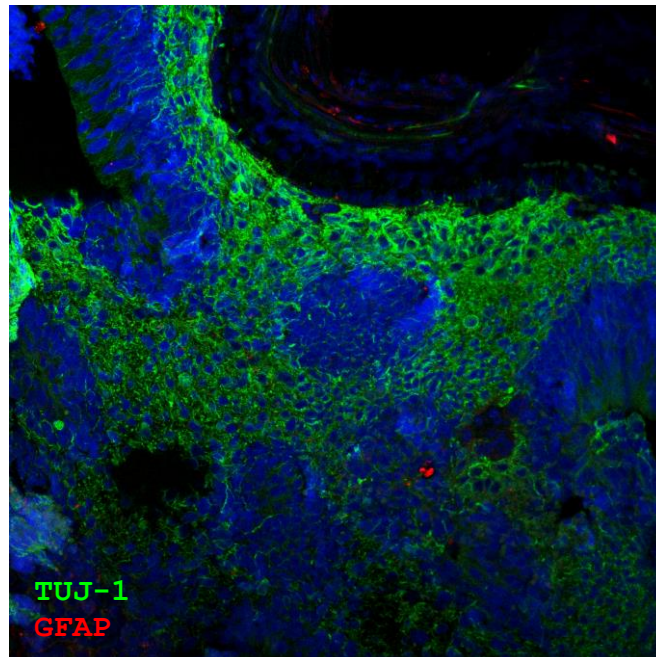
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP, Albúmina y FOXA2**.

Anexo 3

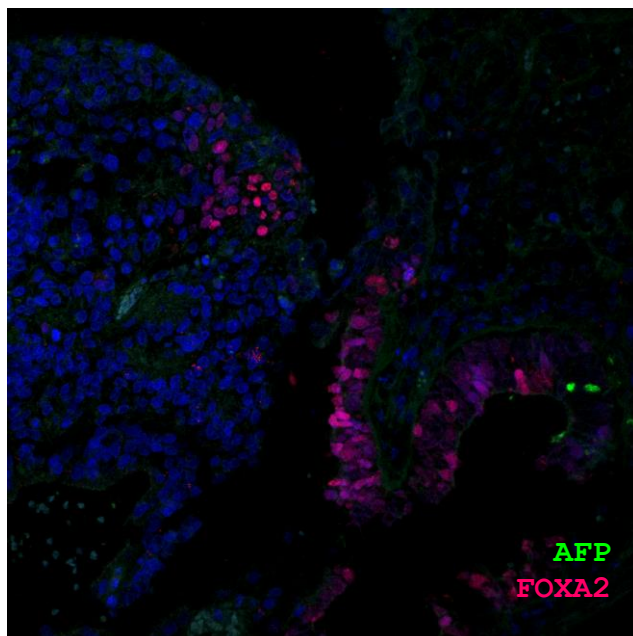
Diferenciación *in vivo*



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



Diferenciación *in vivo* a ectodermo: Células positivas para **TUJ1 y GFAP.**

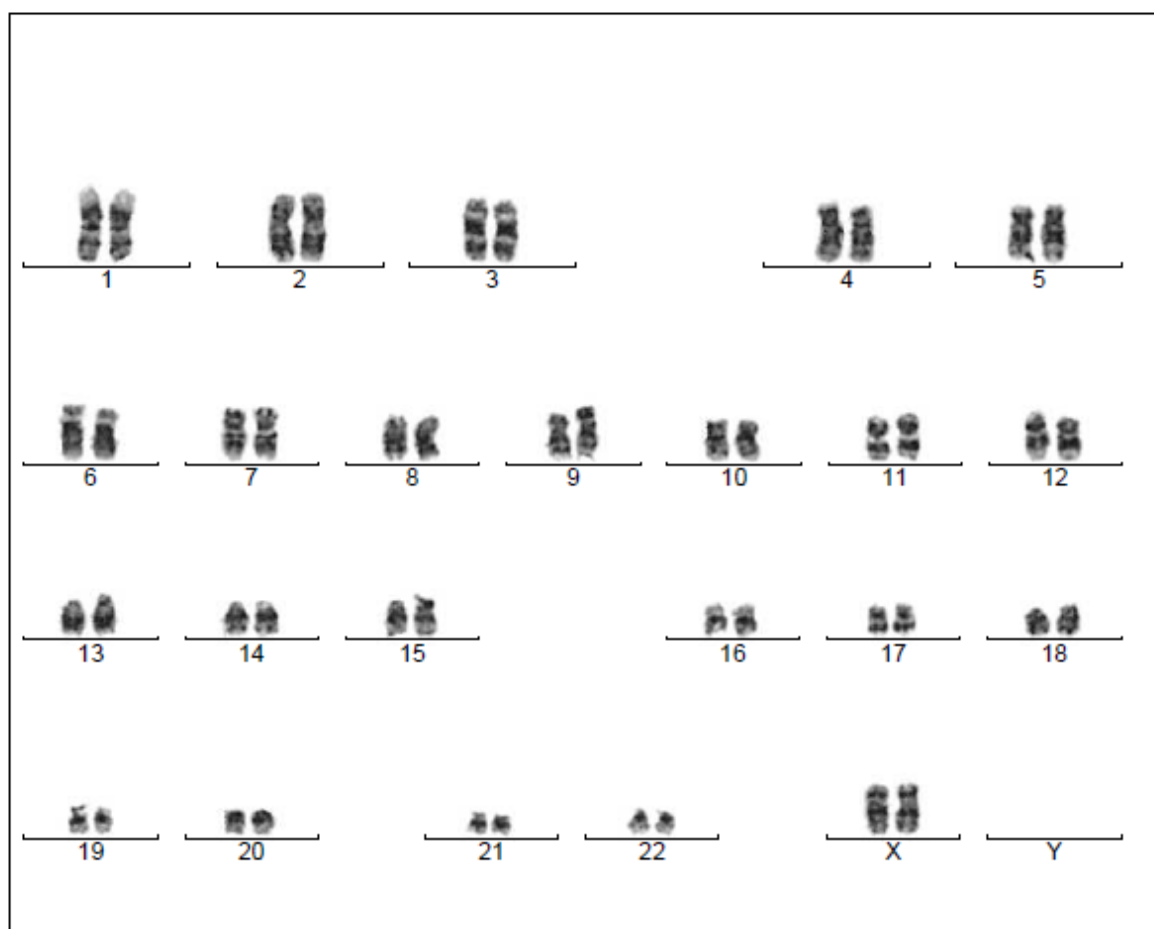


Diferenciación in vivo a endodermo: Células positivas para **AFP** y **FOXA2**

Anexo 4

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Case name: A162120

Patient name: DUP7-FIPS4-R4F-2

Specimen type: stem cells

Result: 46,XX

Anexo 5

Resultado microsatélites



Table 5. The *GenePrint*® 10 System Allelic Ladder Information.

STR Locus	Label	Size Range of Allelic Ladder Components ^{1,2} (bases)	Repeat Numbers of Allelic Ladder Components
TH01	FL	156–195	4–9, 9.3, 10–11, 13.3
D21S11	FL	203–259	24, 24.2, 25, 25.2, 26–28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36–38
D5S818	JOE	119–155	7–16
D13S317	JOE	176–208	7–15
D7S820	JOE	215–247	6–14 ³
D16S539	JOE	264–304	5, 8–15
CSF1PO	JOE	321–357	6–15
Amelogenin	TMR	106, 112	X, Y
vWA	TMR	123–171	10–22
TPOX	TMR	262–290	6–13

¹The length of each allele in the allelic ladder has been confirmed by sequence analysis.

²When using an internal lane standard, such as the Internal Lane Standard 600, the calculated sizes of allelic ladder components may differ from those listed. This occurs because different sequences in allelic ladder and ILS components may cause differences in migration. The dye label also affects migration of alleles.

³HeLa cells have a microvariant allele 13.3 at the D13S317 locus. This will appear as an off-ladder allele (see www.cstl.nist.gov/strbase/var_D13S317.htm#Tri).

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:

A continuación se detalla la correlación entre el código de muestra de Biobanco y la línea celular procesada:

código Biobanco	Línea celular
32151906054	DUP7 FIPS4-R4F-2 p59

En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a los alelos encontrados para cada uno de los marcadores microsatélites analizados.

Línea celular	Loci STR analizados									
	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
DUP7 FIPS4-R4F-2 p59	X	8, 10	8, 12	12, 13	27, 29	11	8	6, 8	11	15, 18

Granada, a 11 de Diciembre de 2015

Área de Biología Molecular

Servicio de autenticación de líneas celulares

Detalles de la solicitud

Solicitante: Cristina Gómez Santos
Centro: Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Departamento:

Detalles de la muestra

Identificador externo: Fibras DUPSW4-01 p4
Identificador interno: qG15013842
Descripción: 1 epp amb pellet

Informe de resultados

Resultados

Calidad de la muestra: Correcta

Muestra	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	AMEL	vWA	TPOR
Fibras DUPSW4-01 p4	6-8	27-29	11-11	8-12	8-8	12-13	8-10	XX	15-18	11-11

Coincidencia con línea celular conocida: No Cual:

Contaminación con otra línea celular humana: No detectable

Observaciones: El patrón de marcadores STR coincide en un 100 % con la línea celular DUP7 FIPS4F-4-6 (qG15013841)

Firmado:
Manel Garcia

Fecha: 20/07/2015

Breve descripción del método

El estudio se ha realizado mediante el genotipado de marcadores STR (también conocidos como microsatélites: TH01, D21S11, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, vWA y TPOR). La combinación de los nueve marcadores utilizados produce un perfil de alelos con una probabilidad de coincidencia por azar de $1 \text{ en } 2,9 \times 10^9$. Se usa además un marcador para identificar el sexo de la muestra (AMEL).

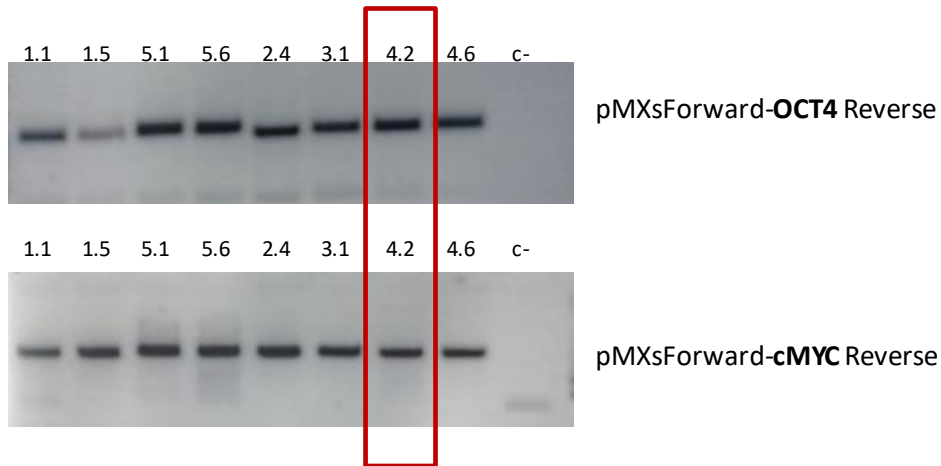
Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes [DUP7]FIPS4-R4F-2
y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

Anexo 6

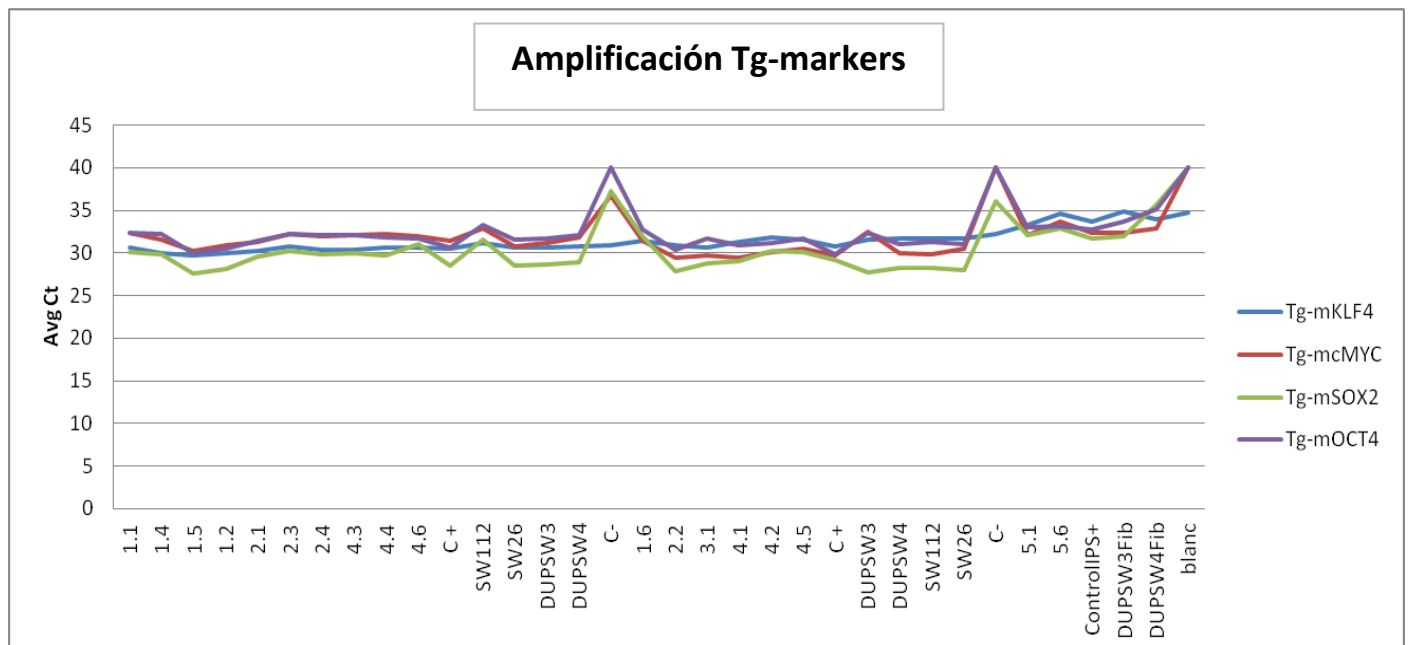
Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Integration Study by PCR analysis of genomic DNA

Constructs used (pMXs OCT4 VP16 SOX2-mOrange) & (pMXsKLF4 MYC-GFP)



Análisis gPCR mostrando las integraciones genómicas de los genes utilizados para generar la línea.

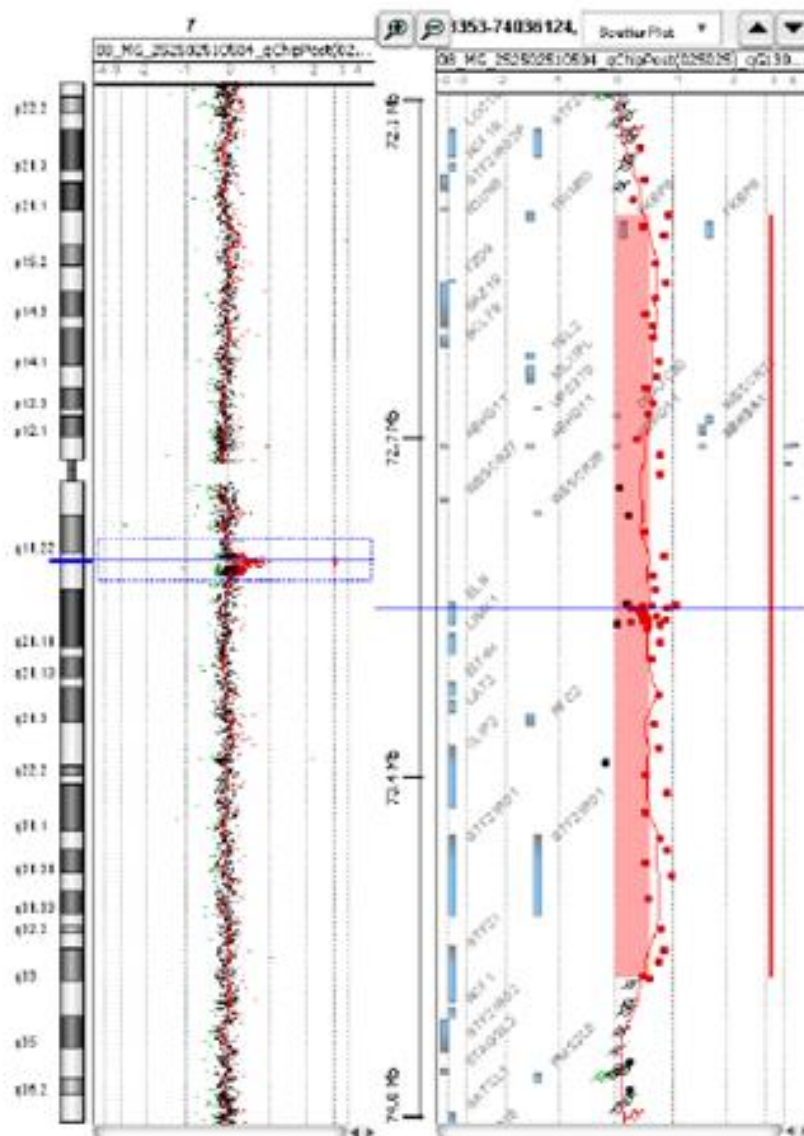


Silenciamiento de los transgenes de reprogramación. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH

Anexo 8

Genotipado

Genotyping showing the 1.5Mb duplication of 7q11.23 model by CGH array. Clone 4.2



Duplicación de 1,5Mb de la banda 7q11.23 identificada en el presente caso, que coincide con la microduplicación recurrente de esta banda que se ha descrito como la causa del Síndrome de microduplicación 7q11.23.

Anexo 7

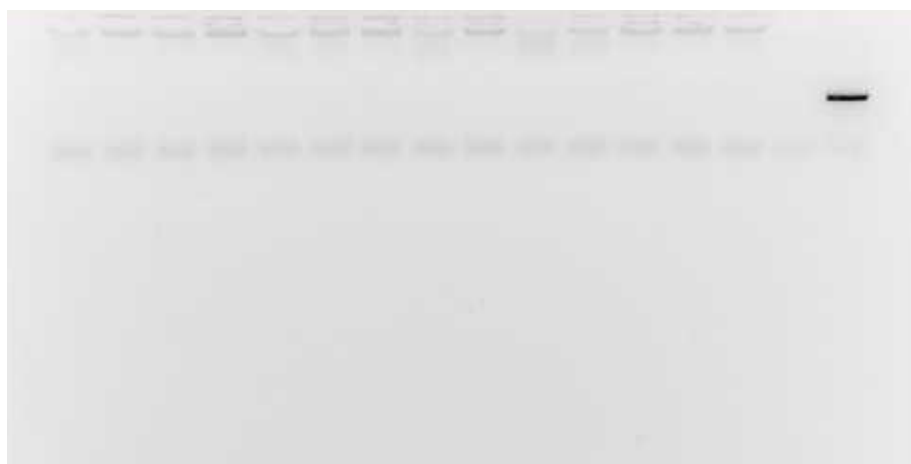
Resultado test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST

21-10-2015

1

2 3



1. DUP7 FiPS4-R4F-2 p54

2. CT -

3. CT +