

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR FiPS Ctrl1-R4F-4 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Cariotipo

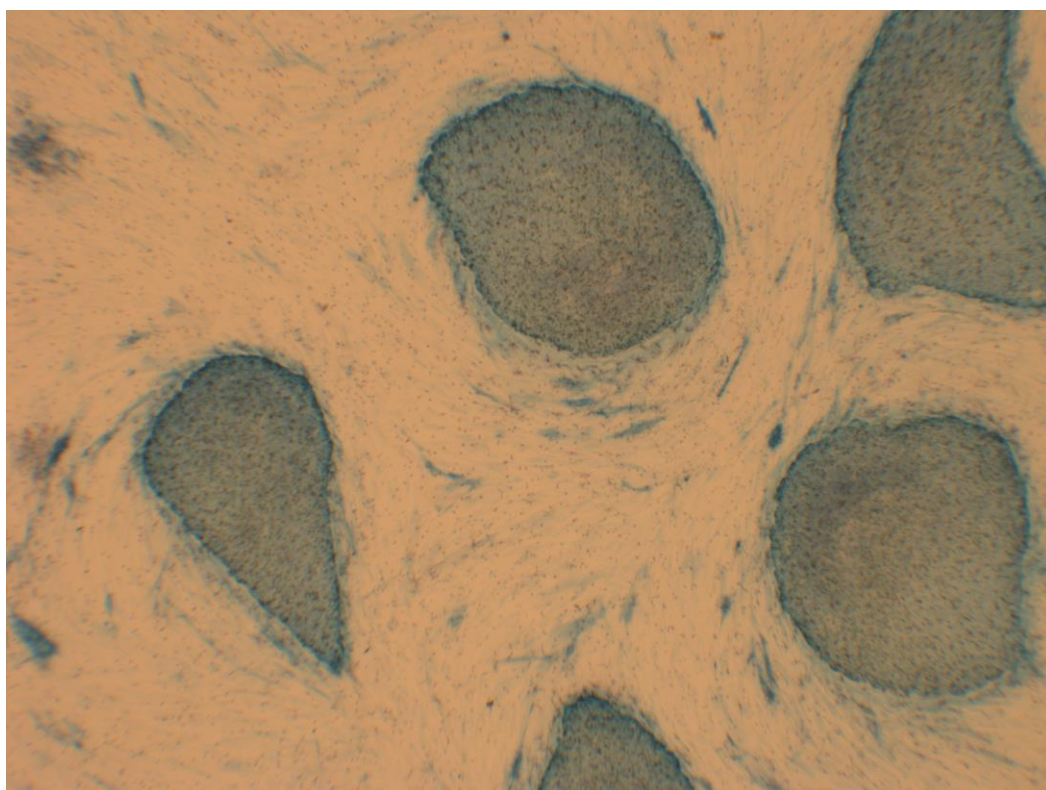
Anexo 4: Resultados microsatélites

Anexo 5: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

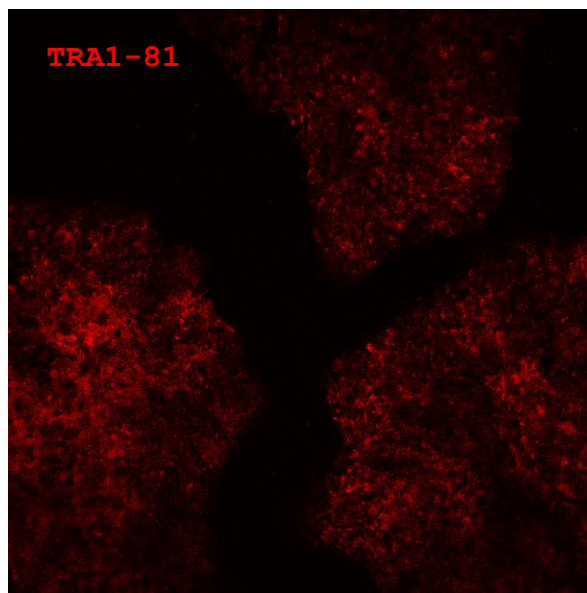
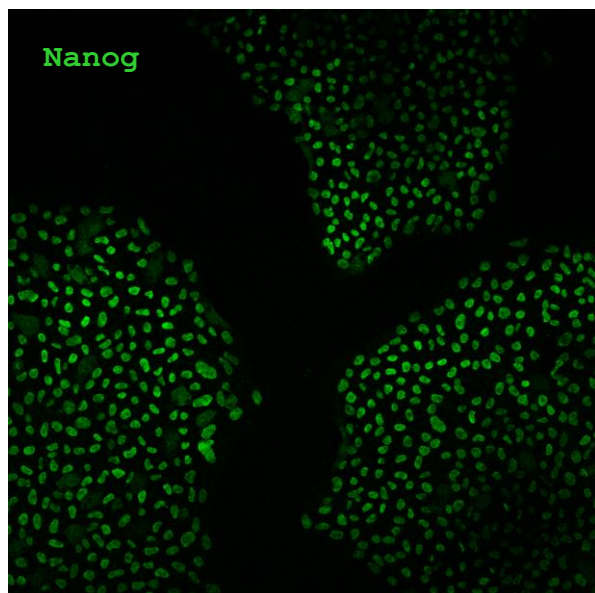
Anexo 6: Resultado test de micoplasma

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

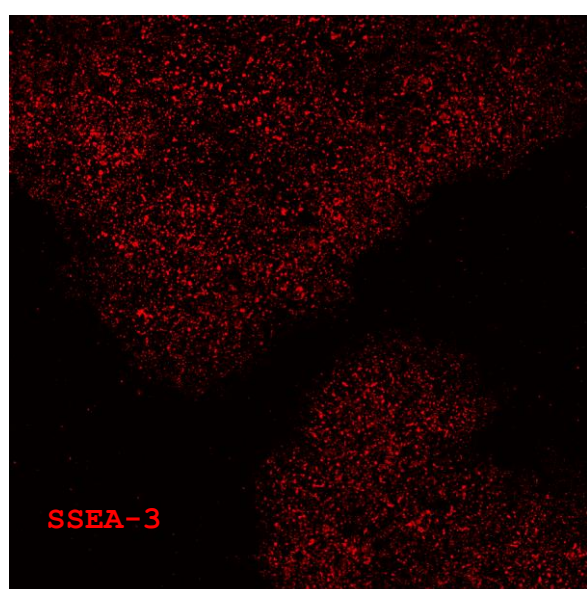
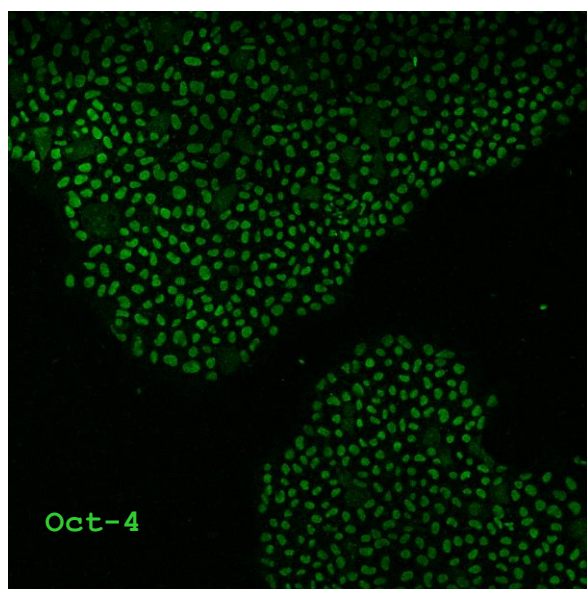


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



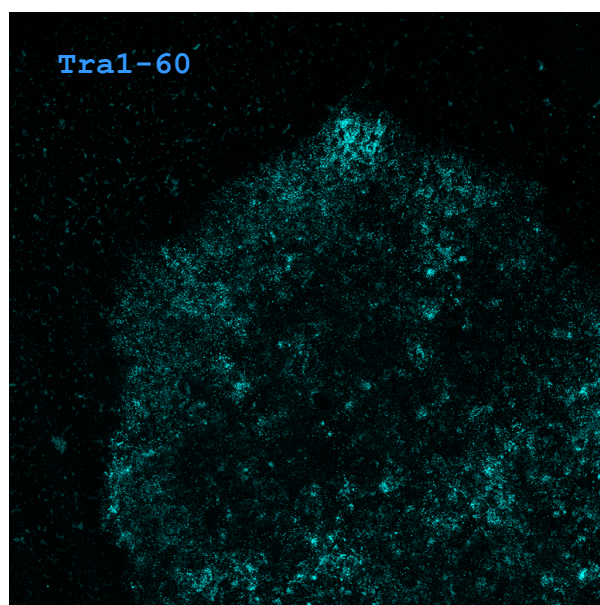
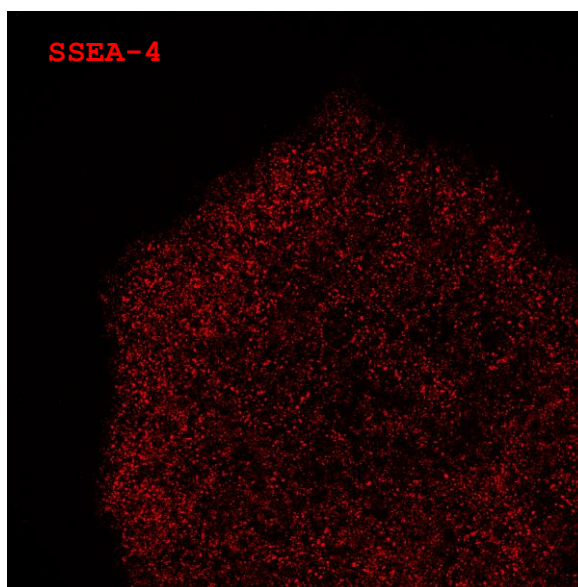
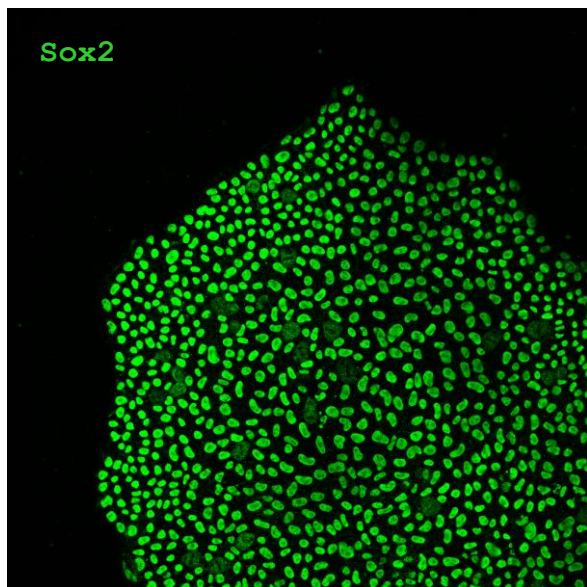
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3

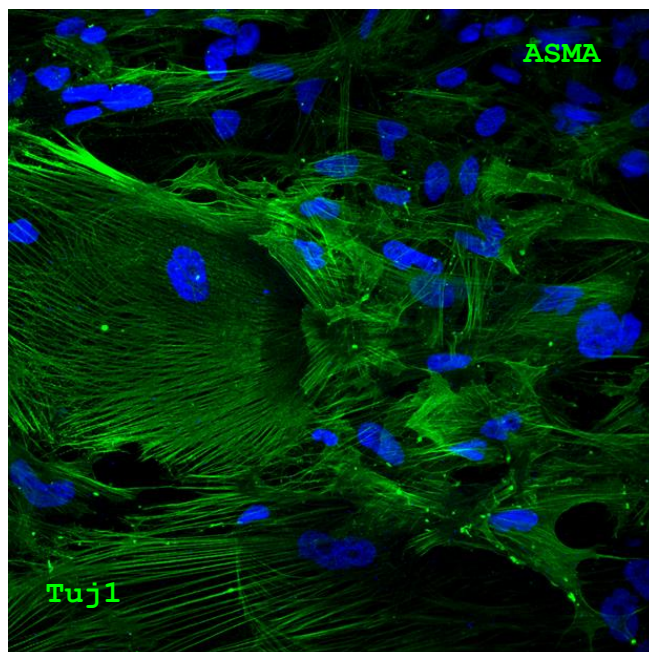


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

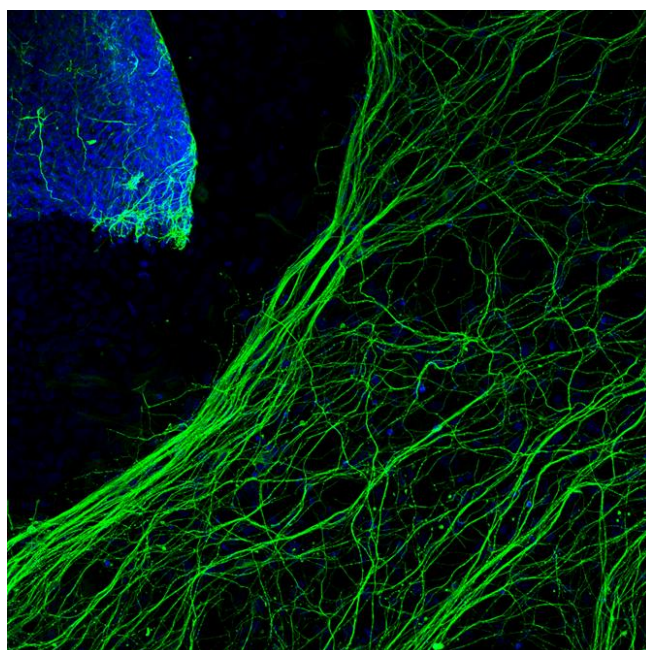
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

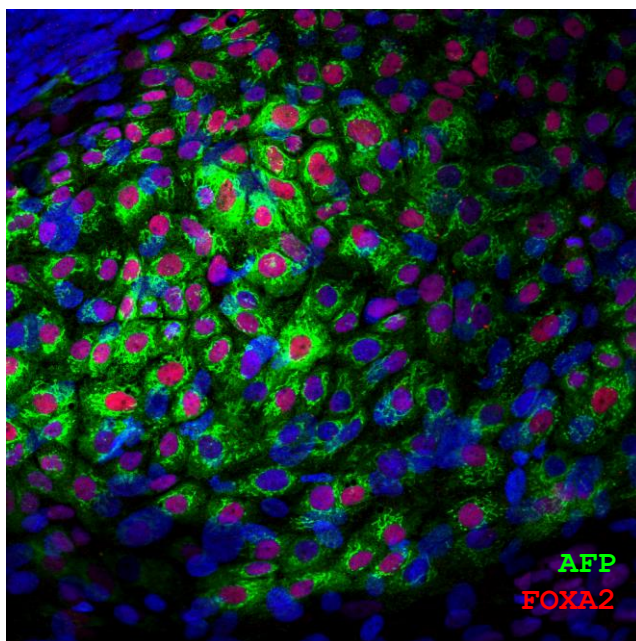
Diferenciación *in vitro*



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



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

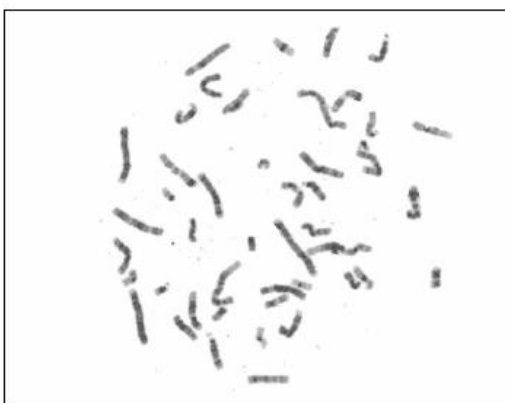
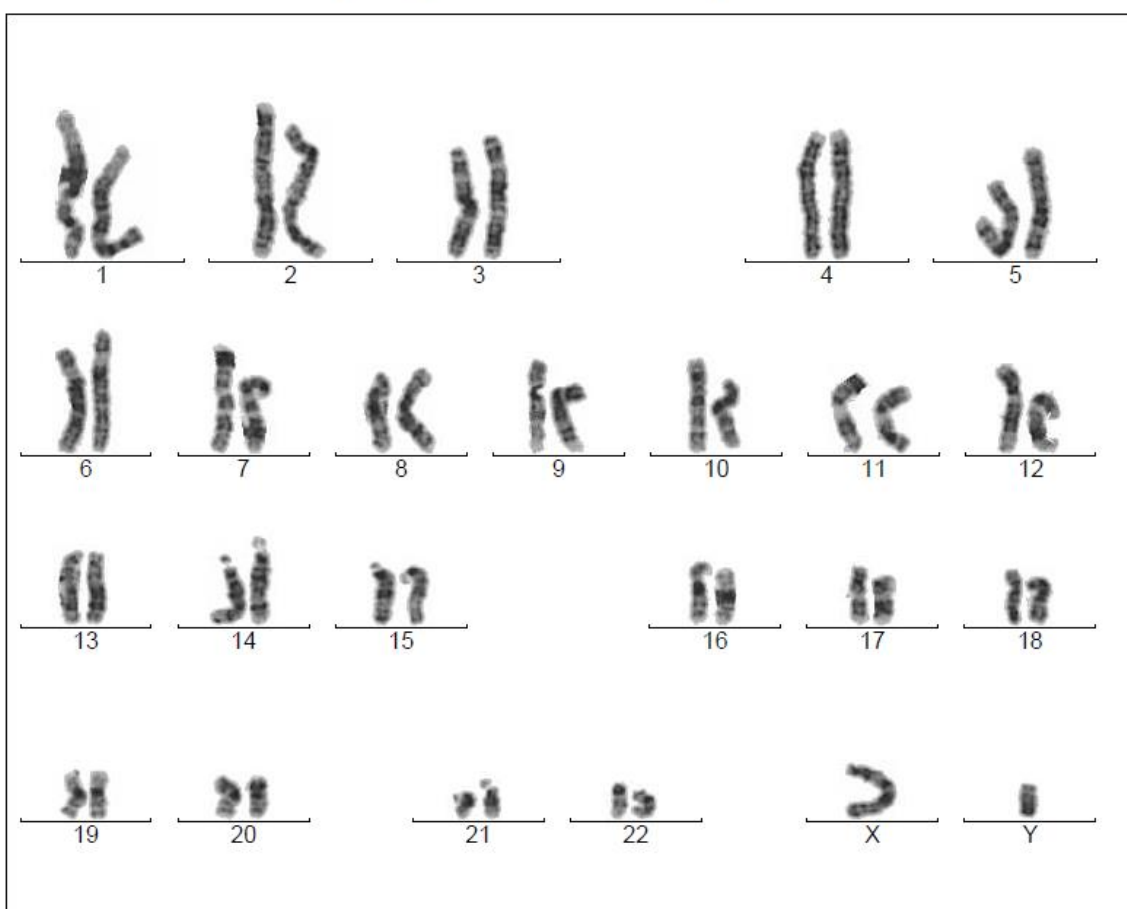


Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

Anexo 3

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Case name: A181377

Patient name: FiPS Ctrl1-R4F-4 p16

Specimen type: stem cells

Result: 46,XY

Anexo 4

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
32161599002	FiPS Ctrl1 R4F-4, P15

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
FiPS Ctrl1 R4F-4, P15	X, Y	11, 12	12, 13	10, 11	29, 31.2	12, 13	10, 11	6	8, 10, 12.5	18

Granada, a 28 de Diciembre de 2016

Área de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

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

código Biobanco	Línea celular
32151906010	Ctrl1F-ABB p2

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
Ctrl1F-ABB p2	X,Y	11, 12	12, 13	10, 11	29, 31.2	12, 13	10, 11	6	8, 10, 12.5	18

Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes **FiPS Ctrl1-R4F-4** y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

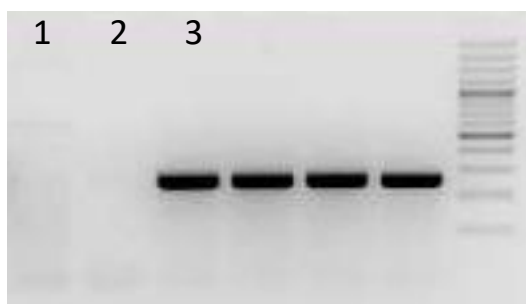
Anexo 5

Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

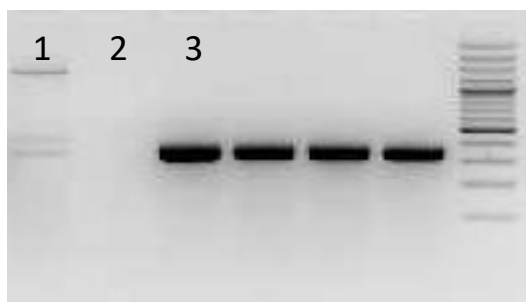
Integration

20/10/2016

pMXs(FIOctVPHASoxVP-Or)n4



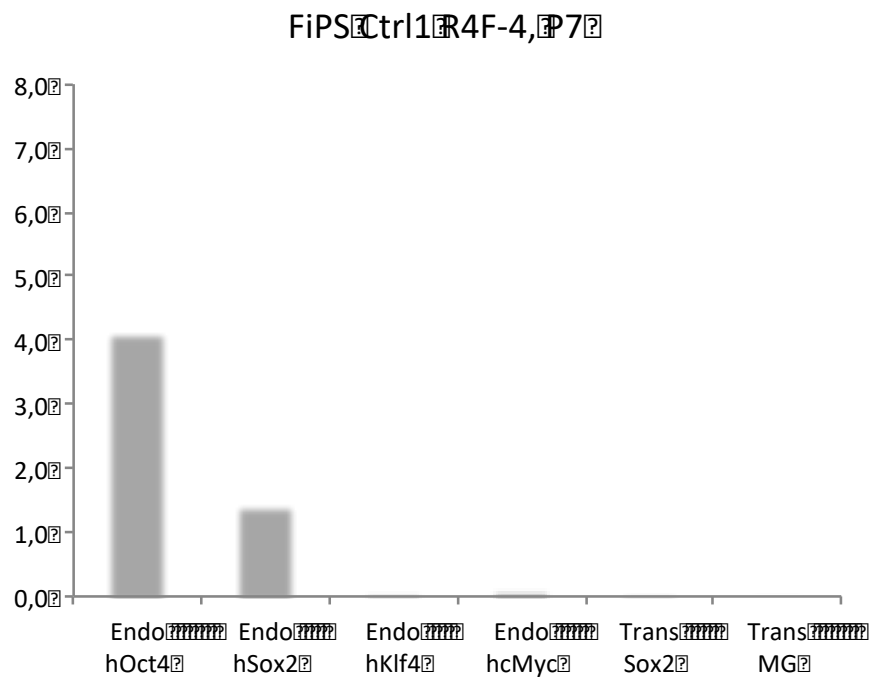
pMXs-KM-GFP



1. Negative Control (non reprogrammed cells)
2. Negative Control (water)
3. FiPS Ctrl1 R4F-4, p7

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

Silencing
17/10/2016



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

Anexo 6

Resultado test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST

14/12/2016



1. FiPS Ctrl1 R4F-4, p15
2. Negative control (water)
3. Positive control