

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR [SWB] FiPS5-R4F-1 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: Análisis microsatélites

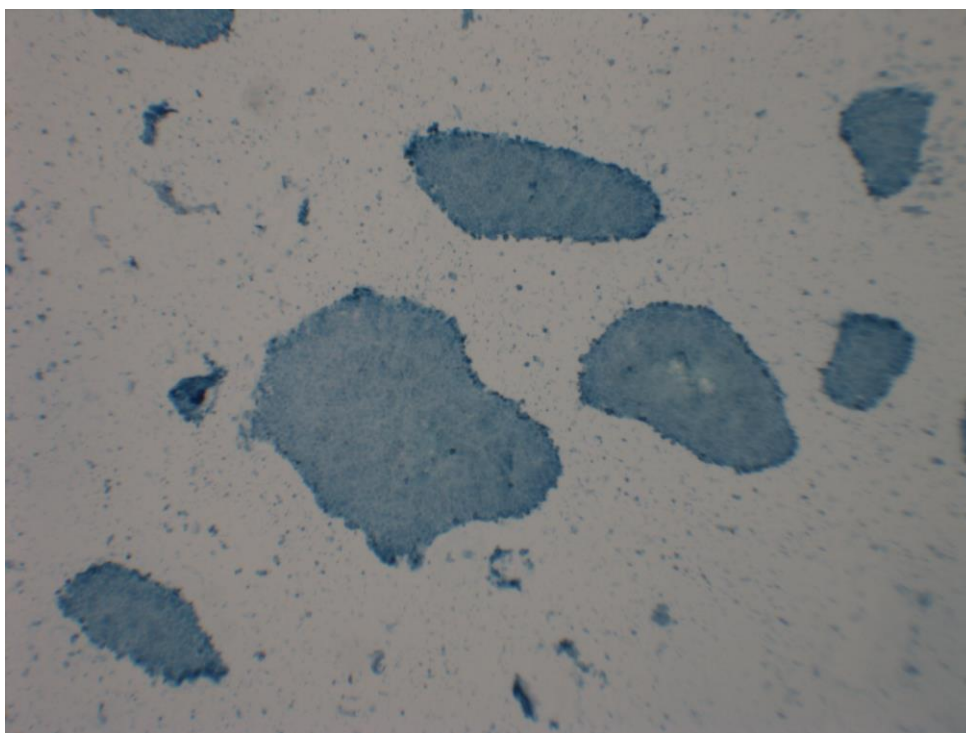
Anexo 6: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Anexo 7: Genotipado

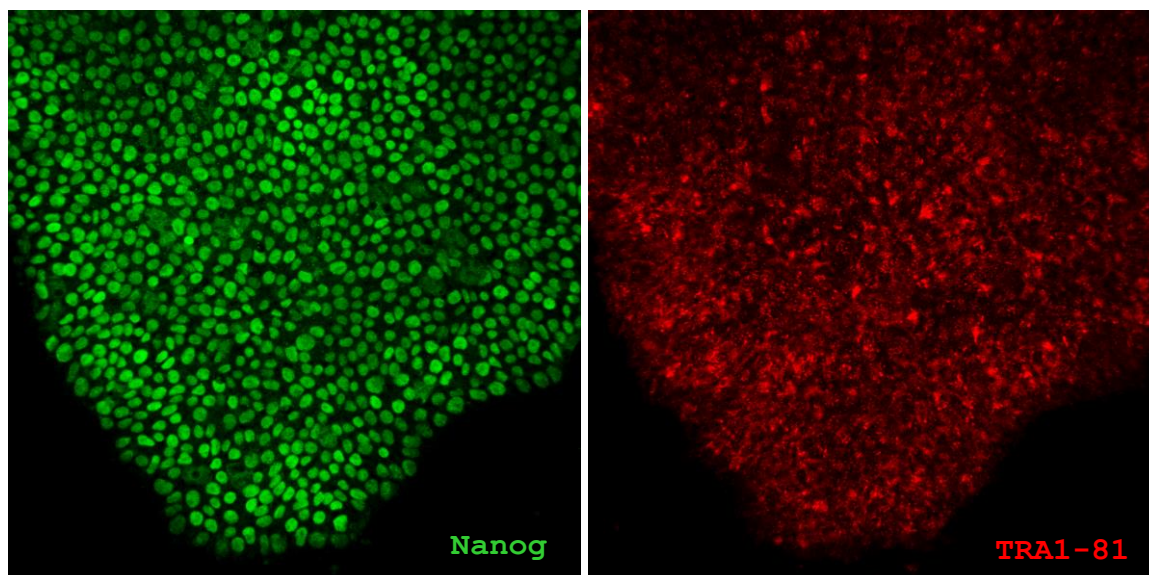
Anexo 8: Test de micoplasma

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

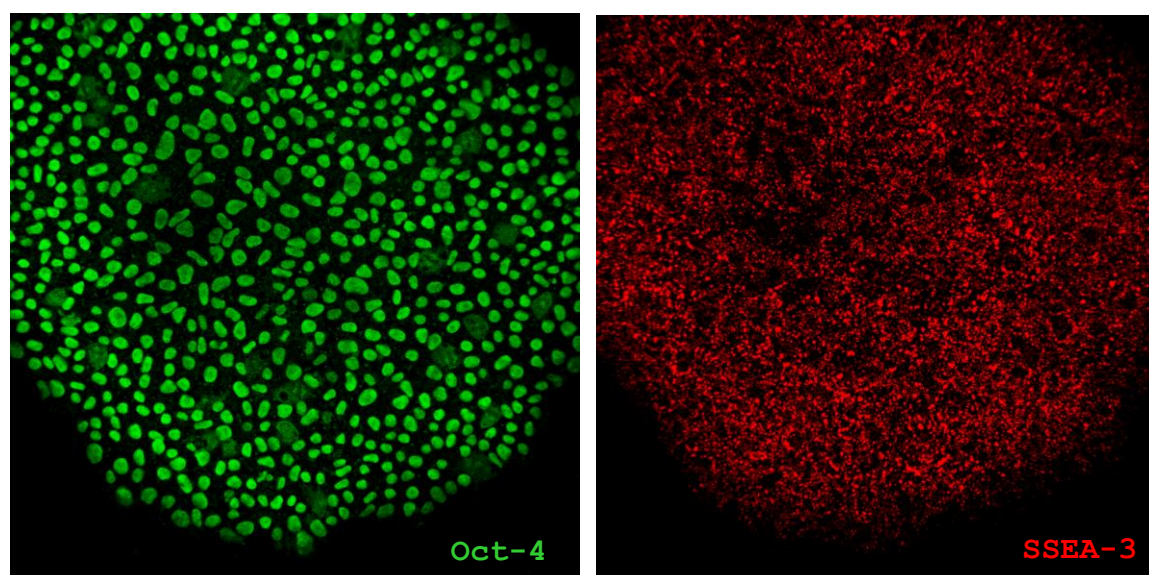


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



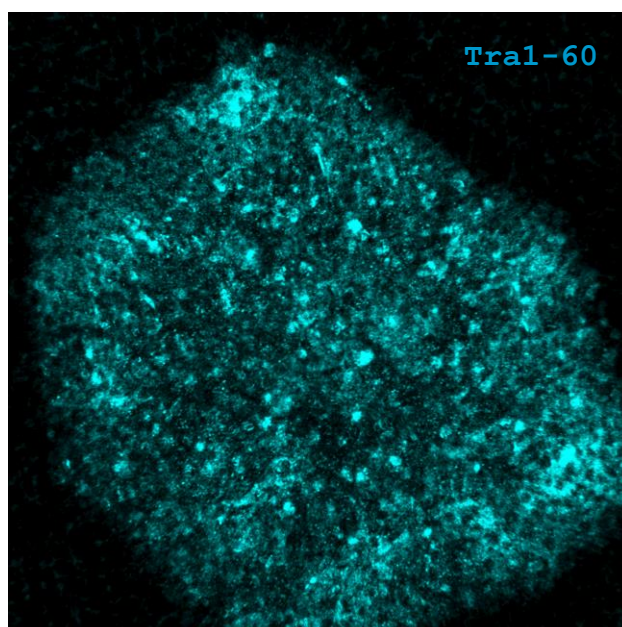
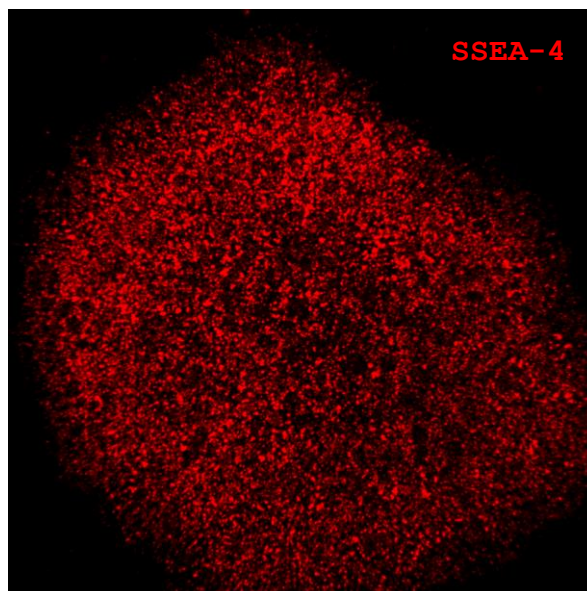
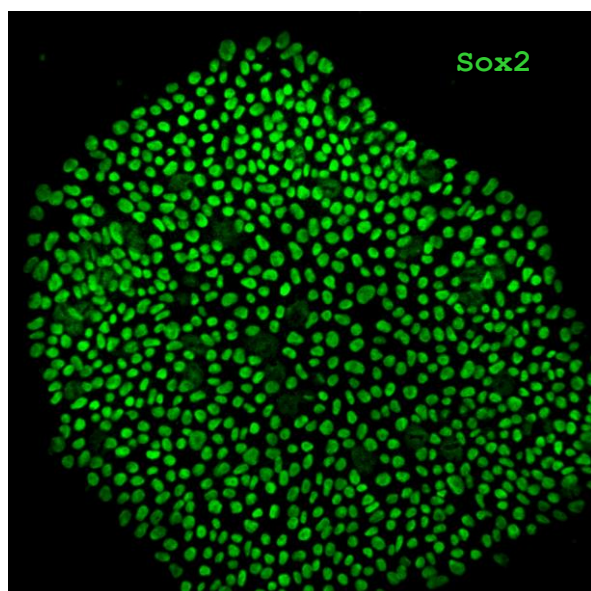
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3

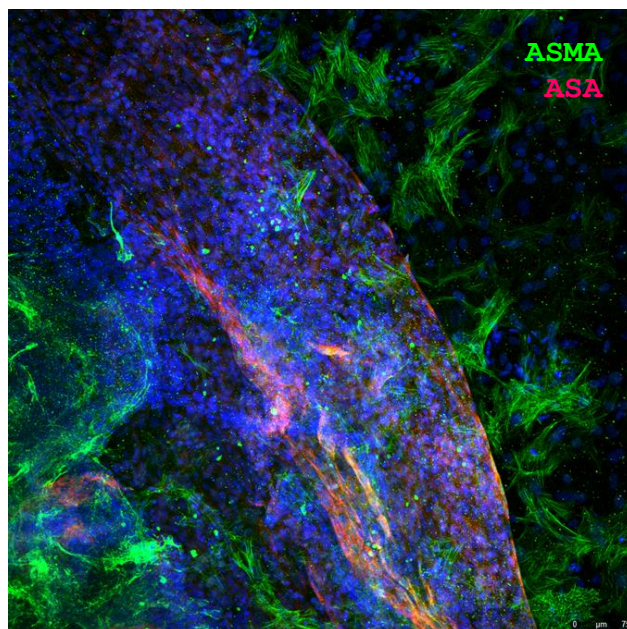


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

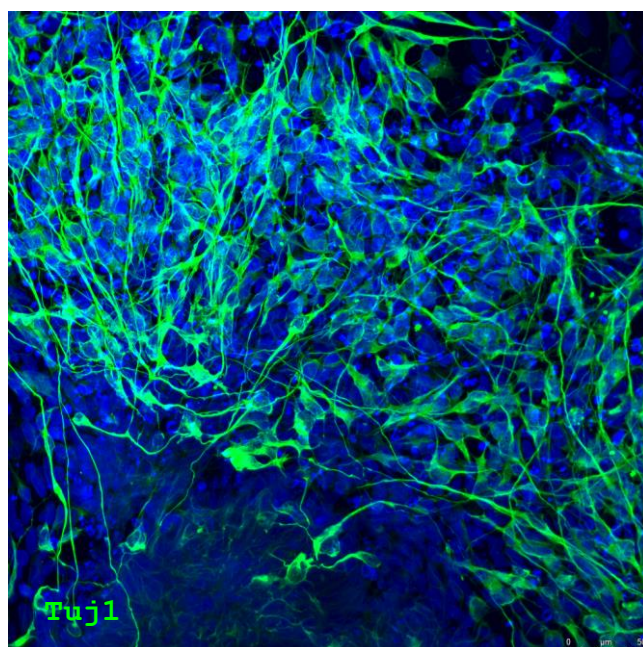
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

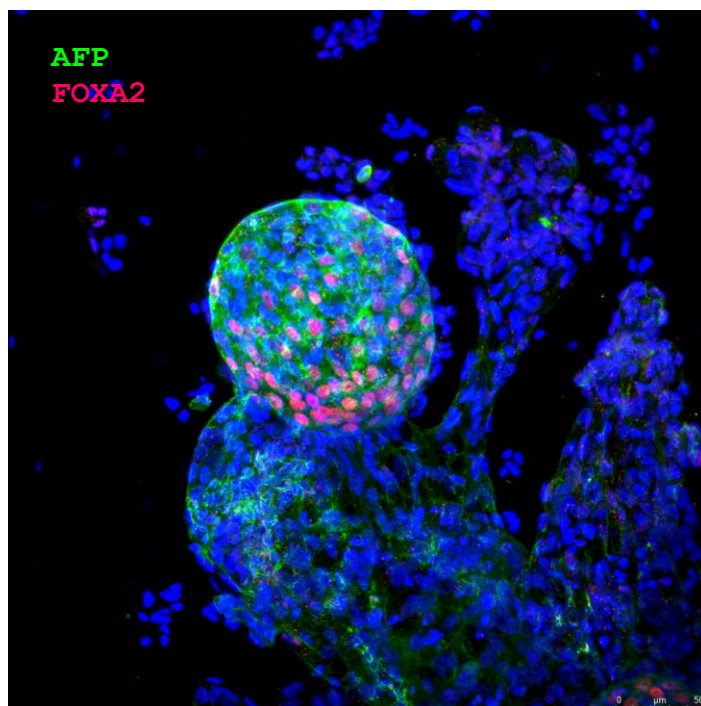
Diferenciación *in vitro*



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



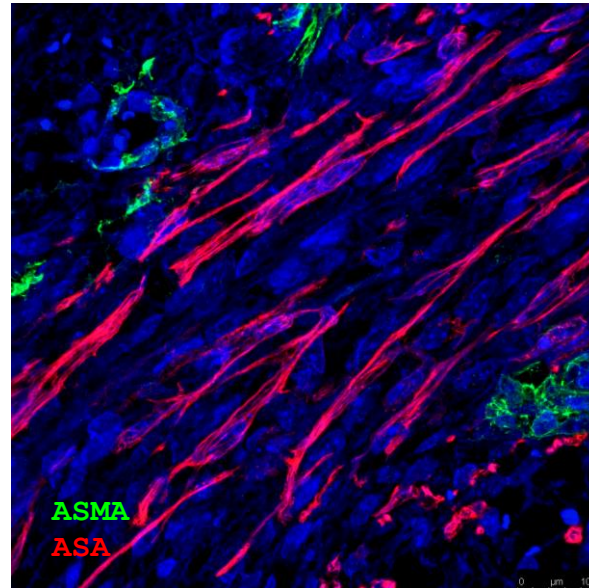
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1**.



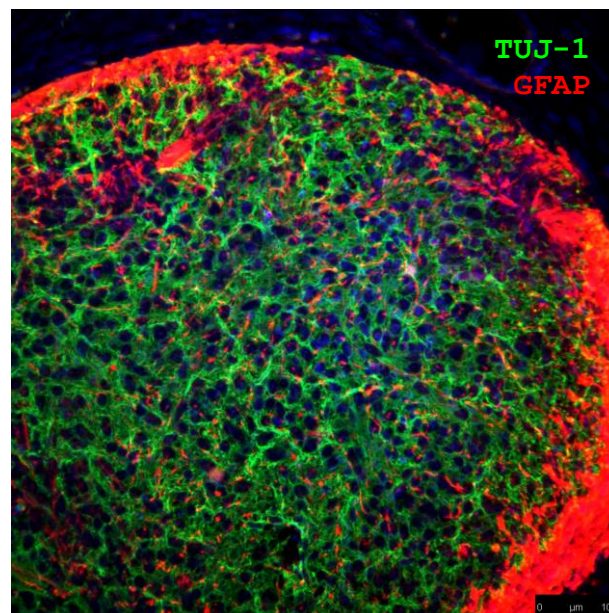
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

Anexo 3

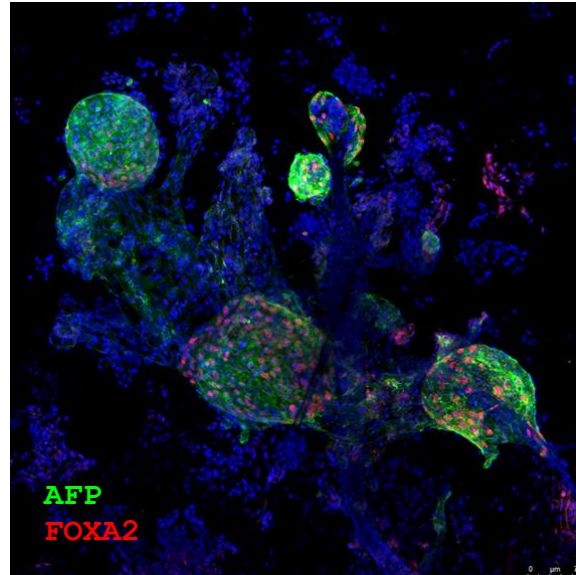
Diferenciación *in vivo*



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



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

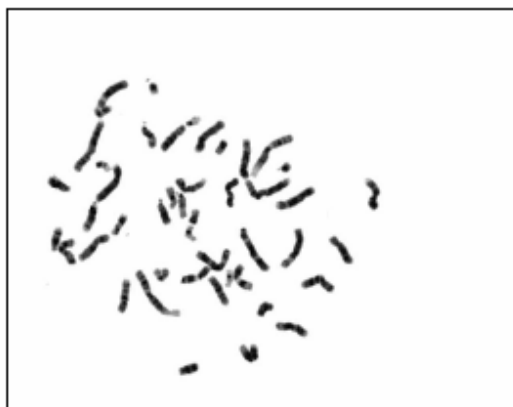
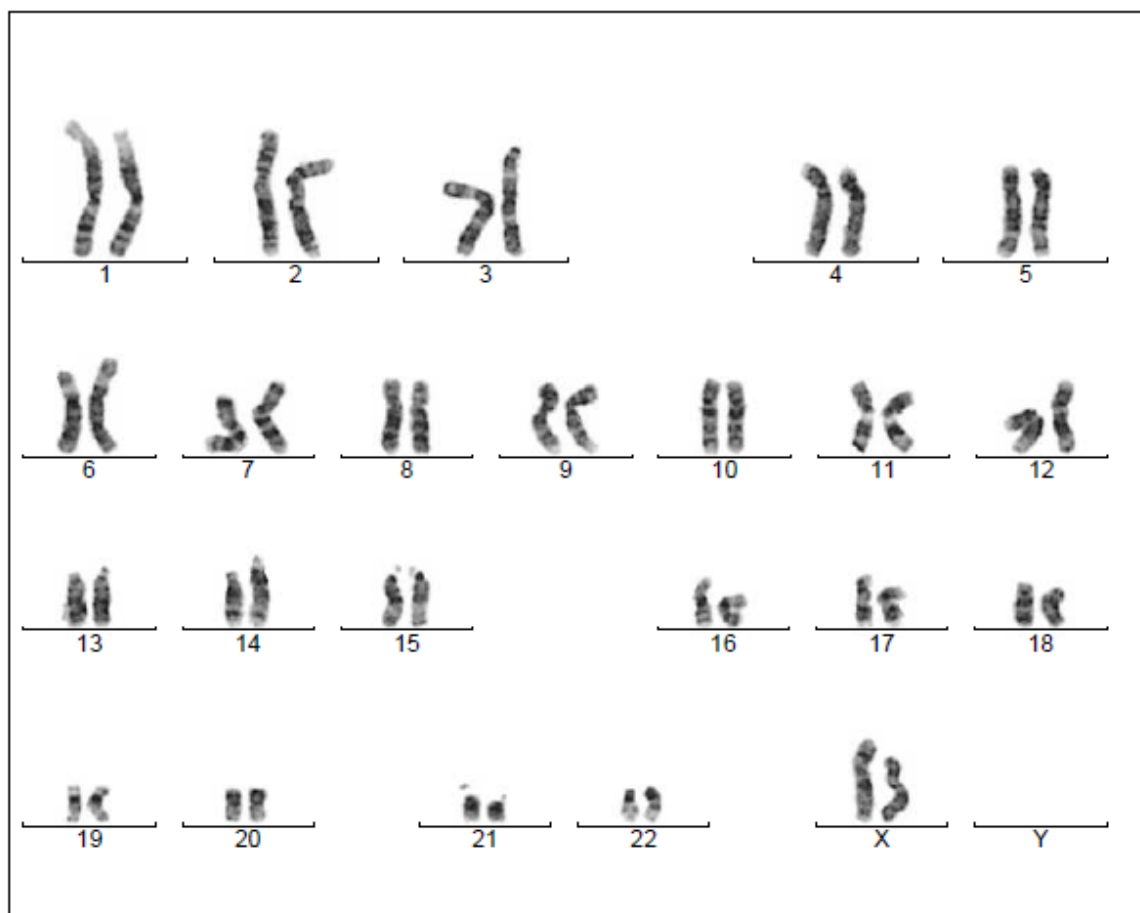


Diferenciación in vivo a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

Anexo 4

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Case name: A161558

Patient name: SWB-FiPS5-R4F-1

Specimen type: stem cells

Result: 46,XX

Anexo 5

Análisis microsatélites



Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
CONSEJERÍA DE SALUD

v.03

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, 32.1, 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.fbi.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
32151906049	SWB FiPS5-R4F-1p23

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
SWB FiPS5-R4F-1p23	X	10	12, 13	12, 13	31.2, 32.2	12, 14	10, 11	6, 9	8	16, 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: Fibros SW26-01 p6
Identificador interno: qG15013844
Descripción: 1 epp amb pellet

Informe de resultados

Resultados

Calidad de la muestra: Correcta

Muestra	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	AMEL	vWA	TPOX
Fibros SW26-01 p6	6-9	31.2-32.2	12-14	12-13	10-11	12-13	10-10	XX	16-18	8-8

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 SWB FIPS4F-5-6 (qG15013843)

Firmado:
Manel Garcia

Fecha: 20/07/2015

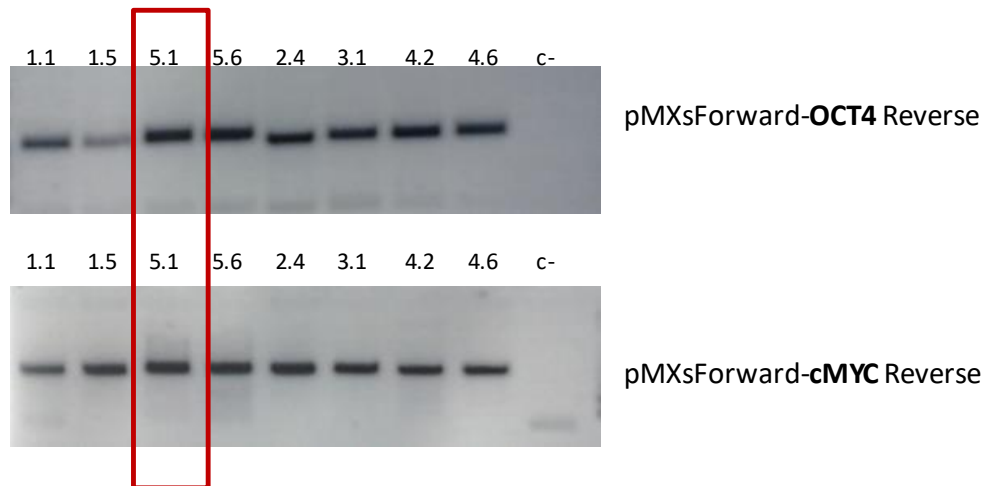
Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes [SWB]FiPS5-R4F-1
y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

Anexo 6

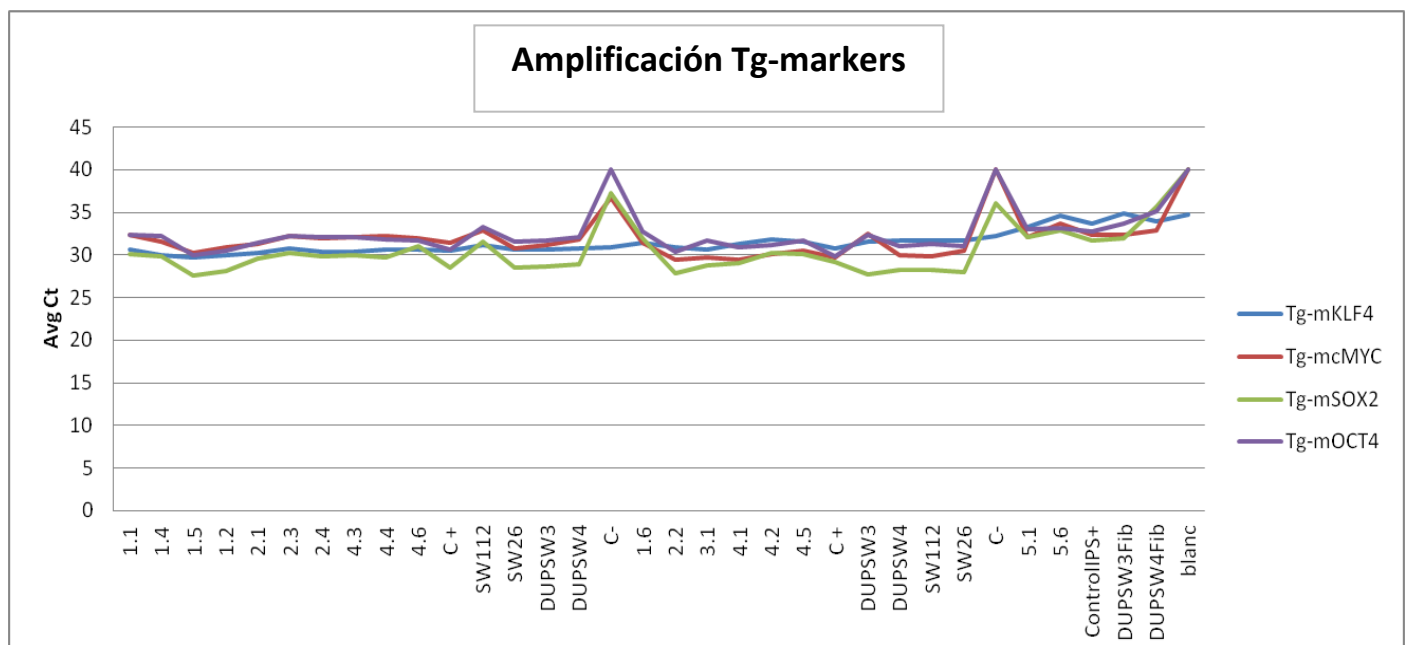
Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

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 2 genes utilizados Oct-4 y cMyc para generar la línea.

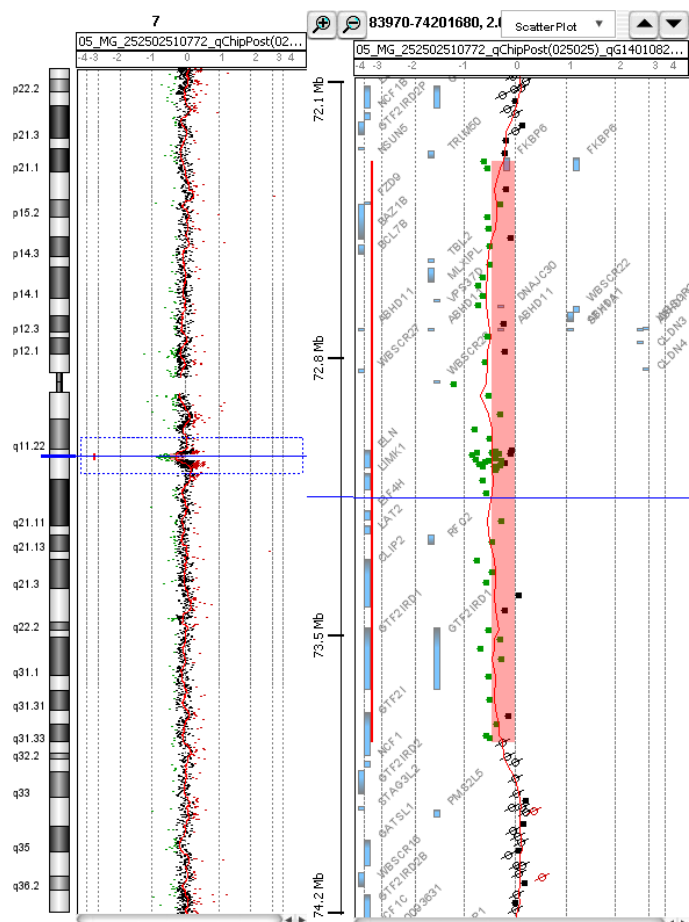


Silenciamiento de los transgenes de reprogramación. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH.

Anexo 7

Genotipado

Genotyping showing the 1.5Mb deletion of 7q11.23 model by CGH array. Clone 5.1



Detalle de la deleción intersticial de 1,5Mb identificada en el presente caso en la banda 7q11.23 que coincide con la microdeleción recurrente de esta banda descrita en la bibliografía como causa del síndrome de Williams-Beuren.

Anexo 8

Test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST

12-11-2015

1

2

3



1. SWB FiPS5-R4F-1 p24

2. CT -

3. CT +