

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR DUPSW FiPS 501-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

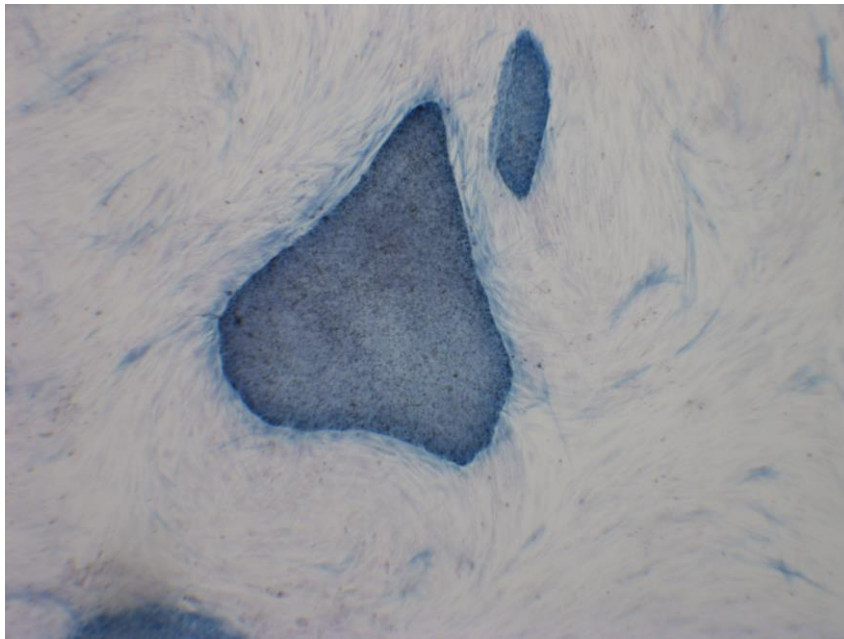
Anexo 6: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Anexo 7: Genotipado

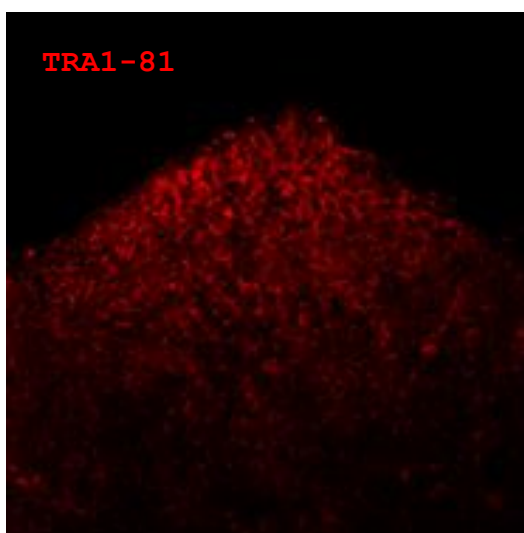
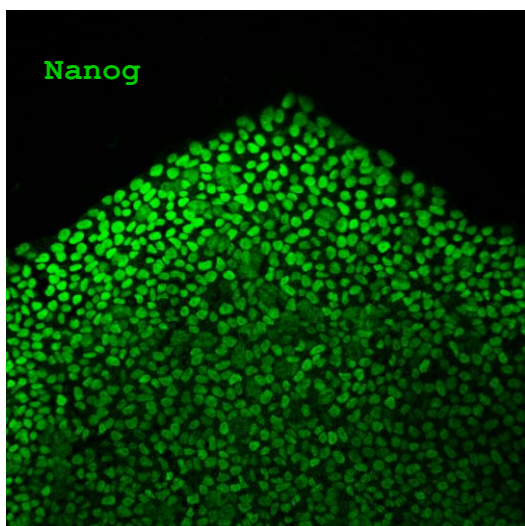
Anexo 8: Resultado Test de micoplasma (PCR)

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

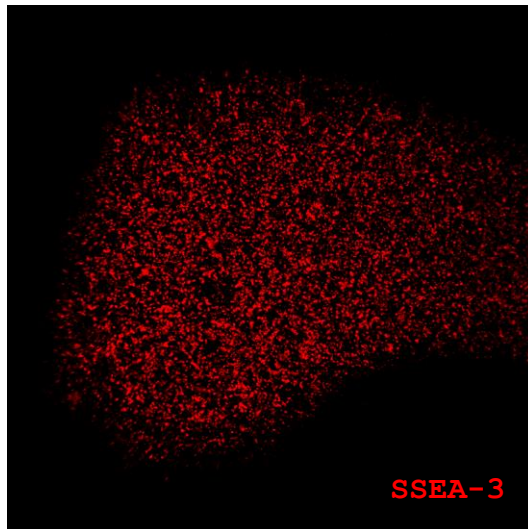
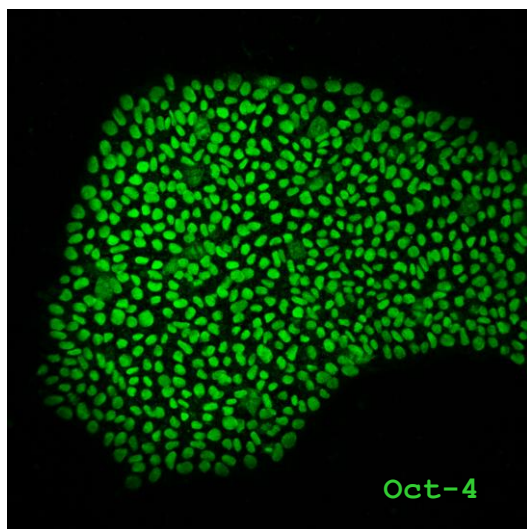


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



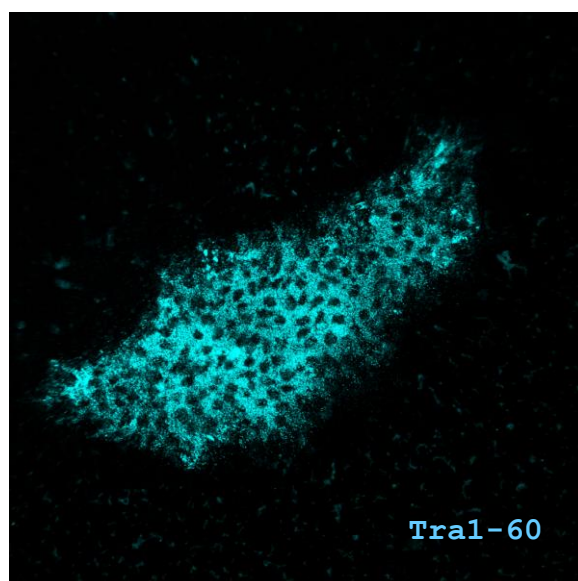
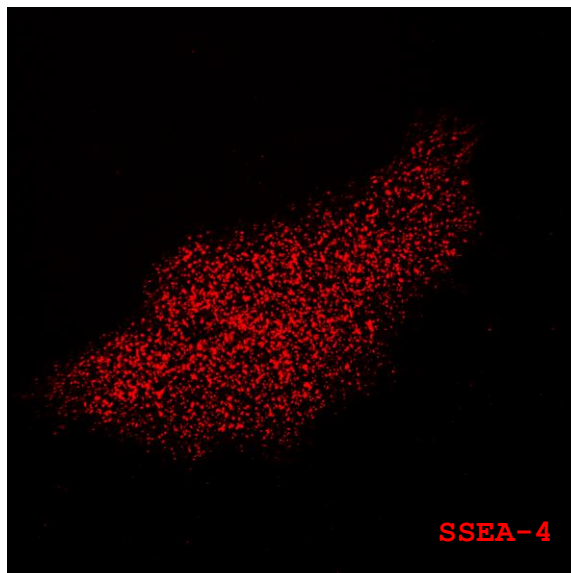
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

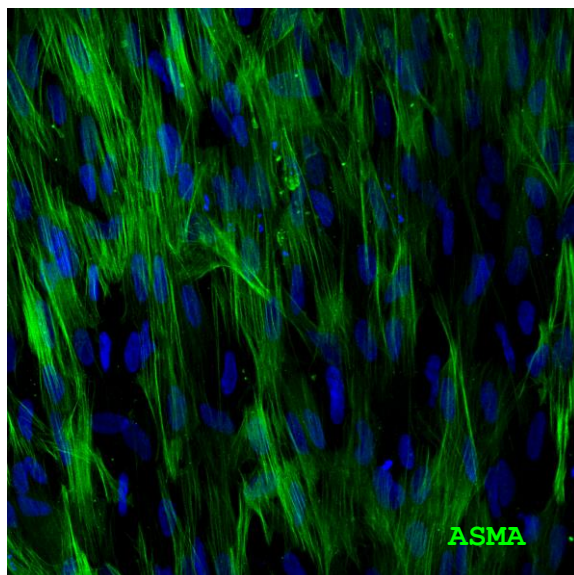
Oct-4 y SSEA-3



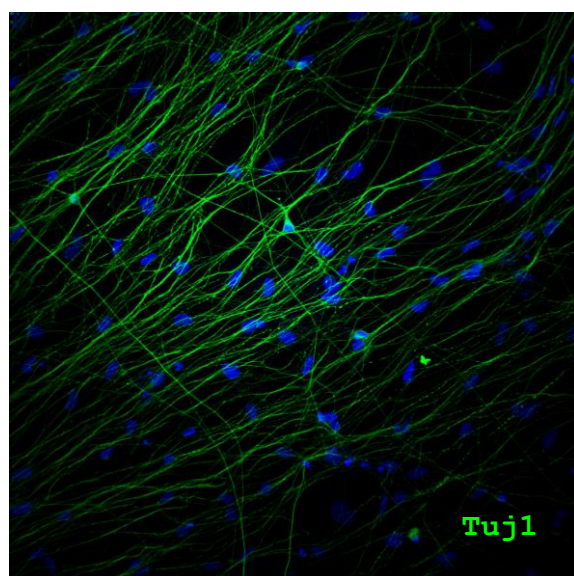
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

Diferenciación *in vitro*



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



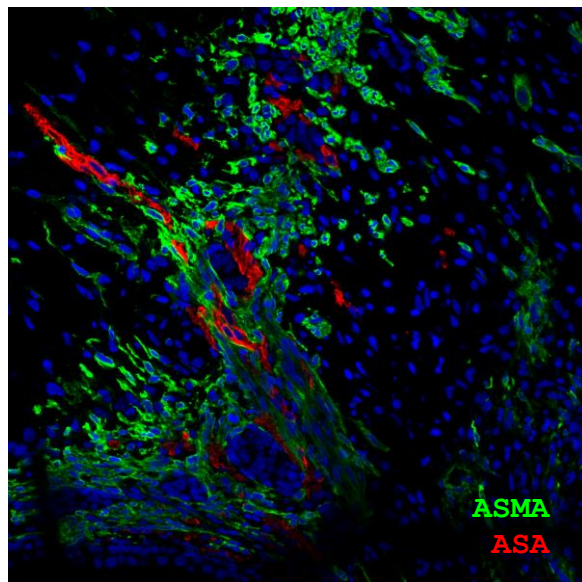
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1**.



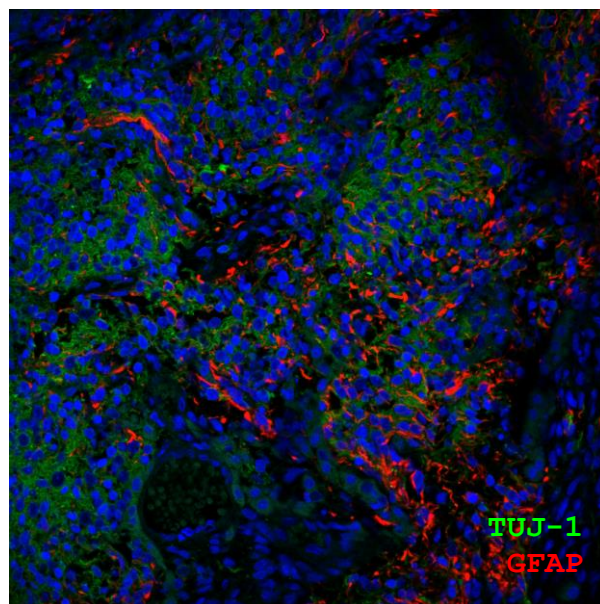
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **FOXA2**

Anexo 3

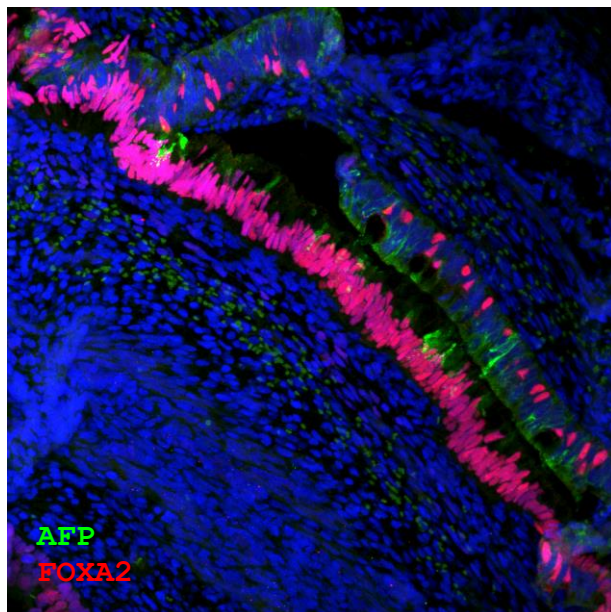
Diferenciación *in vivo*



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



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

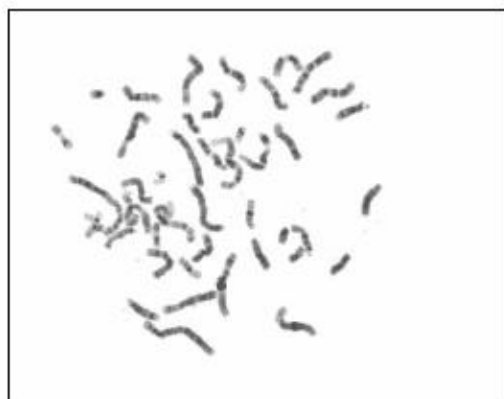
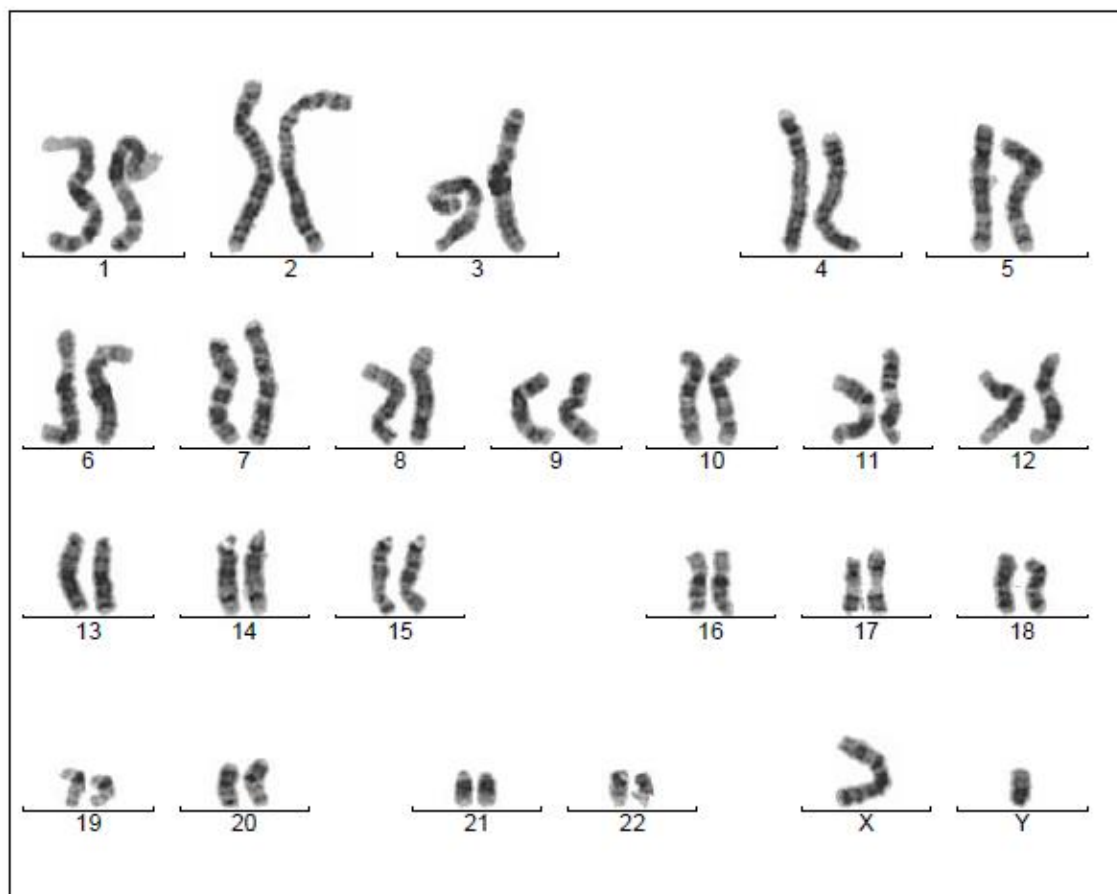


Diferenciación in vivo a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

Anexo 4

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Case name: A179625

Patient name: DUPSW FiPS 501-R4F-2 p16

Specimen type: stem cells

Result: 46,XY

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
32161597002	DUPSW FiPS501 R4F-2, 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
DUPSW FiPS501 R4F-2, P15	X, Y	11, 12	11, 12	9, 11	27, 28	12, 13	9, 11	6, 9.3	8, 11	16, 18

Granada, a 28 de Diciembre de 2016

Área de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

RESULTADOS:

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

código Biobanco	Línea celular
32161593002	DUPSW 501 F

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
DUPSW 501 F	X, Y	11, 12	11, 12	9, 11	27, 28	12, 13	9, 11	6, 9.3	8, 11	16, 18

Granada, a 28 de Diciembre de 2016



Área de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

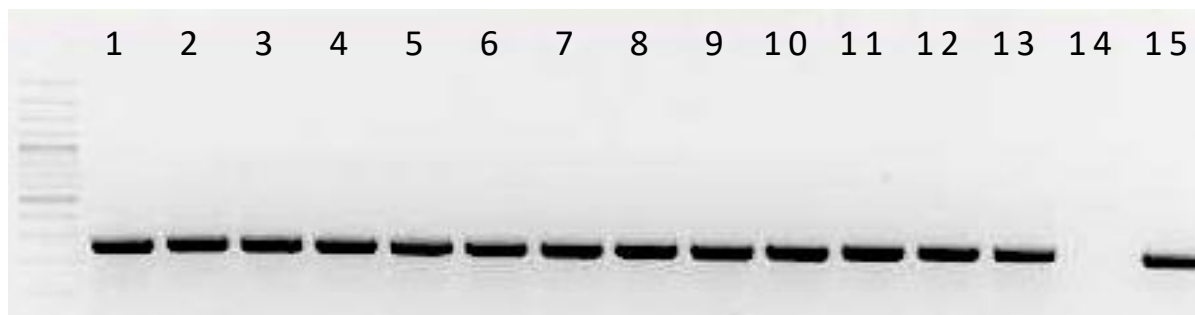
Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes DUPSW FiPS 501-R4F-2
y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

Anexo 6

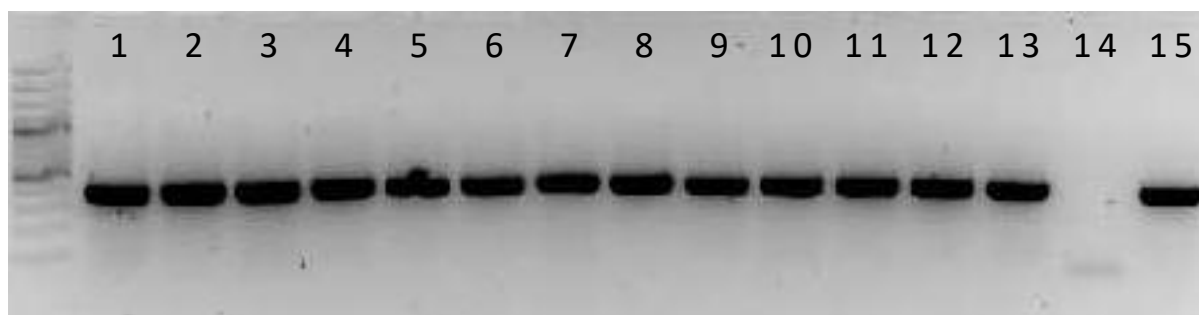
Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

M16091 Integration PCR 22/06/16

Oct4 – Sox2



Klf4 - cMyc

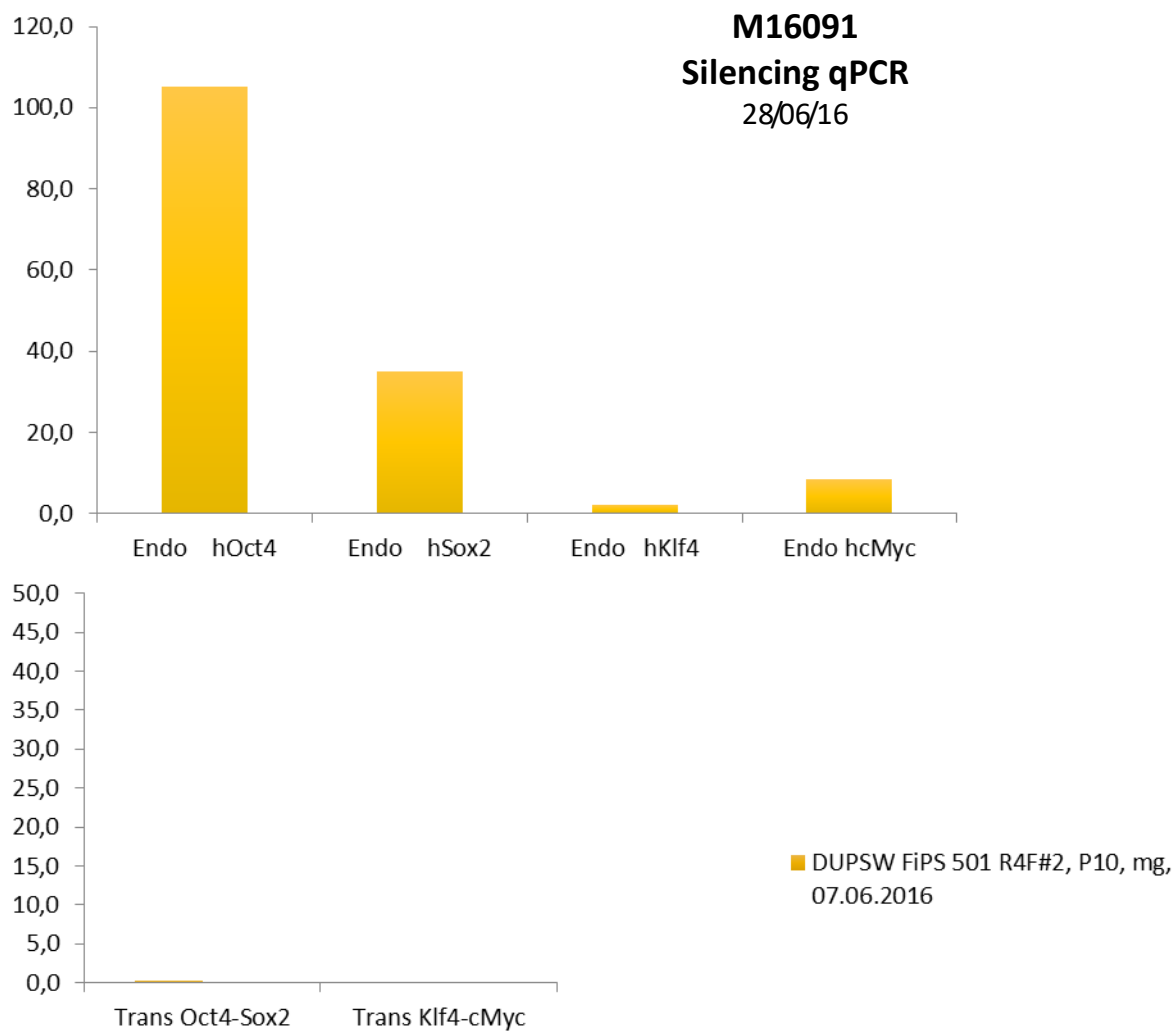


8. DUPSW FiPS 501 R4F#2, P10

14. Negative Control (H2O)

15. Positive Control

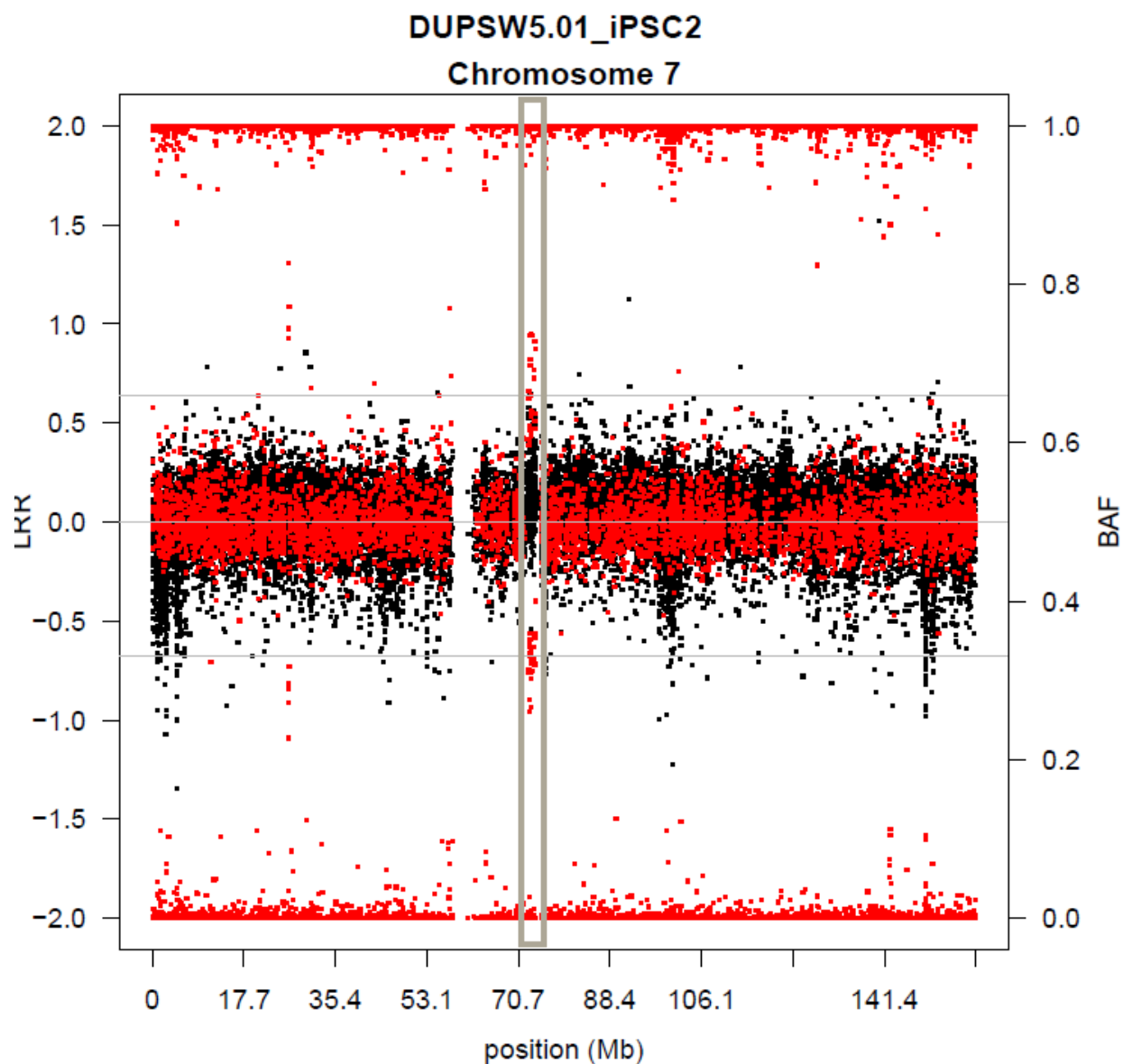
Análisis gPCR mostrando las integraciones genómicas de los genes utilizados para generar la línea



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

Anexo 7

Genotipado



SNP-array mostrando la presencia de la duplicación de la región 7q11.23 en la línea de hiPSC.

Anexo 8

Resultado test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST

09-11-2016

1 2 3



1. DUPSW FiPS 501 R4F-2 p14
2. CT -
3. CT +