

# 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:** 01/09/2018

### **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>	Ctrl2-FiPS5F2				
<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>	Fibroblastos del prepucio humano / The human foreskin fibroblasts ATCC CRL2429				
<b>Sexo y edad del donante.</b> <i>Sex and age of the donor</i>	Hombre Male	4 años Age 4			
<b>¿El donante tiene alguna patología?</b> <i>Has the donor any pathological condition?</i>	<b>NO</b> <input checked="" type="checkbox"/>	<b>SÍ</b> <input type="checkbox"/> (especificar) No Yes (specify)			
<b>¿La patología es de origen genético?</b> <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	<b>NO</b> <input checked="" type="checkbox"/>	<b>SÍ</b> <input type="checkbox"/> (especificar) No Yes (specify)			

<b>Muestra biológica recibida</b> <i>Biological sample</i>	<b>Fresco</b> <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i>	<b>Crioconservado</b> <input checked="" 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> 13/01/2016	
<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>	DMEM (Invitrogen 21969-035), 2mM Glutamax (Invitrogen #35050-038), 1x Penstrep, 20% FBS (Gibco #10270-106).	
<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 (ver Anexo) Yes (see Annex)	
<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>	Si pase 8 Yes passage 8	
<b>Método utilizado en la generación de la línea iPSc. (Integrativa/ No-integrativa)</b> <b>Especificar factores y plásmidos de reprogramación utilizados.</b> <i>Method used for the generation of iPSC line (Integrative / Non-integrative)</i> <i>Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	mRNA Reprogramming Kit (Stemgent): OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, c-MYC mRNAs.	
<b>Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia)</b> <i>iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Cultivo sobre fibroblastos humanos del prepucio. Medio de cultivo hESC: KO DMEM, KSR 20%, Glutamax 2mM, aminoacidos no esenciales 0.1mM, β-mercaptopropano 0.23mM, basic FGF 10ng/mL, and penicilina/streptomicina. Pase manual cada 6-8 días.  Culture on human foreskin feeders. Culture medium hESC: KO DMEM, KSR 20%, Glutamax 2mM, non essential aminoacids 0.1mM, β-mercaptopropano 0.23mM, basic FGF 10ng/mL and penicilina/streptomicina. Cells were mechanically passaged every 6-8 days.	
<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;</i>	Colonias poligonales 1-2mm en diámetro. Elevada relación núcleo/ citoplasma.  Polygonal colonies 1-2mm diameter large. High nucleus/cytoplasm ratio.	

<i>others)</i>	
<b>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación)</b> <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	Solution A: 50% hESC medium, 50% KSR; Solution B: 80% hESC medium, 20% DMSO (Sol A:Sol B =1:1)  Criopreservados en contenedor de isopropanol a -80°C y posteriormente en nitrógeno líquido. Descongelacion rápida a 37°C. Cryopreserved in isopropanol container at -80°C, over night, and stored in liquid nitrogen the next day. Rapid thawing at 37°C.
<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>	Pase 12 Passage 12
<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</b> <i>Pluripotency test</i>	<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n.</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>
	<b>Oct 4</b>	Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; RT-PCR (Annex)		
	<b>Nanog</b>	Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; (Annex)		
	<b>Sox 2</b>	Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; RT-PCR (Annex)		
	<b>SSEA3</b>			
	<b>SSEA4</b>	Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry; Flow cytometry(Annex)		
	<b>TRA-1-60</b>	Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry (Annex 2)		
	<b>TRA-1-81</b>	Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry (Annex)		
	<b>Fosfatasa. Alk Si/ Yes</b>			
<b>Test de diferenciación in vitro</b> <i>In vitro differentiation test</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>Comentarios</b> <i>Comments</i>				
	<b>Ectodermo</b>	Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry TUJ-1 (Annex) <i>Ectoderm</i>		
	<b>Mesodermo</b>	Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry SMA (Annex) <i>Mesoderm</i>		
	<b>Endoderm</b>	Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry AFP (Annex) <i>Endoderm</i>		
<b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida)</b>  <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	Ensayo de EBs. Las colonias iPSC se levantaron manualmente y cultivaron en condiciones no adherentes en medio hESC desprovisto de bFGF, durante 7 días. Posteriormente, los EBs fueron sembrados sobre cubreobjetos tratados con 0.1% de gelatina durante 2h a temperatura ambiente y cultivados dos semanas en el mismo medio (ver Anexo).			
	EB assay: the iPSC colonies were lifted manually and cultured in non-adherent conditions in hESC medium without bFGF the following 6 days. Thereafter, the EBs were seeded on glass coverslips treated with 0,1% gelatin for 2 h/RT and cultured during 2 weeks in the same cell culture medium (see Annex).			

<b>Test de diferenciación in vivo</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>(Annex) Ectoderm</i>	Teratoma análisis histológico/Histological analysis of teratoma				
	<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	Teratoma análisis histológico/Histologic analysis of teratoma(Annex)				
	<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>	Teratoma análisis histológico/Histologic analysis of teratoma(Annex)				
<b>Descripción de las características de diferenciación <u>in vivo</u></b> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>	Células iPSC resuspendidas en medio de cultivo se inyectan subcutáneamente en la espalda de ratón SCID. Tras 8 semanas se forman teratomas de 1 cm de diámetro, se analizan los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina.  iPS cells resuspended in culture medium are injected subcutaneously in SCID mice. After 8 weeks teratomas are formed of 1cm of diameter, excised, fixed and stained by hematoxilin/eosin.					
<b>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase)</b> <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	Cariotipo normal masculino (ver Anexo) p.10 Normal male karyotype (see Annex) p.10					
<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 (ver Anexo) Yes (see Annex)  Microsatélites analizados/Microsatellite markers analysed: TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818 y D21S11, Amelogenin					
<b>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b> <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	Metodo no integrativo Non-integrative method					

<b>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b> <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	
<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>	
<b>Test de micoplasma</b> <i>Mycoplasma Test</i>	Negativo Negative

### SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3      Applicant Details

<b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i> Dr.Slaven Erceg Vukicevic	<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal address:</i> c/Eduardo Primo Yúfera 3, Valencia 46012
<b>Centro de Trabajo:</b> <i>Institution:</i> FCV Centro de Investigación Príncipe Felipe	<b>Teléfono (phone):</b> +963289680 <b>Fax:</b> <b>E-mail:</b> serceg@cipf.es

**SECCIÓN 4**  
*Section 4***INFORMACIÓN ADICIONAL (OPCIONAL)**  
*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):

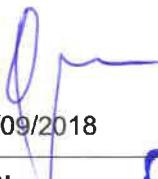
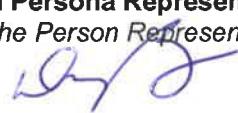
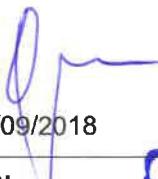
**Otras observaciones o información relevantes** (a llenar por el BNLC):  
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

**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>	<b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i>
Fecha/ Date: 01/09/2018	Dr.Slaven Erceg Vukicevic  01/09/2018
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Dña. Deborah Burks Directora 	Fecha /Date 06/09/2018  PRINCIPE FELIPE CENTRO DE INVESTIGACION www.cif.es +34 963289680
<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i> FCV Centro de Investigación Príncipe Felipe C/ D' Eduardo Primo Yúfera, 3 46012 Valencia	<b>Teléfono /Telephone:</b> ++34 963289680 <b>Fax:</b> <b>E-mail:</b>