

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR **THD FiPS B1-Ep6F-15** 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

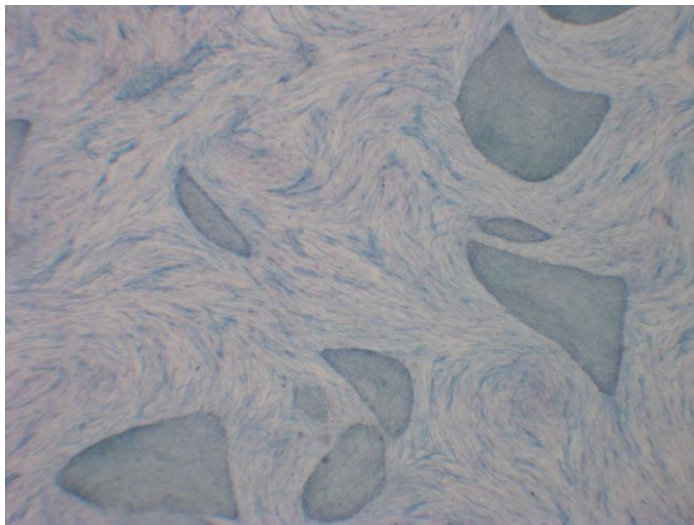
Anexo 5: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Anexo 6: Genotipado

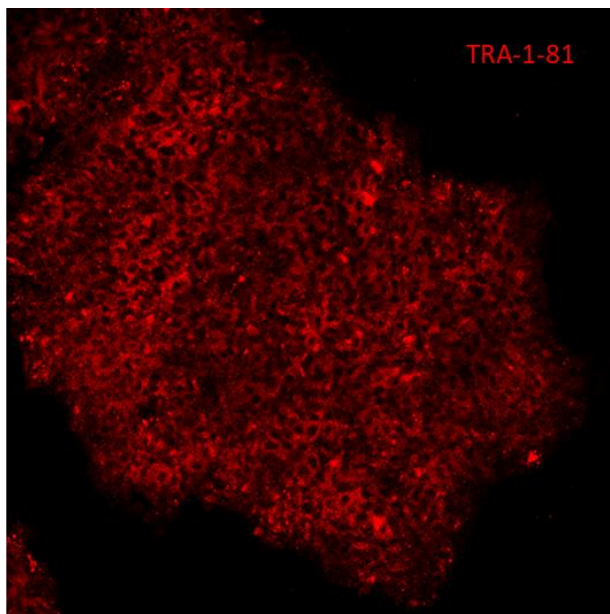
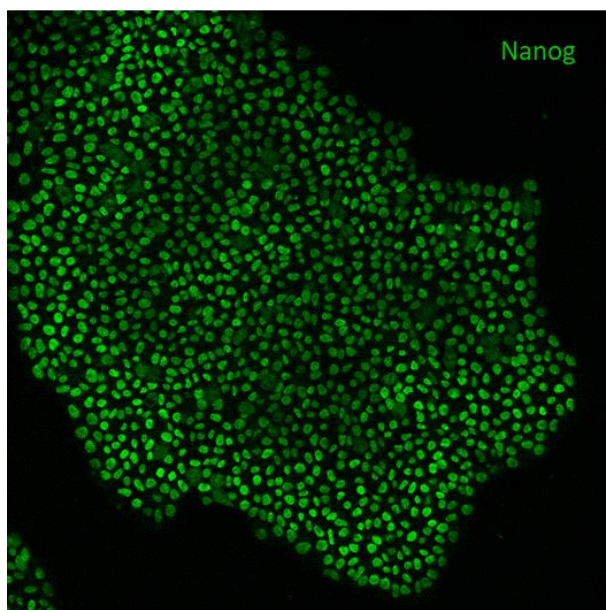
Anexo 7: Resultado Test de micoplasma

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

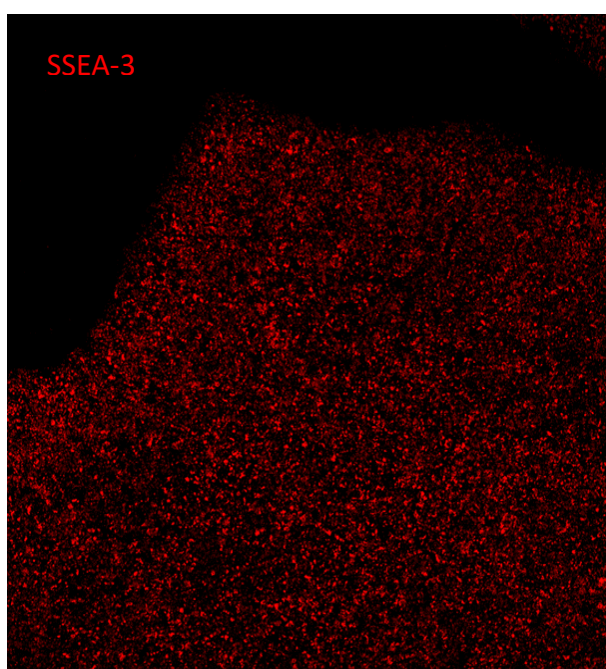
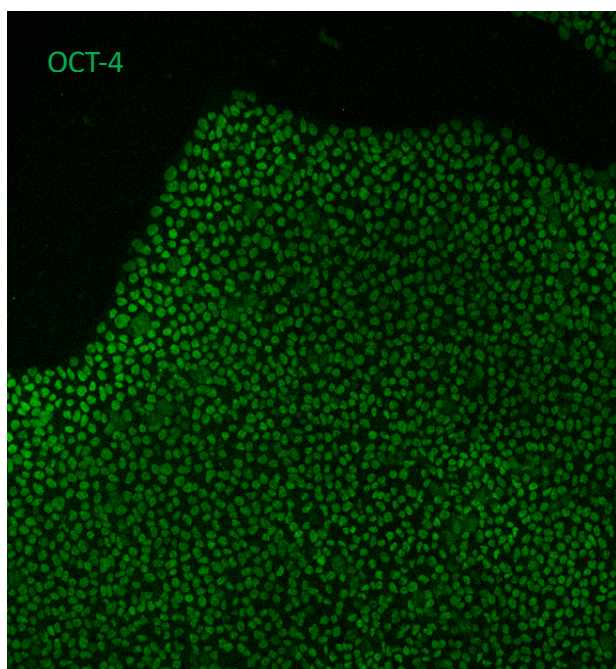


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



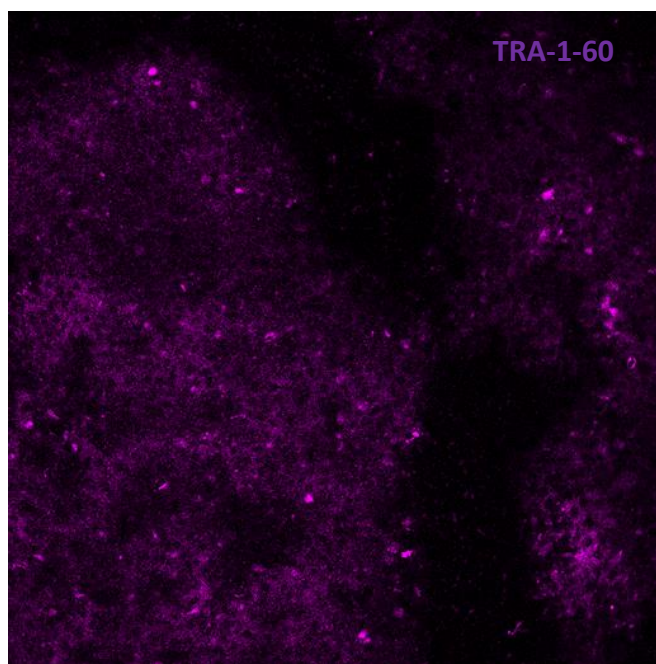
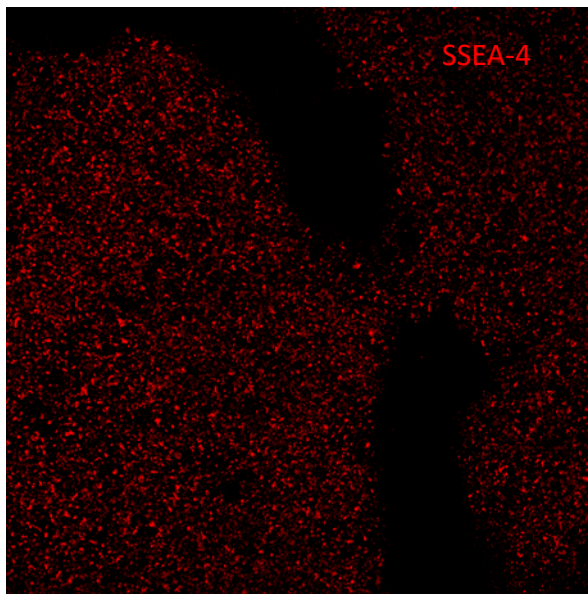
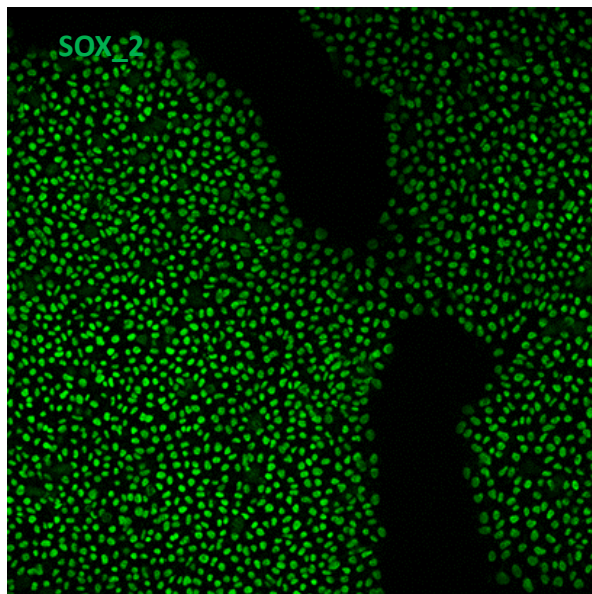
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3

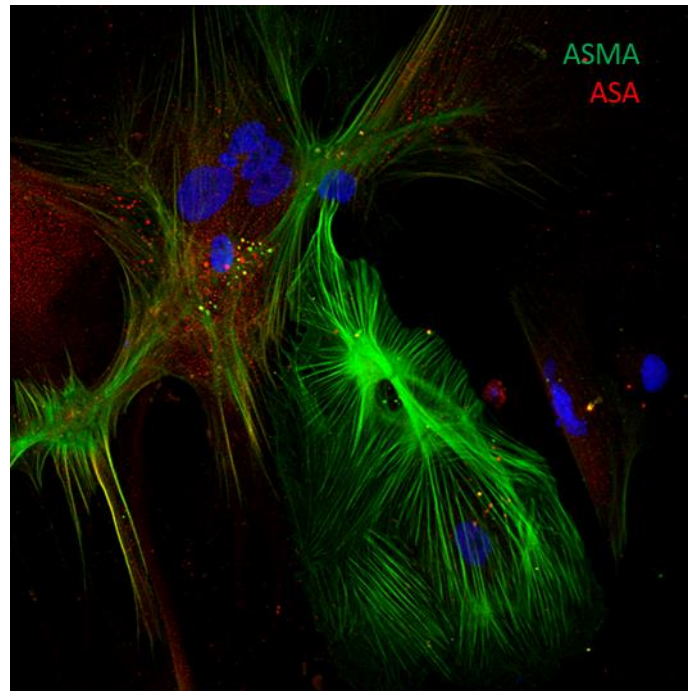


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

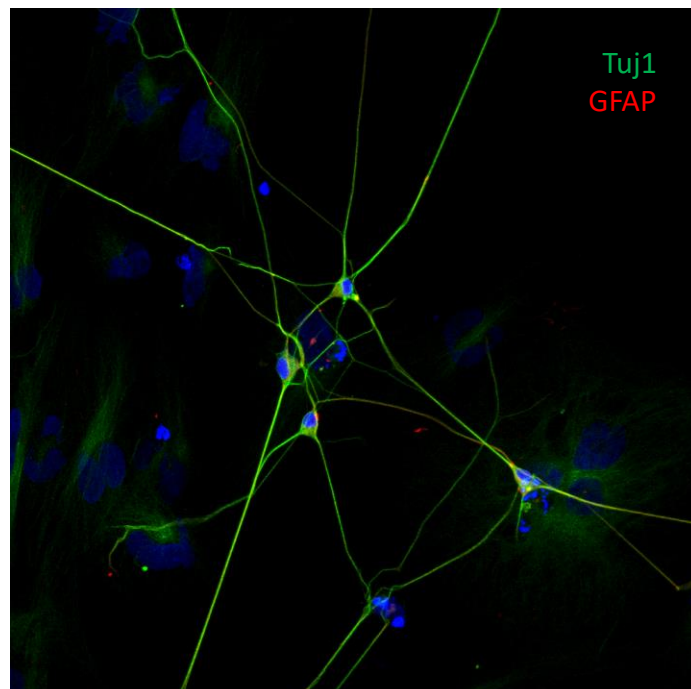
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

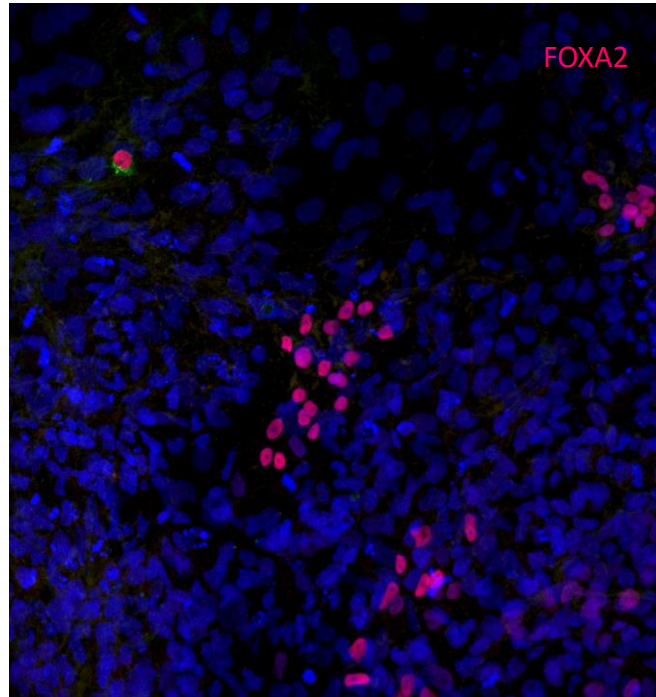
Diferenciación *in vitro*



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



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



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

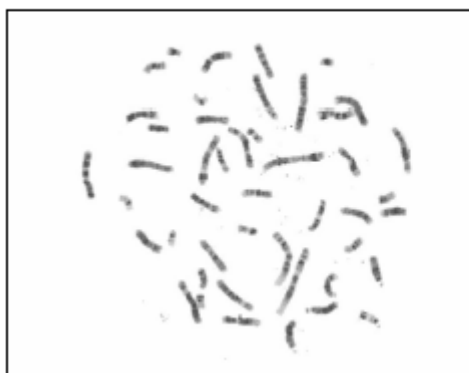
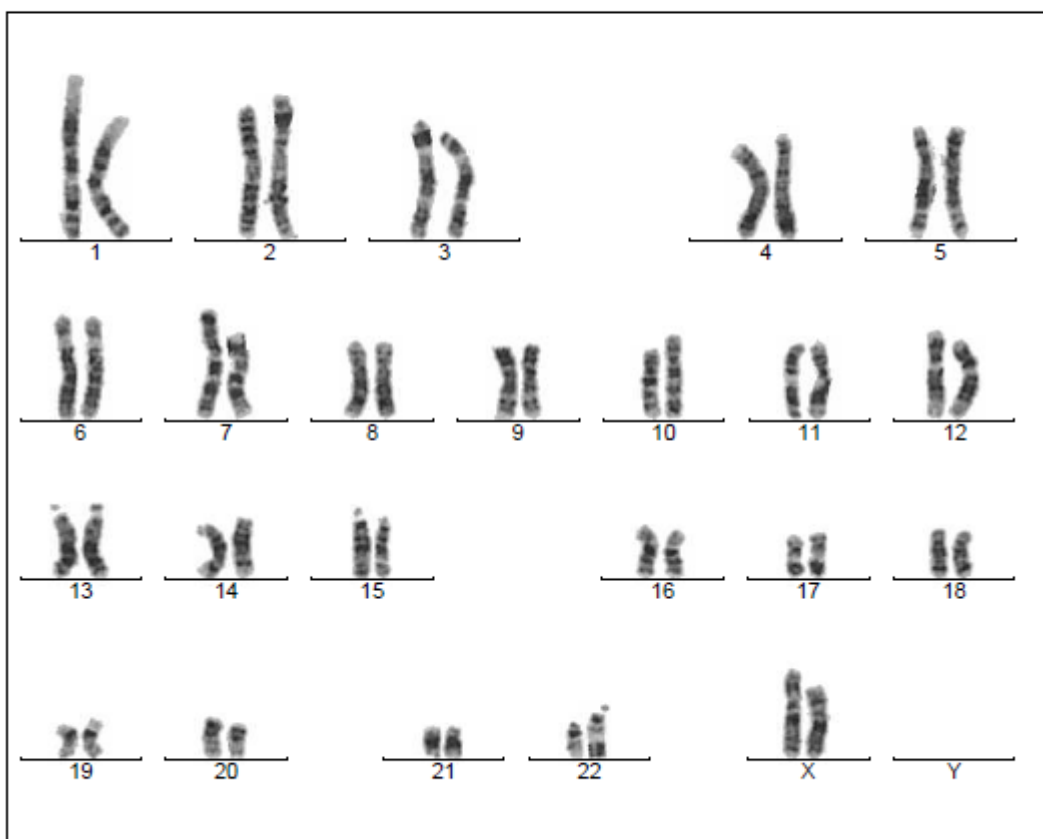


Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 3

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Case name: A179624

Patient name: THD FiPS B1-Ep6F-15 p17

Specimen type: stem cells

Result: 46,XX

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
32161305002	THD FiPSB1 Ep6F-15 p13

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
THD FiPSB1 Ep6F-15 p13	X	11	11, 13	11	29, 30	11	10, 13	7	8, 11	16, 17

Granada, a 14 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
32161229002	THD B1 F p6

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
THD B1 F p6	X	11	11, 13	11	29, 30	11	10, 13	7	8, 11	16, 17

Granada, a 24 de Octubre de 2016



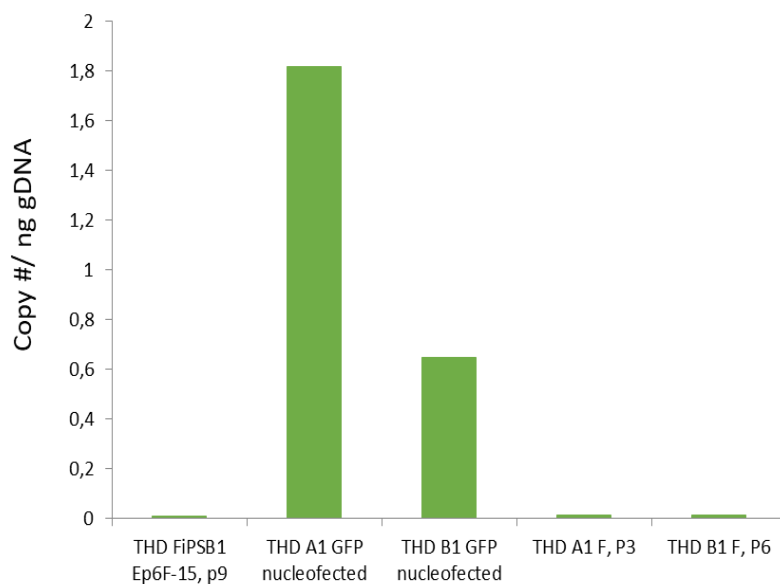
Área de Biología Molecular
Biobanco del ISPA

Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

Anexo 5

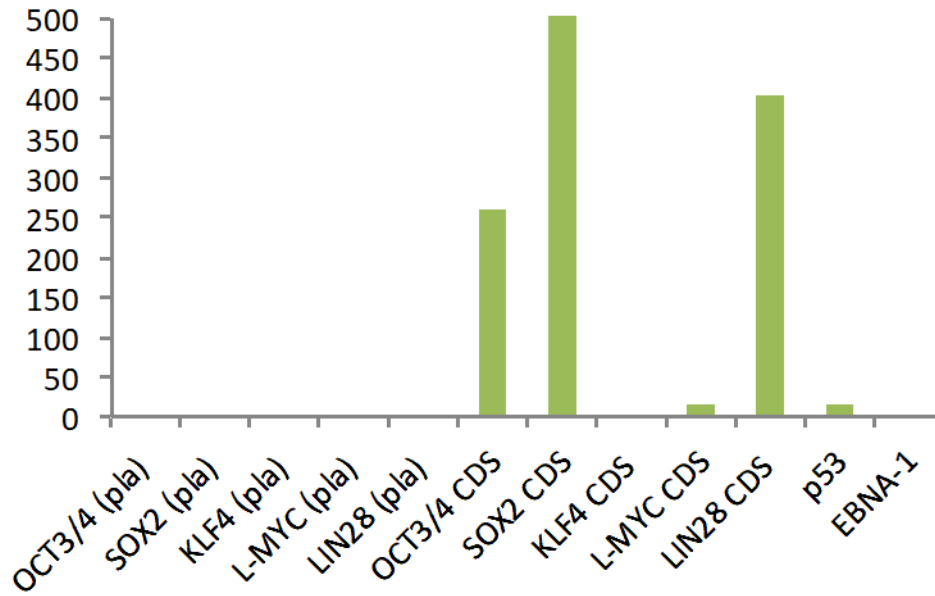
Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

PCR Absence of episomal vector



Análisis PCR donde se muestra la ausencia de plásmidos episomales en la línea **THD FiPS B1 Ep6F-15**, en fibroblastos control GFP-nucleofectados 72h después de la nucleofección (**THD A1 GFP y THD B1 GFP**) y en fibroblastos control no-nucleofectados (**THD A1 F y THD B1 F**).

THD FiPSB1 Ep6F-15, p9



Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de expresión de mRNA de transgenes (pla) y marcadores de pluripotencia endógenos (CDS) en la línea **THD FiPS B1 Ep6F-15**



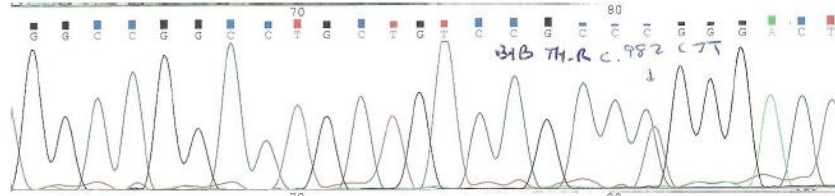
Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 6

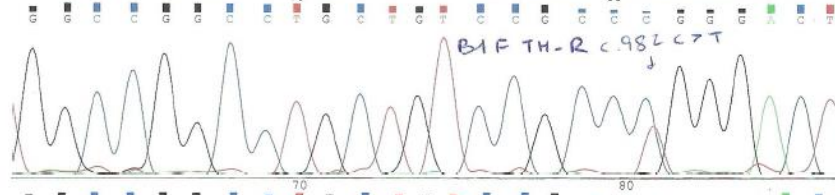
Genotipado

c.982C>T

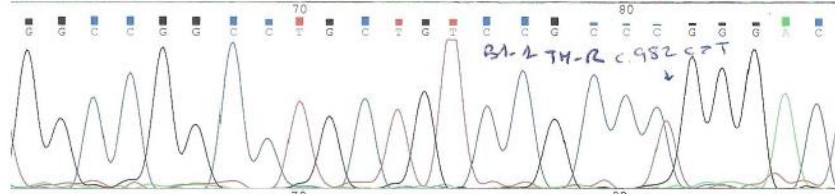
Blood



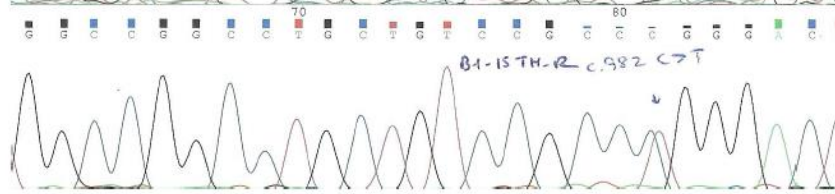
Fibroblasts



Clon 1



Clon 15



alignment position	111.....	121.....	131.....	141.....	151.....	161.....	171.....	181.....	191.....	201.....	211.....	
SeqReFc_982C_T	111	CCTGTGGCCG	GCTGCTGTC	CGCCGGGAC	TTCTGGCCA	GCTGGCCTT	CCGCGTGTTC	CAGTGCACCC	AGTATATCCG	CCACGCGTCC	TGCCCCATGC	ACTCCcTGA
A13 Blood	57	CCTGTGGCCG	GCTGCTGTC	CGCCGGGAC	TTCTGGCCA	GCTGGCCTT	CCGCGTGTTC	CAGTGCACCC	AGTATATCCG	CCACGCGTCC	TGCCCCATGC	ACTCC--TGA
A14 Fibroblasts	57	CCTGTGGCCG	GCTGCTGTC	CGCCGGGAC	TTCTGGCCA	GCTGGCCTT	CCGCGTGTTC	CAGTGCACCC	AGTATATCCG	CCACGCGTCC	TGCCCCATGC	ACTCC--TGA
A15 Clon 1	57	CCTGTGGCCG	GCTGCTGTC	CGCCGGGAC	TTCTGGCCA	GCTGGCCTT	CCGCGTGTTC	CAGTGCACCC	AGTATATCCG	CCACGCGTCC	TGCCCCATGC	ACTCC--TTA
A16 Clon 15	57	CCTGTGGCCG	GCTGCTGTC	CGCCGGGAC	TTCTGGCCA	GCTGGCCTT	CCGCGTGTTC	CAGTGCACCC	AGTATATCCG	CCACGCGTCC	TGCCCCATGC	ACTCC--TGA

Anexo 7
Resultado Test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST



1. THD FiPS B1-Ep6F-15 p12
2. Negative Control (water)
3. Positive Control