

# **ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR SWB FiPS 344-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

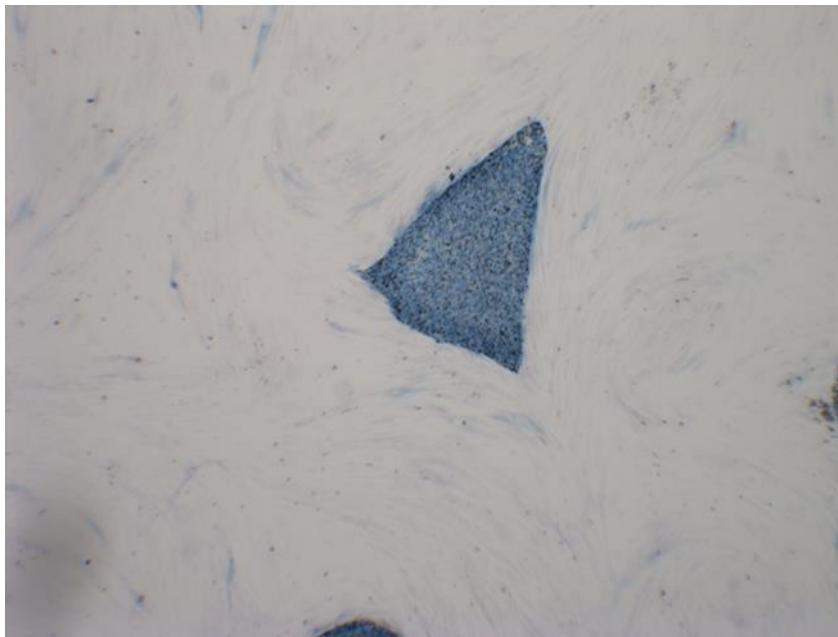
Anexo 6: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Anexo 7: Genotipado

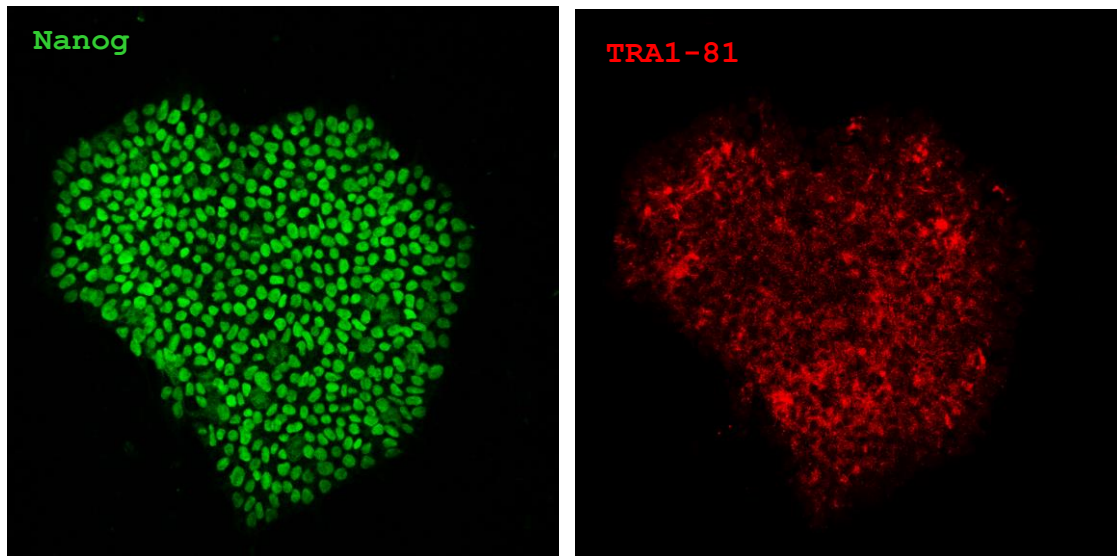
Anexo 8: Resultado Test de micoplasma

# **Anexo 1**

## **Fenotipo. Marcadores de pluripotencia**

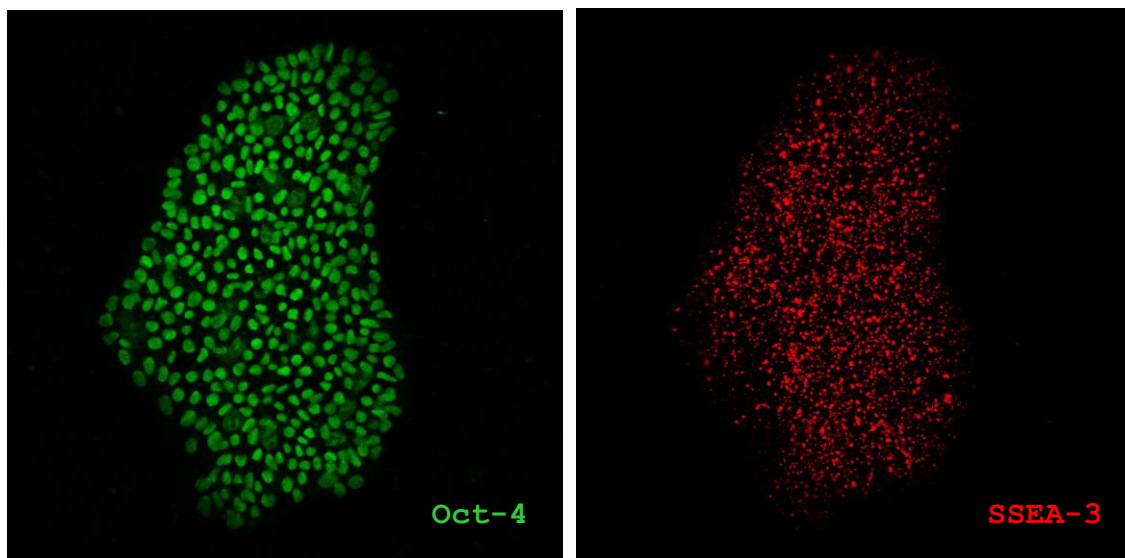


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



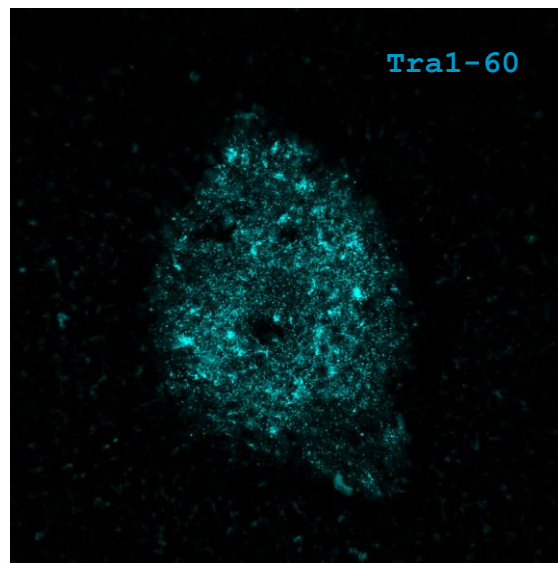
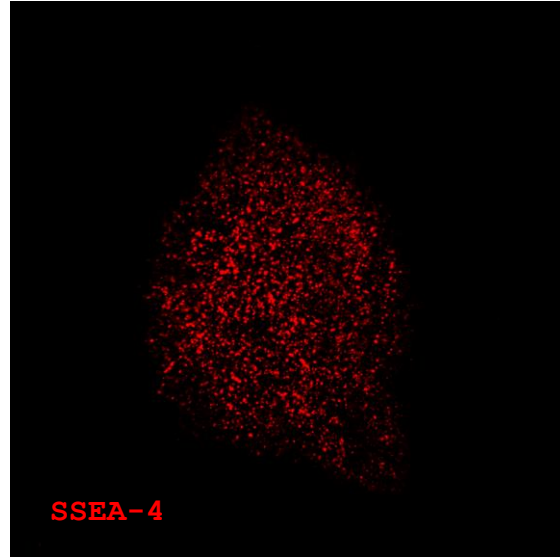
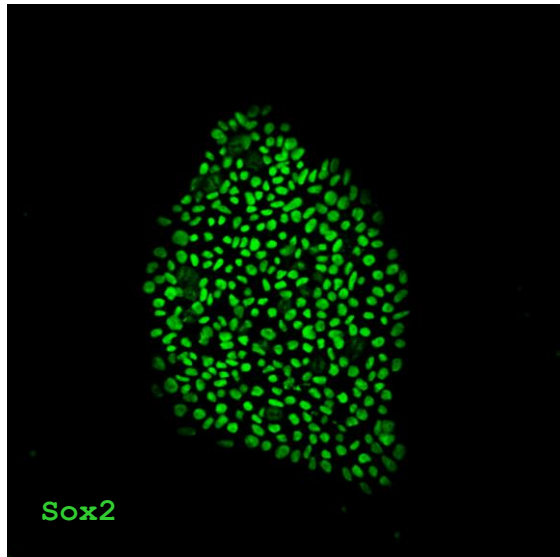
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

**Nanog y TRA1-81**



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

**Oct-4 y SSEA-3**

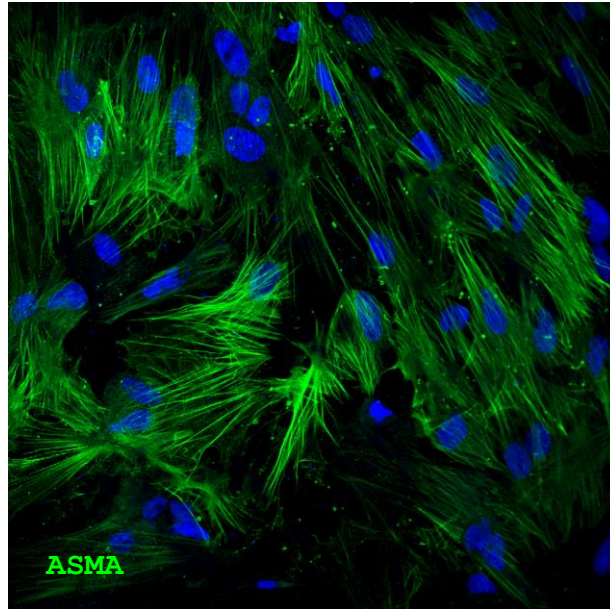


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

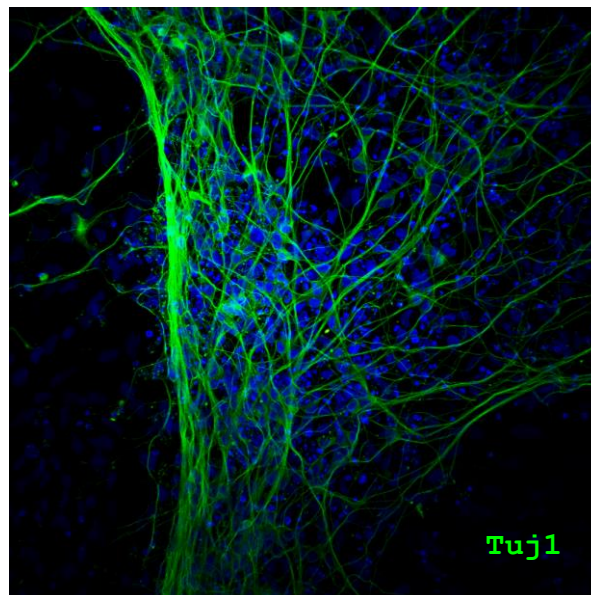
**Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60**

## **Anexo 2**

### **Diferenciación *in vitro***

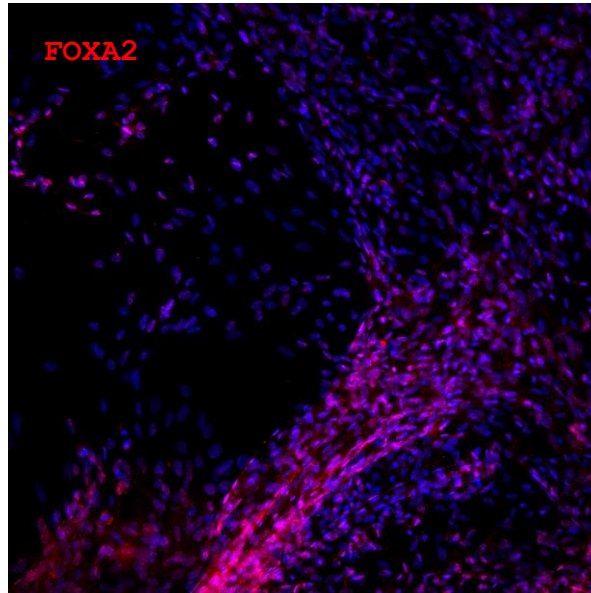


Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para **ASMA**



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

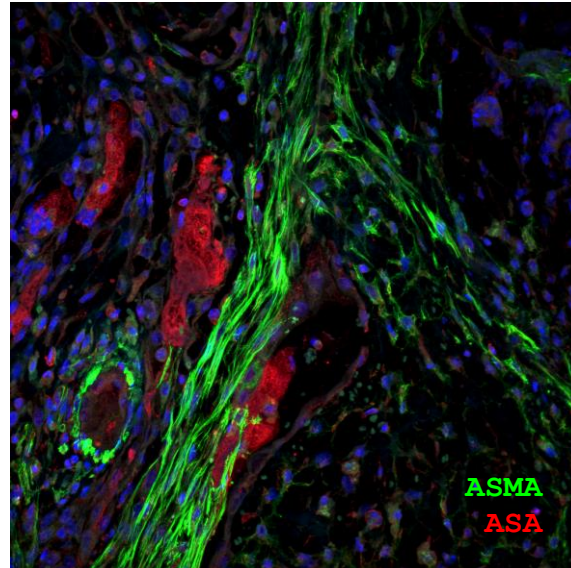




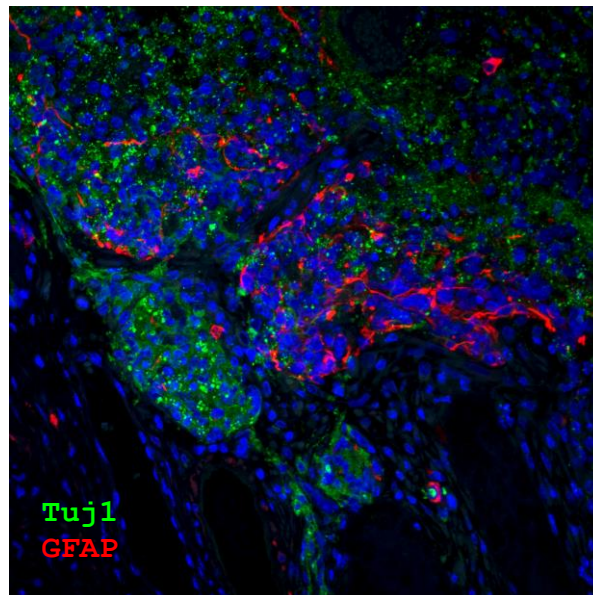
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **FOXA2**

## **Anexo 3**

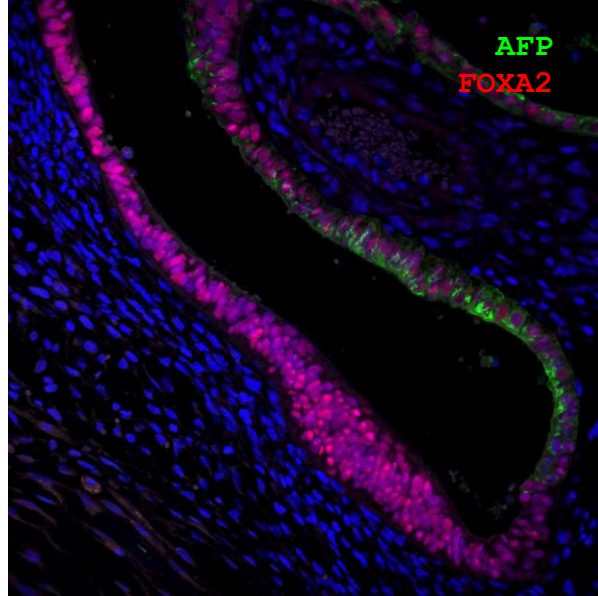
### **Diferenciación *in vivo***



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



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

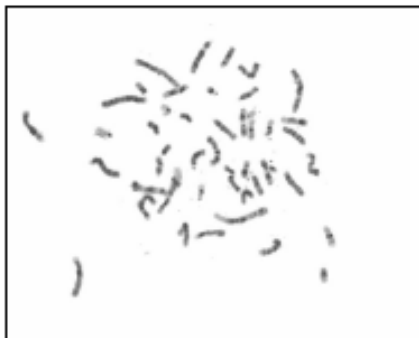
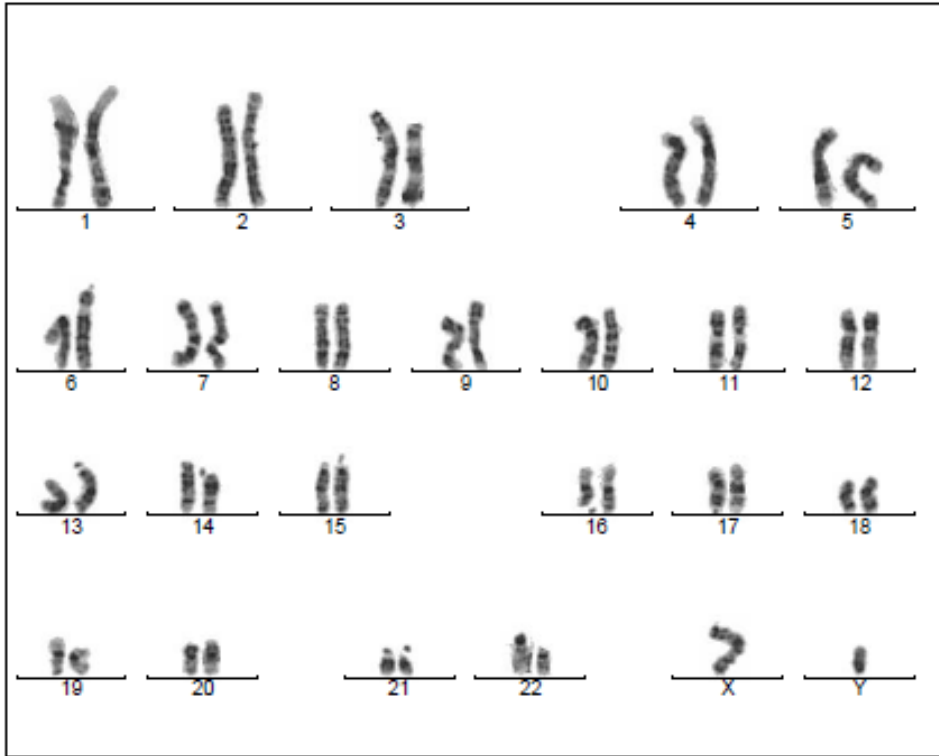


Diferenciación in vivo a endodermo: Células positivas para **AFP** y **FOXA2**

## **Anexo 4**

### **Cariotipo**

## Cytogenetic analysis



Case name: A180412

Patient name: SWB FiPS 344-R4F-2 p15

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 <sup>1,2</sup> (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 <sup>3</sup>
D16S539	JOE	299–304	3, 8–15
CSF1PO	JOE	321–367	6–15
Amelgen <sup>®</sup>	TMR	106, 112	X, Y
vWA	TMR	123–171	10–25
TPOX	TMR	262–290	6–13

<sup>1</sup>The length of each allele in the allelic ladder has been confirmed by sequence analysis.

<sup>2</sup>When 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.

<sup>3</sup>HeLa cells have a microvariant allele 13.3 at the D13S317 locus. This will appear as an off-ladder allele (see [www.ncbi.nlm.nih.gov/strbase/var\\_D13S317.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/strbase/var_D13S317.html)).

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
32161596002	SWB FiPS344 R4F-2, P10

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 FiPS344 R4F-2, P10	X, Y	10	9, 12	11, 12	30, 32	11, 12	11, 12	8, 10	8, 11	15, 17

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
32161592002	SWB 344.01 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
SWB 344.01 F	X, Y	10	9, 12	11, 12	30, 32	11, 12	11, 12	8, 10	8, 11	15, 17

Granada, a 28 de Diciembre de 2016



Área de Biología Molecular  
Biobanco del CSRM

Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes SWB FiPS 344-R4F-2  
y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

## **Anexo 6**

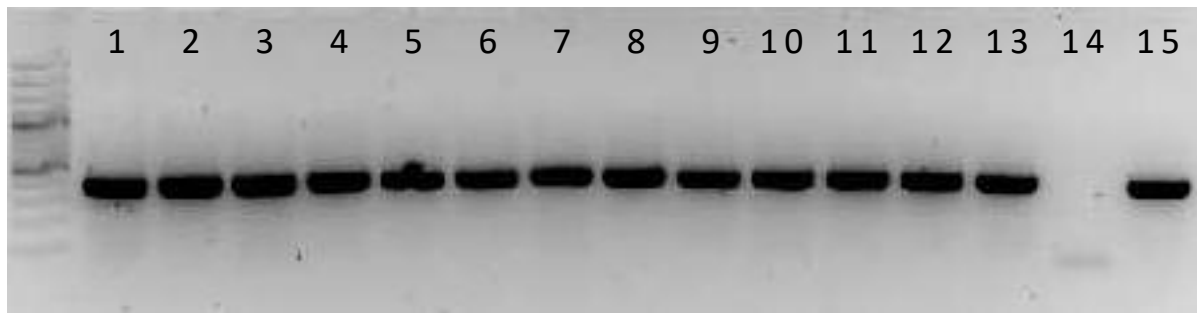
# **Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación**

## M16091 Integration PCR 22/06/16

Oct4 – Sox2



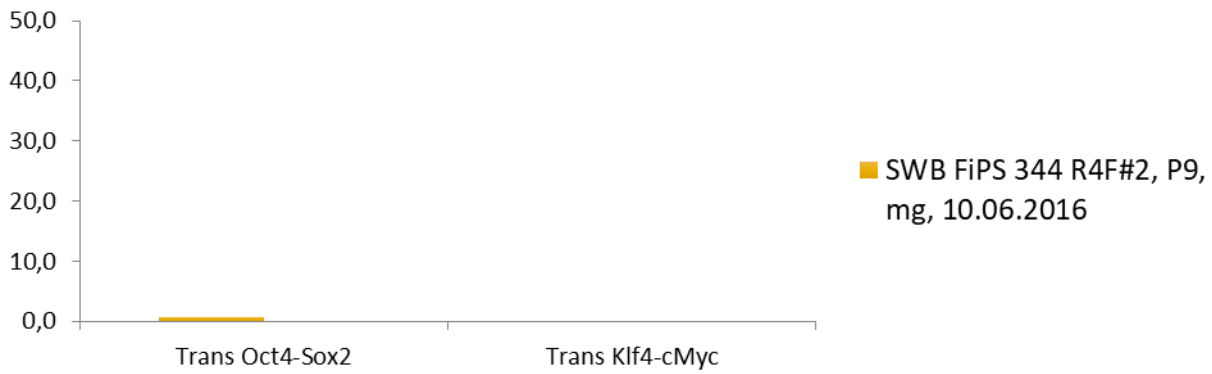
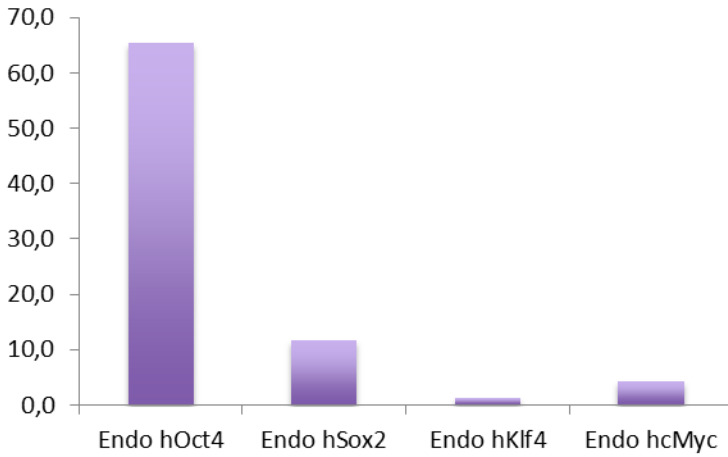
Klf4 - cMyc



- 4. SWB FiPS 344 R4F#2, P9
- 14. Negative Control (H2O)
- 15. Positive Control

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

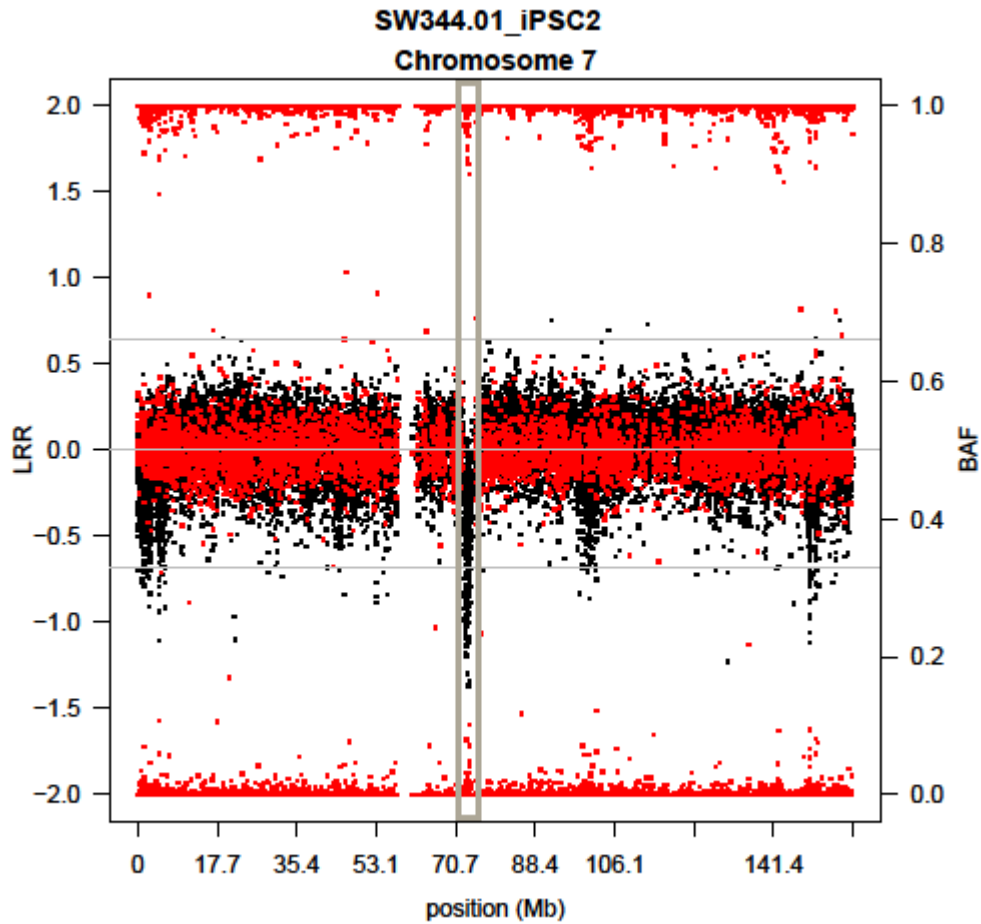
## M16091 Silencing qPCR 28/06/16



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**



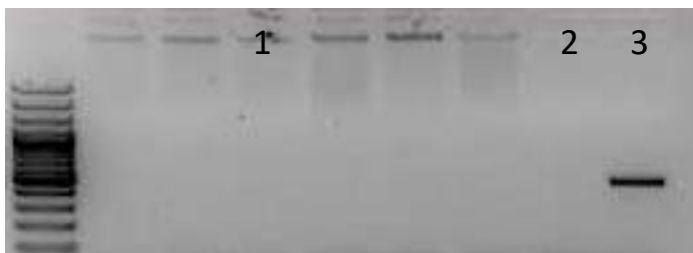
SNP-array mostrando la presencia de la delección de la región 7q11.23 en la línea de hiPSC.

## **Anexo 8**

### **Resultado Test de micoplasma**

## MYCOPLASMA TEST

14/12/2016



1. SWB FiPS344 R4F-2, p14
2. Negative control (water)
3. Positive control