

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO
DE LA LÍNEA CELULAR [**CORD**]-**FiPSC1-**
Ep5F-2 EN EL BANCO NACIONAL DE
LÍNEAS CELULARES

Anexos:

- Anexo 1: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de las células de origen y su correspondiente línea iPSC
- Anexo 2: Test de fosfatasa alcalina y marcadores de Pluripotencia
- Anexo 3: Test de diferenciación *in vitro*
- Anexo 4: Cariotipo
- Anexo 5: Test de integración y silenciamiento
- Anexo 6: Secuenciación Sanger de la mutación
- Anexo 7: Test de *Mycoplasma*

Anexo 1:

La línea original de fibroblastos FbDCB1 coincide en los microsatélites analizados (CSF1PO, D13S317, D16S539, D21S11, D5S818, D7S820, TH01, TPOX y vWA, y Amelogenin) con la línea iPSC a depositar

Análisis de microsatélites de la línea de fibroblastos FbDCB1:

P-CMR[C]

RESULTADOS:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

Línea celular	Loci STRs analizados									
	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	AMEL	vWA	TPOX
FbDCB1	9	28; 30	11	12; 13	8; 9	12	11	X	17; 18	8; 10

Barcelona, a 23 de mayo de 2023

Laboratorio Biología Molecular

P-CMRC

Análisis de microsatélites de la línea iPSC a depositar:



ESTUDI DE MICROSATÈL-LITS (STRs)

Mostra: **Identificació** **ID Ambar** **Tipus de mostra**
DCB FPSC1 EP5F-2 P8 1221740 Extracte DNA

Descripció de l'estudi

L'estudi de consisteix en l'anàlisi de microsatèl·lits o "short tandem repeats" (STR) de DNA procedent de determinades línies cel·lulars. El procediment seguit ha estat el següent:

. PCR - Amplificació de 15 regions de DNA (STR- short tandem repeats) amb els Kit de Genotipat AmpFLSTR® Identifier® Plus PCR Amplification Kit. La combinació d'aquestes 15 regions constitueix el perfil genètic (impressió digital genètica)

. Electroforesi capil·lar - Lectura del perfil genètic de la mostra.

. Software d'anàlisi - Assignació del perfil genètic.

Resultats

Marcadors Genètics	Localització cromosòmica	Al·lels mostra 1221740	
D8S1179	8	11	16
D21S11	21q11.2-q21	28	30
D7S820	7q11.21-22	8	9
CSF1PO	5q33.3-34	11	11
D3S1358	3p	16	18
TH01	11p15.5	9	9
D13S317	13q22-31	12	13
D16S539	16q24-qter	12	12
D2S1338	2q35-37.1	18	23
D19S433	19q12-13.1	12	13
VWA	12p12-pter	17	18
TPOX	2p23-2per	8	10
D18S51	18q21.3	13	18
D5S818	5q21-31	11	11
FGA	4q28	20	23
AMELOGENINA*	X: p22.1-22.3- Y: p11.2	X	X

*Amelogenina: Resultat al·lel relatiu al sexe cromosòmic: XX (sexe femení); XY (sexe masculí)

L'Hospitalet del Llobregat, 04/07/2023

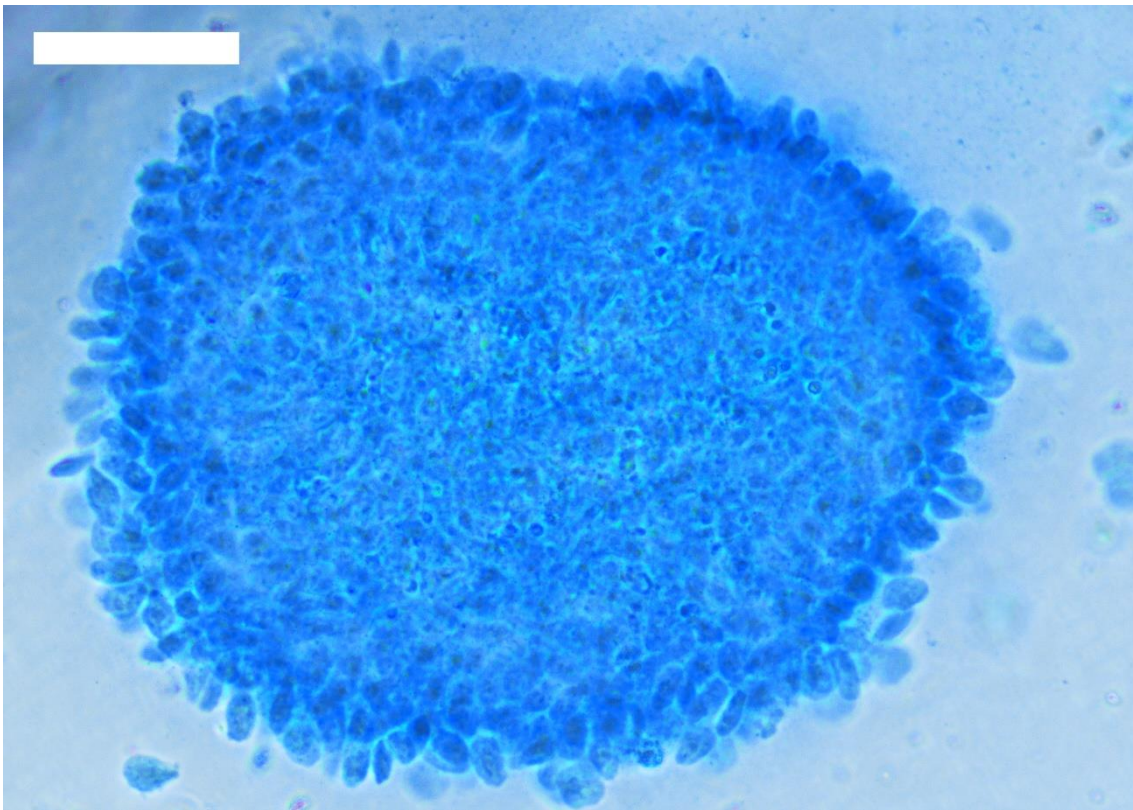


Dr. J.V.Martinez Mas
Director de Laboratorio

Anexo 2:

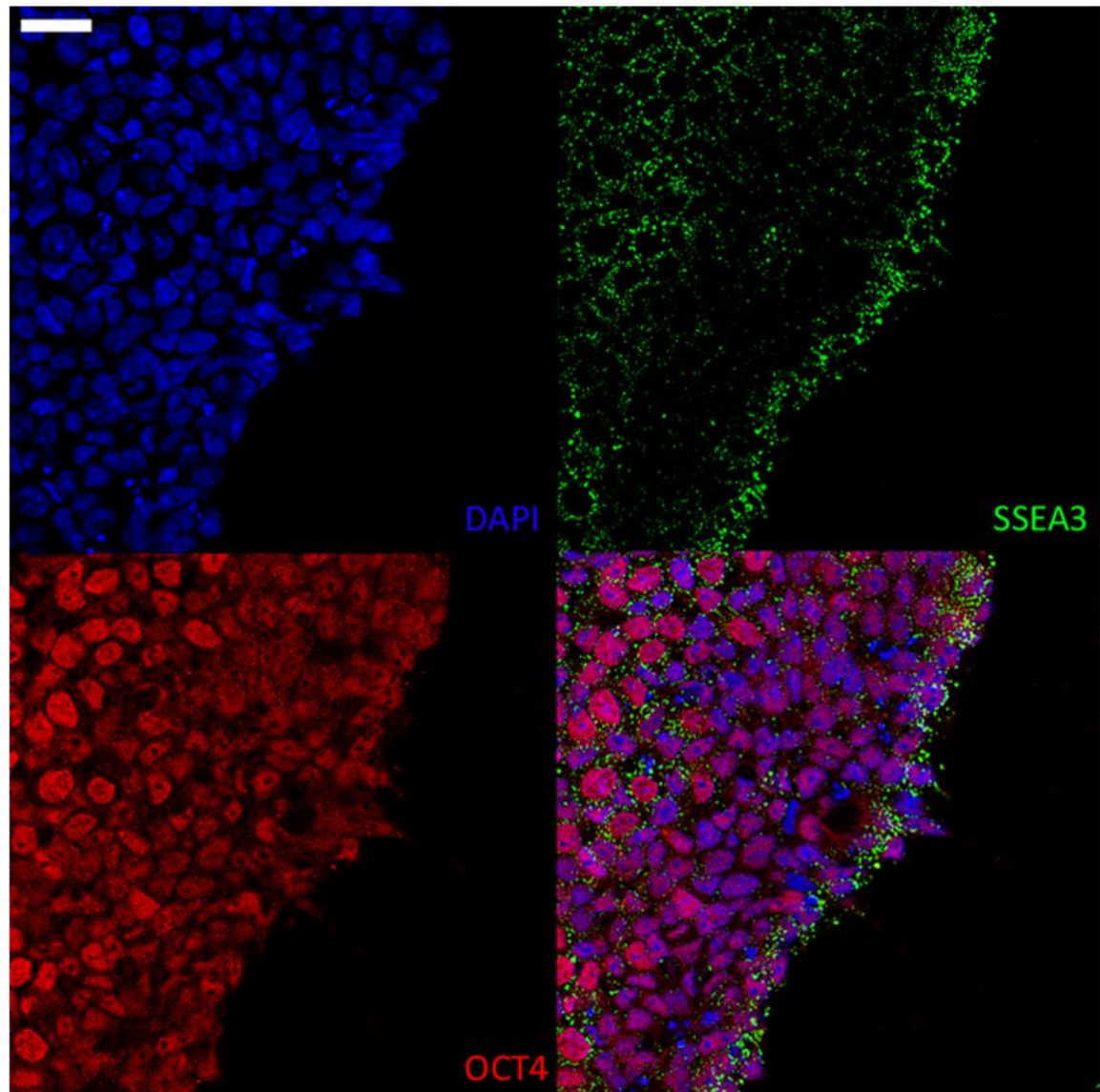
Test de Fosfatasa alcalina

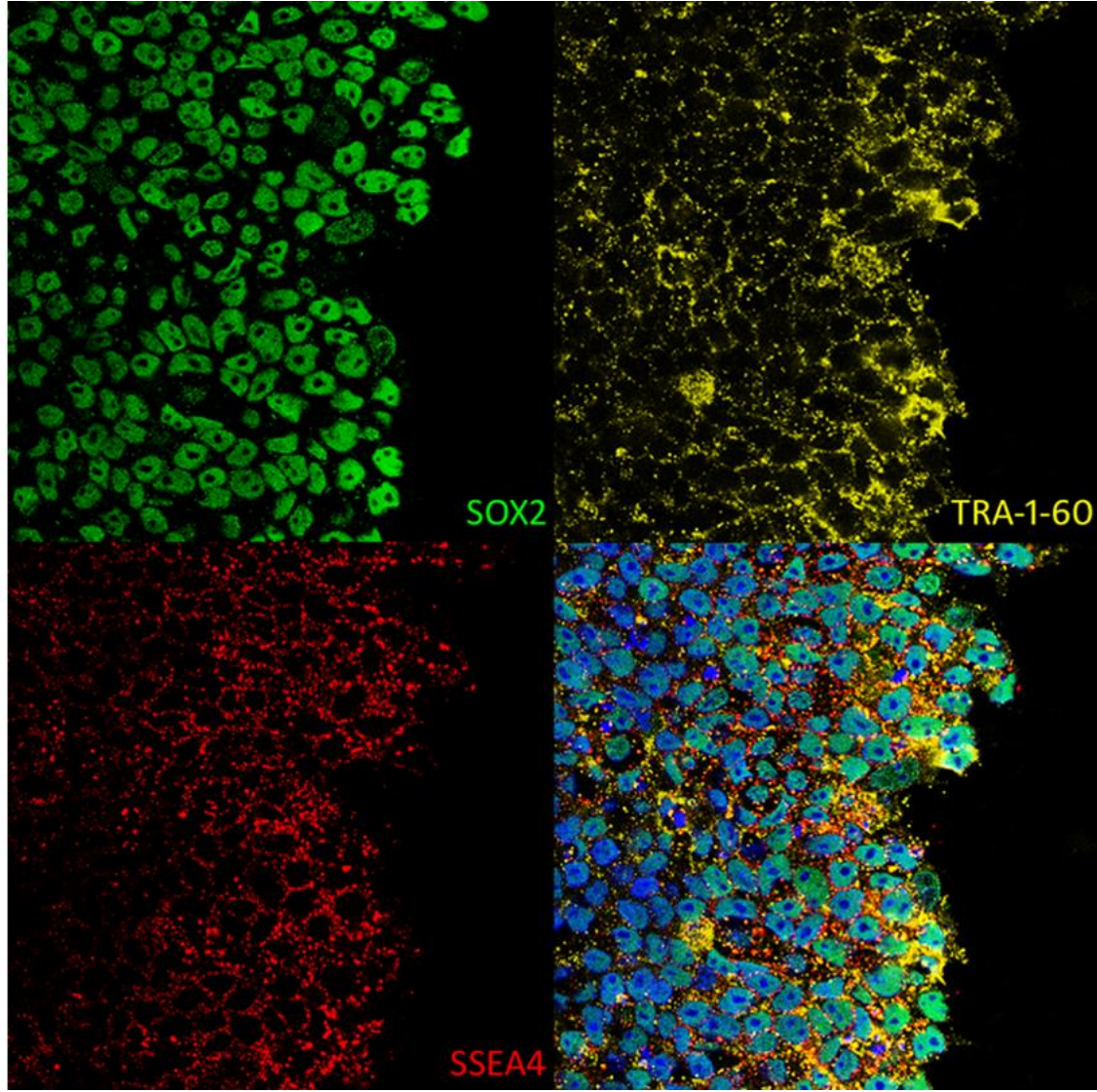
Test de fosfatasa alcalina positivo demostrando alta actividad de fosfatasa alcalina, característico de las células iPSC. Escala de 50 μm .

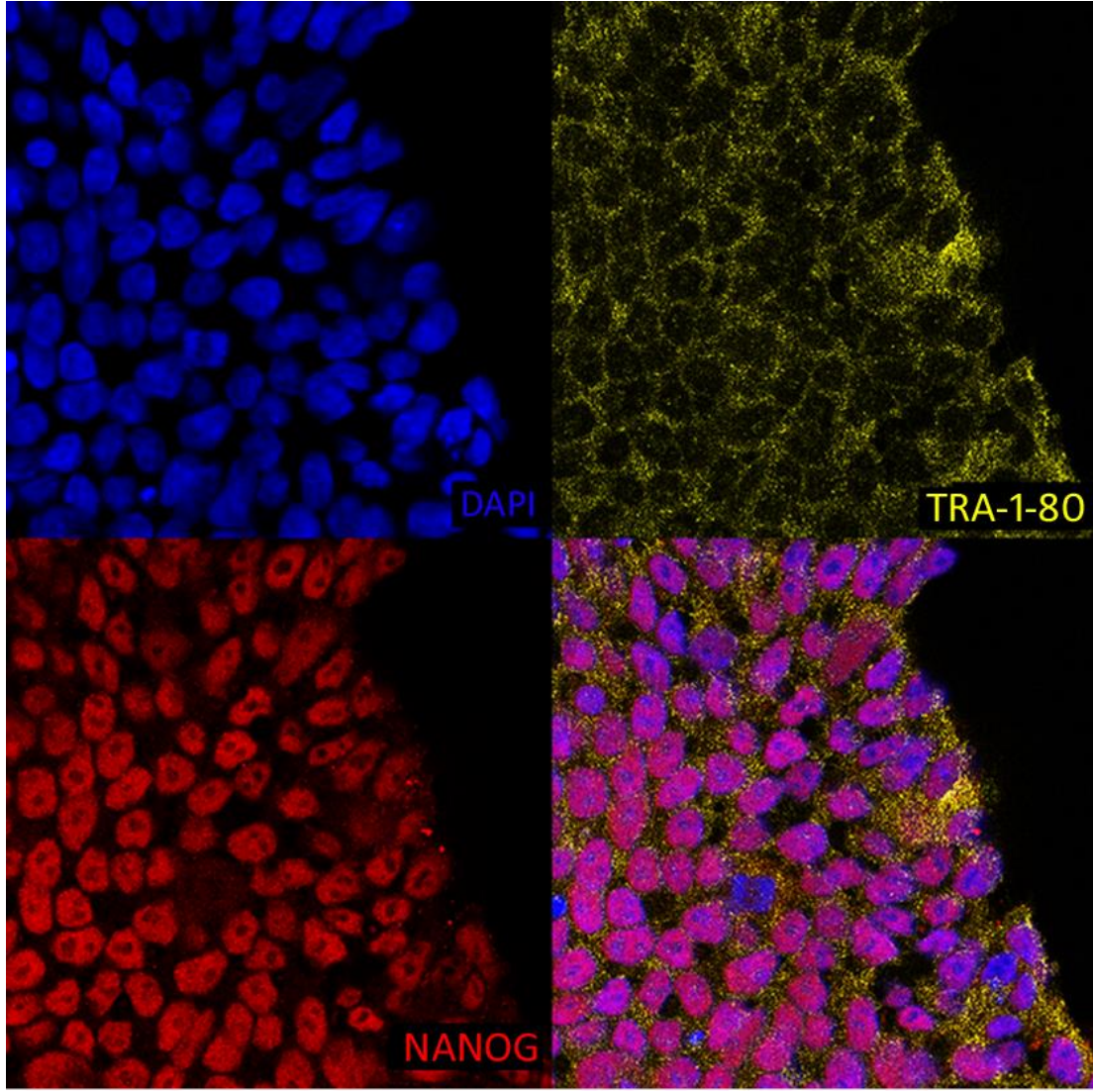


Marcadores de pluripotencia:

Inmunoreactividad positiva a los marcadores de pluripotencia OCT4, SSEA3, SOX2, SSEA4, TRA1-60, NANOG, y TRA-1-81. Escala de 25 μ m.



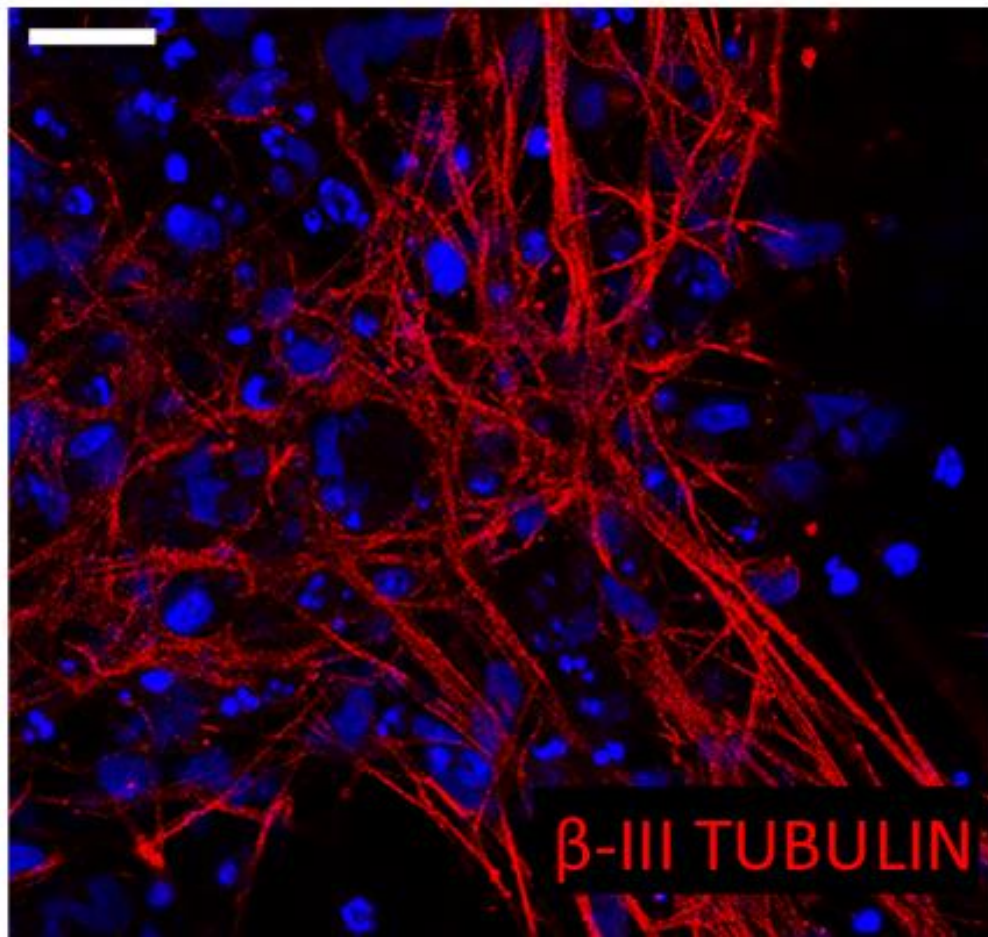




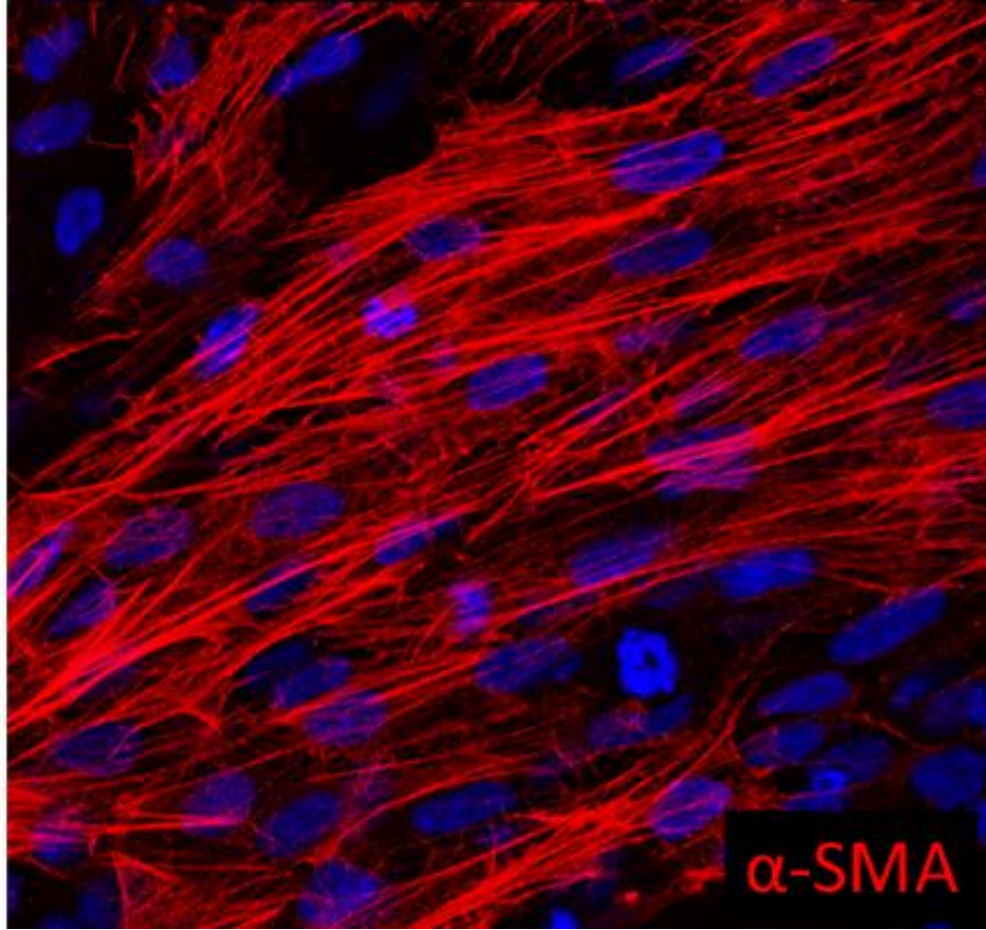
Anexo 3:

Inmunoreactividad positiva a marcadores de las tres capas germinales: ectodermo (β -III Tubulin), mesodermo (α -SMA) y endodermo (α -1 Fetoprotein). Escala 25 μ m

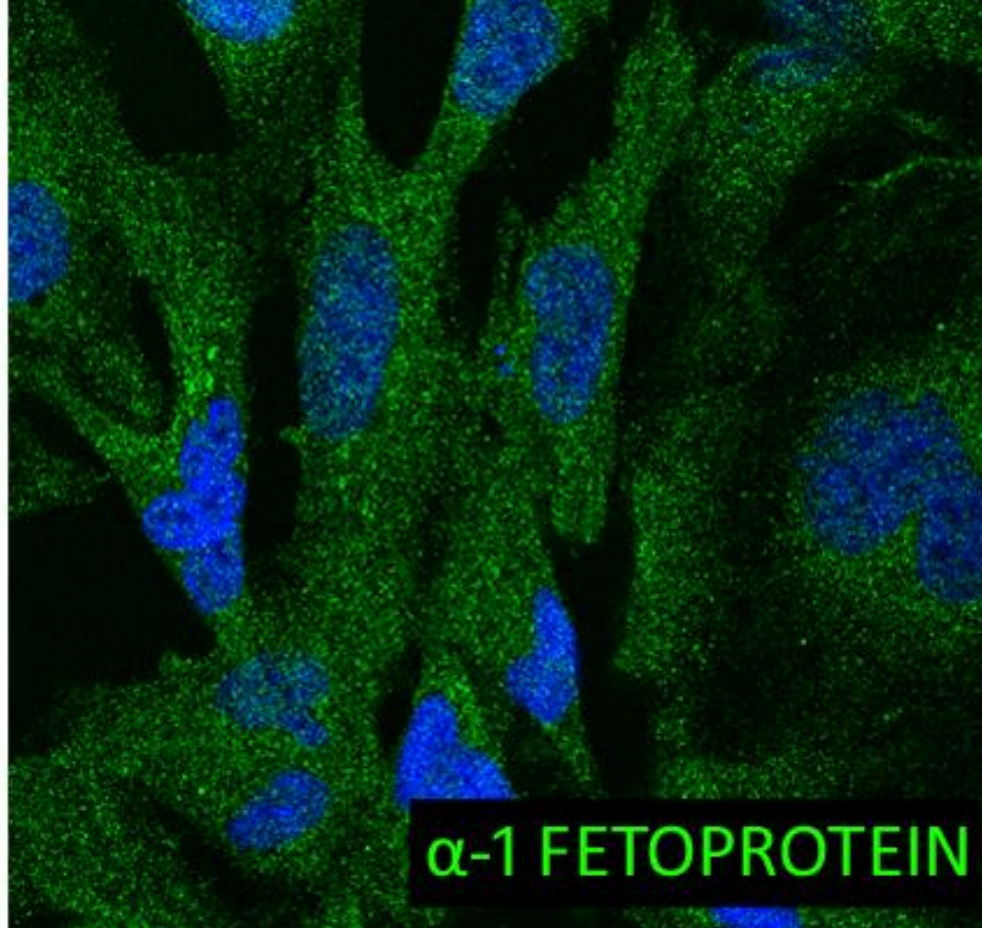
Diferenciación a células de ectodermo



Diferenciación a células de mesodermo



Diferenciación a células de endodermo

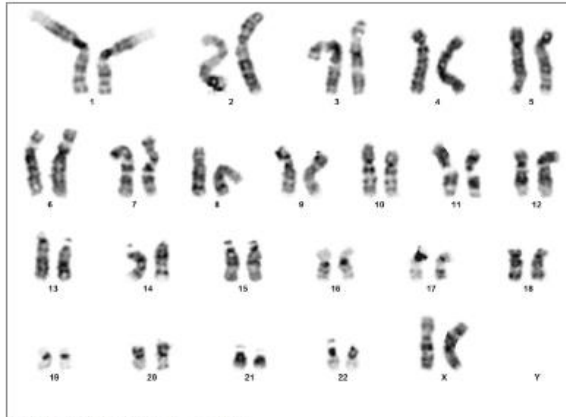


Anexo 4:

Análisis citogenético sin alteraciones

Case name: 31670507
 Name: DCB FIPSC1 Ep5F-2 p9
 NHC: CT0617

Department: IDIBELL
 Date: 7/6/2023
 Sample: CM



Case: 31670507 Slide: 1 Cell: 1F

Result: 46,XX

Servei peticionari	IDIBELL	DCB FIPSC1 Ep5F-2 p9,
Núm. H. Clínica	CT0617	
Data naixement	Sexe ?	
Data recepció mostra	16/06/2023 08:13	
Clau laboratori	001/3.167.0507	

COMPLET

DATA EMISSIÓ: 07/07/2023
 HOSPITAL SANT JOAN DE DÉU

ANÀLISI	RESULTAT	UNITATS	REF.	P	1 / 1
---------	----------	---------	------	---	-------

/GENÈTICA

ESTUDI CITOGENÈTIC

✓ Cariotip cèl·lules mare P
<http://corlabs/Storage/ozsgqwqaknxjq7ykobsejexqmaSp2d2iw.pdf####31670507.pdf>

Tècnica: Cultiu convencional per a aquest tipus de teixit i tinció de bandes G. Nivell de resolució entre 300 i 500 bandes per joc haploide.

Metafases estudiades: 16

Fórmula cromosòmica: 46,XX

Interpretació: No s'han detectat anomalies cromosòmiques numèriques ni estructurals entre les metafases analitzades.

Observacions:

Aquest resultat pot veure's afectat per les limitacions pròpies de la tècnica, com ara la presència d'un mosaic de baixa freqüència o la detecció d'alteracions cromosòmiques estructurals criptiques. No s'informa dels resultats que s'interpreten com a heteromorfismes. Aquest resultat segueix les recomanacions de la European Guidelines for Constitutional Cytogenetics Analysis 2018 i ISCN vigent.

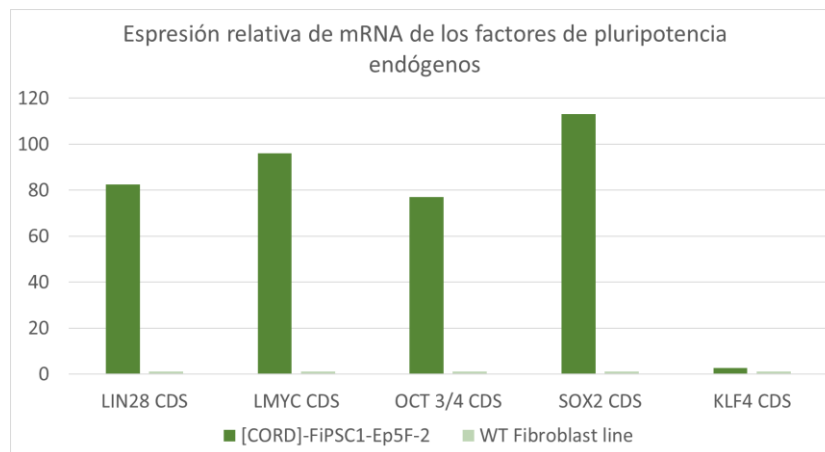
Validat per : Dra. Cuatrecasas Capdevila Esther

Anexo 5:

Test de integración

Técnica: qRT-PCR

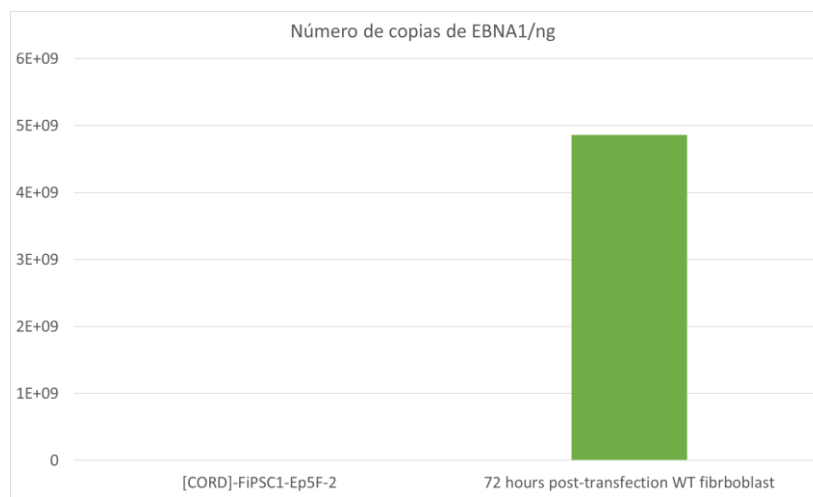
Expresión relativa del mRNA de los factores de pluripotencia endógenos (Lin28, LMYC OCT3/4, SOX2 y KLF4) significativamente mayor que en una línea de fibroblastos WT.



Test de silenciamiento:

Técnica: quantitative copy number PCR

Ausencia de copias de secuencias EBNA1 presente en todos los vectores de reprogramación utilizados



Anexo 7:

Resultado negativo del test de *Mycoplasma* utilizando el kit MycoStrip™ (Invivogen, Toulouse, France) basado en PCR isotérmica.

