

**BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)**  
*National Bank of Stem Cell Lines*  
**IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA**  
*Application Form to Deposit a Human Cell Line*

Documentos que se acompañan:

*Attached documents:*

- Copia de la autorización de derivación de la línea celular, junto con informe del Comité Ético del centro de procedencia.  
*A copy of the authorization for the derivation of the cell line, with the corresponding ethics committee approval*
- Copia de cualquier publicación científica relacionada con la derivación y/o caracterización de la línea.  
*A copy of any relevant published scientific papers related to the derivation and/or characterization of the cell line*
- C. V. del investigador principal (una página; formato libre).  
*A one page CV for the Principal Investigator*
- Otros (especificar).  
*Others (specify)*

ANEXO

**SECCIÓN 1**  
*Section 1*

**Información General**  
*General Information*

**Nombre de la línea:** VAL-9-GFP  
*Name of the line:*

**Investigador principal:** Carlos Simón Vallés  
*Principal Investigator:*

**Origen de la línea celular:**  
*Origin of the cell line*

**Embrionario**  **Fetal**  **Adulto**   
*Embryonic Fetal Adult*

**¿La línea celular ha sido derivada de un embrión con anomalía genética?**  
*Has the cell line been derived from an embryo with genetic anomaly?*

**NO**  **SÍ**  (especificar)  
*No Yes (specify)*

**Identificación genética de la línea celular. Método y resultado**  
*Genetic identity of the cell line. Method and result*

Fingerprinting

**Código:** VAL-9 GFP

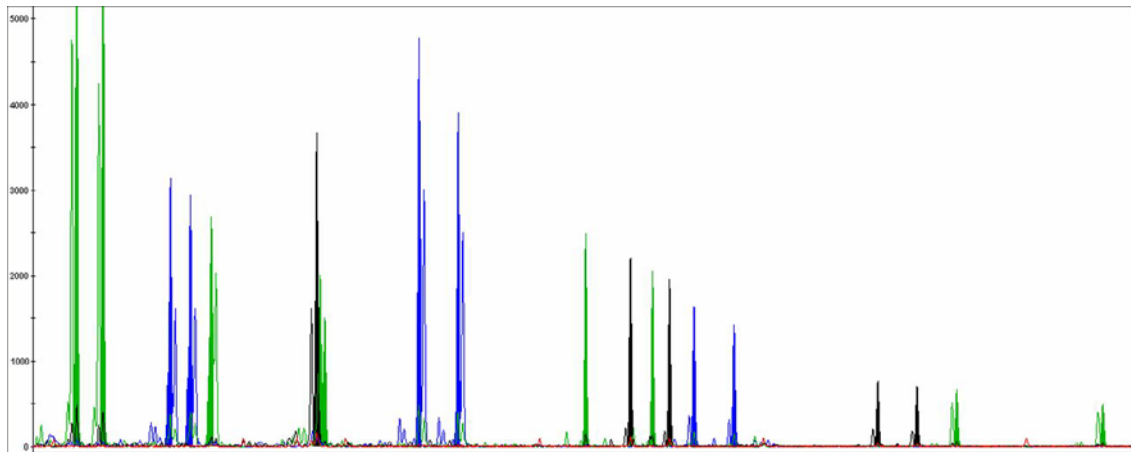
**Servicio:** Prueba de *fingerprinting* basada en el análisis de nueve marcadores polimórficos (ver lista); Estos 9 *loci* se heredan de forma independiente. Simultáneamente se co-amplifica un segmento del gen amelogenina, homólogo en cr. X e Y, para determinación del sexo de la muestra:

- A. D3S1358
- B. vWA
- C. FGA
- D. D8S1179
- E. D21S11
- F. D18S51
- G. D5S818
- H. D13S317
- I. D7S820

**Método:** PCR fluorescente y análisis de fragmentos en analizador genético AB 3130 según AmpFISTR Profiler Plus Loci, Applied Biosystems.

**Muestras:** ADN extraído a partir de colonias de VAL9-GFP recogidas en PBS.

**Resultados:** Línea de sexo masculino

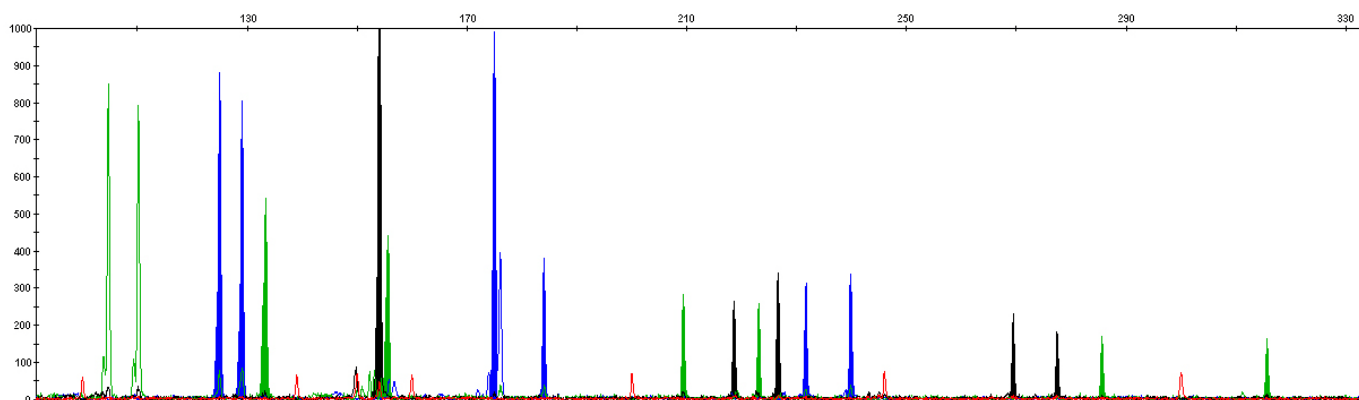


Julio Martín, PhD  
Laboratorio de Diagnóstico Molecular (DGP-PCR)  
**Unidad de Diagnóstico Genético Preimplantacional**  
Tel 96 303 72 73 (Horario 16-19:00 horas) Fax 96 345 55 12

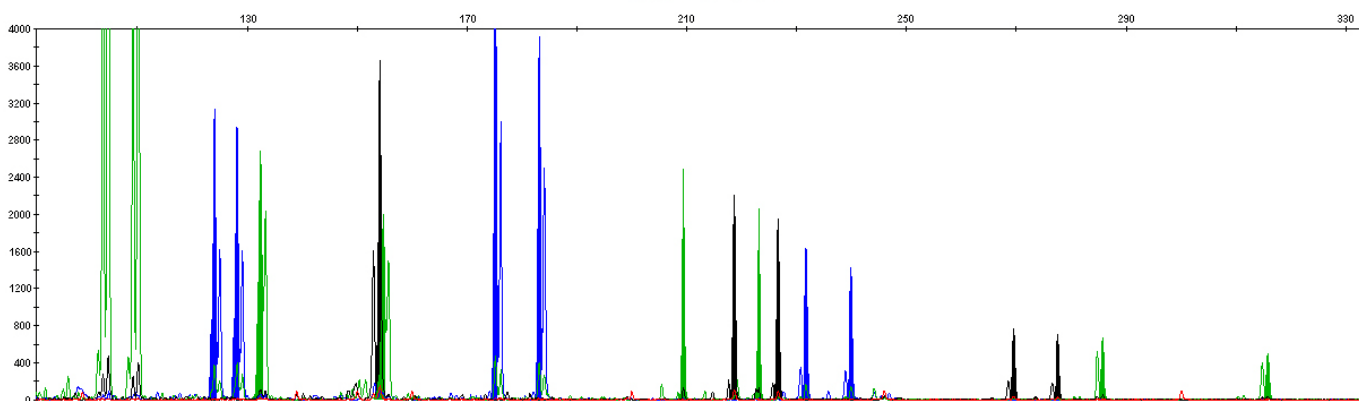


## Comparativa de las huellas genéticas de VAL-9 y VAL-9 GFP

### VAL-9



### VAL-9 GFP



Las muestras de ADN de VAL-9 y VAL-9-GFP comparten identidad para los 9 marcadores analizados, lo que determina en más de un 99%<sup>1</sup> que se trata de la misma línea celular.

<sup>1</sup>Chakraborty and Stivers, Journal of forensic sciences 41(4):671-7, 1996

## SECCIÓN 2

### Section 2

## Datos del Depositante

### Applicant Details

<b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i> Carlos Simón Vallés	<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal address:</i> Av. Autopista del Saler, 16
<b>Centro de Trabajo:</b> <i>Institution:</i> Centro de Investigación Príncipe Felipe (C.I.P.F.)	<b>Teléfono (phone):</b> +34 963 28 96 80 <b>Fax:</b> +34 963 28 97 01 <b>E-mail:</b> csimon@cipf.es

## SECCIÓN 3

### Section 3

## Datos de la Línea Celular

### Details of Cell Line

<b>Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...)</b> <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> Línea de células madre embrionarias humanas VAL-9. <i>Human embryonic stem cell line VAL-9</i>	
<b>Muestra biológica</b> <i>Biological sample</i> <p style="text-align: right;"><b>Fresco</b> <input type="checkbox"/> <b>Crioconservado</b> <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <input type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i> <input checked="" type="checkbox"/></p>	
<b>Fecha de la obtención de la muestra biológica</b> <i>Date of obtaining the biological sample</i> Congelación: 09/12/2008 <i>Freeze: 09/12/2008</i>	<b>Fecha del uso o descongelación (si congelado)</b> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 10/08/2009
<b>Fecha de la donación del muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i>	

**Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto)**

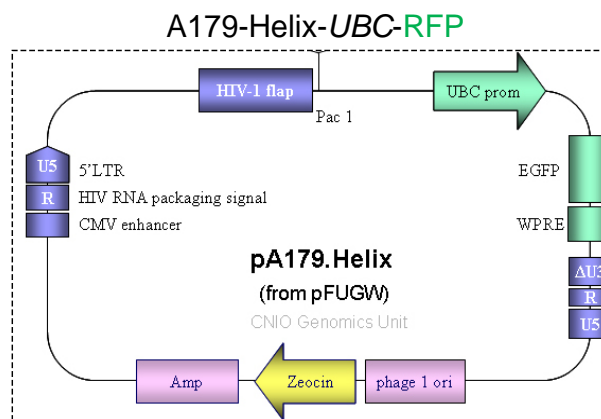
*General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue)*

La línea de células madre embrionarias humanas VAL-9 fue congelada mediante el método Valencia (Valbuena D, *et al.* RBM Online, 2008;17(1):127-135) . Se descongeló un criovial en pase 18. Tras su expansión hasta pase 20 se realizó la transfección con GFP (green fluorescente protein ). Para ello se usaron células empaquetadoras 293T/17 de ATCC (CRL-11268), el vector lentiviral A179-Helix-UBC-RFP (cedido por Genomics Unit, Spanish National Cancer Centre, CNIO), y los plásmidos PMGLIX-PSTI (GFP), GAG POL-BAM HI (supervivencia virus) y VSVG-ECORT (encapsulación virus).

Las células empaquetadoras fueron descongeladas y sembradas en placa petri de 60mm a una concentración de  $5 \times 10^5$ , y mantenidas en cultivo por un día antes de iniciar la co-transfección con los plásmidos conteniendo el DNA necesario para la formación de los viriones y la inserción de GFP. Se añadió un microgramo de cada plásmido y se mantuvo incubando durante 48 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se recogió el sobrenadante con los viriones y se puso en contacto con las células de VAL-9 a transfectar, incubando durante una hora. Finalmente se retiró el medio y se añadió medio HES y bFGF. Tras 48 horas se procedió al análisis bajo el microscopio de fluorescencia para seleccionar aquellas colonias positivamente transfectadas. Tras 4 pases de selección manual se aislaron mediante FACS las células GFP+, con un nivel de discriminación suficientemente restrictivo para asegurar la purificación de la población.

*The human embryonic stem cell line VAL-9 was frozen by Valencia method. One cryovial was thawed in passage 18. After expansion to passage 20 the transfection with GFP (green fluorescente proteín) was performed. Packaging cells 293T/17 from ATCC (CRL-11268), lentiviral vector A179-Helix-UBC-RFP (gently provided by Genomics Unit, Spanish National Cancer Centre, CNIO) and DNA plasmids PMGLIX-PSTI (GFP), GAG POL-BAM HI (virus survival) y VSVG-ECORT (virus encapsulation) were used.*

*Packaging cells were thawed and seeded in a 60 mm Petri dish, concentration  $5 \times 10^5$ , and maintained for 24 hours in culture before co-transfection with the DNA plasmids needed for virions formation and GFP insertion. One microgram of each plasmid was added to the culture medium and incubated for 48 hours at 37°C. Afterwards supernatant containing the viruses was collected and added to the plate containing VAL-9 cells to be transfectated, incubating it for an hour. Finally, the medium with the viruses was removed and replaced with HES medium and bFGF. After 48 hours, fluorescence analysis was carried out to mechanically select the transfectated colonies. After 4 passages of mechanical passaging GFP+ cells were sorted by FACS, with a very restrictive gate ensuring the efective isolation of the positive population.*



Vector lentiviral, cedido por Genomics Unit, CNIO

**En caso de muestra embrionaria, indicar si se utilizaron blastómeros o células de la masa celular interna y el método de aislamiento utilizado**

*If of embryonic origin, indicate whether blastomeres or internal cell mass were used, as well as the isolation method*

**Origen del soporte celular o acelular utilizado para la derivación, así como de los componentes de los medios de cultivo (si se describen en publicación, indicar además referencia)**

*Origin of the cellular or cellular free support used in derivation in addition to the components of the culture mediums (if they are described in a publication, please indicate the reference).*

- **Soporte celular /cellular support** : human foreskin fibroblasts CCD112Sk (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA. N° catálogo: CRL-2429).
- **Componentes del medio para Feeder / Feeder medium components**: 90% Iscoves' Modified Dulbecco's médium (ATCC), n° Catálogo: 30-2005) + 10%Fetal Bovine Serum ((Gibco), n° catálogo:10091148).
- **Componentes del medio para hESC/ hESC medium components**: 80% Knockout DMEM (Gibco/BRL, Paisley, Scotland, UK; n° catálogo 10829-018), 20% Knockout SERUM Replacement (Gibco/BRL; n° catálogo: 10828-028), 1 mM L-glutamine solution (Gibco/BRL; n° catálogo: 25030-024), 1% MEM non essential amino acids (100x) (Gibco/BRL; n° catálogo: 11140-035), 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol (Gibco/BRL; n° catálogo: 31350-10), 10  $\mu$ g/ml human recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA ; n° catálogo: 13256-029).

**Valbuena D, Galán A, Sánchez E, Poo ME, Gómez E, Sánchez-Luengo S, Melguizo D, García A, Ruiz A, Moreno R, Pellicer A, Simón C. Derivation and characterization of three new Spanish human embryonic stem cell lines (VAL-3,-4,-5) on human feeder and in serum-free conditions. Reproductive BioMedicine Online 2006; 13(6):875-86.**

Poo ME, Aguilar C, Gómez E, Sánchez E, Marqués-Marí A, Galán A, Medrano J, Riboldi M, Ruiz V, Enseñat-Waser R, Valbuena D, Simón C. Derivation, Characterization, Differentiation and Registration of Eight Human Embryonic Stem Cell Lines (VAL-3, -4, -5, -6M, -7, -8, and -9) on Human Feeders. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal; Submitted.

**Mantenimiento de la línea: Line maintenance**

**Ratio de pase: Passage ratio** 1:4 - 1:5

**Método de pase: Passage method** mecánico / mechanical

**Xenobióticos**

**si**

**no**

*Xenobiotics*

*Yes*

*No*

**Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo**

**(forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)**

*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; others)*

Mantienen la morfología de la línea celular VAL-9 antes de la transfección: colonias aplanadas, translúcidas y con bordes definidos, con células homogéneamente dispuestas en monocapa, y ratio núcleo/citoplasma elevado. Se agrupan en colonias de 3000-5000 células. Presentan fluorescencia verde en los núcleos celulares.

*Maintenance of morphology of the cell line VAL-9 before transfection: flat colonies, translucent, with defined borders, with cells homogeneously located in a monolayer, and a high ratio of nucleus/cytoplasm. Colonies with 3000-5000 cells. The nuclei of the cells are green fluorescent.*

**Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)**

*Microbiological controls carried out (indicate in detail)*

El soporte celular fue testado para: bacterias habituales, Mycoplasma, endotoxinas, citomegalovirus, Epstein-Barr, VHB, VHC, herpes humano 6(A) y 6(B), VIH1, VIH2, HTLV-I/II, parvovirus y transcriptasa reversa. Los resultados fueron negativos. Los controles fueron realizados por el Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI), entidad homologada por AENOR, ENAC y Consellería de Sanitat.

La línea fue testada para Mycoplasma y patógenos habituales. De forma rutinaria se realizan controles microbiológicos que aseguran la ausencia de microorganismos en las condiciones de cultivo utilizadas.

*Cellular support was tested for: usual bacteria, Mycoplasma, endotoxin, cytomegalovirus, Epstein-Barr, HBV, HCV, human herpes 6(A) y 6(B), HIV1, HIV2, HTLV-I/II, parvovirus and reverse transcriptase. Results were negative. Controls were done by the Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI), homologated by AENOR, ENAC and Consellería de Sanitat.*

*Cell line was tested for Mycoplasma and common pathogens. Routinely, we perform microbiologic controls that ensure the absence of microorganisms in the culture conditions used.*

**Marcadores:***Markers*

	<b>Método (ARN/proteínas) Method (RNA/proteins)</b>	<b>nº pase* Passage n**:</b>	<b>resultado results</b>	<b>comentarios comments</b>
<b>Oct 4</b>	PCR e inmunocitoquímica (ICQ) / <i>PCR and immunocytochemistry (ICC)</i>	26	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
<b>Nanog</b>	PCR e ICQ/ <i>PCR and ICC</i>	26	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
<b>Rex 1</b>				
<b>Sox 2</b>				
<b>SSEA3</b>				
<b>SSEA4</b>	ICQ / <i>ICC</i>	26	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
<b>TRA-1-60</b>	ICQ / <i>ICC</i>	26	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
<b>TRA-1-81</b>	ICQ / <i>ICC</i>	26	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
<b>Telomerasa/</b> <i>Telomerase</i>	PCR	26	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
<b>Fosfatasa Alk.</b> / <i>Alkaline phosphatase</i>	ICQ / <i>ICC</i>	26	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
<b>Cariotipo /</b> <i>Karyotype</i>	bandas G / <i>G bands</i>	26	46,XY	masculino normal / <i>normal male</i>
<b>Otros /</b> <i>Others</i>				
Cripto, Dnmt3b, Gabr, Gdf3	PCR	26	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
Nfh	PCR	26	-	diferenciación / <i>differentiation</i> (ectodermo) / <i>(ectoderm)</i>
Ren	PCR	26	-	diferenciación / <i>differentiation</i> (mesodermo) / <i>(mesoderm)</i>
Amy	PCR	26	-	diferenciación / <i>differentiation</i> (endodermo) / <i>(endoderm)</i>

\* El número de pase corresponde al sumatorio del pase que tenía VAL-9 cuando fue transfectada (pase 18) y el número de pases que lleva en cultivo la línea GFP (8 pases) por tanto: pase 26 = 18+8.

\*\* *Passage number corresponds to the summation of the VAL-9 passage at the transfection moment (passage 18) plus the number of passages in culture after transfection with GFP protein (8 passages). Passage 26 = 18+8.*

**Capacidad de diferenciación***Differentiation capacity*

	<b>Ectodermo/</b> <i>Ectoderm</i>			<b>Endodermo/</b> <i>Endoderm</i>			<b>Mesodermo/</b> <i>Mesoderm</i>		
	<b>marcador</b>	<b>pase*</b>	<b>resultado</b>	<b>marcador</b>	<b>pase*</b>	<b>resultado</b>	<b>marcador</b>	<b>pase*</b>	<b>resultado</b>
	<i>marker</i>	<i>passage**</i>	<i>result</i>	<i>marker</i>	<i>passage**</i>	<i>result</i>	<i>marker</i>	<i>passage**</i>	<i>result</i>
<b>In Vitro</b>	tubulin $\beta$ -III	27	positivo	$\alpha$ -fetoproteína	27	positivo	actina muscular	27	positivo
<i>In vitro</i>	<i>tubulin <math>\beta</math>-III</i>	<i>27</i>	<i>positive</i>	<i><math>\alpha</math>-fetoprotein</i>	<i>27</i>	<i>positive</i>	<i>muscle actin</i>	<i>27</i>	<i>positive</i>

**In vivo /** *in vivo***Método:***Method:*

inducción de teratomas

*teratomas induction***Resultado:** positivo*Result: positive*

\* El número de pase corresponde al sumatorio del pase que tenía VAL-9 cuando fue transfectada (pase 18) y el número de pases que lleva en cultivo la línea GFP (9 pases) por tanto: pase 27 = 18+9.

\*\* *Passage number corresponds to the summation of the VAL-9 passage at the transfection moment (passage 18) plus the number of passages in culture after transfection with GFP protein (9 passages). Passage 27 = 18+9.*

**Descripción de las características de diferenciación *in vitro****Description of the differentiation characteristics in vitro*

Formación de cuerpos embrioides e inmunocitoquímica para marcadores de diferenciación de ectodermo, mesodermo y endodermo.

*Embryoid bodies formation and immunostaining against differentiation markers from ectoderm, mesoderm and endoderm.*

**Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas***Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation*

Inyección intratesticular en ratones SCID de 30 colonias de la línea por testículo (90.000-150.000 células). Transcurridas 12 semanas, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron tumores cuyo análisis anatómo-patológico e inmunohistoquímico demostró que se trataba de teratomas formados por tipos celulares propios de ectodermo, mesodermo y endodermo.

*Intratesticular injection in SCID mice of 30 cell colonies of the line/testis (90,000-150,000 cells). After 12 weeks, the mice were sacrificed and tumors were obtained. Anatomopathological analysis and immunohistochemistry of tumors showed that they were teratomas with typical tissues from the ectoderm, mesoderm and endoderm.*

**Datos de la tipificación HLA***HLA typification data*

HLA-A\*0201, HLA-A\*1101  
 HLA-B\*0702, HLA-B\*5101  
 HLA-Cw\*0202, HLA-Cw\*0702  
 HLA-DRB1\*1101, HLA-DRB1\*1501  
 HLA-DRB3\*0202-  
 HLA-DRB5\*0101-  
 HLA-DQA1\*0505, HLA-DQA1\*0102  
 HLA-DPB1\*0301, HLA-DPB1\*0602  
 HLA-DPB1\*0401, HLA-DPB1\*0501

**Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.***Cell consistency alter 6 passages of freezing and thawing. Results.*

La línea celular se mantiene estable tras más de 6 pases siguiendo los procedimientos de congelación y descongelación propios.

*The cell line is stable for more than 6 passages following our freezing and thawing protocol.*

Valbuena D., Sánchez-Luengo S., Galán A., Sánchez E., Gómez E., Poo ME, Ruiz V, Genbacev O., Krtolica A., Pellicer A., Moreno R., Simón C. An Efficient Slow Freezing hESC Cryopreservation Method in Xeno-Free Conditions without the use of a programmable freezer. Reproductive BioMedicine Online, 2008 ; 17(1) : 127-135.

**Pase en el momento del registro***Passage at the time of the recording*

**Pase 32.** El número de pase corresponde al sumatorio del pase que tenía VAL-9 cuando fue transfectada (pase 18) y el número de pases que se ha mantenido en cultivo la línea GFP (14 pases) por tanto: pase 32 = 18+14.

**Passage 32.** Passage number corresponds to the summation of the VAL-9 passage at the transfection moment (passage 18) plus the number of passages in culture after transfection with GFP protein (14 passages). Passage 32 = 18+14.

**¿Ha sido la línea modificada genéticamente?***Has the line been genetically modified?*Sí Yes No No **¿Se llevó a cabo un análisis clonal?***Has a clonal analysis been carried out?*Sí/ Yes  No  **Resultado / Result****Comentarios/ Comments:**



**Otras observaciones o información relevantes** (a juicio del Investigador Principal):

Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigator):

La línea celular VAL-9-GFP se aporta con el fin de ser utilizada como herramienta útil para la investigación, ya que la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) es permanente. Al no estar ligada al estadio de indiferenciación de las células, permite seguir la trazabilidad de la línea en cualquier experimento en condiciones de indiferenciación y en posteriores estadios de diferenciación.

*VAL-9-GFP cell line is provided in order to be used like a useful tool for research because the GFP expression is permanent. Not being tied to the undifferentiation stage of the cells, allows to trace the cell line in any experiment, in undifferentiation conditions and even in later differentiation stages.*

**Otras observaciones o información relevantes** (a rellenar por el BNLC):

Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

**Seguimiento de la línea** (a rellenar por el BNLC):

Follow up of the line (to be completed by BNLC)

