

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 (Anexos).
Others (specify)

SECCIÓN 1

Section 1

Información General

General Information

Nombre de la línea: AND-4

Name of the line:

Investigador principal: Martín Muñoz López, Pablo Menéndez y José Luis García Pérez.

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

HLA y Microsatélites (Anexo 1)

HLA and Microsatellite (Annex 1)

SECCIÓN 2
Section 2

Datos del Depositante
Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> José Luis García Pérez	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Av. del Conocimiento s/n 18100, Armilla (Granada)
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Banco Andaluz de Células Madre <i>Andalusian Stem Cell Bank</i> Avda. del Conocimiento s/n 18100 · Armilla · (Granada)	Teléfono (phone): 958 894 672 Fax: 958 894 652 E-mail: josel.garcia.perez@juntadeandalucia.es

SECCIÓN 3
Section 3

Datos de la Línea Celular
Details of Cell Line

Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...) <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> Fibroblastos embrionarios humanos (HEFs) comerciales de la American Type Collection Culture <i>Commercial human embryonic fibroblasts (HEFs) from ATCC</i>	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> <p style="text-align: center;">Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i> <input type="checkbox"/></p>	
Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> Enero 2009 <i>January 2009</i>	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> Junio 2009 <i>June 2009</i>
Fecha de la donación del muestra biológica <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) <i>General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue)</i>
--

Text items should be filled in both Spanish and English

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: Fibroblastos humanos irradiados.

Medio Cultivo: KO-DMEM suplementado con 20% KO Serum Replacement, 1% aminoácidos no esenciales, 1 mM L-glutamina, 0.1 mM β -mercaptoetanol y 8 ng/ml bFGF.

Support: irradiated human embryonic fibroblasts

Culture medium: KO-DMEM supplemented with 20% KO Serum Replacement, 1% non-essential amino acids, 1 mM L-glutamine, 0.1 mM β -mercaptoethanol and 8 ng/ml of bFGF.

Mantenimiento de la línea: Line maintenance

Ratio de pase: *Passage ratio 1:2-1:3 cada 5-7 días; 1:2-1:3 every 5-7 days*

Método de pase: *Passage method enzimático y mecánico; enzymatic and mechanical*

Xenobióticos
Xenobiotics

no
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)

Colonias redondeadas y alargadas en la vertical. Células con elevada relación núcleo/citoplasma.

Rounded colonies and vertically elongated. High nucleus/cytoplasm ratio.

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

Análisis de hongos y micoplasma negativos (Anexo 2)

Micology and mycoplasma negative (Annex 2)

Marcadores: <i>Markers</i>				
	Método (ARN/proteínas) <i>Method</i> <i>(RNA/proteins)</i>	nº pase <i>Passage n.</i>	resultado <i>results</i>	comentarios <i>comments</i>
Oct 4	RT-PCR	5	+	Anexo 3
Nanog	RT-PCR	5	+	Anexo 3
Rex 1	RT-PCR	5	+	Anexo 3
Sox 2	RT-PCR	5	+	Anexo 3
SSEA3	Inmunofluorescencia	5	+	Anexo 3
SSEA4	Inmunofluorescencia	5	+	Anexo 3
TRA-1-60	Inmunofluorescencia	5	+	Anexo 3
TRA-1-81	Inmunofluorescencia	5	+	Anexo 3
<i>Telomerasa/Telomerase</i>				
<i>Fosfatasa Alk. /Alkaline phosphatase</i>				
Cariotipo / Karyotype		10	47, XY,+1,+5,-17	Anexo 4
<i>Otros / Others</i>				

Capacidad de diferenciación <i>Differentiation capacity</i>									
	Ectodermo/ Ectoderm			Endodermo/Endoderm			Mesodermo/ Mesoderm		
	marcador	pase	resultado	marcador	pase	resultado	marcador	pase	resultado
	<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>
In Vitro	PGFA	5	+	Ckpan	5	+	α-Actina	5	+
<i>In vitro</i>	<i>GFAP</i>	<i>5</i>	<i>+</i>	<i>PanCk</i>	<i>5</i>	<i>+</i>	<i>α-Actin</i>	<i>5</i>	<i>+</i>
(Anexo 5)									
In vivo/ in vivo (Anexo 6)		Método: Formación de teratomas en ratones NOD/SCID <i>Method: Teratoma formation in NOD/SCID mice</i>					Resultado: + <i>Result:+</i>		

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

Cultivo de cuerpos embrionarios (EBs) durante 21 días en medio de cultivo sin bFGF

*Embryoids bodies (EBs) cultured for 21 days in culture medium without bFGF***Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas***Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation*

Se inyectan colonias en la cápsula testicular o subcutáneamente en el flanco de un ratón NOD/SCID. Una vez crecido el teratoma se extrae, se fija y se obtienen cortes histológicos que se tiñeron con hematoxilina/eosina y mediante inmunohistoquímica para identificar las diferentes capas embrionarias

Colonies are injected into testicular capsule or subcutaneously into a NOD/SCID mouse. When the teratoma appears, it is extracted, fixed, and the histological cuts are staining with hematoxilin/eosin and by immunohistochemistry to identify the different germ line

Datos de la tipificación HLA*HLA typification data***Anexo 1***Annex 1***Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.***Cell consistency alter 6 passages of freezing and thawing. Results.*

Las células fueron congeladas y descongeladas satisfactoriamente. Tras su descongelación, producen cultivos de iPS pluripotentes.

Cells were frozen and thawed successfully. Upon thawing, fully pluripotent cultures of iPS were obtained.

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

Pase 13

*Passage 13***¿Ha sido la línea modificada genéticamente?***Has the line been genetically modified?*Sí Yes No No **Comentarios/ Comments:**

Ver Anexo 7 para un esquema del vector lentiviral insertado en el genoma de la línea AND-4

See Annex 7 for an scheme of the lentiviral vector inserted in the genome of the AND-4 line

¿Se llevó a cabo un análisis clonal?*Has a clonal analysis been carried out?*Sí/ Yes No **Resultado / Result**

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

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

Esta línea de células iPS se ha generado mediante la introducción en fibroblastos embrionarios humanos (HEFs) de los factores de transcripción Oct-3/4, Sox-2, Klf-4 y Myc mediante un vector lentiviral (ver Anexo 7). Además, estudios de expresión del transgén en la línea AND-4 generada indican que éste continúa siendo expresado, no habiendo sido silenciada la inserción viral (Anexo 8). Es posible que esta inserción y/o la expresión del transgén haya contribuido al cariotipo anormal de la línea AND-4, ya que los HEFs parentales antes de la reprogramación poseían un cariotipo normal 46 X,Y (ver Anexo 4).

This iPS cell line has been generated by introduction of the transcription factors Oct-3/4, Sox-2, Klf4 and Myc in human embryonic fibroblasts (HEFs) using a lentiviral vector (see Annex 7). Furthermore, expression assays showed that the transgene is expressed in AND-4, and that the lentiviral insertion has not been silenced (Annex 8). It is possible that this insertion and/or the expression of transgene has contributed to the abnormal karyotype of AND-4 line, as the parental HEFs had a normal 46 X,Y karyotype (see Annex 4).

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)

SECCIÓN 4

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.

<p>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>(Legal Representative of the Department/Centre)</i></p> <p>Juan Jesús Bandera González</p>  <p>Fecha/ Date: 04/03/2010</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p>José Luis García Pérez</p>   <p>Fecha /Date 04/03/2010</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i></p> <p>D. Juan Jesús Bandera González Director Gerente Fundación Progreso y Salud</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2ª Planta Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93 - 41092 Sevilla</p>	<p>Teléfono /Telephone: 955040450</p> <p>Fax: 955040457</p> <p>E-mail: gestionproyectos.fps@juntadeandalucia.es</p>