



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **CT PBiPS2-Sv4F-1** 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: Ausencia de los transgenes de reprogramación

Anexo 7: Resultado Test de micoplasma

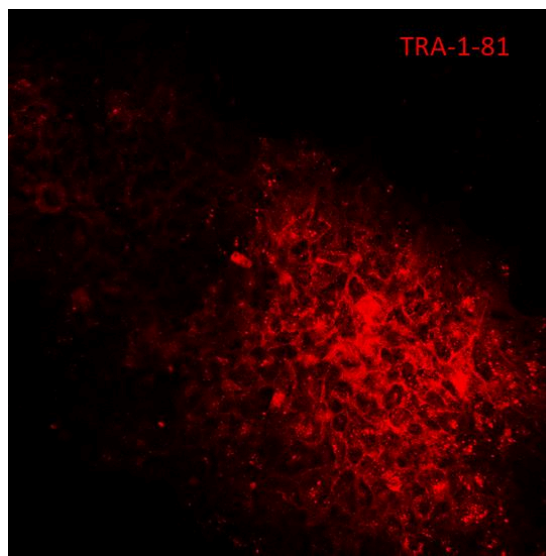
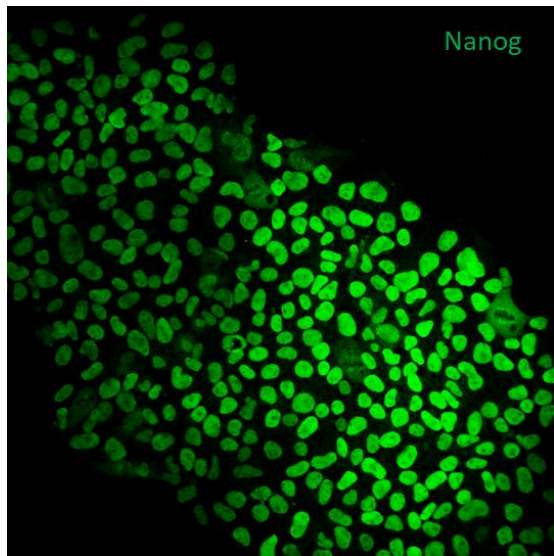


Anexo 1

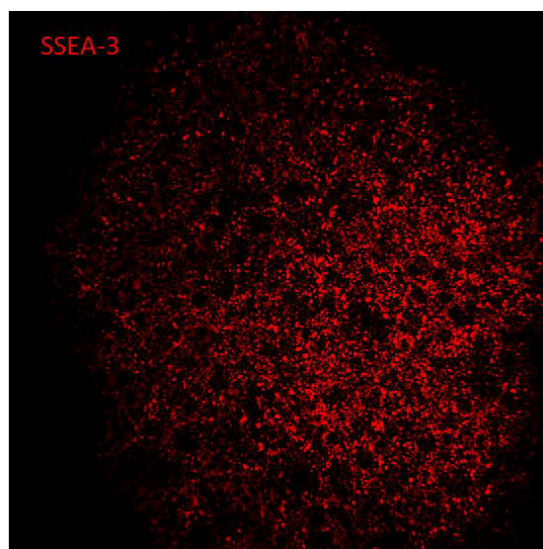
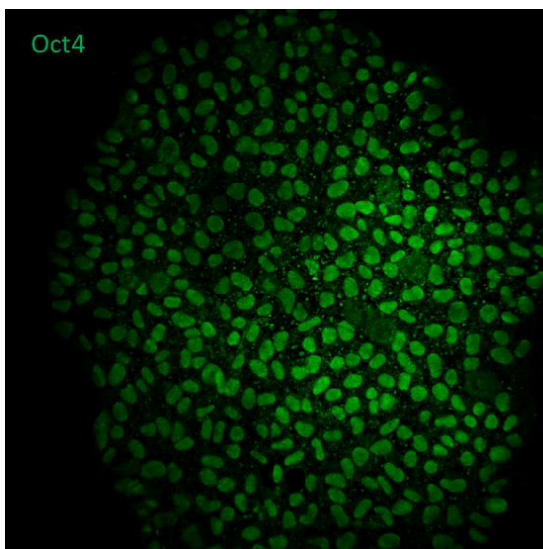
Fenotipo. Marcadores de pluripotencia



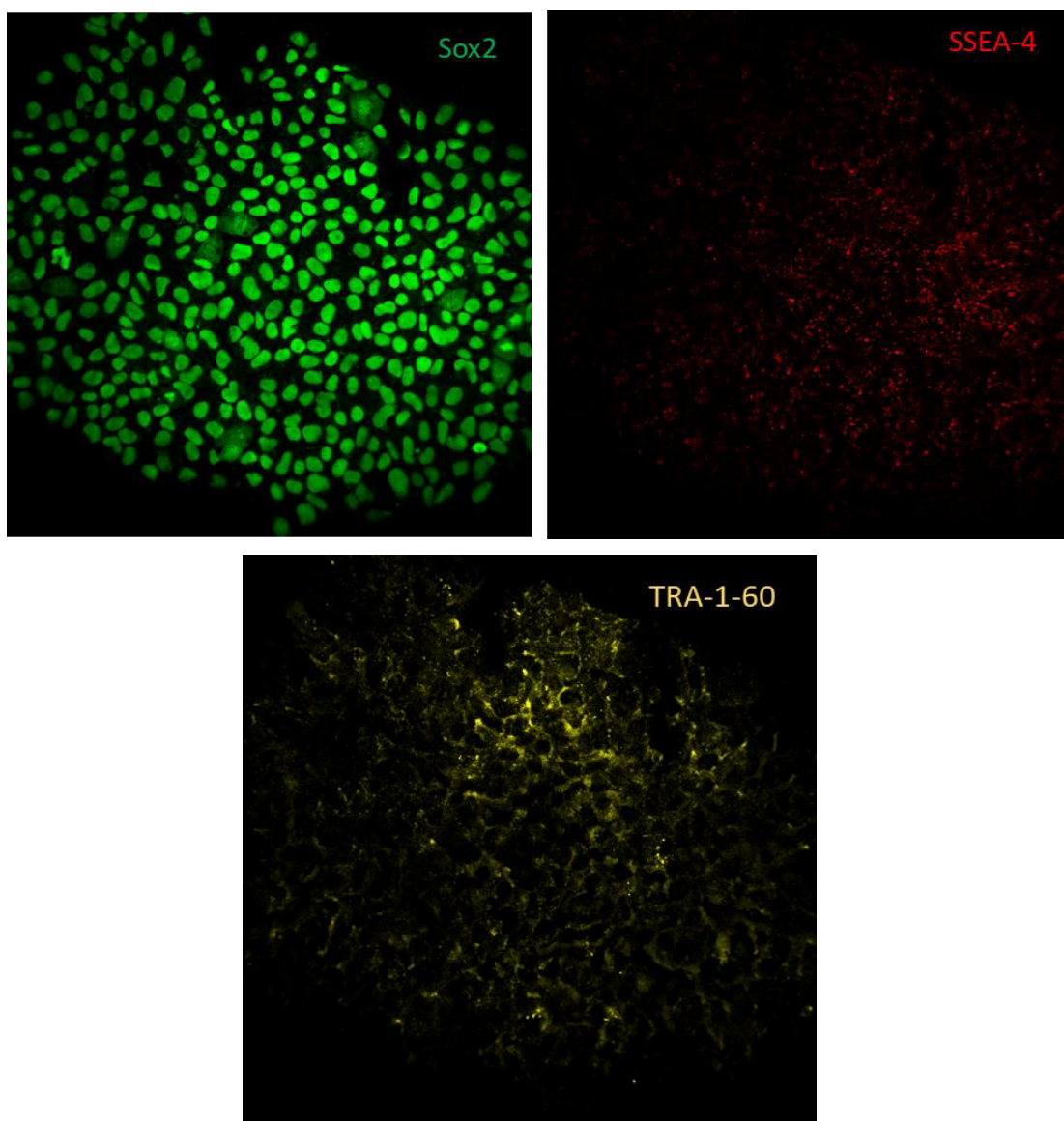
Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



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

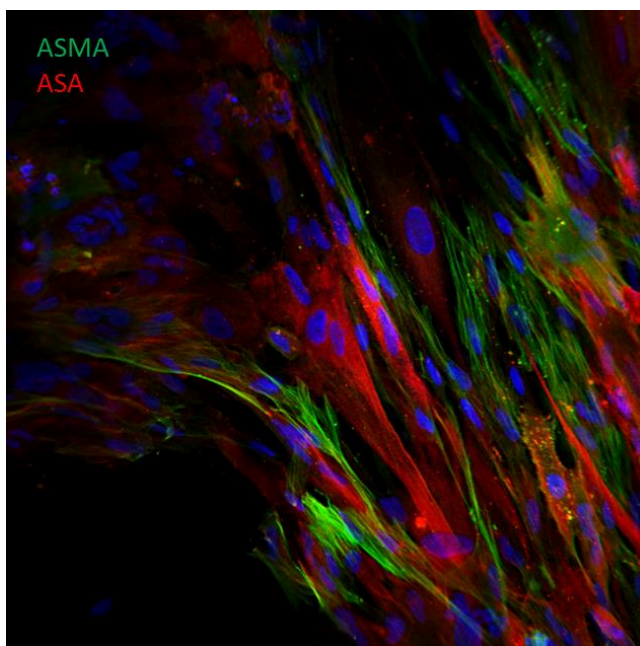


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

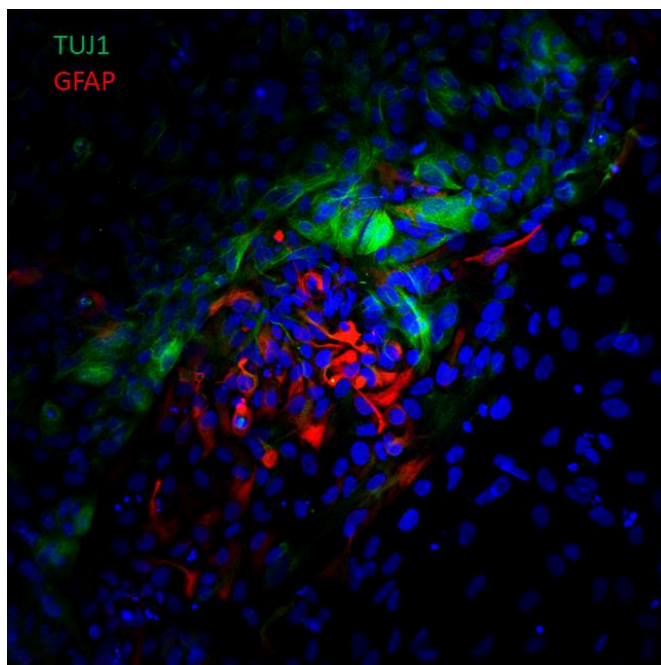


Anexo 2

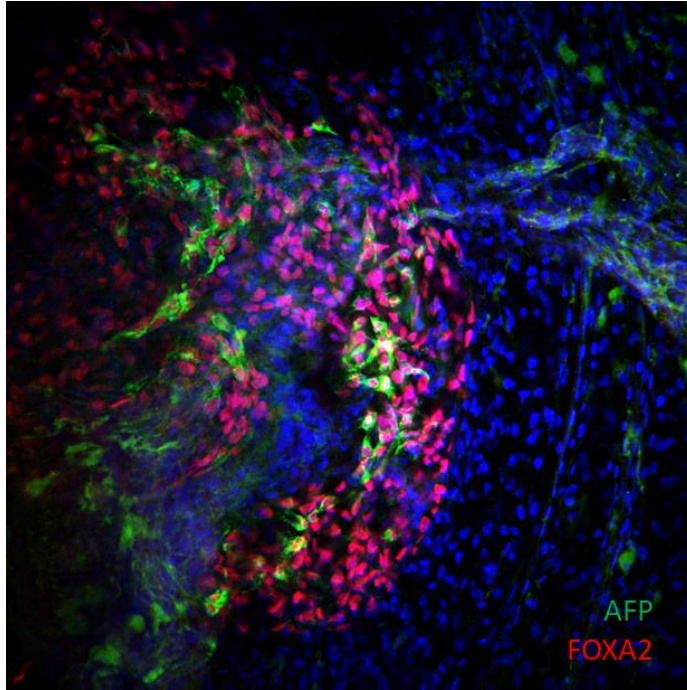
Diferenciación *in vitro*



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



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

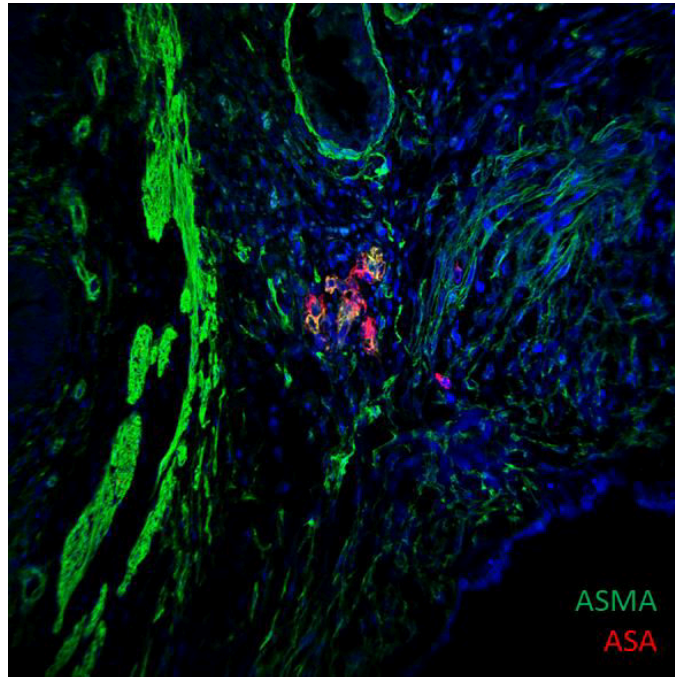


Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

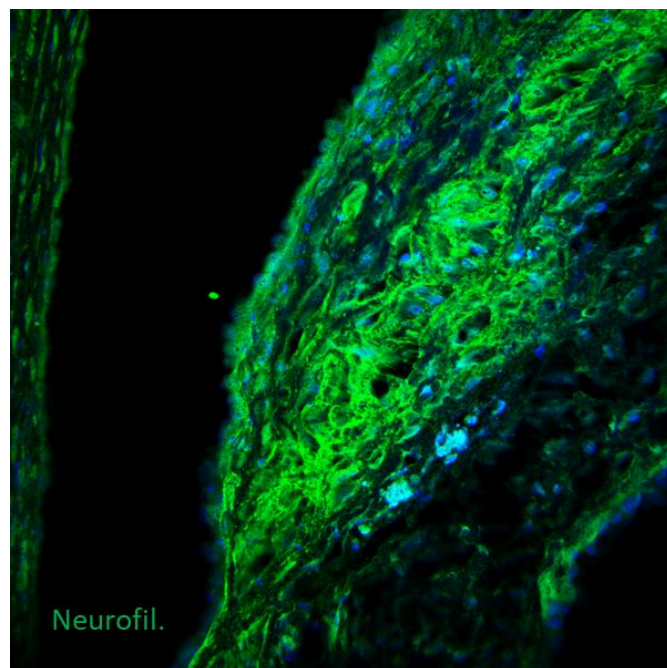


Anexo 3

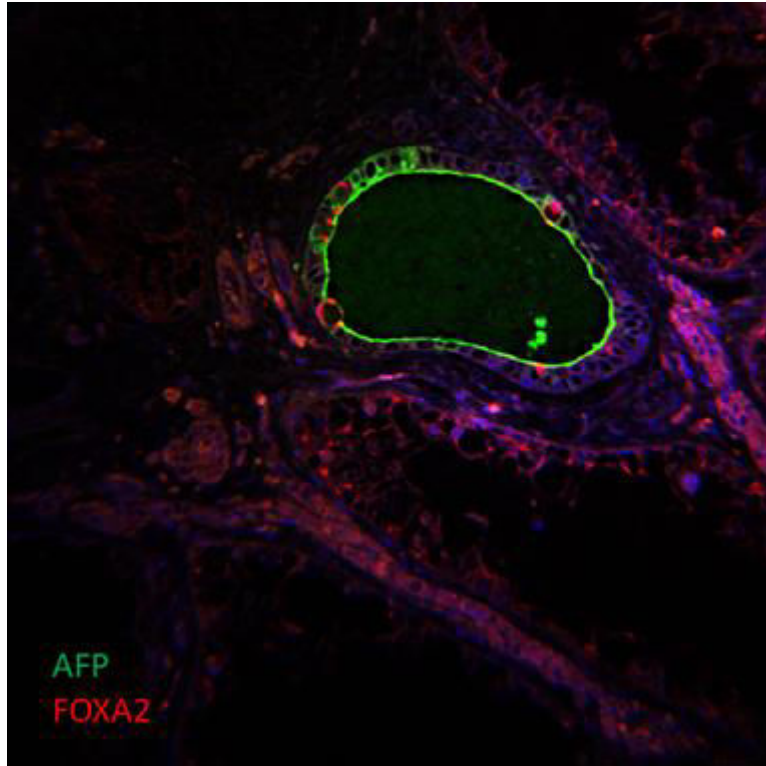
Diferenciación *in vivo*



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



Diferenciación *in vivo* a ectodermo: Células positivas para **Neurofilamento**.



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



Anexo 4

Cariotipo

ESTUDI CITOGENETIC

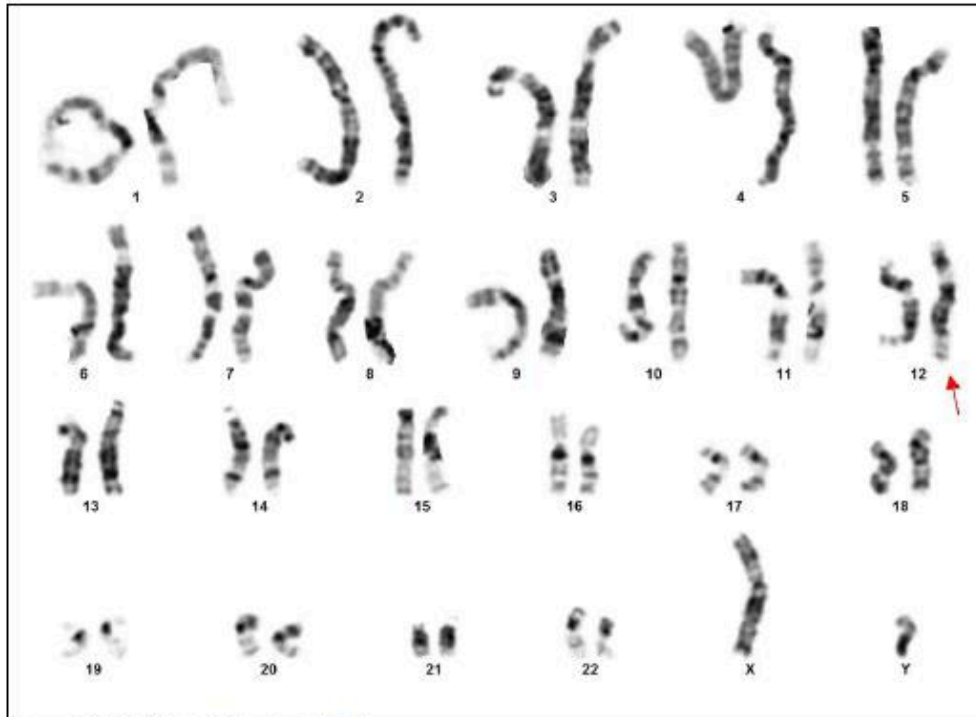
Case name: 91640718

NHC: CT0097

Nombre y Apellidos: CT PBIPS 2-Sv4F-2 p12

Tipo de muestra: CM

Servicio: CMRB



Case: 91640718 Slide: 1 Cell: 2

Resultado: 46,XY,inv(12)(p11.2q13.3)



Anexo 5

Resultado microsatélites

Los resultados obtenidos son estudiados mediante el programa informático GeneMapper[®] 3.2. De acuerdo con la información suministrada por Promega[®] sobre su kit de amplificación GenePrint[®] 10 System, estos son los datos correspondientes de los alelos existentes para cada uno de los diferentes loci STR (figura1):



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	263–259	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
CSP1PO	JOE	321–357	6–15
Amelogenin	TMR	106, 112	X, Y
vWA	TMR	123–171	10–22
TPOX	TMR	262–280	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.ncbi.nlm.nih.gov/ncbiwebc/ncbi/var_D13S317.html 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:

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

Código biobanco	Código origen del ADN de la línea celular	Loci STRs analizados									
		TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
INVN02519A524ADNA002	CT PBiPS2 Sv4F-1, P14	7, 9.3	30.2, 33.2	12, 13	10, 12	8, 10	11	10	X, Y	16, 17	8, 11

Granada, a 15 de Octubre de 2019

Laboratorio de Biología Molecular
 Biobanco del SSPA

RESULTADOS:

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

Código biobanco	Código origen del ADN de la línea celular	Loci STRs analizados									
		TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
INVN02519A526ADNA002	Cardiotoxicity2, 23CCARE	7, 9.3	32.2, 33.2	12, 13	10, 12	8, 10	11	10	X, Y	16, 17	8, 11

Granada, a 15 de Octubre de 2019

Laboratorio de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en las células mononucleadas de las que procede.



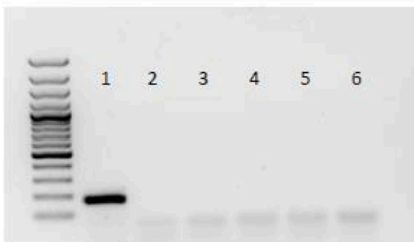
Anexo 6

Ausencia de los transgenes de reprogramación

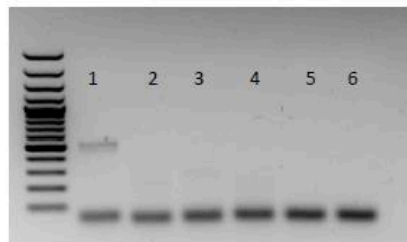
RT-PCR SENDAI 31/05/2019

1. Sendai infected CT2-PBMCs, 0,15M, 08.03.19 (positive control)
2. CT PBiPS2 Sv4F-1, P10, 24.05.19
3. CT PBiPS2 Sv4F-2, P10, 23.05.19
4. CT PBiPS2 Sv4F-6, P8, 24.05.19
5. Sample 3 without RT
6. H2O

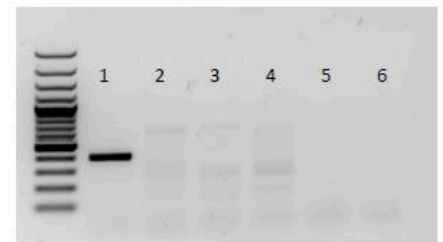
SeV (181pb)



KOS (528 pb)



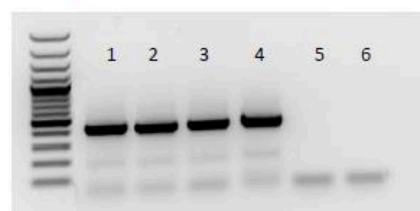
Klf4 (410 pb)



C-Myc (532 pb)



GAPDH



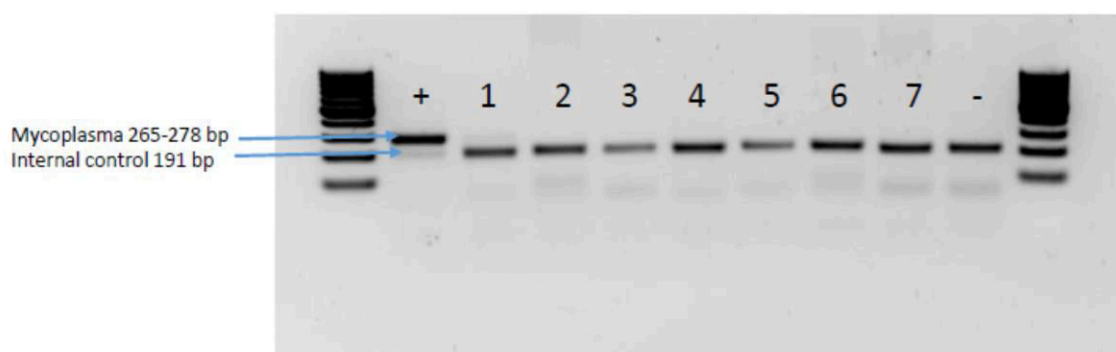
Ausencia de los transgenes de reprogramación. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH



Anexo 7

Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 03/05/2019



1 -CT PBiPS2-Sv4F-1 p5
2 -CT PBiPS2-Sv4F-2 p5
3 -CT PBiPS2-Sv4F-6 p3