

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)

SECCIÓN 1

Section 1

Información General

General Information

Nombre de la línea: bES[13]

Name of the line: bES[13]

(Células madre embrionarias de blastómero)

(Blastomeric embryonic stem cell)

Investigador principal: Juan Carlos Izpisúa Belmonte. Anna Veiga Lluch

Principal Investigator:

Investigador colaborador: Josep Santaló Pedro (UAB)

Collaborating 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

Documento de Solicitud de Depósito de Línea Celular. Versión 3

Los apartados que requieran entrada de texto, deben rellenarse tanto en Castellano como en Inglés

Text items should be filled in both Spanish and English

SECCIÓN 2
Section 2

Datos del Depositante
Applicant Details

Investigador Principal: Juan Carlos Izpisúa Belmonte. Anna Veiga Lluch. <i>Principal Investigator:</i> Investigador colaborador: Josep Santaló Pedro (UAB) <i>Collaborating investigator:</i>	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Dr Aiguader 88 08003 Barcelona
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona	Teléfono (phone): 93 3160303 Fax: 93 3160301 E-mail: gerencia@cmrb.eu

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> Embrión humano en estadio D+2 (4 células). <i>4 cells-stage human embryo</i>	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> <p style="text-align: center;">Fresco <input type="checkbox"/> Críoconservado <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i></p>	
Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> 23.11.2001	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 30.11.2011
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 24.08.2006	

<p>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></p> <p>El embrión criopreservado donado fue descongelado mediante un protocolo lento con PROH y sacarosa. El embrión había sido congelado en el 2º día de desarrollo. Tras 1 día de cultivo (6 células), se realizó una biopsia embrionaria mediante la perforación de la Zona Pelúcida (ZP) con un laser y la retirada de los blastómeros. Los blastómeros se incubaron por pares en un medio G2 (Vitrolife) suplementado con una concentración de 1.5 µg/ml de E-cadherina-Fc (Sigma) durante 24h. Posteriormente se eliminó la E-cadherina-Fc mediante un lavado en PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ durante 5 min. Se sembró y co-cultivó pares de blastómeros aislados sobre una monocapa de fibroblastos irradiados y medio de derivación</p> <p>The donated frozen embryo was thawed using a slow protocol with PROH and sucrose. The embryo had been frozen on day 2 of development. After 1 day of culture (6 cells), embryo biopsy was performed by drilling the zona pellucida (ZP) with a laser and the blastomeres isolation. The blastomeres were incubated in pairs in G2 medium (Vitrolife) supplemented with a concentration of 1.5 µg/ml of E-cadherin-Fc (Sigma) for 24 h. Then, the E-cadherin-Fc was removed by washing in PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺ for 5 min. Isolated pairs of blastomeres were seeded on a monolayer of irradiated fibroblast in derivation medium.</p>

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

Se realizó el aislamiento de los blastómeros mediante perforación de la zona pelúcida con láser.

The blastomere isolation was performed by drilling the zona pellucida(ZP) with a laser.

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).

Support: human foreskin fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, CCD1112Sk).

Culture medium: Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mmol/l

GlutaMAX (Gibco, InVitrogen corporation), 0,05mmol/l 2-mercaptoethanol (Gibco, InVitrogen corporation), 16

ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Cambrex), 20%

Knockout Serum Replacement (InVitrogen) y 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation).

Mantenimiento de la línea: Line maintenance

Ratio de pase: *Passage ratio 1:2-1:3 cada 6/7 días; 1:2-1:3 every 6/7 days*

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

Xenobióticos

Xenobiotics

si X

Yes X

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 grandes poligonales, ligeramente aplanadas, de un tamaño entre 1- 3 mm de diámetro de diversas formas con bordes lisos. Células de tamaño uniforme y una elevada relación núcleo/citoplasma.

Large and flat polygonal colonies, with uniformly sized cells of 1-3 mm of diameter. They have several forms and smooth edges. High nucleus/cytoplasm ratio.

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

Análisis de esterilidad, hongos, ureplasma y micoplasma. (ver Anexo 2)

Sterility analysis, fungi, ureplasm and mycoplasm. (see Annex 2)

Marcadores: ver Anexo 3*Markers: see Annex 3*

	Método (ARN/proteínas) Method (RNA/proteins)	nº pase Passage n.	resultado results	comentarios comments
Oct 4	inmunofluorescencia	5	+	
Nanog	inmunofluorescencia	5	+	
Rex				
Sox 2	inmunofluorescencia	5	+	
SSEA3	inmunofluorescencia	5	+	
SSEA4	inmunofluorescencia	5	+	
TRA-1-60	inmunofluorescencia	5	+	
TRA-1-81	inmunofluorescencia	5	+	
Telomerasa				
Fosfatasa Alk.	actividad	5	+	
Cariotipo / Karyotype		10	46,XX	(ver Anexo 4)
Otros / Others				

Capacidad de diferenciación*Differentiation capacity*

	Ectodermo/ Ectoderm			Endodermo/Endoderm			Mesodermo/ Mesoderm		
	marcador marker	pase passage	resultado result	marcador marker	pase passage	resultado result	marcador marker	pase passage	resultado result
In Vitro	Tuj1	5	+	α-feto proteína(AFP)	5	+	ASMA	5	+
<i>In vitro</i>	GFAP	5	+	FOXA2	5	+	ASA	5	+
Ver Anexo 5									
In vivo/ in vivo									
Ver Anexo 6				Método: formación de teratomas en ratones SCID			Resultado: +		
				<i>Method: teratoma formation in SCID mice</i>			<i>Result: +</i>		

Descripción de las características de diferenciación *in vitro*

Description of the differentiation characteristics in vitro

Mesodermo: cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en medio de cultivo suplementado con ácido ascórbico.
Endodermo: cultivo de cuerpos embrioides. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27.

Mesoderm: Embryoids bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27..

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 clumps de células indiferenciadas y tras aproximadamente 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo. (ver Anexo 6).

Clumps of undifferentiated cells were injected into the testis and under the skin of SCID mice. Around 8 weeks later teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (see Annex 6).

Datos de la tipificación HLA

HLA typification data

Ver Anexo 1

See Annex 1

Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.

Cell consistency after 6 passages of freezing and thawing. Results.

Se observa consistencia celular tras congelación y descongelación con crecimiento adecuado y características de indiferenciación.

Cellular consistency after freezing and thawing, with adequate growth and undifferentiation characteristics.

Pase en el momento del registro

Passage at the time of the recording

P25

¿Ha sido la línea modificada genéticamente?

Has the line been genetically modified?

Sí Yes

No No

Comentarios/ Comments:

¿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):

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> CMRB <small>Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona</small> Fecha / Date: 30/07/2012 Dr. Aiguader, 88</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p></p> <p>Fecha /Date 30/07/2012</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Miguel Gómez Clares</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Dr. Aiguader, 88, 7ª planta 08003, Barcelona</p>	<p>Teléfono /Telephone: +34 93 316 03 03 Fax: +34 93 316 03 01 E-mail: gerencia@cmrb.eu</p>