

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA  
LÍNEA CELULAR **IC-PD4-F-iPS-4F-1** EN EL BANCO  
NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANNEXES TO THE APPLICATION FORM FOR DEPOSITING  
**IC-PD4-F-iPS-4F-1** CELL LINE  
INTO THE NATIONAL BANK OF STEM CELL LINES

## ANEXOS / ANNEXES

Anexo 1: Test de pluripotencia de la línea [IC-PD4-F-iPS-4F-1](#)  
Annex 1: Pluripotency Test

Anexo 2: Test de diferenciación in vitro de la línea [IC-PD4-F-iPS-4F-1](#)  
Annex 2: In vitro differentiation Test

Anexo 3: Cariotipo de la línea [IC-PD4-F-iPS-4F-1](#)  
Annex 3: Karyotype

Anexo 4: Huella genética de la línea [IC-PD4-F-iPS-4F-1](#)  
Annex 4: Genetic fingerprinting

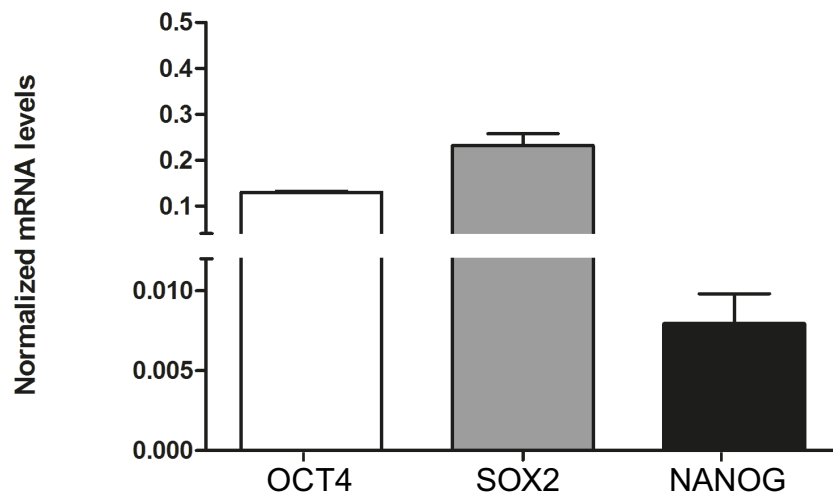
Anexo 5: Test de silenciamiento de la línea [IC-PD4-F-iPS-4F-1](#)  
Annex 5: Silencing Test

Anexo 6: Confirmación del diagnóstico genotípico de la línea [IC-PD4-F-iPS-4F-1](#)  
Annex 6: Confirmation of genotypic diagnosis of the line

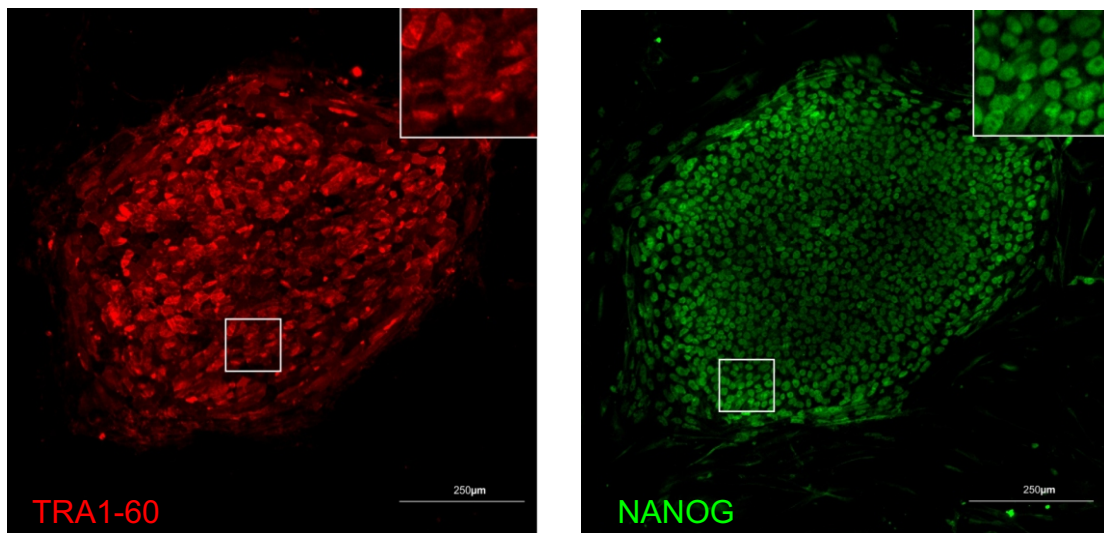
Anexo 7: Test de micoplasma de la línea [IC-PD4-F-iPS-4F-1](#)  
Annex 7: Mycoplasma Test

Anexo 1  
Test de pluripotencia de la línea IC-PD4-F-iPS-4F-1

Annex 1  
Pluripotency Test

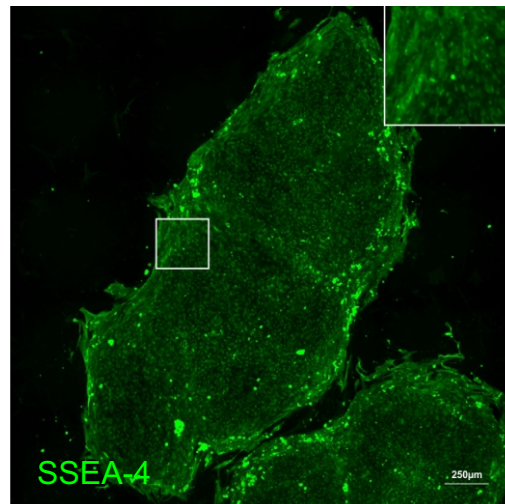


Niveles de expresion de OCT4, SOX2 y NANOG de la línea IC-PD4-F-iPS-4F-1  
Expression levels of OCT4, SOX2 and NANOG

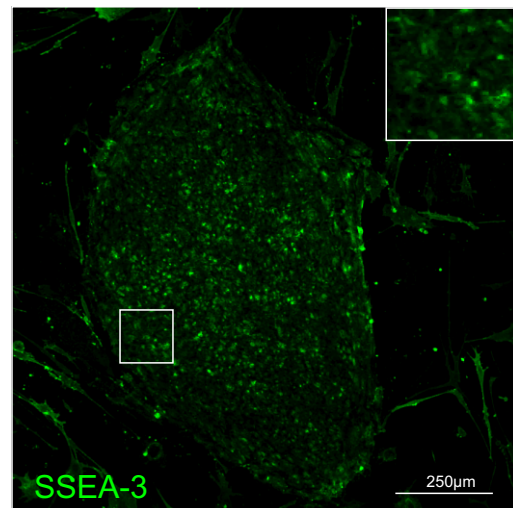
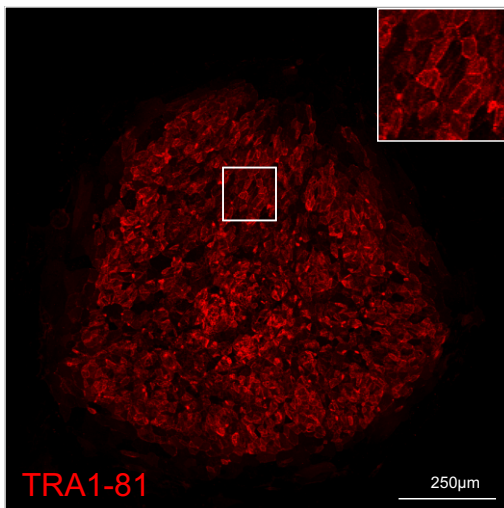


Detección por inmunofluorescencia de la expresión de TRA1-60 y NANOG en la línea IC-PD4-F-iPS-4F-1

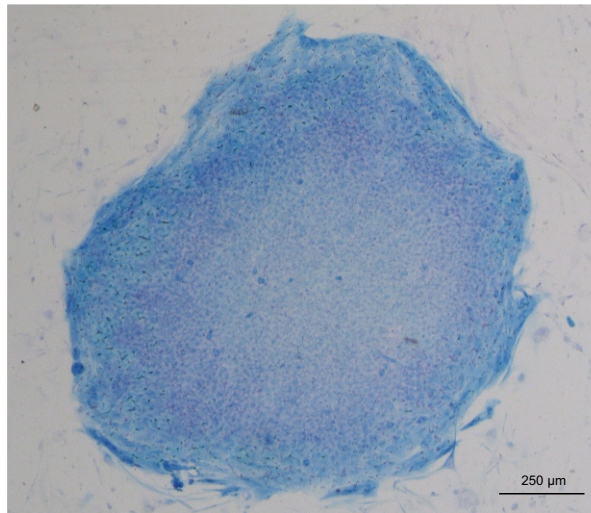
Immunofluorescence detection of TRA1-60 and NANOG expression



Detección por inmunofluorescencia de la expresión de SSEA-4  
en la línea IC-PD4-F-iPS-4F-1  
Immunofluorescence detection of SSEA-4 expression



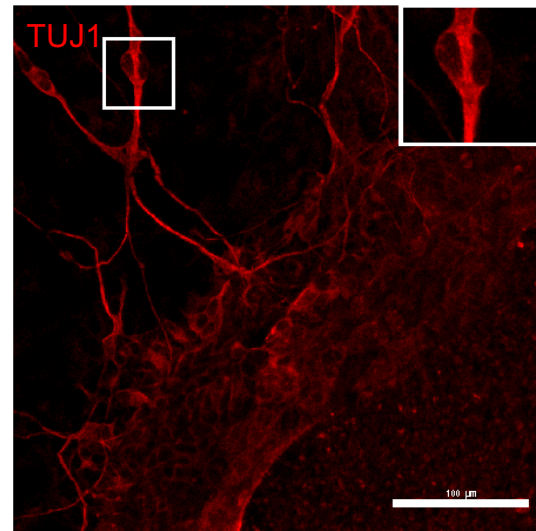
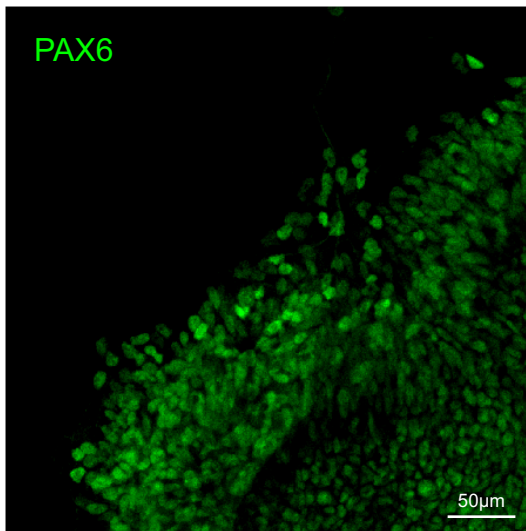
Detección por inmunofluorescencia de la expresión de TRA1-81 y SSEA-3 en  
la línea IC-PD4-F-iPS-4F-1  
Immunofluorescence detection of TRA1-81 and SSEA-3 expression



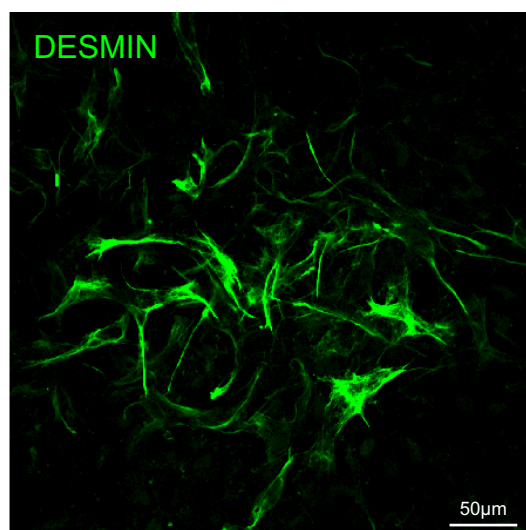
Detección por inmunocitoquímica de la actividad fosfatasa alcalina  
en la línea IC-PD4-F-iPS-4F-1  
Immunocytochemistry detection of alkaline phosphatase activity

Anexo 2  
Test de diferenciación in vitro de la línea IC-PD4-F-iPS-4F-1

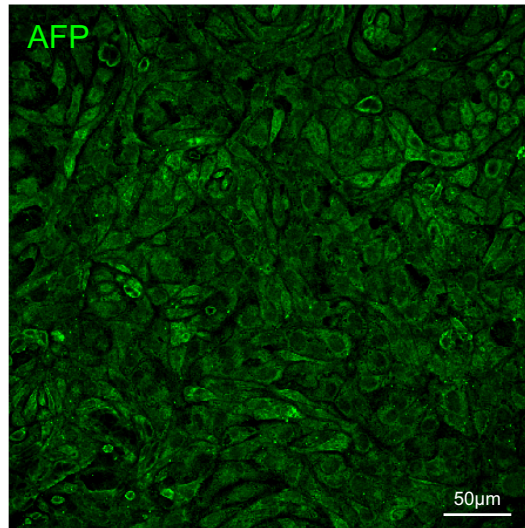
Annex 2  
In vitro differentiation Test



Diferenciación in vitro a Ectodermo de la línea IC-PD4-F-iPS-4F-1. Células positivas para PAX6 y TUJ1.  
In vitro differentiation into Ectoderm. PAX6 and TUJ1 positive cells.



Diferenciación in vitro a Mesodermo de la línea IC-PD4-F-iPS-4F-1. Células positivas para DESMIN.  
In vitro differentiation into Mesoderm. DESMIN positive cells.



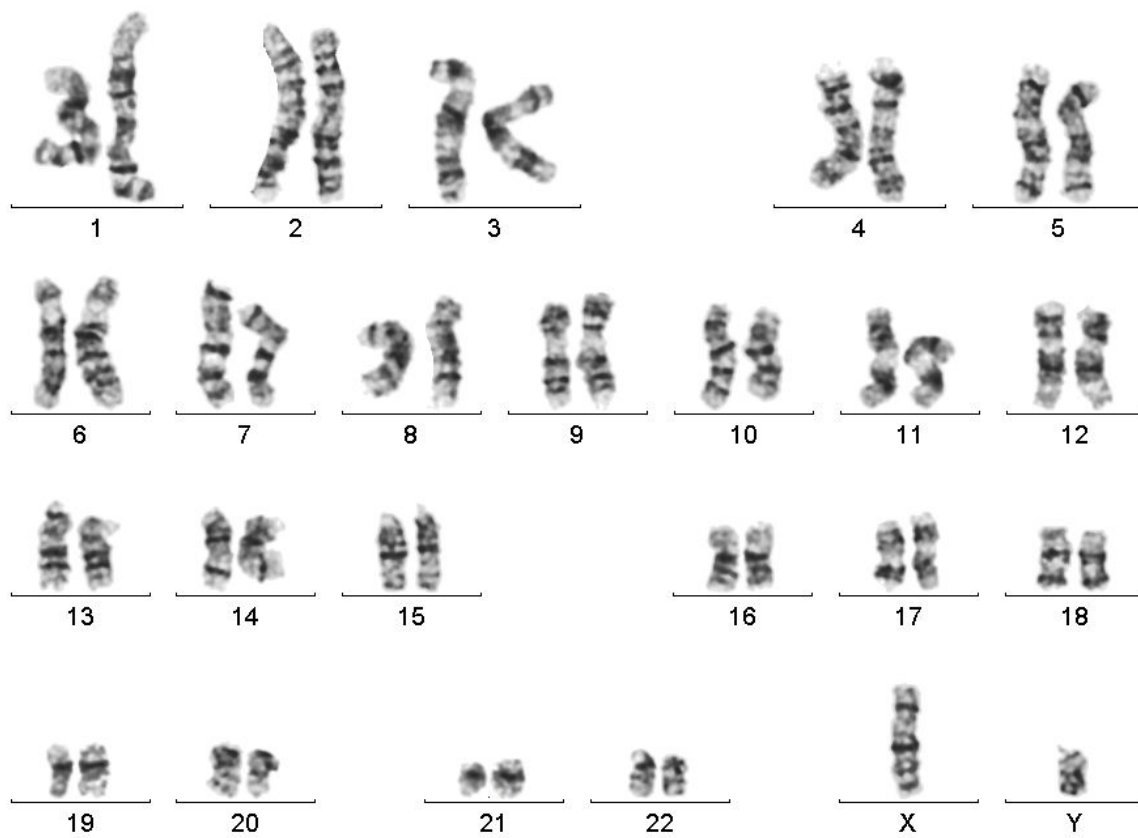
Diferenciación in vitro a Endodermo de la línea [IC-PD4-F-iPS-4F-1](#). Células positivas para alfa-fetoproteína.

In vitro differentiation into Endoderm. Alpha-fetoprotein positive cells.



Anexo 3  
Cariotipo de la línea IC-PD4-F-iPS-4F-1

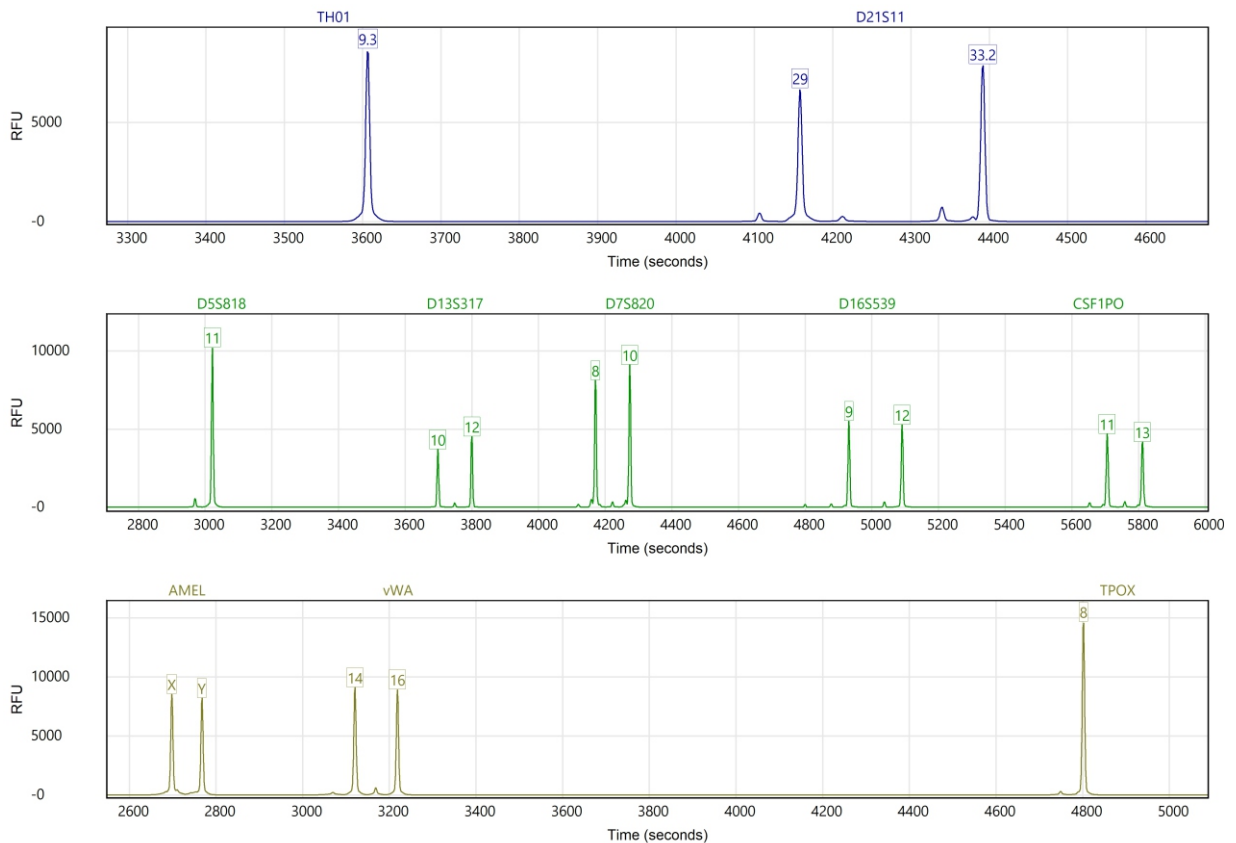
Annex 3  
Karyotype





## Anexo 4 Huella genética de la línea IC-PD4-F-iPS-4F-1.

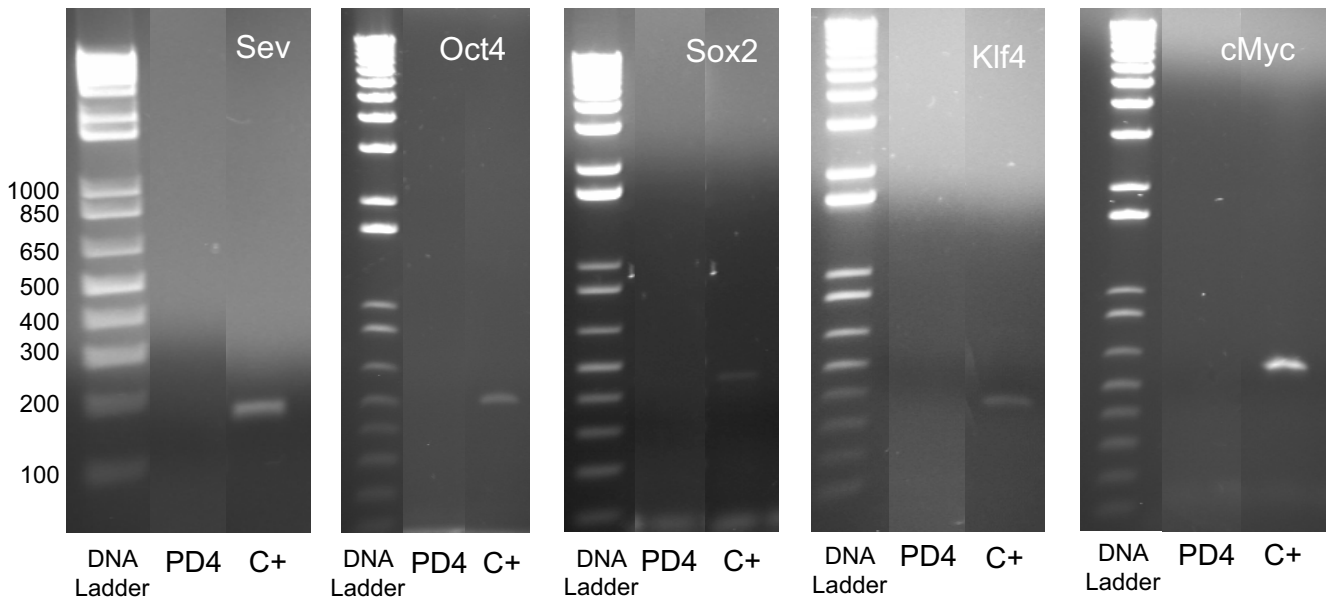
### Annex 4 Genetic fingerprinting



| GenePrint10 Marker | Test Sample Profile |
|--------------------|---------------------|
| TH01               | 9.3                 |
| D21S11             | 29, 33.2            |
| D5S818             | 11                  |
| D13S317            | 10, 12              |
| D7S820             | 8, 10               |
| D16S539            | 9, 12               |
| CSF1PO             | 11, 13              |
| AMEL               | X, Y                |
| vWA                | 14, 16              |
| TPOX               | 8                   |

Anexo 5  
Test de silenciamiento de la línea IC-PD4-F-iPS-4F-1

Annex 5  
Silencing Test



| Gene | Primer (5'-3') | Length                                  |
|------|----------------|---|
| Sev  | Forward        | GGA TCA CTA GGT GAT ATC GAG C*          |
|      | Reverse        | ACC AGA CAA GAG TTT AAG AGA TAT GTA TC* |
| Oct4 | Forward        | ATG CAC CGC TAC GAC GTG AGC GC          |
|      | Reverse        | AAT GTA TCG AAG GTG CTC AA*             |
| Sox2 | Forward        | TTC CTG CAT GCC AGA GGA GCC C           |
|      | Reverse        | AAT GTA TCG AAG GTG CTC AA*             |
| Klf4 | Forward        | TAA CTG ACT AGC AGG CTT GTC G*          |
|      | Reverse        | TCC ACA TAC AGT CCT GGA TGA TGA TG      |
| cMyc | Forward        | CCC GAA AGA GAA AGC GAA CCA G           |
|      | Reverse        | AAT GTA TCG AAG GTG CTC AA*             |

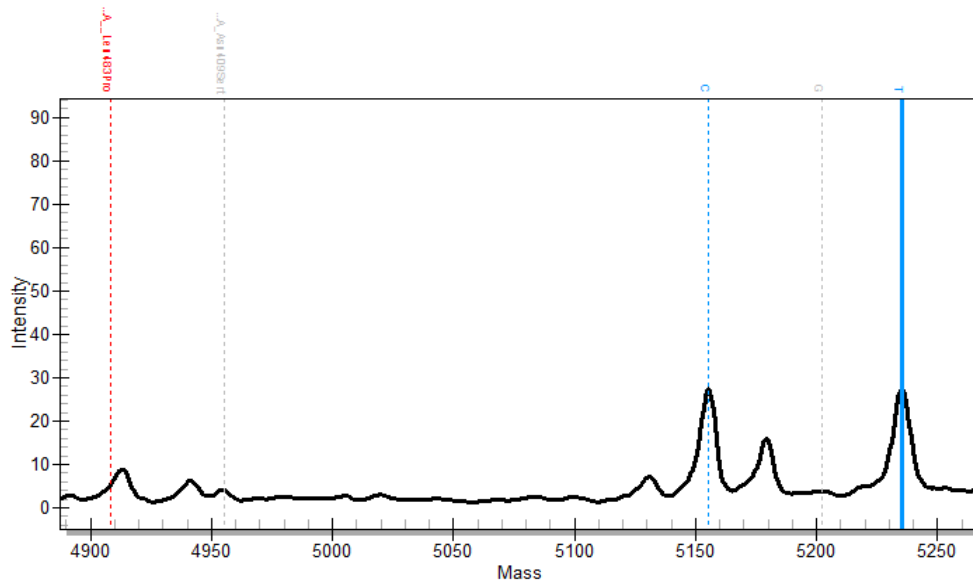
\* Primer contains SeV genome sequences. Pairing of these primers with transgene-specific primers allows specific detection of transgenes carried by the CytoTune™ Sendai reprogramming vectors. Note that the same reverse primer is used for detecting Sox2, Klf4, and Oct4.

Anexo 6  
Confirmación del diagnóstico genotípico de la línea IC-PD4-F-iPS-4F-1

Annex 6  
Confirmation of genotypic diagnosis of the line

| Alelo | cDNA          | Proteína       | Exon |
|-------|---------------|----------------|------|
| L444P | c. 1448 T > C | p. Leu 483 Pro | 10   |

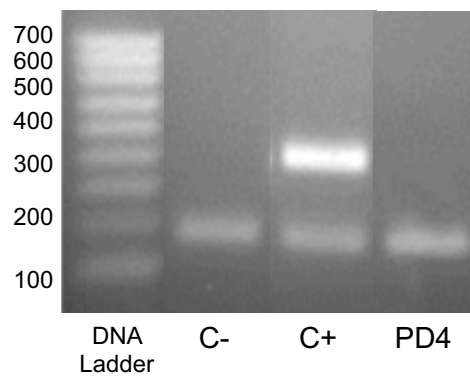
GBA\_\_Leu483Pro



El espectro de masas a partir de muestras que tienen la mutación L444P en heterocigosis muestra picos de T y C en las posiciones en torno a 5155 y 5235, respectivamente.

Anexo 7  
Test de micoplasma de la línea IC-PD4-F-iPS-4F-1

Annex 7  
Mycoplasma Test



- Contaminación: Bandas entre 448-611 bp Micoplasma positivo
- Control interno 270 bp
- A mayor contaminación menos amplificación del control interno
- C- : control interno
- C+ : control positivo de cultivo contaminado con micoplasma