

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **IC-PD5-F-iPS-4F-1** EN EL BANCO
NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANNEXES TO THE APPLICATION FORM FOR DEPOSITING
IC-PD5-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-PD5-F-iPS-4F-1](#)

Annex 1: Pluripotency Test

Anexo 2: Test de diferenciación in vitro de la línea [IC-PD5-F-iPS-4F-1](#)

Annex 2: In vitro differentiation Test

Anexo 3: Cariotipo de la línea [IC-PD5-F-iPS-4F-1](#)

Annex 3: Karyotype

Anexo 4: Huella genética de los fibroblastos (células de origen)

y de la línea [IC-PD5-F-iPS-4F-1](#)

Annex 4: Genetic fingerprinting

Anexo 5: Test de silenciamiento de la línea [IC-PD5-F-iPS-4F-1](#)

Annex 5: Silencing Test

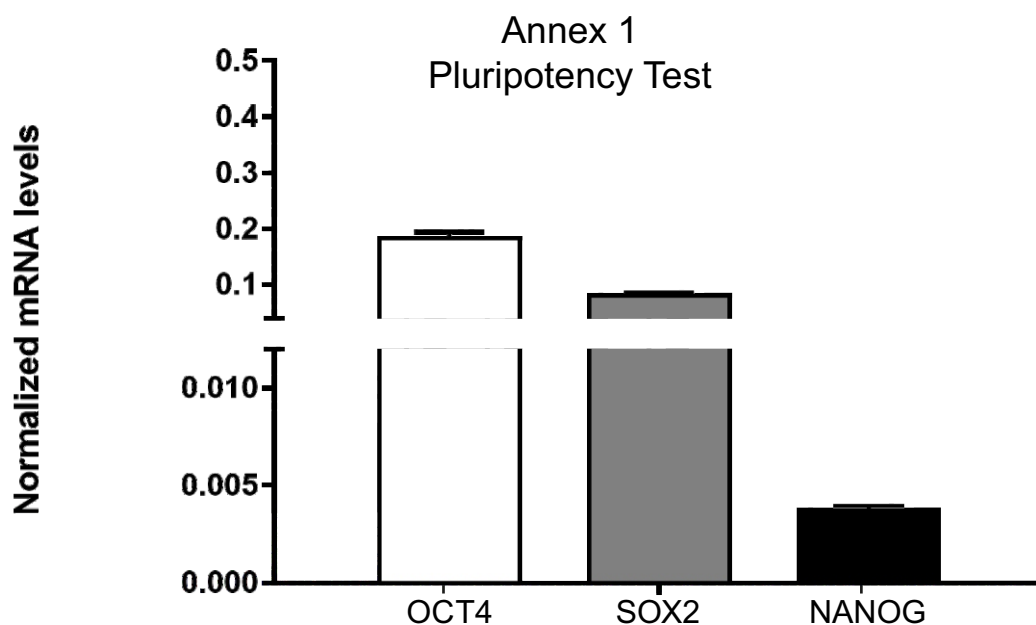
Anexo 6: Confirmación del diagnóstico genotípico de la línea [IC-PD5-F-iPS-4F-1](#)

Annex 6: Confirmation of genotypic diagnosis of the line

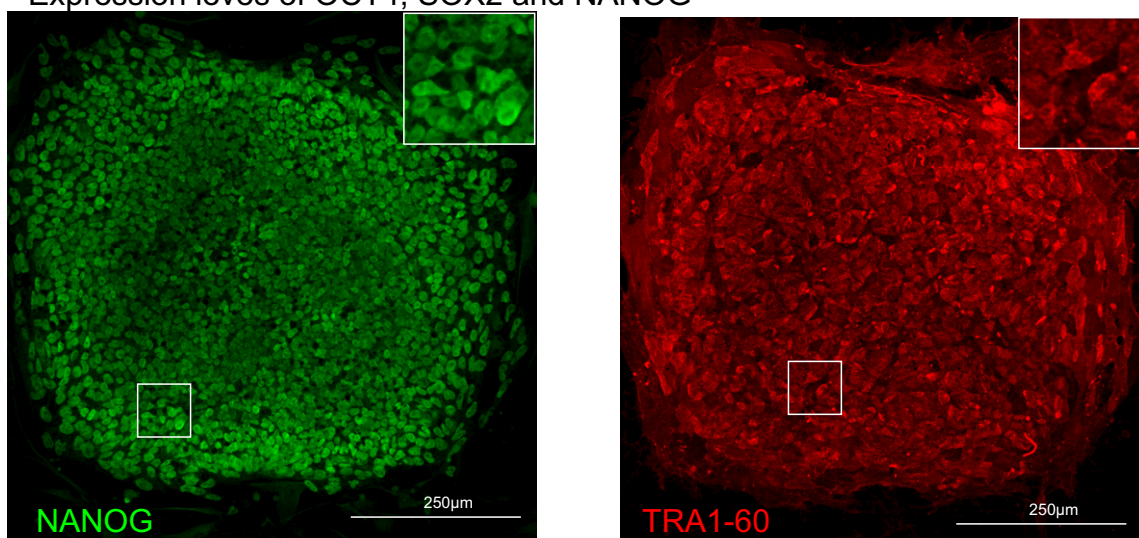
Anexo 7: Test de micoplasma de la línea [IC-PD5-F-iPS-4F-1](#)

Annex 7: Mycoplasma Test

Anexo 1
Test de pluripotencia de la línea IC-PD5-F-iPS-4F-1

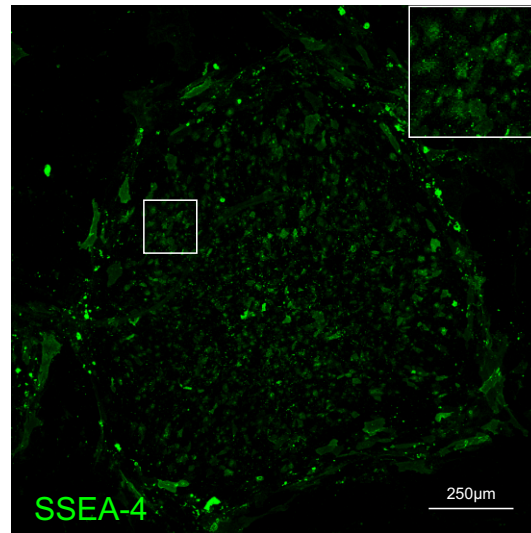


Niveles de expresion de OCT4, SOX2 y NANOG de la línea IC-PD5-F-iPS-4F-1
Expression levels of OCT4, SOX2 and NANOG

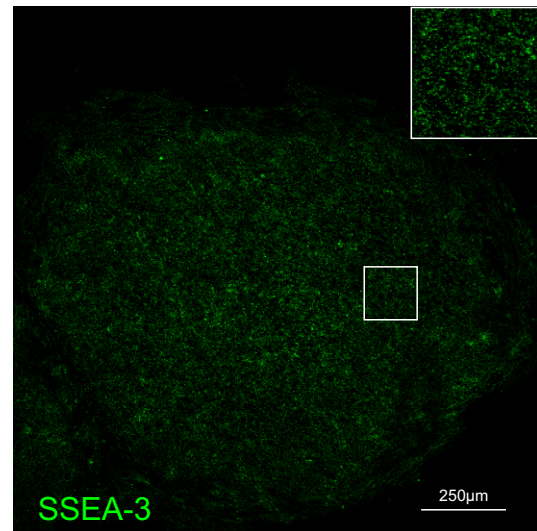
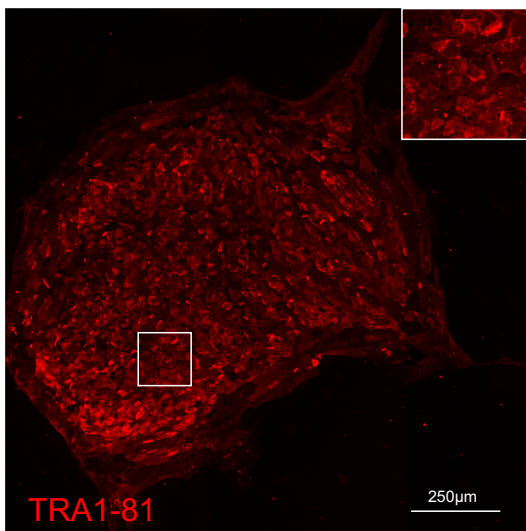


Detección por inmunofluorescencia de la expresión de TRA1-60 y NANOG en la línea IC-PD5-F-iPS-4F-1

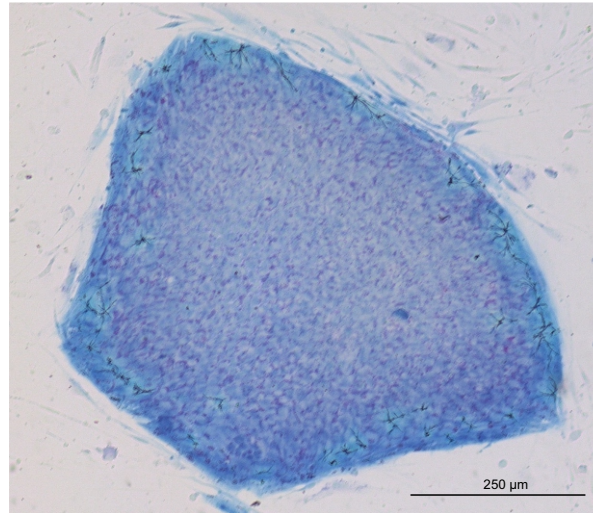
Immunofluorescence detection of TRA1-60 and NANOG expression



Detección por inmunofluorescencia de la expresión de SSEA-4
en la línea IC-PD5-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-PD5-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-PD5-F-iPS-4F-1

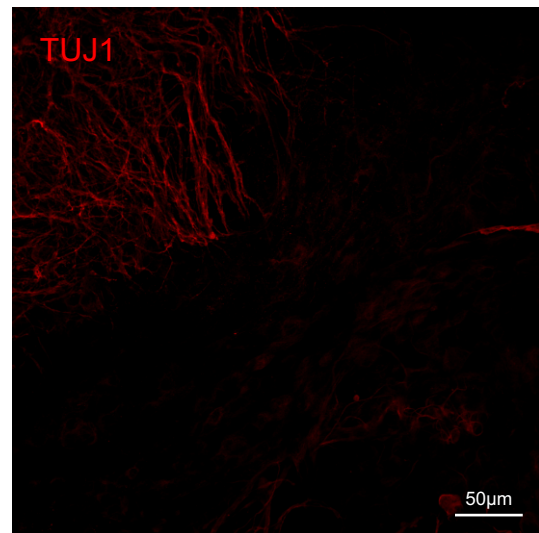
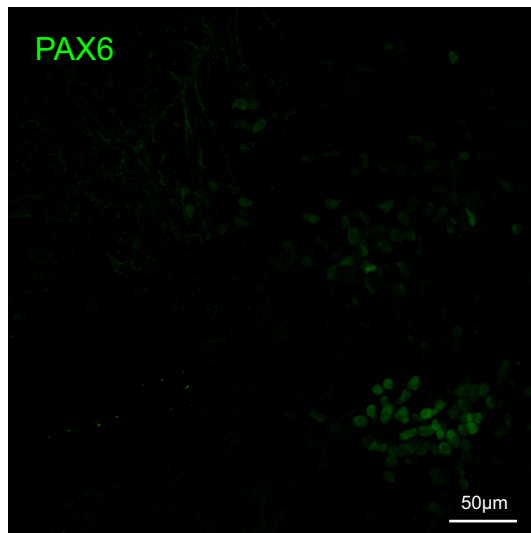
Immunocytochemistry detection of alkaline phosphatase activity

Anexo 2

Test de diferenciación *in vitro* de la línea IC-PD5-F-iPS-4F-1

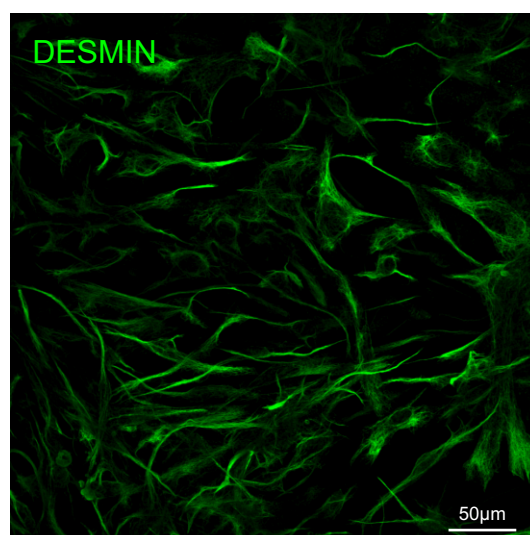
Annex 2

In vitro differentiation Test



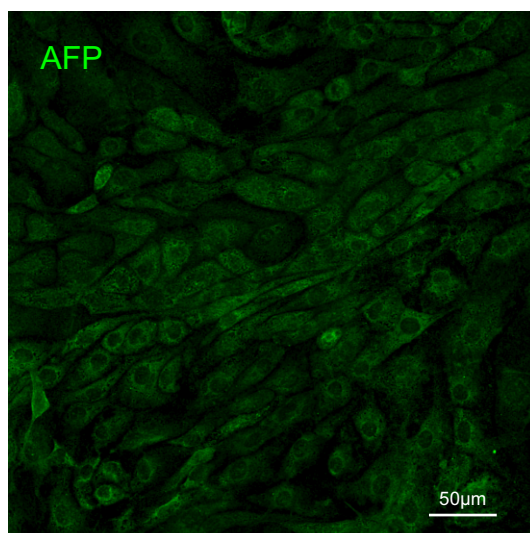
Diferenciación *in vitro* a Ectodermo de la línea IC-PD5-F-iPS-4F-1. Células positivas para PAX6 y TUJ1.

In vitro differentiation into Ectoderm. PAX6 and TUJ1 positive cells.



Diferenciación *in vitro* a Mesodermo de la línea IC-PD5-F-iPS-4F-1. Células positivas para DESMIN.

In vitro differentiation into Mesoderm. DESMIN positive cells.

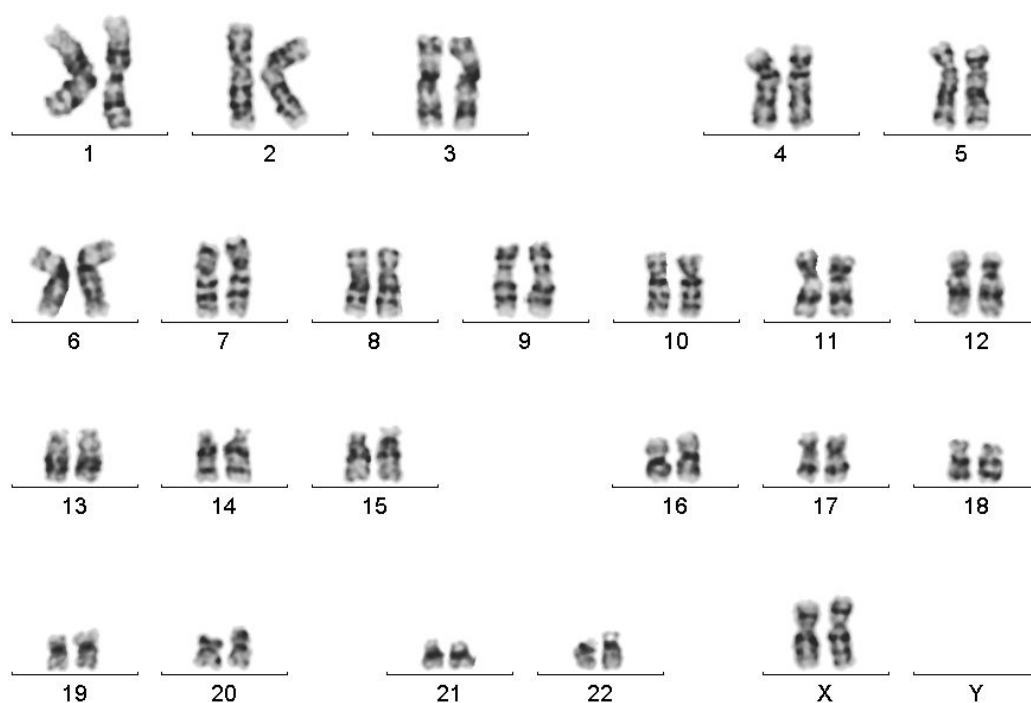


Diferenciación in vitro a Endodermo de la línea **IC-PD5-F-iPS-4F-1**. Células positivas para alfa-fetoproteína.

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

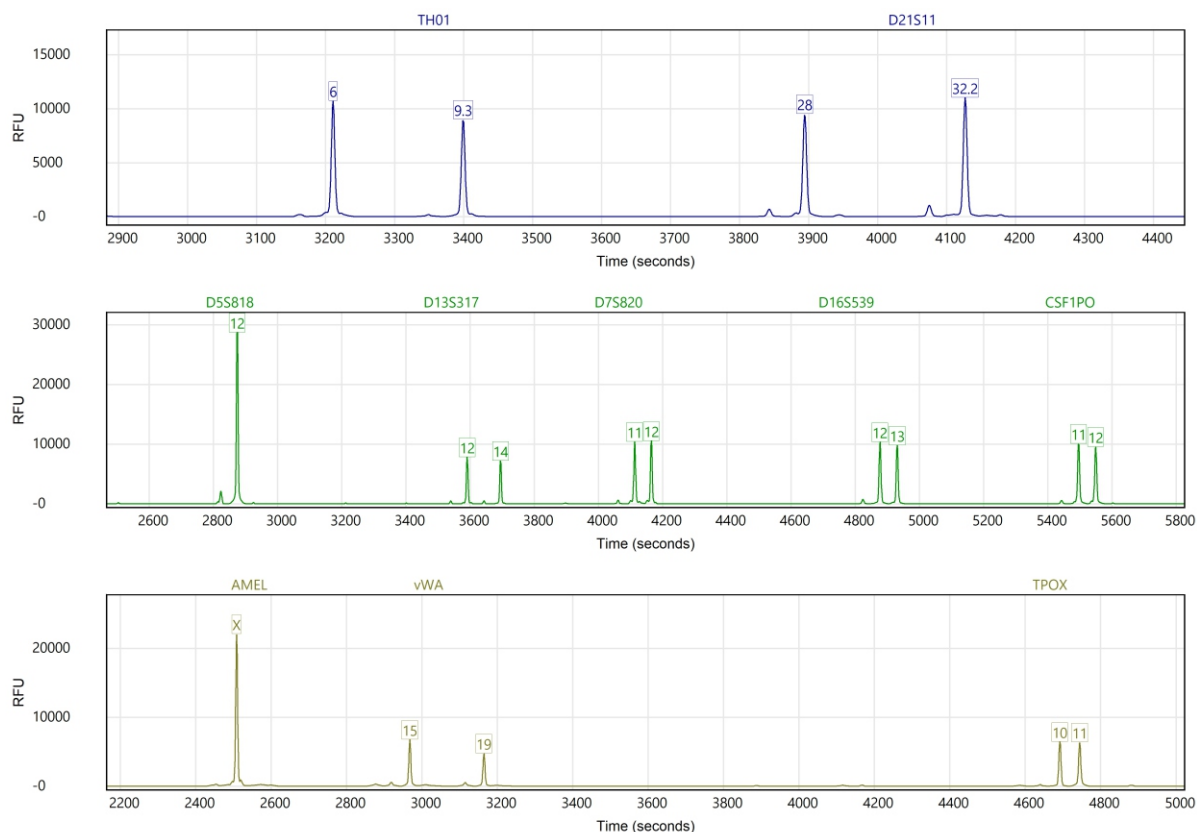
Anexo 3
Cariotipo de la línea **IC-PD5-F-iPS-4F-1**

Annex 3
Karyotype



Anexo 4 Huella genética de los fibroblastos (células de origen)

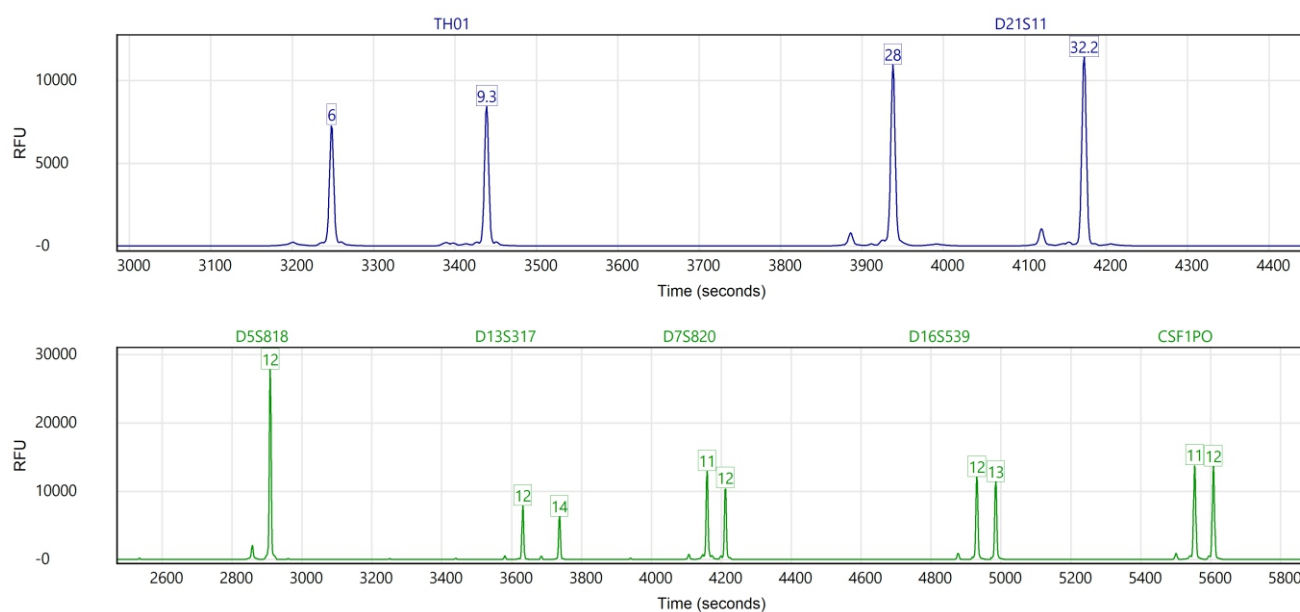
Annex 4 Genetic fingerprinting of fibroblasts



GenePrint10 Marker	Test Sample Profile
TH01	6, 9.3
D21S11	28, 32.2
D5S818	12
D13S317	12, 14
D7S820	11, 12
D16S539	12, 13
CSF1PO	11, 12
AMEL	X
vWA	15, 19
TPOX	10, 11

Anexo 4
Huella genética de la línea IC-PD5-F-iPS-4F-1.

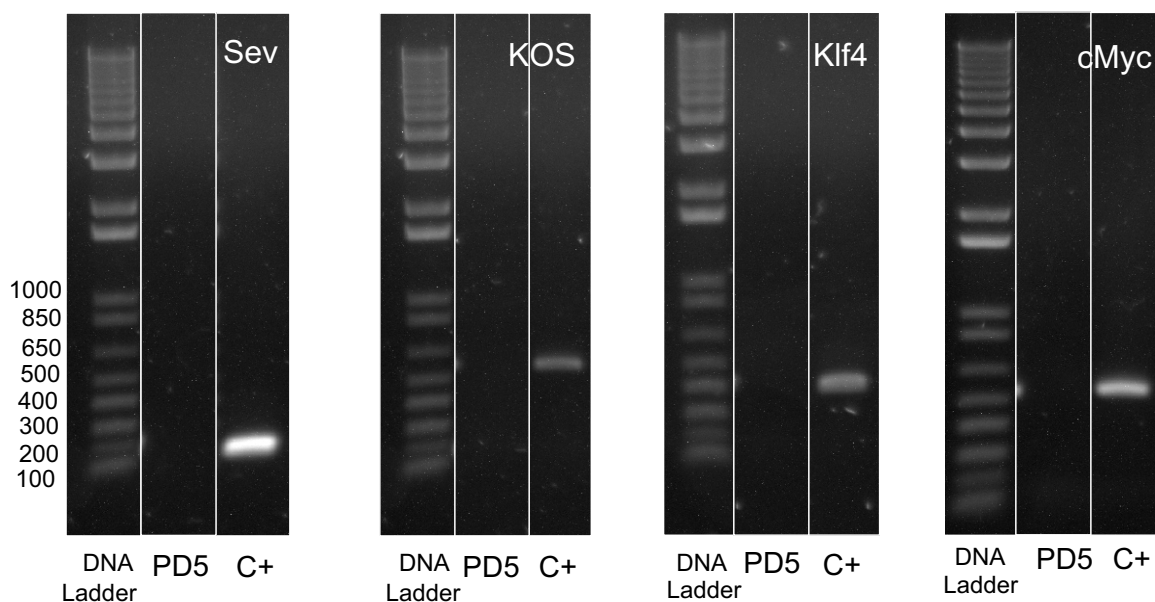
Annex 4
Genetic fingerprinting



GenePrint10 Marker	Test Sample Profile
TH01	6, 9.3
D21S11	28, 32.2
D5S818	12
D13S317	12, 14
D7S820	11, 12
D16S539	12, 13
CSF1PO	11, 12
AMEL	X
vWA	15, 19
TPOX	10, 11

Anexo 5
Test de silenciamiento de la línea IC-PD5-F-iPS-4F-1

Annex 5
Silencing Test



		Primer (5'-3')	Length
Sev	Forward	GGA TCA CTA GGT GAT ATC GAG C*	181 bp
	Reverse	ACC AGA CAA GAG TTT AAG AGA TAT GTA TC*	
KOS	Forward	ATG CAC CGC TAC GAC GTG AGC GC	483 bp
	Reverse	ACC TTG ACA ATC CTG ATG TGG	
Klf4	Forward	TTC CTG CAT GCC AGA GGA GCC C	410 bp
	Reverse	AAT GTA TCG AAG GTG CTC AA*	
cMyc	Forward	TAA CTG ACT AGC AGG CTT GTC G*	532 bp
	Reverse	TCC ACA TAC AGT CCT GGA TGA TGA TG	

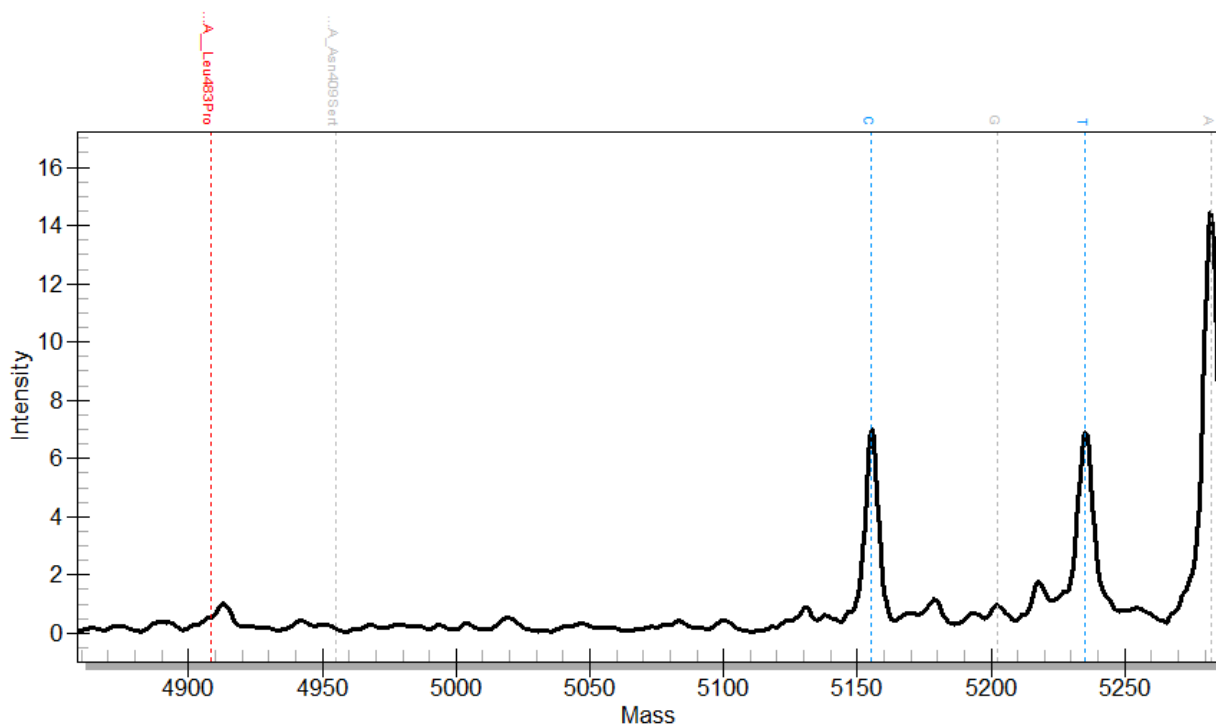
* Primer contains SeV genome sequences. Pairing of these primers with transgene-specific primers allows specific detection of transgenes carried by the CytoTune™ 2.0 Sendai reprogramming vectors.

Anexo 6
Confirmación del diagnóstico genotípico de la línea **IC-PD5-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

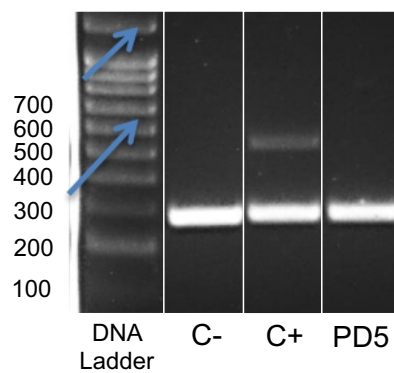
GBA__Leu483Pro



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-PD5-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