

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **IC-PD3-F-iPS-4F-1** EN EL BANCO
NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANNEXES TO THE APPLICATION FORM FOR DEPOSITING
IC-PD3-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-PD3-F-iPS-4F-1](#)

Annex 1: Pluripotency Test

Anexo 2: Test de diferenciación in vitro de la línea [IC-PD3-F-iPS-4F-1](#)

Annex 2: In vitro differentiation Test

Anexo 3: Cariotipo de la línea [IC-PD3-F-iPS-4F-1](#)

Annex 3: Karyotype

Anexo 4: Huella genética de la línea [IC-PD3-F-iPS-4F-1](#)

Annex 4: Genetic fingerprinting

Anexo 5: Test de silenciamiento de la línea [IC-PD3-F-iPS-4F-1](#)

Annex 5: Silencing Test

Anexo 6: Confirmación del diagnóstico genotípico de la línea [IC-PD3-F-iPS-4F-1](#)

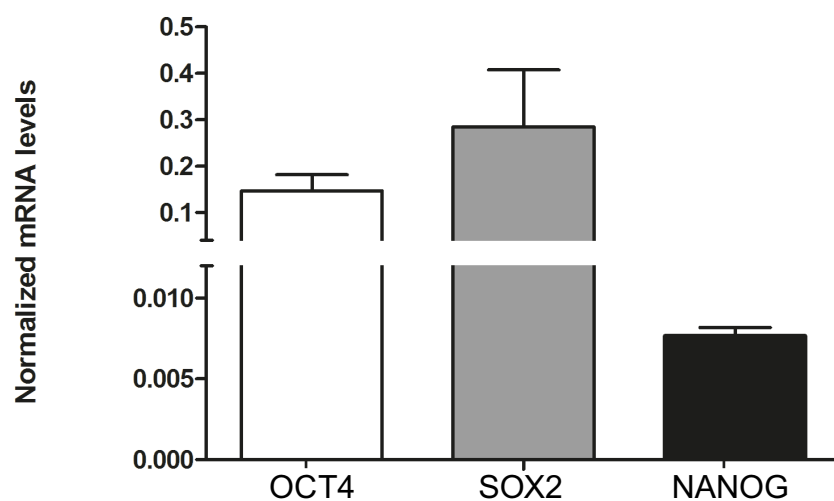
Annex 6: Confirmation of genotypic diagnosis of the line

Anexo 7: Test de micoplasma de la línea [IC-PD3-F-iPS-4F-1](#)

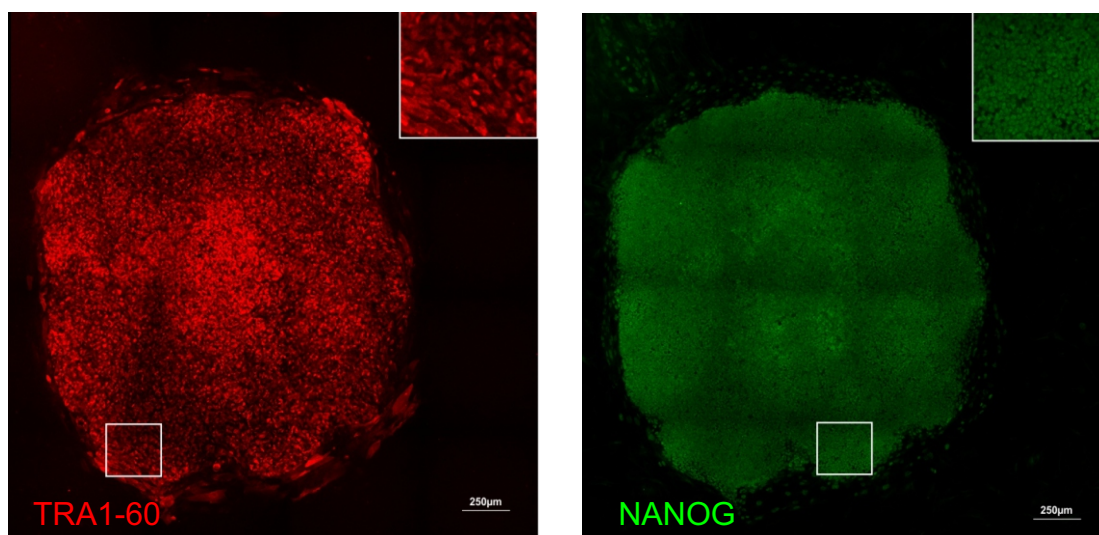
Annex 7: Mycoplasma Test

Anexo 1
Test de pluripotencia de la línea IC-PD3-F-iPS-4F-1

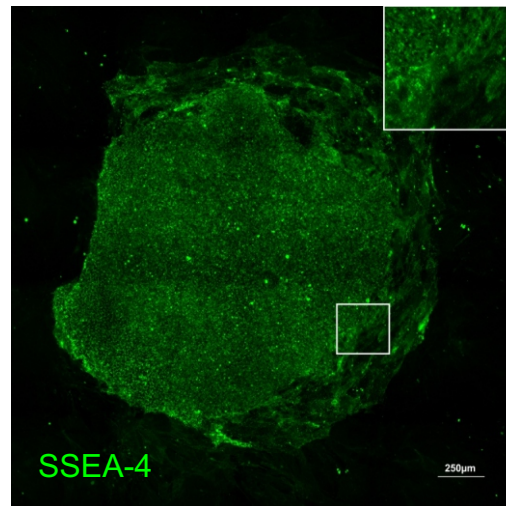
Annex 1
Pluripotency Test



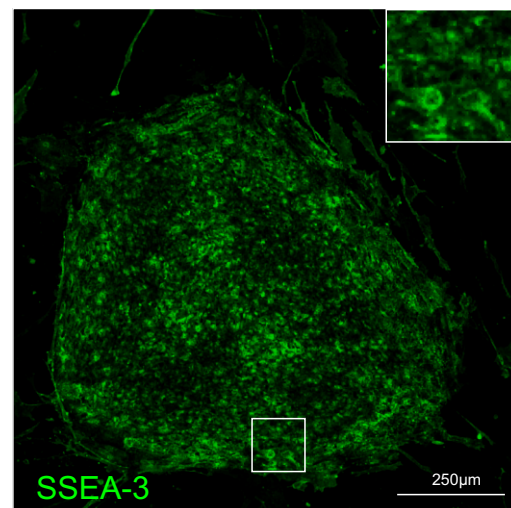
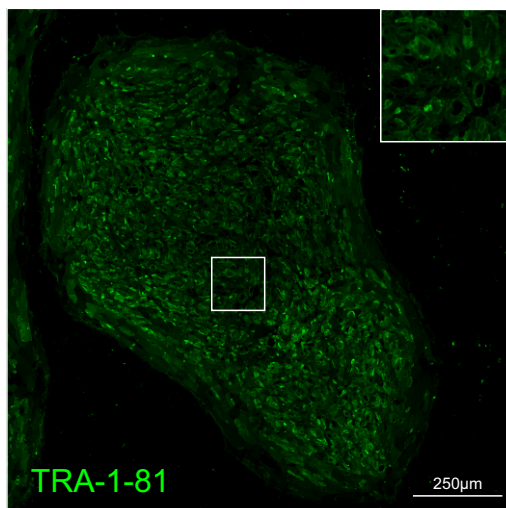
Niveles de expresion de OCT4, SOX2 y NANOG de la línea IC-PD3-F-iPS-4F-1
Expression levels of OCT4, SOX2 and NANOG



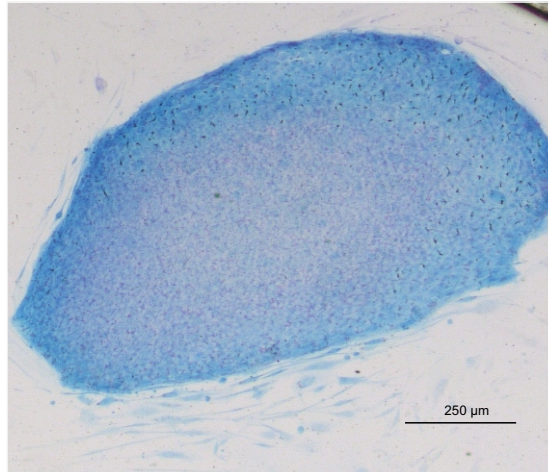
Detección por inmunofluorescencia de la expresion de TRA1-60 y NANOG en la línea IC-PD3-F-iPS-4F-1
Immunofluorescence detection of TRA1-60 and NANOG expression



Detección por inmunofluorescencia de la expresión de SSEA-4
en la línea [IC-PD3-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-PD3-F-iPS-4F-1](#)
Immunofluorescence detection of TRA1-81 and SSEA-3 expression



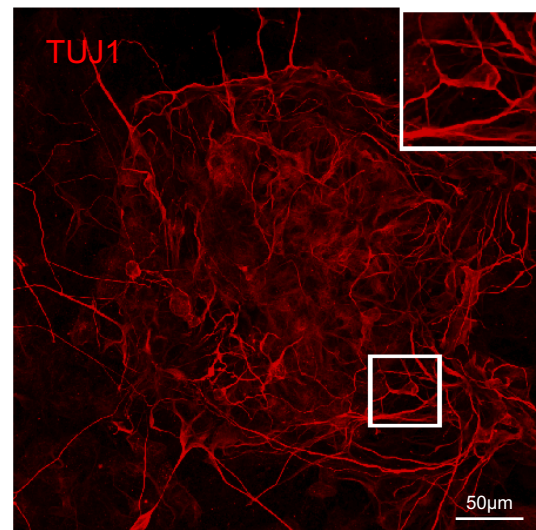
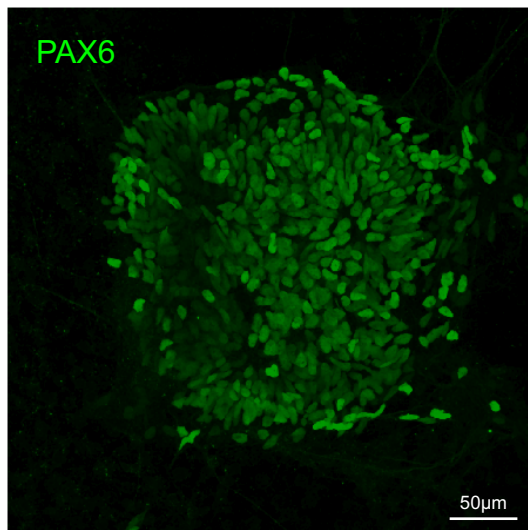
Detección por inmunocitoquímica de la actividad fosfatasa alcalina
en la línea [IC-PD3-F-iPS-4F-1](#)
Immunocytochemistry detection of alkaline phosphatase activity

Anexo 2

Test de diferenciación in vitro de la línea IC-PD3-F-iPS-4F-1

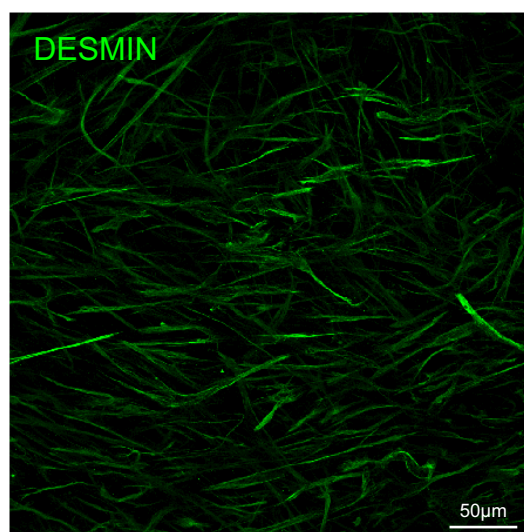
Annex 2

In vitro differentiation Test



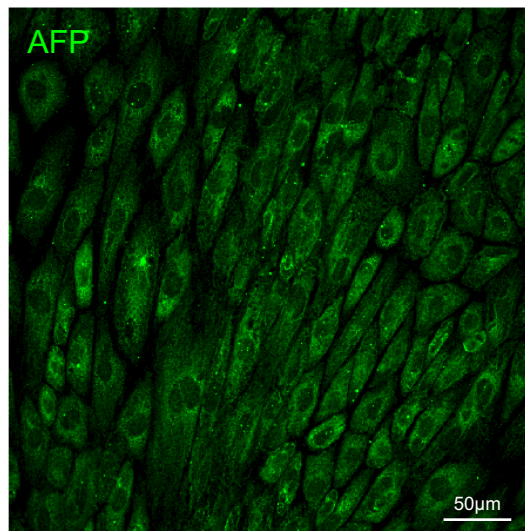
Diferenciación in vitro a Ectodermo de la línea IC-PD3-F-iPS-4F-1. Células positivas para PAX6 y TUJ1.

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



Diferenciación in vitro a Mesodermo de la línea IC-PD3-F-iPS-4F-1. Células positivas para DESMIN.

In vitro differentiation into Mesoderm. DESMIN positive cells.

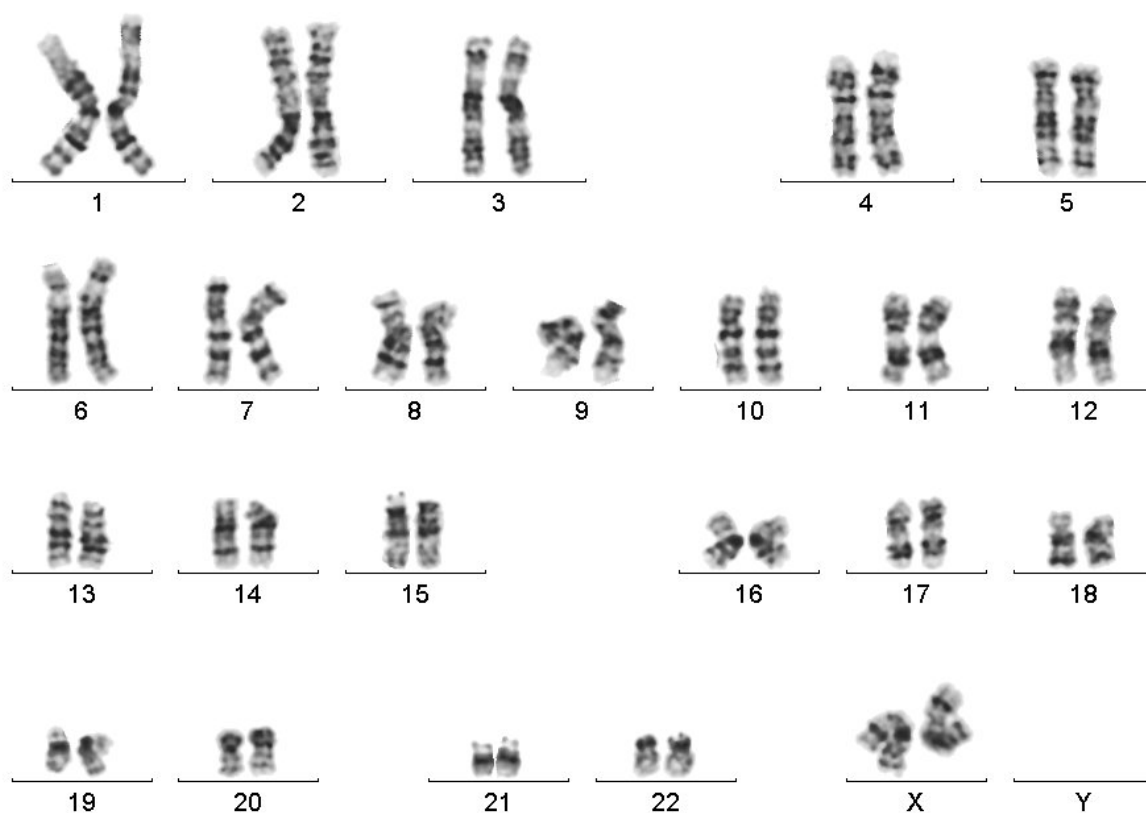


Diferenciación in vitro a Endodermo de la línea **IC-PD3-F-iPS-4F-1**. Células positivas para alfa-fetoproteína.

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

Anexo 3
Cariotipo de la línea IC-PD3-F-iPS-4F-1

Annex 3
Karyotype

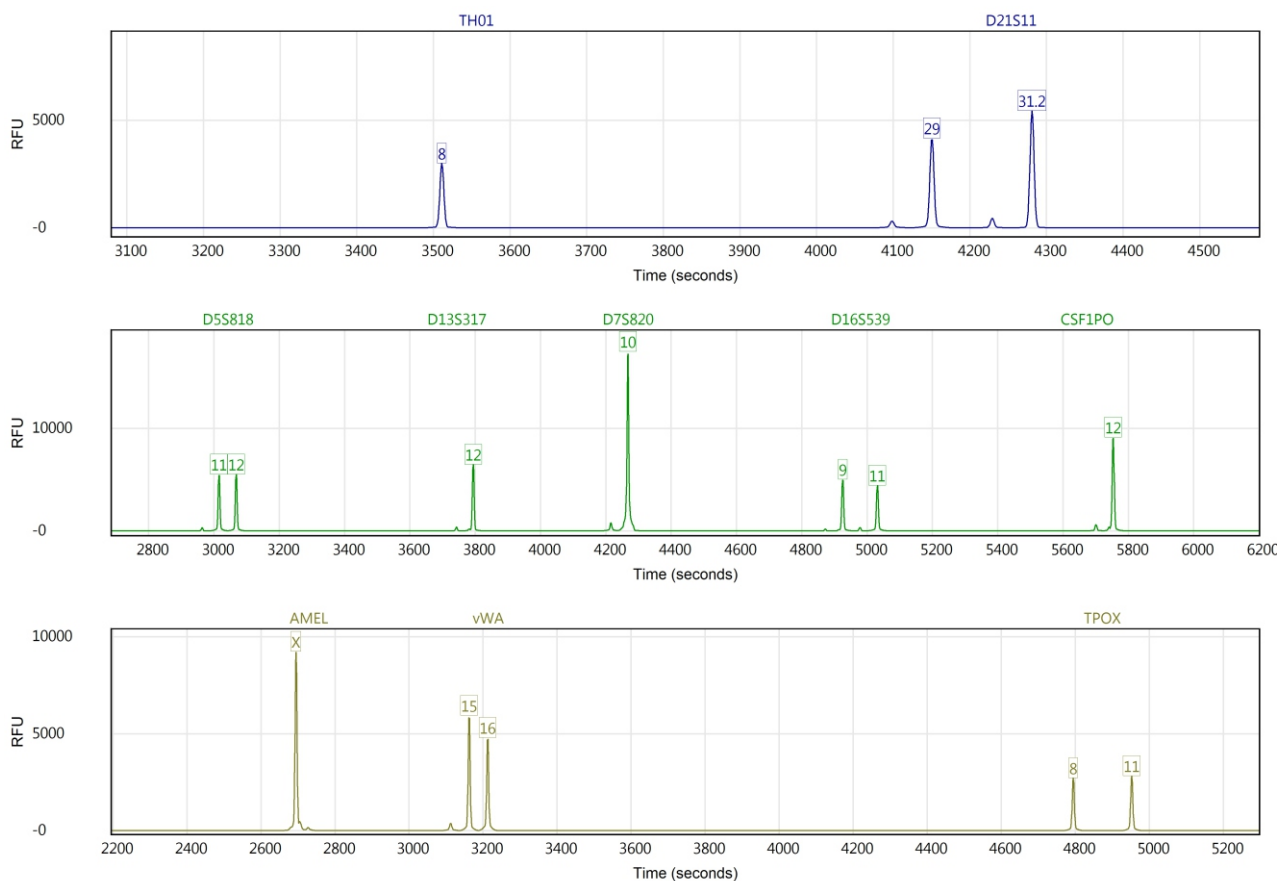


Anexo 4

Huella genética de la línea IC-PD3-F-iPS-4F-1.

Annex 4

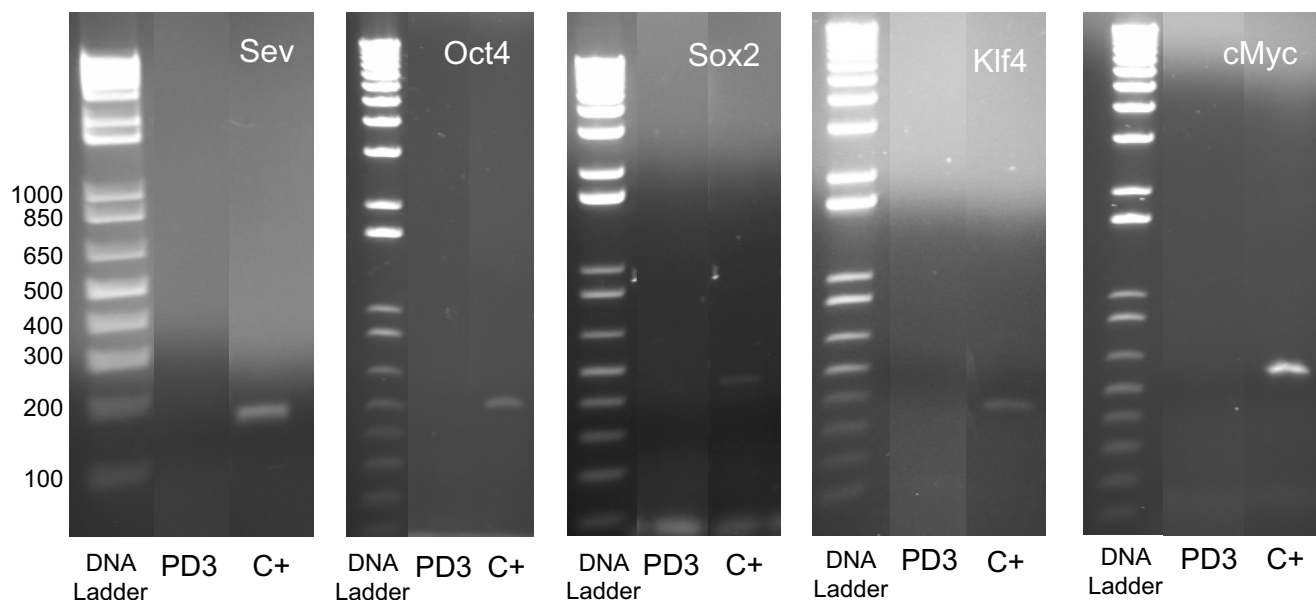
Genetic fingerprinting



GenePrint10 Marker	Test Sample Profile
TH01	8
D21S11	29, 31.2
D5S818	11, 12
D13S317	12
D7S820	10
D16S539	9, 11
CSF1PO	12
AMEL	X
vWA	15, 16
TPOX	8, 11

Anexo 5
Test de silenciamiento de la línea IC-PD3-F-iPS-4F-1

Annex 5
Silencing Test



Gene		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*	
Oct4	Forward	ATG CAC CGC TAC GAC GTG AGC GC	483 bp
	Reverse	AAT GTA TCG AAG GTG CTC AA*	
Sox2	Forward	TTC CTG CAT GCC AGA GGA GCC C	451 bp
	Reverse	AAT GTA TCG AAG GTG CTC AA*	
Klf4	Forward	TAA CTG ACT AGC AGG CTT GTC G*	410 bp
	Reverse	TCC ACA TAC AGT CCT GGA TGA TGA TG	
cMyc	Forward	CCC GAA AGA GAA AGC GAA CCA G	532 bp
	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.

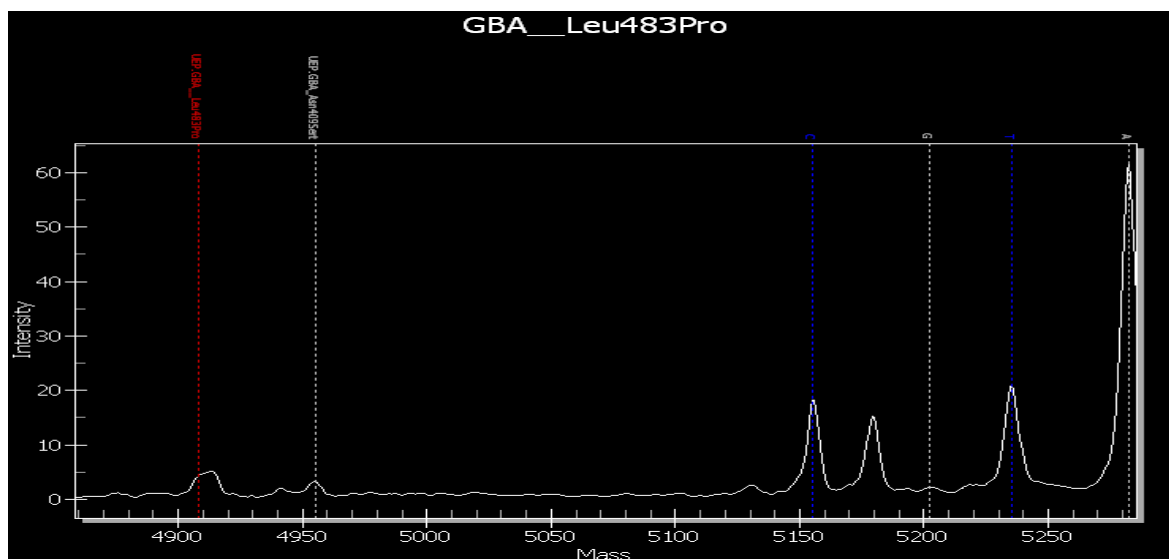
Anexo 6

Confirmación del diagnóstico genotípico de la línea **IC-PD3-F-iPS-4F-1**

Annex 6

Confirmation of genotypic diagnosis of the line

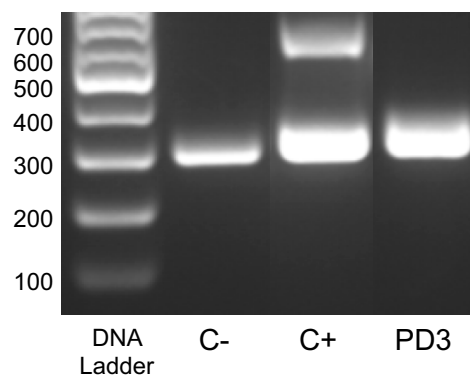
Alelo	cDNA	Proteína	Exon
L444P	c. 1448 T > C	p. Leu 483 Pro	10



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-PD3-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