

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **IC-AD6-F-iPS-4F-1** EN EL BANCO
NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANNEXES TO THE APPLICATION FORM FOR DEPOSITING
IC-AD6-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-AD6-F-iPS-4F-1](#)

Annex 1: Pluripotency Test

Anexo 2: Test de diferenciación in vitro de la línea [IC-AD6-F-iPS-4F-1](#)

Annex 2: In vitro differentiation Test

Anexo 3: Cariotipo de la línea [IC-AD6-F-iPS-4F-1](#)

Annex 3: Karyotype

Anexo 4: Huella genética de los fibroblastos (células de origen) y de la línea [IC-AD6-F-iPS-4F-1](#)

Annex 4: Genetic fingerprinting

Anexo 5: Test de silenciamiento de la línea [IC-AD6-F-iPS-4F-1](#)

Annex 5: Silencing Test

Anexo 6: Confirmación del diagnóstico genotípico de la línea [IC-AD6-F-iPS-4F-1](#)

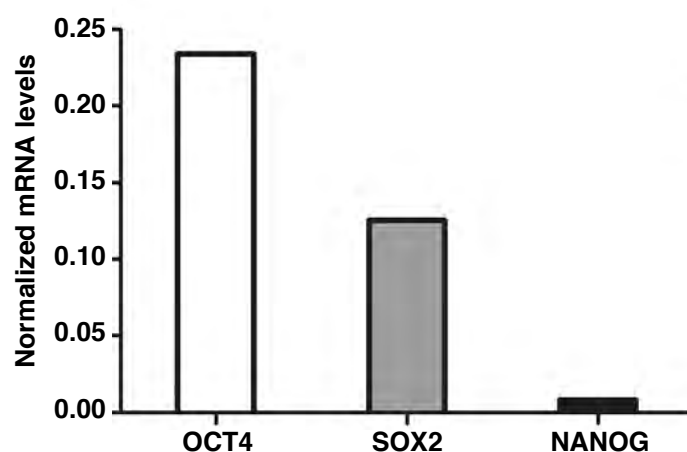
Annex 6: Confirmation of genotypic diagnosis of the line

Anexo 7: Test de micoplasma de la línea [IC-AD6-F-iPS-4F-1](#)

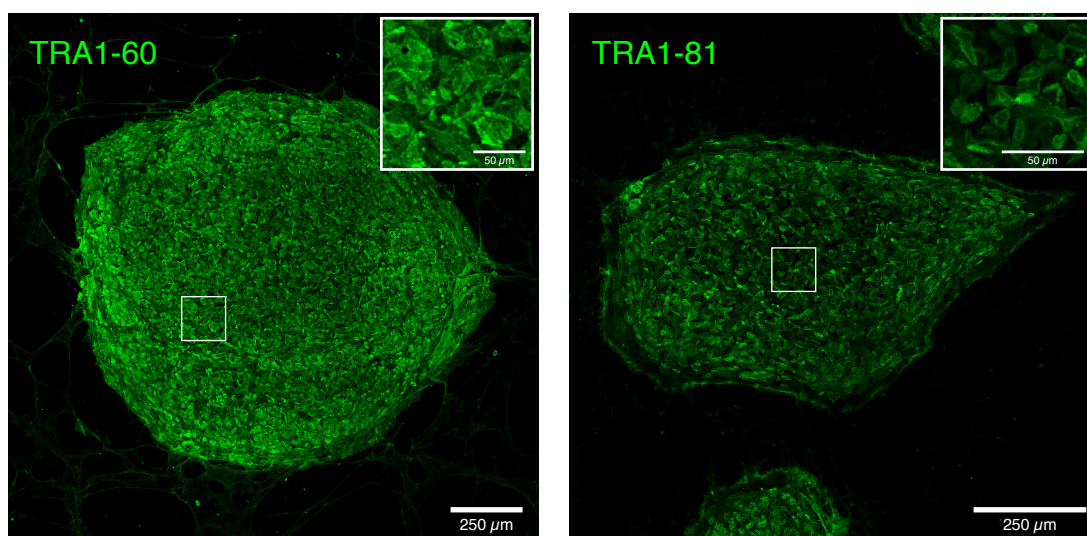
Annex 7: Mycoplasma Test

Anexo 1
Test de pluripotencia de la línea IC-AD6-F-iPS-4F-1

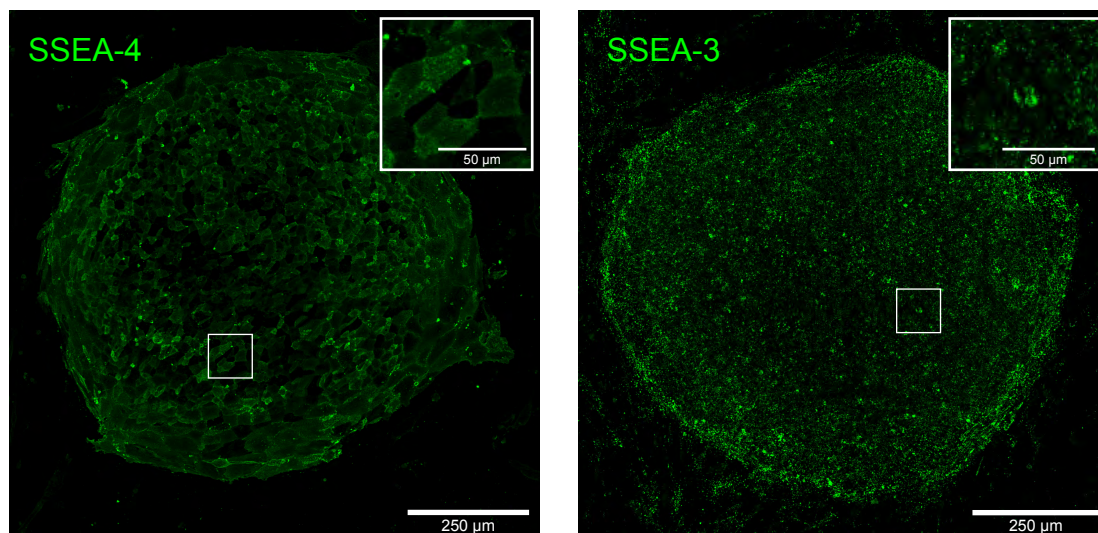
Annex 1
Pluripotency Test



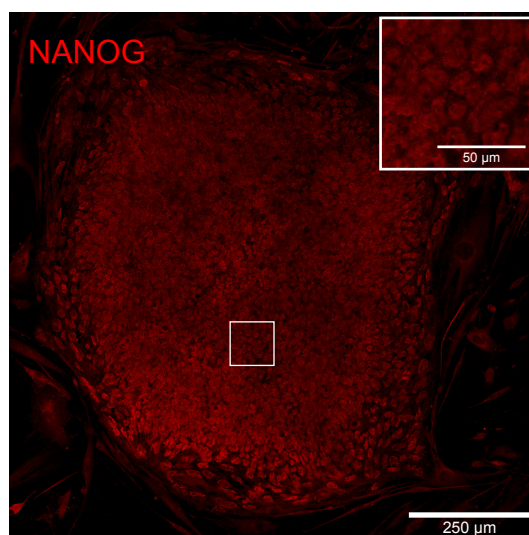
Niveles de expresion de OCT4, SOX2 y NANOG de la línea IC-AD6-F-iPS-4F-1
Expression leves of OCT4, SOX2 and NANOG



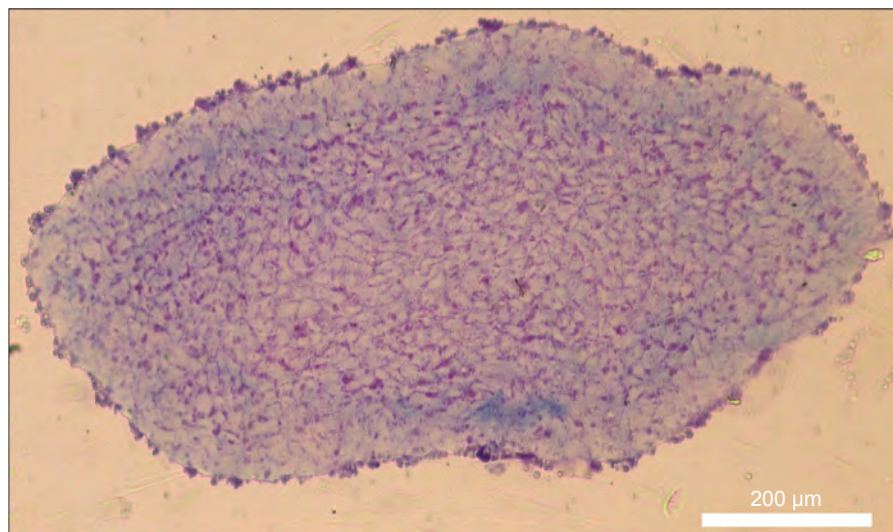
Detección por inmunofluorescencia de la expresion de TRA1-60 y TRA1-81 en la línea IC-AD6-F-iPS-4F-1
Immunofluorescence detection of TRA1-60 and TRA1-81 expression



Detección por inmunofluorescencia de la expresión de SSEA-4 y SSEA-3
en la línea [IC-AD6-F-iPS-4F-1](#)
Immunofluorescence detection of SSEA-4 and SSEA-3 expression



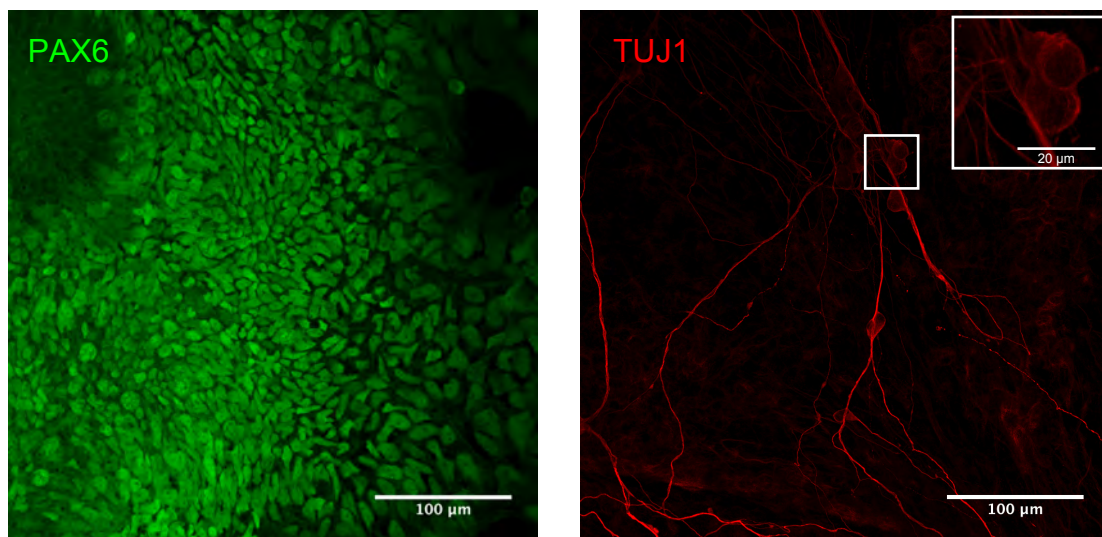
Detección por inmunofluorescencia de la expresión de NANOG en
la línea [IC-AD6-F-iPS-4F-1](#)
Immunofluorescence detection of NANOG expression



Detección de la actividad fosfatasa alcalina en la línea IC-AD6-F-iPS-4F-1
Detection of alkaline phosphatase activity

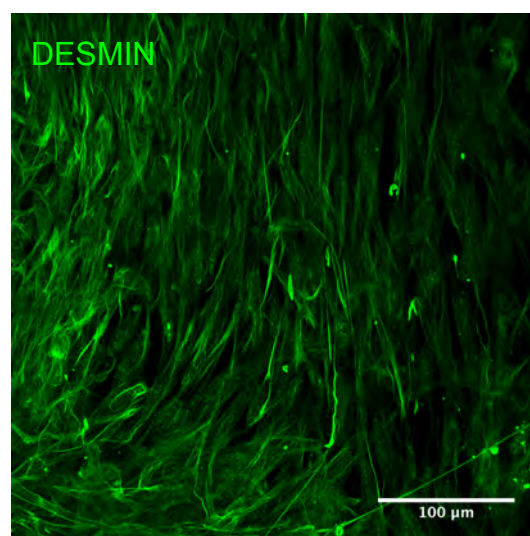
Anexo 2
Test de diferenciación *in vitro* de la línea IC-AD6-F-iPS-4F-1

Annex 2
In vitro differentiation Test



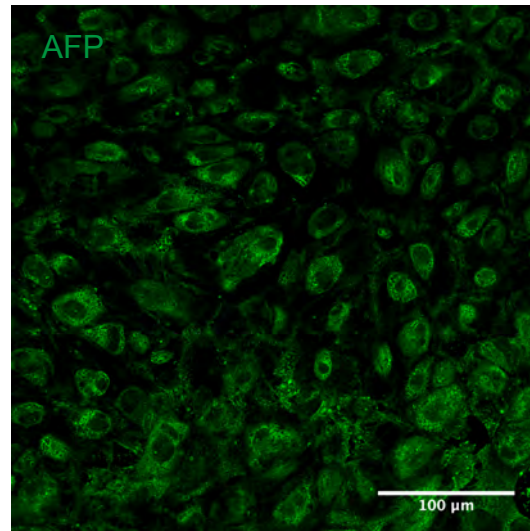
Diferenciación *in vitro* a Ectodermo de la línea IC-AD6-F-iPS-4F-1. Células positivas para PAX6 y TUJ1.

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



Diferenciación *in vitro* a Mesodermo de la línea IC-AD6-F-iPS-4F-1. Células positivas para DESMIN.

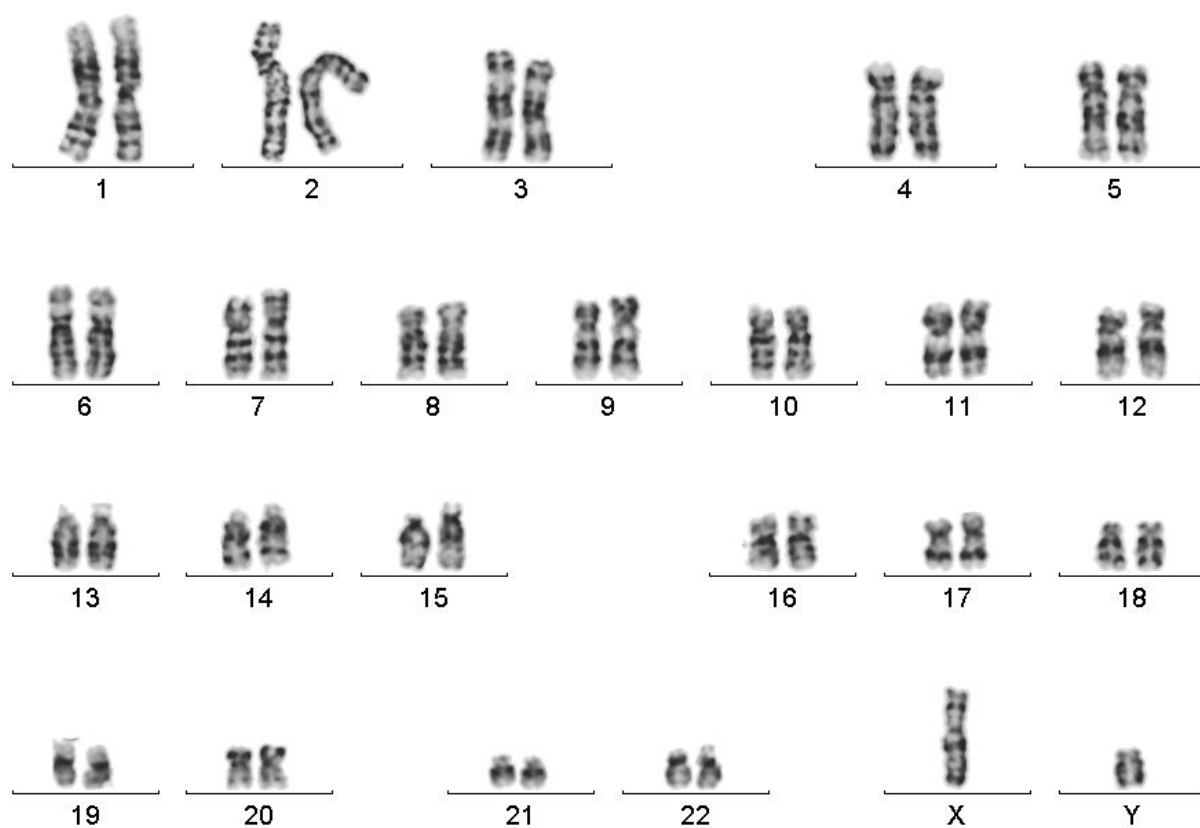
In vitro differentiation into Mesoderm. DESMIN positive cells.



Diferenciación in vitro a Endodermo de la línea [IC-AD6-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-AD6-F-iPS-4F-1

Annex 3
Karyotype

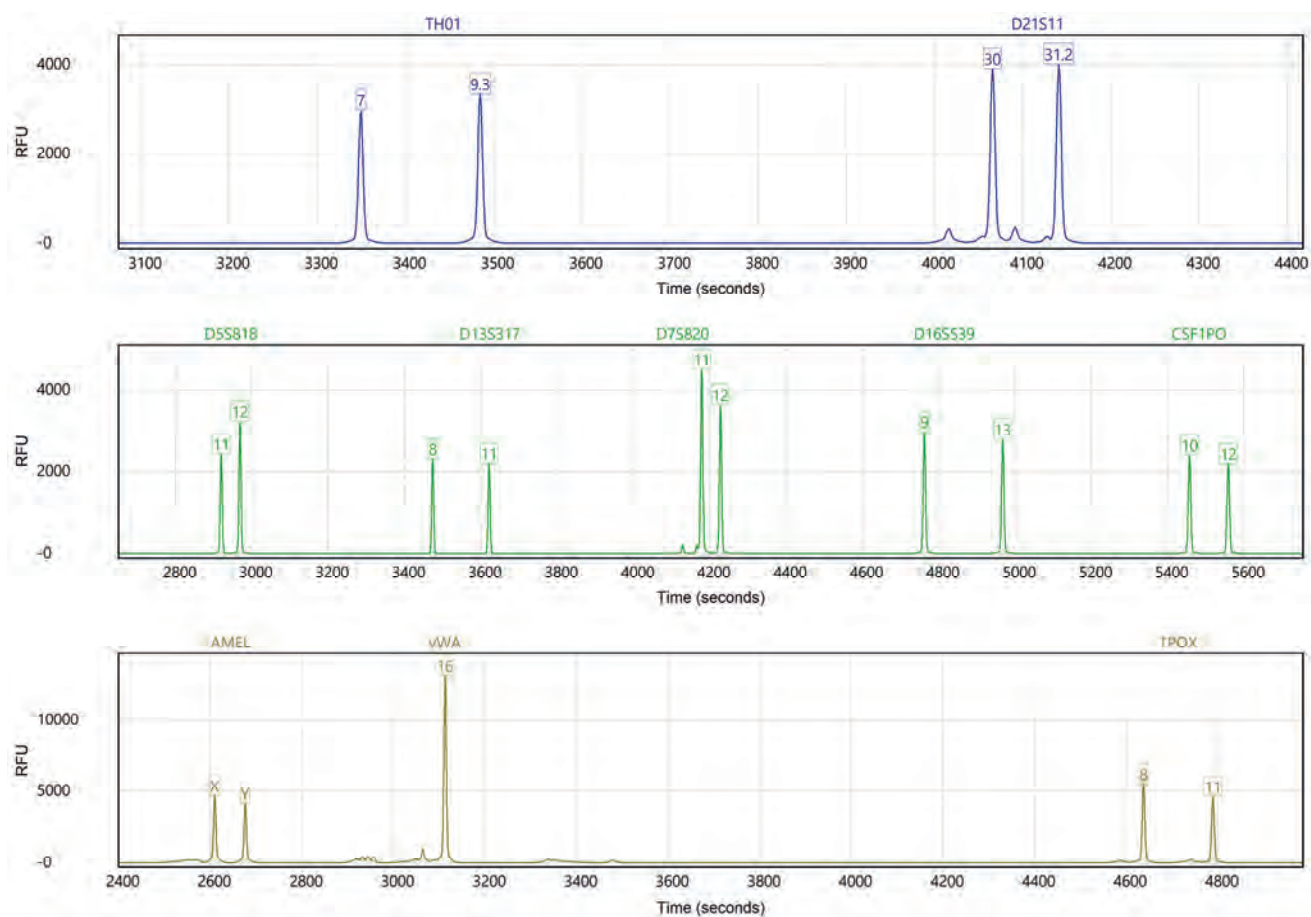


Anexo 4

Huella genética de los fibroblastos (células de origen)

Annex 4

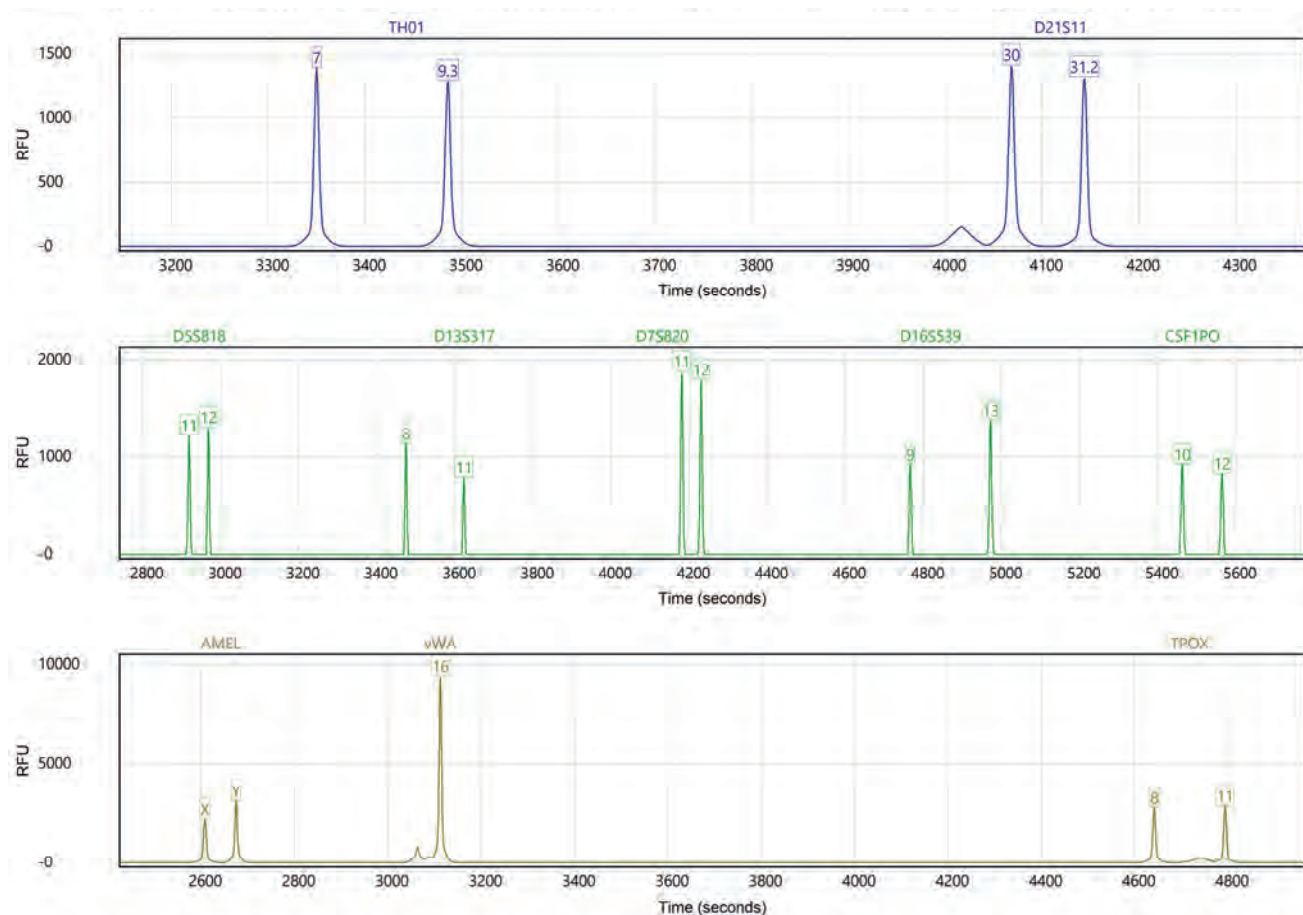
Genetic fingerprinting of fibroblasts



GenePrint10 Marker	Test Sample Profile
TH01	7, 9.3
D21S11	30, 31.2
D5S818	11, 12
D13S317	8, 11
D7S820	11, 12
D16S539	9, 13
CSF1PO	10, 12
AMEL	X, Y
vWA	16
TPOX	8, 11

Anexo 4
Huella genética de la línea IC-AD6-F-iPS-4F-1.

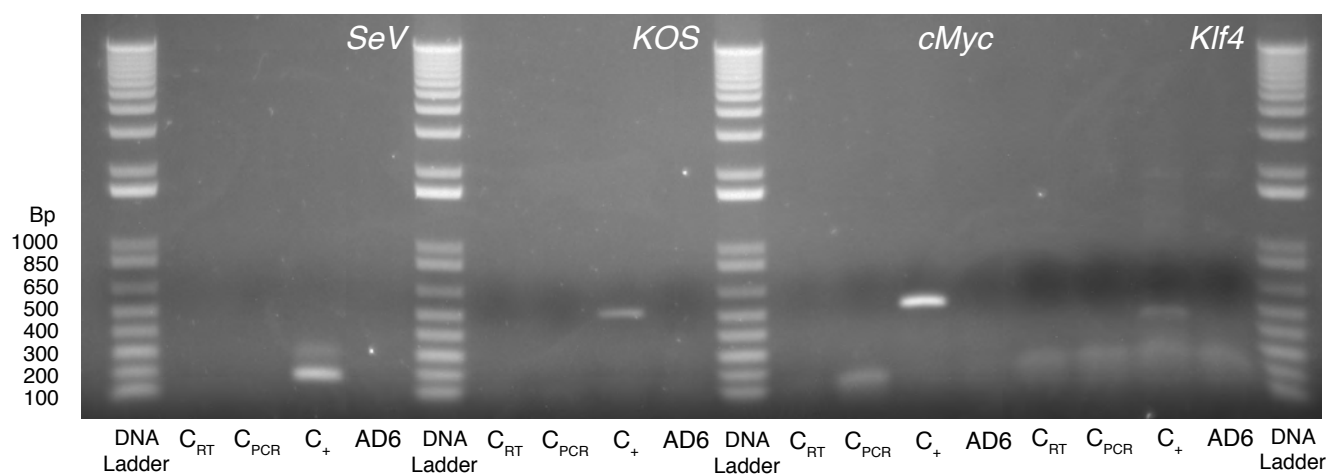
Annex 4
Genetic fingerprinting of line IC-AD6-F-iPS-4F-1



GenePrint10 Marker	Test Sample Profile
TH01	7, 9.3
D21S11	30, 31.2
D5S818	11, 12
D13S317	8, 11
D7S820	11, 12
D16S539	9, 13
CSF1PO	10, 12
AMEL	X, Y
vWA	16
TPOX	8, 11

Anexo 5
Test de silenciamiento de la línea **IC-AD6-F-iPS-4F-1**

Annex 5
Silencing Test



Gene		Primer (5'-3')	Length
<i>SeV</i>	Forward	GGA TCA CTA GGT GAT ATC GAG C*	181 bp
	Reverse	ACC AGA CAA GAG TTT AAG AGA TAT GTA TC*	
<i>KOS</i>	Forward	ATG CAC CGC TAC GAC GTG AGC GC	528 bp
	Reverse	ACC TTG ACA ATC CTG ATG TGG	
<i>cMyc</i>	Forward	TAA CTG ACT AGC AGG CTT GTC G*	532 bp
	Reverse	TCC ACA TAC AGT CCT GGA TGA TGA TG	
<i>Klf4</i>	Forward	TTC CTG CAT GCC AGA GGA GCC C	410 bp
	Reverse	AAT GTA TCG AAG GTG CTC AA*	

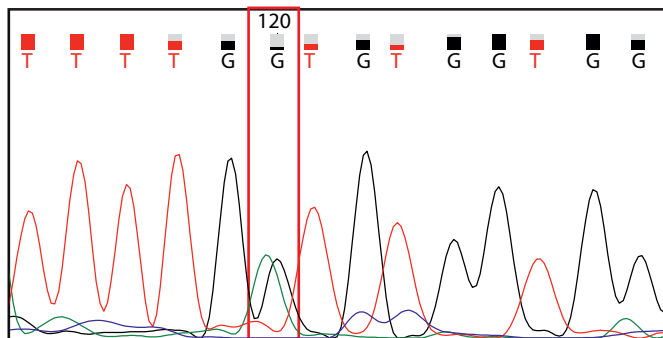
* Primer contains SeV genome sequences. Pairing of these primers with transgene-specific primers allows specific detection of transgenes carried by the CytoTune™ 2.0 Sendai reprogramming vectors.

Anexo 6

Confirmación del diagnóstico genotípico de la línea IC-AD6-F-iPS-4F-1

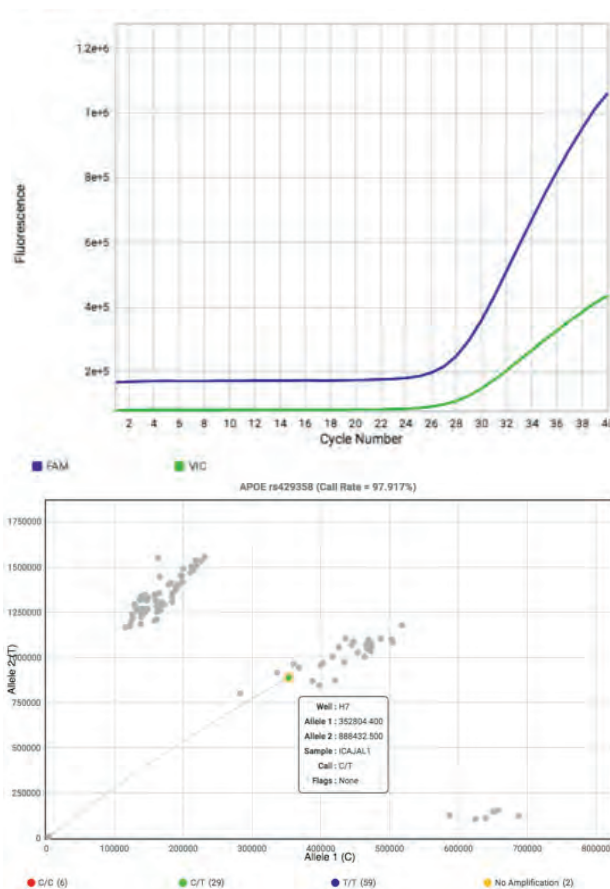
Annex 6

Confirmation of genotypic diagnosis of the line IC-AD6-F-iPS-4F-1

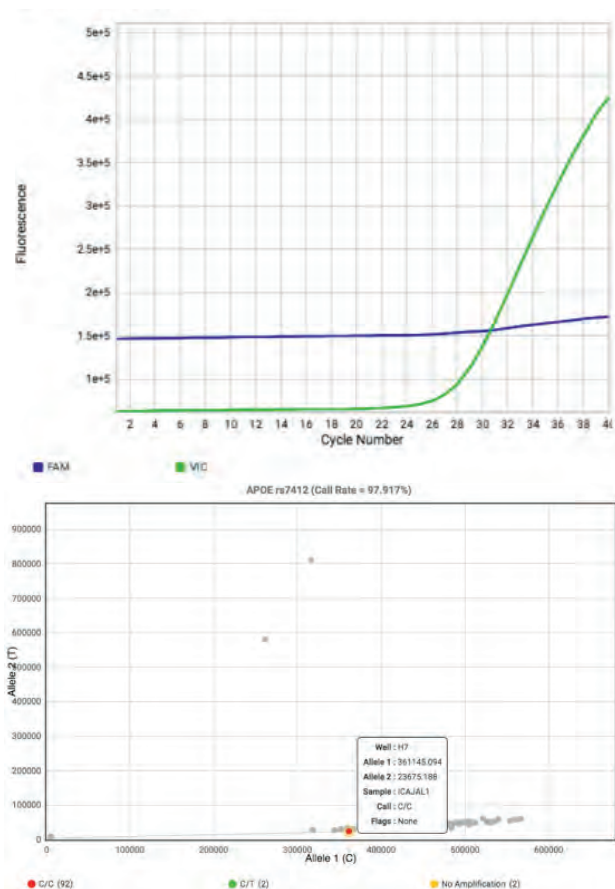


We analyzed, by DNA sequencing, the nucleotide substitution from GGT to GAT in the g.61242 position and we confirmed that IC-AD6-F-iPS-4F-1 cell line has the PSEN1 Gly206Asp mutation in heterozygosis.

SNP rs429358



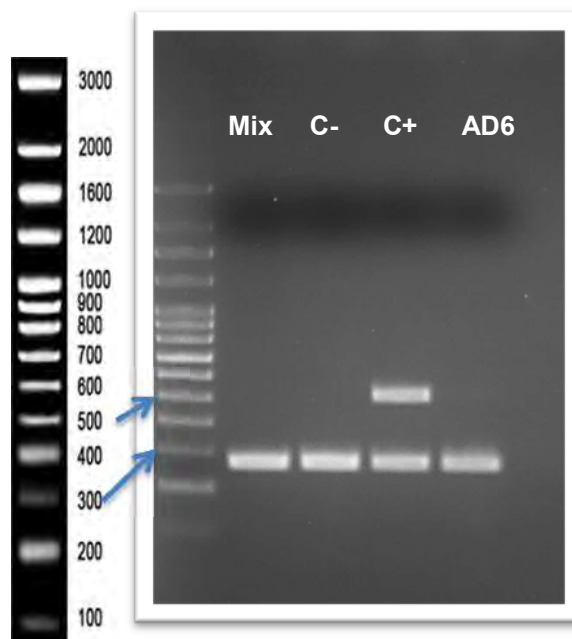
SNP rs7412



Using TaqMan SNP genotyping assays, we analyzed the rs429358 and rs7412 SNPs showing that both probe (VIC, green; FAM, blue) bound to the C- and T-containing allele in rs429358 SNP and only the VIC probe (green) bound to the C-containing allele in rs7412 SNP, confirming that the IC-AD6-F-iPS-4F-1 cell line has an ApoE3/E4 genotype.

Anexo 7
Test de micoplasma de la línea IC-AD6-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