

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **IC-AD1-F-iPS-4F-1** EN EL BANCO
NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANNEXES TO THE APPLICATION FORM FOR DEPOSITING
IC-AD1-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-AD1-F-iPS-4F-1](#)

Annex 1: Pluripotency Test

Anexo 2: Test de diferenciación *in vitro* de la línea [IC-AD1-F-iPS-4F-1](#)

Annex 2: In vitro differentiation Test

Anexo 3: Cariotipo de la línea [IC-AD1-F-iPS-4F-1](#)

Annex 3: Karyotype

Anexo 4: Huella genética de los fibroblastos (células de origen) y de la línea [IC-AD1-F-iPS-4F-1](#)

Annex 4: Genetic fingerprinting

Anexo 5: Test de silenciamiento de la línea [IC-AD1-F-iPS-4F-1](#)

Annex 5: Silencing Test

Anexo 6: Confirmación del diagnóstico genotípico de la línea [IC-AD1-F-iPS-4F-1](#)

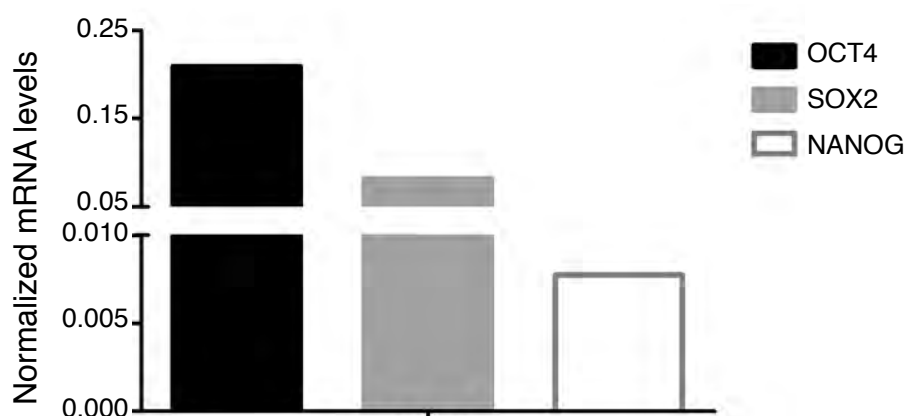
Annex 6: Confirmation of genotypic diagnosis of the line

Anexo 7: Test de micoplasma de la línea [IC-AD1-F-iPS-4F-1](#)

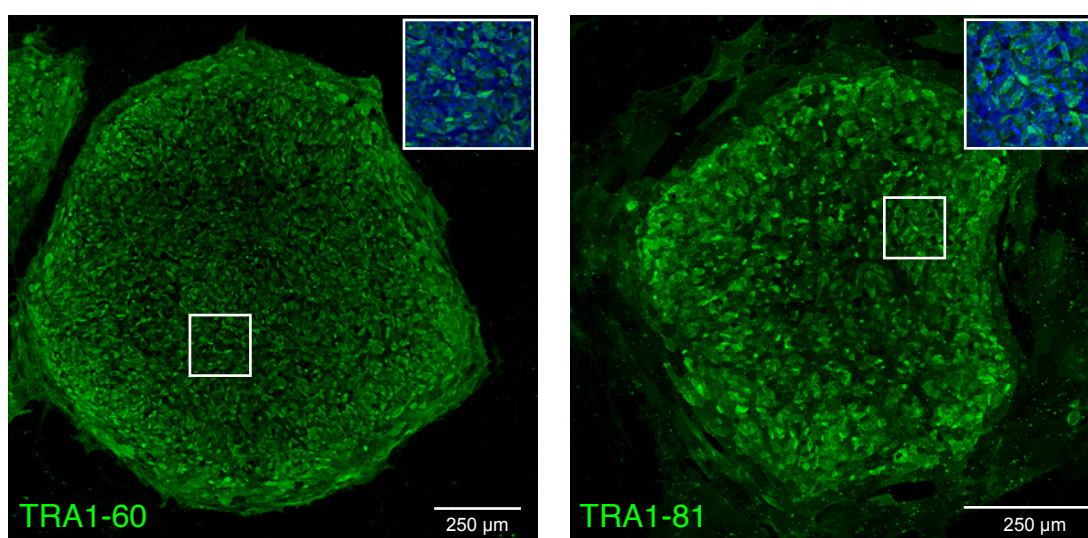
Annex 7: Mycoplasma Test

Anexo 1
Test de pluripotencia de la línea IC-AD1-F-iPS-4F-1

Annex 1
Pluripotency Test

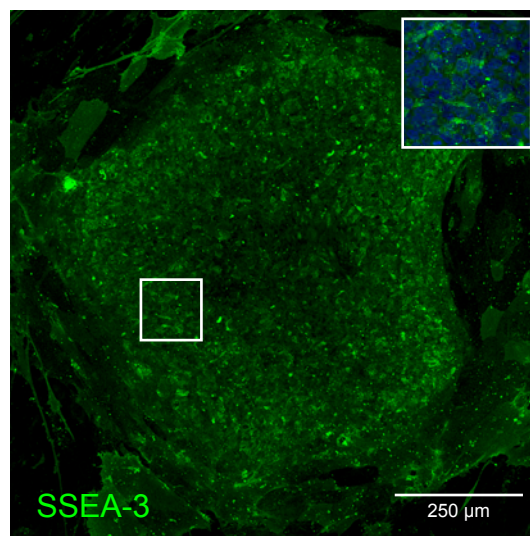
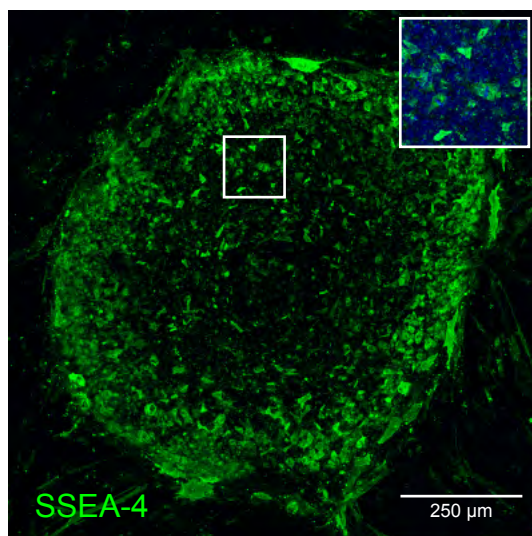


Niveles de expresion de OCT4, SOX2 y NANOG de la línea IC-AD1-F-iPS-4F-1
Expression levels of OCT4, SOX2 and NANOG

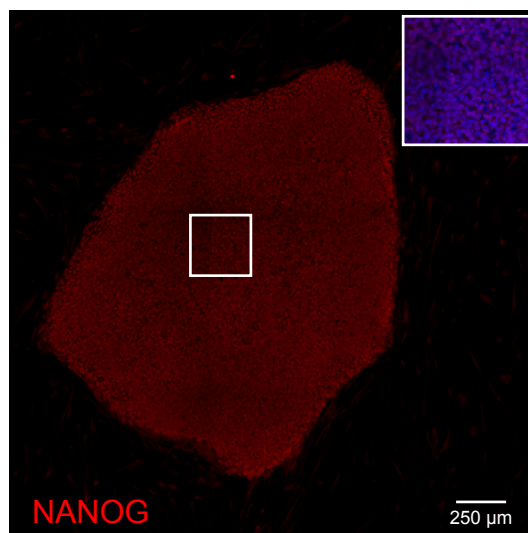


Detección por inmunofluorescencia de la expresion de TRA1-60 y TRA1-81 en la línea IC-AD1-F-iPS-4F-1

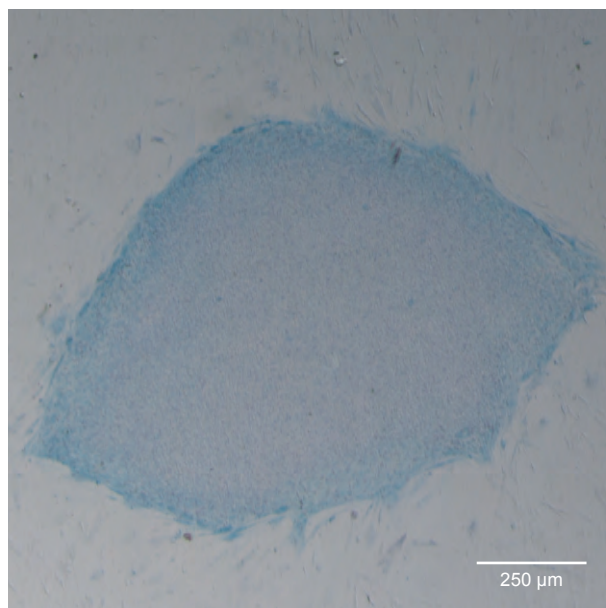
Immunofluorescence detection of TRA1-60 and TRA1-81 expression



Detección por inmunofluorescencia de la expresión de SSEA-4 y SSEA-3
en la línea [IC-AD1-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-AD1-F-iPS-4F-1](#)
Immunofluorescence detection of NANOG expression



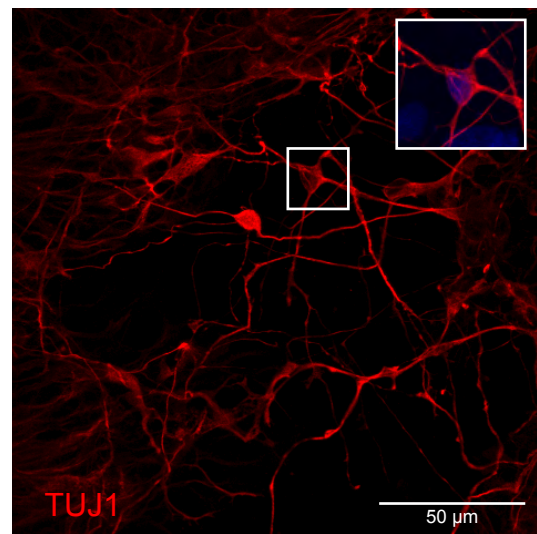
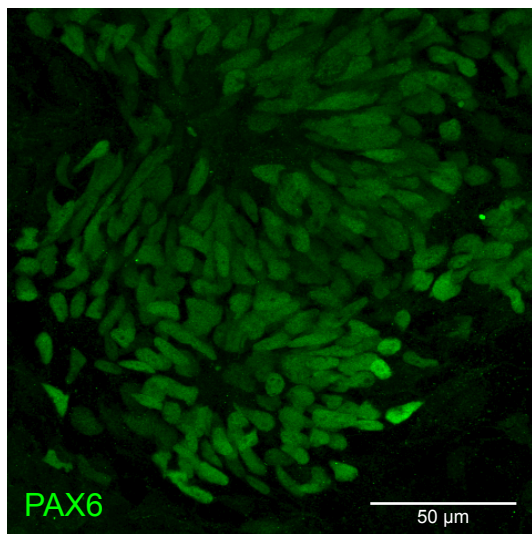
Detección de la actividad fosfatasa alcalina en la línea [IC-AD1-F-iPS-4F-1](#)
Detection of alkaline phosphatase activity

Anexo 2

Test de diferenciación *in vitro* de la línea IC-AD1-F-iPS-4F-1

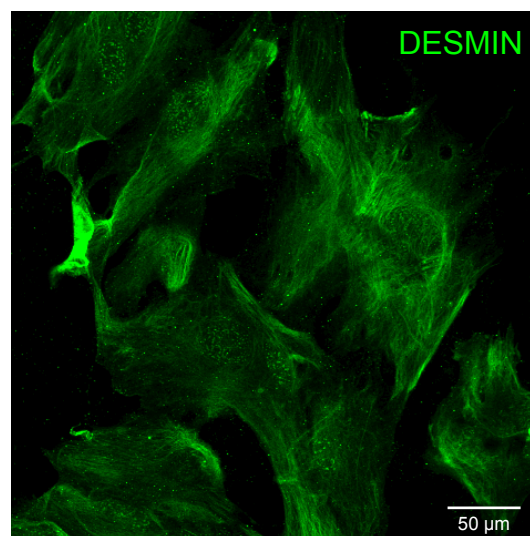
Annex 2

In vitro differentiation Test



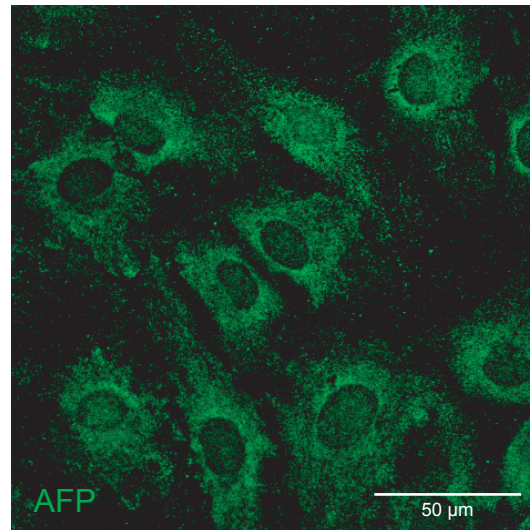
Diferenciación *in vitro* a Ectodermo de la línea IC-AD1-F-iPS-4F-1. Células positivas para PAX6 y TUJ1.

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



Diferenciación *in vitro* a Mesodermo de la línea IC-AD1-F-iPS-4F-1. Células positivas para DESMIN.

In vitro differentiation into Mesoderm. DESMIN positive cells.

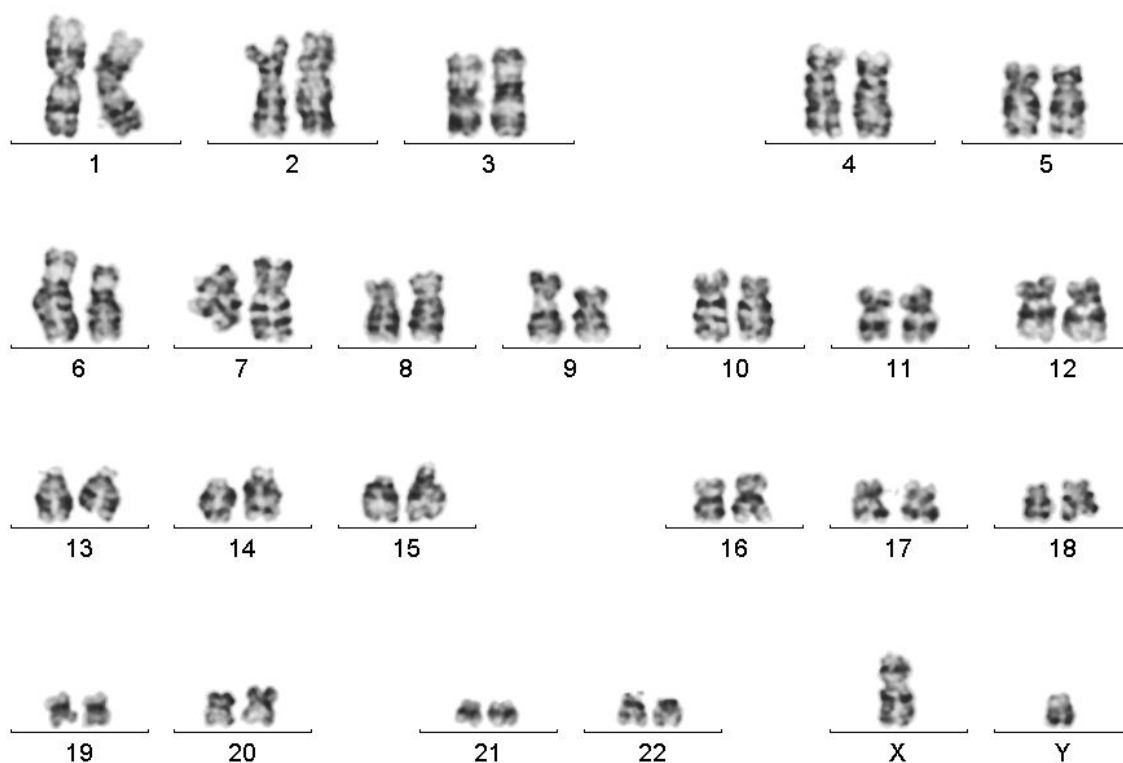


Diferenciación *in vitro* a Endodermo de la línea **IC-AD1-F-iPS-4F-1**. Células positivas para alfa-fetoproteína.

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

Anexo 3
Cariotipo de la línea IC-AD1-F-iPS-4F-1

Annex 3
Karyotype

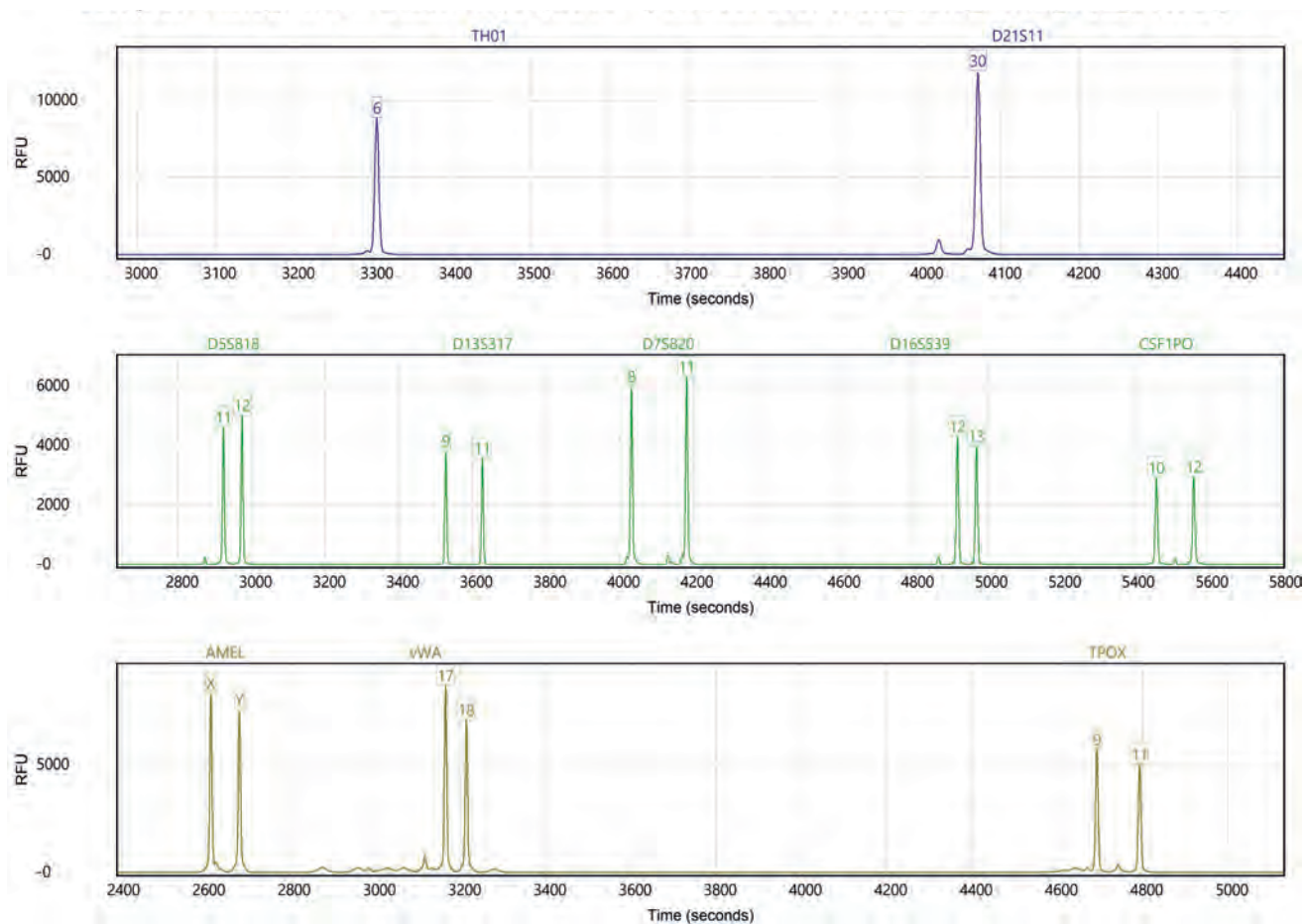


Anexo 4

Huella genética de los fibroblastos (células de origen)

Annex 4

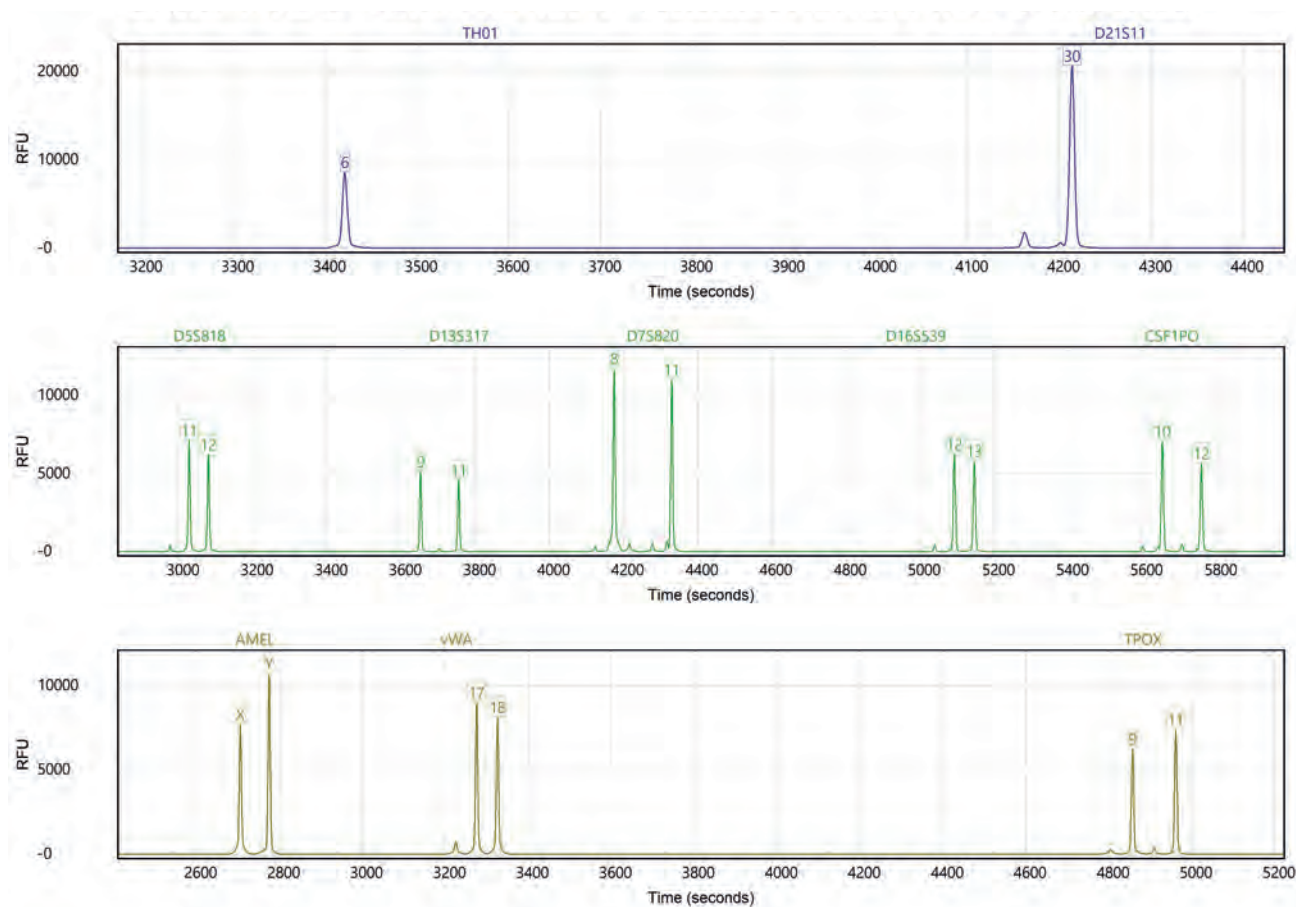
Genetic fingerprinting of fibroblasts



GenePrint10 Marker	Test Sample Profile
TH01	6
D21S11	30
D5S818	11, 12
D13S317	9, 11
D7S820	8, 11
D16S539	12, 13
CSF1PO	10, 12
AMEL	X, Y
vWA	17, 18
TPOX	9, 11

Anexo 4
Huella genética de la línea IC-AD1-F-iPS-4F-1.

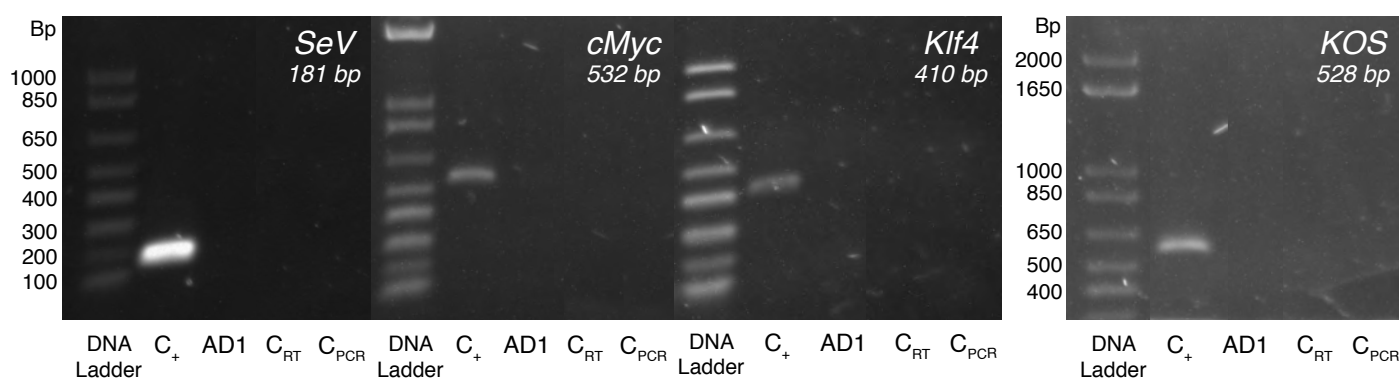
Annex 4
Genetic fingerprinting of line IC-AD1-F-iPS-4F-1



GenePrint10 Marker	Test Sample Profile
TH01	6
D21S11	30
D5S818	11, 12
D13S317	9, 11
D7S820	8, 11
D16S539	12, 13
CSF1PO	10, 12
AMEL	X, Y
vWA	17, 18
TPOX	9, 11

Anexo 5
Test de silenciamiento de la línea IC-AD1-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.

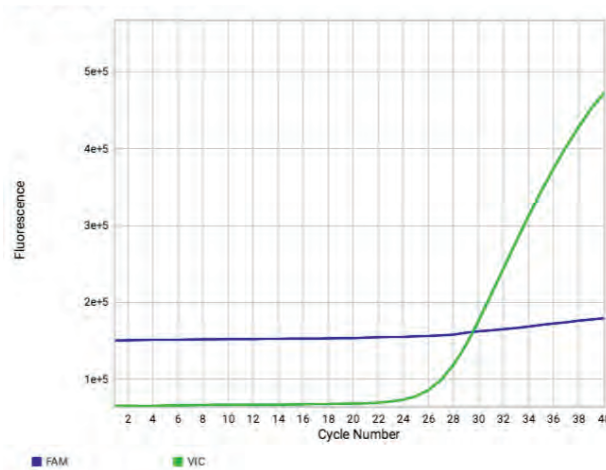
Anexo 6

Confirmación del diagnóstico genotípico de la línea IC-AD1-F-iPS-4F-1

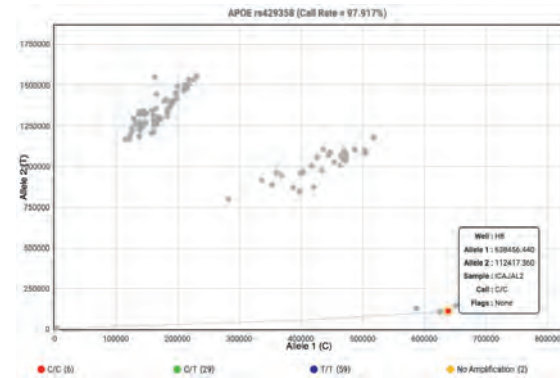
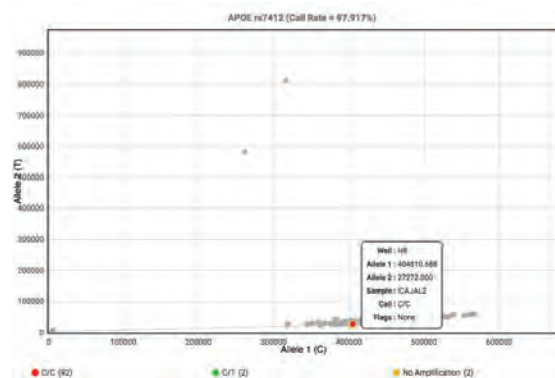
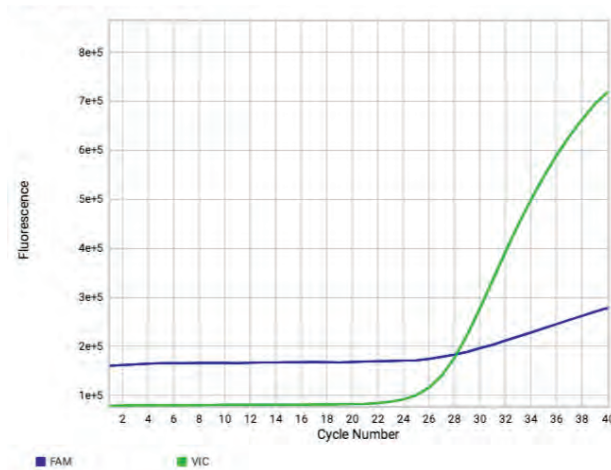
Annex 6

Confirmation of genotypic diagnosis of the line IC-AD1-F-iPS-4F-1

SNP rs7412



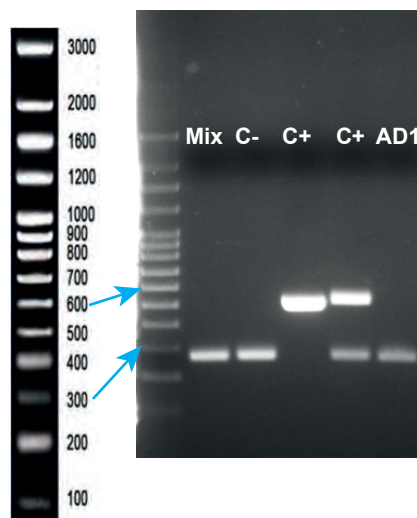
SNP rs429358



Using TaqMan SNP genotyping assays, we analyzed the rs7412 and rs429358 SNPs showing that only the VIC probe (green) bound to the C-containing allele in both SNPs, confirming that the IC-AD1-F-iPS-4F-1 cell line has an ApoE4/E4 genotype. No amplification was observed with the FAM probe (blue) that recognizes the T-containing allele.

Anexo 7
Test de micoplasma de la línea IC-AD1-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