

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA  
LÍNEA CELULAR **IC-AD5-F-iPS-4F-1** EN EL BANCO  
NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANNEXES TO THE APPLICATION FORM FOR DEPOSITING  
**IC-AD5-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-AD5-F-iPS-4F-1](#)

Annex 1: Pluripotency Test

Anexo 2: Test de diferenciación *in vitro* de la línea [IC-AD5-F-iPS-4F-1](#)

Annex 2: In vitro differentiation Test

Anexo 3: Cariotipo de la línea [IC-AD5-F-iPS-4F-1](#)

Annex 3: Karyotype

Anexo 4: Huella genética de los fibroblastos (células de origen) y de la línea [IC-AD5-F-iPS-4F-1](#)

Annex 4: Genetic fingerprinting

Anexo 5: Test de silenciamiento de la línea [IC-AD5-F-iPS-4F-1](#)

Annex 5: Silencing Test

Anexo 6: Confirmación del diagnóstico genotípico de la línea [IC-AD5-F-iPS-4F-1](#)

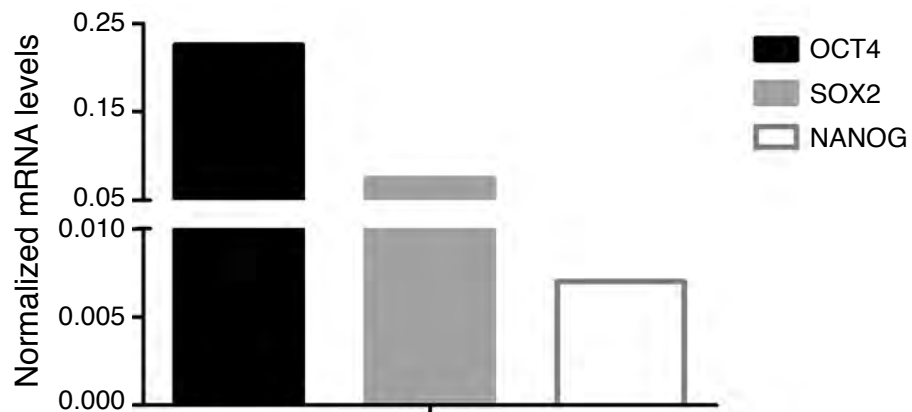
Annex 6: Confirmation of genotypic diagnosis of the line

Anexo 7: Test de micoplasma de la línea [IC-AD5-F-iPS-4F-1](#)

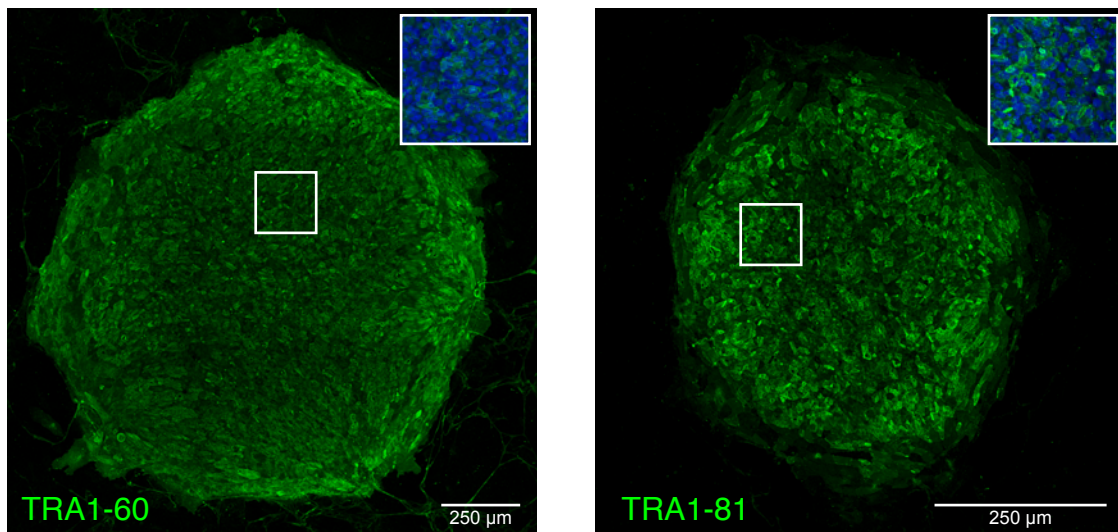
Annex 7: Mycoplasma Test

Anexo 1  
Test de pluripotencia de la línea IC-AD5-F-iPS-4F-1

Annex 1  
Pluripotency Test

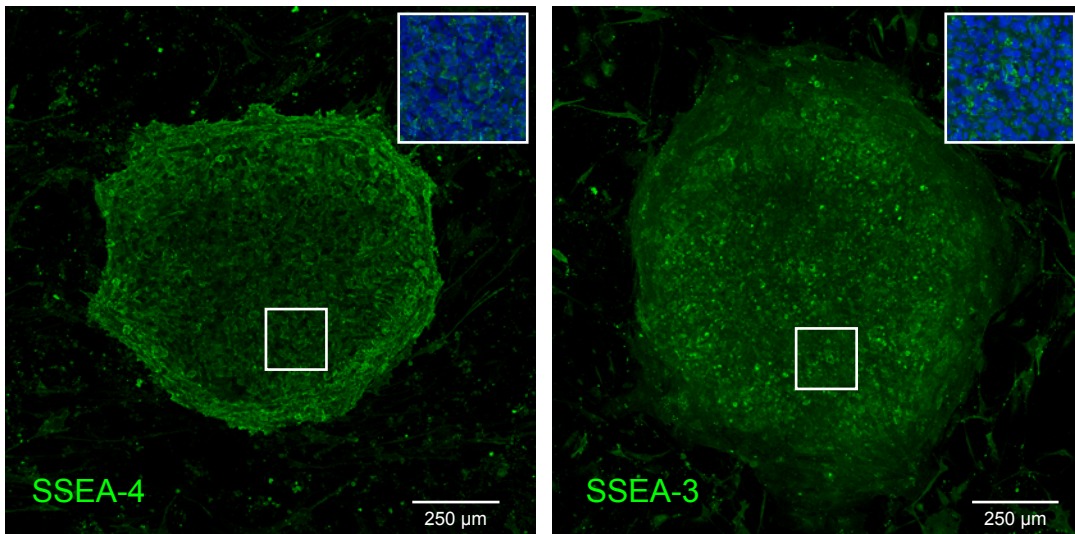


Niveles de expresion de OCT4, SOX2 y NANOG de la línea IC-AD5-F-iPS-4F-1  
Expression levels of OCT4, SOX2 and NANOG

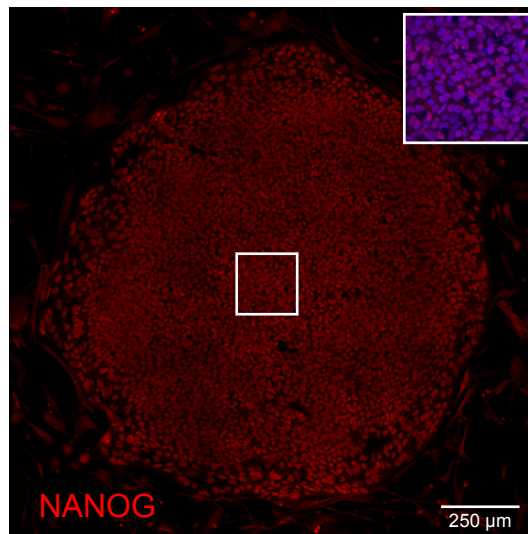


Detección por inmunofluorescencia de la expresion de TRA1-60 y TRA1-81 en la línea IC-AD5-F-iPS-4F-1

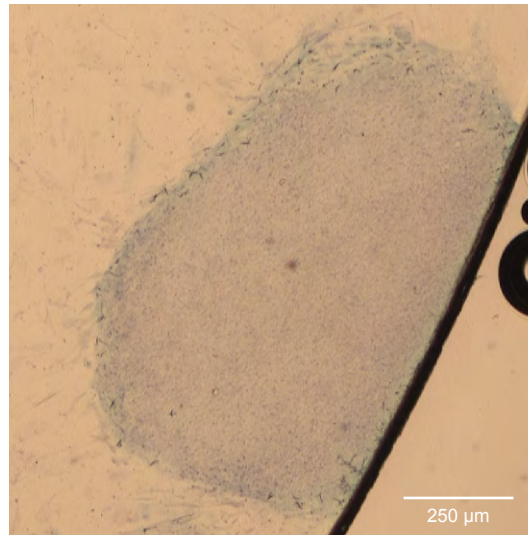
Immunofluorescence detection of TRA1-60 and TRA1-81 expression



Detección por inmunofluorescencia de la expresión de SSEA-4 y SSEA-3 en la línea [IC-AD5-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-AD5-F-iPS-4F-1](#)  
Immunofluorescence detection of NANOG expression



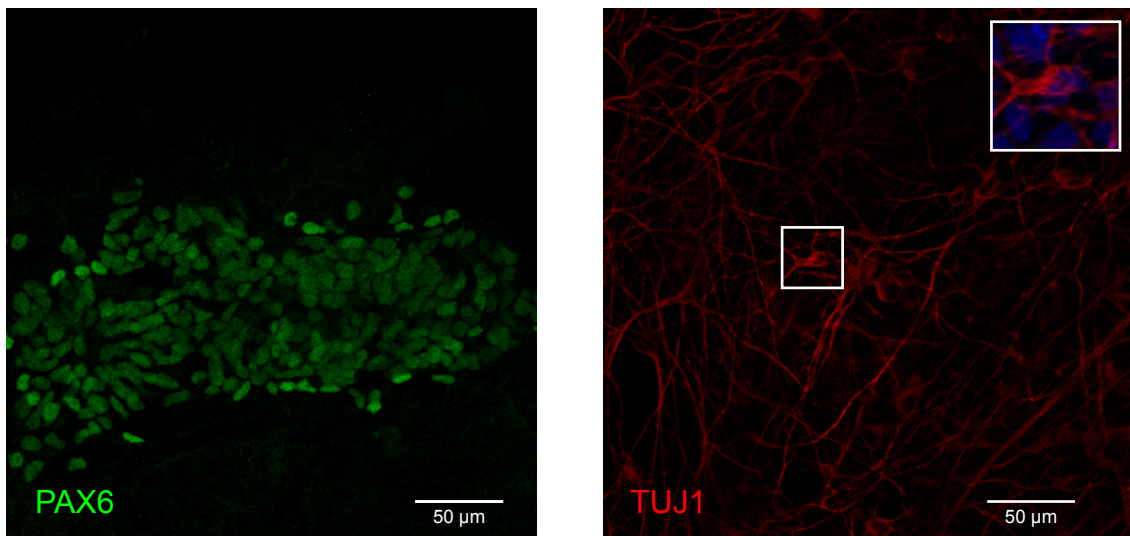
Detección de la actividad fosfatasa alcalina en la línea [IC-AD5-F-iPS-4F-1](#)

La banda negra indica el borde del cubreobjetos.

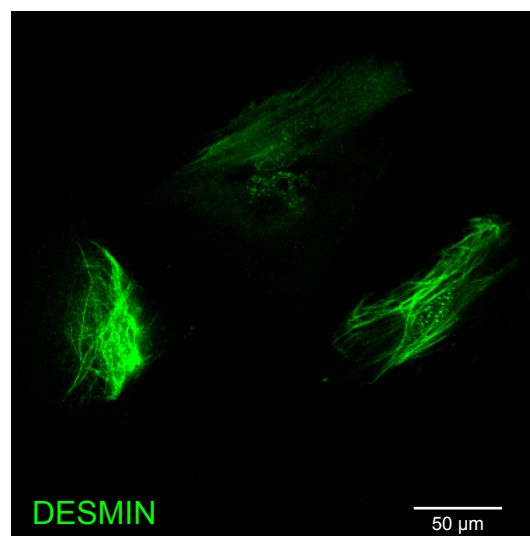
Detection of alkaline phosphatase activity. The black stripe indicates the edge of the coverslip.

Anexo 2  
Test de diferenciación *in vitro* de la línea IC-AD5-F-iPS-4F-1

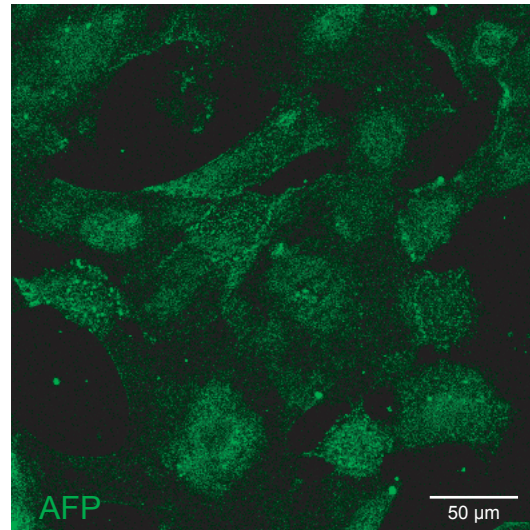
Annex 2  
In vitro differentiation Test



Diferenciación *in vitro* a Ectodermo de la línea IC-AD5-F-iPS-4F-1. Células positivas para PAX6 y TUJ1.  
*In vitro* differentiation into Ectoderm. PAX6 and TUJ1 positive cells.



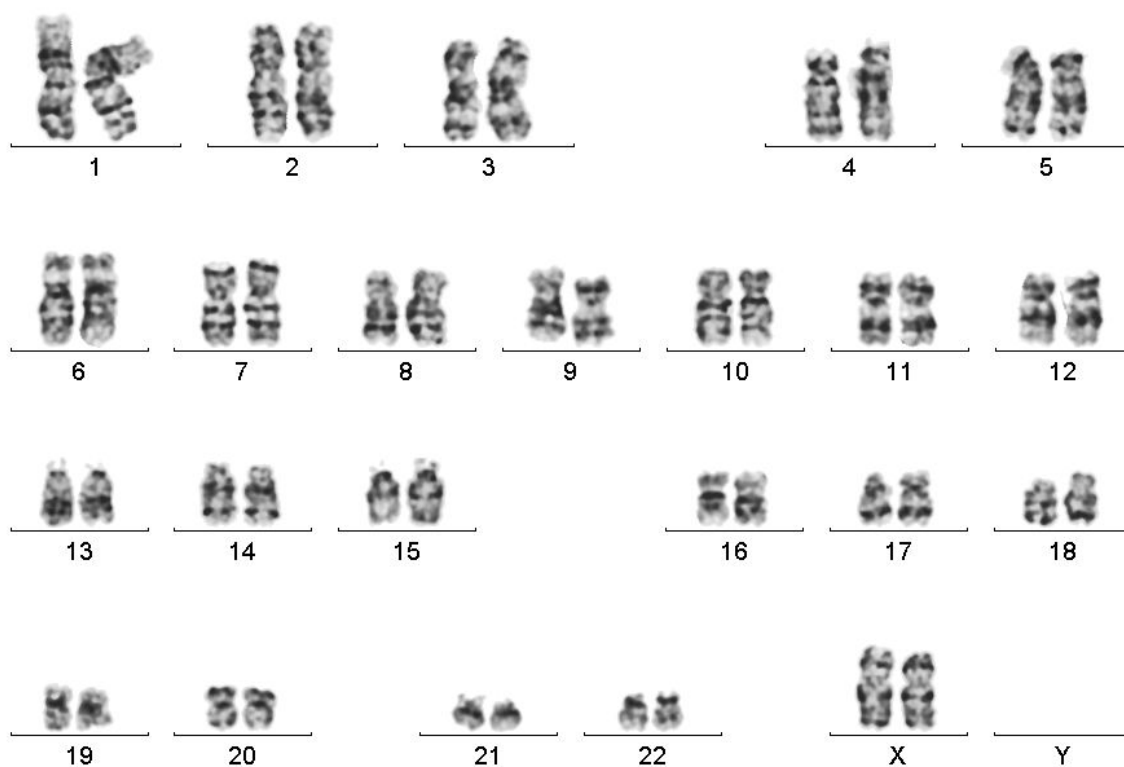
Diferenciación *in vitro* a Mesodermo de la línea IC-AD5-F-iPS-4F-1. Células positivas para DESMIN.  
*In vitro* differentiation into Mesoderm. DESMIN positive cells.



Diferenciación in vitro a Endodermo de la línea [IC-AD5-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-AD5-F-iPS-4F-1

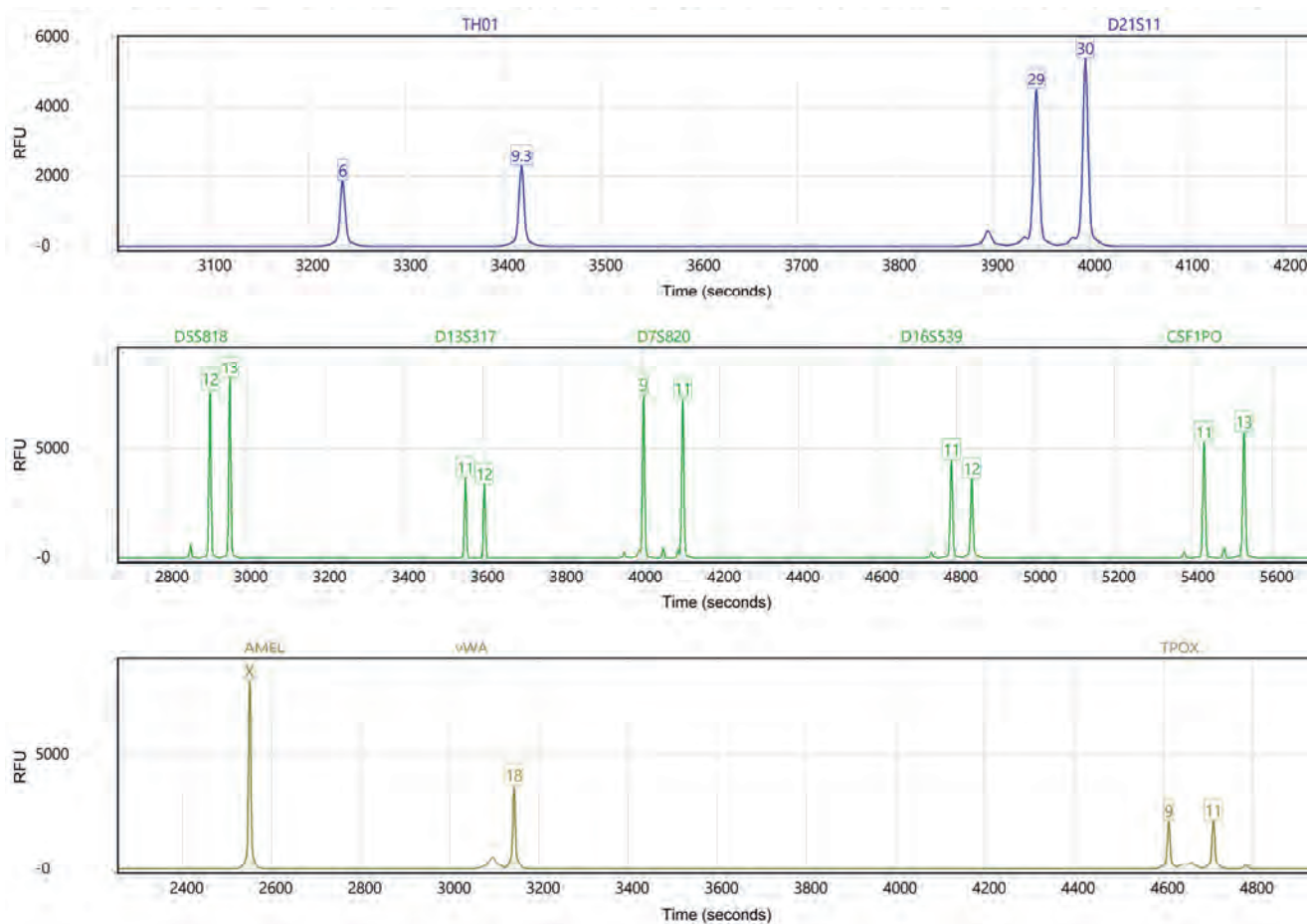
Annex 3  
Karyotype





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

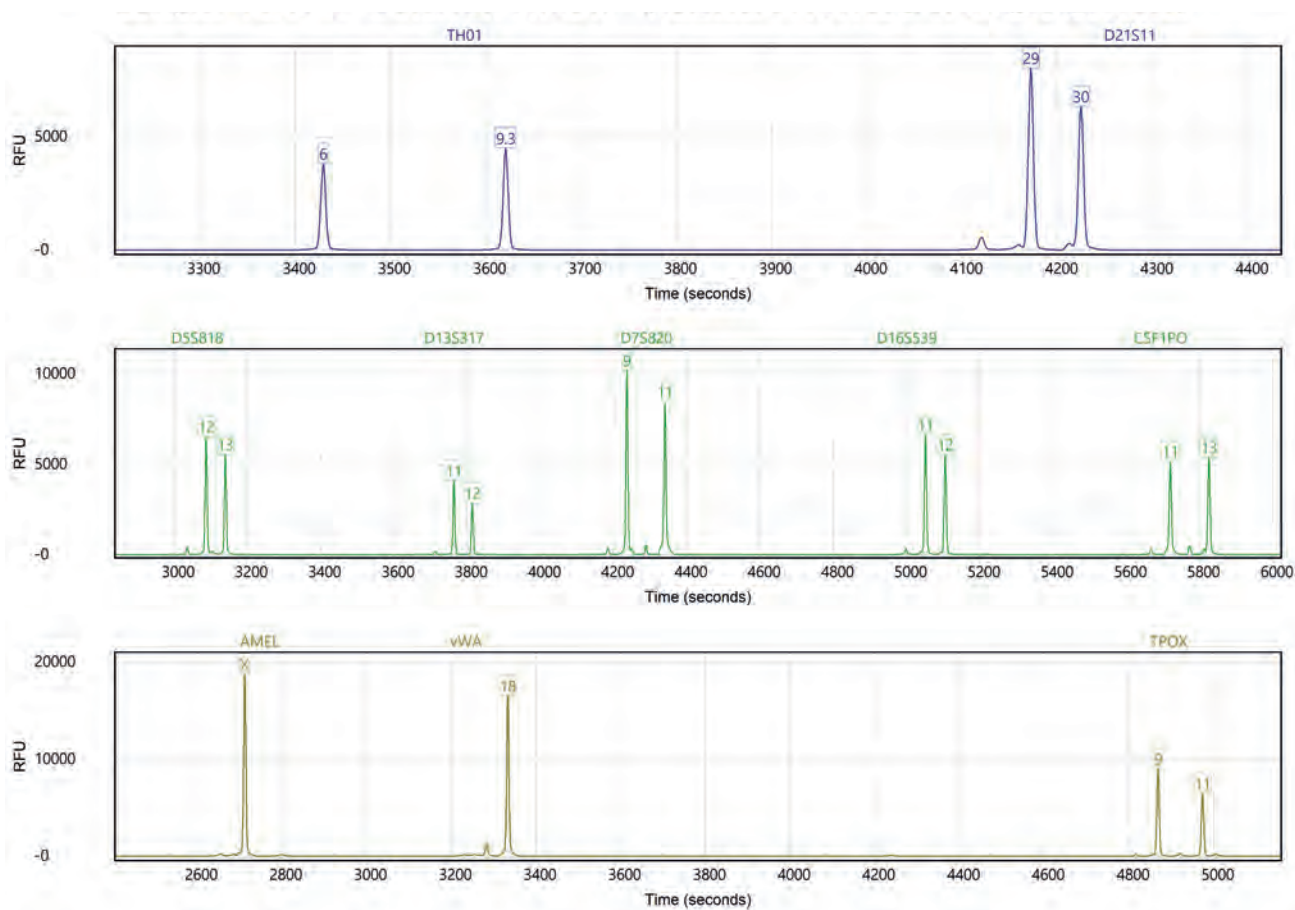
### Annex 4 Genetic fingerprinting of fibroblasts



GenePrint10 Marker	Test Sample Profile
TH01	6, 9.3
D21S11	29, 30
D5S818	12, 13
D13S317	11, 12
D7S820	9, 11
D16S539	11, 12
CSF1PO	11, 13
AMEL	X
vWA	18
TPOX	9, 11

Anexo 4  
Huella genética de la línea IC-AD5-F-iPS-4F-1.

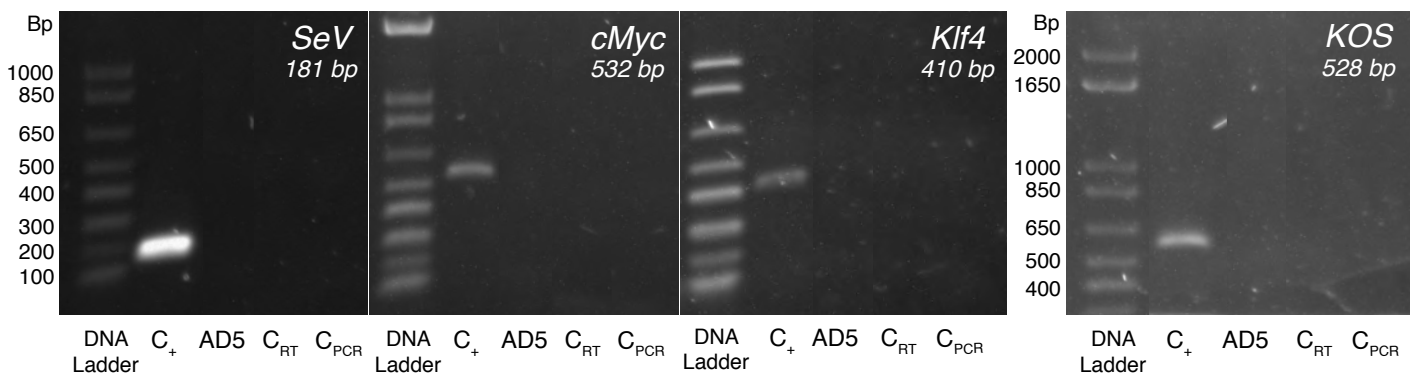
Annex 4  
Genetic fingerprinting of line IC-AD5-F-iPS-4F-1



GenePrint10 Marker	Test Sample Profile
TH01	6, 9.3
D21S11	29, 30
D5S818	12, 13
D13S317	11, 12
D7S820	9, 11
D16S539	11, 12
CSF1PO	11, 13
AMEL	X
vWA	18
TPOX	9, 11

Anexo 5  
Test de silenciamiento de la línea IC-AD5-F-iPS-4F-1

Annex 5  
Silencing Test



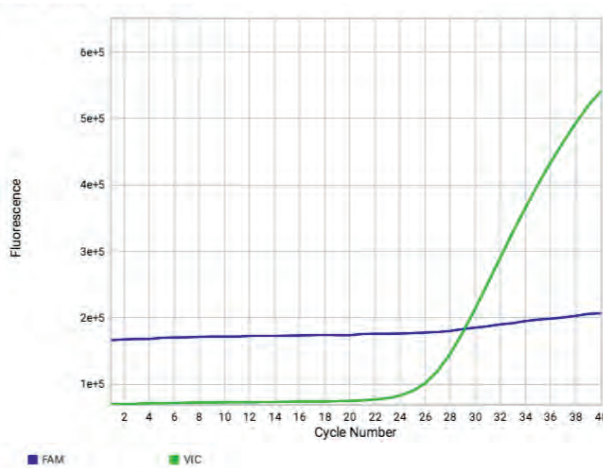
Gene	Primer (5'-3')	Length
<i>SeV</i>	Forward GGA TCA CTA GGT GAT ATC GAG C*	181 bp
	Reverse ACC AGA CAA GAG TTT AAG AGA TAT GTA TC*	
<i>KOS</i>	Forward ATG CAC CGC TAC GAC GTG AGC GC	528 bp
	Reverse ACC TTG ACA ATC CTG ATG TGG	
<i>cMyc</i>	Forward TAA CTG ACT AGC AGG CTT GTC G*	532 bp
	Reverse TCC ACA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

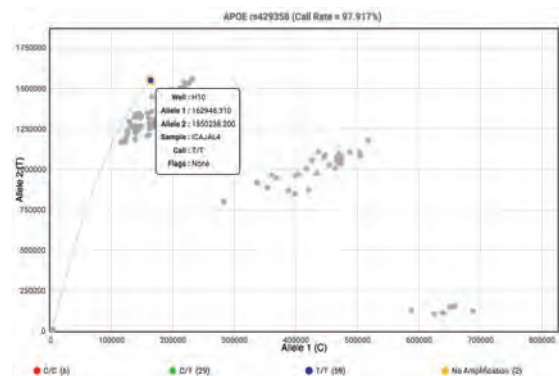
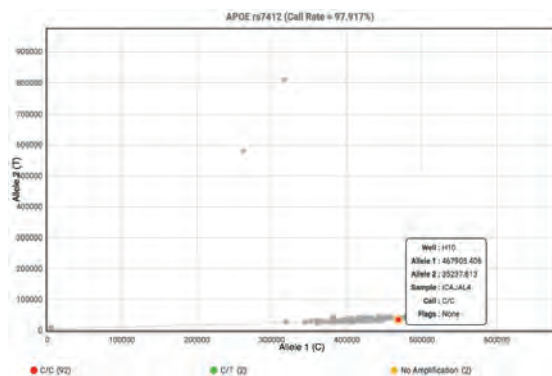
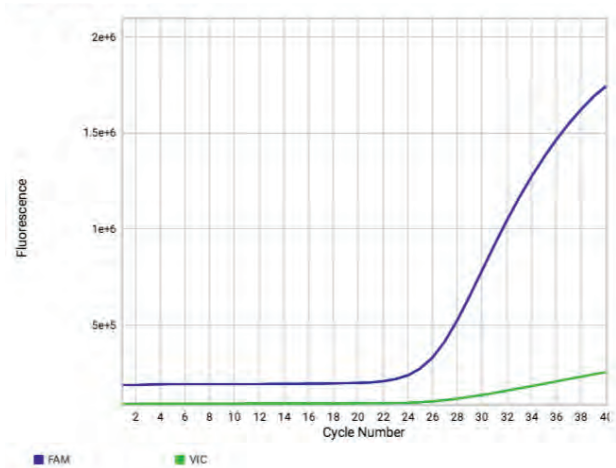
Anexo 6  
Confirmación del diagnóstico genotípico de la línea IC-AD5-F-iPS-4F-1

Annex 6  
Confirmation of genotypic diagnosis of the line IC-AD5-F-iPS-4F-1

SNP rs7412



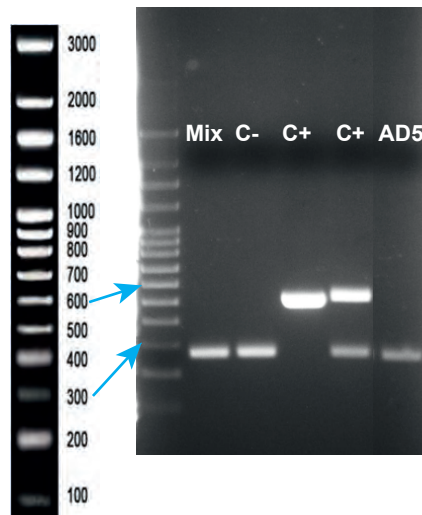
SNP rs429358



Using TaqMan SNP genotyping assays, we analyzed the rs7412 and rs429358 SNPs showing that the VIC probe (green) bound to the C-containing allele in rs7412 SNP while the FAM probe (blue) bound to the T-containing allele in rs429358 SNP, confirming that the IC-AD5-F-iPS-4F-1 cell line has an ApoE3/E3 genotype.

Anexo 7  
Test de micoplasma de la línea IC-AD5-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