

Investigator™ Quantiplex® Pro RGQ Kit

法医学検体の高感度な DNA 定量と男性 DNA の品質評価

Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit は、TaqMan® 法および QIAGEN 独自の高速反応試薬を用いた定量 RT-PCR 技術に基づく製品で、サンプル中のヒトの全 DNA および男性 DNA の品質評価を行いながら、各々を定量することができるキットです。キットには、PCR 阻害マーカとして信頼できる PCR インターナルコントロール (IPC) が含まれているため、STR 解析など下流の試験を阻害する可能性がある PCR インヒビターの有無を確認することができます。さらに、ヒトの全 DNA および男性 DNA いずれについても分解の程度を正確に評価することができるため、STR 試験に及ぼす影響を判断することが可能になります。このキットは、前処理で使用するサンプル調製法や下流で使用する STR キットの種類によらず、いかなるヒト ID 試験のワークフローに対しても適応します。さらに、IPC は、弊社の Investigator STR PCR assay 製品 (Investigator ESSplex SE QS Kit、Investigator 24plex QS Kits など) に含まれる Quality Sensor と相補的に作用するようデザインされており、ワークフロー全体としての最適化を可能にしています。また、女性 DNA に混在する男性 DNA を定量測定することが必要な性的暴行サンプルの検査には最適です。

- 女性 DNA の混在比率が高い (最大 1,000,000:1) 場合でも、男性 DNA を極めて正確かつ高感度に測定することが可能
- ヒトの全 DNA および男性 DNA いずれについても分解程度の個別評価が可能
- 広域ダイナミックレンジ: ヒトの全 DNA および男性 DNA いずれも 0.5 pg/μl ~ 200 ng/μl
- STR 試験結果との高い相関性を有する信頼できる阻害因子情報
- 高速 PCR 反応技術により定量結果を得るまで 1 時間程度

犯罪解決のパートナー

法医学検査において、DNA 定量は複雑なワークフローの一部に過ぎません。最も有用な結果を得るには各段階の試験を最適化するだけでなく、全体としての整合性をとることが重要です。Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit はこの問題に対応した製品であり、下流の STR PCR 試験において極めて有用な結果が得られるように開発されました。DNA 定量結果と STR PCR 試験結果との整合性をとるために、弊社の Quantiplex Pro Kit には IPC が、また Investigator STR PCR Kit には Quality Sensor がそれぞれ含まれています (図 1)。▶



図 1. Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit により PCR 阻害や DNA 分解に関する情報が得られ、さらに下流の STR PCR 試験とも整合性を保ちヒトの全 DNA や男性 DNA を正確に定量
 Quality Sensor を含む STR キットと Quantiplex Pro Kit とを併用することにより、定量試験と STR 試験における PCR 反応の確実性が示され、ワークフロー全体としてのシナジーが得られる。

IPC と Quality Sensor は、PCR 反応の阻害因子に対して同様の挙動をとるようにデザインされているため、各キットによる PCR アッセイ結果が相補的になります。これにより STR での確実な PCR 反応が予測されるため、自身を持って結果を解釈することができます。

DNA 分解 (Human Degradation Index、HDI および Male Degradation Index、MDI)

検体 DNA の分解が著しい場合、DNA が高濃度であっても STR PCR 解析が必ずしも成功するとは限りません。貴重な時間や高価な試薬を無駄にせず、適切な下流の解析方法が選択できるよう、Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit にはヒトの全 DNA および男性 DNA それぞれに対応する大小 2 つの PCR 標的 DNA が含まれています。これにより、DNA の分解程度を正確に評価することができます。長い鎖長の PCR 標的 DNA は、いずれも 350 bp 超の鎖長のため、対象となる男女の DNA を含む STR プロファイルにおいて、高分子座位での DNA 品質の推察が可能になります。さらに、PCR 標的 DNA は 2 つの鎖長が大きく異なっているため、対応する PCR 産物における DNA 分解への感受性も異なります (図 2)。ヒトの DNA および男性 DNA の 2 つの異なる鎖長を PCR 増幅することは、検体 DNA の分解程度を評価する強力な手段になります。また、STR における PCR 増幅と直接的な相関関係を有することも考えられます。このことは、分解していない女性 DNA サンプルに、分解が激しい加害者男性の DNA が少量混在した、性的暴力サンプルを解析する際には特に有用です。この特徴を利用することで男性 DNA の正確な質的特徴付けが可能となり、その後に実施する試験 (激しく分解された男性 DNA を Y-STRs あるいは Y-SNPs など) について適切に判断することができます。

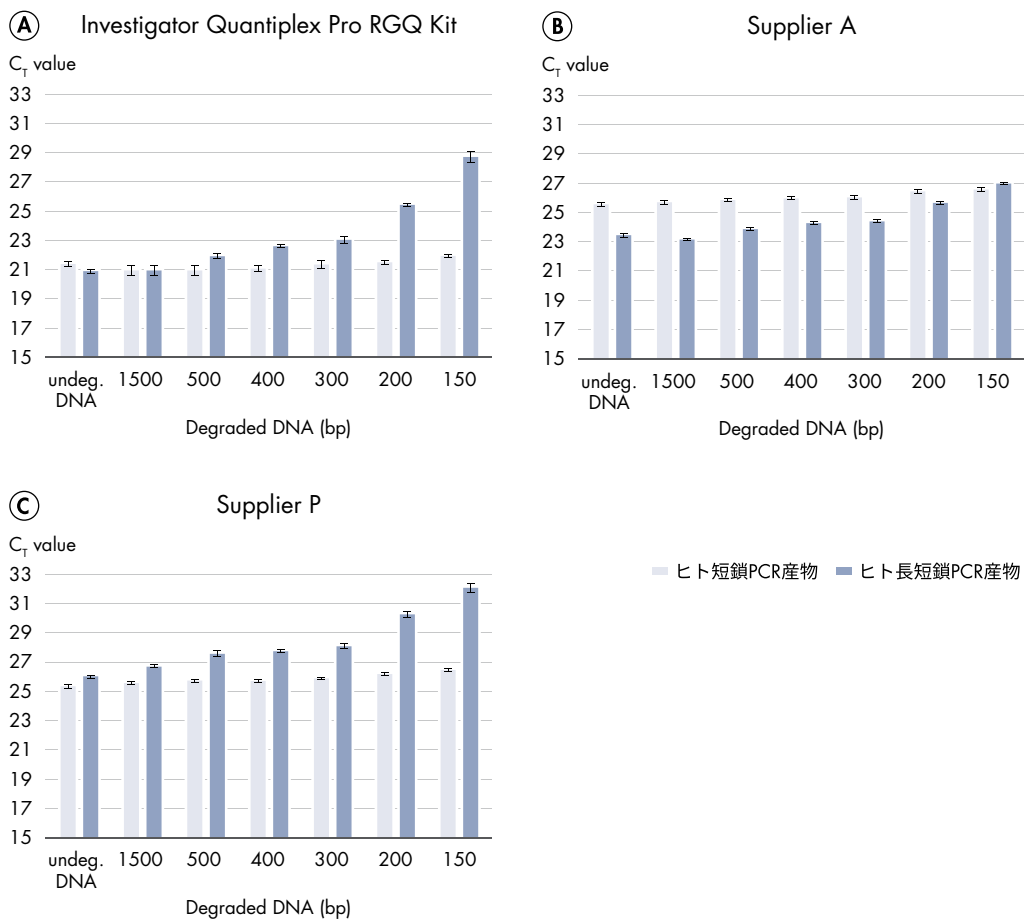


図 2. DNA 分解の正確な検出

Covaris® S220 Focused-ultrasonicator™を用いて男性のゲノム DNA をせん断し、DNA 断片のサイズが各平均で 1500 bp、500 bp、400 bp、300 bp、200 bp、150 bp になるように調整した。**A:** 各 DNA 断片 (4.6 ng) の C_T 値を Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit により測定した。市販されている他社 2 製品を同じ条件で使用した結果を **B** と **C** に示す。すべての反応は、製品製造元による仕様に準拠している。ヒト長短鎖 PCR 産物断片での C_T 値は、QIAGEN 製品が他社 2 製品より高い結果が得られ、DNA の品質をより正確に評価できることを示している。

Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit は、女性 DNA が過剰に存在するサンプルの場合でも、市販の他の製品より効率的に男性 DNA の分解を検出することができます (図 3)。男性 DNA の分解程度が正確かつ再現性良く定量できることで、Y-STR キットの使用に際して DNA を増量するなど、試験について正しい判断をすることが可能になります。▷

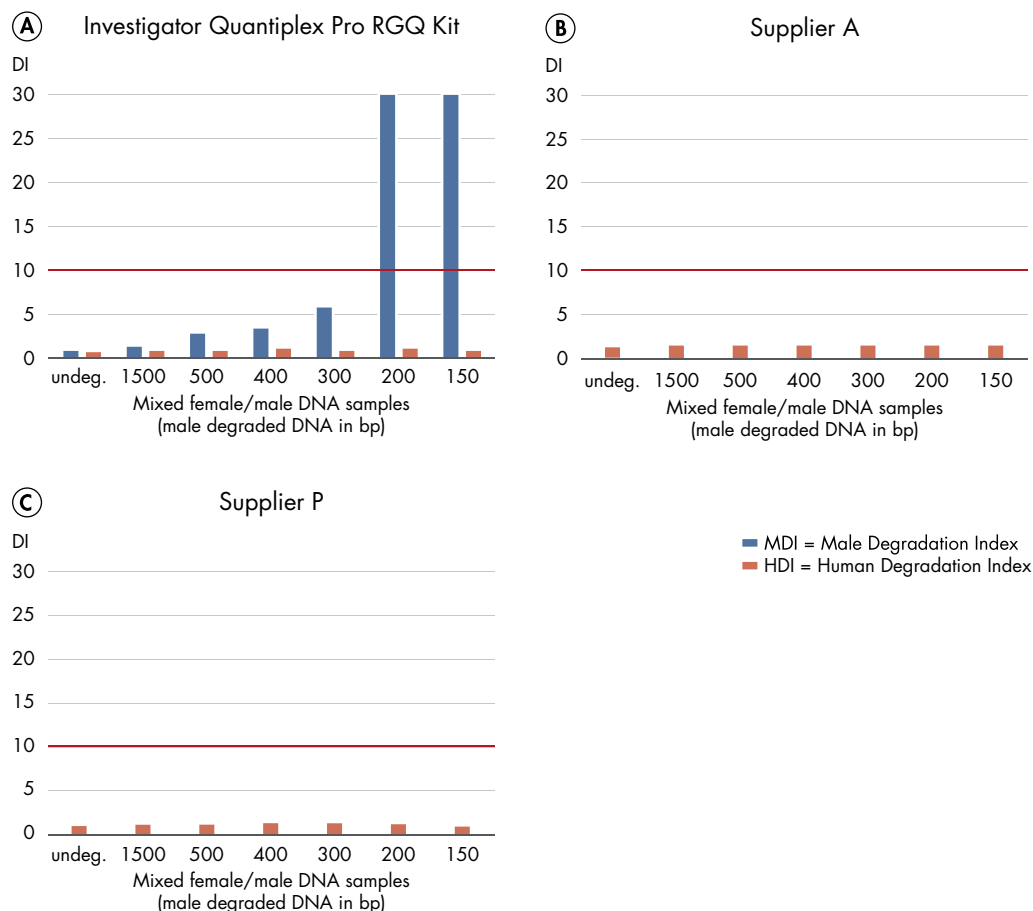


図 3. 男女の DNA が混在するサンプル中の男性 DNA の正確な測定

Covaris S220 Focused-ultrasonicator を用いて男性のゲノム DNA をせん断した。DNA 断片のサイズが各平均で 1500 bp、500 bp、400 bp、300 bp、200 bp、150 bp になるように調製し、分解されていない女性 DNA が 100 ng/μl、分解された男性 DNA が 0.1 ng/μl がそれぞれに含まれるように調製した。各サンプルを、Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit を A に、他社キットによる結果を B と C に結果を示す。Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit では、過剰量の女性 DNA 中に混在する男性 DNA の分解程度を正確に測定できたが、他社製品では測定することができなかった。

分解していない過剰の女性 DNA サンプルに男性 DNA 断片が少量混在している場合、Y-STR キットを使用しない限り、男性 DNA の有用なプロファイルを得ることは期待できません。Y-STR キットを使用するワークフローの有用性を実証し、さらに、Y-STR プロファイルと男性 DNA 分解との相関関係を確認するために、Investigator Argus Y-12 QS Kit を用いて男女の DNA が混在するサンプルから男性 DNA プロファイルを得ました。このキットでは、Y 染色体上にある 12 か所の STR loci を同時に増幅することができます (図 4)。

過剰量の女性DNAサンプルに混在する分解した男性DNAの ArgusYの増幅

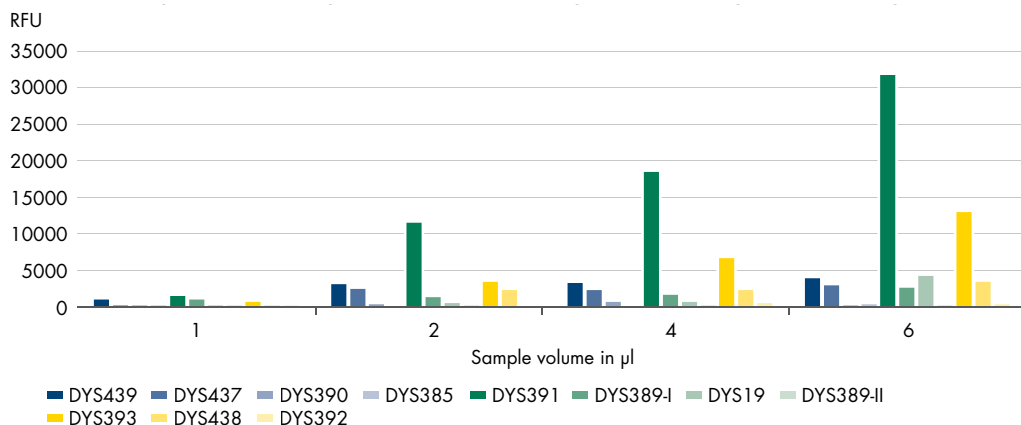


図 4. Investigator Argus Y-12 QS Kit による男性 DNA のプロファイリング

図 3 で調製した、分解されていない女性 DNA サンプルに 150 bp サイズまで分解された男性 DNA を混在させたサンプルを用い、Investigator Argus Y-12 QS Kit によりサンプル中の DNA を増幅した。この結果は、使用する DNA サンプルを増量することにより、男性 DNA の分解による影響が補完され得ることを示している。

測定感度とダイナミックレンジ

法医学用サンプルや個人識別用サンプルは、多量に採取できるサンプル（目で確認できる血痕など）から、微量にしか採取できないサンプル（細胞や遊離 DNA）まで様々なため、取り扱いには種々の工夫が必要な場合があります。さらに、性的暴行サンプルでは多くの場合、過剰な女性 DNA に混在する男性 DNA を正確に測定する必要があります。Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit は、卓越した検出感度とダイナミックレンジをもって、わずかなヒト DNA 及び男性の DNA に対応できるように設計されました。本キットを使用すれば、サンプル DNA に関係なく、ヒトおよび男性の DNA を正確かつ再現性良く検出することができます（図 5）。

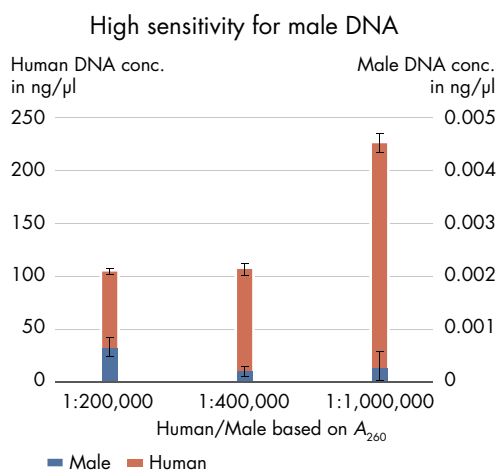


図 5. ヒトの全 DNA および男性 DNA の高精度かつ高感度な測定

3 種類の異なる男女 DNA 混合サンプル (0.5 pg/µl 男性 DNA + 100 ng/µl 女性 DNA (1:200,000)、0.25 pg/µl 男性 DNA + 100 ng/µl 女性 DNA (1:400,000)、0.2 pg/µl 男性 DNA + 200 ng/µl 女性 DNA (1:1,000,000)) を測定した。Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit により、男性 DNA および女性 DNA をそれぞれ正確に定量できた。

PCR 阻害物質の検出

法医学用サンプルでは、DNA が付着している物質が犯罪により様々に異なり、多くの場合、有用な DNA プロファイリングを阻害する物質が混在します。最も強力なサンプル調製法を適応した場合でも、精製 DNA サンプル中にその一部が残存しており、阻害物質を検出し、その影響を取り除かない限り、STR における PCR 反応が阻害されることとなります。Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit には、PCR 阻害物質に感受的で直接的に反応を示す IPC が含まれています（図 6）。このように、STR 解析の阻害物質の存在の検出のみならず、サンプルに最適な解析方法の選択をするのに必要な阻害物質の混入程度を示唆する正確な定量情報を提供します。

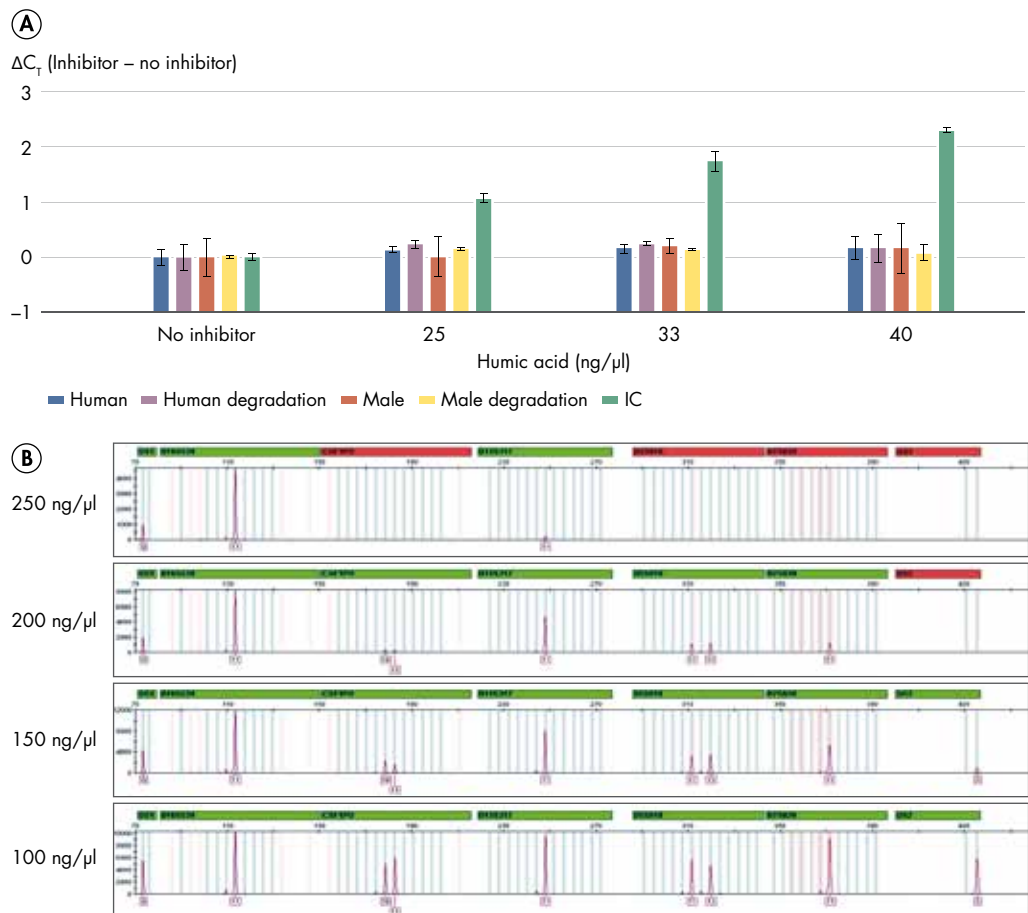


図 6. PCR 阻害物質の検出

A. Rotor-Gene[®] Q real-time PCR system を用い、0.25,33,40 ng/μl のフミン酸存在下で Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit による試験を行った。インターナルコントロール(緑)は Quality Sensor として作用し、 C_T 値のシフトにより阻害物質の存在を確認した。一方、フミン酸による定量(ヒトの全 DNA は赤、男性 DNA は青)への影響については、フミン酸濃度が最大 40 ng/μl までは信頼できる結果が得られた。

B. Investigator 24plex QS Kit は、フミン酸濃度が 200 ng/μl (STR 反応における最高濃度) までには使用に影響しないことが確認されている。一方、Investigator 24plex Kit に含まれる Quality Sensor により (図中各濃度の右端に示すホモ接合 locus)、Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit と同程度の感度で PCR 阻害物質の存在を確認できる。

テクニカル仕様

Parameter	Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit
Human target, small (length/channel)	91 bp/yellow channel
Human target, large (length/channel)	353 bp/red channel
Human male target, small (length/channel)	81 bp/green channel
Human male target, large (length/channel)	359 bp/orange channel
Internal PCR Control (length/channel)	434 bp/crimson channel
Volume per reaction	20 μ l
PCR speed on the RGQ	~1 hour

オーダーインフォメーション

製品	内容	Cat. no.
Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit (200)	Quantiplex Pro RGQ Reaction Mix, Quantiplex Pro RGQ Primer Mix, Male Control DNA M1, QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387316
QIAgility System HEPA/UV (incl. PC)	Robotic workstation for automated PCR setup (with UV light and HEPA filter); including notebook computer, QIAgility Software, installation and training, 1-year warranty on parts and labor	9001532
Rotor-Gene Q 6plex HRM System	Real-time PCR cycler with 6 channels (blue, green, yellow, orange, red, crimson), laptop computer, software, accessories: includes 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9001660

記載の製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。最新のライセンス情報および製品ごとの免責事項については、各 QIAGEN キットの Handbook または User Manual をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は www.qiagen.com から入手されるか、QIAGEN テクニカルサポートまたはお近くの代理店へお問い合わせください。

個人識別および法医学鑑定のソリューションに関しては、**弊社ウェブサイト www.qiagen.com/quantiplexkits** をご覧ください。

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAgility®, QIASymphony®, Investigator™, Quantiplex®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); Covaris®, S220 Focused-ultrasonicator™ (Covaris, Inc.); TaqMan® (Roche Group).
本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。製品情報、仕様、カタログ番号 (Cat. no.)、価格等は予告なく変更する場合がございます。予めご了承ください。
© 2018 QIAGEN, all rights reserved.

株式会社 キアゲン | 〒104-0054 | 東京都中央区勝どき 3-13-1 | Forefront Tower II
Tel:03-6890-7300 | Fax:03-5547-0818 | E-mail:techservice-jp@qiagen.com | www.qiagen.com