

動画『DNA型鑑定の実際』の解説

*本動画は、押田茂實・岡部保男編著『Q&A 見てわかる DNA型鑑定』（現代人文社、2010年4月刊行）の付録DVDを再収録したものである。



DVDの構成（収録時間32分04秒）

- 1 鑑定試料の血液採取
- 2-1 フェノール・クロロホルム法による血液からのDNA抽出
- 2-2 QIAamp® DNA Micro Kitによる血液からのDNA
- 3 PCR（Polymerase Chain Reaction）法
- 4 STR多型の検出

参考 精液斑の鑑定

*本DVDでは、①採血した血液について、②DNA抽出、③PCR法、④STR多型の検出を行っています。一般に性的犯罪に関連する下着の精液斑からの精液の証明とDNA型鑑定例が多いので、参考までにその検査法の一部を最後に収録してあります。

企画：押田茂實（日本大学医学部社会医学系法医学分野）

撮影協力：鉄 堅（日本大学医学部社会医学系法医学分野）

岩上悦子（日本大学医学部社会医学系法医学分野）

飯酒いさはい盃勇（日本大学医学部社会医学系法医学分野）

岡部健一（弁護士）・齋田健二郎（弁護士）

制作：株式会社ビデオ・パック・ニッポン

撮影場所：日本大学医学部法医学教室

撮影日時：2009年12月17日・24日

著作権者：押田茂實＋現代人文社

1 鑑定試料の血液採取

服装チェック、帽子・マスク・手袋

諸注意（使用するマイクロピペット・遠心分離機など）

氏名、記名のチェック（取り違えの防止）



鑑定試料の血液採取

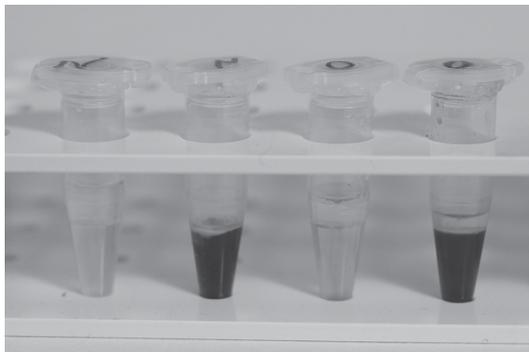


諸注意（使用するマイクロピペットの

諸注意（使用するマイクロピペットの
扱いなど）



② 溶液 I 0.5ml と NP-40 20 μ l を入れ、よく混合する。



⑥ 上、中層を新しいチューブに入れる。
下層：赤→黄
上層：白

2-1 フェノール・クロロホルム法による血液からの DNA 抽出 (約 1 時間位)

- ① 全血 0.5 ml (抗凝固剤：EDTA3Na 約 3 mg/ml) を 1.5 ml チューブに入れる。
- ② 溶液 I 0.5 ml と NP-40 20 μ l を入れ、よく混合して 8,000 回転、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離する。(細胞膜を溶かす)
- ③ デカンテーション法で上清を捨てる。
(沈査を捨てないよう、ゆっくりと上清を捨てる)
- ④ 溶液 II を 300 μ l 入れ、チップ先端を切ったものでよく混ぜ合わせる。
- ⑤ 飽和フェノール 300 μ l を入れ、よく混合して、12,000 回転、4 $^{\circ}$ C で 2 分間遠心する。(核膜を溶かす)
- ⑥ 上、中層を新しいチューブに入れる。 下層：赤→黄 上層：白



- ⑤と⑥を3回繰り返す
- ⑦ Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 液 300 μ l を加え、よく混ぜ合わせてから 12,000 回転、4 $^{\circ}$ C で 2 分間遠心する。
- ⑧ 中間層、上層を取って、Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) 液 300 μ l を加え、混ぜ合わせて 12,000 回転、4 $^{\circ}$ C で 2 分間遠心する。
- ⑨ 上層だけ取り、約 2.5 倍量である 100%エタノール 500 μ l を加え、よく混和する。(純粹の DNA を集める、DNA が肉眼で見える)
- ⑩ 12,000 回転、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心する。
- ⑪ デカンテーション法で上清を捨てる。
- ⑫ 70%冷エタノール 500 μ l を加え、沈殿した DNA を洗浄し、12,000 回転、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心する。
- ⑬ 上層のエタノールを捨てて、残っている DNA を乾燥させる。
- ⑭ TE buffer (緩衝液) または滅菌水 25~50 μ l を入れる。
- ⑮ 65 $^{\circ}$ C で 5~10 分間加温して、DNA を溶かす。

DNA 抽出終了

- ⑯ DNA 濃度を測定する。測定器械 (NanoDrop $^{\circledR}$ Spectrophotometer、ND-100)



- ⑯ DNA 濃度を測定する。
測定器械 (NanoDrop $^{\circledR}$ Spectrophotometer、ND-100)

2-2 QIAamp® DNA Micro Kit(50) による血液からの DNA 抽出



DNA 抽出キット

QIAamp® DNA Mico Kit プロトコール：少量の血液からのゲノム DNA 分離
EDTA、クエン酸、ヘパリンなどの抗凝固剤で処理した 1~100 μ l の全血から
DNA を分離するためのプロトコール。

準備 服装チェック

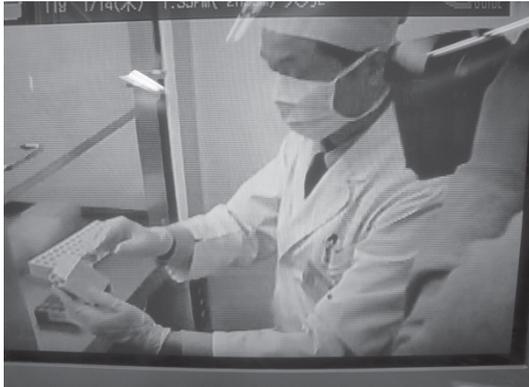
- ・サンプルを室温に戻す (15~25°C)。
- ・溶出用 Buffer AE あるいは蒸留水を室温に戻す。
- ・インキュベーターを 56°C にセットする。
- ・Buffer AW1 および AW2 を調製する。
- ・Buffer AL あるいは Buffer ATL が沈殿物を形成している場合には 70°C に温めて静かに攪拌し、沈殿物を溶かす。

操作手順

- ① 1.5ml のマイクロ遠心チューブに 1~100 μ l の全血をピペットで入れる。
- ② Buffer ATL を加えて最終容量を 100 μ l にする。
- ③ 10 μ l の Proteinase K を添加する。
- ④ 100 μ l の Buffer AL を添加後、ふたを閉めボルテックスで 15 秒間混ぜる。
- ⑤ 56°C で 10 分間インキュベートする。
- ⑥ 1.5ml チューブを数秒間遠心してふたの内側に付いたサンプルを集める。
- ⑦ 50 μ l のエタノール (96~100%) をサンプルに添加し、ふたを閉め、15 秒間ボルテックスで完全に混和する。室温で 3 分間インキュベートする。
- ⑧ 1.5ml チューブを数秒間遠心してふたの内側に付いたサンプルを集める。
- ⑨ QIAamp MinElute Column にいれてふたを閉め、8,000 回転で 1 分間遠心する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、ろ過液を含むコレクションチューブを捨てる。
- ⑩ QIAamp MinElute Column を静かに開き、500 μ l の Buffer AW1 を添加する。8,000 回転で 1 分間遠心する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、ろ過液を含むコレクションチューブを捨てる。
- ⑪ QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW2 を添加する。ふたを閉めて 6000 \times g (8000rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、ろ過液を含むコレクションチューブを捨てる。
- ⑫ メンブレンを完全に乾燥させるために、14,000 回転で 3 分間遠心する。
- ⑬ QIAamp MinElute Column を新しい 1.5ml のマイクロ遠心チューブにセットし、ろ過液を含むコレクションチューブを捨てる。QIAamp MinElute Column のふたを静かに開き、20~100 μ l の Buffer AE (あるいは蒸留水) をメンブレンの中央に添加する。
- ⑭ ふたを閉めて室温 (15~25°C) で 1 分間インキュベートする。14,000 回転で 1 分間遠心する。

DNA 抽出終了

3 PCR (Polymerase Chain Reaction) 法



①前処理



②PCR 装置にセット



③PCR 装置の作動

器械

(手順、必要時間)

自動的に PCR 増幅

AmpF λ STR \circledR Identifiler TM PCR Amplification Kit (Applied Biosystems 社) を用いて User's Manual に従って、D8S1179、D21S11、D7S820、CSF1PO (Human c-fms proto-oncogene for CSF-1 receptor gene)、D3S1358、TH01 (Human tyrosine-hydroxylase gene)、D13S317、D16S539、D2S1338、D19S433、vWA (Human von Willebrand factor gene)、TPOX (Human thyroid peroxidase gene)、D18S51、D5S818、FGA (Human alfa fibrinogen) の 15 座位の常染色体 STR 多型と性染色体の Amelogenin 座位の PCR 増幅を行い、STR 多型の解析には、ABI PRISM \circledR 310 ジェネティックアナライザを用い、キャピラリー電気泳動を行い、GeneMapper ID v3.2 ソフトに基づいて、それぞれの型判定を実施した。

①クリーンベンチでの前処理



4 STR 多型の検出

STR の検査法として2種類があり、一つは従来のポリアクリルアミドゲル電気泳動法で、もう一つはキャピラリー電気泳動法である。前者は手作業で銀染色法を用い、一回におおよそ1～3ローカスを検出できる。後者のキャピラリー電気泳動法は機械の検出器により結果を記録し、一回に9箇所以上のローカスを検出でき、現在多用されている。

・キャピラリー電気泳動法

機械の進歩が著しい (ABI PRIZM ®310 ジェネティックアナライザ、Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザ)

- ① サンプルの前処理 (陽性対照・陰性対照・検体)
- ② 入力、生データの表示 (35～40分/1サンプル)
- ③ 結果の出力・印刷
- ④ エレクトロフェログラム (チャート) のチェック



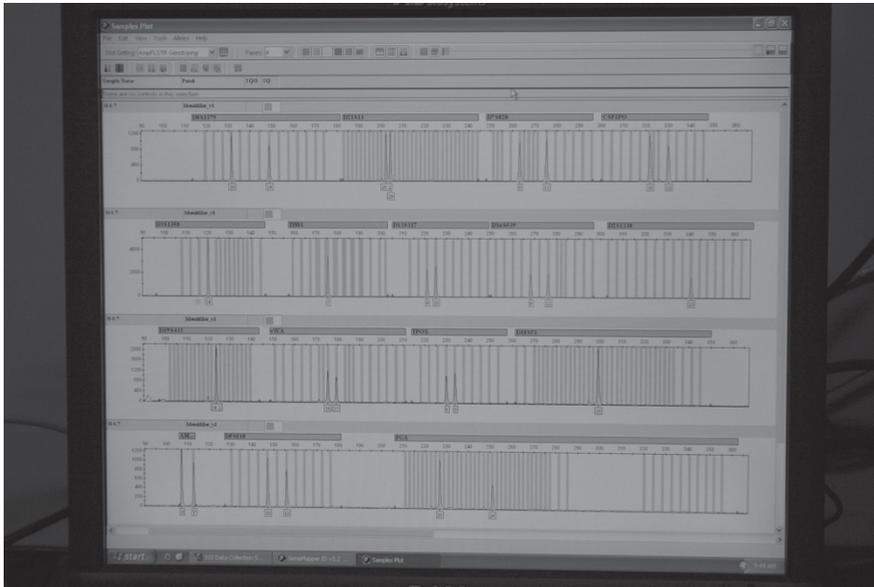
STR 多型検出器 (左奥) とコンピュータ (中央)



Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザ

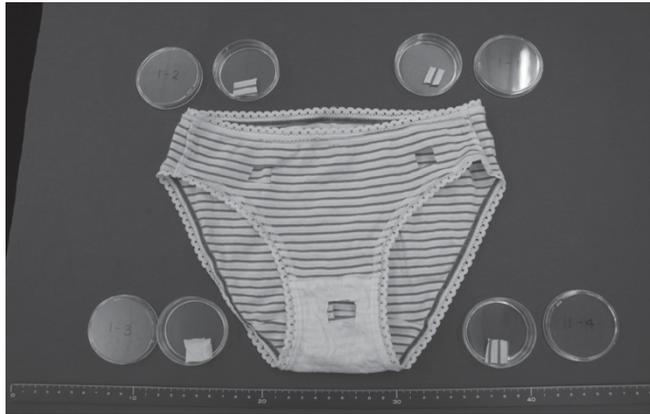


STR 多型検出後、コンピュータを操作してエレクトロフェログラム (チャート) を出力する



画面上的エレクトロフェログラム

参考 精液斑の鑑定



1 鑑定試料の観察と試料採取

下着の精液斑、ガーゼの精液斑

- ① 全景・部分（拡大）写真撮影（下にメジャーを入れて撮影する）
- ② 試料採取部位の写真撮影
- ③ 試料の採取（検体と陰性対照）
- ④ 試料採取後の部位写真撮影（検体と陰性対照）
- ⑤ 採取試料の写真撮影（検体と陰性対照）

2 予備試験

- ① 紫外線照射
- ② SM テスト

酸性ホスファターゼに関する定性試験。

【試薬】 1液 α -Naphthylphosphoric acid

2液 Diazonium o-dianisidine

0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5)

【方法】

- ① 1液と2液を等量混合し、酢酸緩衝液で8倍に希釈する。
- ② 希釈液を検体に滴下する。
- ③ 判定（陽性ではアゾ色素生成により鮮やかな紫色を呈する）。

3 確認試験（精子の証明）～顕微鏡検査・写真撮影（400倍）



精子の写真（オピッツ法〔Oppits〕による発色、400倍）

4 DNA型検査

- ① 血液からのDNA型検査と異なり、被害者（女性）と加害者（精液）の混合斑痕の場合には両方の型が精液斑などから検出されます。精液のみのDNA型を検出する方法も施行されています。
- ② 犯人逮捕前に試料から犯人の精液の型が検査されて判明しているか。
（犯人の精液を誤って混入される可能性のないことの証明）

（了）