



Independent Forensics Rapid Stain Identification Of Human Semen (RSID™-SEmen)

Technical Information Sheet #0200

使用目的

RSID™-SEmen は、迅速、簡便で信頼性のある検出を目的として作成された精液検出用キットで、衣服、寝具、壁から採取した付着物、コンドームや染み・汚れの付着物などの法医学実験室で扱うさまざまな検体からヒト精液を検出します。

このテストでは、わずか $1\mu\text{l}$ のヒト精液を検出します。テストは 10 分で判定できます。

検出プロトコールは、STR 解析を行う前の、DNA 解析の標準的な法医学実験手順に完全に摘要できます（標準プロトコール参照）。

テスト感度は STR 分析で精液を検出する際に十分な生物試料が含まれるように調節されています（精管切除術を受けた場合や精子数が減少している男性を除く）。標準的な抽出プロトコールが付属しています（標準プロトコール参照）。

RSID™ テストはヒト精液の一次確認試験です。ヒトの精液以外の体液とは交差反応がありません。このイムノクロマストリップテストはヒト唾液 α -アミラーゼに特異的な 2 種類のモノクローナル抗体を使用しています。

はじめに

RSID™-SEmen テストはイムノクロマストリップテストで、ヒト精液セメノジェリン (Semenogelin) の存在を検出する目的で作成されたものです。セメノジェリンは精囊で作られるタンパク質で、射精後に精液を凝塊させる働きがあります。

RSID™-SEmen テストは 2 種類のヒト セメノジェリン特異的モノクローナル抗体を使用しています。

RSID™-SEmen テストはヒト精液に特異的で、他の手法と比べて感度の向上、特異性、迅速さなど、さまざまな利点があります。今日の精液検出手法は推定法で（証拠物件の更なる検証を行うことを前提にした方法で、精液に特異的ではない）、それゆえ法律的にも科学的な課題にも批判を受けやすい方法となっています。

テスト原理

RSID™-SEmen は 2 種類のヒト セメノジェリン特異的モノクローナル抗体を使用したイムノクロマトアッセイです。2 種類のうち一方のモノクローナル抗体は金コロイド標識さ

れており、カセットの検体滴下部真下の結合パッドに置かれています。もう一方の抗体はカセット内部の結合パッドと接触したメンブレン上の「テ스트ライン (T)」上に置かれています。メンブレン上の「コントロールライン (C)」には抗マウス IgG 抗体が置かれ、これがポジティブコントロールとなっています。

メンブレンの反対側の末端部分にはウイックがあり、これがテスト終了後の検体とランニングバッファーを吸収し、検体が逆流するのを防ぎます。検体が滴下部に滴下されるとすぐに、ランニングバッファーと検体は結合パッドを通って拡散し、金コロイド標識抗体液中に広がっていきます。もしヒト セメノジェリンが検体中に存在すれば、抗原-金コロイド標識抗体の複合体が形成されます。検体と抗体（複合体とフリー体）はランニングバッファーに乗ってテ스트ストリップのメンブレン相に移動します。テ스트ライン上に固相されたセメノジェリン抗体がセメノジェリン-金コロイド標識抗体の複合体を捕らえ、「テ스트ライン」に赤線が現れます。もしヒト セメノジェリンが存在しなければ、抗原-金コロイド標識抗体の複合体が形成されませんので、金コロイドは「テ스트ライン」上に蓄積されず、赤線は現れません。「コントロールライン」上の抗マウス IgG は、ライン上を通過したマウス抗体をすべて捕らえるため、「コントロールライン」に赤線が現れます。これにより、検体が検体滴下部から「テ스트ライン」を通過して「コントロールライン」まで移動したこと示し、ストリップテストが正しく機能したことを表します。

キット構成内容

- ・ テストカセット 25 個
防湿ホイルで個包装済（シリカゲル乾燥袋入り）
- ・ RSID™-Semen Running Buffer 5ml
- ・ RSID™-Semen Extraction Buffer (RSID™-Semen 用の組成。STR フリー) 25ml
- ・ プロトコール

標準プロトコール（ポジティブコントロール用）

RSID™-SEmen のポジティブコントロールは滅菌綿棒で採取したヒト精液 $50\mu\text{l}$ から作製します。精液が吸着した綿棒を 1ml の RSID™-Semen Extraction Buffer に浸し、室温で 1-2 時間抽出します。この抽出液 $5\mu\text{l}$ を $95\mu\text{l}$ の RSID™-Semen Running Buffer で希釈します（トータル容量 $100\mu\text{l}$ ）。 $100\mu\text{l}$ 全量をカセットの検体滴下部に滴下します。これは、強い陽性反応を示します。

検体解析の標準抽出プロトコール

証拠物件（壁から採取した付着物、コンドームや染み・汚れの付着物など）から得られた検体を $200-300\mu\text{l}$ の RSID™-Semen Extraction Buffer で 1-2 時間抽出します。この抽出液 $20\mu\text{l}$ を $80\mu\text{l}$ の RSID™-Semen Running

Bufferで希釈します(トータル容量 100 μl)。衣類や紙の付着物は、付着部分を切り取って(～20mm²)使用します。切り取ったものを 100 μl の RSID™-Semen Extraction Bufferに浸し、1-2 時間抽出します。この抽出液 10 μlを 90 μl の RSID™-Semen Running Bufferに加え、トータル 100 μl に調製します。それから、100 μl全量をカセットの検体滴下部に滴下します。残った抽出液でその後STR解析を行います(標準プロトコールを参照)。

ストリップテストアッセイ手順

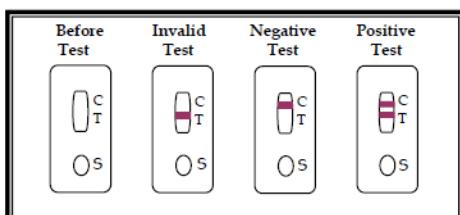
注意:アッセイは室温で行ってください。また、すべてのアッセイでポジティブおよびネガティブコントロールを用意してください(標準プロトコールを参照)。

1. 除湿ホイル袋からカセットを取り出します。シリカゲル乾燥剤を捨てます。
2. RSID™-Semen Running Buffer で 100 μl の検体液を調製し、0.6ml のマイクロチューブに入れます。
3. タイマーを 10 分にセットします。
4. ランニングバッファーに希釈されている検体をカセットの検体滴下部に滴下します。タイマーをスタートさせます。
5. 10 分後、判定を行い、結果を記録します。
6. High Dose Hook Effect のため、ポジティブあるいはネガティブコントロールの結果反応が弱い場合は、検体を 1:20 に希釈して再度試験を行ってください。例えば、もし 200 μl の綿棒抽出物を 20 μl 使用して得られたポジティブあるいはネガティブコントロールの結果が弱かった場合は、もとの抽出物 1 μl を 99 μl の RSID™-Semen Running Buffer に加え、新しいカセットで試験してください(詳細は後述の High Dose Hook Effect を参照)。
7. カセットを処分します。カセットの繰り返し使用はできません。

判定法

RSID™-SEmen は検体を滴下してから正確に 10 分後に判定してください。下図は結果例を示しています。

- i) 明確な赤線がコントロール(C)のみに現れた場合:陰性 ヒト精液は検出されず
- ii) 明確な赤線がコントロール(C)とテスト(T)の両方に現れた場合:陽性 ヒト精液を検出
- iii) 明確な赤線がテスト(T)のみに現れた場合:測定失敗 結果得られず



安定性と保存

RSID™-SEmen カセットは室温で保存してください。RSID™-Semen Running Buffer、RSID™-Semen Extraction Buffer は 4°Cで保存してください。印字された有効期限を過ぎたカセットは使用しないでください。

特異性

RSID™-SEmen テストはヒト セメノジェリンに特異的に作られています。ヒト唾液、全血、膣分泌液、月経血、母乳や尿とは交差反応がありません。

下記の動物の精液との交差反応がないことを試験済みです。

イヌ、ネコ、マウス、ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ヒツジ

感度

標準プロトコールを用いた場合、RSID™-SEmen の検出限界は 1 μl です。

未希釈の精液は RSID™-SEmen には使用しないでください。精液の粘性により正確な結果が得られなくなります。検体はまず滅菌綿棒にとり、RSID™-Semen Extraction Buffer で抽出し、RSID™-Semen Running Buffer で希釈してください。

High Dose Hook Effect

テストサンプル中に非常に高レベルのターゲット(この場合はセメノジェリン)が存在する場合、イムノクロマトストリップテストでは偽陰性の結果となり、これを High Dose Hook Effect といいます。高レベルのターゲット存在下では、結合しきれなかったターゲットがコロイド金標識抗体－抗原複合体より先にテストラインに到達てしまい、偽陰性の結果となります。

我々は、ヒト精液が過剰に含まれた検体(～3-50 μl)を解析する場合に RSID™-SEmen ではポジティブコントロールの結果が弱かったり偽陰性の結果が得られたりすることを観測しています。20 倍の希釈で再試験を行うことで、すべてのケースにおいてポジティブコントロールの結果が弱かったり偽陰性の結果が得られたりすることを回避できました(詳細は Validation Report 参照)。

注意:標準的な実験室試験では、RSID™-SEmen のユーザーは High Dose Hook Effect により弱いポジティブコントロール反応や偽陰性の結果を見る場合があります。それゆえ、これらの結果が出た場合には、検体を 1:20 に希釈して再試験を行ってください。再試験の結果ポジティブコントロールに強い陽性反応が得られた場合、1 度目の結果は High Dose Hook Effect によるものだということがわかり、過剰の精液が検体中に含まれていたことになります。もし、再試験の結果が再び弱い反応を示せば、1 度目の結果が正しかったということになります。

**Independent Forensics
Rapid Stain Identification Of
Human Semen (RSID™-SEmen)
Provided Protocols #0200**

可能であれば、衣類などの簡単に裁断できる物質に付着した染み・汚れは、再試験ができるように付着物の最低でも半分を保存しておきます。付着物の付いた物質の裁断に使用するハサミやメスは、ハサミの中心軸部分を特に注意しながら、使用する前につど 95%エタノール、蒸留水で洗浄し、清潔なキムワイプで水分を拭き取ってください。ハサミとメスは使用するごとに 95%エタノールと蒸留水に順々に浸すことを推奨します。それぞれの検体につど新しい清潔な切斷面を使用するようにしてください。

グラスや金属などの裁断できない物質に付着した付着物は、滅菌脱イオン水で湿らせた清潔で新しい綿棒でサンプリングします。スポンジに浸み込ませるような要領で付着物を湿らせた綿棒へ移します(滑らかな表面に対しては、力加減を中程度に調節します。荒い表面に対しては、より弱い力加減で綿棒を使用し、綿棒の先が崩れないように注意してください)。綿棒は適切な環境下で空気乾燥させ、遮光して室温で保存します。

メスあるいはハサミを用いて綿棒と軸の間で切り取り、綿棒の軸を取り除きます。ハサミを用いて軸の部分から綿球の頭の部分を切り取ります(綿棒をマイクロチューブに入れ、綿球を軸のできるだけ近い部分で切断し、綿球の頭の部分はチューブ内に残します)。切断したらすぐに、軸の部分は実験室の規定に従い保存あるいは廃棄してください。

必要な器具:0.6ml あるいは 1.5ml の使い捨てマイクロチューブ(DNase, RNase, pyrogen, RNA/DNA フリー、あるいは同等品)、filtrationチップ(row retention タイプ)、使い捨てピペット、キムワイプ

必要な試薬:ddH₂O、95%エタノール

抽出プロトコール- 付着物検出のポジティブコントロール用

RSID™-SEmen のポジティブコントロールは滅菌綿棒で採取したヒト精液 50 μl から作製します。

プロトコール

- 1) 滅菌綿棒上にヒト精液を 50 μl 吸着させます。
- 2) 綿棒を 1.5ml のマイクロチューブに清潔な方法で入れます。
- 3) RSID™-Semen Extraction Buffer を 1ml チューブに加え、フタをします。

- 4) チューブを勢いよくボルテックスし、綿棒を完全に湿らせます。
 - 5) 1-2 時間室温でインキュベーションします。
 - 6) 5 μl の抽出液と 95 μl の RSID™-Semen Running Buffer を混合し、トータル容量 100 μl に調製します。
 - 7) 100 μl 全量をカセットの検体滴下部に滴下します。
 - 8) 10 分後、結果を記録します(Technical information sheet の図を参照)。
- このポジティブコントロールは強い陽性反応を示します。

抽出プロトコール- 付着物検出のネガティブコントロール用

RSID™-SEmen のネガティブコントロールは滅菌済み綿棒から作製します。

プロトコール

- 1) 滅菌綿棒上に滅菌ddH₂Oを 50 μl 吸着させます。
 - 2) 綿棒を 1.5ml のマイクロチューブに清潔な方法で入れます。
 - 3) RSID™-Semen Extraction Buffer を 1ml チューブに加え、フタをします。
 - 4) チューブを勢いよくボルテックスし、綿棒を完全に湿らせます。
 - 5) 1-2 時間室温でインキュベーションします。
 - 6) 5 μl の抽出液と 95 μl の RSID™-Semen Running Buffer を混合し、トータル容量 100 μl に調製します。
 - 7) 100 μl 全量をカセットの検体滴下部に滴下します。
 - 8) 10 分後、結果を記録します(Technical information sheet の図を参照)。
- このネガティブコントロールは陰性反応を示します。

抽出プロトコール - 裁断物に付着した物質検出のみの単独操作プロトコール

多くの実験室では、DNA 解析を裁断物の残りの部分を使って検討する前に、証拠物件から切り取った小さな裁断物を試験することで証拠物件の解析を行います。この技術には RSID™-SEmen 試験を簡単に適用することができます。

プロトコール

- 1) 清潔な方法で、証拠物件から直径 5mm のパンチ状あるいは 20mm² の裁断物を切り取り、0.6ml マイクロチューブに入れます。
- 2) 100 μl の RSID™-Semen Extraction Buffer をチューブに加え、フタをします。
- 3) チューブを勢いよくボルテックスして、パンチあるいは裁断物を完全に湿らせます。

- 4) 1-2 時間室温でインキュベーションします。
- 5) 軽く遠心して、パンチあるいは裁断物を沈殿させます。
- 6) 抽出液 20 μl を新しいチューブに移し、RSID™-Semen Running Buffer を加えて(80 μl)容量を 100 μl に調製します。タイマーを 10 分にセットします。
- 7) 6)のランニングバッファーに希釈された抽出液(100 μl)を RSID™-SEmen カセットの検体滴下部に滴下します。タイマーをスタートさせます。
- 8) 10 分後、結果を記録します(Technical information sheet の図を参照)。
- 9) High Dose Hook Effect により弱いシグナルが現れた場合は、再試験を行ってください(抽出液 1 μl と RSID™-Semen Running Buffer を混合し、トータル容量 100 μl に調製します。この調製液 100 μl 全量を RSID™-SEmen カセットの検体滴下部に滴下し、10 分後に結果を記録します)。

抽出プロトコール ー付着物検出と STR 解析の連続操作プロトコールー

このプロトコールは綿棒から証拠となる物質を抽出するために設計されていて、付着物の同定とDNA-STR解析を一つのチューブフォーマットの同じサンプルから行うことができます。

プロトコール

- 1) 綿棒を 0.6ml あるいは 1.5ml のマイクロチューブに清潔な方法で入れます。
- 2) マイクロチューブに 200 μl の RSID™-Semen Extraction Buffer を加えます。チューブのフタをします。
- 3) チューブを勢いよくボルテックスして綿棒あるいは裁断物を完全に湿らせます。
- 4) 室温で 1-2 時間抽出します。
- 5) 20 μl の抽出液を付着物検出試験用にります。この抽出物を 80 μl の RSID™-Semen Running Buffer に加え、トータル容量 100 μl に 0.6ml マイクロチューブ内で調製します。タイマーを 10 分にセットします。
- 6) 5)のランニングバッファーに希釈された抽出液を、RSID™-SEmen カセットの検体滴下部に滴下します。タイマーをスタートさせます。
- 7) 10 分後、判定を行い、結果を記録します(Technical Information Sheet の図を参照)。
- 8) High Dose Hook Effect により弱いシグナルがでた場合は、再試験を行ってください(抽出液 1 μl と RSID™-Semen Running Buffer を混合し、トータル容量 100 μl に調製します。この調製液 100 μl 全量を RSID™-SEmen カセットの検体滴下部に滴下し、10 分後に結果を記録します)。

- 9) 残りの抽出液で DNA 抽出を開始します。
 - (a) Chelex(キレックス)抽出: キレックスビーズ溶液を直接綿棒あるいは裁断物に滴下し、キレックス抽出プロトコールに従い操作します。
 - (b) フェノール/クロロホルム抽出: 裁断物あるいは綿棒をチューブから除きます。DNA 抽出を通常の操作方法に従って行います。
 - (c) 他の抽出方法: 裁断物あるいは綿棒をチューブから除き、DNA 抽出を付属のプロトコールに従って行います。

検証プロトコール- 付属文書説明

この文書は利便性のために準備されていて、RSID™-SEmen の検証と試験のガイドになりますが、実験室ではみな各々の検証・試験プロトコールに従ってください。実験室のプロトコールと適合する場合は、このキットに供給されたフォームを実験室で試験結果の記録に選んで差し支えありません。

検証の概要 “Validation Summary”

- 1) 実験室名、住所を記入します。
- 2) 試験検体の数 ("Number of sample types tested") を記録します。試験検体には法医学的なケースワークで一般に遭遇する検体を含むようにしてください。
- 3) 試験検体のトータル数 ("Number of samples run") を記録します。多くの実験室の報告書では通常最低 5 検体が必要とされます。
- 4) 試験検体のタイプを丸で囲み、必要であればテクニクサマリー ("Technique summary") に追加の検体タイプを記入します。
- 5) 試験結果を記録します。 "Precision and Sensitivity" と "Accuracy and Reproducibility" の結果を丸で囲みます。当てはまる結果 ("Result") のチェックボックスにチェックを入れ、試験を行った実験担当者のイニシャル、日付を記録します。
- 6) 実験室の責任者の承認を記録します。
- 7) 試験結果の公開日を記録します。この日付は実験検証を合格した日付で、検体とケースワークに採用されます。

検証の解説 “Validation Description”

- 1) 実験室名と試験した検体の数を記入します。
- 2) この研究の試験検体のタイプを丸で囲むか書き加えます。
- 3) 検証概要 ("Validation summary") と検証解説 ("Validation Description") を標準作業手順で決められた試験結果を蓄積したバインダーあるいはファイルに保存します。

Independent Forensics
Rapid Stain Identification
Of Human Semen (RSID™-Semen)
Technical Information Sheet

INTENDED USE

The new **Rapid Stain Identification (RSID™)** test for semen is designed for fast, easy, and reliable detection of human semen from a variety of samples encountered by forensic laboratories including clothing, bedding, vaginal swabs, prophylactics, and stained surfaces.

The test will detect as little as 1 µl of human semen, and test results are complete within 10 minutes.

The detection protocol can be completely integrated into standard forensic laboratory procedures for DNA analysis, prior to STR analysis (see Provided Protocols).

The test sensitivity has been adjusted so that when semen is detected, sufficient biological material should be present to generate an STR profile (exceptions include low sperm count semen or semen from vasectomized men). Typical extraction protocols are provided for your convenience (see Provided Protocols).

This is the first commercially available confirmatory test for human semen. No other human body fluids tested cross react with this procedure (See Specificity below for fluids tested). The immunochromatographic strip test uses dual monoclonal antibodies specific for human semenogelin.

Introduction

Rapid Stain Identification of Human Semen (RSID™-Semen) is a lateral flow immunochromatographic strip test designed to detect the presence of human semenogelin. Semenogelin is a protein produced by the seminal vesicles that causes seminal fluid to form a coagulum subsequent to ejaculation. RSID™-Semen uses two anti-human semenogelin monoclonal antibodies in a lateral flow format, which detects the presence of semenogelin.

RSID™-Semen is specific for human semen and has numerous advantages over other methods for semen detection, including increased sensitivity, specificity, and speed. Current identification methods for semen are presumptive (provide a basis for continued analysis of the tested exhibit but are not specific for semen), and are therefore open to legal and scientific challenge.

Principle of the Test

RSID™-Semen is an immunochromatographic assay that uses two mouse monoclonal antibodies specific for human semenogelin. One of these antibodies is conjugated to colloidal gold and is deposited on a conjugate pad beneath the sample window. The other antibody is striped onto the "Test line" on a membrane attached to the conjugate pad. The "Control line" on the membrane consists of anti-mouse IgG antibody and is used as a test control.

Attached to the other end of the membrane is the wick, which absorbs the tested fluid and running buffer at the completion of the test thus preventing back-flow of the sample. Once the tested fluid is added to the sample window, the running buffer and sample diffuse through the conjugate pad, re-dissolving the gold-conjugated antibodies. If human semenogelin is present in the sample, an antigen-antibody conjugated to colloidal gold complex will form. Sample and antibodies (complexed and free) are transported by bulk fluid flow to the membrane phase of the strip test. The immobilized anti-semenogelin antibodies on the test line capture the semenogelin-antibody-gold complexes, producing a red line at the Test position. If no human semenogelin is present in the sample, then gold-conjugated antibody-antigen complexes do not form, and colloidal gold will not be accumulated at the Test line. The anti-mouse IgG on the control line captures any mouse antibodies flowing past the test line, producing a red line at the Control position. This demonstrates that the sample fluid was transported through the length of the test, and that the components of the strip test are working correctly.

Reagents and Materials Provided

- i) Test cassettes: 25 cassettes, individually wrapped and sealed in moisture-proof foil (a silica gel desiccant pouch has been added for increased shelf life.)
- ii) 5 ml of RSID™-Semen Running Buffer
- iii) 25 ml of RSID™-Semen Extraction Buffer (formulated for use with RSID™-Semen, certified STR free)
- iv) Suggested laboratory and validation protocols, optional validation summary form.

Protocol for Positive Control

Positive controls for RSID™-Semen can be produced from 50 µl of human semen deposited on a sterile cotton swab. The semen swab should be extracted in 1 ml of RSID™-Semen Extraction Buffer for 1-2 hours at room temperature; 5 µl of this extract should be diluted in 95 µl of RSID™-Semen Running Buffer (total volume 100 µl). Load all 100 µl into the sample well; this will give a strong positive signal.

Suggested Extraction Protocol for Sample Analysis

Forensic samples obtained on cotton swabs (e.g., vaginal swabs, prophylactics, and stained solid surfaces) should be extracted in 200-300 µl of RSID™-Semen Extraction Buffer for 1-2 hours. A 20 µl volume of this extract is added to 80 µl of RSID™-Semen Running Buffer for a total final volume of 100 µl. Stains on fabric or paper should be sampled by taking a punch or cutting ($\approx 20 \text{ mm}^2$) of the item. The punch or cutting should be extracted in 100 µl of RSID™-Semen Extraction Buffer for 1-2 hours. A 10 µl volume of this extract is then added to 90 µl of RSID™-Semen Running Buffer for a total final volume of 100 µl which is then loaded into the sample well on the cassette. The remainder of the extract can then be processed for STR analysis using one of the recommended protocols (see Provided Protocols).

Strip Test Assay Procedure

Note: Assays should be performed at room temperature, we recommend that a positive and negative control be included with every assay (see Provided Protocols).

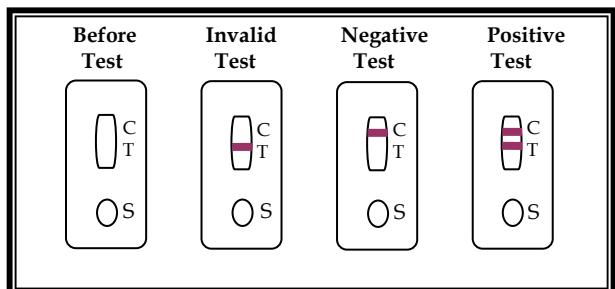
1. Remove cassette from the foil pouch. Discard silica gel desiccant.
2. Bring sample to a final volume of 100 µl with supplied RSID™-Semen Running Buffer, typically in a disposable 0.6 ml microfuge tube.
3. Set a timer for 10 minutes.
4. Add sample in running buffer to sample window. Start timer.
5. At 10 minutes, score and record results as shown in the diagram.
6. Due to the high dose Hook effect, samples giving a weak positive or negative result should be diluted 1:20 and re-tested. For example: If 20 µl from a 200 µl swab extract gives a weak positive or negative result, 1 µl from the original extract should be added to 99 µl RSID™-Semen Running Buffer and analyzed on a new cassette (see High Dose Hook Effect below for details).
7. Discard cassette(s). Each cassette can only be used once.

Scoring Results

RSID™-Semen should be evaluated *exactly* 10 minutes after the addition of sample. Fig. 1 illustrates expected results:

- i) A visible red line at the Control (C) position only indicates a negative result.
No human semen detected.
- ii) Visible red lines at both the Control (C) and Test (T) positions indicate a positive result.
Human semen detected.
- iii) A visible red line at the Test (T) position only indicates a failed test.

Test failure, no conclusion possible.



Stability and Storage

RSID™-Semen cassettes should be stored at room temperature. RSID™-Semen Extraction and Running Buffers should be stored at 4°C. Do not use buffers or cassettes after the printed expiration date.

Specificity

RSID™-Semen is specific for human semenogelin. No cross-reactivity with human saliva, whole blood, vaginal fluid, menstrual blood, breast milk or urine has been observed.

No cross reactivity with animal semen has been observed. Species tested: dog, cat, mouse, cow, horse, pig, goat, and sheep.

Test Sensitivity

The detection limit for RSID™-Semen, used as suggested is 1 µl of human semen.

Undiluted semen should *not* be used with RSID™-Semen, as the viscosity of the sample prevents proper release of the conjugate from the conjugate pad. The tested sample should first be deposited on a sterile cotton swab, extracted in RSID™-Semen Extraction Buffer, and diluted as needed in RSID™-Semen Running Buffer before analysis with RSID™-Semen.

High Dose Hook Effect

A high dose Hook effect refers to weak positive or false negative results seen with immunochromatographic strip tests when very high levels of target are present in the tested sample. Under these conditions, unbound target antigen can reach the test line *before* the colloidal gold-labeled antibody-bound antigen, resulting in a weak positive or false negative result.

We have observed weak positive and false negative results with RSID™-Semen when samples containing large amounts of human semen (\approx 3 to 50 µl) were analyzed. 20-fold dilution of these samples and re-testing with RSID™-Semen eliminated the weak positive and false negative results in all cases (see Validation Report for details).

User Note: Under standard laboratory testing, users of RSID™-Semen may observe weak positive or false negative results due to the high dose Hook effect. Therefore, any weak positive or negative result from RSID™-Semen should be confirmed by diluting the sample 1:20 and re-testing. If re-testing of the diluted sample results in a stronger positive signal, the original result was caused by the high dose Hook effect and a large amount of semen is present in the sample. If re-testing of the diluted sample is once again weakly positive or negative, the original result is confirmed.

Validation

A typical validation summary page and validation test description are supplied. Laboratories should adapt or edit these to suit their own requirements for technical validation.

Not for in vitro diagnostic use



Manufactured by:

Independent Forensics

4600 ROOSEVELT RD., STE. 201 - HILLSIDE, IL 60162

TEL. 866-434-2400 FAX 708-978-5115

WWW.IFI-TEST.COM/RSID.HTML

**Independent Forensics
Rapid Stain Identification
Of Human Semen (RSID™-Semen)
Provided Protocols**

GENERAL GUIDELINES

When possible, stains deposited on fabric or other substrates that can be easily cut, should be dissected to preserve at least half of the questioned stain in order to allow for re-testing. Scissors or scalpels used to cut the underlying substrate of questioned stains should be washed in 95% ethanol and deionized water, and then dried with a fresh Kimwipe before use and between each cutting. Special emphasis should be paid to the hinge region of scissors. We recommend immersing scissors and scalpels sequentially in 95% ethanol and deionized water between uses. Use a clean new cutting surface for each sample.

Stains deposited on substrates that cannot be cut (e.g., glass, metal) may be sampled with a clean new swab moistened with sterile deionized water. Use a 'sponge' technique to transfer the stain to the moistened swab; medium pressure may be required on smooth surfaces, use less pressure on rough surfaces to avoid shredding the swab batting. Swabs should be air dried in a protective environment and stored dry at room temperature, protected from light.

Swab batting can be removed from the shaft of the swab using a scalpel or scissors. The swab head can be removed from the shaft of the swab using scissors: place the swab in a microcentrifuge tube and cut the shaft as close as possible to the batting while leaving the swab head in the tube. Once cut, the shaft can be saved or discarded as per laboratory protocol.

-Supplies required: 0.6 or 1.5 ml disposable microcentrifuge tube (Certified DNase, RNase, Pyrogen, RNA/DNA Free or equivalent), filter/barrier pipette tips (low retention or equivalent), disposable transfer pipettes, Kimwipes

-Reagents required: ddH₂O and 95% EtOH

Extraction Protocol for RSID™-Semen - Positive control: A Positive Control for RSID™-Semen can be produced from 50 µl of human semen deposited on a sterile cotton swab.

Protocol

- 1.) Deposit 50 µl of human semen onto a sterile cotton swab.
 - 2.) Place swab in a 1.5 ml microcentrifuge tube using laboratory clean technique
 - 3.) Add 1 ml of RSID™-Semen Extraction Buffer and close tube.
 - 4.) Vortex tube vigorously to thoroughly wet swab.
 - 5.) Incubate at room temperature for 1-2 hours.
 - 6.) Mix 5 µl of extract with 95 µl of RSID™-Semen Running Buffer (total volume, 100 µl).
 - 7.) Load entire 100 µl into the sample window of the cassette.
 - 8.) At 10 minutes, score and record results as shown (see diagram, Technical Information Sheet, pg. 3); this will give a strong signal at the Test line.
-

Extraction Protocol for RSID™-Semen - Negative control: A Negative control for RSID™-Semen can be produced from a sterile cotton swab.

Protocol

- 1.) Deposit 50 µl of sterile ddH₂O onto a sterile cotton swab.
 - 2.) Place swab in a 1.5 ml microcentrifuge tube using laboratory clean technique
 - 3.) Add 1 ml of RSID™-Semen Extraction Buffer and close tube.
 - 4.) Vortex tube vigorously to thoroughly wet swab.
 - 5.) Incubate at room temperature for 1-2 hours.
 - 6.) Mix 5 µl of extract with 95 µl of RSID™-Semen Running Buffer (total volume, 100 µl).
 - 7.) Load entire 100 µl into the sample window of the cassette.
 - 8.) At 10 minutes, score and record results as shown (see diagram, Technical Information Sheet, pg. 3); this will give no signal at the Test line.
-

Extraction Protocol for RSID™-Semen from Punch or Cutting (separate from STR analysis):

Many laboratories choose to analyze evidence by testing small punches or cuttings from exhibits (swabs, fabric, etc.) before diverting the remainder of the exhibit for DNA testing. This technique can be easily integrated into RSID™-Semen testing.

Protocol

- 1.) Remove a 5 mm diameter punch or ≈20 mm² cutting from the exhibit and place in a 0.6 ml microcentrifuge tube using laboratory clean technique.
- 2.

Semen, April, 2007

- 2.) Add 100 µl of RSID™-Semen Extraction Buffer and close tube.
- 3.) Vortex tube vigorously to thoroughly wet punch or cutting.
- 4.) Incubate at room temperature for 1-2 hours.
- 5.) Briefly centrifuge extract to pellet punch or cutting.
- 6.) Remove 20 µl of extract and bring volume to 100 µl with RSID™-Semen Running Buffer (add 80 µl of running buffer). Set a timer for 10 minutes.
- 7.) Add extract in running buffer (100 µl) to sample well of an RSID™-Semen cassette. Start timer.
- 8.) At 10 minutes, score and record results as shown (see diagram, Technical Information Sheet, pg. 3).
- 9.) Due to high dose Hook effect, weak positive and negative results should be re-tested: Remove 1 µl of the original extract and bring volume to 100 µl with RSID™-Semen Running Buffer (add 99 µl of running buffer). Add extract in running buffer (100 µl) to sample well of an RSID™-Semen cassette and record result at 10 minutes.

Extraction Protocol for RSID™-Semen from whole swab (integrated with STR analysis):

This protocol is designed to extract an exhibit swab such that *both* stain identification and DNA-STR analysis can be performed from the same sample in a single tube.

Protocol

- 1.) Place swab in 0.6 or 1.5 ml microcentrifuge tube using laboratory clean technique
- 2.) Add 200 µl of RSID™-Semen Extraction Buffer. Close tube.
- 3.) Vortex tube vigorously to thoroughly wet swab or cutting.
- 4.) Incubate at room temperature for 1-2 hours.
- 5.) Remove a 20 µl aliquot of extract for stain ID testing. Add extract to 80 µl of RSID™-Semen Running Buffer to a final volume of 100 µl in a 0.6 ml microcentrifuge tube. Set timer for 10 minutes.
- 6.) Add extract in running buffer (100 µl) to sample well of an RSID™-Semen cassette. Start timer.
- 7.) At 10 minutes, score and record results as shown (see diagram, Technical Information Sheet, pg. 3).
- 8.) Due to the high dose Hook effect, weak positive and negative results should be re-tested: Remove 1 µl of the original extract and bring volume to 100 µl with RSID™-Semen Running Buffer (add 99 µl of running buffer). Add extract in running buffer (100 µl) to sample well of an RSID™-Semen cassette and record result at 10 minutes.

- 9.) Start DNA extraction with remaining extract -
 - (a) Chelex extraction: add Chelex bead solution directly to swab, proceed as per Chelex extraction protocol.
 - (b) Phenol/Chloroform extraction: remove swab from tube and proceed with DNA extraction as per standard laboratory protocol.
 - (c) Other extraction methods: remove swab from tube and proceed with DNA extraction as per supplied protocol (e.g., Qiagen, Promega or similar).
-

Validation Protocol -

This section is provided as a convenience and is meant to be a guide to documenting the validation and testing of RSID™-Semen. All laboratories must follow their own validation and testing protocols.

Validation Summary

- 1.) Record number of sample types tested. Sample types tested should include those samples commonly encountered in forensic case work.
 - 2.) Record total number of samples tested - a minimum of 5 is usually required for most laboratory audits.
 - 3.) Record test results. Include details regarding precision, sensitivity, accuracy, specificity, and reproducibility. Record the date and the initials of the analyst who performed the validation study.
 - 4.) Record approval of appropriate laboratory supervisory personnel.
 - 5.) Record date of test release. This is the date that the test passes laboratory validation and can be used for samples and casework.
-

Not for in vitro diagnostic use

Manufactured by:



Independent Forensics
4600 ROOSEVELT RD., STE. 201 - HILLSIDE, IL 60162
TEL. 866-434-2400 FAX 708-978-5115
WWW.IFI-TEST.COM/RSID.HTML