

Effect of novel luminol-based blood detection reagents on DNA stability

Ju Yeon Jung, Yu-Li Oh, Jee Won Lee, Seung Lim¹, Jung-mok Kim¹,
Yang Han Lee², and Si-Keun Lim[★]

Forensic DNA Division, National Forensic Service, Wonju 26460, Korea

¹*Forensic Investigation Section, Detective Division, Gyeongnam Police Agency, Sangnam-ro 289, Changwon 51154, Korea*

²*Gwangju Institute, National Forensic Service, Gwangju 57231, Korea*

(Received March 2, 2018; Revised April 11, 2018; Accepted April 12, 2018)

새로운 루미놀 기반 혈흔 탐지 시약이 디엔에이에 미치는 영향에 대한 연구

정주연 · 오유리 · 이지원 · 임 승¹ · 김정목¹ · 이양한² · 임시근[★]

국립과학수사연구원 법유전자과, ¹경남지방경찰청 형사과 과학수사계,

²국립과학수사연구원 광주과학수사연구소

(2018. 3. 2. 접수, 2018. 4. 11. 수정, 2018. 4. 12. 승인)

Abstract Detection of bloodstains is a very important process in scientific investigations, and luminol is often used for the detection of bloodstains that are not visible. Recently, new preparation methods of blood detection reagents based on luminol (BloodFlareA, B) were developed and reported to have higher active persistence and to be more economical than conventional blood detection reagent, BlueStar forensic. In this paper, we tested the specificity and effect of the BloodFlares (A and B) on DNA and compared them with those of BlueStar forensic. False positive results for the BloodFlares were not observed in semen, saliva, vaginal fluids, urine, sweat, and nasal discharge, but were observed in CuSO₄, FeSO₄, and bleach solutions, and the observed patterns were similar to those of BlueStar forensic. The effect on DNA was determined by analyzing the DNA yield, degradation index, and DNA profiling. Based on these results, we concluded that the BloodFlares based on luminol do not affect DNA stability and are applicable in forensics.

요 약: 혈흔의 탐색은 과학수사에 있어서 매우 중요하고, 혈흔이 육안으로 관찰되지 않을 때 흔히 루미놀이 사용된다. 최근, 루미놀을 기반으로 새로운 혈흔 탐지 시약 제조법이 개발되었고, 기존의 블루스타 제품보다 높은 활성 지속력이 보고되었다. 본 연구에서는 보고된 새로운 혈흔 탐지 시약 제조법 두 가지를 선별(이하 블러드플레어A, B)하여 특이성과 디엔에이에 미치는 영향을 관찰하였고, 기존의 블루스타와 비교하였다. 블러드플레어A, B는 혈흔 외 다른 인체분비물에서 위양성 반응이 없었으나, 채소, 구리황산염, 철황산염 및 차아염소산나트륨이 함유된 표백제에 대하여 위양성 반응이 관찰되었으며, 이는 블루스타와 동일한 양상을 보였다. 디엔에이에 미치는 영향을 관찰하고자 추출 과정, 반응 시간에 의한 디

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)33-902-5716 Fax : +82-(0)33-902-5941

E-mail : neobios@korea.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

엔에이 분해, 디엔에이 프로필 검출에 미치는 영향을 시험하였고, 블러드플레어는 비교적 디엔에이에 안정적이며, 법과학적 적용이 가능할 것으로 판단하였다.

Key words: luminol, new preparation methods of blood detection reagents, BloodFlares, BlueStar forensic, specificity, effect on DNA

1. 서 론

살인, 강도 등 강력 사건에서 혈흔의 탐색은 수사 방향의 결정과 사건 해결에 중요하다.¹ 사건현장, 증거물 등의 바탕색이 혈흔과 유사하거나, 적은 양의 혈흔이 묻어 있는 경우, 특히 범인이 증거물의 혈흔 부위를 세척 및 훼손하여 제거하고자 하였다면 육안으로 혈흔을 탐색하는 데 한계가 있다. 1928년에 루미놀(Luminol)이 과산화수소의 존재 하에 혈흔과 반응하면 발광이 현저히 증가한다는 사실이 발견되면서 육안으로 탐색이 어려운 혈흔을 찾는데 활용되기 시작하였다.^{2,3} 이후 루미놀 시약의 제조에 있어서 혼합되는 시약의 종류를 달리하여 루미놀의 보존성, 안정성 및 사용의 편리성 등을 개선하는 방법에 대한 연구들이 수행되었고,⁴ 현재는 제품화된 블루스타(Bluestar forensic, Sirchie, Youngsville, USA)가 사건현장 및 법과학 실험실에서 널리 사용되고 있다.⁵ 최근, 블루스타보다 활성 지속력이 우수한 새로운 루미놀 시약의 제조법을 보고하였는데,⁶ 본 제조법의 법과학적 유효성을 검증하기 위해서는 특이성(specificity) 및 디엔에이에 미치는 영향 등에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 이에 본 논문에서는 최근 보고된 루미놀 기반 혈흔 탐지 시약 제조 방법 중 두 가지 조성을 선별(이하 블러드플레어A, 블러드플레어B) 하여 시약의 특이성과 디엔에이에 미치는 영향을 관찰함으로써 법과학적 적용 가능성을 검증하고자 하였고, 이를 블루스타와 함께 비교하였다. 루미놀은 혈흔 뿐 아니라 화학적 산화제 등 루미놀을 산화시킬 수 있는 물질들과 반응하므로 다양한 물질들과의 위양성 반응 여부를 관찰하는 특이성 시험이 요구된다.^{7,8} 블러드플레어A, B 및 블루스타와 다양한 인체분비물(혈액, 타액, 정액, 질액, 뇨, 땀 및 콧물), 채소(오이, 양배추, 양파, 당근, 대파, 브로콜리, 상추, 감자, 마늘 및 고추),⁹ 금속염(구리황산염, 철황산염, 망간황산염) 및 표백제(차아염소산나트륨 4%이상 함유) 간의 반응을 관찰하였다. 혈흔 탐지 시약은 사건현장이나 증거물에 직접 닿아 반응하므로 검사 시약이 혈흔 디엔에이에 미치는 영향이 적어야

한다.¹⁰ 그리하여 블러드플레어에 포함된 화학적 물질이 혈흔 디엔에이 추출 효율에 미치는 영향, 채취 후 보존 기간 동안 혈흔 디엔에이의 분해에 미치는 영향, 최종적으로 STR 증폭을 통해 디엔에이 프로필에 미치는 영향에 대한 연구를 수행하였고, 이를 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 및 혈흔 탐지 시약

실험에 사용한 인체분비물 시료는 모두 국립과학수사연구원의 IRB 승인을 받았고, 특이성 시험에 사용된 혈액, 정액, 타액, 뇨, 질액, 땀 및 콧물은 각각 서로 다른 지원자로부터, 혈흔 디엔에이에 미치는 영향에 대한 시험에 사용된 혈액은 3명의 지원자로부터 제공받았다. 블러드플레어A(조성; 루미놀, 글리신, 제이인산나트륨 7수화물, 수산화나트륨, 황산마그네슘 7수화물, 30% 액상 과산화수소) 및 블러드플레어B(루미놀, 글리신, 제이인산나트륨 7수화물, 수산화나트륨, 과붕산나트륨 1수화물)는 Table 1의 조성대로 제조하였고,⁶ 루미놀은 삼천화학(korea), 나머지 시약은 ACROS(SIGMA, USA)

Table 1. Methods for preparation of BloodFlareA and BloodFlareB

Sample	Chemical Compound	Amount
BloodFlareA	Luminol	0.1 g
	Sodium hydroxide	0.3 g
	Glycine	0.1 g
	Sodium phosphate dibasic·7H ₂ O	0.5 g
	Magnesium sulfate·7H ₂ O	0.03 g
	30 % Hydrogen peroxide	1.0 mL
	Distilled Water	Up to 100 mL
BloodFlareB	Luminol	0.1 g
	Sodium hydroxide	0.3 g
	Glycine	0.2 g
	Sodium phosphate dibasic·7H ₂ O	0.5 g
	Sodium perborate·H ₂ O	1.0 g
	Distilled Water	Up to 100 mL

제품을 사용하였다. 블루스타(Bluestar forensic kit)는 Sirchie (Youngsville, USA)사로부터 구매하여 사용자 지침서대로 제조하여 사용하였다.

2.2. 특이성 시험

혈액 및 노는 30 μ L를 취하여 동량의 혈흔 탐지 시약과 반응시켰다. 타액, 정액, 질액, 땀 및 콧물은 면봉으로 채취하여 면봉 1점을 200 μ L의 증류수에 담고 3 시간 동안 용출시킨 후 용출액 10 μ L를 90 μ L의 혈흔 탐지 시약과 반응시켰다. 특이성 시험에 사용된 오이, 양배추, 양파, 당근, 대파, 브로콜리, 상추, 감자, 마늘 및 고추는 즙을 내어 사용하였다. 구리황산염(CuSO_4), 철황산염(FeSO_4)은 덕산화학(Korea)에서 망간황산염(MnSO_4)은 삼천화학(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 표백제는 차아염소산나트륨(NaOCl)이 4% (w/v) 이상 함유된 세제로 원액을 사용하였다. 채소즙, 금속염 및 표백제를 10 μ L를 취하여 90 μ L의 혈흔 탐지 시약과 반응시켰다. 반응 여부는 암실화된 환경에서 발광을 관찰함으로써 판단하였다. 육안으로 반응이 관찰되면 양성(+)으로 판정하였고, 관찰되지 않으면 음성(-)으로 판정하였으며, 발광의 정도는 발광이 육안으로 관찰되는 최저 밝기와 최대 밝기(혈흔의 발광 정도를 최대 기준)를 5단계로 나누어 표기하였다.

2.3. 디엔에이 추출 효율에 미치는 영향

디엔에이 추출 방법은 컬럼(Column) 혹은 비드(Bead)를 이용한 방식이 대표적이다.¹¹ 컬럼으로 추출하는 방식으로 QIAmp DNA micro kit(Qiagen, Valencia, CA), 비드를 이용하는 방식으로 QIASymphony DNA Investigator Kit(Qiagen)를 사용자 지침서대로 사용하였다. 혈액 원액(N=3) 25 μ L와 증류수, 블루스타, 블러드플레이어A 및 블러드플레이어B를 각각 동일 부피로 혼합하여 디엔에이를 추출하였고, 추출된 디엔에이의 정량은 Quantifiler™ Trio Quantification kit(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용자 지침서대로 사용하였으며, 3 회 반복실험 하였다.

2.4. 디엔에이 분해에 미치는 영향

혈액 원액(N=3)을 증류수로 1/10 및 1/100 희석 후, 희석된 혈액 10 μ L를 증류수, 블루스타, 블러드플레이어A 및 블러드플레이어B와 각각 동일 부피로 혼합하여 상온에서 0일, 1일, 3일 및 7일간 반응(incubation) 시켰다. 모든 시료의 디엔에이 추출은 QIAmp DNA

micro kit를 사용하였고, 용리는 추출 키트에 포함된 버퍼(AE) 50 μ L를 사용하였다.

디엔에이 분해 정도를 측정하고자 실시간 정량 분석 키트인 Quantifiler™ Trio Quantification kit 및 ABI 7500 RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) 장비를 사용하였다. 분해지수(Degradation Index, DI) 계산은 전체 인간 디엔에이(total human 디엔에이)의 큰 타겟 부위(Large Autosomal, LA) 디엔에이 농도를 작은 타겟 부위(Small Autosomal, SA) 디엔에이 농도로 나누어 계산하였다.¹²

2.5. 증폭 및 모세관전기영동

디엔에이 프로필 검출에 미치는 영향을 관찰하고자 위 디엔에이 분해에 미치는 영향에 대한 실험 과정에서 분리된 디엔에이 시료 중 1/10 희석 혈액을 혈흔 탐지 시약과 7일간 반응시킨 시료로부터 분리된 디엔에이를 선별하여 10 μ L 주형으로 Identifier Plus kit(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 증폭하였다. 모든 실험 과정은 사용자 지침서대로 수행하였고, 증폭은 GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific), 모세관 전기영동은 3500xL Genetic Analyzer(Thermo Fisher Scientific)를 사용하였다. 데이터 분석은 GeneMapper® ID-X v1.4 Software(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 RFU(relative fluorescent units) 100 기준으로 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 특이성

블러드플레이어A 및 B는 혈흔 탐지 시약으로서 다른 인체분비물에 대한 위양성 반응이 없어야 하고, 위양성이 관찰될 수 있는 다양한 물질들과의 반응 시험은 혈흔을 정확하게 탐색하고 감정하는데 중요하다. 관찰 결과, 블러드플레이어A 및 블러드플레이어B의 반응 강도와 반응을 일으키는 물질의 종류가 동일하게 확인되었으며, 블루스타도 이와 유사한 양상으로 위양성이 관찰되었다. 이는 블러드플레이어A, B 및 블루스타는 모두 루미놀 기반의 시약으로 기본 원리가 동일하기 때문에 특이성 측면에서 차이를 보이지 않은 것으로 사료된다. 다양한 채소의 즙은 위양성 반응의 강도는 약하였지만 비교적 장시간 지속되었고, 본 실험에 사용된 채소들 중에서는 양배추, 감자, 마늘이 가장 높은 위양성을 보였다. 양배추와 마늘은 혈흔예비검사법의 일종인 Peroxtesmo® KM 페이퍼의 특이성 연구에

Table 2. Reagent specificity

Sample	Distilled Water	BlueStar	Blood-FlareA	Blood-FlareB
Blood	-	+++++	+++++	+++++
Saliva	-	-	-	-
Semen	-	-	-	-
Vaginal fluid	-	-	-	-
Urine	-	-	-	-
Sweat	-	-	-	-
Nasal discharge	-	-	-	-
Cucumber	-	+	+	+
Cabbage	-	+++	+++	+++
Onion	-	++	+	+
Carrot	-	+	++	++
Spring onion	-	+	+	+
Broccoli	-	++	++	++
Lettuce	-	++	++	++
Potato	-	+++	+++	+++
Garlic	-	+++	+++	+++
Chili pepper	-	++	++	++
CuSO ₄	-	++++	++++	++++
FeSO ₄	-	+++++	+++++	+++++
MnSO ₄	-	-	-	-
Bleach solution	-	+++++	+++++	+++++

서도 가장 높은 위양성을 보인 것으로 보고되었다.^{1,9} 금속염 3가지와 차아염소산나트륨이 함유된 표백제를 블루스타, 블러드플레어A 및 블러드플레어B와 반응시킨 결과, 망간염을 제외한 두 가지 금속염과 표백제에 대하여 강한 발광이 관찰되었다. 하지만 지속시간은 매우 짧았다(2초 미만). 금속염과 표백제의 발광 지속시간이 짧다는 특징은 정확한 혈흔 탐색에 있어서 매우 중요한 요소가 될 수 있다. 높은 발광 강도에 비해 반응 시간이 2초 미만인 경우, 금속염이나 표백제일

가능성이 있으므로, 교차시험이 요구된다. 즉, 발광 강도와 지속성의 관계에 대한 고려와 다양한 혈흔 예비 검사법 및 확증검사법을 통한 교차 검증은 혈흔 탐색의 정확성을 높일 것으로 사료된다.

3.2. 디엔에이 추출 효율에 미치는 영향

혈흔 탐지 시약이 디엔에이 추출에 미치는 영향을 알아보고자 대표적인 디엔에이 추출 방법인 컬럼과 비드 방식을 각각 사용하여 디엔에이를 추출하였고, Quantifiler™ Trio Quantification kit로 3회 반복 정량하여 및 농도를 비교하였다. 컬럼 방식(QIAmp DNA micro kit)과 비드 방식(QIASymphony DNA Investigator Kit)으로 분리된 디엔에이 모두 추출에 있어서 증류수를 처리한 음성대조군 시료와 혈흔 탐지 시약 처리 시료 간의 차이를 관찰한 결과, 의미있는 차이가 관찰되지 않았다(Table 3). 다만, 두 가지 추출 방식 간의 효율을 비교하면, 디엔에이 추출 효율은 비드 방식이 컬럼 방식 보다 높은 효율을 보였다. 한 가지 방법 내에서 증류수, 블루스타, 블러드플레어A 및 블러드플레어B가 처리된 시료로부터 분리된 디엔에이 간의 농도를 비교하였을 때 거의 차이가 없었고, 본 연구에 사용된 모든 혈흔 탐지 시약이 디엔에이 추출 과정에 미치는 영향은 없는 것으로 판단되었다.

3.3. 디엔에이 분해에 미치는 영향

혈흔 탐지 시약이 묻어있는 시료가 디엔에이 감정을 위해 법과학 실험실로 인계 및 추출 전처리 이전까지 일정기간 보관이 된다. 보관되는 동안 혈흔 탐지 시약이 시료와 반응하여 디엔에이의 분해를 유도하는 지에 대하여 관찰하고자 증류수에 희석(1/10, 1/100)된 혈액을 블루스타, 블러드플레어A 및 블러드플레어B과 동일 부피로 혼합한 후 0일, 1일, 3일 및 7일간 반응

Table 3. Concentration of DNA (ng/μL) extracted from whole blood reacted with the reagents

Sample	Extraction Method	Concentration of DNA	
		Average	Std ^{c)}
Blood + Distilled Water	Micro kit ^{a)}	6.83	0.34
Blood + Bluestar	Micro kit ^{a)}	7.18	1.03
Blood + BloodFlareA	Micro kit ^{a)}	7.14	0.27
Blood + BloodFlareB	Micro kit ^{a)}	6.19	0.34
Blood + Distilled Water	Investigator Kit ^{b)}	10.71	0.48
Blood + Bluestar	Investigator Kit ^{b)}	11.80	0.74
Blood + BloodFlareA	Investigator Kit ^{b)}	13.00	0.74
Blood + BloodFlareB	Investigator Kit ^{b)}	12.09	0.75

^{a)}QIAmp DNA micro kit; ^{b)}QIASymphony DNA Investigator Kit; ^{c)}Standard deviation

시켰다. 일반적으로 현장 증거물에서 탐지시약을 통해 채취된 혈흔은 오염, 세탁 등으로 육안으로 관찰되지 않은 정도의 매우 적은 양일 가능성이 높다. 디엔에이의 농도가 낮을수록 시약의 영향에 민감하므로¹ 희석된 혈액을 사용하여 관찰하였으며, 반응 시간은 수사 기관 혹은 법과학 실험실에서의 증거물 채취로부터 디엔에이 프로파일 분석까지 시료가 보관되는 기간을 고려한 것이다. Quantifiler™ Trio Quantification kit는 증폭 크기 214 bp의 큰 타겟 부위(Large Autosomal, LA)와 80 bp의 작은 타겟 부위(Small Autosomal, SA)를 동시에 정량하여 분해 정도를 측정할 수 있는 키트이다. 디엔에이 분해의 정도에 대한 분해지수는 큰 타겟 부위 디엔에이 농도를 작은 타겟 부위 디엔에이 농도로 나누어 계산하는데, 분해지수가 1 보다 작으면 디엔에이가 분해되지 않은 것, 10보다 크면 심각한 분해(혹은 정량을 위한 증폭 과정의 억제)가 진행된 것이다.¹² 실험 결과, 혈흔 탐지 시약들 사이의 유의한 차이는 관찰되지 않았으며, 모두 분해지수 1 미만의 수치를 보였다(Fig. 1). 즉, 정량을 통해 분석된 분해지수를 통해 블루스타, 블러드플레어A 및 블러드플레어B가 모두 7일간의 반응 시간 동안 디엔에이 분해 및 정량 과정의 억제에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

3.4. 디엔에이 증폭에 미치는 영향

혈흔 탐지 시약과 7일간 반응시킨 1/10 희석 혈액 시료로부터 분리된 디엔에이를 선별하여 상염색체 STR 증폭을 통해 디엔에이 증폭에 미치는 영향을 관찰하였다. 선별된 디엔에이는 혈흔 탐지 시약과의 반응 기간이 가장 길면서, 디엔에이 프로파일 검출률을 관찰하는 데 있어 시료의 양적 부족에 의한 영향을 배제할 수 있는 범위 내에서 선별되었다. 상염색체 증폭 키트인 Identifier Plus kit를 이용하여 디엔에이 증폭 후 디엔에이 프로파일의 검출률을 계산한 결과, 블루스타, 블러드플레어A 및 블러드플레어B 모두 100%의 검출률을 보였다. 일반적으로 습도, 열, 미생물 등 다양한 환경의 노출에 의하여 분해된 디엔에이는 절편화(fragmentation)를 유도하고, 평균 증폭산물의 크기를 감소시키며, 분해의 정도가 심할수록 길이가 긴 증폭산물은 증폭 양이 감소하거나 검출이 안 되기도 한다. 이를 ski slope effect 라고 하는데, 전기영동도 상에서 피크의 높이가 오른쪽으로 갈수록 낮아지는 모습을 보이며, 현장 증거물의 STR 분석 과정에서 어렵지 않게 관찰된다.^{13,14} 검출률은 분석 임계값 이상의 높이로 피크가 검출되었는지에 대한 산출이기 때문에, 검출률이 100%로 관찰되어도 ski slope effect는 시료의 분해에 의해 나타날 수 있다. 본 연구에서 모든 디

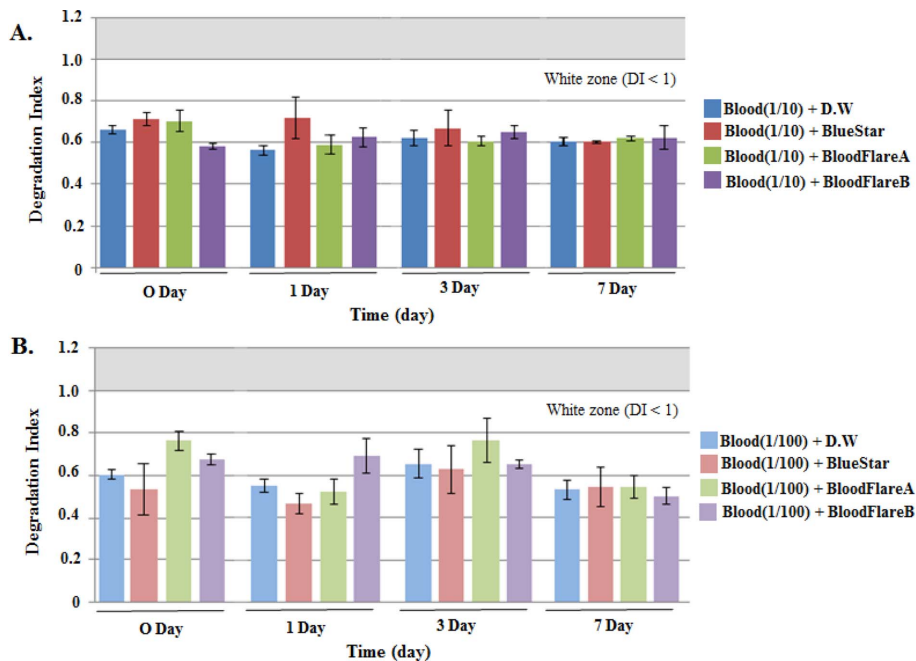


Fig. 1. Degradation index (DI) of DNA isolated from 1/10 (A) and 1/100 (B) diluted blood reacted with the reagents (D.W., Distilled Water). White zone indicates that DNA is not degraded or inhibited.

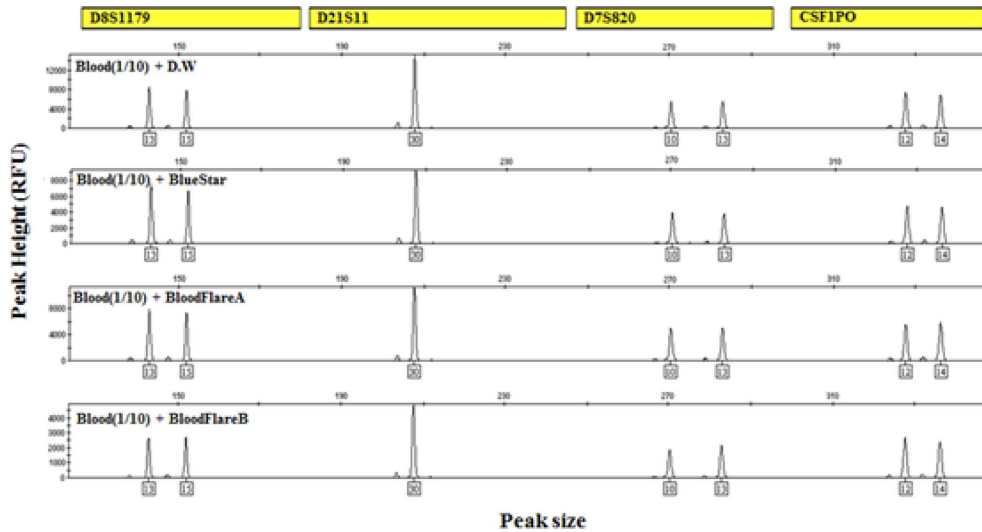


Fig. 2. Electropherogram of the representative samples (loci of Blue dye, Donor #3) analyzed using Identifier Plus kit. No ski slope effect was observed.

엔에이 프로필이 검출되었으나 혈흔 탐지 시약에 의한 분해로 의하여 ski slope effect 현상이 발생되었는지 관찰하였고, 블루스타, 블러드플레어A 및 블러드플레어B가 처리된 시료 모두 피크의 높이가 유사한 수준으로, 두드러진 ski slope effect 현상이 관찰되지 않았다(Fig. 2).

4. 결 론

본 연구를 통해 혈흔 탐지 시약으로 새롭게 개발된 블러드플레어A 및 블러드플레어B의 법과학적 유효성 검사가 수행되었고, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 블러드플레어A 및 B는 혈흔 외 다른 인체분비물에서 위양성이 관찰되지 않았고, 채소, 일부 금속염, 표백제와 반응하였다. 하지만 발광 지속시간의 고려, 다양한 혈흔 예비검사법 혹은 확증검사법과의 교차검증을 통해 혈흔의 판정에 있어서 정확성을 높일 수 있을 것이다.
2. 블러드플레어A 및 B가 혈흔 디엔에이 추출 효율, 보관 기간에 의한 디엔에이 분해 및 디엔에이 프로파일 검출에 미치는 영향을 관찰한 결과, 디엔에이에 비교적 안정적인 것으로 확인되었으며, 이는 기존에 디엔에이 안정성이 보고된 블루스타와 동등한 수준으로 관찰되었다.
3. 본 연구는 블러드플레어A 및 B가 법과학적으로 적용이 가능한지에 대한 검증을 특이성, 디엔에이 안

정성 측면에서 관찰하였으며, 기존의 블루스타와 동등한 수준의 특이성과 디엔에이 안정성이 확인되었는데, 시약 활성의 보존력과 경제성을 함께 고려할 때 블러드플레어는 혈흔탐지시약으로서 블루스타를 대체하여 사건 현장 및 법과학 실험실에서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단하였다. 더불어 다양한 환경에 의해 노출되고, 농도와 상태가 다른 현장증거물들을 이용한 실험이 추가적으로 수행된다면 안정성에 대한 신뢰성을 더욱 높일 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 정부의 재원으로 국립과학수사연구원 과학수사 감정기법 연구개발사업의 지원을 받아 수행한 연구임(2018-유전자-03).

References

1. Y.-L. Oh, J. Y. Jung, Y.-J. Kim, D.-H. Kim, and K. Lee, *J. Sci. Crim. Investig.*, **11**(1), 1-7 (2017).
2. Luminol, <https://en.wikipedia.org/wiki/Luminol>, Assessed 24 February 2018.
3. F. Barni, S. W. Lewis, A. Berti, G. M. Miskelly, and G. Lago, *Talanta*, **72**(3), 896-913 (2007).
4. M. Grodsky, K. Wright, and P. L. Kirk, *J. Crim. Law Criminol.*, **42**, 94-104 (1951).

5. Bluestar forensic, <https://www.bluestar-forensic.com/gb/blustar-chemistry.php>, Assessed 5 January 2018.
6. S. Lim, J.-M. Kim, J. Y. Jung, and S.-K. Lim, *Anal. Sci. Technol.*, **31**(1), 47-56 (2018).
7. T. I. Quickenden and P. D. Cooper, *Luminescence*, **16**, 251-253 (2001).
8. S. S. Tobe, N. Watson and N. N. Daeid, *J. Forensic Sci.* **52**(1), 102-109 (2007).
9. N. Müftügil, *J. Sci. Food Agric.*, **36**, 877-880 (1985).
10. A. M. Gross, K. A. Harris, and G. L. Kaldun, *J Forensic Sci.*, **44**(4), 837-840 (1999).
11. S. Laus, L. A. Kingsley, M. Green, and R. M. Wadowsky, *J. Mol. Diagn.*, **13**(6), 695-700 (2011).
12. Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits USER GUIDE, <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4485354.pdf>, Assessed 13 December 2016.
13. J. Y. Jung, S. H. Park, S. W. Park, M. H. Park, J. W. Choi, and D. S. Lee, *J. Sci. Crim. Investig.*, **9**(3), 206-212 (2015).
14. O. Hansson, T. Egeland, and P. Gill, *Int. J. Legal Med.*, **131**(2) 303-317 (2017).