مقاله پژوهشی

استفاده از محلول لومینول برای شناسایی خون شستشو شده و انجام DNA Typing

سعید زندیه * - دکتر مرجان صباغیان** - دکتر مجتبی سعادتی***

* کارشناس ارشد بیولوژی مولکولی، مرکز تشخیص هویت تهران بزرگ آزمایشگاه جنایی

** دکترای بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و فیزیک دانشگاه تهران

*** دکترای میکروب شناسی، استادیار دانشگاه امام حسین (ع) ، دانشکده علوم و فنون، پژوهشکده زیست شناسی

خلاصه

زمینه و هدف: شناسایی و جداسازی لکه‌های خون در صحنه‌های جرم بسیار مهم می‌باشد، زیرا در آزمایش‌های سرولوژی و DNA می‌توان از خون‌های به جا مانده استفاده نمود. در بسیاری از موارد صحنه جرم شسته شده و آثار خون تمیز می‌گردد و تشخیص این لکه‌ها با چشم غیرمسلح امکان‌پذیر نمی‌باشد. در روش ارایه شده با استفاده از محلول شیمیایی جدید که دارای پایه لومینول است، می‌توان آثار باقی‌مانده خون را با حساسیت و دقت زیاد شناسایی نمود.

روش بررسی: ابتدا محلول لومینول تهیه گردید. با تغییر شرایط و استفاده از مواد شیمیایی مختلف میزان حساسیت محلول بهینه‌سازی شد و سپس با نسبت‌ها و رقت‌های مختلف خون آزمایش انجام شده و با اضافه نمودن محلول لومینول به رقت‌های مختلف خون، شدت نور با استفاده از دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری گردید. همچنین تأثیر محلول در سطوح مختلف و شرایط نوری متفاوت بررسی شد و سرانجام نمونه خون‌ها جهت پروفایل DNA مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: با استفاده از محلول جدید لومینول و مقایسه آن با محلول قدیمی علاوه بر حساسیت بسیار زیاد به خون در سطوح مختلف محلول لومینول تا رقت 10^{-6} دارای حساسیت می‌باشد، همچنین عدم نیاز به محیط کاملاً تاریک و امکان تهیه عکس، فیلم بدون آسیب DNA، امکان پروفایل از نمونه‌های نامریی نیز از مزایای این روش می‌باشد.

نتیجه‌گیری: اثبات وجود خون در یک صحنه جنایی اعم از قتل، سرقت و آلات جرم از قبیل چاقو که به دلیل شسته شدن آثار خونی بر روی آن قرار ندارد و انجام آزمایشات ژنتیکی در سیر تکمیل پرونده و کمک به مقامات قضایی و انتظامی بسیار مؤثر است، یکی از وظایف تیم بررسی صحنه‌های جرم کشف این‌گونه آثار است در حال حاضر با استفاده از نور فرابنفش (UV) اقدام به بررسی صحنه جرم می‌شود که در بسیاری از موارد کارآیی مناسبی ندارد، لذا در این تحقیق سعی شد علاوه بر آنالیز لکه‌ها موارد مثبت کاذب مورد تمایز قرار گیرد و با انجام DNA Typing ابزار قدرتمندی جهت کشف جرم در اختیار کارآگاهان و قضات محترم باشد، از مزایای محلول جدید لومینول می‌توان به استفاده آسان، آماده‌سازی راحت و همچنین وجود کمترین خطر برای سلامتی کاربر و عدم تأثیر بر روی ماده ژنتیکی اشاره کرد.

واژگان کلیدی: خون نامریی، محلول لومینول، صحنه‌های جنایی، بررسی ماده ژنتیکی

وصول مقاله: ۱۳۸۷/۳/۲۵ تأیید مقاله: ۱۳۸۷/۹/۲۳

نویسنده پاسخگو: خیابان وحدت اسلامی، مرکز تشخیص هویت تهران بزرگ، آزمایشگاه بیولوژی جنایی Saeed_biology@yahoo.com

مقدمه

وجود لکه‌های خون در هر نقطه از صحنه‌های جرم می‌تواند در بازسازی صحنه جرم مفید باشد (۱). با بررسی ژنتیکی و تعیین پروفایل لکه‌های خون موجود در این صحنه‌ها می‌توان نسبت به شناسایی قاتل و یا ضاربی که مجروح شده اقدام نمود. این در حالی است که در بسیاری از صحنه‌های جنایت معمولاً رد خون از روی زمین و دیوارها و نیز بر روی البسه و آلت قتاله شستشو شده و محیط تمیز گردیده است.

در سال‌های اخیر تلاش بسیاری از محققین این بوده تا بتوانند با استفاده از برخی ترکیبات شیمیایی نسبت به شناسایی خون شستشو شده در محل جرم اقدام نمایند لذا بر این اساس نیز آزمایش‌های

[Downloaded from sjfm.ir on 2025-08-21]

متعددی طراحی شـده که در اکثر روش‌های، شناسـایی خون بر پایه واکنـش بـا هموگلوبیـن و مشـتقات آن و یا جدا سـازی پروتئین‌ها می‌باشـد. این روش‌ها که با اسـتفاده از مواد شـیمیایی انجام می‌شود علاوه بر اثرات مخربی که روی ماده ژنتیکی داشـته، با آسیب بهDNA مانـع از DNA Typing می‌گردند (۲) می‌توانند اثـرات زیان‌آوری بر سلامت تکنسـین صحنه جرم داشته باشند. از جمله این مواد: بنزدین و ارتوتولوییدرا می‌توان نام برد که دارای خواص کارسـینوژنی هستند (۳). بـرای کار با این مواد نیاز به شـرایط ویـژه حفاظتی بوده و بطور محدود در آزمایشگاه قابل استفاده است (۴).

خواص کیمولومینسانس لومینول(3-aminophthalhydrazine) برای اولین بار در سـال ۱۹۲۸ میلادی گزارش شـده است (۵). وجود محیط مایع با سیستم اکسیداسیون و شرایط قلیایی، برای تهیه محلول مورد نیاز اسـت و انتقال یون‌های مثبت فلـزات، همچنین لیگاندهای آزاد یا ترکیب شـده با مواد معدنی می‌تواند اکسیداسـیون لومینول را کاتالیز نماید (۶). در این میان هموگلوبین که وظیفه انتقال اکسـیژن از ریـه به سـلول‌ها را بـر عهده دارد حاوی آهن اسـت کـه این آهن (Fe^{3+}) توانایی کاتالیزوری برای لومینول در حضور اکسید کننده را دارا می‌باشد (۷). پایداری انجام آزمایش بستگی به تهیه یک محیط اکسید کننده و نیز تنظیم دقیق pH دارد که باید با دقت و حساسـیت زیادی انجام شـود. در حال حاضر دو فرمول برای تهیه محلول لومینول وجود دارد که لومینول I توسط Gradsky و لومینول II توسط Weber (۸) معرفی شـده اسـت. در مطالعاتWalter Sprech نشان داده شده که مواد موجود در این محلول‌ها به DNA آسـیب می‌رساند (۱۰،۹)، این در حالی است که Rutty گزارش نموده که شدت و زمان درخشش آن نیز بسیار کم می‌باشد (۱۲،۱۱).

روش بررسی

3-aminophthalhydrazine، هیـدروژن پراکسـید، سـدیم کربنات، پتاسـیم کربنات، سدیم هیدروکسـید، پتاسیم هیدروکسید و سدیم پربورات از شرکت مرک تهیه گردید.

ابزار اندازه گیری شدت کیمولومینسانس

جهت اندازه‌گیری شدت کیمولومینسـانس از دستگاه لومینومتر مرکز تحقیقات بیوشـیمی و فیزیک دانشـگاه تهران اسـتفاده شد. به منظـور انجام آزمایـش، ۹۰ میکرولیتر محلول لومینول (ماده اکسـید کننـده، قلیـا و لومینول) به ۱۰میکرولیتر خون کامل اضافه شـد و در محدوده ۴۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر شدت نور اندازه‌گیری گردید.

بـه منظور بررسـی محلـول جدیـد که دارای حساسـیت بیشـتری در مقایسه با روش قبل بوده ونسـبت به تهیه رقت‌هایی در محدوده $\frac{1}{50}$ تا $\frac{1}{10000}$ اقدام گردید. بدین منظور سوسپانسـیون خون در محلول ایزوتونیک تهیه شـد و سپس ۰/۳ میکرولیتر از خون رقیق شـده درون لوله‌های کوت ریخته و با افـزودن محلول جدید لومینول، شـدت نور برای مدت ۱۰ دقیقه توسط دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری شد.

انجام DNA Typing

بـرای این منظور ۵ میکرولیتر خون کامل بدون مواد ضد انعقادی بر روی کاغذ صافی ریخته شـد و پس از خشـک شدن محلول جدید لومینول بر روی آن اسـپری گردید، پس از رؤیت نور سـاطع شـده از آن عکس و فیلم تهیه شـد و جهت تخلیـص DNA نمونه‌ها، با روش فنل کلروفرم اقدام گردید. تکثیر در جایگاه‌های اسـتاندارد ژنی، توسط دستگاه EBI ۳۱۳۰۰ و با اسـتفاده از کیتAmp/STR Identifiler در ۱۶ جایگاه مورد بررسـی قرار گرفت و نتایج بدست آمده توسط نرم افزار Gene Mapper تجزیه و تحلیل شد.

بهینه سازی مواد موجود در محلول جدید

پربورات و هیدروژن پراکسید به عنوان مواد اکسیدکننده استفاده گردید، از آنجا که این مواد پایدار نبوده لذا برای هر بار آزمایش محلول تازه تهیه و از آن اسـتفاده شـد. جهـت ایجاد حداکثر شـدت نور در محـدوده PH، ۱۰/۵ تـا ۱۳ اقدام گردید که بسـتگی بـه ماده قلیا و ماده اکسـید کننده داشـت. محیط قلیایی با اسـتفاده از کربنات و نیز نمک‌های سدیم یا پتاسیم و یا یک باز قوی همچون سدیم هیدروکسید یا پتاسـیم هیدروکسـید تهیه گردید و pH آن به گونه ای تنظیم شد، که امکانDNA Typing در مورد لکه‌های شناسـایی شده توسط ماده لومینسـانس داشته باشـد به همین دلیل pH محلول مورداستفاده در محـدوده ۱۱/۵ تنظیم شـد. بـرای تنظیم غلظت مناسـب لومینول و هیدروژن پراکسـید آزمایش‌های متعددی انجـام گرفت، تا غلظت ۲۵ میلی مـولار ازNaOH و محدوده‌ای از غلظت‌های ۱۰- ۱ میلی مولار لومینـول و ۱۰۰- ۵ میلی مولار پراکسـید هیدروژن به عنوان غلظت مطلوب انتخاب گردید.

طریقه کاربرد محلول لومینسانس

پودر محلول جدید لومینول (اکسـید کننده- قلیا و لومینول) در ۱۲۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل گردید سـپس داخل یک ظرف اسپری ریخته شد و از فاصله ۵۰ سانتی متری بر روی ناحیه‌ای که قبلاً آغشته به خون بوده و بعد آثار آن شستشـو شده بود اسپری گردید. به منظور دقت در آزمایش از دو کنترل شـامل کنترل مثبت (که شامل سه رقت از خون بصورت $\frac{1}{10}$ ، $\frac{1}{100}$ و $\frac{1}{10000}$) و کنترل منفی (یک کاغذ صافی بدون هیچ گونه ماده بیولوژیکی) استفاده شد.

برای شناسایی حجم‌های بسیار جزیی خون بوسیله محلول جدید و اسـتفاده از آن در بررسـی ژنتیکی DNA Typing نسـبت به تهیه رقت‌هـای 10^{-1}، 10^{-2}، تا 10^{-8} از خون اقـدام گردید و در حجم‌های ۰/۱، ۰/۵ ، ۲/۵ و ۵ میکرولیتـر بـر روی کاغـذ صافـی ریخته شـد و

[Downloaded from sjfm.ir on 2025-08-21]

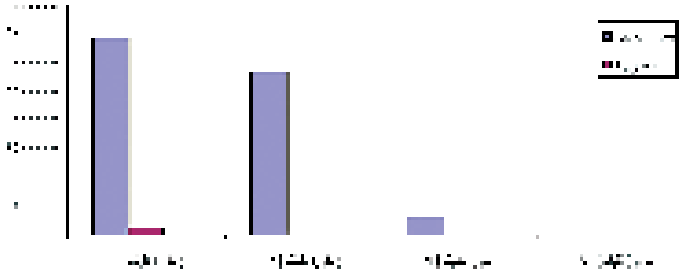
مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید تا ورقه‌های کاغذ صافی کاملاً خشک شوند، سپس توسط محلول جدید لومینول لکه‌ها شناسایی و نقاط نورانی از روی کاغذ صافی بریده و از آنها جهت انجامDNA Typing استفاده شد.

به منظور شناسایی لکه‌های خون و انجام آزمایش بر روی سطوح مختلف، آنها به دو بخش جاذب رطوبت شامل کاغذ دیواری، انواع کاغذ، چوب، آستر البسه‌های مختلف، اسکناس، انواع پشم، قالی و انواع موکت و مواد غیر جاذب شامل چوب پنبه، انواع لوله پولیکا، انواع مختلف پلاستیک، بطری شیشه‌ای، انواع برگ گیاهان، کاغذ روغنی، روی فلزات رنگ شده، فلز زنگ زده، خرد سنگ تقسیم شدند. همچنین بر روی مواد دارای خلل و فرج مانند: پوشش سفالی، شکر و پوسته صدف خون با رقت‌های مختلف ریخته شد و در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید و سپس توسط محلول لومینول آزمایش انجام گرفت. سطوح مورد آزمایش به دو قسمت تقسیم شدند و بر روی یک قسمت از آن با ۲۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف خون آلوده گردید (کنترل مثبت) و بر روی قسمت دوم هیچ خونی ریخته نشد (کنترل منفی). پس از انجام آزمایش از موارد مثبت ضمن تهیه عکس توسط سواب از روی سطوح نمونه‌برداری شد و از آنها جهت انجام تست ژنتیک استفاده گردید.

یافته‌ها

در این تحقیق نسبت به تولید حداکثر نور با استفاده از تأثیر مواد قلیا و اکسیدکننده مختلف اقدام گردید. همانطور که در جدول شماره یک نشان داده شده، NaOH با بیشترین شدت نور (۳۹۷۰۰) و K_2CO_3 با کمترین شدت نور (۲۶۴۲۰) مشخص گردید. آزمایش با این مواد نشان می‌دهد که سایر مواد نیز با قلیایی کردن محیط می‌توانند سبب ایجاد نور شوند ولی سدیم هیدروکسید با غلظت یکسان نسبت به دیگر مواد بیشترین شدت نور را تولید نمود.

حداکثر نور اندازه‌گیری شده با غلظت ۵ میلی مولار از هیدروژن پراکسید و غلظت ۱۰میلی مولار از لومینول مشاهده شد که با افزایش غلظت لومینول از ۵ میلی مولار به ۱۰میلی مولار تنها باعث افزایش ۸٪ شدت نور گردید، که در آخر غلظت بهینه برای انجام واکنش به این صورت معین شد: ۲۵ میلی مولار NaOH ، ۵ میلی مولار لومینول و



نمودار ۱- مقایسه شدت نور اندازه‌گیری شده نشان می‌دهد محلول I (محلول لومینول با فرمول قدیمی) در زمانهای مختلف دارای شدت نور کمتری نسبت به محلول جدید لومینول می‌باشد

۵۰ میلی‌مولار هیدروژن پراکسید وpH محلول بر روی ۱۱ تنظیم شد و در زمان‌های مختلف شدت نور اندازه‌گیری گردید (نمودار ۱).

واکنش‌های مثبت کاذب

مواد سفیدکننده شیمیایی باعث ایجاد واکنش مثبت با محلول لومینول شد که شدت نور تولید شده برای هر کدام متفاوت و با چشم غیر مسلح به راحتی اختلاف آن با لکه‌های خون قابل تشخیص بود. در مورد مواد سفید کننده، نور آن برای مدت کوتاهی ظاهر و فوراً ناپدید شد در حالی که در مورد لکه‌های خون نور برای مدت بیشتری دارای ماندگاری بود. پس از مخلوط کردن نسبت‌های مختلف ماده سفید کننده و خون (جدول ۲) نور ساطع شده از شدت بیشتری نسبت به خون کامل برخوردار بود، همانند واکنش با مواد سفید کننده ولی مدت زمان واکنش مانند اثر ترکیبات سفید کننده کوتاه نبود و مدت زمان رویت مانند خون طولانی بود.

مقایسه محلول جدید با محلول لومینول I

شدت نور در زمان t0، بلافاصله بعد از اسپری کردن محلول جدید au ۳۴۴۶۰۰۰ و برای محلول I آن au ۱۴۳۵۰۰ اندازه‌گیری شد. این نتیجه نشان داد که بعد از گذشت مدت زمان یک دقیقه، شدت نور برای محلول I نزدیک صفر بود در حالی که با محلول جدید، شدت نور ۸۳٪ شدت نور در زمان t0 و بعد از گذشت ۷ دقیقه هنوز ۱۰٪ شدت اولیه مشاهده شد. بعد از ۱۰ دقیقه ۱٪ شدت نور قابل تشخیص بود (au) ۳۱۰۰. نسبت نور با رقت خون رابطه مستقیم دارد و تا رقت

جدول ۱- اندازه‌گیری شدت نور توسط دستگاه لومینومتر با مواد قلیایی مختلف روی لکه‌های خون - بیشترین شدت نور ساطع شده با رقت ۲۵ میلی مولار مربوط به هیدروکسید سدیم می‌باشد-

مواد قلیایی	K_2CO_3 0.47mM	Na_2CO_3 0.47mM	KOH 25mM	NaOH 25mM
PH اندازه گیری شده در محلول نهایی	۱۱	۱۱	۱۱	۱۱
شدت نور (au)	۲۶۴۲۰	۳۰۹۳۰	۳۴۴۰۰	۳۹۷۰۰

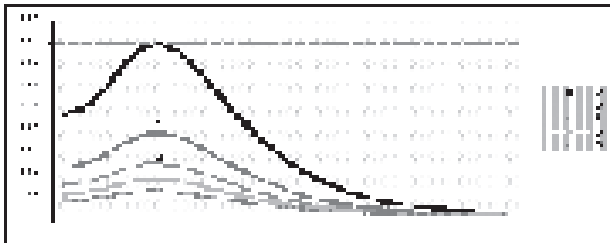
[Downloaded from sjfm.ir on 2025-08-21]

جدول ۲- رقت‌های مختلف خون در نسبت‌های متفاوت با مواد سفیدکننده که توسط دستگاه لومینومتر قابل اندازه‌گیری بوده است.

درصد سفید کننده شیمیایی (Bleach)	٪ ۹/۶			٪ ۰/۴۸		
نسبت خون به مواد سفید کننده شیمیایی	۱/۱	۱/۲	۱/۳	۱/۱	۱/۲	۱/۳

10^{-4} شدت نور در حدود ۱۷۳۰ au قابل اندازه‌گیری بود. محلول جدید قادر به تشخیص لکه‌های خون با رقت بالاتر از 10^{-4} نیز امکان‌پذیر می‌باشد (نمودار ۱).

جهت تعیین هویت با استفاده از روش‌های ژنتیکی اقدام به پروفایلینگ در جایگاه‌های STR شد و با بررسی محصول تولید شده و پیک‌های مربوط به آن استنباط شد که مواد موجود در محلول جدید مهارکننده واکنش PCR نبوده و ارتفاع تمامی پیک‌ها در جایگاه‌های STR در حد مطلوب بود. این در حالی است که محلول لومینول جدید هیچ‌گونه اثر مخربی بر روی ماده ژنتیکی نداشت و با استفاده از آن می‌توان پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، نسبت به DNA Typing اقدام نمود (جدول ۳ و تصاویر ۴-۱).

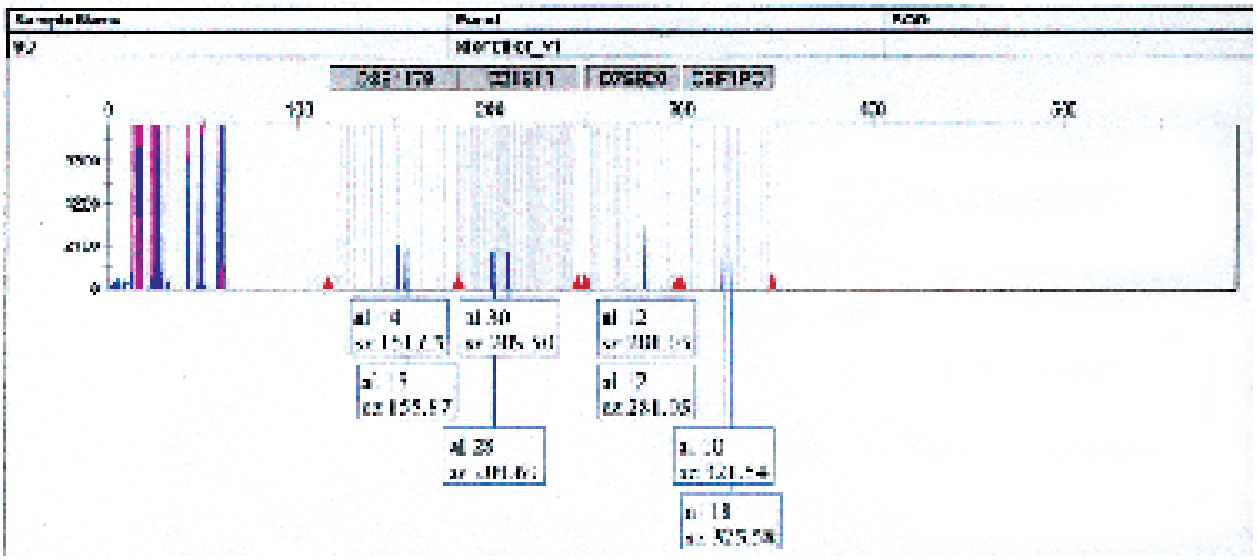


نمودار ۲- اندازه‌گیری شدت نور، در طول موج ۶۰۰ تا ۴۰۰ با خون دارای رقت 10^{-6} در ثانیه‌های ۱۰۰،۶۰،۴۰،۲۰ توسط دستگاه لومینومتر. پیک شماره ۲ ثانیه ۲۰، پیک شماره ۳ ثانیه ۴۰، پیک شماره ٤ ثانیه ٦٠، پیک شماره ٥ ثانیه ۸۰ و پیک شماره ٦ ثانیه ۱۰۰ که در طول موج ٤٤٠ نانومتر حتی بعد از گذشت یک دقیقه نور ساطع شده قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

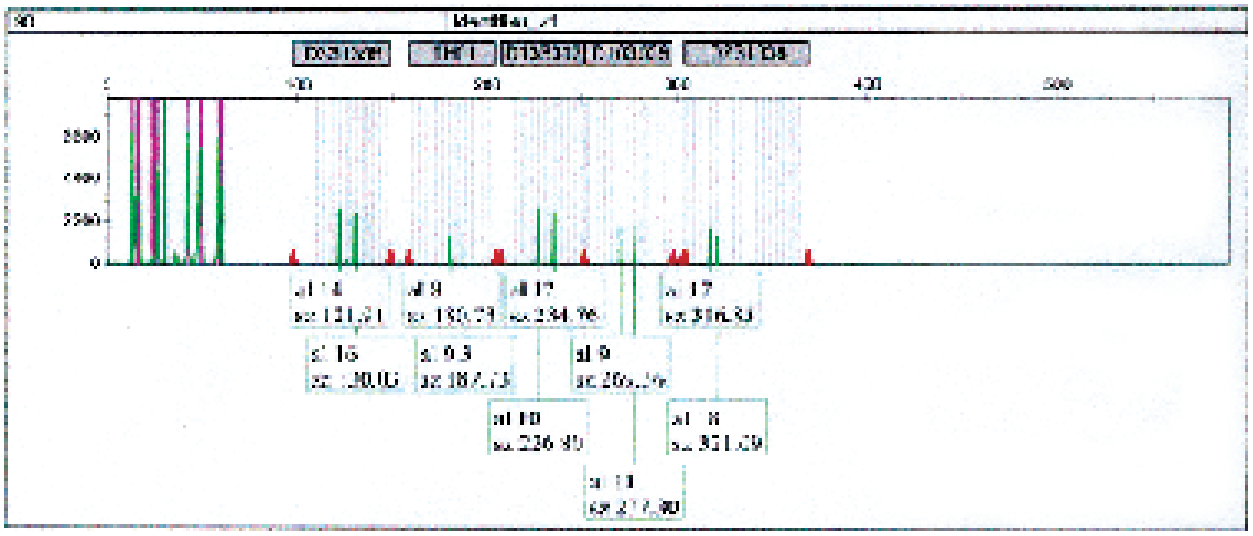
جدول ۳- بررسی محصول PCR برای جایگاه‌های STR توسط دستگاه الکتروفتوگرام

	فایل نمونه	نام نمونه	پنل	نشانگر	Dye	آلل ۱	آلل ۲
۱	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	D8S1179	B	۱۴	۱۵
۲	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	D21S11	B	۲۸	۳۰
۳	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	D7S820	B	۱۲	۱۲
۴	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	CSF1PO	B	۱۰	۱۱
۵	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	D2S1338	G	۱۷	۱۸
۶	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	D16S539	G	۹	۱۱
۷	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	D13S317	G	۱۰	۱۲
۸	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	THO1	G	۸	۳/۹
۹	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	D18S51	Y	۱۲	۱۶
۱۰	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	TPOX	Y	۱۱	۱۱
۱۱	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	VWA	Y	۱۷	۱۹
۱۲	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	D19S433	Y	۱۴	۱۴
۱۳	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	D3S1358	G	۱۴	۱۶
۱۴	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	AMEL	R	X	Y
۱۵	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	D5S818	R	۱۰	۱۱
۱۶	fas.90-5.30-86	۹۰	Identifier_V1	FGA	R	۲۰	۱۳

[Downloaded from sjfm.ir on 2025-08-21]



تصویر ۱- بررسی در جایگاه‌های D8S1179 , D21S11 , D7S820 , CSF1PO



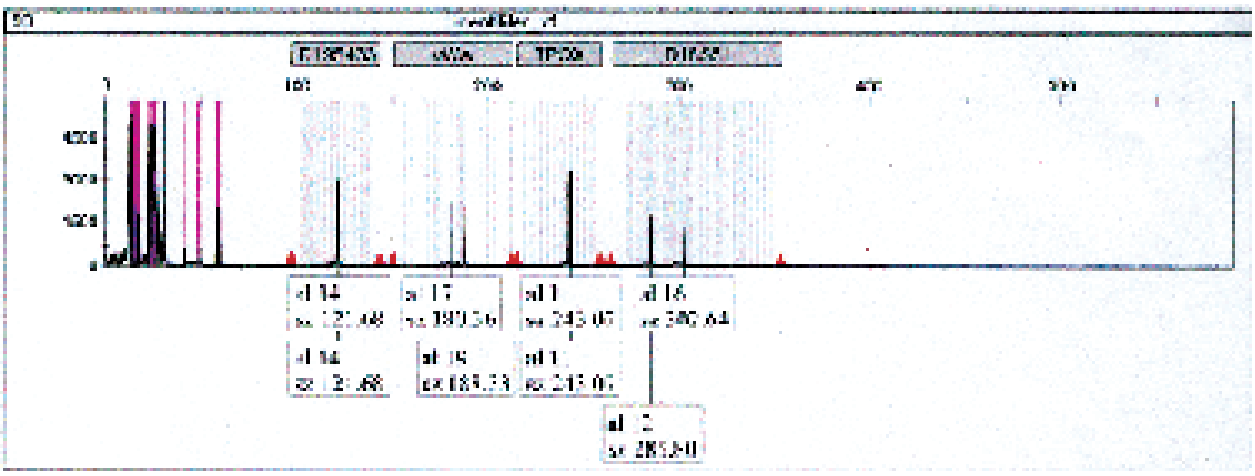
تصویر ۲- بررسی در جایگاه‌های D3S1358 , THO1 , D13S317 , D16S539 , D2S1338

بحث

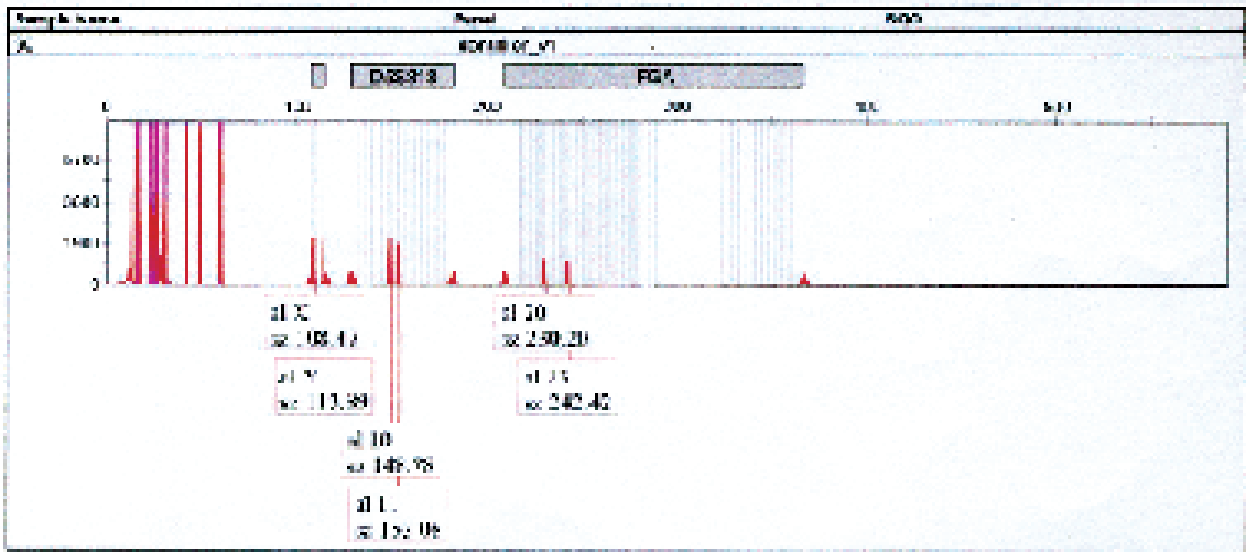
انجـام آزمایش در صحنه جرم (تسـت‌های فوری) با اسـتفاده از معرف‌های شـیمیایی اغلب کمک‌های با ارزشـی را به پردازش صحنه جرم و بررسـی آزمایشـگاهی ارایه می‌دهد. جهت مؤثـر و مفید بودن کارآیـی این معرف‌ها در صحنه باید بتوان آنها را به راحتی در محیط-های غیر آزمایشـگاهی، بدون نیاز به تجهیزات خاص استفاده کرد و تا حد امکان هم باید حساسیت زیادی داشته باشند و مقادیر بسیار کمی از آنها را در طی آزمایش به نمونه افزود. باید توجه داشت که تست‌های فوری در صحنه جرم با اهداف غربالگری طراحی شـده‌اند و نباید بجای تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی و آزمون‌های تأییدی به کار روند (۱۳).

تست‌های شیمیایی برای شناسایی مقادیر جزیی خون یا مشتقات شـبیه خون بکار می‌روند، عنصر آهـن در هموگلوبین خون عموماً در حالت احیا می‌باشد و تست‌های احتمالی، جهت شناسایی مولکول آهن احیا شـده در یک واکنش اکسـایش – کاهش طراحی شده‌اند، که در این‌گونه واکنش‌ها معرف بی‌رنگ به محلول رنگی تبدیل می‌شـود. اما با معرف لومینول، به جای آنکه یک رنگ بصری تشـکیل شـود، جواب مثبت توسط فلوئورسانس و نور ساطع شده نمایان می‌گردد.

[Downloaded from sjfm.ir on 2025-08-21]



تصویر ۳ - بررسی در جایگاه‌های D19S433 ,VWA ,TPOX , D18S51



تصویر ٤- بررسی در جایگاه‌های D5S818 , FGA , AMEL

لومینول (3-aminophthalazine) برای اولین بار در سال ۱۸۵۳ تولید شد و در واکنش‌های کیمولومینسانس مورد استفاده قرار گرفت و نیز در سال ۱۹۲۸ واکنش آن با خون توسط Albrecht تجربه گردید،که در این واکنش آهن موجود در هموگلوبین با لومینول واکنش داده و تحریک می‌شود سپس الکترون‌ها در بازگشت از لایه بالاتر نور ساطع می‌نمایند. نور ایجاد شده در محدوده طول موج ۴۵۲-۴۴۱ نانومتر، نور آبی/سفید، شبیه نور کرم شب تاب قابل رؤیت است، لومینول در این واکنش مانند یک Luciferase (آنزیمی که در سلول‌های برخی از موجودات زنده وجود دارد و سبب کاتالیز لوسیفرین می‌گردد) عمل می‌کند (۱۴).

در مطالعه اخیر، فرمول جدیدی از محلول لومینول ارایه شد، که نسبت به فرمول‌های قدیمی دارای مزایای متعددی می‌باشد، در فرمول قدیمی لومینول و نیز سایر تست‌های شناسایی سریع خون، واکنش‌های مثبت کاذب وجود دارد (۱۵)، برخی از پاک‌کننده‌های خانگی حاوی عامل‌های اکسیدکننده قوی می‌باشند، به علاوه حضور پراکسیداز گیاهی، جواب مثبت کاذب خواهد داد. بعضی از میوه‌ها و سبزی‌ها دارای مقدار کافی پراکسیداز می‌باشند (۱۶)، که به این تست‌ها جواب مثبت می‌دهند، بطور مثال: سیب، ترب کوهی، گل کلم و غیره. اما در فرمول جدید (محلول جدید) این مشکل رفع گردیده و با توجه به شدت و مدت زمان رؤیت نور ساطع شده، مثبت کاذب قابل تشخیص می‌باشد. این محلول در واکنش با خون دارای مدت زمان بیشتر بوده و نیز شدت نور آن با یک روند ثابت کاهش می‌یابد

[Downloaded from sjfm.ir on 2025-08-21]

که می‌توان از آن توسط دوربین عکاسی عکس تهیه نمود و به تاریکی مطلق نیز نیاز نمی‌باشد، اما در موارد مثبت کاذب نور در کسر ثانیه و با شدت زیاد رؤیت و سپس محو می‌شود.

نتیجه گیری

در آزمایشگاه‌های مراکز تشخیص هویت و پزشکی قانونی سراسر کشور از تست بنزدین استفاده می‌شود، این ترکیب در شکل احیا، بی‌رنگ و در شکل اکسایش و در حضور کاتالیزور (نظیر هم موجود در هموگلوبین) به رنگ سبز تیره در می‌آید (۱۶)، باید توجه داشت که بنزدین ترکیب بسیار خطرناک و سرطان‌زایی بوده و تنفس بخارات این ترکیب و تماس پوستی آن منجر به سرطان می‌گردد، (در سال ۱۹۷۴ انجمن بهداشت و ایمنی شغلی (OSHA) استفاده از این مواد و ساخت آن را منع نموده است)، ولی در فرمول جدید لومینول از موادی استفاده شده که خطر کمتری برای سلامتی افراد دارد (۱۷).

با بهینه کردن شرایط در محلول جدید و افزایش حساسیت آن، تا رقت 10^{-6} خون واکنش می‌دهد که در صحنه‌های جرمی که آثار خون شستشو شده مفید خواهد بود (۱۸)، تست‌های شیمیایی دیگر به اجزای خون صدمه زده و در صورت استفاده از آن دیگر از نمونه خون برای انجام تست‌های سرولوژی و DNATyping نمی‌توان استفاده کرد (۱۹) در حالی که پس از استفاده از محلول جدید لومینول علاوه بر نمایان کردن لکه خون نامریی، آزمایشات تعیین هویت قابل انجام خواهد بود (۲۰) و سبب مهار واکنش PCR نیز نمی‌گردد (۲۱). در حالی که استفاده از محلول قدیمی و تجاری لومینول به دلیل وجود برخی از مواد شیمیایی مانند پربورات سدیم سبب تداخل در تخلیص ماده ژنتیکی شده و از طرفی حذف آنها جهت انجام واکنشPCR نیز بسیار سخت و هزینه‌بر می‌باشد ولی استفاده از محلول جدید علاوه بر حذف مواد شیمیایی تداخل کننده در تخلیص سرعت نمونه‌برداری نیز افزایش یافته و مواد مهار کننده واکنش PCR نیز حذف گردیده است .

References

1- Blum L. J Esperanca P, Rocquefelte S.A New high-performance reagent and procedure for latent bloodstain detection based on luminal chemiluminescence. Journal Canadian society of Forensic Sciences. 2006; 39(3): 81-100.

2- Cox MA. Study of the sensitivity and specificity of four presumptive tests of blood. Journal of Forensic Sciences. 1991; 36 (5): 1503-11.

3-Gill P. Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the Uk - past present and future perspectives. Biotechniques. 2002; 32(2): 366-68.

4- Manna DA, Montpetit S. A nouvel approach to obtaining reliable PCR results from luminol treated bloodstains. Journal of forensic Sciences. 2000; 40(4): 886-890.

5- Laux DL. Luminol Chemical sheds new light on crime scenes. Law Enforcement Technology. 1991: 26–7.

6- Hochmeister MN, Budowle B, Sparkes R, Rudin O, Gehrig C, Thali M, Schmidt L, et al. Validation studies of an immunochromatograPHic 1-step test for the forensic identification of human blood. Journal of forensic Sciences 1999; 44(3): 597–602.

7- Budowle B, Leggitt JL, Defenbaugh DA, Keys KM. The presumptive reagent fluorescein for detection of dilute bloodstains and subsequent STR typing of recovered DNA. Journal of forensic Sciences. 2000; 45(5): 1090 -92.

8- Weber K. Die andwendung der chemiluminescenz des Luminols in der gerichtlichen medizin und toxicologie I. Der nachweis von blutspuren. Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med. 1966; 57: 410-23.[(German)]

9- Thompson WC, Taroni F, Aitken GG. How the probability of a false positive affects the value of DNA evidence. Journal of forensic Sciences. 2003; 48(1): 48-54.

10- Hochmeister MN, Budowle B. Effects of presumptive test reagents on the ability to obtain restriction fragment length polymorPHism (RFLP) patterns from human blood and semen stains. Journal of forensic Sciences. 1991; 36(3): 656 –61.

11- Gill P. Application of low copy number DNA profiling. Croatian Medical Journal. 2001 Jun, 42(3): 229-32.

12- Rutty GN , Hopwood A, Tucker V. The effectiveness of protective clothing in the reduction of potential DNA contamination of the scene of crime. International journal Legal Medicine. 2003 Jun;117(3): 170-4.

13- Quickenden TI, Creamer JI. A study of common

[Downloaded from sjfm.ir on 2025-08-21]

interferences with the forensic luminol test for blood. Luminescence, 2001 16(4): 295 –98.

14- Chemiluminescence: Synthesis of Luminol: Available from URL: http://cas.bellarmce.edu/ chem117a/lab/ luminol.htm

15- James SH, Eckert. WG. Interpretation of Bloodstain Evidence at Crime Scenes, second ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 2005: 155-160.

16- James SH. Scientific and Legal Applications of Bloodstain Pattern Interpretation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2004: 50-40.

17- Quickenden TI, Copper, PD. Increasing the specificity of the forensic luminol test for blood. Luminescence: Journal of biological and chemical luminescene. 2001; 16(3): 251-53.

18- Patzelt D. History of forensic serology and molecular genetics in the sPHere of activity of the German Society for Forensic Medicine. Forensic Science International. 2004; 144: 185 – 91.

19- James SH, Kish PE, Sutton TP. Principle of bloodstain pattern analysis: theory and practice. CRC press Taylor & Francis Group. 2005: 358-360.

20- Marquette CA, Blum, LJ. Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. Anal Bioanal Chem. 2006; 3: 546-554.

21- Webb JL. Creamer JI, Quickenden, TI. A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques. Luminescence: Journal of biological and chemical luminescene., 2006; 21(4): 214-20.

[Downloaded from sjfm.ir on 2025-08-21]