

# 荧光定量PCR技术在血液斑迹离体时间推断中的应用

朱晨露<sup>1</sup>, 穆 恺<sup>1</sup>, 杨雪莹<sup>2</sup>, 张 瑾<sup>2</sup>, 王金玲<sup>1,3</sup>, 孙 鹏<sup>1</sup>, 王瑞俭<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>北华大学林学院, 吉林 吉林

<sup>2</sup>公安部鉴定中心, 北京

<sup>3</sup>吉林省林业生物技术工程研究中心, 吉林 吉林

收稿日期: 2026年3月23日; 录用日期: 2026年5月18日; 发布日期: 2026年5月29日

## 摘 要

血液斑迹遗留时间(TSD)推断是法医物证检验中的关键问题, 对案件发生时间的确定和犯罪现场重建具有重要意义。随着分子生物学技术的快速发展, 基于荧光定量PCR (qPCR)技术的RNA降解分析方法已成为血液斑迹TSD推断的重要研究方向。本文系统综述了荧光定量PCR技术在血液斑迹遗留时间推断中的研究进展, 包括技术原理、RNA生物标志物筛选、环境影响因素、数学模型构建及未来发展方向, 以期为法医实践提供参考。

## 关键词

荧光定量PCR, 血液斑迹, 遗留时间, RNA降解, 生物标记, 法医学

# Application of Quantitative Real-Time PCR Technology in Estimation of Time Since Deposition of Blood Stain

Chenlu Zhu<sup>1</sup>, Kai Mu<sup>1</sup>, Xueying Yang<sup>2</sup>, Jin Zhang<sup>2</sup>, Jinling Wang<sup>1,3</sup>, Peng Sun<sup>1</sup>, Ruijian Wang<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Forestry College of Beihua University, Jilin Jilin

<sup>2</sup>Institute of Forensic Science of China, Beijing

<sup>3</sup>Engineering Research Centre of Forestry Biotechnology of Jilin Province, Jilin Jilin

Received: March 23, 2026; accepted: May 18, 2026; published: May 29, 2026

\*通讯作者。

文章引用: 朱晨露, 穆恺, 杨雪莹, 张瑾, 王金玲, 孙鹏, 王瑞俭. 荧光定量 PCR 技术在血液斑迹离体时间推断中的应用[J]. 生物医学, 2026, 16(3): 499-507. DOI: 10.12677/hjbm.2026.163052

## Abstract

Estimation of Time Since Deposition (TSD) of blood stain is a key problem in forensic certification testing. It is important for establishing the time of the case and reconstructing the crime scene. With the rapid development of molecular biology technology, the RNA degradation analysis method based on Quantitative Real-time PCR (qPCR) technology has become an important research direction for the TSD inference of blood stains. This paper provides a systematic review of the research progress of qPCR technology in the inference of blood stains, including the technical principle, the screening of the RNA biomarkers, the influence of environmental factors, the mathematical model construction and the future development direction, in order to provide a reference for forensic practice.

## Keywords

Quantitative Real-Time PCR, Blood Stains, Time Since Deposition, RNA Degradation, Biomarkers, Forensic Science

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

在刑事侦查和司法鉴定实践中,准确推断犯罪现场生物斑迹的遗留时间对于确定案发时间、缩小侦查范围、验证嫌疑人供述具有关键作用。血液斑迹作为犯罪现场最常见的体液斑迹,其形成时间的推断一直是法医学研究的难点和热点[1]。

传统血液斑迹时间推断方法主要依赖于肉眼观察血液斑迹颜色变化、形态特征及理化检验,但这些方法受主观因素影响大、准确性低、时间窗口短,难以满足实际办案需求。随着分子生物学技术的快速发展,基于核酸降解规律的遗留时间(Time Since Deposition, TSD)相关技术在司法实践中的犯罪时间确定、伤害顺序判断、调查范围界定、案件性质分析、不在场证据核实等方面具有重要的应用价值[2]。实时荧光定量 PCR (Real-time Quantitative PCR, qPCR)技术因其高灵敏度、高特异性、可定量等优势,在血液斑迹 TSD 推断领域展现出广阔的应用前景[3][4]。

## 2. 基于 RNA 降解的血液斑迹 TSD 推断研究

血液离体后,由于自身稳定性差及 RNase 的作用及环境因素的影响, RNA 会发生渐进性降解[5]。不同类型的 RNA 分子具有不同的稳定性和降解速率,这种降解规律与时间存在一定的相关性,这是 TSD 推断的基本原理[6]。早期研究的 RNA 分子主要包括信使 RNA (mRNA)、转运 RNA (tRNA)、核糖体 RNA (rRNA)。其中, mRNA 半衰期较短且易受 RNase 攻击,其降解速度较快,可用于短时间内 TSD 推断。tRNA 虽然分子较小,但具有独特的高级结构与修饰模式,对热及 RNase 的稳定性相对较高[7],可作为中长时程 TSD 推断的潜在标志物。rRNA 含量丰富且结构相对稳定,常被用作内参指标来校正 RNA 提取效率的差异,但在体外样本中也会呈现降解现象,因此也可用于长时程 TSD 推断的标记分子,如 18S rRNA、5S rRNA 等[8]-[10]。随着对非编码 RNA (ncRNA, noncoding RNA)研究的深入,一些功能性 RNA 逐渐进入人们视野,如 miRNA (MicroRNA)、snRNA (small nuclear RNA)、scRNA (small cytoplasmic RNA)、

反义 RNA (siRNA, antisense RNA)、长链非编码 RNA (lncRNA)和 PIWI 相互作用 RNA (piRNA)等。某些非编码 RNA 因其独特的分子稳定性及对环境变化的响应规律, 正成为极具应用前景的 TSD 推断生物标志物[2] [11]。现有研究显示, 微小 RNA (miRNA)、环状 RNA (circRNA)最具应用潜力。miRNA 可能与蛋白质结合或被包裹在细胞外囊泡中而表现出良好的稳定性[2], 如 miR-122、miR-133a、miR-206、miR16-5p、miR451a 等[12] [13]。而 circRNA 的环状结构使得它们比线性 RNA 更稳定, 如 circ0000095、hsa\_circ\_0001445 等[13] [14]。另外, 某些 lncRNA (如 MALAT1、NEAT1)的延迟降解特性也表现出一定的应用潜力[15]。

### 3. qPCR 技术在 RNA 分析中的优势

法医学事件现场中的血迹检材可能通过擦拭、滴落、喷溅等方式形成, 具有微量、降解、混合或污染的特点。因此, 对其中 RNA 的检测技术有着高灵敏度、高特异性的基本要求。荧光定量 PCR 技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司首次推出, 是在 PCR 反应体系中加入荧光染料或荧光探针, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。其核心原理是在 PCR 扩增的指数期, 模板的 Ct 值(Cycle threshold)与起始模板拷贝数存在线性关系, 据此实现精确定量[3]。与常规 PCR 相比, qPCR 技术具有特异性更强、灵敏度高、定量准确、适于自动化操作等优点, 特别适用于法医检材中微量、降解核酸样本的检测分析[16]。

### 4. qPCR 技术在血液斑迹 TSD 推断中面临的挑战

荧光定量 PCR 技术(qPCR)作为法医学中检测和量化特定核酸序列的金标准技术, 具有高灵敏度、高特异性及适合建立标准操作流程等特点, 在血液斑迹等生物斑迹 TSD 推断研究中得到广泛应用[12]-[14] [16]-[20]。然而, qPCR 在应用于血液斑迹 TSD 推断时仍面临一系列严峻且复杂的挑战, 这些挑战主要源于血液斑迹样本特性、当前技术局限性以及环境变量的干扰等。表 1 统计了荧光定量 PCR 技术在血液斑迹时间推断(TSD)中的部分典型研究成果。这些研究多在实验室或受控条件下开展, 尽管部分 RNA 标记分子与离体时间存在较强相关性, 但该技术仍需建立稳定可靠的技术体系, 才能获得广泛认可并应用于法医实践。

**Table 1.** Literature statistics of quantitative PCR analysis of changes in RNA marker molecules in blood stains with *in vitro* time  
**表 1.** 采用定量 PCR 技术分析血液斑迹中 RNA 标记分子随离体时间变化规律的文献统计

检测方法	RNA 分子	内参基因	时间范围	模型建立方法	模型准确性	参考文献
荧光定量 PCR	hsa_circ_0001445 (circRNA)	U6	1~120 d	皮尔逊相关性	$r = 0.810$	[32]
荧光定量 PCR	hsa_circ_0000095 (circRNA)	U6	1~120 d	皮尔逊相关性	$r = 0.646$	[32]
荧光定量 PCR	ALAS2	U6	1~120 d	皮尔逊相关性	$r = 0.79$	[32]
荧光定量 PCR	HBB	U6	1~120 d	皮尔逊相关性	$r = 0.77$	[32]
荧光定量 PCR	ALAS 2 (5'/3')	Ct 比值	2 d~310 d	线性回归模型	$R^2 = 0.03$	[4]
荧光定量 PCR	B2M (5'/3')	Ct 比值	2 d~310 d	线性回归模型	$R^2 = 0.34$	[4]
荧光定量 PCR	LGALS2 (5'/3')	Ct 比值	2 d~310 d	线性回归模型	$R^2 = 0.2$	[4]
荧光定量 PCR	S100A12 (5'/3')	Ct 比值	2 d~310 d	线性回归模型	$R^2 = 0.43$	[4]
荧光定量 PCR	CLC (5'/3')	Ct 比值	2 d~310 d	线性回归模型	$R^2 = 0.84$	[4]
荧光定量 PCR	$\beta$ -actin (1782 bp 片段)	$\beta$ -actin (51 bp 片段)	0~30 d	二次多项式非线性 模型	$R^2 = 0.8653$	[27]

续表

荧光定量 PCR	$\beta$ -actin (998 bp 片段)	$\beta$ -actin (51 bp 片段)	0~60 d	二次多项式非线性 模型	$R^2 = 0.9151$	[27]
荧光定量 PCR	$\beta$ -actin (578 bp 片段)	$\beta$ -actin (51 bp 片段)	0~180 d	二次多项式非线性 模型	$R^2 = 0.9585$	[27]
荧光定量 PCR	18S rRNA/ $\beta$ -actin mRNA	Ct 比值	8~15 d	线性回归模型	$R^2 = 0.9875$	[28]
荧光定量 PCR	ALAS2	let-7g-5p	0~180 d	多元线性回归模型	$R^2 = 0.612$	[20]
荧光定量 PCR	B2M	let-7g-5p	0~180 d	多元线性回归模型	$R^2 = 0.951$	[20]
荧光定量 PCR	HBA	let-7g-5p	0~180 d	多元线性回归模型	$R^2 = 0.861$	[20]
荧光定量 PCR	HBB	let-7g-5p	0~180 d	多元线性回归模型	$R^2 = 0.881$	[20]
荧光定量 PCR	GAPDH	let-7g-5p	0~180 d	多元线性回归模型	$R^2 = 0.967$	[20]
荧光定量 PCR	SNORD24	let-7g-5p	0~180 d	多元线性回归模型	$R^2 = 0.946$	[20]
荧光定量 PCR	SNORD38B	let-7g-5p	0~180 d	多元线性回归模型	$R^2 = 0.932$	[20]
荧光定量 PCR	18S rRNA	let-7g-5p	0~180 d	多元线性回归模型	$R^2 = 0.954$	[20]
荧光定量 PCR	miR-16-5p	—	1~180 d	线性拟合	$R^2 = 0.646 (25^\circ\text{C})$	[33]
荧光定量 PCR	miR-451a	—	1~180 d	线性拟合	$R^2 = 0.654 (25^\circ\text{C})$	[33]
荧光定量 PCR	U6	—	1~180 d	线性拟合	$R^2 = 0.801 (25^\circ\text{C})$	[33]
半(荧光)定量 PCR	$\beta$ -actin (5'/3')	Ct 比值	0~5 y	皮尔逊相关分析	$r = 0.852$	[34]
半(荧光)定量 PCR	Cyclophilin (5'/3')	Ct 比值	0~5 y	皮尔逊相关系数	$r = 0.923$	[34]
荧光定量 PCR	HBA	—	0~30 d	—	降解率 97.3% (RT)	[17]
荧光定量 PCR	ALAS2	—	0~30 d	—	降解率 98.8% (自然条件)	[17]

#### 4.1. 样本特性

RNA 是基因转录的产物, 不同个体的性别、年龄、生理阶段、病理因素、情绪、饮食习惯等都可能对 RNA 种类和数量产生明显影响[21]-[23]。另外, RNA 分子的不稳定性对其保存、运输等条件要求较为苛刻。一般情况下, 可以选择将样本用液氮速冻并短期保存, 长期保存建议置于 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱, 运输则选用干冰条件。当然也可以选择一些具有 RNA 保护作用的试剂, 如 RNA Later 等, 实现在更高温度条件下的保存与运输。即便有合适的贮存条件, 由于 RNA 分子的不稳定性, 也建议尽可能在短时间内进行后续的实验工作, 比如提取 RNA 并尽快实施逆转录反应。

#### 4.2. 当前 qPCR 技术的局限性

血液斑迹作为一种典型的体外生物检材, 具有微量、陈旧、易污染等特性, 对其检测技术提出了极高的要求, 理论上 qPCR 技术能满足这类检材的基本要求, 但当前其技术上还存在很多难以克服的障碍。

##### (1) RNA 提取技术

对于微量血液斑迹样本, 特别是干燥的血液斑迹, 大多数 RNA 提取试剂效果不良, 需要使用对血液斑迹渗透、溶解能力更强, 且对微量 RNA 具有富集作用的提取试剂。开发高效溶解血液斑迹、对 RNA 安全的表面活性剂, 结合微量吸附柱或磁珠的 RNA 富集技术, 可能是一个较为理想的方法。另外, 如果分析的对象是小 RNA, 还需要使用专门对微量样本优化的 microRNA 提取试剂盒。

##### (2) RNA 模板的均一化技术

一个长期困扰 RNA 定量问题是如何保证所有样本具有相同的起始模板量(RNA 浓度)。使用尽量一致的样本量并进行标准化操作,可以在很大程度上降低模板量引起的定量误差,但对于血液斑迹类样本的定量显然更加困难。这就对另一个策略提出了更多挑战,即内参基因。理想的内参是不随时间及环境变化而发生降解或转化的 RNA 分子。当前 TSD 推断模型的构建通常是基于两个(组)降解速率有明显差异基因的 Ct 比值或差值,其中一些较为稳定的基因被用于此类研究,如 U6 snRNA、18S rRNA、5S rRNA、RNU6b 等[13] [24]。然而,迄今为止,在血液斑迹 TSD 研究中尚未找到理想的内参基因(RNA)。

### (3) 目标 RNA 的检测特异性

qPCR 技术检测的特异性与设计的扩增引物序列密切相关。比如,对于人源基因来说,其引物可以在数据库(如 NCBI)中进行特异性验证。需要注意的是,在 qPCR 技术中使用 TaqMan 探针法的特异性优于 SYBR 荧光染料法,而后者则具有明显的经济性和便捷性。另外, RNA 模板中是否有 DNA 残留也是影响其特异性的因素之一,解决的办法是在 RNA 提取过程中或逆转录之前用 DNase I 降解 DNA,或者设计跨长外显子的引物。需要注意的是,独立的 DNA 降解过程将导致 RNA 部分降解,使用 DNA 降解 - 逆转录一体化(All in One)的逆转录试剂可有效降低这一影响[25]。

### (4) 技术标准化问题

在采用 qPCR 技术进行血液斑迹 TSD 推断时,由于各研究之间在样本采集与存储、实验试剂与设备、选择的技术方法、实验操作标准和数据分析等方面可能存在差异,不同研究之间的结果难以直接比较或进行整合分析,极大限制了该技术在 TSD 推断领域的研究与应用。

## 4.3. 环境变量对 RNA 及 TSD 推断的影响

① 温度是影响血液斑迹 RNA 降解速率的最重要环境因素之一。研究表明,高温环境可加速 RNA 降解,低温环境则延缓降解过程[13]。

② 湿度通过促进水解酶的活性和微生物的生长来间接加速 RNA 降解。水分子是 RNA 自然降解及 RNase 催化降解的必要条件[26]。潮湿条件有利于环境中微生物的繁殖,其分泌的 RNase 间接促进了 RNA 的降解。

③ 紫外线(UV)辐射可以直接打断 RNA 链,造成单链或双链断裂,并引起碱基修饰(如形成嘧啶二聚体),从而破坏 RNA 的完整性。有研究显示,某些 miRNA 对紫外线有较好的稳定性,显示这类 RNA 在室外暴露环境中的应用潜力[13] [26]。

④ 其他因素,如环境的酸碱性、血液斑迹所附着基质的材质、季节变化等。值得注意的是,自然条件下的环境因素并非孤立作用,常存在交互效应,如温度 - 湿度 - 光照的协同作用等。

## 4.4. 数据处理与模型构建方法对 TSD 推断的影响

TSD 推断最常用的数据统计方法是线性回归分析,通常是采用目标基因与内参基因 Ct 值的差值( $\Delta Ct$ )或比值与时间建立线性分析模型[4] [13] [27] [28],或者使用多个 RNA 标记分子共同建立多元线性回归方程[20]。随着人工智能技术的发展,基于机器学习的深度数据模型在 TSD 推断中的应用逐渐兴起,并显示出良好的 TSD 预测能力。如使用 glmnet R 软件包的弹性网络(EN)模型建立 TsD 预测的机器学习模型[4],基于机器学习的 KNN 回归模型[29]、随机森林预测模型[30]等。然而,深度学习模型,虽然可能具有较高的预测精度,但其内部运作机制不透明,难以提供清晰的因果解释[31]。

## 5. 未来发展趋势

基于 qPCR 技术的 TSD 推断方法虽然有了明显进展,但其可靠性及公共认可度仍有待提高,距离成

为法庭证据还有很长的路要走，未来需要更多的研究乃至实践案例应用来证明其科学性与可靠性。

### (1) 开发新的 RNA 标记分子

已研究可能应用于 TSD 分析的 RNA 标记分子多集中于 mRNA、rRNA、部分小 RNA 等。而 RNA 分子的多样性与复杂性可能远超我们的想象。因此，从庞大、纷杂的转录产物中，筛选和验证更稳定、更具时间特异性的新型 RNA 标志物，仍然是未来的重点工作。另外，一个难以跨越的障碍是，目前尚没有找到稳定的、可用于 TSD 推断的合适内参基因，这使得对血液斑迹转录组的深入研究显得尤为迫切。对于内参基因的选择，可以从文献资料或转录组数据中发掘随时间变化稳定的基因，利用 GeNorm、NormFinder 内参基因筛选软件筛选出合适的内参基因或内参基因组合。

### (2) 建立标准化的分析体系

通过建立标准化的样本采集、保存、检测和数据分析流程，可以有效提高研究结果的可重复性及数据间的可交流性，同时也为未来的实践应用提供保障。另外，开发适用于微量血液斑迹样本 RNA 提取及逆转录试剂，开发专门用于 microRNA、circRNA 分析的产品与技术，甚至适用于各类 RNA 分析的通用技术，也是血液斑迹 TSD 研究及建立标准化体系亟待解决的问题。

通过构建严格规范化的样本采集、保存、检测及数据分析全流程体系，能够显著提升研究成果的可重复性，并增强不同来源数据之间的可比性与可交流性，从而为后续的学术探讨与实践转化奠定基础。此外，针对微量血液斑迹样本，研发高效、稳定的 RNA 提取与逆转录专用试剂，以及开发专门适用于 microRNA、circRNA 等特定类型 RNA 分析的高灵敏度产品与配套技术，甚至探索适用于全部 RNA 的通用性分析平台，也是当前血液斑迹 TSD 推断领域所面临的关键技术挑战。

### (3) 引入个体及环境因素

在 TSD 的研究中，系统性地引入种族、性别、区域、饮食及生活习惯等多样化的样本个体差异变量，同时充分考虑温度、湿度、酸碱度、附着物等关键环境影响因素。通过构建一个全面覆盖不同人群特征和不同环境条件的多样本、多维度数据库，深入分析与总结 RNA 标记分子与环境因子之间相互作用的时序动态特征及其演变规律。在此基础上，在预测模型中引入基于这些规律提炼出的相应校正参数与调整系数，从而显著提升在复杂个体背景和多样环境条件下 TSD 预测结果的稳定性与可靠性。

### (4) 多标记、多技术整合分析

在 TSD 研究中，不同的标记分子及分析方法各有特点。将不同的标记分子进行多标记的联合分析，可以相互补充、交叉验证，从而提升 TSD 推断的准确性和稳定性。例如将 microRNA、circRNA、mRNA、rRNA、tRNA 等多种 RNA 分子标记，或蛋白质、代谢物等其他类型的生物标记物进行多标记联合分析，从多个维度捕获血液斑迹随时间变化的复杂信息。同时，整合不同分析技术(如 qPCR、多组学联合、光谱技术、质谱分析等)的优势，对多标记物进行系统分析，再运用多元统计分析、机器学习等方法构建融合多源数据的预测模型，以实现 TSD 精确、可靠的推断。

### (5) 从实验室走向法庭的科学和法律标准

基于 qPCR 的血液斑迹 TSD 推断技术应用于法庭，必须首先通过严格的科学验证。qPCR 技术与推断模型的验证是确保推断结果可靠性的基础，可以从提高检测结果的精密度、准确度及灵敏度入手，确保微量血迹样本中 RNA 定量检测结果的稳定性与可靠性。在血迹 TSD 推断技术中，由于个体差异的存在、初始样本量或 RNA 总量难以均一化处理等因素，模型的预测结果可能存在较高的错误率。对此，可通过优化技术体系、增加验证样本数量，并采用训练/测试分割、交叉验证等方法，对推断模型的错误率进行系统评估与针对性优化。另外，盲测是验证方法可靠性的重要手段，通过在未知样本信息的情况下进行检测，避免主观因素对结果的影响。可以采用单盲测试(检测者未知样本信息)或双盲测试(检测者和样本提供者均未知样本信息)等方式进一步验证方法的可靠性。同时，还可考虑对不同课题组的数据开展

对比分析,探究实验条件与结果的差异,解析方法的系统误差,从而持续推动检测方法的标准化与规范化进程。

除了科学验证外,基于 qPCR 的 TSD 推断技术还需满足法律认可标准,才能作为证据在法庭上使用。这项技术涉及专业的分子生物学原理与复杂的数学统计模型,如何在法庭上解释这些模型的结果,是该技术在法医领域应用中的重要挑战。因此,需将复杂的统计模型简化为通俗易懂的语言,通过图表、图像等方式直观展示数据分布、模型拟合情况等;必要时,可邀请具备专业知识的专家证人对统计模型结果进行解释说明,以提升证据的可信度。

## 6. 结论

荧光定量 PCR 技术在血液斑迹离体遗留时间推断领域取得了显著进展。从早期的单一 mRNA 标志物检测,发展到如今的多类型 RNA (mRNA, circRNA, miRNA)联合分析,从简单的回归模型到复杂的机器学习算法,qPCR 技术在 TSD 方向的研究正朝着更精准、更可靠、更实用的方向发展。然而,该技术在实际应用中仍面临个体差异、环境复杂性、标准化不足等挑战。未来需要通过多种标记分子及环境因子整合、多组学联合、人工智能算法引入、大样本数据库建立等措施,进一步提高 TSD 推断的准确性和可靠性,推动该技术在法医实践中的广泛应用,为刑事侦查和司法鉴定提供更有力的科学支持。

## 基金项目

本文受法医遗传学公安部重点实验室开放课题(2023FGKFKT02)资金支持。

## 致谢

感谢吉林省林业生物技术工程研究中心和北华大学林学院林业生物技术创新研究平台的支持和帮助。

## 参考文献

- [1] 韩祺瑞, 张文骥, 李昊洋, 等. 血迹遗留时间推断技术现状与展望[J]. 法医学杂志, 2024, 40(5): 468-475, 483.
- [2] Song, B., Qian, J. and Fu, J. (2023) Research Progress and Potential Application of MicroRNA and Other Non-Coding RNAs in Forensic Medicine. *International Journal of Legal Medicine*, **138**, 329-350. <https://doi.org/10.1007/s00414-023-03091-1>
- [3] Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M. (1996) Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*, **6**, 986-994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- [4] Hånggi, N.V., Bleka, Ø., Haas, C. and Fonneløp, A.E. (2023) Quantitative PCR Analysis of Bloodstains of Different Ages. *Forensic Science International*, **350**, Article 111785. <https://doi.org/10.1016/j.forseint.2023.111785>
- [5] Fordyce, S.L., Kampmann, M., van Doorn, N.L. and Gilbert, M.T.P. (2013) Long-Term RNA Persistence in Postmortem Contexts. *Investigative Genetics*, **4**, Article No. 7. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-4-7>
- [6] 张瑾, 刘开会, 张颖, 等. RNA 检验在生物斑迹时间信息分析中的应用[J]. 中国法医学杂志, 2022, 37(6): 589-593.
- [7] Ohira, T., Minowa, K., Sugiyama, K., Yamashita, S., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., *et al.* (2022) Reversible RNA Phosphorylation Stabilizes tRNA for Cellular Thermotolerance. *Nature*, **605**, 372-379. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04677-2>
- [8] Sacco, M.A., Gualtieri, S., Tarallo, A.P., Calanna, L., La Russa, R. and Aquila, I. (2024) The Role of Molecular Investigations in Estimating the Time since Deposition (TSD) of Bloodstains: A Systematic Review of the Literature. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**, Article 7469. <https://doi.org/10.3390/ijms25137469>
- [9] Lv, Y., Ma, K., Zhang, H., He, M., Zhang, P., Shen, Y., *et al.* (2014) A Time Course Study Demonstrating mRNA, miRNA, 18S rRNA, and u6 SnRNA Changes to Estimate PMI in Deceased Rat's Spleen. *Journal of Forensic Sciences*, **59**, 1286-1294. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12447>
- [10] Lv, Y., Ma, J., Pan, H., Zeng, Y., Tao, L., Zhang, H., *et al.* (2017) Estimation of the Human Postmortem Interval Using an Established Rat Mathematical Model and Multi-RNA Markers. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, **13**, 20-27. <https://doi.org/10.1007/s12024-016-9827-4>

- [11] Li, Y., Wang, Z., Ishmael, D. and Lvy, Y. (2023) The Potential of Using Non-Coding RNAs in Forensic Science *Applications. Forensic Sciences Research*, **8**, 98-106. <https://doi.org/10.1093/fsr/owad003>
- [12] Lee, E.J., Jeong, M., Lee, H., Je, M., Park, K., Lee, D.G., *et al.* (2024) MiR-122, miR-133a, and miR-206 as Potential Biomarkers for Post-Mortem Interval Estimation. *Genes & Genomics*, **46**, 1175-1182. <https://doi.org/10.1007/s13258-024-01559-x>
- [13] Chen, X., Xu, H., Lin, Y. and Zhu, B. (2024) Forensic Stability Evaluation of Selected MiRNA and CircRNA Markers in Human Bloodstained Samples Exposed to Different Environmental Conditions. *Forensic Science International*, **362**, Article 112148. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2024.112148>
- [14] Wei, Y., Wang, J., Wang, Q., Cong, B. and Li, S. (2022) The Estimation of Bloodstain Age Utilizing CircRNAs and MRNAs Biomarkers. *Forensic Science International*, **338**, Article 111408. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2022.111408>
- [15] Wang, C. and Liu, H. (2022) Factors Influencing Degradation Kinetics of MRNAs and Half-Lives of MicroRNAs, CircRNAs, LncRNAs in Blood *in Vitro* Using Quantitative PCR. *Scientific Reports*, **12**, Article No. 7259. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11339-w>
- [16] Haarkötter, C., Alvarez-Cubero, M.J., Alvarez, J.C. and Saiz, M. (2022) Usefulness of Quantitative PCR in Forensic Genetics. In: Dash, H.R., Shrivastava, P. and Lorente, J.A., Eds., *Handbook of DNA Profiling*, Springer, 773-797. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-4318-7\\_39](https://doi.org/10.1007/978-981-16-4318-7_39)
- [17] Bukhari, R., Rehman, R.A., Salman, M., Rakha, A., Munawar, A., Nazir, S., *et al.* (2025) Molecular Analysis of Time-Dependent DNA and RNA Degradation in Bloodstains: Differential Stability of HBA and ALAS2 Gene Targets and Its Forensic Implications. *Molecular Biology Reports*, **53**, Article No. 210. <https://doi.org/10.1007/s11033-025-11363-9>
- [18] Manasatienkij, C. and Nimmual, A. (2021) Forensic Blood Stain Aging Using Reverse Transcription Real-Time PCR. *Forensic Science International: Reports*, **3**, Article 100205. <https://doi.org/10.1016/j.fsr.2021.100205>
- [19] Fu, J. and Allen, R.W. (2019) A Method to Estimate the Age of Bloodstains Using Quantitative PCR. *Forensic Science International: Genetics*, **39**, 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.12.004>
- [20] 郭顺天, 郑刘霞, 孙启凡, 等. 基于 RNA 生物标志物的血痕形成时间推断模型构建与验证[J]. 中国法医学杂志, 2023, 38(5): 530-536.
- [21] Zhou, X., Cao, J., Zhu, L., Farrell, K., Wang, M., Guo, L., *et al.* (2023) Molecular Differences in Brain Regional Vulnerability to Aging between Males and Females. *Frontiers in Aging Neuroscience*, **15**, Article ID: 1153251. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1153251>
- [22] Tsamou, M. and Roggen, E.L. (2024) Sex-Associated MicroRNAs Potentially Implicated in Sporadic Alzheimer's Disease (Sad). *Brain Research*, **1829**, Article 148791. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2024.148791>
- [23] Bernad, B., Tomescu, M., Anghel, T., Lungeanu, D., Enătescu, V., Bernad, E.S., *et al.* (2024) Epigenetic and Coping Mechanisms of Stress in Affective Disorders: A Scoping Review. *Medicina*, **60**, Article 709. <https://doi.org/10.3390/medicina60050709>
- [24] Nikolajevic, J., Ariaec, N., Liew, A., Abbasnia, S., Fazeli, B. and Sabovic, M. (2022) The Role of MicroRNAs in Endothelial Cell Senescence. *Cells*, **11**, Article 1185. <https://doi.org/10.3390/cells11071185>
- [25] Nolan, T., Hands, R.E. and Bustin, S.A. (2006) Quantification of mRNA Using Real-Time Rt-PCR. *Nature Protocols*, **1**, 1559-1582. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>
- [26] Zhao, C., Zhao, M., Zhu, Y., Zhang, L., Zheng, Z., Wang, Q., *et al.* (2021) The Persistence and Stability of MiRNA in Bloodstained Samples under Different Environmental Conditions. *Forensic Science International*, **318**, Article 110594. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110594>
- [27] Nakanishi, H., Takada, A., Yoneyama, K., Sakai, K. and Saito, K. (2026) Using Long RNA Fragment Degradation Ratio to Estimate the Time Elapsed since Bloodstain Deposition. *Forensic Science International*, **378**, Article 112708. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2025.112708>
- [28] 许炎, 蒋巍, 平原, 等. 应用 RNA 分析技术推断现场血痕形成时间[J]. 法医学杂志, 2010, 26(5): 340-342.
- [29] Cheng, F., Li, W., Ji, Z., Li, J., Hu, W., Zhao, M., *et al.* (2023) Estimation of Bloodstain Deposition Time within a 24-H Day-Night Cycle with Rhythmic mRNA Based on a Machine Learning Algorithm. *Forensic Science International: Genetics*, **66**, Article 102910. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102910>
- [30] Zhang, J., Liu, K., Wang, R., Chang, J., Xu, X., Du, M., *et al.* (2024) Transcriptomic Changes and Prediction of Time since Deposition of Blood Stains. *Forensic Science International*, **355**, Article 111930. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2024.111930>
- [31] Scorzato, L. (2024) Reliability and Interpretability in Science and Deep Learning. *Minds and Machines*, **34**, 1-31. <https://doi.org/10.1007/s11023-024-09682-0>
- [32] Nagesh, D. and Nagarajamurthy, B. (2024) Estimation of Time-Since-Deposition of Bloodstains on Different Surfaces

---

Using ATR-FTIR Spectroscopy and Chemometrics. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, **21**, 123-137.  
<https://doi.org/10.1007/s12024-024-00849-w>

- [33] 赵聪聪. 不同环境条件下血痕中 microRNA 稳定性研究[D]: [硕士学位论文]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.
- [34] Bauer, M., Polzin, S. and Patzelt, D. (2003) Quantification of RNA Degradation by Semi-Quantitative Duplex and Competitive RT-PCR: A Possible Indicator of the Age of Bloodstains? *Forensic Science International*, **138**, 94-103.  
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2003.09.008>