



# Formosan Entomologist

Journal Homepage: [entsocjournal.yabee.com.tw](http://entsocjournal.yabee.com.tw)

## Rapid Identification of Three Species of Blow Flies (Diptera: Calliphoridae) by PCR-RFLP and DNA Sequencing Analysis 【Research report】

### 利用PCR-RFLP及定序分析技術快速鑑定三種屍體上【研究報告】

Chun-Hsien Chen and Cheng-Jen Shih\*

陳俊憲、石正人\*

\*通訊作者E-mail: [shihcj@ccms.ntu.edu.tw](mailto:shihcj@ccms.ntu.edu.tw)

Received: 2002/12/05 Accepted: 2003/02/26 Available online: 2003/03/01

### Abstract

Blow flies are common insects in Taiwan. They provide an objective estimate of the postmortem interval (PMI) in forensic entomology. However, it is difficult to identify blow fly species, especially at immature stages, such as eggs, larvae, and pupae, because of their morphological similarity. Identification of insect species occurring on carrion has therefore become a problem for forensic entomologists. In this study, blow flies were collected from corpses of pigs. Three species of blow fly were commonly found: *Chrysomya megacephala*, *C. rufifacies*, and *C. pinguis*. Total DNA was also isolated and used as template for PCR. ITS1 in ribosomal DNA (rDNA) and CO1 in mitochondrial DNA (mtDNA) were amplified to distinguish blow fly species. The primers of ITSF01 and ITS6 were used to amplify rDNA ITS1 region, C1-J-1632 and C1-N-2191 were used to amplify mitochondrial DNA (partial gene of subunit I of cytochrome oxidase). The amplified products were also digested with nine restriction enzymes. Results of PCR-RFLP analysis revealed that ITS1 and the partial COI region can be used to identify these three species. We also sequenced the ITS1 region for more understanding of the difference between these three species.

### 摘要

麗蠅 (blow fly) 是台灣常見的食屍及食糞性昆蟲，廣泛分佈在全島各地，是法醫昆蟲學 (forensic entomology) 中最常被用來判斷動物死亡後至屍體被發現期間 (postmortem interval, PMI) 的昆蟲。許多麗蠅的卵及幼蟲在型態上十分相似，所以不易從這二個時期之外部形態鑑別其種類。本試驗自豬的屍體上採集麗蠅中，以大頭金蠅 (*Chrysomya megacephala*)、紅顏金蠅 (*C. rufifacies*)、肥軀金蠅 (*C. pinguis*) 等三種最為常見。在萃取這些麗蠅之總 DNA 後，在體外增幅其 rDNA 上的內轉錄區間 (internal transcribed spacers, ITS) 區域，以 ITSF01 及 ITS6 引子增幅 ITS1 片段；在 mtDNA 研究上，以引子 C1-J-1632 及 C1-N-2191 增幅 mtDNA 上的細胞色素氧化携次單位 I (cytochrome oxidase subunit I, COI) 部份區域。同時將增幅出之各 DNA 片段，進行限制携片段長度多態型 (RFLP) 分析，結果顯示二段基因片段在三種麗蠅均不同，所以可供快速鑑定之用。同時將增幅出之 ITS1 片段定序，以更加了解此三物種之差異程度。

**Key words:** *Chrysomya*, blow fly, rapid identification, polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP).

**關鍵詞:** 麗蠅、快速鑑定、聚合携連鎖反應、限制携片段長度多態型

Full Text:  [PDF \(5.57 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

# 利用 PCR-RFLP 及定序分析技術快速鑑定三種屍體上常見麗蠅

陳俊憲 石正人\* 國立台灣大學昆蟲學系 台北市大安區羅斯福路 4 段 1 號

## 摘要

麗蠅 (blow fly) 是台灣常見的食屍及食糞性昆蟲，廣泛分佈在全島各地，是法醫昆蟲學 (forensic entomology) 中最常被用來判斷動物死亡後至屍體被發現期間 (postmortem interval, PMI) 的昆蟲。許多麗蠅的卵及幼蟲在型態上十分相似，所以不易從這二個時期之外部形態鑑別其種類。本試驗自豬的屍體上採集麗蠅中，以大頭金蠅 (*Chrysomya megacephala*)、紅顏金蠅 (*C. rufifacies*)、肥軀金蠅 (*C. pinguis*) 等三種最為常見。在萃取這些麗蠅之總 DNA 後，在體外增幅其 rDNA 上的內轉錄區間 (internal transcribed spacers, ITS) 區域，以 ITSF01 及 ITS6 引子增幅 ITS1 片段；在 mtDNA 研究上，以引子 C1-J-1632 及 C1-N-2191 增幅 mtDNA 上的細胞色素氧化酶次單位 I (cytochrome oxidase subunit I, COI) 部份區域。同時將增幅出之各 DNA 片段，進行限制酶片段長度多態型 (RFLP) 分析，結果顯示二段基因片段在三種麗蠅均不同，所以可供快速鑑定之用。同時將增幅出之 ITS1 片段定序，以更加了解此三物種之差異程度。

**關鍵詞：**麗蠅、快速鑑定、聚合酶連鎖反應、限制酶片段長度多態型

## 前言

屍體上出現的腐食性昆蟲種類眾多，其中以麗蠅最具代表性。麗蠅種類繁多，成蟲將卵產於動物屍體之口、鼻、肛門或傷口處，孵化的幼蟲以屍體為食 (Catts and Haskell, 1990)。因為幼蟲的遷徙能力不強，所以屍體上的蛆，極可能是由麗蠅成蟲在屍體上產卵孵化而來的。由屍體上麗蠅的齡期，配合該種麗

蠅的發育積溫，以判斷動物死亡後至屍體被發現的間期，在法醫昆蟲學上最常被應用。

台灣地處亞熱帶，終年氣溫偏高，適合昆蟲生長，麗蠅種類與數量均相當可觀，各種麗蠅之生長環境雖不盡相同，混棲的現象卻也常有，所以孳生環境不能作為分辨種類之依據。麗蠅的鑑識特徵需要特別仔細，或經解剖雄性生殖器 (Hu and Min, 2000)。目前分類專家多以穩定性較高的雄性生殖器構造作為依

\*論文聯繫人  
e-mail:shihcj@ccms.ntu.edu.tw

據，然而生殖器的特徵不僅細微，也常因麗蠅成蟲個體間的差異，造成鑑識上之困難 (Fan, 1997)。辦案人員並非具備昆蟲分類學之知識，短期培訓不易，造成法醫昆蟲學推動與應用上的困難。此外，屍體上採集到者多為麗蠅幼蟲，需要飼養至成蟲方能判斷其種類，這種處理方法耗時太長。若是發現的幼蟲數量不多或是只有殘肢，無法順利飼育至成蟲 (Byrd and Castner, 2000)。故建立簡單而準確的快速鑑定技術，就能適用於蠅類不同發育時期，在需少數樣品，又可在短時間完成鑑定，才能符合法醫昆蟲學的要求。

利用昆蟲之去氧核糖核酸，經過聚合酶連鎖反應在體外複製某特定片段，然後以電泳圖譜表現出來，或是作基因定序，可能找到一些特性。發展中的鑑定技術內，RFLP (Restriction Fragment length polymorphism) 是經常被利用的技術之一。RFLP 的原理是利用限制酶 (restriction enzyme, RE) 切割純化後的 DNA 分子，得到的片段，用膠體電泳可以顯現電泳圖譜之多態型 (Taylor and Szalanski, 1999.)。常用的基因有 rDNA 及 mtDNA (Malgorn and Coquoz, 1999)。rDNA 與 mtDNA 某些片段在同種昆蟲體內之保守性高，不同種類在特定區域的變異性大，加上昆蟲體內之數量多，所以已有許多的通用引子 (universal primer) 可供利用，這些特性均適合應用於快速鑑定 (Hillis and Dixon, 1991)。本研究之目的，即希望能藉由 PCR-RFLP，提供快速鑑定麗蠅的方法，以應用於法醫昆蟲學上。

## 材料與方法

### 一、麗蠅標本採集與保存

本試驗以掃網搜集豬屍上常見之麗蠅成

蟲，帶回後以豬肝供成蠅產卵，孵化後幼蟲以飼養大頭金蠅所用人工飼料餵食，建立單雌培養之純系，以取得試驗所需麗蠅各時期之蟲體。人工飼料成分如下：魚粉 144 g，酵母粉 36 g，洋菜粉 3.6 g，水 540 ml，混合加熱後倒入盤中冷卻，分切成塊備用 (Hung, 1995)。此外，在臺灣本島北、中、南、東部各地區，以豬腐肉引誘麗蠅，再用掃網方式採集成蟲，攜回試驗室進行鑑定分析。成蟲乾燥後保存於 -20°C，幼蟲與卵則浸泡於 70% 酒精中，保存於 -20°C。

### 二、麗蠅 DNA 萃取

本試驗使用 Viogene 公司的 DNA 純化試劑組 (Blood and Tissue Genomic DNA Miniprep System kit, Cat. No. GG1001) 及 Omega Biotek 公司的 DNA 純化試劑組 (E.Z.N.A.<sup>®</sup> Tissue DNA Kit I, Cat. No. D3495-01) 萃取麗蠅之 DNA。將單隻麗蠅標本置於 1.5 ml 離心管中，加入液態氮冷凍後將蟲體研磨，再加入 200  $\mu$ l lysis buffer 將蟲體充分研磨，然後加入 20  $\mu$ l Proteinase K (20 mg/ml)，混合均勻置於 60°C 水浴中 2 ~ 3 小時，隨後增溫至 70°C 加熱 20 分鐘，使 Proteinase K 失去其功能。隨後加入 200  $\mu$ l EX buffer 於 70°C 處理 10 分鐘，再加入 210  $\mu$ l 100% 酒精，混合均勻後將樣品轉移到 spin column，以 6,000 xg 離心 2 分鐘。以 wash buffer 500  $\mu$ l 清洗 spin column 並以 6,000 xg 離心 2 分鐘，重覆清洗步驟兩次，用 70°C 預熱的 elute buffer 或 dd H<sub>2</sub>O 將 DNA 從 spin column 中溶出來，以 6,000 xg (KUBOTA 6800, RA-155R rotor) 離心 2 分鐘，此液即含有麗蠅的 genomic DNA (約 2 ng/ $\mu$ l)，保存於 -20°C 備用。

### 三、利用 PCR 技術大量增幅目標 DNA

本試驗以 Perkin-Elmer 公司的 GeneAmp® PCR System 2400 溫度控制器進行 PCR，增幅目標 DNA。取 PCR 專用 0.2 ml 微量離心管，加入 0.5 µl 的麗蠅 DNA 萃取液（約含有 20 ng DNA），0.6 unit 之 DNA polymerase，10 x reaction buffer（含 0.2 mM Mg<sup>2+</sup>）2.5 µl，2.5 mM dNTPs 混合液 2.5 µl（終濃度為 0.25 mM）及 1.5 µM forward primer 2.5 µl（終濃度為 0.2 µM）和 1.5 µM reverse primer 2.5 µl（終濃度為 0.2 µM），最後加入去離子無菌水使總體積為 25 µl，將溶液混合均勻後，進行 PCR 反應。依所複製 DNA 之種類，分為如下二種方法：

1. rDNA 之 ITS1 區域：增幅 ITS1 區域的兩組引子有 ITS-F01 / (ITS2, ITS6)；其中 ITS-F01 來自於為螞蟻設計之引子 (Baur *et al.*, 1996)，ITS2 來自於真菌 (White *et al.*, 1990)；ITS6 則引自私人通訊 (Armstrong, personal communication)。PCR 反應條件為 96°C/3 分鐘，然後進行 40 個循環之 96°C/45 秒，55°C/1 分鐘，72°C/1 分鐘，最後經 72°C/7 分鐘完成反應，儲存於 4°C 冰箱中備用。

2. mtDNA 之 COI 區域：增幅部分 COI 區域的引子對為 C1-J-1632/C1-N-2191 (Simon *et al.*, 1994)；PCR 反應的條件為 92°C/3 分鐘，然後進行 40 個循環之 92°C/1 分鐘，42°C/1 分鐘，72°C/1 分鐘，最後經 72°C/7 分鐘後，儲存於 4°C 冰箱中備用。

### 四、RFLP 分析

取 5 µl PCR 增幅的產物（約 0.5 ~ 1.0 µg 之 DNA），加入 1 ~ 2 unit 的限制酶和 1

x buffer，最後加入去離子無菌水使總體積為 20 µl，在適當溫度水浴中限制酶切割 2 小時。酶切後的產物以 2% agarose gel 在 1x TAE 緩衝液進行電泳，於紫外燈下觀察並拍照，比較麗蠅之限制酶切割片段圖譜。DNA 片段大小的測定，採用 AAB 公司 (Advanced American Biotechnology) 的影像分析軟體，推算每個 DNA 片段長度。

### 五、DNA 定序及序列分析

將 PCR 的增幅產物以 2% 的 agarose gel 進行電泳分析，然後利用 Gel Extraction Kit (購自 Viogene 公司, Cat. No. EG1001) 進行純畫出預期之 DNA 片段，以刀片切下膠片上目標 DNA，放入 1.5 ml 離心管中，加入 0.5 ml 之 GEX Buffer，置於 60°C 放置 10 分鐘令膠體溶解，將溶解後的液體轉移到 spin column 中以 10,000 xg (KUBOTA 6800, RA-155R rotor) 離心 30 秒後，加入 0.5 ml 的 wash buffer I 以 10,000 xg (KUBOTA 6800, RA-155R rotor) 離心 30 秒後，再加入 0.5 ml 的 wash buffer II 以 10,000 xg (KUBOTA 6800, RA-155R rotor) 離心 30 秒，最後加入 30 µl ddH<sub>2</sub>O，置放 1 分鐘後，以 10,000 xg (KUBOTA 6800, RA-155R rotor) 離心 1 分鐘將 DNA 自 spin column 中溶解出來供定序之用。定序部份委由明欣生物科技公司進行。所得的 DNA 序列以 GeneDoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>) 以及 Clustal X 等軟體進行排序列比對，並連結國家衛生研究院 (National Health Research Institutes) 的 GCG 網站進行 DNA 序列的分析比對 (網址為: <http://gcg.nhri.org.tw/>)。

## 結 果

### 一、麗蠅標本採集

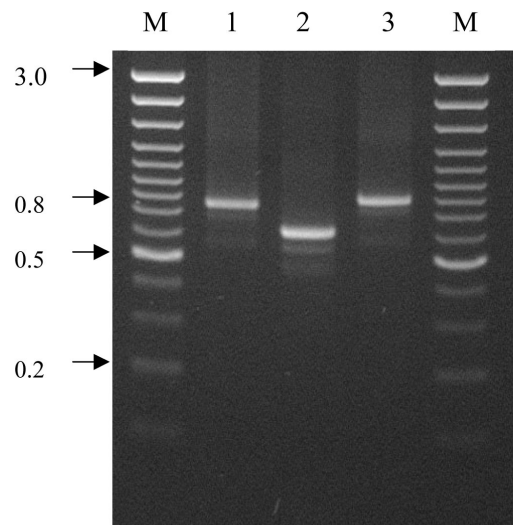
本研究由豬屍上採集麗蠅成蟲與試驗室飼養幼蟲之結果，發現下列三種最優勢之種類，大頭金蠅 (*Chrysomya megacephala*)、紅顏金蠅 (*C. rufifacies*) 與肥驅金蠅 (*C. pinguis*)。此三種麗蠅之卵、幼蟲、蛹與雌成蟲型態上差異很小。此外，在全省北、中、南、東部地區以腐肉誘集麗蠅之結果，亦以此三種麗蠅數量為最多，且有混棲的現象。試驗中曾將採回之麗蠅成蟲標本浸泡於 95% 酒精中保存，亦可直接冰存於 -80°C 冰箱中，萃取 DNA 時，發現以活體或冰存之標本較好。

### 二、目標 DNA 的增幅

經外部形態鑑定後，由以上麗蠅萃取之 DNA，以進行 ITS1 區域的增幅，所得到的 PCR 產物經電泳分析，發現大頭金蠅 (*Chrysomya megacephala*) 之 ITS1 region 長度約為 750 bp，紅顏金蠅 (*C. rufifacies*) 為 600 bp，肥驅金蠅 (*C. pinguis*) 為 800 bp (圖一)。因此，此三種麗蠅之 ITS1 長度不同。

在 mtDNA 方面，參考 Simon 等人依果蠅 mtDNA 定序所合成之通用引子 (Simon *et al.*, 1994)，正向引子為 C1-J-1632，反向引子為 C1-N-2191，以 PCR 增

幅三種麗蠅之 COI 部份區域，進行膠體電泳分析後，發現增幅出之 COI 部份區域長度均約為 600 bp (圖二)。



圖一 三種麗蠅進行 rDNA 之 ITS1 區域以 PCR 增幅的結果。

Fig. 1. Amplification of the ITS1 regions in rDNA, for three blow fly species. M: 100-bp DNA ladder; lane 1, *Chrysomya megacephala*; lane 2, *C. rufifacies*; lane 3, *C. pinguis*.

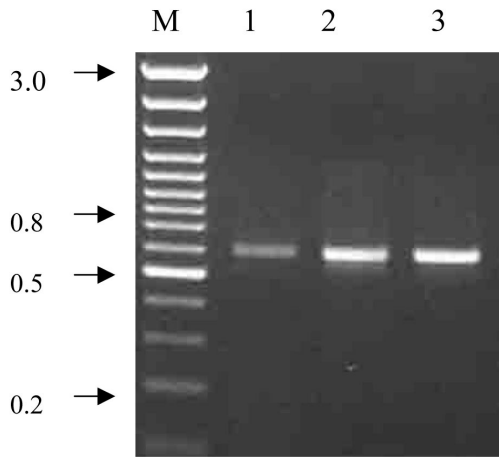
### 三、PCR 增幅產物—ITS1 與 COI 的 RFLP 分析

將 PCR 增幅出的 ITS1 與 COI 部份區域，進行核酸內切酶切割的 RFLP 分析。進

表一 PCR-RFLP 試驗中所使用的引子及其核酸序列。

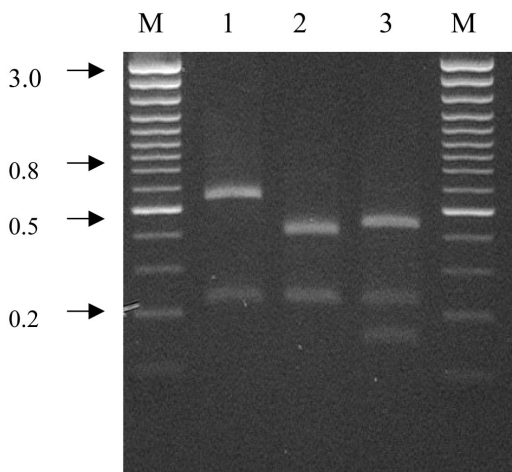
Table 1. Base-pair sequence of PCR-RFLP primers used

Location	Primer name	Primer sequence (5'→3')
18S rDNA	ITSF01	GAA CCT GCG GAA GGA TC
5.8S rDNA	ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC
	ITS6	GAG CCG AGT GAT CCA CCG CT
mtDNA	C1-J-1632	TGA TCA AAT TTA TAA
	C1-N-2191	GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC



圖二 三種麗蠅進行 mtDNA 之 COI 區域以 PCR 增幅的結果。

Fig. 2. Amplification of the COI regions in mtDNA, for three blow fly species. M: 100-bp DNA ladder; lane 1, *Chrysomya megacephala*; lane 2, *C. rufifacies*; lane 3, *C. pinguis*.

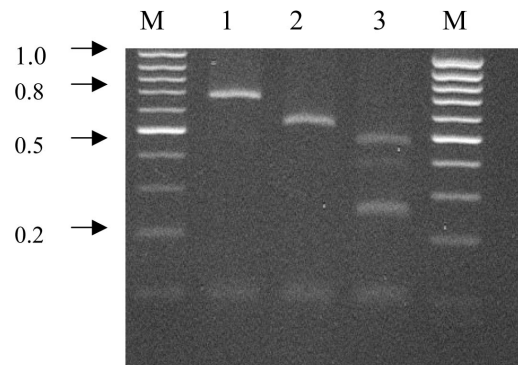


圖三 以核酸內切酶 *AluI* 切割 rDNA 之 ITS1 之 RFLP 圖譜。

Fig. 3. RFLP analysis of ITS1 in the rDNA region with *AluI*. M: 100-bp DNA ladder; lane 1, *Chrysomya megacephala*; lane 2, *C. rufifacies*; lane 3, *C. pinguis*.

行十餘種核酸內切酶的酶切試驗後，以 *AluI*、*HaeIII* 切割三種麗蠅之 ITS1 片段，

明顯具有不同的核酸切割位，結果如圖三、四。以 *TaqI*、*AluI* 切割 COI 部份區域，亦具有不同的核酸切割位，分別如圖五、六。由內切酶切後的核酸片段，供鑑別這三種麗蠅。其次自三種麗蠅中，選取不同採集地點之標本，以及不同生長時期之標本，進行 PCR-RFLP 之種內分析，其結果如圖七，發現其同種不同個體間穩定性極高，以 ITS1 區域分析而言，不管是不同的生長時期（卵、幼蟲、蛹、成蟲），抑或不同的採集地點，均可得到相同結果。以 COI 區域而言，亦與 ITS1 所得結果相同（圖八）。因此，利用此一方法，可以快速鑑別此三種不同麗蠅。

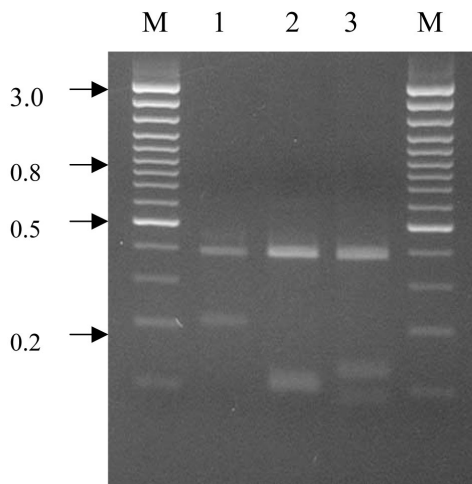


圖四 以核酸內切酶 *HaeIII* 切割 rDNA 之 ITS1 之 RFLP 圖譜。

Fig. 4. RFLP analysis of ITS1 in the rDNA region with *HaeIII*. M: 100-bp DNA ladder; lane 1, *Chrysomya megacephala*; lane 2, *C. rufifacies*; lane 3, *C. pinguis*.

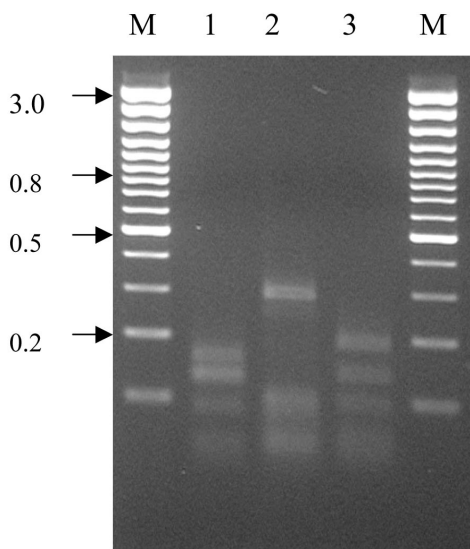
#### 四、ITS1 序列分析

PCR 擴增所得三種麗蠅之 ITS1 片段經定序後，發現此三種麗蠅之鹼基 A 及 T 所佔比例相當高（圖九）。大頭金蠅之 ITS1 片段序列長度為 771 bp，A+T % 為 75.1%；紅顏金蠅之 ITS1 片段序列為 640 bp，A+T % 為 78.7%；肥軀金蠅之 ITS1 片段序列為



圖五 以核酸內切酶 *TaqI* 切割 mtDNA 之 COI 之 RFLP 圖譜。

Fig. 5. RFLP analysis of the COI in the mtDNA region with *TaqI*. M: 100-bp DNA ladder; lane 1, *Chrysomya megacephala*; lane 2, *C. rufifacies*; lane 3, *C. pinguis*.



圖六 以核酸內切酶 *AluI* 切割 mtDNA 之 COI 之 RFLP 圖譜。

Fig. 6. RFLP analysis of the COI in the mtDNA region with *AluI*. M: 100-bp DNA ladder; lane 1, *Chrysomya megacephala*; lane 2, *C. rufifacies*; lane 3, *C. pinguis*.

808 bp, A+T % 為 75.5%。自 NCBI 網站之基因庫 (Genebank) 搜尋有關雙翅目昆蟲之 rDNA 序列, 與此三種麗蠅之 ITS 序列進行排序比對, 結果可找出 18S rDNA 與 5.8S rDNA 等保守性高之區域, 即可推知 ITS1 之實際長度, 其結果如表二。整個增幅區域序列的相似度以大頭金蠅和肥軀金蠅最高為 88%, 大頭金蠅和紅顏金蠅之相似度為 83%, 紅顏金蠅和肥軀金蠅為 82%。

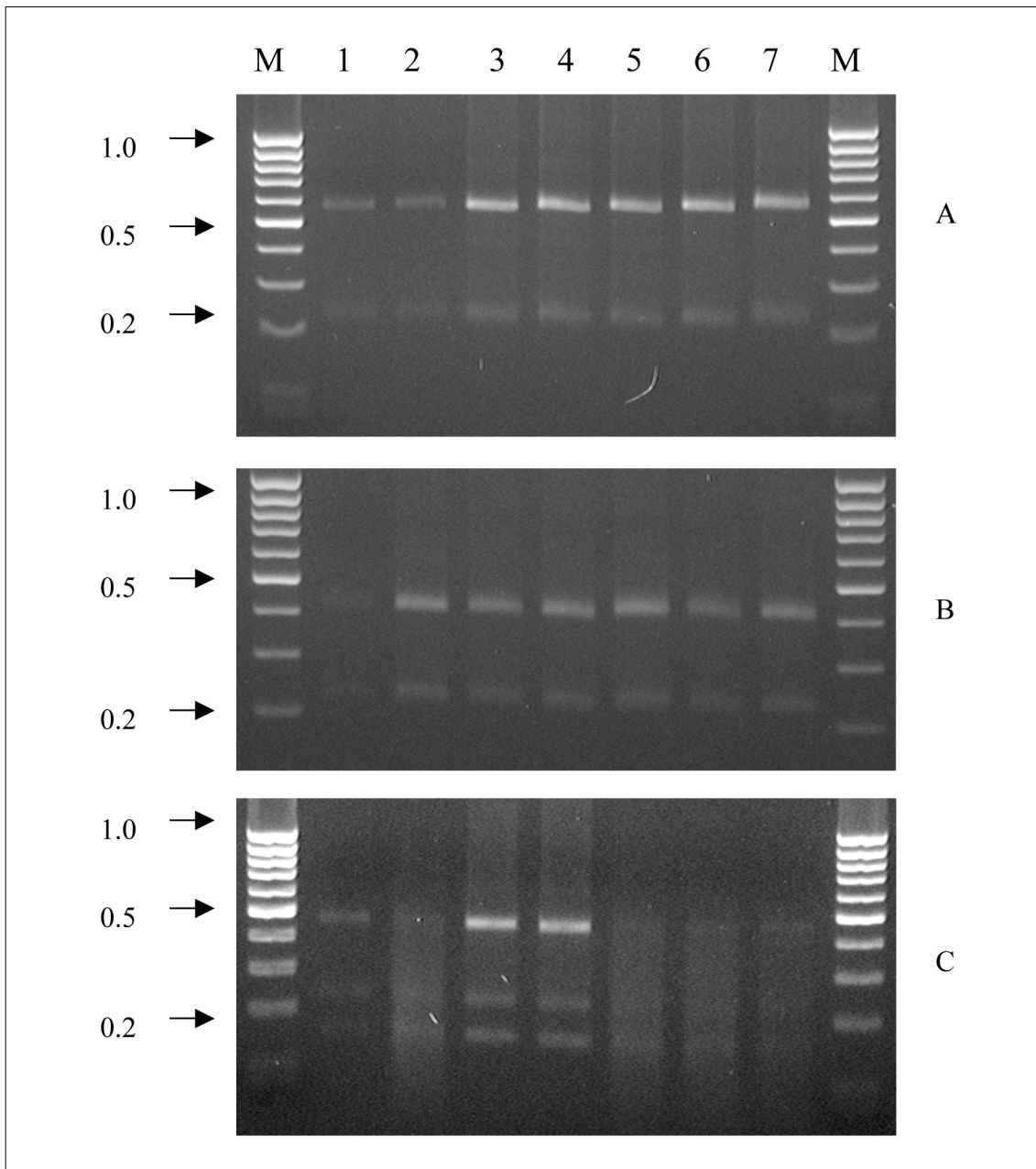
表二 三種不同麗蠅 ITS1 區域定序結果之分析。  
Table 2. ITS1 region analysis of three different blow flies

	<i>C. meg</i>	<i>C. ruf</i>	<i>C. pin</i>
18S	1-63 bp	1-60 bp	1-61 bp
ITS1	64-745 bp	61-614 bp	62-783 bp
5.8S	746-771 bp	615-640 bp	784-808 bp
ITS1 length	682 bp	554 bp	722 bp

此外, 利用 GCG 所提供之服務進行限制酶切割分析, 證實在此三種麗蠅之 ITS1 片段上, *AluI* 與 *HaeIII* 之切割位置與切割位數目有所不同, 推算出之切割片段長度, 與限制酶切割結果相符。

## 討 論

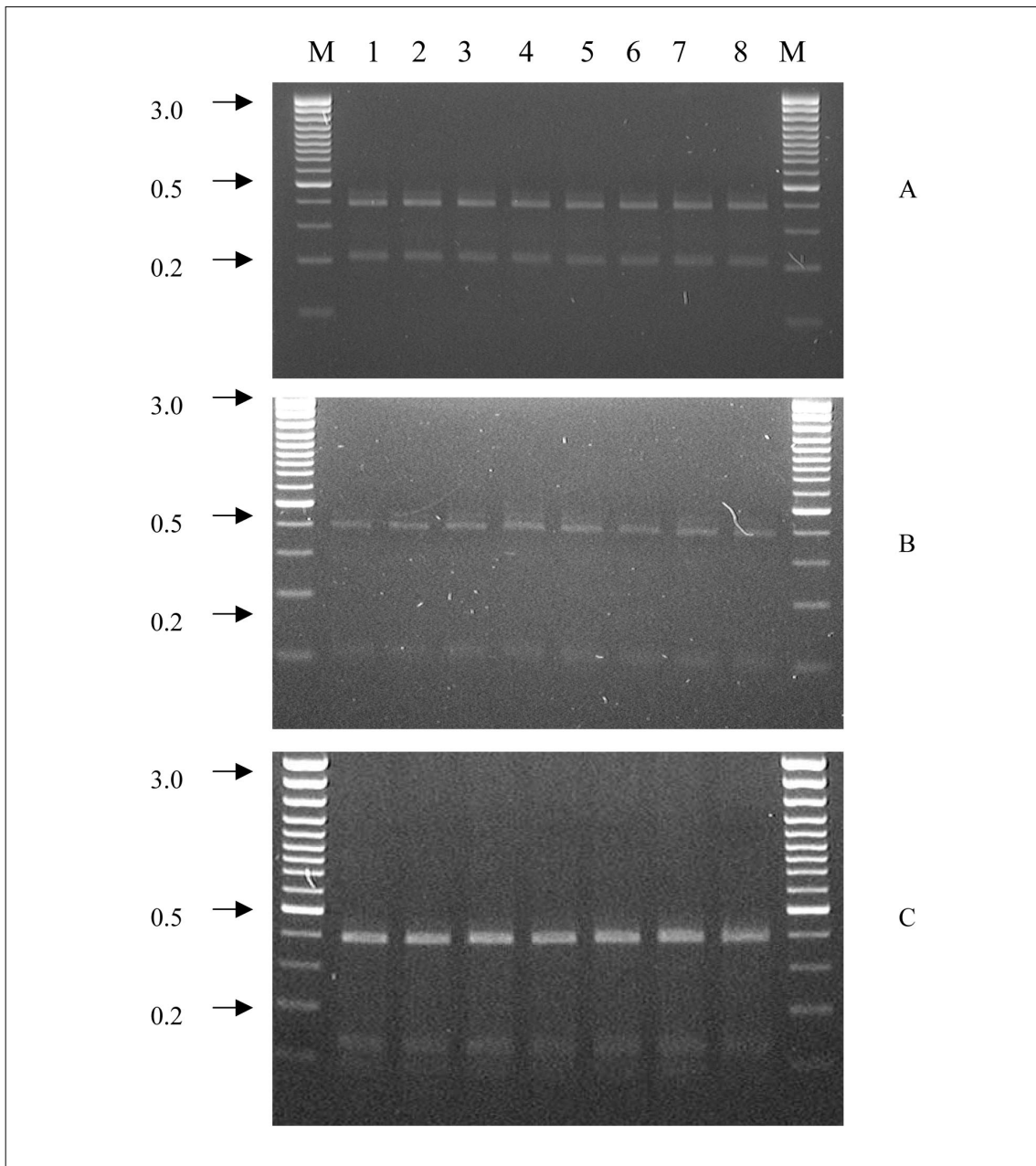
雙翅目麗蠅科的昆蟲, 在法醫昆蟲學上常被利用於死亡時間的推斷。麗蠅除了腐食性的種類外, 亦有寄生於活體生物, 例如蚯蚓、蝸牛、蟾蜍、牛、羊、甚至人類體內者, 形成蠅蛆症 (myiasis)。大量發生時, 對畜牧業造成嚴重損害 (Fan, 1997), 如非洲 (Azeredo-Espin and Maderira, 1996)、巴西 (Glesson and Sarre, 1997)、紐西蘭 (Narang and



圖七 不同生長時期、不同採集地之三種麗蠅之 rDNA ITS1/PCR 產物，以核酸內切酶 *AluI* 切割之 RFLP 圖譜。A. 大頭金蠅 (*Chrysomya megacephala*)、B. 紅顏金蠅 (*C. rufifacies*)、C. 肥軀金蠅 (*C. pinguis*)。

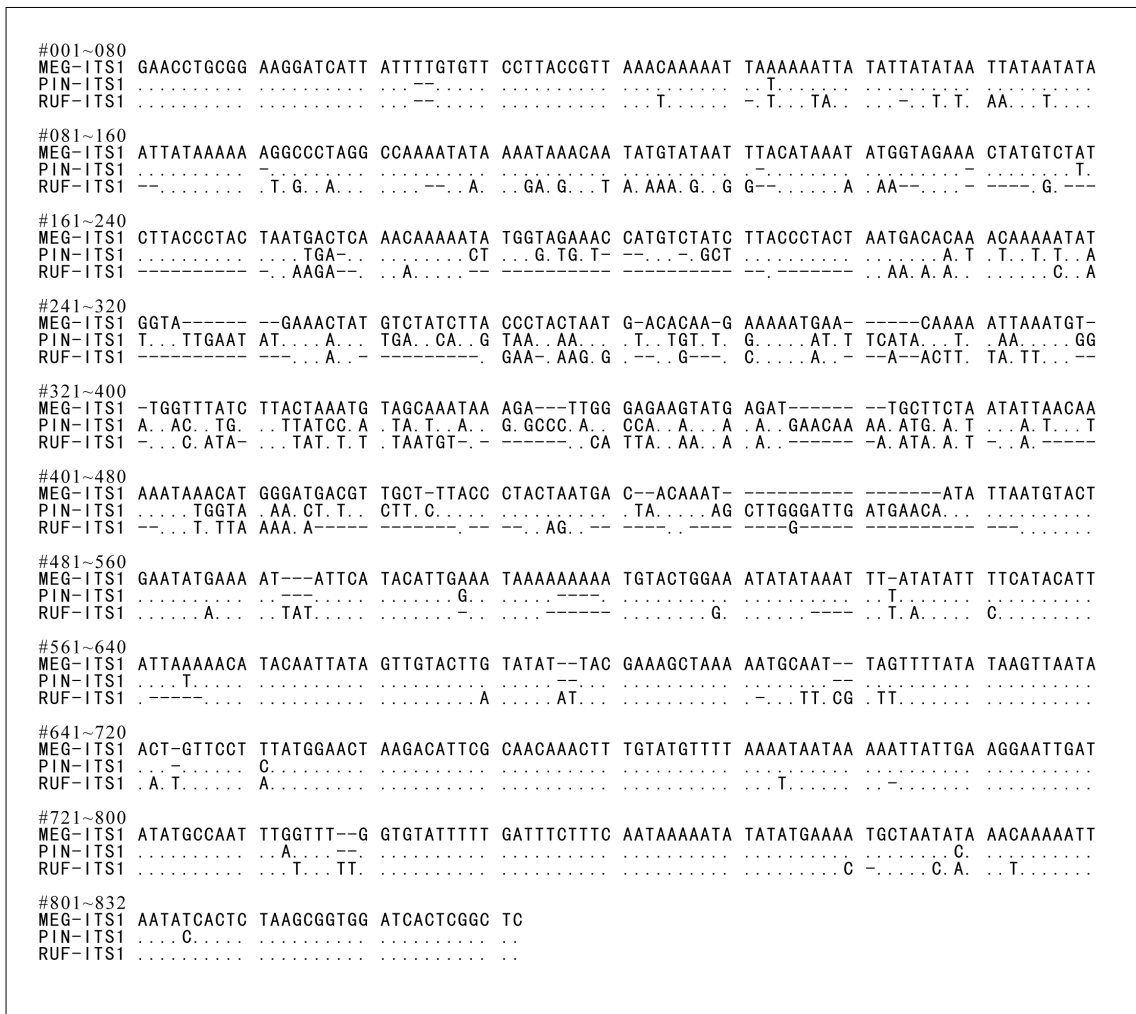
Fig. 7. RFLP analysis of ITS1 in rDNA/PCR with the endonuclease *AluI* for blow fly species. Template DNA for PCR was obtained from various periods and different collection sites. M: 100-bp DNA ladder; lanes 1~4, eggs, larvae, pupae, and adults collected from Wenshan district, Taipei City; lane 5, Adult collected from Taichung City; lane 6, adult collected from Chiayi City; lane 7, adult collected from Kaohsiung City; lane 8, adult collected from Taitung City. A. *Chrysomya megacephala*, B. *C. rufifacies*, C. *C. pinguis*.





圖八 不同生長時期、不同採集地之三種麗蠅之 COI/PCR 產物，以核酸內切酶 *TaqI* 切割之 RFLP 圖譜。A. 大頭金蠅 (*Chrysomya megacephala*)、B. 紅顏金蠅 (*C. rufifacies*)、C. 肥軀金蠅 (*C. pinguis*)。

Fig. 8. RFLP analysis of COI/PCR using the endonuclease *TaqI* for blow fly species. Template DNA for PCR was obtained from various periods and different collection sites. M: 100-bp DNA ladder; lanes 1~4, eggs, larvae, pupae, and adults collected from Wenshan district, Taipei City; lane 5, Adult collected from Taichung City; lane 6, adult collected from Chiayi City; lane 7, adult collected from Kaohsiung City; lane 8, adult collected from Taitung City. A. *Chrysomya megacephala*, B. *C. rufifacies*, C. *C. pinguis*.



圖九 三種麗蠅 ITS 片段序列比較。MEG-ITS1：大頭金蠅 (*Chrysomya megacephala*)；PIN-ITS1：肥軀金蠅 (*C. pinguis*)；RUF-ITS1：紅顏金蠅 (*C. ruffacies*)。

Fig. 9. ITS1 sequences of three blow fly species. MEG-ITS1: *Chrysomya megacephala*, PIN-ITS1: *C. pinguis*, RUF-ITS1: *C. ruffacies*.

Degrugillier, 1995)，所以與蠅蛆症相關的麗蠅曾被廣泛研究。惟麗蠅分類一般是以成蟲特徵為依據，在卵或幼蟲期等未成熟階段，由於缺乏明顯的形態特徵差異，造成鑑定工作困難。

核糖體 DNA 內之各區域因為功能上的差異，以不同形式與速率進行演化，其中 ITS 片段的變異較快，已經應用於鑑定及親緣關係

分析的研究，例如赤眼卵寄生蜂 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Sappal *et al.*, 1995)；寄生性天敵金小蜂 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Taylar and Szalanski, 1999)；及歐洲地區 13 種常見斑蚊 (West *et al.*, 1997) 等。18S, 5.8S, 28S rDNA 等具有轉錄功能的部位，因屬高保守性，在物種間變異較小，並不適於近緣種類分

類之用。以 rDNA 中的 ITS1 region，進行 RFLP 分析，產生的核酸切割片段長度於三種麗蠅明顯不同，序列分析也得到相同結果。同一種類不同成長期與不同地區之族群，則具有相當高的穩定性。因此，可用於三種麗蠅的鑑定之用。

mtDNA 之數量多、演化速率高、保守性強及母系遺傳等優勢，常被應用於種類鑑定及親緣關係分析，且各區段之演化速率不一，可依據試驗目的，選擇適合的區域進行試驗。在昆蟲方面亦有相當多研究，例如應用於采采蠅 (*Glossina morsitans morsitans*) 之遺傳結構與地理分佈之關係 (Wohlford *et al.*, 1999)；歐洲常見麗蠅的分類 (Vincent *et al.*, 2000)；次生錐蠅 (*Cochliomyia macellaria*) (Roehrdanz and Johnsin, 1996) 等。本試驗以粒線體 DNA 上之 COI 區域進行 mtDNA/PCR/RFLP 分析，亦可鑑別此三種常見麗蠅，且在同種類但不同生長期與不同地區之族群則具有相當高的穩定性。

利用此二種分子之鑑定方法，由於證據相當明確，人員只要接受過簡單訓練後即能從事工作，鑑定流程可在一天之內完成，可謂是一準確、快速、簡便的鑑定技術，值得未來進一步推廣應用。

## 引用文獻

- Azeredo-Espin, A. M. L., and N. G. Maderira. 1996. Primary myiasis in dog caused by *Phaenicia exima* (Diptera: Calliphoridae) and preliminary mitochondrial DNA analysis of the species in Brazil. *J. Med. Entomol.* 33: 839-843.
- Baur, A., M. Sanetra, N. Chalwatzis, A. Buschinger, and F. K. Zimmermann. 1996. Sequence comparisons of the internal transcribed spacer region of ribosomal genes support close relationships between parasitic ants and their respective host species (Hymenoptera: Formicidae). *Ins. Soc.* 43: 53-67.
- Byrd, J. H., and J. L. Castner. 2000. *Forensic Entomology*. CRC Press, Washington D.C. 418 pp.
- Catts, E. P., and N. H. Haskell. 1990. *Entomology and Death: A Procedural Guide*. Joyce's Print Shop, City, SC. 182 pp.
- Fan, Z. D. 1997. *Fauna sinica, Insecta Vol. 6, Diptera: Calliphoridae*. Beijing, Science Press. 707 pp. (in Chinese).
- Glesson, D. M., and S. Sarre. 1997. Mitochondrial DNA variability and geographic origin of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), in New Zealand. *Bull. Entomol. Res.* 87: 265-272.
- Hillis, D. M., and M. T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66: 411-453.
- Hu, C., and J. Min. 2000. *Forensic Entomology*. Chungqing, China, Chungqing Publishing House. 366 pp. (in Chinese).
- Hung, T. C. 1995. The life table and mass rearing of *Chrysomya megacephala* (Fabricius). Master's thesis. Graduate Institute of Plant Pathology and

- Entomology, National Taiwan University. 77 pp. (in Chinese).
- Malgorn, Y., and R. Coquoz.** 1999. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae. An interest in forensic entomology. *Forens. Sci. Int.* 102: 111-119.
- Narang, S. K., and M. E. Degrugillier.** 1995. Genetic fingerprinting of the screwworm (Diptera: Calliphoridae) infestation in North Africa by mitochondrial DNA markers. *Fla. Entomol.* 78: 294-304.
- Roehrdanz, R. L., and D. A. Johns.** 1996. Mitochondrial DNA restriction site map of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 33: 863-865.
- Sappal, N. P., R. S. Jeng, M. Hubbes, and F. Liu.** 1995. Restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction amplified ribosomal DNAs of three *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species. *Genome* 38: 419-425.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook.** 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651-701.
- Taylor, D. B., and A. L. Szalanski.** 1999. Identification of *Muscidifurax* spp. by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Biol. Control* 15: 270-273.
- Vincent, S., J. M. Vian, and M. P. Carlotti.** 2000. Partial sequencing of the cytochrome oxidase b subunit gene 1: a tool for the identification of European species of blow flies for postmortem interval estimation. *J. Forens. Sci.* 45: 820-823.
- West, D. F., T. Payette, T. Mundy, and W. C. Black.** 1997. Regional molecular genetic key of thirteen snow pool *Aedes* species (Diptera: Culicidae) in northern Colorado. *J. Med. Entomol.* 34: 404-410.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In:* M. A. Innis, D. H. Gelgand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego, CA..
- Wohlford, D. L., E. S. Krafur, N. T. Griffiths, J. G. Marquez, and M. D. Baker.** 1999. Genetic differentiation of some *Glossina morsitans morsitans* populations. *Med. Vet. Entomol.* 13: 377-385.

收件日期：2002年12月5日

接受日期：2003年2月26日

# Rapid Identification of Three Species of Blow Flies (Diptera: Calliphoridae) by PCR-RFLP and DNA Sequencing Analysis

Chun-Hsien Chen and Cheng-Jen Shih\* Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C

## ABSTRACT

Blow flies are common insects in Taiwan. They provide an objective estimate of the postmortem interval (PMI) in forensic entomology. However, it is difficult to identify blow fly species, especially at immature stages, such as eggs, larvae, and pupae, because of their morphological similarity. Identification of insect species occurring on carrion has therefore become a problem for forensic entomologists. In this study, blow flies were collected from corpses of pigs. Three species of blow fly were commonly found: *Chrysomya megacephala*, *C. rufifacies*, and *C. pinguis*. Total DNA was also isolated and used as template for PCR. ITS1 in ribosomal DNA (rDNA) and CO1 in mitochondrial DNA (mtDNA) were amplified to distinguish blow fly species. The primers of ITSF01 and ITS6 were used to amplify rDNA ITS1 region, C1-J-1632 and C1-N-2191 were used to amplify mitochondrial DNA (partial gene of subunit I of cytochrome oxidase). The amplified products were also digested with nine restriction enzymes. Results of PCR-RFLP analysis revealed that ITS1 and the partial COI region can be used to identify these three species. We also sequenced the ITS1 region for more understanding of the difference between these three species.

**Key words:** *Chrysomya*, blow fly, rapid identification, polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP).