

五种常见嗜尸性蝇类的分子鉴定

王江峰¹, 尹晓宏^{1,2}, 陈玉川^{1,*}

(1. 广东警官学院刑事技术系, 广州 510230; 2. 中山大学基础医学院法医系, 广州 510080)

摘要:为了解决法医学人员对于嗜尸性蝇类的鉴定难题,对中山市、广州市及西安市 5 种常见嗜尸性蝇类共 17 个样本,对其线粒体 CO I 基因的 348 bp 大小片段进行了 RFLP 和 DNA 序列分析,采用 ABI377 测序仪测序, DNASTAR 软件预测限制性位点, *Dde* I, *Dra* I 和 *Hinf* I 3 种限制性内切酶消化,非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测酶切结果, MEGA3.0 软件包进行序列分析和构建系统发育树。结果表明:采用 mtDNA 扩增结合银染技术和 DNA 序列分析,均可以方便快捷地进行上述三地 5 种常见嗜尸性蝇类的种类鉴定。本文结果为法医昆虫学中嗜尸性昆虫 DNA 鉴定数据库的建立提供了数据资料。

关键词:嗜尸性蝇类;分子鉴定;线粒体 CO I 基因;RFLP;法医昆虫学

中图分类号:Q969 文献标识码:A 文章编号:0454-6296(2007)04-0423-06

Molecular identification of five common species of necrophagous flies in China

WANG Jiang-Feng¹, YIN Xiao-Hong^{1,2}, CHEN Yu-Chuan^{1,*} (1. Department of Forensic Science and Technology, Guangdong Police College, Guangzhou 510230, China; 2. Department of Medical Jurisprudence, Sun-Yatsen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: In order to solve the difficulty of the identification of necrophagous flies faced by forensic pathologists and technicians, the feasibility of species identification based on a 348 bp region of the mitochondrial CO I (cytochrome oxidase subunit I) gene using RFLP and analysis of DNA was evaluated. Samples were collected in Zhongshan, Guangzhou and Xi'an. The 348 bp region of the CO I gene was amplified and sequenced using forward and reverse primers. Cleavage sites for several restriction endonucleases were searched using the DNASTAR. PCR products were digested with restriction endonuclease *Dde* I, *Dra* I and *Hinf* I, and then separated on native polyacrylamide gels. Evolutionary tree and evolutionary divergence analysis were performed using MEGA 3.0. The analysis indicated that the methods could be used to identify common necrophagous flies. The results provided basis for further research, especially for the setup of mtDNA database of insects of forensic importance.

Key words: Necrophagous flies; molecular identification; mitochondrial CO I gene; RFLP; forensic entomology

法医昆虫学中对嗜尸性蝇类的准确鉴定十分重要,但是,幼期阶段的蝇类昆虫的鉴定目前仍是一个难题,特别对于非昆虫专业人员。对于卵、低龄幼虫或者昆虫的部分肢体的遗传种类分析,线粒体 DNA (mtDNA) 是一个很好的指标,其有很大的拷贝数,并且种类间有高的突变率,种间序列变异迅速。有关

嗜尸性蝇类的分子鉴定,加拿大 Sperling 等(1994)通过试验表明通过 PCR 技术结合 RFLP 技术可以实现对伏蝇、丝光绿蝇和亮绿蝇的鉴定。Benecke (1998) 的研究则表明可以用 RAPD PCR 技术实现对嗜尸性蝇类的鉴定,并成功用该方法确定一起案件中尸袋外和尸袋内发现的幼虫是同一种。2000 年法国的

基金项目:国家自然科学基金(30100216);广东省自然科学基金(001386, 036628, 06011661);公安部应用创新计划资助项目

作者简介:王江峰,1970 年 11 月生,陕西富平人,博士,副教授,广东省高等学校“千百十”工程省级培养对象,主要从事死亡时间和法医昆虫学研究, E-mail: wjf701125@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: CYC2800@163.net

收稿日期 Received: 2006-06-12; 接受日期 Accepted: 2007-02-24

Vincent 等用 mtDNA 的 CO1 基因片断序列分析对 6 个欧洲种类和一个圭亚那种类开展了鉴定研究,结果表明该方法可以成功的应用于幼虫、蛹和蛹壳的种属鉴定。其后,英国(Stevens and Wall, 2001)、美国(Wells and Sperling, 2001)、澳大利亚(Wallman, 2001)、日本(Kiyoshi *et al.*, 2005)等国学者分别对本地区的嗜尸性丽蝇及麻蝇开展了研究。

尽管嗜尸性蝇类种类繁多,但真正在死亡时间推断方面起重要作用的只有为数不多的几种,对其鉴定各个国家和地区应该和人类 DNA 数据库的做法一样,建立相关数据库,以实现嗜尸性蝇类的迅速快捷鉴定。对于我国的嗜尸性蝇类,我国台湾的陈蔚云等(2004)对台湾地区 8 个丽蝇科种类,蔡继峰等(2005a, 2005b, 2005c, 2005d)对成都等地区 6 个种类、呼和浩特 5 个种类,王新杰(2006)对山东潍坊地区 6 个种类 mtDNA 的 CO 基因片段开展了研究,其余地区尚未见有类似研究报道。

鉴于以上原因,我们开展了本研究,分别采用限制性酶切技术和 DNA 序列分析技术对我国广东省及西安地区常见的丽蝇科大头金蝇 *Chrysomya megacephala* (F.)、丝光绿蝇 *Lucilia sericata* (Meigen)、绯颜裸金蝇 *Achoetandrus rufifacies* (Macquart) 和巨尾阿丽蝇 *Aldrichina grahami* (Aldrich) 及蝇科的厚环黑蝇 *Ophyra spinigera* Stein 共 5 种嗜尸性蝇类进行了分子鉴定研究。

1 材料与方法

1.1 虫源

样本分别采自中山市、西安市和广州市(表 1);其中中山市和西安的材料是用猪或兔尸体置于野外诱集的成蝇,广州市的标本系用猪肝引诱成蝇,产卵后实验室内饲养得到的。材料鉴定得到了中山大学生命科学学院的协助。

表 1 样本种类、采集信息和 CO I 基因序列 GenBank 登录号

Table 1 Specimen, collecting data and GenBank accession number of CO I sequence

样本 Sample	采集地点 Collecting location	采集日期 Collecting date	GenBank 登录号 GenBank accession no.
大头金蝇 <i>Chrysomya megacephala</i> (F.)	中山市 Zhongshan	2003-2004	DQ328668-9
大头金蝇 <i>Chrysomya megacephala</i> (F.)	西安市 Xi'an	2005.5-10	DQ328670
绯颜裸金蝇 <i>Achoetandrus rufifacies</i> (Macquart)	中山市 Zhongshan	2004.4-10	DQ295070
			DQ328665-6
丝光绿蝇 <i>Lucilia sericata</i> (Meigen)	广州市 Guangzhou (Meigen)	2005.4-10	DQ328672-3
丝光绿蝇 <i>Lucilia sericata</i> (Meigen)	中山市 Zhongshan	2003-2004	DQ328671
丝光绿蝇 <i>Lucilia sericata</i> (Meigen)	西安市 Xi'an	2005.5-10	DQ328674
巨尾阿丽蝇 <i>Aldrichina grahami</i> (Aldrich)	西安市 Xi'an	2005.5-10	DQ328667
厚环黑蝇 <i>Ophyra spinigera</i> Stein	中山市 Zhongshan	2003-2004	DQ328675-7

收集于中山市的样本置于室温干燥备用;西安和广州的样本均于 -70°C 冷冻 2 h, 然后 99% 的乙醇中 4°C 保存。为了避免蝇 DNA 被其食取的 DNA 以及消化道内寄生虫 DNA 污染,取蝇的胸部和足来提取 DNA。

1.2 DNA 提取

1.2.1 干样本:干样本 DNA 参照 Christine 和 David (2003) 使用的方法提取:STE 缓冲液(0.1 mmol/L NaCl, pH 8.0 10 mmol/L Tris buffer, pH 8.0 1 mmol/L EDTA, dsH_2O) 中室温浸泡 5 h, 取出后在消毒的滤纸上干燥, 然后放入 Ep 管中用干净玻棒研磨碎, 加入 500 μL TE 缓冲液(含 10% Chelex, pH 8.0) 和 10 μL 的 10 mg/L 蛋白酶 K(德国 MERCK), 用玻棒再次研磨使样本分布均匀, 53°C 水浴锅至少孵化 6 h, 通常过夜, 然后 93°C 加热 30 min 使蛋白酶 K 变性, 离

心, 上清液 4°C 保存。

1.2.2 新鲜样本和乙醇保存样本:新鲜样本处理采用 Malgom 和 Coquoz(1999) 描述的方法, 并稍作改动。剪取蝇胸部和足, 研磨碎, 加 500 μL lysis 缓冲液(100 mmol/L Tris, 50 mmol/L EDTA) 和 50 μL 10% SDS, 然后加入 10 μL 蛋白酶 K, 配方均来自 Sambrook 等(2001), 56°C 过夜, 孵化产物用氯仿:异戊醇:氯仿(24:1:25) 纯化, 最后的上清液加两倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.2), -20°C 放置 2 h, 使 DNA 充分沉淀, 然后 $13\ 000 \times g$ 离心 10 min, 弃上清, 室温干燥沉淀, 最后用 50 μL 超纯水溶解 DNA, 保存于 -20°C 。

1.3 扩增和测序

应用 Sperling 等(1994) 的引物 CO-I 2f(5'-CAGCTACTTTATGAGCTTTAGG-3') 和 CO-I 3r(5'-

CATTTC AAGYGTGTGTAAGCATC-3'), 扩增线粒体 CO I 基因 348 bp 大小的区域。25 μ L PCR 反应体系, 包括 2.5 μ L 10 \times PCR 反应缓冲液, 0.2 mmol/L dNTPs, 各 0.1 mmol/L 正向和反向引物, 0.5 U Taq 酶 (Fermentas) 和 10 ~ 100 ng DNA 模板。温度循环条件是 95 $^{\circ}$ C 加热 3 min, 然后 30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 1 min, 45 $^{\circ}$ C 1 min 和 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, Goldview 核酸染料 (EB 替代品) 染色。

所有的样本均用正反向引物测序, PCR 产物用 UltraCleanTM 15 试剂盒 (MOBIO) 纯化, 然后在 ABI 377 DNA 测序仪上双向测序。

1.4 限制性位点预测

测序所得序列用 DNASTAR 软件进行修剪和拼接, 得到每个种类完整的序列, 参考 Sperling 等 (1994) 采用的限制性内切酶, 用 DNASTAR 软件分析该序列上一些限制性酶切割的位点, 筛选可以鉴别上述 5 个种类的限制性内切酶。

1.5 限制性酶切

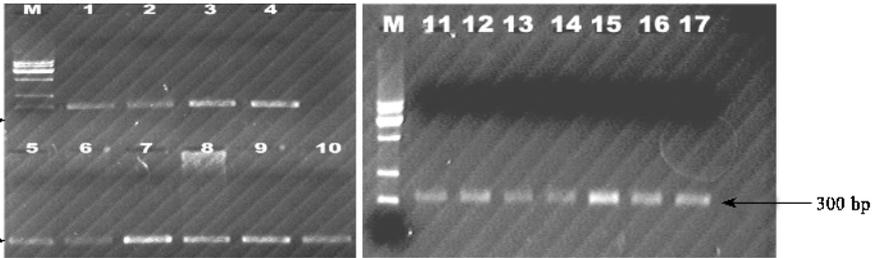


图 1 中山、广州及西安地区常见嗜尸性蝇类 17 个样本 348 bp CO I 基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 The results of electrophoresis of a 348 bp region of the gene for CO I encoding region of mtDNA of necrophagous flies from Zhongshan, Guangzhou and Xi'an districts

2.2 限制性酶切分析

分析所有样本 CO I 基因位点的 348 bp 大小的核酸序列 (图 2), 其中包括引物序列, 用 3 种限制性内切酶 *Dra* I, *Dde* I 和 *Hinf* I 消化切割片段 (图 2 和表 2)。

可以看出, 用 *Dde* I 可以将广东省的 4 种嗜尸性蝇类区分开, 用 *Hinf* I 可以将西安地区的 3 个种类区分开, 用 *Dde* I 结合 *Hinf* I 可以将所有的 5 个种类区分开。

2.3 CO I 序列分析

每个地区的各个种类选 1 ~ 3 个个体进行测序, 5 个种类所有个体的 DNA 序列比较见图 2。除了巨尾阿丽蝇和大头金蝇外, 其余 14 个个体的序列彼此都不相同, 巨尾阿丽蝇的两个样本的 CO I 序列完全相同, 而大头金蝇 (中山市) 2、3 号和大头金蝇 (西

安) 号样本 CO I 序列也完全相同。分歧率最高的是大头金蝇和厚环黑蝇, 为每 348 碱基 14%; 大头金蝇和丝光绿蝇的分歧率为 6.7%, 是两个不同的种类间变异率最低的 (表 3)。

1.6 分子进化树构建

应用昆虫分类学中分子进化树的方法, 探索建立根据序列差异鉴别种类的可行性。采用 MEGA 3.0 软件包 (Kumar *et al.*, 2004) 中 Kimura's two parameter 模式进行分子遗传距离分析和分子进化树的构建。

2 结果

2.1 CO I 扩增与测序

采用我们摸索出的改良干标本 DNA 提取方法, 所有样本均可被扩增 (图 1)。

所有样本均被测序, 序列数据已被 GenBank 数据库收录, 序列登录号见表 1。

安) 号样本 CO I 序列也完全相同。分歧率最高的是大头金蝇和厚环黑蝇, 为每 348 碱基 14%; 大头金蝇和丝光绿蝇的分歧率为 6.7%, 是两个不同的种类间变异率最低的 (表 3)。

用邻接法分析序列数据构建分子进化树 (图 3), 序列中的保守位点已经被移除, 剩下少数与原始序列有关的可变位点用来表示支持分类分歧的碱基替换数目。进化树在 DNA 序列数据的基础上形成了 5 个明显的同种簇, Bootstrap 评估为随机重新分配的样本数据的分组提供了一个可信度比率。本实验中 5 个种类的分组具有高的 Bootstrap 支持率, 在种的水平上, 5 个种类的样本均形成了 Bootstrap 100% 支持率的独立的分支, 但西安市的丝光绿蝇与广州市和中山市的丝光绿蝇之间有相当大的变异。

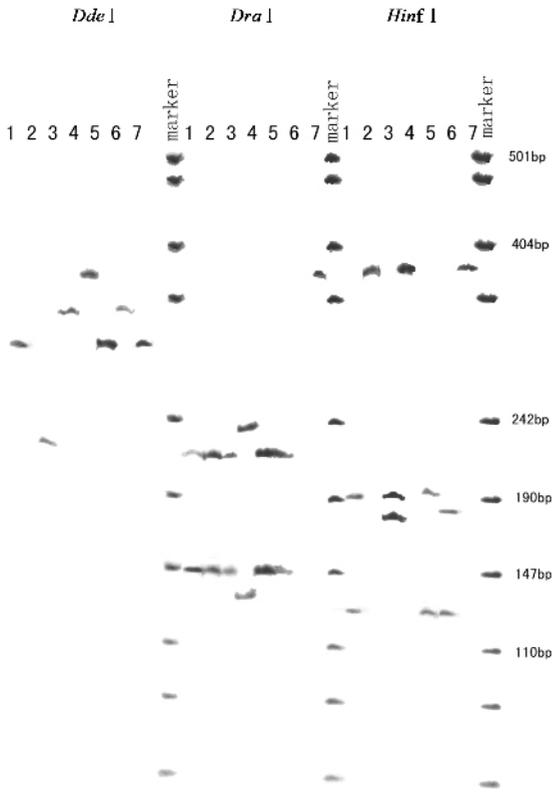


图 2 三种限制性内切酶消化 348 bp 大小片段的分型结果,用非变性 PAGE 结合银染技术检测结果 (Marker = pUC18 DNA/Msp I)

Fig. 2 PPA gel demonstrating the results of digestion of the 348 bp fragment with three different restriction enzymes (Marker = pUC18 DNA/Msp I)

1:大头金蝇 *C. megacephala*; 2:丝光绿蝇 *L. sericata*; 3:绯颜裸金蝇 *A. rufifacies*; 4:厚环黑蝇 *O. spinigera*; 5:大头金蝇(西安) *C. megacephala* (Xi'an); 6:丝光绿蝇(西安) *L. sericata* (Xi'an); 7:巨尾阿丽蝇 *A. grahmi*.

表 2 348 bp 的 CO I 基因区的限制性酶切位点及切割后的片段大小

Table 2 Cleavage sites and fragments produced by digestion of the 348 bp CO I gene region

样本 Sample	切割后片段大小 Fragments produced by digestion (bp)		
<i>Dde</i> I (C↓TNAG)			
<i>C. megacephala</i>	284	30	34
<i>L. sericata</i>	214	70	64
<i>A. rufifacies</i>	314	34	
<i>O. spinigera</i>	348		
<i>C. megacephala</i> (Xi'an)	284	30	34
<i>L. sericata</i> (Xi'an)	314	34	
<i>A. grahmi</i>	284	30	34
<i>Dra</i> I (TTT↓AAA)			
<i>C. megacephala</i>	208	140	
<i>L. sericata</i>	208	140	
<i>A. rufifacies</i>	208	140	
<i>O. spinigera</i>	223	125	
<i>C. megacephala</i> (Xi'an)	208	140	
<i>L. sericata</i> (Xi'an)	208	140	
<i>A. grahmi</i>	348		
<i>Hinf</i> I (G↓ANTC)			
<i>C. megacephala</i>	181	46	121
<i>L. sericata</i>	348		
<i>A. rufifacies</i>	181	167	
<i>O. spinigera</i>	348		
<i>C. megacephala</i> (Xi'an)	181	46	121
<i>L. sericata</i> (Xi'an)	169	58	121
<i>A. grahmi</i>	348		

表 3 中山、广州及西安地区五个常见嗜尸性蝇类 mtDNA 中 348 bp 大小的 CO I 基因序列种内及种间进化分歧

Table 3 Intra- and inter-species evolutionary divergence among five species based on a 348 bp region of the gene encoding COI of mtDNA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1																	
2	0.000																
3	0.129	0.129															
4	0.126	0.126	0.003														
5	0.126	0.126	0.003	0.000													
6	0.119	0.119	0.076	0.073	0.073												
7	0.119	0.119	0.076	0.073	0.073	0.000											
8	0.116	0.116	0.073	0.070	0.070	0.003	0.003										
9	0.119	0.119	0.076	0.073	0.073	0.000	0.000	0.003									
10	0.119	0.119	0.076	0.073	0.073	0.000	0.000	0.003	0.000								
11	0.112	0.112	0.102	0.099	0.099	0.070	0.070	0.067	0.070	0.070							
12	0.109	0.109	0.099	0.096	0.096	0.080	0.080	0.076	0.080	0.080	0.009						
13	0.102	0.102	0.126	0.123	0.123	0.103	0.103	0.099	0.103	0.103	0.083	0.080					
14	0.106	0.106	0.096	0.092	0.092	0.076	0.076	0.073	0.076	0.076	0.006	0.003	0.077				
15	0.132	0.132	0.129	0.132	0.132	0.140	0.140	0.136	0.140	0.140	0.129	0.126	0.122	0.122			
16	0.129	0.129	0.126	0.129	0.129	0.136	0.136	0.133	0.136	0.136	0.126	0.122	0.119	0.119	0.003		
17	0.126	0.126	0.129	0.126	0.126	0.133	0.133	0.129	0.133	0.133	0.122	0.119	0.116	0.116	0.006	0.003	

1-2:巨尾阿丽蝇(西安) *A. grahmi* (Xi'an); 3-5:绯颜裸金蝇(中山) *A. rufifacies* (Zhongshan); 6-7:大头金蝇(西安) *C. megacephala* (Xi'an); 8-10:大头金蝇(中山) *C. megacephala* (Zhongshan); 11-12:丝光绿蝇(广州) *L. sericata* (Guangzhou); 13:丝光绿蝇(西安) *L. sericata* (Xi'an); 14:丝光绿蝇(中山) *L. sericata* (Zhongshan); 15-17:厚环黑蝇(中山) *O. spinigera* (Zhongshan).

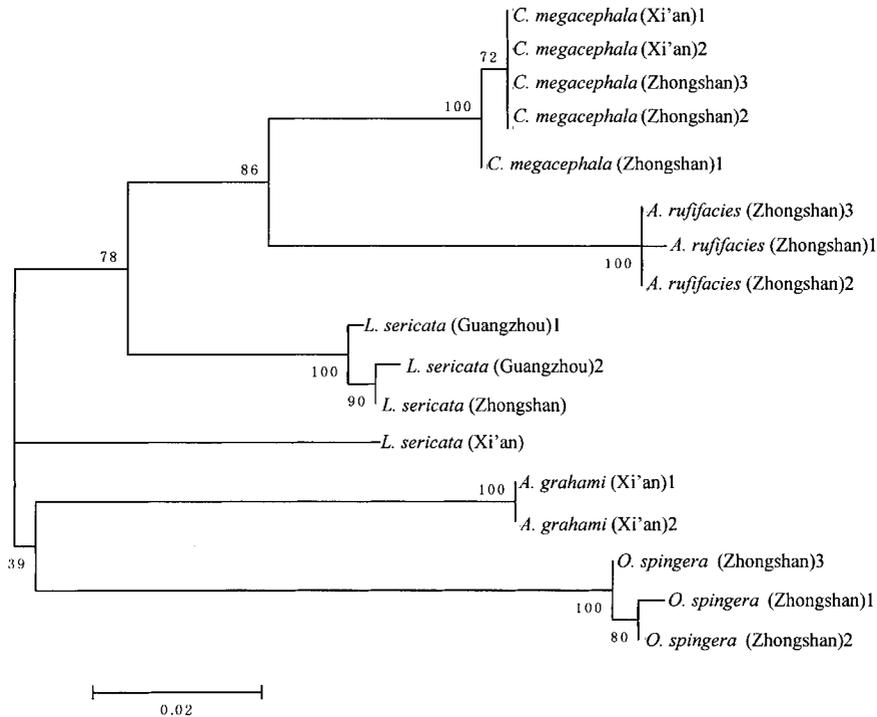


图3 基于CO I 基因348 bp 大小的片段,采用MEGA的邻接法构建的5种嗜尸性蝇类之间的分子系统进化树

Fig. 3 Neighbour-joining tree displaying relationships between *A. grahami*, *A. rufifacies*, *C. megacephala*, *L. sericata* and *O. spingera* based on partial sequence of CO I

进化距离采用 Kimura's two parameter 模式。节点表示 Bootstrap 检验的可信度,下面的线条表示每个位点 0.02 的替换长度。Genetic distance estimated by Kimura's two-parameter method. Bootstrap values indicate support for nodes. The bar indicates 0.02 substitutions per site.

3 讨论

本文采用 Sperling 等(1994)所筛选的限制性内切酶,采用 RFLP 方法,在 CO I 基因上 348 bp 大小的片段上,用 3 种不同的限制性内切酶的消化对大头金蝇等 5 种不同的种类的鉴定进行了研究。结果显示:用 *Dde* I 结合 *Hinf* I 可以将所有的 5 个种类区分开,用 *Dde* I 可以将广东省的 4 种嗜尸性蝇类区分开,用 *Hinf* I 可以将西安地区的 3 个种类区分开。目前,由于序列分析等新技术的发展,限制性内切酶的方法已经不被很多学者所使用。但是,考虑到其实用性及低廉的价格,我们认为通过系统研究筛选建立我们嗜尸性蝇类限制性内切酶的鉴定方法及标准还是很有意义的。

同时本文采用序列分析及系统发育树方法所做的研究结果也表明,可以实现种类的鉴定。当然,限于本研究所涉及的昆虫种类及各种类的个体量,本文的分子系统进化树和严格分类学意义上的分子系统进化树还是有区别的,本文的目的是实现非昆虫

专业人员对相关类群的鉴定,因此所选用的昆虫种类对类群的代表性有局限。

Sperling 等(1994)仅用限制性内切酶切割 CO I 基因 349 bp 片段来鉴别北美最常见的 3 种尸食性蝇类 (*Phormia regina*, *Phaenicia sericata* 和 *Lucilia illustris*),未使用 DNA 序列分析方法。而本研究采用限制性内切酶分析和 DNA 序列分析结合的方法,更加强了本实验结果的可靠性。本实验用与 Sperling 等(1994)相同的线粒体片段以及 3 种限制酶,区别西安地区最常见的 3 种丽蝇种类及广东中山和广州两地最常见的 4 种尸食性蝇类。各地区的种类经 *Dde* I 或 *Hinf* I 限制酶切割后的片段大小各不相同,因此在广东上述两地或西安地区仅用其中一种限制酶就可以将其最常见的几个种类鉴别出来。

由本研究结果也可以看出,不同地区的相同种类其遗传信息可能存在差异。根据国内外相关报道 (Sperling *et al.*, 1994),同一种类的不同发育阶段其遗传信息是相同的,因此,本研究结果可推广到相关种类的幼虫及蛹的鉴定上,甚至在缺乏特殊形态特

征的部分昆虫肢体上也可以鉴别出其种类。

法医昆虫学在公安破案中日益受到重视,而相关昆虫的鉴定对于办案人员几乎是不可能的,在我国各省公安部门几乎都有完善的 DNA 检测设备和成熟技术,如果能够建立相关昆虫的分子鉴定方法将极大的促进法医昆虫学的应用。本研究只是这方面的开端工作,本研究接下来的工作将对我国范围内主要的具法医学重要意义的昆虫开展分子鉴定的系统研究。

致谢 感谢中山大学梁铭球教授协助鉴定标本、西安交通大学法医系魏朝明博士协助采集相关标本。

参 考 文 献 (References)

Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM, 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 196: 80–83.

Benecke M, 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophagous insects (Diptera, Coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice. *Forensic Sci. Int.*, 98(3): 157–168.

Cai JF, Liu M, Ying BW, Dong JG, Deng ZH, Tao T, Pan HF, Zhang HX, Yan HT, Liao ZG, 2005a. Sequencing of mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I for identification of sarcosaphagous flies (Diptera) in Chengdu. *Acta Entomologica Sinica*, 48(1): 101–106. [蔡继峰,刘敏,应斌武,董建国,邓振华,陶涛,潘洪富,张红霞,闫红涛,廖志钢, 2005a. 成都地区四种食尸性蝇类 mtDNA 中 CO I 基因序列检测. *昆虫学报*, 48(1): 101–106]

Cai JF, Liu M, Ying BW, Deng RL, Dong JG, Zhang L, Tao T, Pan HF, Yan HT, Liao ZG, 2005b. The availability of mitochondrial DNA cytochrome oxidase gene for the distinction of forensically important flies in China. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 380–385. [蔡继峰,刘敏,应斌武,邓仁丽,董建国,张林,陶涛,潘洪富,闫红涛,廖志钢, 2005b. mtDNA 中 COI 分子标记在常见食尸性蝇类鉴定中的应用(英文). *昆虫学报*, 48(3): 380–385]

Cai JF, Dong JG, Liu M, Ying BW, Tao T, Pan HF, Zhang L, Yan HT, Zhang JL, Liao ZG, 2005c. Forensic application of the sequencing of mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I gene for sarcosaphagous flies (Diptera) in Hunhot and Dunhong district. *J. Forensic Medicine*, 21(2): 100–104. [蔡继峰,董建国,刘敏,应斌武,陶涛,潘洪富,张林,闫红涛,张嘉陵,廖志刚, 2005c. 呼和浩特等地区嗜尸性苍蝇 mtDNA 中 CO I 基因序列检测及法医学应用. *法医学杂志*, 21(2): 100–104]

Cai JF, Liu M, Ying BW, Zhang L, Ta T, Deng ZH, Pan HF, Deng JQ, Liao ZG, 2005d. Forensic applications of the sequencing of mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I and II gene for

identification of sarcosaphagous flies (Diptera). *J. Sichuan Univ. (Med. Sci. Ed.)*, 36(3): 393–396. [蔡继峰,刘敏,应斌武,张林,陶涛,邓振华,潘洪富,邓建强,廖志刚, 2005d. 嗜尸性苍蝇 mtDNA 中 CO I 和 CO II 基因序列检测及法医学应用. *四川大学学报(医学版)*, 36(3): 393–396]

Chen WY, Hung TH, Shiao SF, 2004. Molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. *Journal of Medical Entomology*, 41(1): 47–57.

Christine LL, David KY, 2003. Genes, morphology and agreement: congruence in Australian anthracine bee flies (Diptera: Bombyliidae: Anthracinae). *Invertebrate Systematics*, 17(2): 161–184.

Kiyoshi S, Masataka T, Yasuhiro A, 2005. Species identification of the forensically important flies in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (CO I) sequences. *J. Legal Medicine*, 7(2): 175–178.

Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Bioinformatics*, 5(2): 150–163.

Malgorn Y, Coquoz R, 1999. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae. An interest in forensic entomology. *Forensic Sci. Int.*, 102(1): 111–119.

Sambrook, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 25–31.

Sperling FAH, Anderson GS, Hickey DA, 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J. Forensic Sci.*, 39(2): 418–427.

Stevens J, Wall R, 2001. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *J. Forensic Sci. Int.*, 120(1): 116–123.

Vincent S, Vian JM, Carlotti MP, 2000. Partial sequencing of the cytochrome oxidase b subunit gene I: a tool for the identification of European species of blowflies for postmortem interval estimation. *J. Forensic Sci.*, 45(4): 820–823.

Wang XJ, Wang XH, Diao LJ, Lu GP, 2006. Identification of six species of sarcosaphagous flies (Diptera) by sequence analysis of cytochrome oxidase subunit I gene (CO I) in Weifang. *J. Forensic Medicine*, 22(2): 93–94. [王新杰,王学海,刁立江,吕桂平, 2006. 潍坊地区六种常见嗜尸性蝇类 mtDNA CO I 区序列研究. *法医学杂志*, 22(2): 93–94]

Wells JD, Sperling FA, 2001. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci. Int.*, 120(2): 110–115.

Wallman JF, Donnellan SC, 2001. The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *Forensic Sci Int.*, 120(1): 60–67.