

Abdominal-B (*Abd-B*) 항상성상자 염기서열을 이용한 시식성 파리 종의 동정

박호국 · 정욱희 · 신상언
고광수 · 황적준

고려대학교 의과대학 법의학교실

접 수 : 2012년 4월 17일
게재승인 : 2012년 5월 10일

책임저자 : 황적준
(136-701) 서울시 성북구 안암동5가
126-1번지 고려대학교 의과대학 법의학
교실
전화 : (02) 2286-1158
FAX : (02) 928-3901
E-mail : jhwang411@korea.ac.kr

DNA- Based Identification of Necrophagous Fly Species Using *Abdominal-B* (*Abd-B*) Homeobox Sequence

Hu Guo Piao, Ukhee Chung, Shang Eon Shin, Kwang Soo Ko, Juck-Joon Hwang
Department of Forensic Medicine, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

In medicolegal investigations, correct identification of the necrophagous fly species collected around and on the corpse is an essential step for estimating the postmortem interval (PMI). Therefore, forensic pathologists and entomologists investigating deaths due to violent crimes need a rapid, easy-to-use protocol to identify fly species found on corpses. A rapid and robust DNA-based tool that can distinguish between various immature and mature species from the Calliphoridae, Muscidae, and Sarcophagidae families would be ideal for such investigations. To date, the DNA barcode initiative is the best approach for identifying species-specific nucleotide sequences. We have developed 3 sequence-characterized amplified region (SCAR)-based identification systems derived from the *Abdominal-B* homeobox sequences of 17 fly species belonging to the Muscidae and Sarcophagidae. The flies used in this study were collected in Korea. These assay systems can classify 17 forensically important fly species into the dipteran family group and reliably distinguish them from inter- and intraspecific fly species through a 2-step multiplex PCR. This novel approach may also be used as an alternative to conventional DNA-based identification methods.

Key words : necrophagous fly, *Abdominal-B*, identification, postmortem interval

서 론

사후경과시간(Postmortem interval; PMI) 추정은 법의검사에서 해결되지 않은 중요하고 어려운 과제이다. 법의실무에서 사후경과시간은 시반, 시체경직, 체온하강과 같은 조기시체현상, 그리고 위 내용물의 소화시간, 유리체액, 뇌척수액 같은 체액의 생화학분석 등을 통해 추정하지만 시신의 부패가 진행되면 이들을 이용할 수 있는 근거마저도 점차 소실된다. 시신의 부패가 진행되는 과정에는 많은 미생물과 동물들이 관여하는데, 그 중 85% 이상이 곤충들이며 특히 시식성 파리(necrophagous fly)들은 죽은 생물체에 불과 몇 분 만에 찾아와 산란을 하고 죽은 생물체가 방치되는 동안 부화하여 성장하므로 사후경과시간을 추정하는 중요한 지표로 이용될 수 있다.¹⁾

시식성 파리는 종에 따라 생활습성이나 성장주기가 다르기 때문에 시식성 파리를 이용하여 사후경과시간을 추정하기 위해서는 파리의 종을 정확하게 식별하는 작업이 선행되어야 한다. 하지만 정확한 종의 식별은 전문지식을 갖춘 분류학자들만이 가능할 뿐만 아니라, 사건현장에서 주로 채집되는 파리의 알, 구더기, 번데기 같은 미성숙 개체의 종 동정은 전문지식을 갖춘 분류학자들도 어려워하는 제한이 있다. 최근에 Sukontason 등²⁾과 Mendonca 등³⁾은 주사전자현미경(scanning electron microscopy, SEM)을 이용하여 검정파리과(Diptera: Calliphoridae)에 해당하는 미성숙 개체의 종을 동정하였다고 보고하였으나, 이 또한 미성숙 개체의 형태학적 전문지식을 필요로 하므로 법의실무에서 보편적으로 이용하기에는 한계가 있다. 따라서 많은 연구자들은 분자생물학적 종 동정법(DNA-based species identification)을 제안하였고, 특히

미토콘드리아 시토크롬 C 산화효소 (mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, CO I) 유전자를 이용한 시식성 파리의 종 동정에 관한 연구가 많이 보고되었다.⁴⁻⁸⁾ 그러나 미토콘드리아 DNA는 모계로만 유전되는 특성 때문에 진화학적으로 최근에 분화하여 incomplete lineage sorting을 보이는 근연관계의 종(sister species)이나 이종간 잡종(hybrid)의 경우에는 구분이 잘 안되거나 계통분류학상의 위치를 정확히 파악하기 어렵다는 제한이 있다.^{9, 10)} 따라서 연구자들은 또 다른 유전자 마커를 찾기 위한 연구를 시도하였고, 시식성 파리인 *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) 속에서 2nd ribosomal internal transcribed spacer (ITS2) 또는 ribosomal DNA (rDNA) 등의 핵 DNA를 이용한 파리 종의 동정에 관한 연구가 발표되었다.^{11, 12)}

이와 같이 핵 DNA를 이용한 시식성 파리의 종 동정은 충분한 가능성이 있으나 아직까지 핵 DNA를 이용하여 한국에서 발견되는 시식성 파리의 종을 동정한 예가 없었고, 과학수사의 실무에서 시식성 파리의 다양한 종에 대한 종 동정이 시급히 해결해야 할 과제이므로 본 연구에서는 새로운 핵 DNA를 이용한 유전자 마커를 개발하고자 하였다.

절지동물(특히, 곤충)에서 항상성 유전자(homeotic gene)는 배아 발생에서 체절특성(segmental identity)을 조절하는 중요한 유전자로서, 곤충에서 밝혀진 항상성 유전자는 *Labial (Lab)*, *Proboscipedia (Pb)*, *Deformed (Dfd)*, *Sexcombs reduced (Scr)*, *Antennapedia (Antp)*, *Ultrabithorax (Ubx)*, *Abdominal A (Abd-A)*, *Abdominal B (Abd-B)*, *Hox 3 (Zen, Z2, Bicoid)*, *fuzitarazu (Ftz)* 등이 있다.^{13, 14)} 이 유전자들은 '항상성상자 (homeobox)' 라고 하는 진화적으로 잘 보존되어 있는 180개의 염기를 포함하고 있으며, 이 염기서열에 의해 60개의 아미노산으로 구성된 homeo domain이 존재한다. 이 부위는 같은 종 뿐만 아니라 서로 다른 종에서도 상당히 유사한 염기서열을 갖기 때문에 생물의 진화학적 연구에 많이 이용되고 있다. 그 중에서 *Abd-B*는 배아의 발육 과정에서 10-14 복부체절 형성에 관여하는 유전자로서 그 기능을 제거하면 복부체절이 흉부체절처럼 발육하는, 배아 발육에 치명적인 결과를 초래한다.¹⁵⁾ 초파리의 *Abd-B* 유전자는 Exon 7과 Exon 8 사이에 단백질 암호화에 관여하지 않는 intron 염기서열이 존재하는 것으로 알려져 있고 이러한 intron의 존재는 서로 다른 종 간에 염기서열 변이 및 길이다형성(sequence and length polymorphism)을 나타낼 것으로 예상되므로 종 동정 마커를 개발하는데, *Abd-B* 유전자의 항상성상자와 그 주변부 염기서열을 이용하고자 하였다.

따라서, 본 연구에서는 시식성 파리 종을 동정하기 위한 새로운 유전자 마커를 발굴하고자, *Abd-B* 유전자의 항상성상자와 그 주변부 염기서열에 대해 시식성 파리의 염기서열을 밝히고, 다른 파리 종간, 그리고 동일한 파리 종내에 DNA 염기서열의 다형성을 확인한 후 그 다형성을 이용하여 시식성 파리들의

종을 간편하게 동정할 수 있는 식별력이 높은 종 특이적 DNA 표지자 체계(species-specific DNA marker system)인 sequence characterized amplified polymorphic regions (SCARs)을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 파리 채집 및 DNA 추출

토끼와 돼지를 이용한 부패실험(고려대학교 녹지운동장 2004년, 평택시 청북면 어연리 2005년), 소와 돼지의 간을 이용한 유인실험(고려대학교 의과대학 교정 2006년)에서 부패가 진행되는 동안 부패단계 별로 찾아오는 시식성 파리 종을 포충망을 이용하여 채집하였고, 동일한 방법으로 제주도(2008년, 2009년)에서도 시식성 파리를 채집하였다. 채집된 파리는 즉시 알코올솜이 든 플라스틱 용기내에 방치하여 살상한 뒤 집게로 생식기 부분을 잡아당겨 밖으로 잘 드러나 보이도록 처리한 후 95% 에틸알코올 용액에 넣어 고정하였다. 알이나 유충 상태로 채집된 개체들은 부란기에서 돼지의 간을 사료로 주면서 사육하였고, 야외에서 채집된 성충 파리와 동일한 방법으로 처리하였다. 채집한 파리는 곤충분류학을 전공한 전문가에게 형태학적 동정을 의뢰하였다(Table 1).

종이 확인된 파리는 2.0 ml Eppendorf tube에 넣고 액체 질소로 5분간 급속 냉동시킨 후 SKMILL-200 (Tokken Inc, Chiba, Japan)을 이용하여 파리를 분쇄하였다. 분쇄된 파리조직으로부터 QIAamp® DNA Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 제조사 지시서(manufacturer's instruction)에 따라 DNA를 추출한 후, DU650 spectrophotometer (Beckman, VA, USA)를 이용하여 농도를 측정하였다.

2. *Abd-B* 항상성상자 염기서열 확인

검정파리과, 집파리과, 쉬파리과에 해당되는 시식성 파리 31종(199개체)의 *Abd-B* 항상성상자와 그 주변부 염기서열을 증폭하기 위해 NCBI GeneBank에 등록된 초파리(*Drosophila melanogaster*, NM_206498.1), 사막메뚜기(*Schistocerca gregaria*, X69161.1), 거저쌀도둑 거저리(*Tribolium castaneum* NM_001039430.1), 누에(*Bombyx mori*, NM_00146228.1)의 *Abd-B* 유전자의 항상성상자와 그 주변부 염기서열과 아미노산서열을 획득한 후, Chromas Pro DNASTar 프로그램을 사용하여 codon degeneracy가 낮은 공통 염기서열 부분을 선택한 후 Primer 3를 이용하여 degenerate primer를 제작하였다. 제작된 forward primer는 5'-GLHEW-3'의 아미노산 서열에 근거하여 5'-GGN YTN CAY GAR TGG AC-3'이고, reverse primer는 5'-

DLP.QH-3' (‘.’은 종결코돈)의 아미노산 서열에 근거하여 5' -TT RTC NAY NGG TCA YTG RTG-3' 이다. Degenerate PCR의 반응용액은 각 성분을 혼합하여 최종농도가 1x Gold buffer (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), 2.5 mM Gold MgCl₂ (Applied Biosystems), 0.2 mM dNTPs (Finnzymes, Espoo, Finland), 0.1 μ M primers, 0.2 unit AmpliTaq Gold™ polymerase (Applied Biosystems), 20 ng 주형 DNA를 포함하도록 하였고, 증류수를 첨가하여 최종 부피는 10 μ l가 되도록 하였다. 증폭반응은 94℃에서 5분간 열처리한 후, 94℃에서 30초, 42℃에서 1분, 72℃에서 1분의 조건으로 순환반응을 시작하여 매회 결합 온도를 1℃씩 낮추어 34℃까지 낮추는 9회의 순환반응을 한 후, 10회부터 다시 94℃에서 30초, 42℃에서 1분, 72℃에서 1분간의 순환반응을 35회 시행하였다.

PCR 산물들을 3% agarose gel (Seakem GTG 2%: Nusieve GTG 1%, FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA)로 크기를 확인 후, GeneClean III kit (BIO 101 Systems,

Vista, CA, USA)를 이용하여 제조사의 지시서에 따라 각 PCR 산물들을 정제하고, T&A Cloning Vector kit (RBC Cloning System, Real BioTech Corporation, Taiwan)를 이용하여 cloning 후, ABI PRISM BigDye® Terminator ver1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems)를 이용하여 sequencing PCR 하고, ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)로 염기서열을 획득하였다. 획득된 염기서열은 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 4 프로그램으로 분석한 후 검정파리과, 집파리과, 그리고 쉬파리과에 해당하는 시식성 파리들의 *Abd-B* 항상성상자를 포함하는 주변부 염기서열을 직접 증폭할 수 있는 universal primer sets를 제작하였다.¹⁶⁾ Forward universal primer는 UF1 (5' - CACGAGTGGACGGGGCAAGT-3'), UF2 (5' - CATGAATGGACCGGTCAGGT-3')이고, reverse primer는 UR1 (5' - TGGCATGATGGCCCATGCTC-3'), UR2 (5' - TTGTCCAAGGGTCACTGATG-3')로 설계하였다. 검정파리과는 UF1과 UR1, UF2와 UR1의 두 종류의 primer 조합, 집파리과는 UF2와 UR1, UF2와 UR2의 두 종류의 primer 조합, 쉬파리과는 UF2와 UR2의 한 종류의 primer 조합으로 각 과의 모든 파리종을 PCR 증폭할 수 있도록 하였다. PCR의 반응용액은 각 성분을 혼합하여 최종농도가 1x Gold buffer, 2.5 mM Gold MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 각각의 0.2 μ M primer, 0.5 unit AmpliTaq Gold™ polymerase, 10 ng 주형 DNA를 포함하도록 하였고, 증류수를 첨가하여 최종 부피는 25 μ l가 되도록 하였다. 증폭반응은 95℃에서 10분간 변성하고, 95℃ 30초, 58℃ 30초, 72℃ 60초에서 35회 순환반응 후 72℃ 15분간 반응하였다. PCR산물 용액 20 μ l에 calf intestinal phosphatase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 0.2 μ l, exonuclease I (New Enggland Biolabs) 0.25 μ l를 첨가하여 37℃에서 45분간 반응시키고 72℃에서 15분간 불활성화하였다. 그 후 ABI PRISM BigDye® Terminator ver1.1 Cycle Sequencing kit를 이용하여 sequencing PCR을 시행하고, ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer 를 이용하여 염기서열을 획득하였다.

3. 계통수 분석

MEGA-4 프로그램을 사용하여 초파리 및 획득된 시식성 파리들의 *Abd-B* 항상성상자 염기서열을 추가하여 정렬하고, Neighbor-joining 방법으로 계통수 분석 (phylogenetic analysis)을 시행하였다. 계통수 분석을 위해 p-distance model을 사용하였고, Bootstrap은 1,000회 반복하였다. Out-group은 초파리의 *Abd-B* 항상성상자 염기서열을 이용하였고, 이를 통해 계통수의 뿌리를 설정하여 실험대상 분류군 사이의 진화상의 상관관계를 추정할 수 있도록 하였다. *Abd-B* 항상성상자의 한가운데에 intron 염기서열이 존재하므로 계통

Table 1. Sample Size and List of Necrophagous Fly Species Used in This Study

Family	Species Name (symbol)	Sample Size
Calliphoridae (blow fly)	Aldrichina grahami (Gr)	6
	Lucilia illustris (Il)	8
	Lucilia ampullacea (Am)	5
	Lucilia caesar (Ca)	10
	Lucilia porphyria (Po)	5
	Paenicia sericata (Se)	5
	Phormia regina (Re)	5
	Chrysomya megacephala (Mg)	10
	Chrysomya pinguis (Pi)	6
	Calliphora vicina (Vi)	9
	Calliphora lata (La)	7
	Hemipyrellia lingurriens (Li)	1
	Triceratopyga calliphoroides (Cl)	7
Muscidae (house fly)	Fannia prisca (Pri)	3
	Muscina angustifrons (Ang)	12
	Muscina stabulans (Sta)	10
	Muscina pascuorum (Pas)	3
	Hydrotaea occulta (Occ)	4
	Hydrotaea dentipes (Den)	8
	Ophyra chalcogaster (Cha)	4
	Ophyra nigra (Nig)	12
	Ophyra leucostoma (Leu)	9
	Musca domestica (Dom)	4
	Phaonia aureola (Aul)	4
Sarcophagidae (flesh fly)	Boettcherisca peregrina (Per)	7
	Helicophagella melanura (Mel)	3
	Parasarcophaga albiceps (Alb)	9
	Parasarcophaga harpax (Har)	7
	Parasarcophaga kanoi (Kan)	1
	Parasarcophaga similis (Sim)	11
	Parasarcophaga haemorrhoidalis (Hae)	4
		199

수 분석시 complete deletion model을 사용하지 않고 pairwise deletion model을 적용하였다.

4. SCAR marker를 이용한 multiplex PCR 체계 구축

획득된 31종 파리를 각 과별로 염기서열을 정렬한 후, FastPCR 6.0 프로그램을 이용하여 과 특이적인 primer를 설계하고 이들을 조합하여 multiplex PCR체계를 구축하였다 (Table 2).¹⁷⁾ PCR 반응용액은 각 성분을 혼합하여 최종농도가 1 x Gold buffer, 2.5 mM Gold MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 x primer 혼합액, 0.5 unit AmpliTaq Gold™ polymerase, 20 ng 주형 DNA를 포함하도록 하였고, 증류수를 첨가하여 최종 부피는 10 μ l가 되도록 하였다. 증폭반응은 95℃에서 11분간 변성하고, 95℃ 30초, 53℃ 30초, 72℃ 60초에서 30회 순환반응 후 60℃ 45분간 반응하였다.

집파리과와 쉬파리과에 해당되는 시식성 파리 종을 구별할

수 있는 중 특이적인 primer를 설계하고 이들을 조합하여 multiplex PCR 체계를 구축하였다 (Table 3). 집파리과의 중 특이적인 multiplex PCR 반응용액은 각 성분을 혼합하여 최종 농도가 1.2 x Gold buffer, 2.0 mM Gold MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 x primer 혼합액, 0.25 unit AmpliTaq Gold™ polymerase, 20 ng 주형 DNA를 포함하도록 하였고, 증류수를 첨가하여 최종 부피는 10 μ l가 되도록 하였다. 증폭반응은 95℃에서 11분간 변성하고, 95℃ 30초, 53℃ 30초, 72℃ 60초에서 30회 순환반응 후 60℃ 45분간 반응하였다. 쉬파리과의 중 특이적인 multiplex PCR 반응용액은 각 성분을 혼합하여 최종 농도가 1.0 x Gold buffer, 2.5 mM Gold MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 x primer 혼합액, 0.25 unit AmpliTaq Gold™ polymerase, 20 ng 주형 DNA를 포함하도록 하였고, 증류수를 첨가하여 최종 부피는 10 μ l가 되도록 하였다. 증폭반응은 95℃에서 11분간 변성하고, 95℃ 30초, 53℃ 30초, 72℃ 30초에서 30회 순환반응 후 60℃ 45분간 반응하였다.

Table 2. Family-Specific Primer Sets for Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae

Primer Name	Sequence (5' → 3')	Conc. (uM)*	Product Size (bp)	Genotype
CsF	AAAYAGTTCAAATAGT	2.42	100	F1A01
MsF	GTGTCTTAAYAGTTCRAATCC	0.90	104	F1A02
SsF	AAATTCYCAACGTCAGCT	1.10	134	F1A03
CMS-R	FAM-GCATGATGRCCCATGCTC	0.40		

CsF; forward common primer to the families of Calliphoridae and Sarcophagidae flies. MsF; family of Muscidae-specific forward primer, SsF; family of Sarcophagidae specific forward primer, CMS-R: reverse common primer for families of Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae. Y; C or T, R; A or G. *: optimal concentration for PCR reaction

Table 3. Sequences and Concentration of Multiplex PCR Primers for Amplifying Muscidae and Sarcophagidae Species-Specific SCAR Markers

Family	Primer	Sequence (5' → 3')	Conc. (uM)*	Product Size (bp)	Genotype
Muscidae	MsF01	<u>GTGTCTTAAYAGTTCRAATCC</u>	1.400	104	MsA02
	MsF02	AAGGTGAARATTTGGTTYCAG	0.200	178	MsA04
	MsF03	AATCACAATCTTAGTCAAGCGC	0.015	81	MsA01
	MsF04	<u>GTGTGAGCGTCAGGCCA</u>	0.012	131	MsA03
	MsF05	CAAGTAAGTATTTGACAGMAGTC	0.280	243	MsA09
	MsF06	AC TTTGTTCCCTTAYTCYAACA	0.080	200	MsA05
	MsF07	ACCGA AAGACAAGTAAGTGG C	0.030	251	MsA10
	MsF08	TCTTCTTTTCTACTCTTTTAC	0.140	204	MsA06
	MsF09	AGTTAGTTAGTCTACGGAAC	0.040	237	MsA07
	MsF10	<u>GTGTCTTAAATCAAAGTCTACAT</u>	0.180	240	MsA08
	MsR01	FAM-TGGCATGATGRCCCATGCTG	0.400		
Sarcophagidae	SsF01	AAATTCYCAACGTCAGCT	0.030	134	SsA02
	SsF02	<u>GTGTCAATAGTTCAAATAGTAAC</u>	0.030	102	SsA01
	SsF03	AAGCGTAAACCTTATTCAAATCC	0.060	369 or 371	SsA07
	SsF04	<u>GTGTCTTGACAAGTAAGWTGAT</u>	0.400	259	SsA06
	SsF05	<u>GTGTCTATGGTTCCAAAATCGA</u>	0.040	173	SsA03
	SsF06	TTGCCTTTGTGTATTAAC	0.450	240	SsA05
	SsF07	<u>GTGTCTTGAAATAAATCTGAT</u>	0.320	233	SsA04
	SsR01	FAM-TGGCATGATGRCCCATGCTG	0.200		

MsF; Muscidae species-specific forward primer. MsR; Muscidae species-specific reverse common primer. SsF; Sarcophagidae species-specific forward primer. SsR; Sarcophagidae species-specific reverse common primer. Underline; non-template sequences, W; A or T, Y; C or T, R; A or G, *: optimal concentration for multiplex PCR reaction

PCR증폭산물은 loading dye 0.2 μ l, GeneScan™-500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems) 0.2 μ l, Hi-Di formamid 2.0 μ l, PCR 산물 1.0 μ l를 혼합한 후 95℃에서 5분 간 변성시키고 얼음에서 2분간 냉각시킨 후 ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems)를 이용하여 전기영동하였으며, 전기영동 결과는 ABI GeneScan 3.1 (Applied Biosystems), Genotyper 2.1 (Applied Biosystems) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

결 과

1. *Abd-B* 유전자의 염기서열 분석

염기서열 분석에 사용한 시식성 파리는 형태학적으로 검정 파리과 8속 13종, 집파리과 6속 11종, 쉬파리과 3속 7종으로 분류되었고, *sericata*의 경우 본 연구에서는 *Paenicia sericata*로 분류하였다(Table 1).^{18, 19)}

각 시식성 파리로부터 획득한 400~450 bp 크기의 *Abd-B*

Table 4. Sequence Alignment of *Abd-B* Homeobox in The Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae Fly Species

	111	111	111	122	222	222	223	333	333	333	444	444	444	455	555	555	556	666	666	666	777	777	777	788	888	888	889				
	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	
<i>D. melanogaster</i>	GTC	CGG	AAA	AAG	CGC	AAG	CCG	TAC	TCG	AAG	TTC	CAG	ACC	CTG	GAG	CTG	GAG	AAG	GAG	TTT	CTT	TTC	AAT	GCG	TAT	GTT	TCC	AAG	CAA	AAG	
<i>T. calliphoroides</i>	..TT	..A	..C	..T	..A	..AAT	..AAA	..CT	..A	..A	..C	..C	..C	..GA	..G	..A
<i>A. grahami</i>	..T	..SAT	..A	..C	..T	..A	..AAT	..AA	..CT	..A	..A	..C	..C	..C	..GG	..A	..A
<i>C. vicina</i>	..A	..AT	..A	..C	..T	..A	..AAT	..AAA	..CT	..A	..AC	..C	..GA	..G	..A
<i>C. lata</i>	..T	..AT	..A	..C	..T	..A	..AAT	..AAA	..CT	..A	..A	..C	..C	..C	..GA	..G	..A
<i>C. pinguis</i>	..G	..AT	..A	..T	..T	..A	..AAA	..A	..AAA	..CT	..A	..ATC	..C	..A	..T	..AA
<i>C. megacephala</i>	..G	..AT	..A	..T	..T	..A	..AAY	..A	..A	..AACT	..A	..AVC	..C	..AAA
<i>L. illustris</i>	..G	..AT	..A	..C	..T	..A	..AAT	..AT	..AA	..CT	..A	..AC	..C	..G	..Y	..AA
<i>L. ceasar</i>	..G	..AT	..A	..C	..T	..A	..AAT	..AT	..AA	..CT	..A	..AC	..C	..GAA
<i>L. ampullacea</i>	..R	..AT	..A	..C	..T	..A	..AAT	..AAA	..CT	..A	..A	..C	..C	..C	..GAA
<i>L. porphyria</i>	..A	..AT	..A	..C	..T	..A	..AAT	..AAA	..CT	..A	..A	..C	..C	..C	..GAA
<i>P. sericata</i>	..A	..AT	..A	..T	..TAAMT	..AAA	..CT	..G	..A	..C	..C	..C	..GAA
<i>H. ligurriens</i>	..AT	..A	..T	..T	..A	..AATT	..AAA	..CT	..G	..A	..C	..C	..C	..GAA
<i>P. regina</i>	..G	..AA	..T	..T	..A	..AAT	..A	..A	..AA	..CT	..A	..AC	..C	..CAA
<i>M. angustifrons</i>	..G	..AT	..A	..C	..T	..CA	..ATATAA	..Y	..A	..AAC	..G	..A	..G	..A	..A
<i>M. pascuorum</i>	..G	..AT	..A	..T	..T	..YA	..TTATA	..C	..A	..ATR	..G	..A	..G	..A	..A	..A
<i>M. stabulans</i>	..G	..AT	..A	..C	..T	..CA	..ATATAA	..Y	..R	..AWC	..R	..A	..G	..A	..A
<i>O. leucostoma</i>	..T	..AA	..C	..T	..A	..AA	..ATATAA	..C	..G	..ACMG	..A	..A
<i>O. chalcogaster</i>	..G	..AA	..C	..T	..C	..AA	..ATATAA	..C	..G	..ACA	..G	..A	..G	..A	..A
<i>O. nigra</i>	..G	..AY	..A	..C	..T	..C	..ATATAA	..Y	..G	..ACC	..G	..A	..G	..A	..A
<i>H. occulta</i>	..T	..AA	..C	..TAA	..TTATAA	..CT	..G	..ATA	..G	..A	..G	..A	..A
<i>H. dentipes</i>	..T	..AA	..C	..TAA	..TT	..A	..ATAA	..Y	..T	..G	..ATAA	..G	..A
<i>P. aureola</i>A	..AT	..A	..T	..TAA	..TT	..A	..ATR	..CT	..A	..ATT	..CG	..A
<i>F. prisca</i>	..T	..AA	..C	..TAA	..TTATAA	..CT	..G	..ATA	..G	..A	..G	..A	..A
<i>M. domestica</i>	..A	..A	..RT	..R	..C	..T	..W	..AAATAA	..CATC	..T	..AA
<i>P. albiceps</i>	..T	..A	..AT	..A	..T	..T	..A	..A	..T	..A	..TT	..A	..ATAA	..C	..A	..AVWA	..G	..AA	..A
<i>P. harpax</i>	..T	..A	..AT	..A	..T	..T	..A	..AAA	..ATA	..C	..A	..ACA	..G	..AA	..A
<i>P. haemorrhoidalis</i>	..T	..A	..AT	..A	..T	..T	..A	..AAT	..A	..ATA	..C	..A	..ACA	..G	..AA	..A
<i>B. peregrina</i>	..T	..A	..AT	..A	..T	..T	..A	..AAT	..A	..ATA	..C	..A	..ACA	..G	..AA	..A
<i>P. similis</i>	..T	..A	..AT	..A	..T	..T	..A	..AAT	..A	..ATA	..C	..A	..ACA	..G	..AA	..A
<i>P. kanoi</i>	..T	..A	..AT	..A	..T	..T	..A	..AAT	..A	..ATA	..C	..A	..ACA	..G	..AA	..A
<i>H. melanura</i>	..T	..A	..AT	..A	..T	..T	..A	..A	..T	..AT	..A	..ATA	..C	..A	..ACA	..G	..AA	..A

Dot (.) means the same nucleotide with *Drosophila melanogaster* sequences. International union of pure and applied chemistry (IUPAC) nucleotide codes, R=A or G; Y=T or C.

Dot (.) means the same nucleotide with *Drosophila melanogaster* sequences. International union of pure and applied chemistry (IUPAC) nucleotide codes, R=A or G; Y=T or C

Phenylalanine (F) 은 시식성 파리종에서는 모두 Tyrosine (Y)으로, 39번째 Glutamine (Q)은 시식성 파리 종에서는 모두 Asparagine (N)으로 전환된 것으로 확인되었으며, 31종의 시식성 파리들 사이에서는 서로 다른 종간에도 모두 일치하였다. 형태학적으로 검정파리과에 해당되는 13종 파리의 Abd-B 항상성상자 염기서열을 pairwise distance분석을 통해 비교한 결과, 초파리 염기서열과는 19.9~23.0%의 차이가 있었고, 검정파리과에 속하는 서로 다른 파리 종간에는 0.0~11.1%의 차이가 있었다. 특히, *Lucilia* 속인 파리 4종 (*illustris*,

ampullaceal, *caesar*, *porphyrina*)은 서로 0.0~1.7%의 염기서열 차이를 보인 반면, 기존에 *Lucilia* 속으로 분류되기도 하던 *sericata*는 *Lucilia* 속인 파리 4종과는 2.8~4.5%의 차이를 보여 본 연구에서 *sericata*를 *phaenicia*속으로 분류하는데 근거가 될 수 있었다. 검정파리과의 동일한 파리 종내에 *Abd-B* 항상성상자 염기서열의 차이를 확인한 결과, *C. lata*, *C. vicina*, *L. illustris*, *L. ampullacea*는 각각의 동일한 종내에서 0.0~0.6% 차이가 관찰되었고, 그 외의 다른 종은 각각의 종내 염기서열이 모두 일치하였다. *H. ligurriens*는 표본수의 제한으로 동일한 종내 염기서열을 비교분석하지 못하였다. 검정파리과의 파리종에서 *Abd-B* 항상성상자의 intron 부위는 파리 종에 따라 68~78 bp의 길이다형성이 확인되었고, 초파리의 염기서열과 비교한 결과 가장 많은 차이가 있는 종은 *C. vicina* (66.0%)였다. 검정파리과에 속하는 다른 파리 종간에는 intron 부위에서 2.8~55.7%의 차이를 보였고, *L. porphyrina*와 *L. ampullacea* 간에는 차이가 없는 것으로 확인되었다. 한편 동일한 파리 종내에 intron 염기서열을 분석한 결과 *C. lata*는 최대 5.3%, *A. grahami*는 4.2%, *L. ampullacea*는 4.4%, *L. porphyrina*는 2.8%, 그리고 *C. megacephala*는 1.4% 차이를 보였지만 *C. pinguis*, *P. sericata*, *P. regina*, *L. caesar*, *C. vicina*, *L. illustris*, *T. calliphoroides*는 동일한 종내에서는 염기서열의 차이가 관찰되지 않았다.

형태학적 분류에서 집파리과에 해당되는 11종 파리의 *Abd-B* 항상성상자 염기서열은 초파리 염기서열과 18.9~23.0%의 차이를 보였고, 집파리과에 속하는 다른 파리 종간에는 0.6~13.7%의 차이를 보였으나, *H. occulta*와 *F. prisca*는 서로 다른 종임에도 차이를 보이지 않았다. 집파리과의 동일한 파리 종내에서 *Abd-B* 항상성상자 염기서열의 차이를 분석한 결과 *M. angustifrons*는 0.0~3.3%, *M. stabulans*는 0.0~0.6%, *O. nigra*와 *H. dentipes*는 각각 0.0~1.7%, *O. chalcogaster*는 0.0~1.1%, *F. prisca*는 0.0~2.3%, *O. leucostoma*는 0.0~0.8%, *P. aureola*는 0.0~0.6%, 그리고 *M. domestica*는 0.6~2.2% 차이를 보였다. *M. pascuorum*와 *H. occulta*는 동일한 종내 염기서열이 모두 일치한 것을 확인 할 수 있었다. 집파리과의 파리 종에서 *Abd-B* 항상성상자의 intron 부위는 파리 종에 따라 60~92 bp로 길이다형성이 관찰되었고, 초파리의 염기서열과 비교한 결과 44.0~60.7%의 차이를 보였으며, 특히 집파리과의 파리종들은 동일한 종내에서도 길이다형성이 관찰되었다. 그 중 *F. prisca*는 종내에서 0.0~39.0%로 가장 많은 차이를 보였고, *M. angustifrons*, *O. chalcogaster*, *H. dentipes*, *M. domestica*, *H. occulta*, *M. stabulans*, *O. nigra*, *P. aureola*, *O. leucostoma*는 각각 최대 33.3%, 22.4%, 13.6%, 9.2%, 8.7%, 8.6%, 6.7%, 5.5%, 1.7%의 차이가 관찰되었으며, *M. pascuorum*는 종내 차이가 관찰되지 않았다.

형태학적 분류에서 쉬파리과에 해당되는 7종 파리의 *Abd-B* 항상성상자 염기서열은 초파리 염기서열과 22.0~25.0%의 차

이를 보였고, 쉬파리과에 속하는 다른 파리 종간에는 0.6~3.4%의 차이를 보였으나, *P. kanoi*와 *B. peregrina*는 서로 다른 종임에도 차이를 보이지 않았다. 쉬파리과의 동일한 파리종 내에 *Abd-B* 항상성상자 염기서열의 차이를 비교한 결과 *P. albiceps* 종내에서 최대 1.7%의 차이를 보였고 그외 5종 (*B. peregrina*, *H. melanura*, *P. harpax*, *P. similis*, *H. haemorrhoidalis*)에서는 종내 염기서열의 차이가 관찰되지 않았다. 반면, *P. kanoi*는 표본수가 적어 종내 차이를 분석할 수 없었다. 쉬파리과의 파리종에서 *Abd-B* 항상성상자의 intron 부위는 *P. harpax*가 72 bp 이고, 나머지 6종 (*H. melanura*, *P. similis*, *P. haemorrhoidalis*, *B. peregrina*, *P. kanoi*, *P. albiceps*)은 70 bp였다. 쉬파리과에서 동일 종내 intron 염기서열을 비교한 결과, *H. melanura*는 0.0~3.0%, *B. peregrina*와 *P. albiceps*는 0.0~1.4% 이고, 나머지 3종 (*P. similis*, *P. haemorrhoidalis*, *B. peregrina*)은 차이가 관찰되지 않았다.

2. *Abd-B* 항상성상자와 주변부 염기서열의 계통수 분석

MEGA 4 프로그램을 이용하여 *Abd-B* 항상성상자와 intron 그리고 함께 증폭한 주변부 염기서열에 대하여 초파리 *Abd-B* 항상성상자의 염기서열을 out-group으로 설정한 후 한국에서 채집한 31 종 시식성 파리의 염기서열을 바탕으로 진화적 계

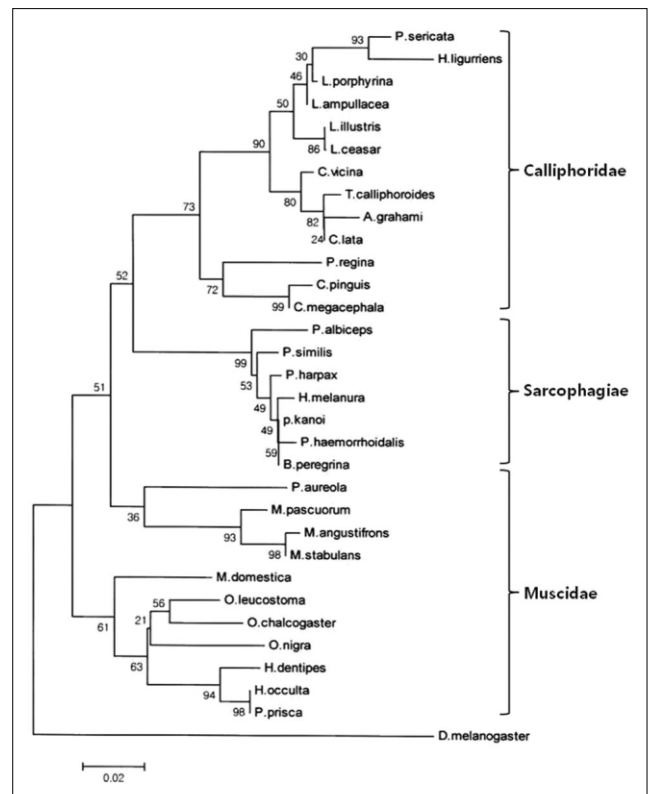


Fig. 1. A phylogenetic tree for 31 species of necrophagous flies, based on *Abd-B* homeobox sequence. Out-group is used that of *Drosophila melanogaster*.

통수 분석을 수행하였다. 그 결과 대체적으로 각 과에 해당되는 파리들이 그룹을 이루어 분류되었지만, 집파리과에 속하는 *P. aureola*, *M. pascuorum*, *M. angustifrons*, *M. stabulans* 등은 나머지 집파리과와 달리 쉬파리과와 유전적 분류가 더 가까운 것으로 나타났으며, 이는 형태학적 분류와는 차이가 있는 것으로 보인다(Fig. 1).

3. SCAR marker를 이용한 multiplex PCR 체계

과 특이적인 증폭반응을 위해 제작된 primer혼합액을 이용한 multiplex PCR을 수행한 결과 13종의 검정파리과에서는 F1A01 genotype, 10종의 집파리과에서는 F1A02 genotype, 7종의 쉬파리과에서는 F1A01과 F1A03 genotype을 확인할 수 있었다(Fig. 2). F1A01 genotype의 경우 CsF primer는 검정파리과와 쉬파리과에서 모두 동일한 염기서열 부위를 포함하고 있어, 두 과에서 동시에 증폭반응이 일어나므로, 쉬파리과에만 특이적으로 반응하는 SsF primer를 제작하여 FA03 genotype을 추가로 획득함으로써 검정파리과와 쉬파리를 구별할 수 있었다.

집파리과와 쉬파리과의 종 특이적인 증폭반응을 위해 제작된 primer혼합액을 이용하여 각각의 multiplex PCR을 수행하였고, 10종의 집파리과와 7종의 쉬파리과에 해당되는 파리 종을 동정할 수 있었다(Figs. 3, 4). 집파리과 파리들을 대상으로 구축한 multiplex PCR 체계의 재현성을 검증하기 위해, 염기서열분석에서 사용된 집파리과의 파리들 중 각 파리 종마다 3개체에서 5개체씩을 임의로 선별하여 multiplex PCR을 수행한 결과 동일한 종내에서는 모두 동일한 genotype으로 동정이 잘 되는 것을 확인하였고, 쉬파리과의 경우 표본수의 제한으로 재현성 검사를 할 수 없는 *P. kanoi*를 제외한 나머지 종들에 대하

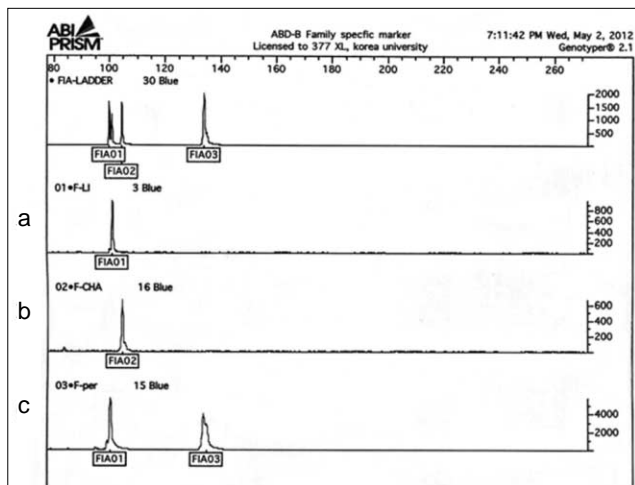


Fig. 2. Electrophoregram showing family-specific SCAR marker for necrophagous flies detected by family identification multiplex PCR system (a; Calliphoridae, b; Muscidae, c; Sarcophagidae).

여 각 파리 종마다 3개체에서 5개체씩 multiplex PCR을 수행하였으며, 그 결과 각각의 종별 genotype이 100% 일치하는 것을 확인함으로써 multiplex 체계의 안정성을 확인하였다.

고 찰

시식성 파리를 이용한 사후경과시간의 추정은 파리의 종에 따라 성장주기나 생활 습성이 다르기 때문에 반드시 종 동정이 선행되어야 한다.²⁰⁾ 전통적인 형태학적 종 동정법은 파리의 형태학적 전문지식이 필요하고, 많은 경우 사건현장에서 채집한 구더기를 성충으로 발육시킨 후 동정을 하기 때문에 시간이 오래 걸리는 등 실무 적용에 제한점이 있다. 이에 비해 DNA를 이용한 시식성 파리의 종 동정은 포괄적인 분자생물학적 기술만으로 간편하게 이용할 수 있어 동정에 소요되는 시간을 단축시킬 뿐만 아니라 파리의 모든 생활주기에서 동정이 가능하다는 장점이 있다. 본 연구에서는 시식성 파리의 *Abd-B* 유전자 염기서열을 이용하여 보다 간편한 방법으로 종 동정 체계를 구축하고자 하였으며, 이를 위해 *Abd-B* 항상성상자와 주변부 염기서열들은 밝히는 연구를 진행하였고, 이에 관한 연구는 국내 외에서 보고된 바가 없으므로 한국에서 채집한 시식성 파리 3과 8 속 31 종의 *Abd-B* 유전자 항상성상자와 그 주변부 염기

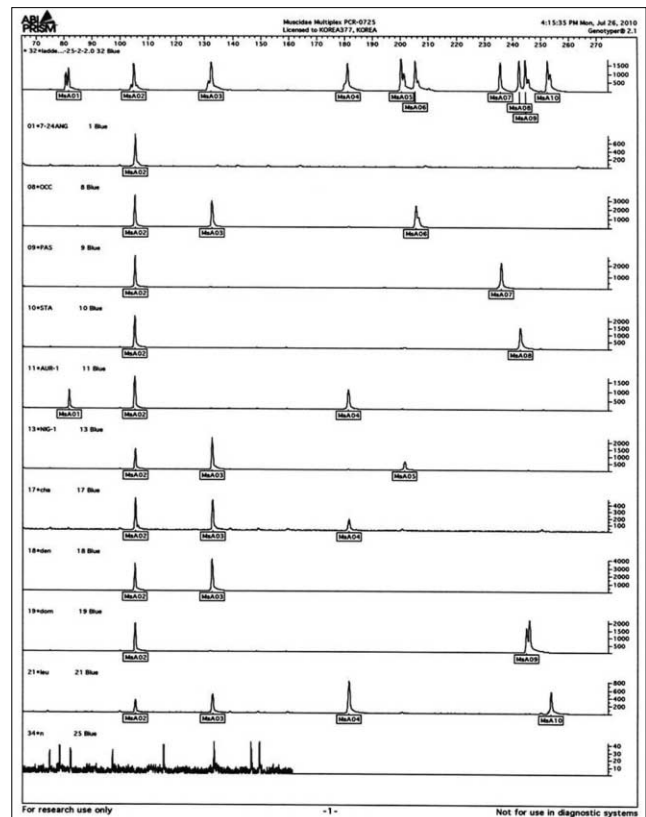


Fig. 3. Electrophoregram showing each species-specific SCAR markers for 10 Muscidae species detected by the multiplex PCR system.

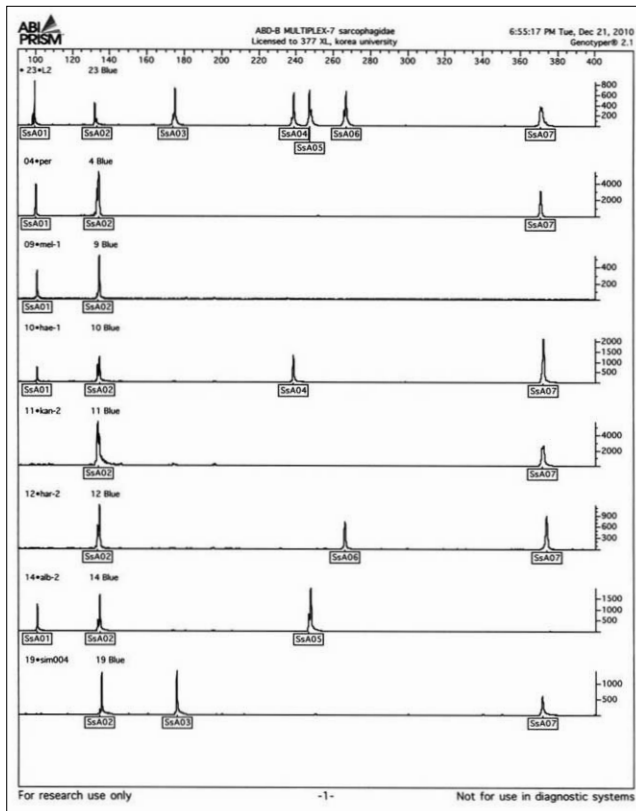


Fig. 4. Electrophoregram showing each species-specific SCAR markers for 7 Sarcophagidae species detected by the multiplex PCR system.

서열을 본 논문을 통해 최초로 보고함에 의미가 있다.

한국에서 채집한 7종의 쉬파리과, 11종의 검정파리과(*L. porphyrina*와 *L. ampullacea* 제외), 그리고 10종의 집파리과(*F. prisca* 제외)의 염기서열을 분석한 결과 동일한 종내에 많은 단일염기다형성이 발견되었으며, 집파리과의 *M. angustifrons*, *O. nigra*, *H. dentipes*, *O. chalcogaster* 종의 intron에서는 길이다형성도 관찰되었다. 특히 *M. angustifrons*의 intron에서 종내 변이가 33.3%나 되어 다른 종들보다 변이 수준이 높지만 계통수 분석에서 같은 그룹으로 분류되었으며, 이는 *Abd-B* 항상성상자 유전자의 단백질 전사에 관여하지 않는 intron에서의 변이는 종의 특성에 큰 영향이 없다는 것을 설명한다.

검정파리과에서 *L. porphyrina*와 *L. ampullacea*는 항상성상자뿐만 아니라 intron 서열까지 일치하였고, 계통수 분석을 실행한 결과 두 종은 서로 parphyly로 나타나 구별할 수 없었다. 이는 Wells 등²¹⁾이 미토콘드리아 염기서열을 바탕으로 *L. porphyrina* (AY097336), *L. porphyrina* (AY074900), *L. ampullacea* (DQ453487)에 대해 진화학적 계통수 분석을 통해 서로 parphyly pattern을 보인다고 발표한 것과 일치하는 결과이다. 우선 곤충 분류학적 관점에서 볼 때 *L. porphyrina*와 *L. ampullacea*는 모두 쌍시목(Diptera) 검정파리과의

Lucillia 속에 속하는 종으로 가슴과 등, 그리고 tibiae의 색에 의해 구별되기 때문에 표본의 상태에 따라 변화가 많아 형태학적으로는 정확한 구별이 어렵다. 따라서 *L. porphyrina*와 *L. ampullacea*가 *L. sericata*와 *L. cupurina*같은 자매종으로 진화적으로 아직 완전한 분리가 이루어지지 않았을 수 있고, 이종간 잡종일 가능성도 있으며,²²⁾ 형태학적 동정이 잘못 되었을 가능성도 배제할 수 없다. 또한 본 연구에서 분석한 *Abd-B* 항상성상자 염기서열 약 380 bp 길이가 충분히 길지 못하여 parphyly로 분석되었을 수 있기 때문에 보다 많은 표본을 채집하여 *Abd-B* 항상성상자 유전자에 대해 집단유전학분석(population genetic analysis)을 하거나 미토콘드리아 혹은 또 다른 핵 DNA를 추가로 검사하여 확인해 보아야 할 것이다.

집파리과 11종에서 서로 다른 종간에 항상성상자 염기서열 분석 결과를 보면, *F. prisca*는 *H. occulta*와 차이가 없었고 *H. dentipes*와 0.6%의 근소한 차이를 보였으며 intron에서는 *H. occulta*와 일치하였고 계통수 분석에서 위의 두 종과 혼합되어 나타났다. 분석한 집파리과 11종에서 *F. prisca*를 제외한 나머지 10종들은 서로 분류가 되었고, 현재 국내에서 *F. prisca*와 같은 *Fannia* 속에 대한 연구가 미완성 단계에 있기 때문에 *F. prisca*의 형태학적 동정에 대해 논쟁이 많은 것으로 보아 *F. prisca*에 대한 형태학적 동정이 잘못되었을 가능성을 배제할 수 없다. 따라서, *F. prisca* 역시 보다 많은 개체에 대한 지속적인 연구가 필요하다.

쉬파리과 7종의 염기서열을 서로 다른 종과 비교한 결과 *P. similis*는 *Abd-B* 항상성상자에서 *B. peregrina*와 차이가 없었고 intron에서는 *P. kanoi*와 차이가 없었지만 항상성상자와 intron 그리고 주변부 염기서열을 모두 포함시켜 실행한 계통수 분석에서는 각각 서로 다른 종과 잘 구분되었다.

그동안 한국에서 채집한 시식성 파리 종의 분포를 보면, 검정파리과 12속 19종, 집파리과 15속 38종, 쉬파리과 14속 40종이다. 종 분포로 볼 때 집파리과와 쉬파리과도 시식성 파리의 중요한 구성부분이기 때문에 쉽고 간편한 종 구별 표시자 체계가 필요하다. SCAR marker는 한 쌍의 primer를 이용하여 PCR을 기본으로 계놈의 특정 부위를 선택적으로 증폭하기 때문에, 식물이나 곤충의 종 구별에 이용되고 있다. SCAR marker는 실험조건에 영향을 많이 받는 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 보다는 안정적이고 재현성이 좋으며, RFLP 방법에 비해 많은 양과 높은 질의 DNA를 필요로 하지 않으며, 또한 한 번의 PCR로 제한효소처리 과정이 필요 없이 결과를 확인할 수 있기 때문에 간편하다.²³⁾

본 연구실에서는 이미 Bicoid유전자의 항상성상자 염기서열을 이용하여 12종 검정파리과를 구분할 수 있는 SCAR marker를 제작하여 특허 등록하였기 때문에 이를 제외한 집파리과와 쉬파리과에 대한 multiplex PCR체계를 구축하였다. PCR 체계를 구축하기 위한 primer 제작 과정에서 보존성이 좋은 항상성상자 염기서열의 특성을 이용하여 3' flanking 부위

에 검정파리과, 집파리과, 쉬파리과가 공통적으로 공유하는 1개의 reverse primer를 설계하여 multiplex에 포함되는 primer 수를 최소화하고, reverse primer에만 FAM 형광물질을 부착하여 비용을 절감하였다. 또한, forward primer 제작시 GC%가 낮은 primer의 5' end에 none template 염기서열을 추가하여 primer의 결합 효율을 높임으로서 multiplex PCR system을 최적화하였다. 뿐만 아니라 전기영동 시간을 단축하고, 표본이 오래되어 분해된 DNA에서도 종 동정이 가능하도록 SCAR marker의 증폭산물의 크기를 최소화하였으며, 모세관전기영동기를 이용하여 보다 정확하고 간편한 판독이 이루어 질 수 있도록 하였다.

본 연구를 통해 구축된 집파리과와 쉬파리과의 SCAR marker를 이용한 multiplex PCR system은 사건 현장에서 수거되는 시식성 파리의 미성숙 개체들에 대하여 DNA에 근거한 보다 정확한 동정을 가능하게 하였다. 한국에 서식하는 집파리과와 쉬파리과에 포함되는 17종의 시식성 파리는 2번의 multiplex PCR로 과 및 종 동정이 가능하기 때문에 시식성 파리를 이용한 법의 실무에서 유용할 것으로 전망된다. 이미 고려대 법의학고실에서는 Bicoid를 이용한 12종 검정파리과의 파리 종을 식별할 수 있는 genotyping kit를 제작하고 특허 신청하였으나, 이 kit의 경우 다른 방법을 통해 검정파리과임을 확인하는 단계가 선행되어야 세부 종 동정이 가능하다는 제한점이 있었다. 반면 본 연구에서 구축된 집파리과와 쉬파리과의 종 동정법은 1차 multiplex PCR system으로 3개의 과(검정파리과, 집파리과, 쉬파리과)에 대한 감별이 가능하게 되었으므로 *Bicoid genotyping kit*의 제한점을 개선할 수 있었을 뿐 아니라, 2단계의 PCR로 법곤충학적으로 매우 중요한 3과 29종의 시식성 파리들의 종을 동정할 수 있는 genotyping kit를 개발하기 위한 기반이 되는 연구로서 의미가 있다.

참 고 문 헌

1. Benecke M. Six forensic entomology cases: description and commentary. J Forensic Sci 1998;4:797-805.
2. Sukontason KL, Ngern-Klun R, Sripakdee D, Sukontason K. Identifying fly puparia by clearing technique: application to forensic entomology. Parasitol Res 2007;101:1407-6.
3. Mendonca PM, dos Santos-Mallet JR, de Mello, RP, Gomes L, de Carvalho Queiroz MM. Identification of fly eggs using scanning electron microscopy for forensic investigations. Micron 2008;39:802-7.
4. Sperling FA, Anderson GS, Hickey DA. DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. J Forensic Sci 1994;39:418-27.
5. Wells JD, Sperling FA. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation and partial sequencing of the cytochrome oxidase b subunit gene I: a tool for the identification of

- European species of blow flies for postmortem interval estimation. J Forensic Sci 2000;45:1358-9.
6. Harvey ML, Dadour IR, Gaudieri S. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. Forensic Sci Int 2003;131:134-9.
7. Chen WY, Hung TH, Shiao SF. Molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. J Med Entomol 2004;41:47-57.
8. Park SH, Zhang Y, Piao H, et al. Sequences of the cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene are suitable for species identification of Korean Calliphorinae flies of forensic importance (Diptera: Calliphoridae). J Forensic Sci 2009;54:1131-4.
9. Harvey ML, Gaudieri S, Villet MH, Dadour IR. A global study of forensically significant calliphorids: implications for identification. Forensic Sci Int 2008;177:66-76.
10. Maddison WP, Knowles LL. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. Syst Biol 2006;55:21-30.
11. Song Z, Wang X, Liang G. Species identification of some common necrophagous flies in Guangdong province, southern China based on the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). Forensic Sci Int 2008;175:17-22.
12. Nelson LA, Wallman JF, Downton M. Identification of forensically important Chrysomya (Diptera: Calliphoridae) species using the second ribosomal internal transcribed spacer (ITS2). Forensic Sci Int 2008;177:238-47.
13. Akam M. Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates. Cell 1989;57:347-9.
14. Dhawan S, Gopinathan KP. Phylogeny of the insect homeobox gene (hox) cluster. Genomics Proteomics Bioinformatics 2005;3:42-6.
15. Lamka ML, Boulet AM, Sakonju S. Ectopic expression of UBX and ABD-B proteins during Drosophila embryogenesis: competition, not a functional hierarchy, explains phenotypic suppression. Development 1992;116:841-54.
16. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007;24:1596-9.
17. Kalendar R, Lee D, Schulman AH. FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. Genes, Genomes and Genomics 2009;3:1-14.
18. Guarnera EA, Mariluis JC. Human case of disseminated cutaneous myiasis due to Phaenicia sericata. Bol Chil Parasitol 1986;41:79-82.
19. Debry RW, Timm AE, Dahlem GA, Stamper T. mtDNA-based identification of Lucilia cuprina (Wiedemann) and Lucilia sericata (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) in the continental United States. Forensic Sci Int 2010;202:102-9.
20. Vanin S, Tasinato P, Ducolin G, et al. Use of Lucilia species for forensic investigations in Southern Europe. Forensic Science International 2008; 77:37-41.
21. Wells JD, Wall R, Stevens JR. Phylogenetic analysis of forensically important Lucilia flies based on cytochrome

- oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. *Int J Legal Med* 2007;121:229-33.
22. Stevens J, Wall R. Species, sub-species and hybrid populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera:Calliphoridae). *Proc Biol Sci* 1996;263:1335-41.
23. Kethidi DR, Roden DB, Ladd TR, Krell PJ, Retnakaran A, Feng Q. Development of SCAR markers for the DNA-based detection of the Asian long-horned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky), *Arch Insect Biochem Physiol* 2003;52:193-204.