

## 刺鳅 X染色体 DNA文库的构建

陈 戟<sup>1</sup> 赵 刚<sup>1,2</sup> 臧亚婷<sup>1</sup> 余其兴<sup>1</sup> 刘江东<sup>1</sup>

(1. 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072 2. 湖北中医院生物医学教研室, 武汉 430061)

**摘要:** 刺鳅 (*Mastacembelus aculeatus*) 是具有明显 X 和 Y 异形性染色体分化的淡水鱼。本实验室通过显微切割 (Microdissection) 和兼并引物 PCR (DOP-PCR) 方法, 从雌性刺鳅中期染色体分裂相中分离获得 X 染色体并扩增其 DNA, 利用 T载体和电转化方法, 建立了刺鳅 X 染色体 DNA 质粒文库。该文库插入片段的平均长度约为 500bp, 理论上包含 X 染色体 98% 以上的序列。当用荧光原位杂交 (FISH) 来验证文库的专一性时发现, 在无竞争性 DNA 杂交条件下, 整个 X 和 Y 染色体上都表现出强烈的杂交信号, 并且常染色体上也出现一些随机散布信号; 当含有竞争性 DNA 时, 常染色体上的信号消失, 仅性染色体上异染色质区域保留有较强信号。就此, 本文对刺鳅性染色体上的序列类型进行了探讨。

**关键词:** 刺鳅; 性染色体; 染色体文库; 荧光原位杂交

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)04-0571-06

性别和性别决定是引人注目的生命现象, 对于性染色体的起源和进化的探索, 亦一直是生命科学的研究热点。全世界现存鱼类约有 24000 余种, 是脊椎动物中分布最广、种类最多的类群, 在脊椎动物的系统进化阶元中, 居承前启后的特殊进化地位, 因而成为研究脊椎动物的性别决定和性染色体分化的重要对象。在已进行过细胞遗传学研究的鱼类中, 绝大部分没有发现异形性染色体, 然而通过核型分析、染色体显带、联会复合体观察和比较基因组杂交 (CGH) 等方法, 发现在少数鱼类中存在有异形性染色体的分化, 且分化程度高低不等, 性别决定方式多种多样<sup>[1]</sup>。这些物种的性染色体有可能代表了脊椎动物性染色体的分化过程。因此, 对于鱼类性染色体的研究, 将有可能为探索脊椎动物性染色体进化历程提供重要的线索。

在我国已有细胞遗传学研究报道的鱼类中, 只有 13 种具有异形性染色体分化, 它们分属于六个目, 分别是鲤形目的鲫鱼 (*Carassius auratus auratus*)、银鲫 (*C. a. gibelio*)、鲇形目的胡子鲇 (*Clarias fuscus*)、革胡子鲇 (*C. leather*)、蟾胡子鲇 (*C. batrachus*)、斑胡子鲇 (*C. macrocephalus*)、白缘缺 (*Lebagrus marginatus*)、黑尾缺 (*L. marginatus*)、

拟缘缺 (*L. marginatus*), 鲈形目的短颌鲚 (*Coilia brachynathus*), 鳜鲡目的星康吉鳗 (*Conger myriaster*), 鲈形目的斑头鱼 (*Agrammus agrammus*) 以及鲈形目的刺鳅 (*Mastacembelus aculeatus*)<sup>[2]</sup>。其中刺鳅属鲈形目 (Perciformes)、刺鳅科 (Osteichthyes)、刺鳅属 (*Mastacembelus*), 是广泛分布于我国南方的小型淡水鱼类。1989 年本实验室对桂林地区刺鳅进行核型分析时发现其具有明显的 X、Y 染色体分化<sup>[3]</sup>, 1999 年我们又对湖北武汉和荆州两地刺鳅的核型、银染带、C 带和精母细胞减数分裂二价体进行了系统研究, 发现两地刺鳅核型完全一致, 并与桂林地区刺鳅核型基本相同<sup>[4]</sup>, 均具有巨大的、明显分化的 X、Y 异形性染色体。这对性染色体是染色体组中最大的一对中部着丝粒染色体, 不仅具有结构异染色质分布差异, 而且在外部形态上也显著不同, 在光镜观察下无需显带即能清晰鉴别。因此, 刺鳅的性染色体无疑成为鱼类性染色体显微切割操作和进化研究的理想实验对象和实验材料。

本实验室曾利用显微切割 (Microdissection) 技术, 成功分离了刺鳅的 X 染色体, 并利用兼并引物 PCR (DOP-PCR) 对染色体 DNA 进行扩增, 以扩增产

收稿日期: 2007-11-07 修订日期: 2009-01-16

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (30400044) 资助

作者简介: 陈戟 (1978—), 男, 汉族, 湖北武汉人; 博士生; 主要从事动物细胞遗传学研究

通讯作者: 刘江东 (1971—), E-mail liujd@whu.edu.cn

物为探针对雌性和雄性刺鳅染色体荧光原位杂交,结果显示 X 和 Y 具有相同的异染色质成分,并推测异染色质化发生于原始性染色体形成的早期,且原始 Y 染色体的分化可能起源于原始 X 染色体上发生的一个臂间倒位<sup>[5]</sup>。可是, DOP-PCR 所获得的 X 染色体 DNA 扩增产物数量有限(仅数微克),如果需要进一步对更多物种进行涂绘比较研究以获得性染色体进化历程信息,或者对刺鳅 X 染色体中 DNA 序列进行分析,构建刺鳅 X 染色体 DNA 文库将会提供有力的研究材料和基础。目前国内尚无构建鱼类性染色体 DNA 文库的报道,本研究建立了刺鳅 X 染色体文库,并制备生物素探针,通过 FISH 对文库的染色体专一性进行了检测。该文库的建立,对于探讨刺鳅和其他淡水鱼类 X、Y 染色体之间的同源性、分化机理、性染色体保守同线群在近缘物种染色体上的分布规律、性染色体上结构异染色质的序列结构和起源等基础理论研究具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料 刺鳅取自湖北省武汉东湖和荆州长湖。

**1.2 中期染色体的制备** 采用空气干燥法制备刺鳅雌雄个体的有丝分裂中期染色体<sup>[3]</sup>。用于显微切割和荧光原位杂交的染色体固定时间分别为 5m in 和 20m in, 其余操作相同。制备好的染色体标本置于 -20℃保存备用。

**1.3 染色体显微切割染色体、DOP-PCR 扩增** 参照文献[5],具体操作为:将雌性刺鳅染色体标本在 95% 乙醇中脱水 5m in 后,在倒置显微镜下用玻璃微针挑取 5—7 条 X 染色体,置于含有 5μL 收集液 (40mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 20mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 50mmol/L NaCl; 1U Topoisomerase I (Promega) 的 0.5 mL Eppendorf 管中,于 37℃ 保温 30m in, 然后加入蛋白酶 K (50 μg/mL) 于 37℃ 再保温 30m in 后, 加热至 96℃ 灭活蛋白酶 10m in。

DOP-PCR 反应体系包括 2.1 μmol/L 兼并引物 (5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3'), 200μmol/L dNTP, 1×Ex Taq Buffer 和 0.05 U /μL Ex Taq 酶 (TaKaRa), DOP-PCR 扩增方法与文献[6]相同。再取 5 μL 首轮反应产物为模板,以相同的反应体系进行第二轮扩增。产物用乙醇沉淀。

**1.4 X染色体 DNA 文库的建立** 将 DOP-PCR 产物进行纯化后 (Promega A7170<sup>#</sup>),与 pGEM-T Easy 载体连接 (Promega A1360<sup>#</sup>),方法见试剂盒说明书。

以大肠杆菌 DH-10b 感受态细胞为受体菌,于 1800V 电压进行电转化 (Eppendorf Electroporator 2510 电转导仪)。将转化后的细胞涂布于含有 X-gal / IPTG 的氨苄青霉素 LB 培养基平板上, 37℃ 培养过夜。

**1.5 文库重组质粒插入片段的检测和扩增** 以碱裂解法提取文库质粒并用 EcoRI 进行酶切分析<sup>[7]</sup>。取约 200ng 质粒为模板,在 20μL 反应体系中加入 0.2mmol/L dNTP, T7 SP6 引物各 0.4μmol/L, 1U Taq DNA 聚合酶进行 PCR 反应。反应步骤为 94℃ 30s 57℃ 45s 72℃ 60s 取少量产物电泳检查扩增结果。

**1.6 X 染色体文库生物素探针的制备** 采用随机引物法,步骤如下: (1) 取文库 PCR 扩增产物约 1—3 μg 置 0.5mL 离心管中,加入去离子水,使之总体积为 11μL,于 95℃ 水浴变性 10m in 后,迅速置冰浴中 5m in; (2) 在冰上向离心管中依次加入: 0.35mmol/L Biotin-dUTP 3μL, 5 × labelling Buffer 4μL, dNTP 标记混合物 (dATP、dCTP、dGTP 为 1mmol/L, dTTP 为 0.65mmol/L) 2μL, Klenow DNA 聚合酶 2U。混匀后短暂离心,置 37℃ 温育 20h; (3) 加入 2μL 100mmol/L EDTA (pH 8.0) 终止反应,加入 2.5μL 4mol/L LiCl 和 75μL 冰冻无水乙醇,混匀,置 -20℃ 2h 以上沉淀产物; (4) 13000r/m in 离心 15m in,吸去乙醇,加入 -20℃ 预冷的 70% 乙醇洗涤沉淀, 13000r/m in 离心 5m in,吸去乙醇,真空抽干后,将沉淀溶于 10μL TE 中,保存于 -20℃ 备用。

**1.7 荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization, FISH)** 雌性和雄性刺鳅染色体标本分别于 40℃ 烘烤 3h 并用 100μg/mL RNase A 37℃ 消化 1h, 脱水后,于 70% 甲酰胺 70℃ 变性 3m in 后,加 40μL 经过 80℃ 水浴变性的杂交液 (50% 甲酰胺、2×SSC、10% 硫酸葡聚糖、200ng 标记探针、20μg 竞争性 DNA (超声波打断的鲑精 DNA 和雌性刺鳅基因组 DNA)),于 37℃ 杂交 20h。染色体标本经 50% 甲酰胺 / 2×SSC 45℃, 0.1×SSC / 0.1% SDS 60℃ 漂洗后,依次封阻 (Blocking reagent (Roche)),信号放大 (卵白素- FITC、抗卵白素生物素 (Sigma)、PI (4μg/mL) 复染。最后置于荧光显微镜 (Olympus BX-51) 下观察 (455nm),以 Fuji HG200 彩色胶卷照相记录图像。

## 2 结 果

### 2.1 X染色体 DOP-PCR产物文库的建立和分析

X 染色体 DOP-PCR 产物经过纯化后,同 pGEM-T

Easy载体系统连接, 利用电转化法将连接产物导入 DH-10b 感受态细胞。在涂布 IPTG /X-gal 的氨苄青霉素 LB 培养基平板上, 1/10 体积的转化细胞平均可以获得约 250 个克隆, 其中白色菌落约 220 个, 重组克隆约占 88%。

pGEM-T Easy<sup>TM</sup> 质粒在克隆位点两侧具有共同的 EcoR I 酶切位点和 T7 SP6 引物结合序列。本研究分别采用 PCR 和 EcoR I 酶切法对文库重组质粒进行了分析。以 T7 SP6 引物对提取的文库质粒进行扩增后, 产物经电泳分离, 呈现一条均匀的 smear 与原始 DOP-PCR 产物分布基本相同(图 1a)。理论上讲, 在克隆过程中小片段(如引物二聚体)往往容易被优先连接, 产生的克隆在培养中通常具有生长优势。而本文获得的文库在克隆和培养过程中未发现明显的这种选择性。图 1b 显示从文库中随机选取的 8 个重组克隆提取质粒并进行 EcoR I 酶切分析, 分别得到大小不同的插入片段。

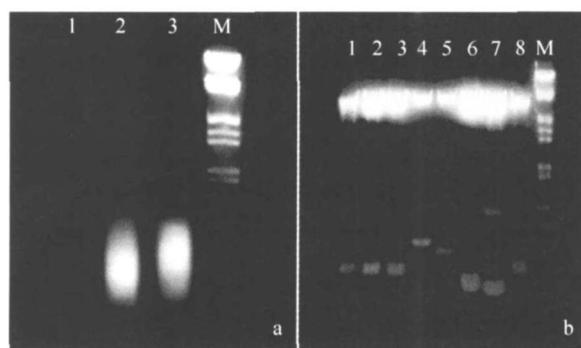


图 1 文库重组质粒的 PCR 分析和酶切分析

Fig 1 PCR and restriction enzyme digestion analysis of chromosome library derived from microdissected X chromosome of *M. aculeatus*. a T7 SP6 primers对文库质粒的扩增结果: 1: 阴性对照; 2 & 3 PCR 扩增产物; M: 分子量标准 (λDNA/EcoR I + Hind III); b: EcoR I 内切酶对随机选取的质粒的酶切分析: 1—8 为随机选取

的质粒; M: 分子量标准 (λDNA/EcoR I + Hind III)

a PCR amplification of the plasmid DNA of the library with T7 and SP6 primers. Lane 1: Negative control without DNA template; Lane 2 & 3: PCR Product; Lane M: Marker; EcoR I/Hind III-digested Lambda DNA. b. Restriction enzyme digestion analysis. Lane 1—8: EcoR I digested plasmid DNA extracted from 8 clones selected from the library randomly; Lane M: Marker; EcoR I/Hind III-digested Lambda DNA.

## 2.2 荧光原位杂交

将 X 染色体 DOP-PCR 扩增产物制备成生物素标记的探针后, 分别对雌性和雄性刺鲅的染色体组进行荧光原位杂交。当杂交体系中不含竞争性 DNA 时, 除了整个 X 和 Y 染色体上都表现出强烈的

信号外, 所有常染色体上也存在一些呈随机散布的信号(图 2); 而当杂交体系中加入竞争性 DNA (20 μg) 时, 常染色体上的信号消失, 仅 X 和 Y 染色体上异染色质区域才观察到较强的荧光信号(图 3)。

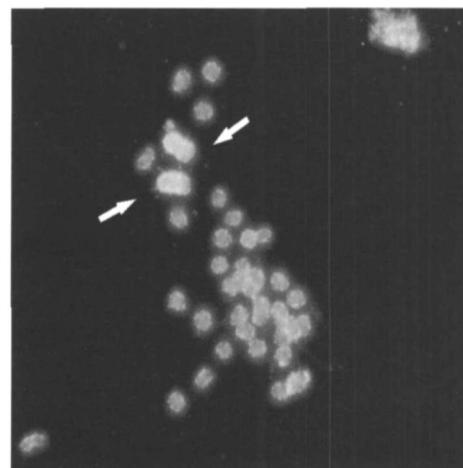


图 2 刺鲅 X 染色体探针对雌性刺鲅染色体的非抑制性 FISH 涂绘(箭头示 X 染色体)

Fig. 2 Non-competitive FISH of female *M. aculeatus* chromosomes with the panting probe derived from the X chromosome library (Arrow heads indicate X chromosomes)

## 3 讨 论

本研究中构建的 X 染色体质粒文库, 来源于显微切割获取的 X 染色体经 DOP-PCR 扩增后得到的产物。将文库插入片段标记而成的生物素探针, 分别向雌、雄性刺鲅染色体组进行非竞争性和竞争性荧光原位杂交时, 获得的信号同 DOP-PCR 产物直接标记杂交的结果相同<sup>[5]</sup>, 从而证实了该文库的忠实性和染色体特异性。

此外, 本研究在文库构建中使用了 T-Vector Easy<sup>TM</sup>载体和电转化法, 获得了较高的转化效率, 平均每皮克 (pg)载体 DNA 得到约 250 个转化细胞, 转化效率大约为  $2.5 \times 10^8$  感受态细胞 /μg。已知刺鲅单倍体 DNA 含量约为 (1.61 ± 0.25) pg 在染色体组中, X 染色体的相对长度为 7.62, 因此单条 X 染色体的 DNA 含量大约为 0.122 pg 或者  $1.1 \times 10^{-8}$  bp<sup>[8]</sup>。本研究构建的文库, 其插入片段的平均长度为 500 bp, 每条染色体扩增后产生的重组克隆平均为  $2.16 \times 10^5$  个, 因而包含的 DNA 插入片段的总量约为  $1.08 \times 10^8$  bp 是 X 染色体 DNA 的 98% 左右。作为 PCR 介导的染色体文库, 尚未见到对染色体覆盖

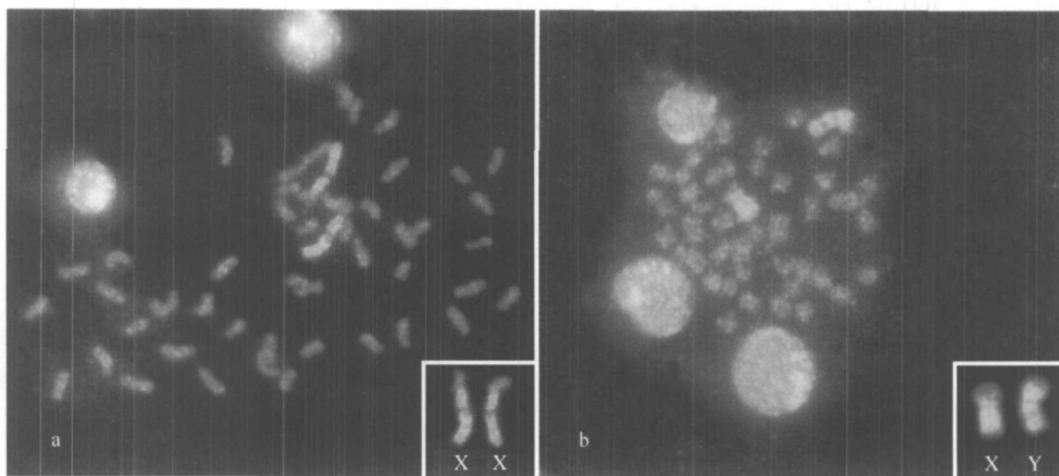


图 3 刺鰩 X 染色体生物素探针对雌、雄性刺鰩染色体的竞争性 FISH 分析

Fig. 3 Competitive FISH analysis with biotin-labeled painting probes derived from the X chromosome library

a 对雌性刺鰩有丝分裂中期染色体的涂绘结果, 插入图片示 X 染色体上的信号; b. 对雄性刺鰩有丝分裂中期染色体的涂绘结果, 插入图片示 X, Y 染色体上的信号

a A metaphase from the female, the inserted frame shows the signals on X chromosomes. b. A metaphase from the male, the inserted frame shows the signals on X and Y chromosomes.

率达到 100% 的报道<sup>[9]</sup>。如果不考虑文库建立过程中 DNA 的损失以及 PCR 扩增中的选择性, 那么本研究所建立的染色体文库, 理论上能够较好地代表刺鰩 X 染色体, 应用于染色体涂绘研究。

在 X 染色体探针对刺鰩染色体组的涂绘实验中, 我们可以观察到, 杂交体系中竞争性 DNA (超声波打断的基因组 DNA) 存在与否与涂绘结果直接相关: 在没有竞争性 DNA 存在的情况下, X、Y 所有的区域都被信号所覆盖, 同时, 常染色体上也有随机状的信号出现; 如果在杂交体系中存在竞争性 DNA, 则杂交信号仅出现在 X 和 Y 的几个异染色质区域, 而在 X、Y 的几个常染色质区域以及常染色体上, 则没有任何信号。我们认为, 上述现象反映了刺鰩性染色体上不同类型的 DNA 序列的组成。我们认为在刺鰩的性染色体上至少存在三种类型的 DNA 序列: 一类是存在于所有染色体上的高度重复序列 (此处称为 iv 类序列), 分布于常染色体和性染色体上, 该类序列在刺鰩基因组中可能是散在的, 并不形成结构异染色质; 第二类为刺鰩性染色体特有的高度重复序列 (称为 ⑤类序列), 仅分布于性染色体的结构异染色质区域, 但不存在于任何常染色体上; 第三类为低度重复序列或者单拷贝序列, 这类序列存在于性染色体常染色质区, 性染色体上的结构基因、调控基因等有可能就属于该类序列 (称为 ④类序列)。这三类序列中, 以 ⑤类重复度最高, 并且在性染色体上分布最广, 与探针复性效率最高, 其次是 iv

类和 ③类, 因其重复度较低, 故与探针复性也较慢。当杂交体系中不存在竞争性 DNA 时, 三种类型序列的探针都可以同染色体上的靶序列很好地结合, 导致性染色体的所有部分 (包括常染色质和异染色质区域) 都被探针覆盖 (这也证实了 X 染色体文库的完整性), 而常染色体上存在 I 类序列的区域也会出现散在的信号。当杂交体系中存在竞争性 DNA 时, ④类序列探针由于较高的绝对含量和快速的复性能力, 比 iv 类和 ③类序列能够更加有效地同性染色体上异染色质区域结合, 相反, ⑤类和 ④类探针同靶序列的结合被抑制, 因此在性染色体常染色质区和常染色体均无信号。上述假设能很好地解释本研究中 X 染色体探针对刺鰩染色体抑制性和非抑制性杂交结果的差异。

既然进化过程无法人为地重演, 我们只能在不同物种中通过比较细胞遗传学等方法来追溯脊椎动物性染色体的进化机制。虽然目前该机制还有待于进一步深入研究, 但是有一点已经获得学术界的普遍认同, 即性染色体来源于同一对古老的同源染色体<sup>[10]</sup>。Ohno 认为性染色体的进化可能分为两个阶段: 首先包含性别决定基因 (或者相关基因) 的染色体发生倒位 (Inversion), 进而这些性染色体上发生异染色质化, 实现对 W、Y 染色体的保护。异染色质的积累可以只发生在一条 (W 或者 Y) 或者同时发生在两条性染色体上。刺鰩的 XY 性染色体不仅在形态和异染色质分布上相互区别, 同时可能通过

Y 染色体上的臂间倒位实现与 X 染色体的隔离, 因此我们认为在低等脊椎动物中, 刺鳅的性染色体的分化处于高级阶段<sup>[5]</sup>。因此, 作为鱼类性染色体高度分化的代表物种, 针对刺鳅性染色体的研究对于揭示低等脊椎动物的性染色体进化历程和性别决定机制都具有重要的意义。

由于染色体显微分离技术尚未在鱼类分子细胞遗传学研究中获得广泛运用, 因此, 关于鱼类性染色体涂绘的报道较少。最为著名的是 Phillips et al. 在鲑科鱼类中进行的性染色体分离和涂绘研究<sup>[11-12]</sup>。董在杰从雌性和超雄性尼罗罗非鱼中分离并扩增了 X 和 Y 染色体, 但对 X、Y 染色体涂绘时未见差异<sup>[13]</sup>。因此对鱼类性染色体和近缘物种之间的涂绘研究还有待于深入进行。本研究构建的刺鳅 X 染色体文库, 对于研究和揭示淡水鱼类性染色体进化、探讨低等脊椎动物 X、Y 染色体之间的同源性、分化机理、性染色体保守同线群在近缘物种染色体上的分布以及性染色体上结构异染色质的序列结构等具有重要意义。

## 参考文献:

- [ 1 ] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences [ J ]. *Aquaculture*, 2002, **208**: 191—364
- [ 2 ] Yang D, Yu L N. Sex and sex identification of fish [ J ]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**( 2 ): 221—226 [ 杨东, 余来宁. 鱼类性别与性别决定. 水生生物学报, 2006, **30**( 2 ): 221—226 ]
- [ 3 ] Yu X J, Zhou T, Li Y C, et al. Chromosomes of Chinese freshwater fishes [ M ]. Beijing: Science Press, 1989 [ 余先觉, 周暾, 李渝成, 等. 中国淡水鱼类染色体. 北京: 科学出版社. 1989 ]
- [ 4 ] Liu J D, Huang L, Yu Q X. The cytogenetic evidences for confirming the existence of sex chromosomes in *Mastacembelus australis* (Osteichthyes, Perciformes) [ J ]. *J. Wuhan Univ. (Nat Sci Ed.)*, 1999, **45**( 2 ): 185—190 [ 刘江东, 黄琳, 余其兴. 刺鳅性染色体的细胞遗传学确定证据. 武汉大学学报(自然科学版), 1999, **45**( 2 ): 185—190 ]
- [ 5 ] Liu J D, Yi M S, Zhao G. Sex chromosomes in the spiny eel (*Mastacembelus australis*) revealed by mitotic and meiotic analysis [ J ]. *Cytogenet Genome Res.*, 2002, **98**: 291—297
- [ 6 ] Shibata F, Hizume M, Kuroki Y. Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa* [ J ]. *Chromosoma*, 1999, **108**: 266—270
- [ 7 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [ M ]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 8 ] Cui J X, Ren X H, Yu Q X. Nuclear DNA content variation in fishes [ J ]. *Caryologia*, 1991, **56**: 425—429
- [ 9 ] Zhou Y H, Hu Z M, Dang B Y, et al. Microdissection and microcloning of rye (*Secale cereale L.*) chromosome 1R [ J ]. *Chromosoma*, 1999, **108**: 250—255
- [ 10 ] Ohno S. Sex chromosomes and sex-linked genes [ M ]. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1967
- [ 11 ] Phillips R B, Reed K M. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review [ J ]. *Aquaculture*, 1996, **140**: 197—216
- [ 12 ] Phillips R B, Konkol N R, Reed K M. Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus* *Salmon* and *Salvelinus* (Salmonidae) [ J ]. *Genetica*, 2001, **111**: 119—123
- [ 13 ] Dong Z J. Preparation of X-and Y-chromosome probes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) for in situ hybridization [ J ]. *J. Nanjing Agric. Univ.*, 2004, **27**( 3 ): 136—138 [ 董在杰. 尼罗罗非鱼 X 和 Y 染色体原位杂交探针的制备. 南京农业大学学报, 2004, **27**( 3 ): 136—138 ]

## THE CONSTRUCTION OF X CHROMOSOME LIBRARY OF SPINY EEL (*MASTACEMBELUS ACULEATUS*)

CHEN Ji<sup>1</sup>, ZHAO Gang<sup>1,2</sup>, ZANG Ya-Ting<sup>1</sup>, YU QiangXing<sup>1</sup> and LIU Jiang-Dong<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072;

2. Department of Basic Medicine, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061)

**Abstract** The spiny eel (*Mastacembelus aculeatus*) is a species of the genus *Mastacembelus* (Osteichthyes, Perciformes), which mainly live in the freshwater of the south of China. The fish is particularly attractive for cytogenetical study owing to possessing well differentiated X and Y sex chromosomes.

In the present study, the X chromosomes of *M. aculeatus* were microdissected from the metaphases of chromosomes of the female. Then, the fragments of X chromosomes were put into a micro tube and amplified using Degenerated Oligonucleotide-Primed PCR (DOP-PCR). Thereafter, the product of PCR was connected to T vector and the plasmids were electric transformed into *E. coli*. As a result, the library of X chromosome of *M. aculeatus* was constructed. The sum of the lengths of the inserted fragments is some  $1.08 \times 10^8$  bp with an average length of 500bp. It is believed that the library covered more than 98% sequences of the whole X chromosome theoretically.

To check the credibility of the library, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was applied. The fragments of the library were labeled with biotin by PCR. Then the probes were hybridized to the chromosome metaphases of both sex of *M. aculeatus* in the absence or the presence of competitor DNA. Strong signals were detected on the entire sex chromosomes as well as signals dispersed on all autosomes with the condition of FISH in the absence of competitor DNA. Whereas competitor DNA was added, the signals disappeared except those showed on heterochromatic regions of X and Y chromosomes. Hence, we assorted the repetitive sequences in the X chromosome of *M. aculeatus* into three types. It was interpreted that the signals of FISH in the presence of competitor DNA showed the distribution of type ② repetitive sequences on the sex chromosomes of *M. aculeatus*.

**Key words** *Mastacembelus aculeatus*, Sex chromosome, Chromosome library, FISH