

草鱼腺苷酸基琥珀酸裂解酶克隆及序列分析

屈 刚^{1,2} 顾继锐^{1,2} 辜文博¹ 朱文漓¹ 吴 江² 刘汉元² 徐 恒^{1,2}

(1. 四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064 2. 通威股份有限公司, 成都 610081)

摘要: 腺苷酸基琥珀酸裂解酶 (Adenylosuccinate lyase, ADSL) 是嘌呤核苷酸合成过程中的关键酶。研究以草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 肠道 cDNA 文库为基础, 应用 PCR、RT-PCR 和 RACE 技术, 成功获得了草鱼肠道组织腺苷酸基琥珀酸裂解酶基因的 cDNA 全长和基因组 DNA 全长。该基因全长 1584 bp 包含一个 1449 bp 的开放阅读框, 编码 482 个氨基酸, 与其他脊椎动物比对显示, 其序列具有较高的保守性。草鱼腺苷酸基琥珀酸裂解酶基因组 DNA 由 13 个外显子和 12 个内含子组成, 其外显子拼接位点非常保守, 遵循 GT-AG 原则。

关键词: 草鱼; 肠道; 腺苷酸基琥珀酸裂解酶; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q 781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009) 06-1105-07

腺苷酸基琥珀酸裂解酶 (Adenylosuccinate lyase, ADSL) 是嘌呤核苷酸生物合成过程中的关键酶。嘌呤核苷酸的生物合成有两条途径: 从头合成途径和补救合成途径。在从头合成途径中, ADSL 催化两个重要的反应: (1) 由 SACAR 生成 AICAR 的反应; (2) 由腺苷酸琥珀酸生成腺苷酸单磷酸 (AMP) 的反应。细胞复制所需的大部分嘌呤核苷酸经由从头合成途径产生, 其余的由补救合成途径产生。ADSL 除了参与嘌呤核苷酸生物合成, 同时也参与嘌呤核苷酸的循环过程。嘌呤核苷酸循环通过控制柠檬酸循环中间体和 AMP 的数量来参与细胞的代谢调控。因此, ADSL 在细胞复制和细胞代谢过程中起重要作用。目前, 很多物种的 ADSL 基因已经被克隆, 包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[1]、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[2]、耐超高温热棒菌 (*Pyrobaculum aerophilum*)^[3]、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)^[4]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[5]、红原鸡 (*Gallus gallus*)^[6]、小家鼠 (*Mus musculus*)^[7]、人 (*Homo sapiens*)^[8]。

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*, 英文名 Grass carp), 隶于鲤科、草鱼属, 又名鲩鱼, 是我国特有的鲤科大型经济鱼类。我们前期构建了国内第一个草鱼肠道 cDNA 文库^[9], 本研究是在 cDNA 文库基础上, 筛选出一条 617 bp 腺苷酸基琥珀酸裂解酶基因 EST 序列, 应用 PCR、RT-PCR 和 RACE 技术, 首次成

功获得了草鱼腺苷酸基琥珀酸裂解酶 cDNA 全长序列和基因组 DNA 序列, 同时研究了该基因的结构, 分析了其物种间的同源性, 对探讨其行使催化能力的功能区域位置及与其他动物的区别, 从而对于研究其重组蛋白在生产中的应用提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂 健康雌性草鱼从四川成都通威水产科技有限公司采集。取草鱼肠道组织保存于 -80℃ 用于总 RNA 提取。克隆用宿主菌为大肠杆菌 JM109, 载体为 Takara 公司 PMD18-T 克隆载体。TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司, Taq 酶和 DNA Marker 购自 Takara 公司, SmartRACE cDNA amplification kit 购自 Clontech 公司, QIAEX II Gel Extraction kit 胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司。实验所用引物的合成以及克隆的测序均由上海英骏生物技术有限公司完成。实验中的其他试剂均为进口或国产分析纯度试剂。常规试剂按《分子克隆实验指南》^[10] 配制。

1.2 引物设计 参照已知的草鱼肠道 cDNA 文库中 ADSL 基因 EST 序列 (GenBank 登录号 FE840584), 使用 Primer Primer 5.0 软件 (Premier Biosoft Inc) 设计了两条特异引物 (GSP5 和 GSP3), 应用 RACE 法 (Rapid amplification of cDNA ends) 扩

收稿日期: 2008-06-23 修订日期: 2009-04-12

基金项目: 通威股份公司科技发展项目-草鱼基因组计划; 四川省科技攻关项目 (05NG002-002-4) 资助

作者简介: 屈刚 (1982-), 男, 辽宁西丰人; 硕士; 研究方向为淡水鱼类分子生物学和微生物生物技术。E-mail: pandeq@ gmail.com

通讯作者: 徐恒, E-mail: xuheng@ email.scu.edu.cn

增该 cDNA 的 5'端和 3'端未知序列,其中 GSP5用来扩增 5'端未知序列,而 GSP3用来扩增 3'端未知序列。RACE 通用引物使用 C bntech 公司的 Long primer和 Short primer。在草鱼 *ADSL* 基因 DNA 扩增中,根据我们已经得到的 *ADSL* 基因 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号 EU 571219)和 GenBank 中查找的

斑马鱼 (zebrafish)*ADSL* 基因组 DNA 全长序列 (NC_007114),通过 NCBI中的 BLAST 软件里的 BLAST2 sequence作序列比对,大致得出各个外显子的拼接位点。根据这些位点在合适的外显子和非翻译区设计 4对特异引物 (F1、R1、F2、R2、F3、R3、F4、R4)。以上引物均列于表 1。

表 1 实验中所用引物序列
Tab.1 Oligonucleotide primers used in experiment

引物 Primer	引物序列 Primer Sequence
Long primer	5'-CTAATACGACTCACTATA GGGCAAGCAGTGGTATCAA CGCAGAGT-3'
Short primer	5'-AAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT-3'
GSP5	5'-CAGACA CG CA CGCTTCCCGACAGT -3'
GSP3	5'-GTTGCCCGA GTCCTTCCTCACAGC -3'
F1	5'-CGCTTCG CTG AACTGCTATTA -3'
F2	5'-GTGTCATAG ACA GGCAGGCTA -3'
F3	5'-GAGGAGTTGGATA GGATGGTCA -3'
F4	5'-ACTGAAGGG CTG GTGGTGTATC -3'
R1	5'-A TACTGG GTGAAG CCTAA AGTC -3'
R2	5'-TACGTCTGACCCGTCACCAAG -3'
R3	5'-CTGTTTCCTCCAGCCTTCACC -3'
R4	5'-TATTCATTGTTATACCGTTTGA -3'

1.3 RNA 的分离、3'RACE和 5'RACE 使用 TRIzol试剂 (Invitrogen) 从草鱼肠道组织中提取总 RNA。按照 SmartRACE cDNA amplification kit (BD Biosciences C bntech)使用说明书进行 3'RACE和 5'RACE。3'RACE反应条件为 94℃预变性 5min, 94℃变性 30s, 54℃退火 30s, 72℃延伸 1min, 30个循环; 72℃延伸 10min。5'RACE反应条件为 94℃预变性 5min, 94℃变性 30s, 68℃退火 30s, 72℃延伸 1min, 30个循环; 72℃延伸 10min。RACE 产物经 1% 琼脂糖 (1×TAE)凝胶电泳分离,用胶回收试剂盒回收目的片段,回收的目的片段用 pMD18-T 克隆载体进行连接转化大肠杆菌 JM109, 筛选阳性克隆并测序。

1.4 草鱼基因组 DNA 的提取和 *ADSL* 基因组序列的扩增 草鱼基因组 DNA 从新鲜草鱼血液中提取。取 200 μL 实验鱼血,加入 1 mL 的 0.3% NaCl 淡水鱼生理盐水,混匀,离心去上清。沉淀中加入去离子水,混匀,低渗处理 15min,离心去上清,获白色沉淀 (细胞核)。沉淀中加入 400 μL 裂解液 (0.5% SDS + 1mol/L NaCl) 和 10 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL), 55℃水浴消化 3h。裂解物用等体积的饱和酚、酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1)、氯仿:异戊醇 (24:1) 各抽提一次。用 2倍体积无水乙醇沉淀上清液,离心,干燥,TE 溶解, - 20℃保存备用。

用 4对特异引物 (F1、R1、F2、R2、F3、R3、F4、

R4)扩增草鱼 *ADSL* 的基因组序列。PCR 反应程序如下: 94℃预变性 5min, 94℃变性 30s, T℃退火 30s (4个扩增反应退火温度分别为 48℃、49℃、52℃、47℃), 72℃延伸 3min, 30个循环; 72℃延伸 10min, 扩增得到的片段经 1% 琼脂糖 (1×TAE)凝胶电泳分离,用胶回收试剂盒回收目的片段,回收的目的片段用 pMD18-T 克隆载体进行连接转化大肠杆菌 JM109, 筛选阳性克隆并测序。

1.5 序列分析 使用 DNASTAR 5.0 软件中的 MegAlign 程序编辑和分析 DNA 序列和蛋白序列。从 GenBank 数据库中查找 *ADSL* 氨基酸序列 human (NP_000017)、mouse (NP_033764)、chicken (AAT76521)、African clawed frog (NP_001080593)、zebrafish (AAH71343) 与本研究所获草鱼 *ADSL* 一起以邻位相联法构建系统发生树。

2 结 果

2.1 草鱼 *ADSL* 基因 cDNA 的克隆与序列分析
我们前期构建了国内第一个草鱼肠道 cDNA 文库,本研究从该 cDNA 文库中鉴定出一个草鱼 *ADSL* 基因 EST 序列,其片段长度为 619 bp。根据该 cDNA 设计基因特异性引物,采用 RACE 技术,扩增出该基因的 5'上游和 3'下游的序列,获得了 579 bp 的 5'端上游序列和 508 bp 的 3'端下游序列,这 3段序列经拼接后获得 1584 bp 的草鱼 *ADSL* 基因 cDNA 序列。

该序列由 1 个 63 bp 的 5'UTR、1 个 1449 bp 的开放阅读框(编码 482 个氨基酸)和 1 个 72 bp 的 3'UTR 组成。在 polyA 上游 17 bp 处,有 1 个典型的 polyA 加尾信号 AATAA。

2.2 草鱼 ADSL 成熟蛋白序列的确定及氨基酸序列的同源性分析

氨基酸序列分析显示,草鱼 ADSL 由 482 个氨基酸残基组成, 分子量为 54552 D, 等电点为 6.72。将草鱼 ADSL 氨基酸序列同其他脊椎动物的 ADSL 比较, 与斑马鱼 ADSL 同源性 94.6%, 与非洲爪蟾 ADSL 同源性为 78.5%, 与 ADSL 鸡同源性为 70.8%, 与小家鼠 ADSL 同源性为 76.2%, 与人 ADSL 同源性为 76.0%。系统进化树(图 1)。

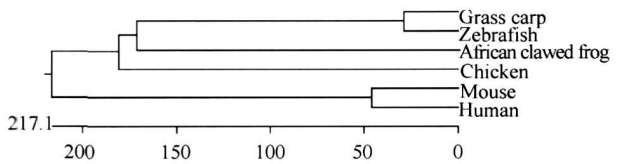


图 1 六种脊椎动物 ADSL 的系统进化树
Fig.1 Phylogenetic tree show relationship among full-length ADSL

2.3 草鱼 ADSL 基因组 DNA 的克隆与序列分析

以草鱼基因组 DNA 为模板,用 4 对基因特异性引物(F1R1、F2R2、F3R3、F4R4)进行 PCR 扩增, 分别获得 3483、3044、1677 和 1391 bp 的基因组片段。应用 DNAStar 中的 SeqMan 程序将 4 个片段进行拼接, 得到草鱼 ADSL 基因组 DNA 全长序列(图 2), 该序列 GenBank 登录号为 EU 571220。将得到的基因组 DNA 序列与其 cDNA 序列比对后, 得知该基因是由 13 个外显子和 12 个内含子组成, 外显子的范围在 45—204 bp 之间, 内含子的范围在 76—2271 bp 之间, 其外显子拼接位点非常保守, 除第 9 个内含子 5'端是 GC 外, 其他外显子都遵循 GT-AG 规则。按照三联密码子决定一个氨基酸, 任何基因的外显子和内含子的交界处会有三种情况出现, 0 类或 2 类。外显子 8 与内含子 8 交界处(ATT/G)属于 1 类; 外显子 4 与内含子 4 交界处(TAT/CA), 外显子 6 与内含子 6 交界处(AAA/AA), 外显子 9 与内含子 9 交界处(AAC/AG)属于 2 类; 其余外显子内含子交界处属于 0 类(表 2)。

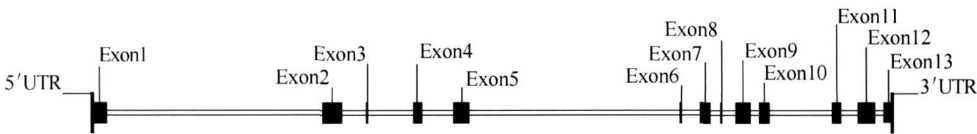


图 2 草鱼 ADSL 基因组序列结构
Fig.2 the structure of grass carp ADSL genomic DNA

表 2 草鱼 ADSL 基因的外显子/内含子的保守拼接位点
Tab.2 Intron/exon boundaries of grass carp ADSL gene

外显子 Exon	内含子 Intron	外显子及其大小 Exon and size	内含子 Intron	内含子 Intron	内含子大小 Size (bp)
1		ATG/GAG...147bp...GAG/AAG	GTCTGTTA...	1	2271
2	...TGCTGCAG	GCA/TTG...204bp...AAC/ACG	GTGAGGCAA...	2	276
3	...TATCTGTAG	GAT/CTG...45bp...CCC/AAG	GTTTGACTT...	3	439
4	...CTTCCACAG	TTG/GCT...80bp...TAT/CA	GTGAGTAAT...	4	334
5	...TTTCTCAG	A/CCA...172bp...GAG/AAG	GTGAATGCA...	5	2234
6	...GTCCTTTAG	GTG/GAG...47bp...AAA/AA	GTATGCTCA...	6	157
7	...TTTTTTTATAG	A/TCA...91bp...CAC/AAG	GTCAGACGC...	7	126
8	...TTGCTGTAG	ATT/TGC...70bp...ATT/G	GTGAGTTTG...	8	76
9	...TGTTTCTAG	GT/TCC...148bp...AAC/AG	GCACTGTTA...	9	110
10	...TTTACTTAG	G/AGG...91bp...CCT/AAG	GTGTGTGTG...	10	678
11	...CTTTTATAG	GTG/ATC...90bp...AGA/CAG	GTCA GAACA...	11	182
12	...CACACTCAG	GAC/TGC...177bp...CAA/CAG	GTACACGCA...	12	102
13	...CTTCTCAG	GTT/ACA...87bp...CTT/TGA			

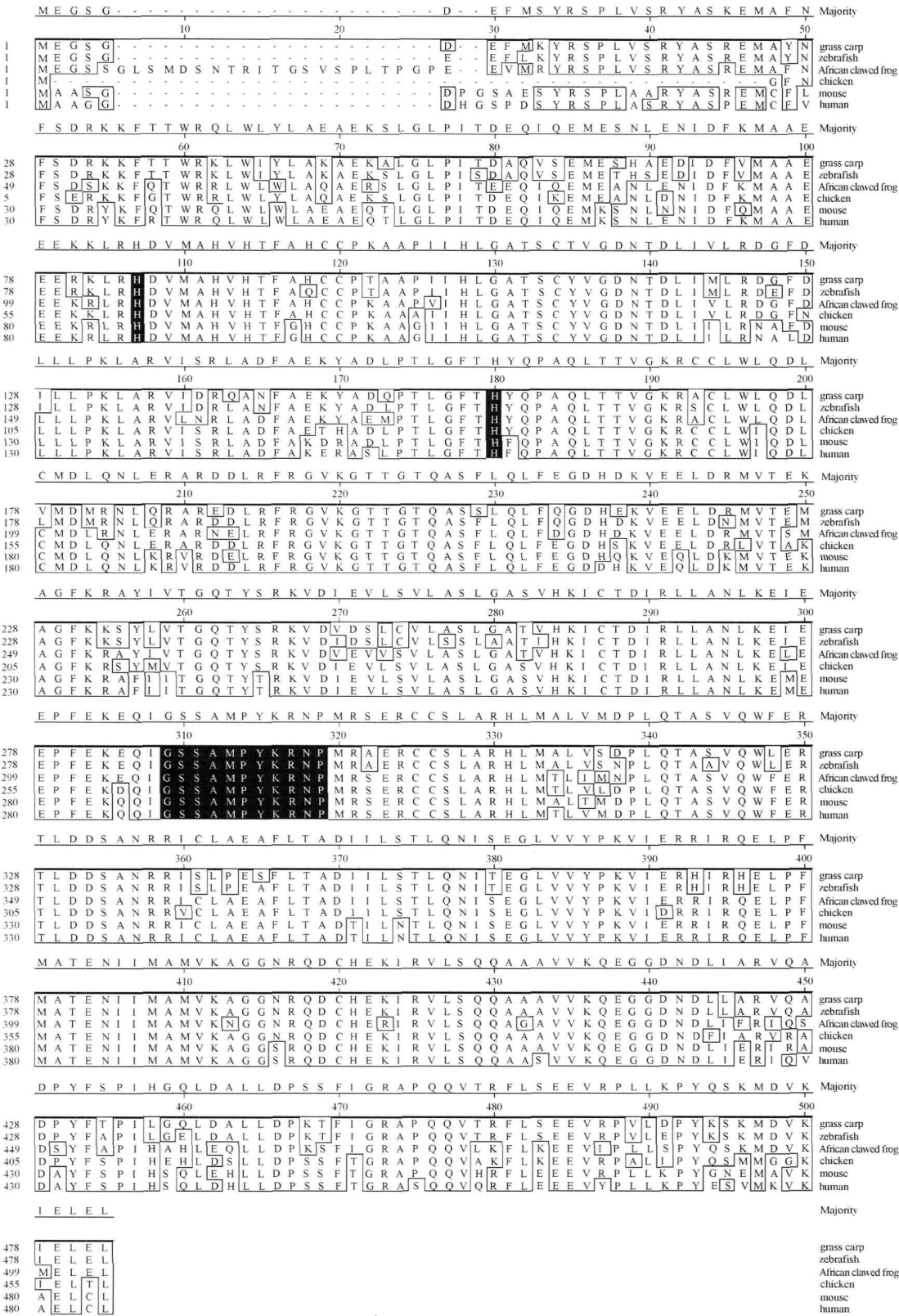


图 3 六种脊椎动物 ADSL 氨基酸序列比对

Fig 3 Alignment of the amino acid sequences of adenylosuccinate lyase from six vertebrates

矩形框中的序列表示相同的氨基酸残基; 参与 β -消除反应的标签序列, 参与一般的酸-碱催化的两个组氨酸残基用黑色背景表示

Identical amino acids are boxed the highly conserved signature for β -elimination reactions and two histidine residues for general acid-general base catalysis are presented against a black background

3 讨 论

3.1 草鱼 ADSL 氨基酸序列特征分析

本研究从草鱼肠道 cDNA 文库中筛选到 *ADSL* 基因的部分 cDNA 序列,应用 PCR、RT-PCR 和 RACE 技术,首次成功获得了草鱼肠道组织 *ADSL* 基因的 cDNA 全长和基因组 DNA 全长。序列分析表明草鱼 *ADSL* 全长 cDNA 包含一个 1449 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码

482个氨基酸残基。将草鱼 *ADSL* 氨基酸序列与其他 5 种脊椎动物 *ADSL* 氨基酸序列进行比对 (图 3), 结果显示,草鱼 *ADSL* 氨基酸序列与之前报道的 5 种脊椎动物的 *ADSL* 氨基酸序列有较高的同源性。其中,草鱼与斑马鱼的同源性最高 (94.6%)。比对同时发现,各物种间的 *ADSL* 氨基酸序列 N 端的氨基酸残基数目有差别,这有可能由进化方向不同引起的,这与进化树所显示的情况相同。

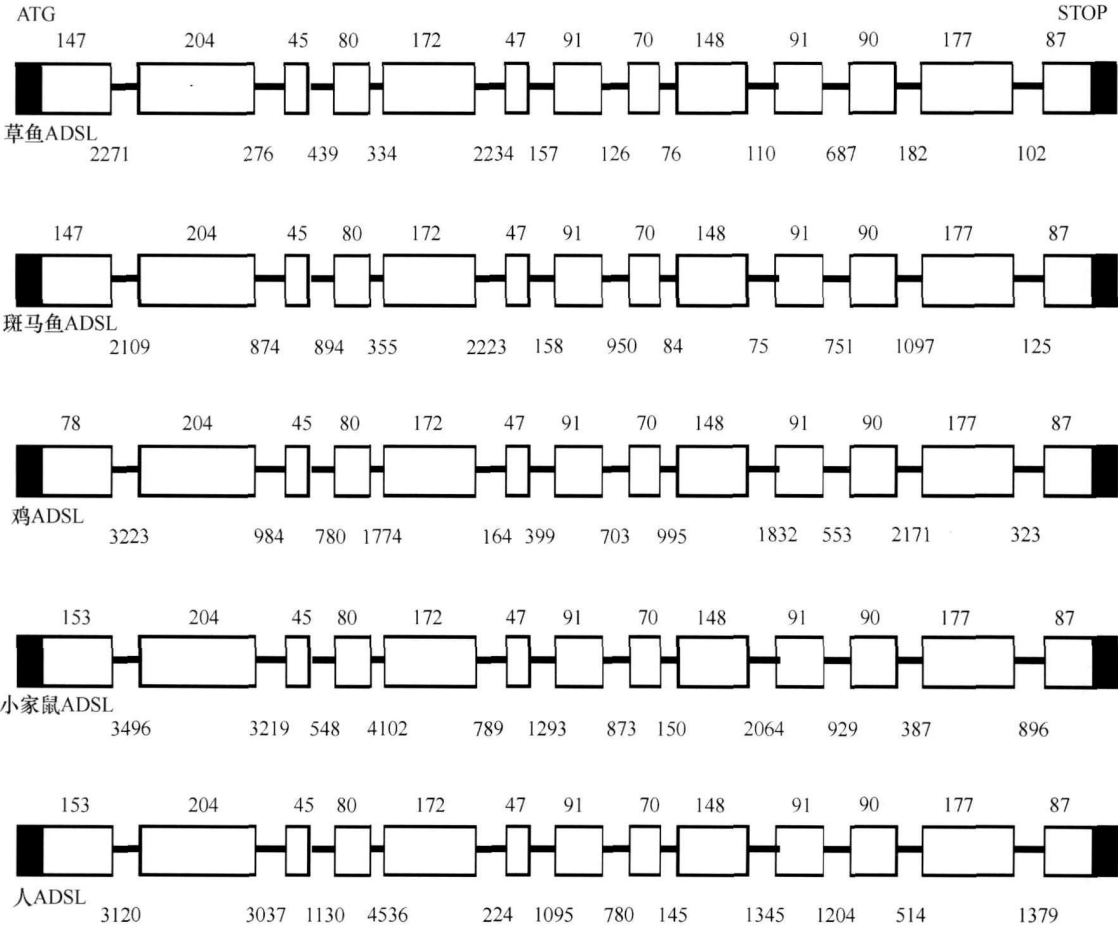


图 4 草鱼、斑马鱼、鸡、小鼠和人 *ADSL* 基因结构的比较

Fig 4 Genomic structure of the grass carp *ADSL* gene compared of those of zebrafish, chicken, mouse and human
矩形表示外显子, 细线表示内含子, 阴影部分表示非翻译区, 翻译起始和终止密码子被标明

The thirteen exons are indicated by rectangles and twelve introns by lines. The sizes of exons are indicated above the exons and the sizes of introns are indicated below the introns. The translation start and termination codons are indicated. Shaded areas indicated untranslated regions (UTRs).

在图 4 中, 一个由 11 个氨基酸残基 (GSSA-MPYKRNP) 组成的片段在 6 种脊椎动物中是高度保守的。而该段氨基酸序列在延胡索酸酶中也是高度保守的, 这段序列被认为是能够催化 β -消除反应这一类酶的标签序列, 即含有此段氨基酸的酶可以催化 β -消除反应, 此类酶的催化产物为延胡索酸^[6]。在嘌呤核苷酸的生物合成过程中, *ADSL* 通过酸-碱催化机制催化 β -消除反应, 因此它属于能够催化 β -

消除反应这类酶家族的成员, 该类酶家族成员的活性形式都是同源四聚体, 而且有典型的折叠构造^[11]。既然 *ADSL* 也属于该类酶家族的成员, 因此我们推断草鱼 *ADSL* 的活性形式也应该为四聚体。Lee *et al.*^[12] 在研究枯草杆菌的 *ADSL* 时发现, 位于同源四聚体的各个亚单位上的两个组氨酸残基 (His68 和 His141) 是酸-碱催化的活性位点。与之对应的 6 种脊椎动物的 *ADSL* 氨基酸序列中, 这两

个氨基酸残基也是高度保守的, 由此推断, ADSL酶活性位点在进化的过程中是保守的。

3.2 草鱼 ADSL 基因组序列特征分析

目前, ADSL 基因序列在许多物种中得到了广泛的研究, 一些物种的 ADSL 基因结构和序列相继被报道, 包括人 (NC_000022)、小家鼠 (NC_000081)、鸡 (AY665559)和斑马鱼 (NC_007114)等, 令人感兴趣的是, 它们外显子和内含子的数目完全相同 (均有 13 个外显子和 12 个内含子), 我们分析草鱼 ADSL 基因的结果也是如此。5 种脊椎动物 ADSL 基因的结构比较发现 (图 4), 除第一个外显子的碱基数目有差别外, 其余的外显子碱基数目完全相同, 且拼接位点高度保守, 可见该基因在进化过程中结构和功能区域是相当保守的, 物种间的差异主要体现在内含子上。比较同时发现, 草鱼和斑马鱼的第 9 个内含子 5'端并非 GT, 而是 GC, 这个很少的剪接位点经实验证明, 在 mRNA 的剪接过程中能够被准确地切开, 尽管比切开 GT 序列的速度要慢得多。这种现象只出现在鱼类中, 人、小家鼠和鸡则没有这种现象。这可能是由于在适应陆生生活的过程中, 为了满足嘌呤核苷酸快速合成的需要而进化产生的。本研究首次成功获得了草鱼腺苷酸琥珀酸裂解酶 cDNA 全长序列和基因组 DNA 序列, 研究了该基因的结构, 分析了其物种间的同源性, 探讨了其行使催化能力的功能区域位置及与其他动物的区别, 从而对于研究其重组蛋白在生产中的应用提供重要的理论依据。

参考文献:

[1] He B, Smith JM, Zalkin H. *Escherichia coli* *puB* Gene cloning nucleotide sequence and regulation by *purR* [J]. *Bacteriol* 1992, **174**: 130—136

[2] Ebbold D J, Zalkin H. Cloning and characterization of a 12-gene cluster from *Bacillus subtilis* encoding nine enzymes for de novo

purine nucleotide synthesis [J]. *Biol. Chem.*, 1987, **262**: 8274—8287

[3] Toth E A, Worby C, Dixon J E, *et al.* The crystal structure of adenylosuccinate lyase from *Pyrobaculum aerophilum* reveals an intracellular protein with three disulfide bonds [J]. *J Mol Biol* 2000, **301**: 433—450

[4] Klein SL, Strausberg R L, Wagner L, *et al.* Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NH *Xenopus* initiative [J]. *Dev Dyn* 2002, **225**: 384—391

[5] Strausberg R L, Feingold E A, Grouse L H, *et al.* Generation and initial analysis of more than 15 000 full-length human and mouse cDNA sequences [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 16899—16903

[6] Amin J, Badyak J, Williams J, *et al.* Cloning of a cDNA encoding adenylosuccinate lyase by functional complementation in *Escherichia coli* [J]. *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**: 9011—9014

[7] Wong L J, O'Brien W E. Characterization of the cDNA and the gene encoding murine adenylosuccinate lyase [J]. *Genomics* 1995, **28**: 341—343

[8] Stone R L, Amin J, Barshop B A, *et al.* A mutation in adenylosuccinate lyase associated with mental retardation and autistic features [J]. *Nat Genet*, 1992, **1**: 59—63

[9] Zhang X J, Qu G, Zhu W L, *et al.* Construction of intestinal cDNA library and analysis of some expressed sequence tags sequencing of *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(2): 251—258 [张学俊, 屈刚, 朱文漓, 等. 草鱼肠道 cDNA 文库构建及部分 EST 分析. 水生生物学报, 2007, **31**(2): 251—258]

[10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edition) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002, 857—980

[11] Toth E A, Worby C, Dixon J E, *et al.* The crystal structure of adenylosuccinate lyase from *Pyrobaculum aerophilum* reveals an intracellular protein with three disulfide bonds [J]. *J Mol Biol* 2000, **301**: 433—450

[12] Lee T T, Worby C, Bao Z Q, *et al.* His68 and His141 are critical contributors to the intersubunit catalytic site of adenylosuccinate lyase of *Bacillus subtilis* [J]. *Biochemistry*, 1999, **38**(1): 22—32

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF ADENYLOSUCCINATE LYASE cDNA AND GENOMIC DNA IN GRASS CARP

QU Gang^{1,2}, GU Ji-Ru^{1,2}, GU Wen-Bo¹, ZHU Wen-Li¹, WU Jiang², LIU Han-Yuan² and XU Heng^{1,2}

(1. Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment (Ministry of Education), College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064; 2. Tongwei Group Co. Ltd, Chengdu 610081)

Abstract *Ctenopharyngodon idellus*, which is common known as grass carp is a kind of large cyprinoid fish in China. It lives in both north and south water of China and is the most important fish in Chinese fresh water aquaculture. Grass carp can efficiently transform vegetable protein into high-quality animal protein. So people call the grass carp “cattle and sheep

in water". The intestine of grass carp is the main part for nutrition digestion and the functional genes from the intestinal cell are tightly connected with the efficient transformation of vegetable protein and animal protein. Adenylosuccinate lyase (ADSL) gene encoding enzymes involved in two pathways of purine nucleotide metabolism are of considerable biological and medical importance. It catalyzes two similar but separate reactions in the *de novo* purine biosynthesis pathway. Now, we are trying to build a connection between grass carp genome project and the industrialization of function feedstuff depended on the information that we have got from this research. In this research, we clone the full length cDNA and genomic DNA of ADSL from grass carp intestine, which is very important in the purine metabolism. The cDNA sequence of Grass Carp ADSL gene contains complete ORF starting at nucleotide 64 with a stop codon at nucleotide 1510—1512. The translated region is of 1446 nucleotides with full open reading frame (ORF) comprising 482 codons preceded by a 5'-untranslated region of 63 nucleotides and followed by 3'-untranslated region of 75 nucleotides. The typical polyadenylation signal AATA-AA is found 13bp upstream of the polyA tail. The predicted mass of encoded protein is 54 552 Da with a calculated isoelectric point of 6.72 and -4.11 charges at pH 7. The ADSL amino acid sequence of grass carp has classical "signature" sequence of enzymes that catalyzing β -elimination reactions and two conservative histidine residues as general acid-base catalysis active site. The deduced amino acid sequence shares high homology with other five vertebrates ADSL and has 94.6% similarity with *Danio rerio*, 78.5% with *Xenopus laevis*, 70.8% with *Gallus gallus*, 76.2% with *Mus musculus* and 76.0% with *Homo sapiens*. To obtain the grass carp ADSL genomic DNA, we design four pairs primers based on the full length cDNA of ADSL and result 8557bp ADSL genomic DNA of grass carp which encompass 13 exons and 12 introns. The splice sites are well conserved through evolution, and observe the regulation of GT-AG except for the ninth intron whose 5' site was GC. The alignment of five vertebrates ADSL genomic DNA sequence indicate that they have the same numbers of intron and exon, and the number of base pairs is identical in 2—12 exons. This reveals that the structure of ADSL gene is well conserved through evolution in exon.

Key words Grass carp; Intestine; Adenylosuccinate lyase; Cloning; Sequence analysis