

龚 静,林 森,徐亚欧,等. 泸宁鸡 *MyoD* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):53-57.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.015

# 泸宁鸡 *MyoD* 基因的克隆及生物信息学分析

龚 静<sup>1</sup>, 林 森<sup>2</sup>, 徐亚欧<sup>2</sup>, 贺庆华<sup>2</sup>, 林亚秋<sup>2</sup>

(1. 四川广播电视大学农林卫生学院, 四川成都 610073; 2. 西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041)

**摘要:**为了研究 *MyoD* 基因在鸡生长发育与肉质形成中的作用,以泸宁鸡为研究对象,采用 RT-PCR 技术克隆 *MyoD* 基因序列,并利用生物信息学的方法,对其氨基酸同源性、理化性质等进行分析 and 预测。结果表明:泸宁鸡 *MyoD* 基因序列长度为 988 bp,其编码的蛋白含 299 个氨基酸残基,具有碱性螺旋-环-螺旋结构(bHLH);根据 *MyoD* 基因比对,构建的进化树显示泸宁鸡与人等哺乳动物的同源性为 63%~67%,与原鸡、绿头鸭、游隼的同源性为 94%~99%。

**关键词:***MyoD* 基因;基因克隆;泸宁鸡;生物信息学

**中图分类号:** S831.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0053-05

自 Davis 等首次对人类生肌决定因子(myogenic determining factor, *MyoD*) 进行克隆以来,生物学家对该基因的结构特征及生物学功能产生了浓厚兴趣<sup>[1]</sup>; *MyoD* 在肌肉生成早期分化过程中和成肌细胞增殖阶段进行表达,主要参与生肌过程<sup>[2]</sup>,具有决定肌卫星细胞能否成为肌肉干细胞的功能,并控制着整个肌肉的发育过程<sup>[3-5]</sup>,属于初级生肌调节因子(MRFs)。由于 *MyoD* 基因产物在多种分化细胞向肌细胞转

化的过程中扮演了重要角色,因此,近年来在动物肉质改良育种工作中,对该基因的研究成为热点。对于成年动物而言, *MyoD* 基因可以调节控制肌细胞的增殖、分化和肌肉组织的增生<sup>[6]</sup>。Akizawa 等学者研究表明, *MyoD* 可与肌球蛋白、肌细胞生成素及肌酸激酶 CK 等基因的启动子区结合,正调控骨骼肌的生长发育<sup>[7-8]</sup>。Liu 在研究火鸡胚胎发育时发现,随着火鸡的胚胎发育, *MyoD* 的 mRNA 表达量呈显著下降趋势<sup>[9]</sup>。Gayraud-Morel 等学者指出了, *MyoD* 和 *Myf5* 表达量在成年动物的骨骼肌发育有关<sup>[6]</sup>。国外学者 Powell 等、国内学者李娟等研究发现,营养状况对动物肌卫星细胞的分裂活性以及肌肉发育有重要影响,并且赖氨酸、蛋氨酸、胱氨酸及亮氨酸的浓度与 *MyoD* 蛋白表达水平有着正相关关系<sup>[10-16]</sup>,以上均表明 *MyoD* 在动物肌肉生长中具有不可或缺的调控作用。

基于上述研究,对 *MyoD* 的功能研究显得尤为重要,但目

收稿日期:2016-04-04

基金项目:四川省畜禽育种攻关项目(编号:2016NZ0099-36)。

作者简介:龚 静(1974—),男,四川渠县人,硕士,讲师,主要从事微生物分子生物学研究。E-mail:gongjing397@163.com。

通信作者:贺庆华(1977—),男,四川彭州人,博士,副教授,主要从事分子生物学研究。E-mail:341400255@qq.com。

2008,18(1):6-14.

[2] Adachi H, Fujiwara Y, Kondo T, et al. *Angptl 4* deficiency improves lipid metabolism, suppresses foam cell formation and protects against atherosclerosis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 379(4):806-811.

[3] Aronsson L, Huang Y, Parini P, et al. Decreased fat storage by *Lactobacillus paracasei* is associated with increased levels of angiopoietin-like 4 protein (ANGPTL4) [J]. *PLOS One*, 2010, 5(9):13087.

[4] Kaddatz K, Adhikary T, Finkernagel F, et al. Transcriptional profiling identifies functional interactions of TGF  $\beta$  and PPAR  $\beta/\delta$  signaling: synergistic induction of *angptl 4* transcription [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(38):29469-29479.

[5] Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, et al. Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(46):17450-17455.

[6] Lichtenstein L, Berbée J F, van Dijk S J, et al. *Angptl 4* upregulates cholesterol synthesis in liver via inhibition of LPL- and HL-dependent hepatic cholesterol uptake[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis*

and Vascular Biology, 2007, 27(11):2420-2427.

[7] 朱洪新,李锦军,覃文新,等. 新基因 *ANGPTL4* 的克隆及其在血管新生中的功能研究[J]. *中华医学杂志*, 2002, 82(2):94-99.

[8] Köster A, Chao Y B, Mosior M, et al. Transgenic angiopoietin-like (*angptl*) 4 overexpression and targeted disruption of *angptl4* and *angptl3*: regulation of triglyceride metabolism [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(11):4943-4950.

[9] Xu A, Lam M C, Chan K W, et al. Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(17):6086-6091.

[10] 马 云. 牛三个基因的分离、定位及其牛经济性状的关联研究[D]. 杨凌:西北农业科技大学, 2006.

[11] Nei M, Tajima F, Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1983, 19(2):153-170.

[12] Valizadeh M, Kang K K, Kanno A, et al. Analysis of genetic distance among nine *Medicago* species by using DNA polymorphisms [J]. *Breeding Science*, 1996, 46(1):7-10.

前研究多集中于猪、牛、山羊等动物<sup>[17-21]</sup>,而关于禽类 *MyoD* 基因特征研究报道相对较少,并尚未见在泸宁鸡的研究中报道。泸宁鸡作为四川凉山州肉蛋兼用型的优质地方养殖鸡种,胸腿肌占胴体质量比例较大,耐粗饲,抗病力强,是一个有发展前途的地方良种鸡<sup>[22]</sup>。因此,本研究以泸宁鸡为研究对象,通过克隆 *MyoD* 基因,并分析其基因及编码蛋白特征,探讨 *MyoD* 基因在泸宁鸡生长、发育过程中的作用具有实际的理论和应用价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验动物及试剂

试验用的泸宁鸡采自四川省凉山州冕宁县原生农业有限公司,屠宰后迅速采其肌肉组织样品置于液氮中以备用;主要试剂为: *Taq* 酶及 DH5 $\alpha$  感受态细胞[天根生化科技(北京)有限公司产品],转化载体 pMD19-T 及反转录试剂盒(大连 TaKaRa),Trizol 试剂(Invitrogen 公司),胶回收试剂盒(博大泰克生物技术有限公司)。

### 1.2 *MyoD* 基因引物的设计与合成

依据原鸡的 *MyoD* 基因序列(GenBank 中登录号为 NP\_989545.2)设计扩增 ORF 的上、下游引物(设计软件为 Premier 5.0)[PF(上游),5'-ACCGCCATCTCACCCCACTC-3';PR(下游),5'-TGGCTGAACGGAGCAATTTGTT-3'],送往生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.3 泸宁鸡 *MyoD* 基因克隆

泸宁鸡肌肉组织样中的总 RNA 提取办法参考梅寒等在泸宁鸡 *MyoG* 基因克隆中的办法<sup>[23]</sup>。经分光光度仪检测,将质量符合要求的泸宁鸡总 RNA 进行反转录,得到的产物进行 PCR 扩增,25  $\mu$ L 反应体系包括:PF 和 PR 各 1  $\mu$ L,cDNA 1  $\mu$ L,9.5  $\mu$ L 灭菌去离子水,最后加 *Taq* 酶 12.5  $\mu$ L。其反应条件分别为:在 94  $^{\circ}$ C 温度下预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 45 s 35 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。胶回收,凝胶电泳检测得到目的条带产物,连接于 pMD-19T 载体(温度为 16  $^{\circ}$ C,时间为 45 min),转入感受态细胞(DH5 $\alpha$ ),提取经筛选得到阳性克隆质粒,送 Invitrogen 公司测序。

### 1.4 泸宁鸡 *MyoD* 基因氨基酸残基序列分析

克隆测序所得的 *MyoD* 序列经软件拼接并翻译成相应氨基酸序列(DNAMAN 软件),并利用该软件对比分析泸宁鸡与其他物种之间的同源关系,制作进化树。利用上述翻译得到的蛋白质氨基酸残基序列,通过在线软件(www.expasy.org)分析 *MyoD* 蛋白质的分子量、等电点等理化性质,通过在线软件(www.cbs.dtu.dk/services/)对其信号肽序列、蛋白磷酸化位点、N-糖基化位点及 O-糖基化位点进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 提取结果

利用上述方法提取到泸宁鸡肌肉组织样中的总 RNA。由图 1 可知,虽然 5S 较浅,但容易分辨出 28S、18S,条带非常清楚,说明泸宁鸡的总 RNA 提取是比较完整的。再用分光光度仪检测发现  $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$  的值介于 1.8~2.0,表明提取的泸宁鸡总 RNA 纯度符合进一步试验的要求。

### 2.2 泸宁鸡 *MyoD* 基因 cDNA 的克隆

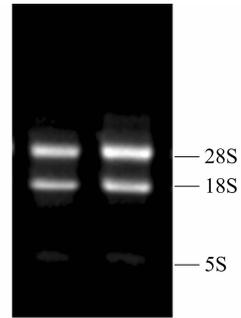


图1 泸宁鸡总 RNA 凝胶电泳结果

由图 2 可知,泸宁鸡 *MyoD* 基因采用 RT-PCR 技术扩增获得长度为 988 bp 的特异性条带,得到的核苷酸及推测出对应的氨基酸残基序列。位于 40 bp 位点的 ATG 作为 *MyoD* cDNA 的起始密码子,其终止密码子居于 937 bp 处,整个序列包括完整的开放阅读框(ORF)共编码 299 个氨基酸,其中核苷酸序列的碱基组成分别为 A=23.4%、T=15.4%、C=33.8%、G=27.3%。

### 2.3 泸宁鸡 *MyoD* 蛋白保守结构域预测

由图 3 可知,经 DNAMAN 软件处理克隆得到 988 bp 长度的泸宁鸡 *MyoD* 基因序列,得到 1 个由 299 个氨基酸残基组成的一级结构编码序列,该序列清楚地反映 *MyoD* 蛋白具有保守的碱性螺旋-环-螺旋结构区域(basic helix-loop-helix, bHLH)。

根据 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测结果发现,泸宁鸡 *MyoD* 蛋白包括 2 个低组分复杂性区域(从 196~208 个氨基酸,从 220~231 个氨基酸)和 1 个 b-HLH 结构域(螺旋-环-螺旋结构域,从 107~158 个氨基酸)。

### 2.4 蛋白二级结构及三级结构预测

通过在线软件 NPSA([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html))分析结果推测泸宁鸡 *MyoD* 蛋白具有的二级结构(图 4),结果显示,泸宁鸡 *MyoD* 编码的蛋白中含 299 个氨基酸残基,其中 58 个(19.40%)氨基酸残基可能形成  $\alpha$ -螺旋(h),34 个(11.37%)氨基酸残基可能形成延伸链,207 个(69.23%)氨基酸残基可能形成无规则卷曲结构(c)。用在线软件 Swiss model 预测 *MyoD* 蛋白的三级结构,结果显示该蛋白为螺旋-环-螺旋二聚体,这与上面蛋白质保守结构预测结果是一致的。

### 2.5 蛋白理化性质分析

在线(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析结果表明,泸宁鸡 *MyoD* 蛋白分子式为  $C_{1409}H_{2198}N_{422}O_{468}S_{19}$ ,包括 299 个氨基酸残基,其中带负电荷的谷氨酰胺(Glu)残基和天冬酰胺(Asp)残基总共为 41 个,带正电荷的精氨酸(Arg)残基和赖氨酸(Lys)残基总共为 30 个。由此可以看出,*MyoD* 蛋白中负电荷氨基酸残基总数多于正电荷,可推定该蛋白可能带负电荷。其分子量 33.15 ku,结合不稳定系数为 69.54,理论等电点为 5.74,平均疏水指数为 -0.787。

### 2.6 蛋白磷酸化与糖基化位点预测结果分析

通过在线预测软件(<http://www.cbs.dtu.dk/>)对 *MyoD* 蛋白氨基酸序列进行磷酸化位点及糖基化位点进行预测,结果发现具有 32 个磷酸化位点及 17 个糖基化位点,其中含有

```

1      ACOGCCATCTCAACCCCACTCCGCGTTCCAGTCGCCCCCATGGACTTACTGGGCCCCATG..
1      T A I S P H S A F P V A P M D L L G P M ..
61     GAAATGACGGAGGGGCTCCCTTTGCTCCTTCACGGCCCGGATGACTTCTATGACGACCCG..
21     E M T E G S L C S F T A A D D F Y D D P ..
121    TGCTTCAACACGTCAGACATGCACCTTCTTGGAGGACCTGGACCCCGGCTGGTGCACGTC..
41     C F N T S D M H F F E D L D P R L V H V ..
181    GGGGGCTGCTGAAGCCCGAGGACACCCGACCCACCGGGACCCACCGGGAACCCA..
61     G G L L K P E E H P H H H H G N P ..
241    CACGAGGAGGAGCAGTGGCGGGGCCAGTGGGCACCACCAGGCGGGCGCTGCTGCTG..
81     H E E E H V R A P S G H H Q A G R C L L ..
301    TGGGOGTCAAGGCTGCAAGAGGAAGACCACCAACCGCTGACCGCCGCAAAAGCCGCCAC..
101    W A C K A C K R K T T N A D R R K A A T ..
361    ATGAGGGAACGGCGGGCTCAGCAAGTCAACGAGGCCCTTGAGACCCCTCAAGGCTGC..
121    M R E R R R L S K V N E A F E T L K R C ..
421    ACTTCCACCAACCCCAACCAGCGCTGCCAAGGTGGAGTCTCGGCAACGCCATCCGC..
141    T S T N P N Q R L P K V E I L R N A I R ..
481    TACATCGAGAGCCTGCAGGCGCTGCTGGTGGAGCAGGAGGATGCATACACCCAGTGTG..
161    Y I E S L Q A L L R E Q E D A Y Y P V L ..
541    GAGCACTACAGCGGGGAGTCAGATGCCTCCAGCCCTGCTCCAACCTGCTCCGATGGCATG..
181    E H Y S G E S D A S S P R S N C S D G M ..
601    ATGGAGTACAGCGGGCGCCCTGTAGCTCTGGCAGGAGAAACAGTACGACAGCAGCTAC..
201    M E Y S G P P C S S R R R N S Y D S S Y ..
661    TACACGGAATCAACAAATGACCCAAAGCATGGGAAGAGTCTGTTGTTCCAGCCTCGAC..
221    Y T E S P N D P K H G K S S V V S S L D ..
721    TGCCCTCAAGCATTGTGGAGAGGATTCCACAGCAACTCCACATGTCOCATAGTGCCT..
241    C L S S I V E R I S T D N S T C P I L P ..
781    CCAGCTGAAGCTGTAGCTGAAGGGAGTCCCTGTTCCCGCCAGGAGGACAAACCTGAGT..
261    P A E A V A E G S P C S P Q E G A N L S ..
841    GACAGTGGAGCCAGATCTCTCCCGCCCAACTGCACCCCTCTTCCCGAGAAAGCAGC..
281    D S G A Q I P S P T N C T P L P Q E S S ..
901    AGCAGCAGCAGCAGCAATCCAATCTACCAAGTGTATAAAGGCAGGTCCAGCGGACTGC..
301    S S S S S N P I Y Q V L * R Q V Q P D C ..
961    ACCGAGAACAATTGCTCCGTTTCAGCCA..
321    T E N K L L R S A ..
    
```

首尾两端灰色底色片段表示克隆所用引物；“\*”表示终止密码子；107~158为螺旋-环-螺旋结构域；196~208、220~231个氨基酸的2个白色框为2个低组分复杂性区域

图2 泸宁鸡 *MyoG* 基因核苷酸及推测的氨基酸序列



“BASIC”表示碱性区域；“HLH”表示螺旋-环-螺旋结构；2个小短形表示2个低组分复杂性区域

图3 泸宁鸡 *MyoD* 基因氨基酸序列碱性区域及螺旋结构

22个丝氨酸(Ser)磷酸化位点、5个苏氨酸(Thr)磷酸化位点、5个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点、3个N-糖基化位点及14个O-糖基化位点。

### 2.7 蛋白质疏水性分析

采用 ExPASy 软件工具的 ProtScale 程序 (<http://web.expasy.org/protscale/>) 推测泸宁鸡 *MyoD* 基因所编码蛋白的亲水、疏水性。结果显示,最强疏水性位于第89位氨基酸处,其值为1.544;最强亲水性位于第56位氨基酸处,其值为-2.989。按分值大小(Score > 1.5)划分发现,具有极少的疏水性序列,但亲水性高的区域具有多个,大部分氨基酸属于亲水性氨基酸,这与理化性质中的预测结果相一致。

### 2.8 蛋白信号肽及跨膜结构分析

通过软件 TargetP 和 TMHMM 在线进行在线推测发现,泸宁鸡 *MyoD* 蛋白不具备信号肽及跨膜螺旋结构存在的条件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)。

### 2.9 蛋白亚细胞定位及蛋白相互作用分析

通过 PSORT II 预测,该蛋白主要在核(87.0%)、细胞质

(8.7%)和细胞骨架(17.4%)上发挥生物学作用。

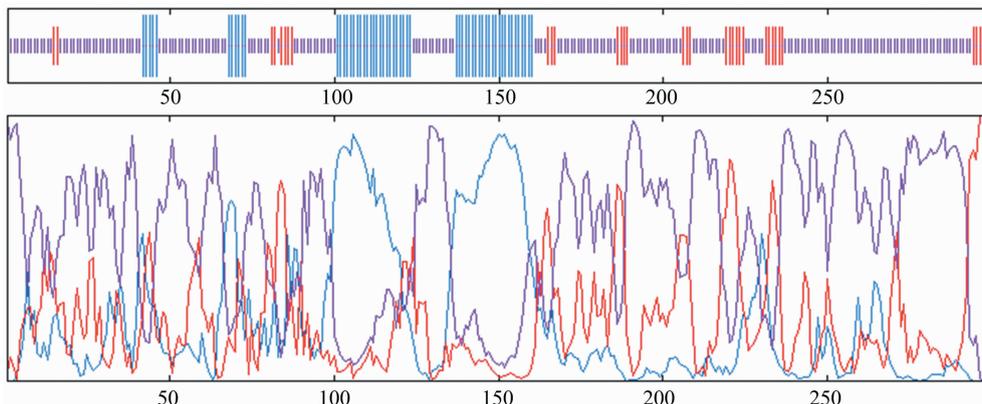
由图5可知,利用 STRING 交互式数据库进行搜索 *MyoD* 蛋白相互作用,条件限制在10个蛋白以内。搜索结果表明, *MyoD* 蛋白(即图5中的 *MyoD1* 蛋白)可能和 SMAD3、TCF3、MEF2A、MYH1、PAX7、MYB、KAT2A、KAT2B、MEF2C、MEF2D 等10个蛋白存在相互作用。

### 2.10 泸宁鸡 *MyoD* 基因及其编码氨基酸序列与其他物种同源性的对比分析

通过 GenBank 中登录的禽类及其他物种的氨基酸序列与泸宁鸡 *MyoD* 蛋白氨基酸序列进行同源性对比分析(表1)及构建物种间进化树进行聚类分析(图6)可知,泸宁鸡与其他禽类的 *MyoD* 基因有较高的同源性,与人、猪等哺乳动物的同源性较低。

## 3 结论与讨论

自人类发现并克隆 *MyoD* 基因<sup>[1]</sup>以来,生物学家对 *MyoD* 基因的研究从未停止。Charge 等在研究中发现, *MyoD* 基因在肌肉发育初对成肌前体细胞能否转化成肌肉细胞具有主宰作用,并且能够促进转化成的肌肉细胞增殖<sup>[24]</sup>。Tapscott 等通过将小鼠的 *MyoD* 基因转入成纤维细胞试验,发现该细胞在 *MyoD* 基因诱导下出现了成肌作用,证实 *MyoD* 与肌肉发育两者之间确实存在关联<sup>[25]</sup>。 *MyoD* 基因相对于其他生肌调节因子(myogenic regulatory factors, MRFs)而言,在肌肉细胞系



图中含有58个氨基酸残基的蓝色区域可形成 $\alpha$ -螺旋;含有34个氨基酸残基的红色区域构成延伸链;含有207个氨基酸残基的紫色区域可形成无规则卷曲

图4 MyoD 蛋白二级结构预测结果

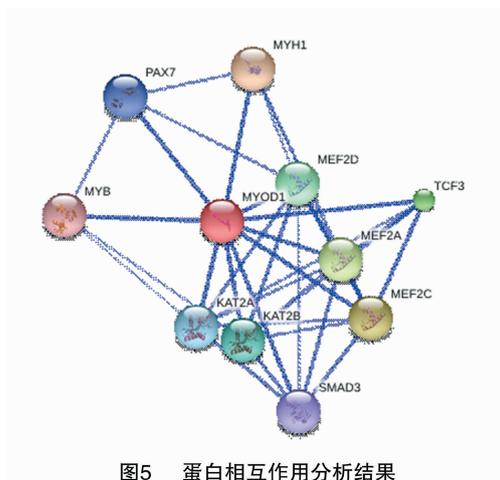


图5 蛋白相互作用分析结果

表1 泸宁鸡 MyoD 氨基酸序列与其他已知物种的氨基酸序列比对结果

种类	氨基酸相似性 (%)	GenBank 注册号
人 ( <i>Homo sapiens</i> )	63	NP_002469.2
鸡 ( <i>Gallus gallus</i> )	99	NP_989545.2
绿头鸭 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	94	NP_001297287.1
游隼 ( <i>Falco peregrinus</i> )	96	XP_005236344.1
牛 ( <i>Bos taurus</i> )	67	NP_001035568.2
猪 ( <i>Sus scrofa</i> )	65	NP_001002824.1
小鼠 ( <i>Mus musculus</i> )	66	NP_034996.2
斑马鱼 ( <i>Danio rerio</i> )	75	NP_571337.2

的分化过程中、骨骼肌成肌形成时、脊椎动物胚胎期肌肉发育期均起到关键作用,该基因缺失可直接致使成肌细胞的增殖和分化无法顺利完成<sup>[26-28]</sup>。因此,对泸宁鸡 MyoD 基因进行研究可在泸宁鸡的育种工作中,为改善泸宁鸡生长速度和肉质品质等后续研究奠定基础。

本研究克隆得到长度为 988 bp 的泸宁鸡 MyoD 基因片段,其核苷酸序列碱基组成中 GC 含量约为 61.1%,数值较高,容易推测该基因 DNA 密度较高,并具有热与碱均不易使之变性的较高稳定性。该基因共编码的 299 个氨基酸中含有 2 个低组分复杂性区域和 1 个 b-HLH 结构域,这与生肌调节因子(MRFs)家族的结构特征具有一致性<sup>[29]</sup>。在肌肉发生过程中,MyoD 基因与其他 3 个生肌调节因子一起各自发挥着不同的调节、控制作用<sup>[30]</sup>。

在线预测发现,磷酸化位点共有 32 个,糖基化位点 17 个。由此推定,MyoD 蛋白在骨骼肌生长发育中所起的开关作用在一定程度上与这些位点有着紧密的关系。通过 TargetP 和 TMHMM 推测可知,泸宁鸡 MyoD 蛋白不具有信号肽及跨膜螺旋结构,由此可推定该基因蛋白质类型应为非分泌型。

泸宁鸡 MyoD 基因编码的氨基酸序列与人等哺乳动物、鸡等禽类动物及斑马鱼等鱼类的同源性为 63%~99%,说明 MyoD 基因在不同的物种中作用方式可能存在一定差异<sup>[31]</sup>,保守性不算太高。进化树分析结果表明,该研究中泸宁鸡与鸡、游隼、绿头鸭的亲缘关系较近,与人、猪等哺乳动物的亲缘关系相对较远,这与传统的形态学分类和生化特征分类的进化地位是相吻合的,表明 MyoD 在用于物种与物种间的系统进化关系分析中具有一定的价值。本试验对该基因编码的蛋白分子性质主要是通过生物信息学进行预测的,仍须通过试验对该基因进行进一步研究。

参考文献:

[1] Davis R L, Weintraub H, Lassar A B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts[J]. Cell,1987, 51(6):987-1000.  
 [2]付石军,郭时金,阚德英,等. 牛肉质性状相关基因的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2013,40(9):158-165.

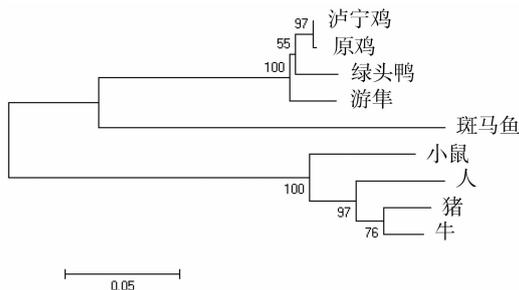


图6 通过 MyoD 基因编码的氨基酸序列对泸宁鸡与其他物种间的聚类分析结果

- [3] Francetic T, Li Q. Skeletal myogenesis and *Myf5* activation [J]. *Transcription*, 2011, 2(3): 109 – 114.
- [4] Dimicoli – Salazar S, Bulle F, Yacia A, et al. Efficient *in vitro* myogenic reprogramming of human primary mesenchymal stem cells and endothelial cells by *Myf5* [J]. *Biology of the Cell*, 2011, 103(11): 531 – 542.
- [5] Londhe P, Davie J K. Sequential association of myogenic regulatory factors and E proteins at muscle – specific genes [J]. *Skeletal Muscle*, 2011, 1(1): 14.
- [6] Gayraud – Morel B, Chrétien F, Flamant P, et al. A role for the myogenic determination gene *Myf5* in adult regenerative myogenesis [J]. *Developmental Biology*, 2007, 312(1): 13 – 28.
- [7] Akizawa Y, Kanno H, Kawamichi Y, et al. Enhanced expression of myogenic differentiation factors and skeletal muscle proteins in human amnion – derived cells via the forced expression of *MyoD1* [J]. *Brain & Development*, 2013, 35(4): 349 – 355.
- [8] Blum R, Dynlacht B D. The role of *MyoD1* and histone modifications in the activation of muscle enhancers [J]. *Epigenetics*, 2013, 8(8): 778 – 784.
- [9] Liu C, Mcfarland D C, Velleman S G. Effect of genetic selection on *MyoD* and myogenin expression in turkeys with different growth rates [J]. *Poultry Science*, 2005, 84(3): 376 – 384.
- [10] Powell D J, Mcfarland D C, Cowieson A J, et al. The effect of nutritional status on myogenic satellite cell proliferation and differentiation [J]. *Poultry Science*, 2013, 92(8): 2163 – 2173.
- [11] Averous J, Gabillard J C, Seiliez I, et al. Leucine limitation regulates *Myf5* and *MyoD* expression and inhibits myoblast differentiation [J]. *Experimental Cell Research*, 2012, 318(3): 217 – 227.
- [12] Gonçzaves E M, Salomão E M, Gomes – Marcondes M C. Leucine modulates the effect of walker factor, a proteolysis – inducing factor – like protein from walker tumours, on gene expression and cellular activity in C2C12 myotubes [J]. *Cytokine*, 2013, 64(1): 343 – 350.
- [13] Areta J L, Hawley J A, Ye J M, et al. Increasing leucine concentration stimulates mechanistic target of rapamycin signaling and cell growth in C2C12 skeletal muscle cells [J]. *Nutrition Research*, 2014, 34(11): 1000 – 1007.
- [14] 李 娟. 鸡生长发育和肌纤维生长的影响因素与相关基因表达研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
- [15] 孙作为. 饲养密度和饲料营养影响肉鸡生长、胴体组成及腿部健康的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2013.
- [16] 赵丽红, 马秋刚, 陈旭东, 等. 日粮代谢能和赖氨酸水平对 AA 肉鸡生长性能和屠宰性能的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2008, 44(23): 35 – 40.
- [17] Ujan J A, Zan L S, Wang H B, et al. Lack of an association between a single nucleotide polymorphism in the bovine myogenic determination 1 (*MyoD1*) gene and meat quality traits in indigenous Chinese cattle breeds [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2011, 10(3): 2213 – 2222.
- [18] Ropka – Molik K, Eckert R, Piórkowska K. The expression pattern of myogenic regulatory factors *MyoD*, *Myf6* and *Pax7* in postnatal porcine skeletal muscles [J]. *Gene Expression Patterns*, 2011, 11(1/2): 79 – 83.
- [19] Lee E A, Kim J M, Lim K S, et al. Effects of variation in porcine *MyoD1* gene on muscle fiber characteristics, lean meat production, and meat quality traits [J]. *Meat Science*, 2012, 92(1): 36 – 43.
- [20] Yamanouchi K, Hosoyama T, Murakami Y, et al. Satellite cell differentiation in goat skeletal muscle single fiber culture [J]. *The Journal of Reproduction and Development*, 2009, 55(3): 252 – 255.
- [21] Sato K, Aoki M, Kondo R, et al. Administration of insulin to newly hatched chicks improves growth performance via impairment of *MyoD* gene expression and enhancement of cell proliferation in chicken myoblasts [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 175(3): 457 – 463.
- [22] 刁运华. 四川遗传资源志: 10 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2009: 122 – 123.
- [23] 梅 寒, 徐亚欧, 吕 明, 等. 泸宁鸡 *MyoG* 基因的克隆及组织表达差异分析 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015, 479(11): 96 – 99.
- [24] Charge S B, Rudnicki M A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration [J]. *Physiological Reviews*, 2004, 84(1): 209 – 238.
- [25] Tapscott S J, Davis R L, Lassar A B, et al. *MyoD*: a regulatory gene of skeletal myogenesis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1990, 280: 3 – 6.
- [26] Rescan P Y. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2001, 130(1): 1 – 12.
- [27] Ye H Q, Chen S L, Xu J Y. Molecular cloning and characterization of the *Myf5* gene in sea perch (*Lateolabrax japonicus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2007, 147(3): 452 – 459.
- [28] Wzykowski J C, Winata T I, Mitin N, et al. Identification of novel *MyoD* gene targets in proliferating myogenic stem cells [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(17): 6199 – 6208.
- [29] Buckingham M. Making muscle in animals [J]. *Trends in Genetics*, 1992, 8(4): 144 – 8.
- [30] Carvajal J J, Rigby P W. Regulation of gene expression in vertebrate skeletal muscle [J]. *Experimental Cell Research*, 2010, 316(18): 3014 – 3018.
- [31] 刘宏祥, 徐文娟, 宋卫涛, 等. 高邮鸭群体 *MSTN*、*MyoD1* 和 *MyoG* 基因外显子中 SNP 位点的分析 [J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(3): 604 – 612.