

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00975

# 利用生物信息学方法对人类(*Homo sapiens*)肌肉增强因子 2(MEF2)的特性比较及进化分析

郭新军

西安文理学院生命科学系, 西安 710065

**摘要:** 肌肉增强因子 2(Myocyte enhancer factor 2, MEF2)是 MADS(MCM1, agamous, deficiens 和 serum response factor)家族成员之一, 在动物发育过程中起到重要的调节作用。为了进一步了解其调控的复杂性, 本文根据 NCBI 中已有的人类 MEF2 相关数据, 应用 ExPASy 在线序列分析工具、CBS 在线分析服务器软件、Conserved Domain Database(CDD)数据库、SABLE 在线分析软件等对人类 MEF2 蛋白的不同亚型序列进行比较分析, 同时, 根据相关序列的比对结果构建系统进化树进行分析。结果表明, MEF2 在人体内以多种蛋白形式存在, 其理化性质存在一定差别, 可能的翻译后糖基化修饰多为 O 型糖基化且均存在较多磷酸化位点。人类各 MEF2 蛋白具明显 MADS 结构域, 多数具有 MEF2 结构域和 HJURP\_C 结构域。各 MEF2 蛋白二级结构均包括了螺旋、折叠和无规则卷曲等多种形式, 其三级结构模式相似。系统进化树显示 MEF2B 蛋白与其他蛋白有着较大的序列差异及较远进化关系, 可能较为原始。

**关键词:** 人类肌肉增强因子 2; 生物信息学; 进化; 结构域; 序列比对

## Properties comparing and evolutionary analysis of MEF2 of *Homo sapiens* based on bioinformatic methods

GUO Xin-Jun

Department of Life Science, Xi'an University of Arts and Science, Xi'an 710065, China

**Abstract:** As one of the members of MADS family, MEF2 group is important in regulating development. Analytical tools of NCBI, ExPASy, CBS, CDD, and SABLE were adopted to analyze the properties of human MEF2 proteins, and evolutionary tree was built according to the result of correlative sequence alignments. The results showed that there are various forms of MEF2 in human body, and there are some differences in the physicochemical characteristics. Relatively more phosphorylation sites are found and the main glycosylation sites are N-glycosylation sites. All MEF2 proteins of human contain MADS domain, and most contain MEF2 domain and HJURP\_C domain. Their secondary structures contain three dominant states: helix, sheet and coil, their tertiary structures are similar. The phylogenetic tree result shows that MEF2B may be original because of its difference of sequences and evolutionary relation.

**Keywords:** human myocyte enhancer factor 2 (MEF2); bioinformatics; evolution; domain; sequence alignment

肌肉增强因子 2(Myocyte enhancer factor 2, MEF2)是 MADS 家族成员之一, 其 N 末端除了 MADS 结构

域之外, 还有一段独特的 MEF2 结构域<sup>[1]</sup>。在脊椎动物体内, 分别有 4 种基因编码 MEF2 蛋白, 即 *Mef2A*、

收稿日期: 2010-11-28; 修回日期: 2011-01-28

作者简介: 郭新军, 博士, 讲师, 研究方向: 动物学与发育生物学。Tel: 029-88253976; E-mail: yanzhiguojun@163.com

网络出版时间: 2011-7-27 15:48:07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110727.1548.006.html>

*Mef2B*、*Mef2C* 和 *Mef2D*，而在无脊椎动物体内只发现了一个 *Mef2* 基因<sup>[2]</sup>。各种基因都有可能形成多种转录产物(剪接体)，从而产生多种蛋白，可能与其复杂的功能有关。MEF2 于早期胚胎发育过程中在不同组织内开始表达，如爪蟾(*Xenopus laevis*)、斑马鱼(*Danio rerio*)和文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)的体节中胚层中<sup>[3-5]</sup>，并且其表达存在一定时空顺序，可以通过调控不同靶基因的表达，影响动物组织的发育。自从 MEF2 最早由小鼠(*Mus musculus*)肌细胞中分离出来以后<sup>[6]</sup>，其在动物体内的关键作用逐渐被人们所了解<sup>[7]</sup>。目前，除了对 MEF2 在不同物体内的表达情况及在肌肉发育中起到的重要作用进行研究外，研究者主要关注其上下游调控通路<sup>[8]</sup>及其在多种动物神经系统及其他组织发育中的功能<sup>[9,10]</sup>。关于 MEF2 表达情况对肌肉发育的影响已逐步被应用到医学研究中，如 MEF2C 将可能成为心脏肥大与心力衰竭治疗新的关注对象<sup>[11]</sup>，其在肌肉相关疾病治疗中的应用将会引起更多的关注。

关于人类 MEF2 在体内的作用已有一定的研究，而其不同蛋白产物在体内作用存在的差别研究较少。利用生物信息学方法可以对人类已知 MEF2 蛋白结构、分子进化等进行预测与分析，从而发现新的信息及规律，为进一步研究其功能及不同 MEF2 的关系提供理论支持。本文试图通过对人类 MEF2 蛋白进行生物信息学比较，了解各 MEF2 蛋白特性的差异，探讨与其功能的相关性，并通过系统进化分析各蛋白之间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 序列获得

通过 NCBI 搜索核酸、蛋白质等数据库中人类(*Homo sapiens*)*Mef2* 各基因相关序列信息，并对 MEF2 蛋白理化性质、化学修饰位点及高级结构等进行进一步分析。同时结合其他物种 MEF2 蛋白序列分析其系统进化(图 1)。

### 1.2 分析方法

应用 ExPASy 在线序列分析工具(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)，分析人类各 MEF2 蛋白氨基酸序列的理化特征<sup>[12]</sup>。同时利用 CBS 在线分析服务器软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)分析序列可能的翻译后修饰位点，均采用默认阈值<sup>[13,14]</sup>。

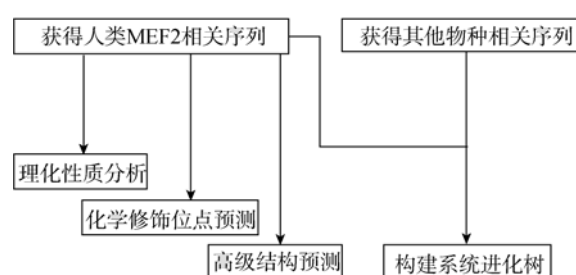


图 1 流程图

应用 NCBI 上的 Conserved Domain Database (CDD)数据库搜索分析人类各 MEF2 蛋白质结构功能域，E 值阈值选择默认的 0.01<sup>[15]</sup>。并应用 SABLE 在线分析软件(<http://sable.cchmc.org/>)及在同源建模服务器 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)上选用全自动模式(Automated Mode)等分别对各蛋白序列二级结构和三级结构进行预测分析<sup>[16]</sup>。

根据 ClustalX 1.83 比对结果比较人类 MEF2 蛋白不同亚型的特点。同时，为了研究 MEF2 进化特点，选取 NCBI 中不同进化地位的几个物种的相关序列，包括脊椎动物模式生物小鼠(*M. musculus*)、无脊椎动物模式生物黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、秀丽新小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)及进化地位位于脊椎动物和无脊椎动物之间的文昌鱼(*B. belcheri*)和玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*)等，与人类 MEF2 进行多序列比对，并用 Mega4.0 软件，选择邻接法(Neighbor-Joining)并自举(Bootstrap)1 000 次计算置信值，建立系统进化树<sup>[17-19]</sup>，对 MEF2 的进化情况进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列相关信息

通过搜索 NCBI 核酸、蛋白质等数据库，共查找到 4 个人类 *Mef2* 基因(*hMef2A*、*hMef2B*、*hMef2C*、*hMef2D*)，4 个基因分别位于不同染色体上。其中 *Mef2A* 和 *Mef2C* 均已发现可以形成多个不同的剪接体，除 *Mef2A* 剪接体 2 和 5 及 *Mef2C* 剪接体 1 和 6 外，均具有不同表达产物(表 1)，说明人类 *Mef2* 基因及其产物在人体内以多种形式存在。

### 2.2 理化性质与化学修饰

理化性质预测结果表明，人类 MEF2 蛋白理化性质存在一定差别，理论等电点差别最大的是 MEF2A

表 1 人类 *Mef2* 基因及相应蛋白序列基本信息

编号	基因	位置	剪接体	核酸序列号	蛋白序列号
1	<i>Mef2A</i>	染色体: 15; 区带: 15q26	1	NM_005587.2	NP_005578.2
2			2	NM_001130926.1	NP_001124398.1*
3			3	NM_001130927.1	NP_001124399.1
4			4	NM_001130928.1	NP_001124400.1
5			5	NM_001171894.1	NP_001165365.1*
6	<i>Mef2B</i>	染色体: 19; 区带: 19p13.11	—	NM_001145785.1	NP_001139257.1
7	<i>Mef2C</i>	染色体: 5; 区带: 5q14	1	NM_002397.4	NP_002388.2**
8			2	NM_001131005.2	NP_001124477.1
9			3	NM_001193347.1	NP_001180276.1
10			4	NM_001193348.1	NP_001180277.1
11			5	NM_001193349.1	NP_001180278.1
12			6	NM_001193350.1	NP_001180279.1**
13	<i>Mef2D</i>	染色体: 1; 区带: 1q12-q23	—	NM_005920.2	NP_005911.1

注: \*, \*\* 表示蛋白序列分别相同。

蛋白亚型 3; MEF2A 和 MEF2C 各亚型氨基酸成分最多的均为丝氨酸, 而 MEF2B 和 MEF2D 蛋白氨基酸组成最多的均为脯氨酸。除 MEF2A 亚型 3 和 4 外, 其余 MEF2 蛋白氨基酸成分最少的均为色氨酸, 差别不大。理化性质是通过蛋白序列预测的, MEF2 蛋白氨基酸序列组成情况决定了其理化性质。翻译后修饰位点预测结果表明人类 MEF2 蛋白可能的翻译后糖基化修饰多为 O 型糖基化, 且均存在较多磷酸化位点(表 2)。修饰位点类型与蛋白序列中氨基酸种类有关, 主要影响 MEF2 活性, 而各 MEF2 蛋白化学修饰位点多位于 C 末端, 说明了该不保守区域对调节蛋白功能起到重要作用。

2.3 结构域与结构分析

通过 NCBI 中 Conserved Domain Database(CDD) 数据库搜索发现, 人类各 MEF2 蛋白具明显 MADS 结构域, 除 MEF2A 亚型 3 和 4 之外, 均具有 MEF2 结构域, 而 MEF2A 亚型 1、2、5, MEF2C 亚型 1、2、3、6, MEF2D 均具有一个 HJURP\_C 结构域。而通过与无脊椎动物 MEF2 对比发现, 黑腹果蝇、丽蝇蛹集金小蜂(*Nasonia vitripennis*)等 MEF2 均未发现 HJURP\_C 结构域。MADS 结构域和 MEF2 结构域是 MEF2 蛋白主要标志, 与蛋白功能有关, 而 HJURP\_C 结构域有待于进一步研究。功能结构域均位于 N 末端, 其 C 末端未发现明确的功能结构域, 与其 C 末

表 2 人类 MEF2 蛋白序列理化性质及可能存在的翻译后修饰位点

编号	理论等电点	最多氨基酸 (%)	最少氨基酸 (%)	酸性氨基酸数	碱性氨基酸数	O 型糖基化位点数	N 型糖基化位点数	磷酸化位点数
1	9.07	Ser(13.2)	Trp(0.4)	39	45	18	2	48
2, 5	8.82	Ser(13.9)	Trp(0.4)	40	44	18	2	49
3	6.98	Ser(14.6)	Cys(0.2)	35	35	21	1	46
4	9.35	Ser(14.7)	Cys(0.2)	30	35	22	2	46
6	9.24	Pro(18.5)	Trp(0.5)	35	42	19	1	18
7, 12	8.14	Ser(14.4)	Trp(0.4)	44	46	11	3	43
8	9.12	Ser(14.3)	Trp(0.4)	39	47	11	3	41
9	8.85	Ser(14.1)	Trp(0.4)	44	50	11	3	43
10	9.30	Ser(14.9)	Trp(0.5)	30	38	12	3	35
11	8.87	Ser(13.7)	Trp(0.5)	32	36	8	2	34
13	7.73	Pro(13.1)	Trp(0.4)	44	45	11	3	31

端序列拼接特点一致(图 2)。不同的 MEF2 蛋白的功能结构域存在一定的差别, 其在体内的调控机制可能会有差异。

应用 SABLE 在线分析软件对人类 MEF2 进行二级结构预测, 结果表明, 各 MEF2 蛋白二级结构均为混合型, 包括了螺旋、折叠和无规则卷曲等多种形式, 且这种变化主要分布在序列 N 末端, C 末端结构多以无规则卷曲形式存在(图 3)。不同蛋白间存在一定区别, 如 MEF2A 亚型 1 等 N 末端多存在较大范围的折叠区, 而 MEF2A 亚型 3 和 4 N 末端多为螺旋形式(图未列)。二级结构主要是由主链的氢键维持的, MEF2 蛋白序列氨基酸的差异造成其二级结构的差异, 结构上的差别亦会影响到 MEF2 调控机能的差异。

三级结构预测结果表明人类 MEF2 蛋白保守区的

三级结构模式相似(图 4), 虽然 MEF2A 亚型 3 和 4 的 N 末端序列及二级结构与其他蛋白存在一定差别, 但三级结构却仍存在相似的模式, 说明 MEF2 蛋白二级结构存在差异的部分不是影响三级结构构建的关键要素。各 MEF2 蛋白在体内的表达次序及调控机制存在一定差别, 但其相似的三级结构模式又说明了 MEF2 多种蛋白形式在调控过程中可能遵循相似的模式。

## 2.4 蛋白同源性与进化分析

根据 ClustalX 1.83 比对结果可知, MEF2A 亚型 3 和 4 在 N 末端缺少一段序列, 包括部分 MADS 结构域及全部 MEF2 结构域, 其余各 MEF2 蛋白在该区域高度保守(图 5A)。除了我们所熟知的保守结构域外, C 末端部分也存在多处短的保守片段, 反映了各

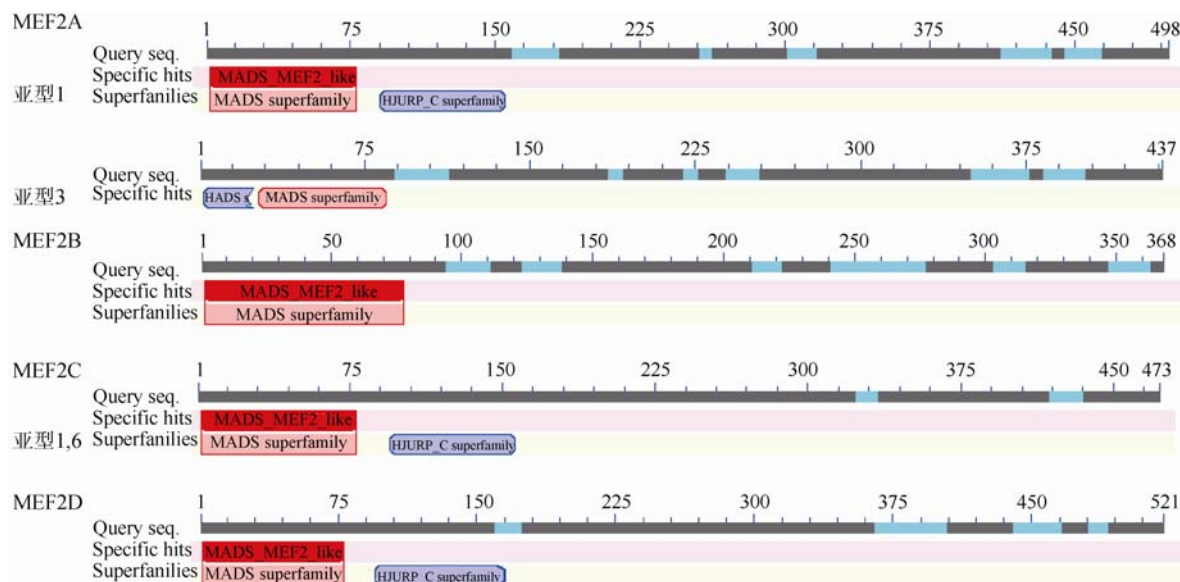


图 2 NCBI 上获得的 MEF2 保守结构域分析结果

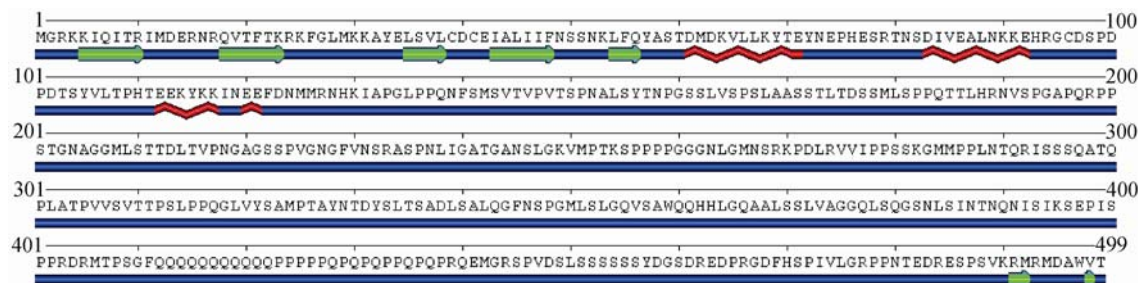


图 3 MEF2A 亚型 1 的二级结构预测

代表螺旋; 代表折叠; 代表卷曲。

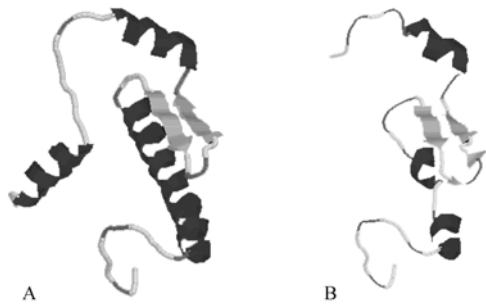


图 4 MEF2 蛋白的三级结构预测  
A: MEF2A 亚型 1; B: MEF2A 亚型 3。

MEF2 蛋白可能具相同的起源, 但 MEF2B 与其他蛋白差别较大(图 5B)。另外, MEF2A 蛋白 C 末端存在一个多聚谷氨酰胺片段(图 5C), 其可能的功能有待

于进一步研究。  
根据不同物种 MEF2 蛋白(表 3), 并以秀丽新小杆线虫为外群构建系统进化树(图 6)。由图可知, 无脊椎动物 MEF2 较为原始, 脊椎动物中 MEF2A、MEF2B、MEF2C、MEF2D 分别形成不同的类群, 其中 MEF2B 处于较原始的分支, 而 MEF2A 和 MEF2C 关系较近, 处于较高地位。不同的物种 MEF2 蛋白分别与人类对应的 MEF2 蛋白聚在一起, 说明了各蛋白的分化是在物种形成后产生的。而海鞘和文昌鱼在进化地位上处于无脊椎动物和脊椎动物之间, 但其 MEF2 蛋白进化地位在 MEF2B 和 MEF2D 之间, 是否应该考虑其在动物体内还存在其他形式的 MEF2



图 5 ClustalX 比对结果(部分)  
A: MADS 结构域和 MEF2 结构域; B: 其他较短保守片段; C: 多聚谷氨酰胺片段。

表 3 各物种中 MEF2 及其同源蛋白质情况列表

名称	蛋白序列号	名称	蛋白序列号
<i>Mus musculus</i> MEF2A	NP_001028885.1	<i>Drosophila melanogaster</i> MEF2.6	NP_995789.1
<i>Mus musculus</i> MEF2B.1	NP_032604.2	<i>Drosophila melanogaster</i> MEF2.3	NP_477018.1
<i>Mus musculus</i> MEF2B.2	NP_001038949.1	<i>Drosophila melanogaster</i> MEF2.4	NP_477020.1
<i>Mus musculus</i> MEF2C.1	NP_001164008.1	<i>Drosophila melanogaster</i> MEF2.1	NP_477021.1
<i>Mus musculus</i> MEF2C.2	NP_079558.1	<i>Drosophila melanogaster</i> MEF2.2	NP_477019.1
<i>Mus musculus</i> MEF2D	NP_598426.1	<i>Branchiostoma belcheri</i> MEF2	ABN45793.2
<i>Danio rerio</i> MEF2A	NP_571376.1	<i>Ciona intestinalis</i> MEF2	NP_001071760.1
<i>Danio rerio</i> MEF2C	NP_571387.2	<i>Caenorhabditis elegans</i> MEF2	AAA79336.1
<i>Danio rerio</i> MEF2D	NP_571392.1		



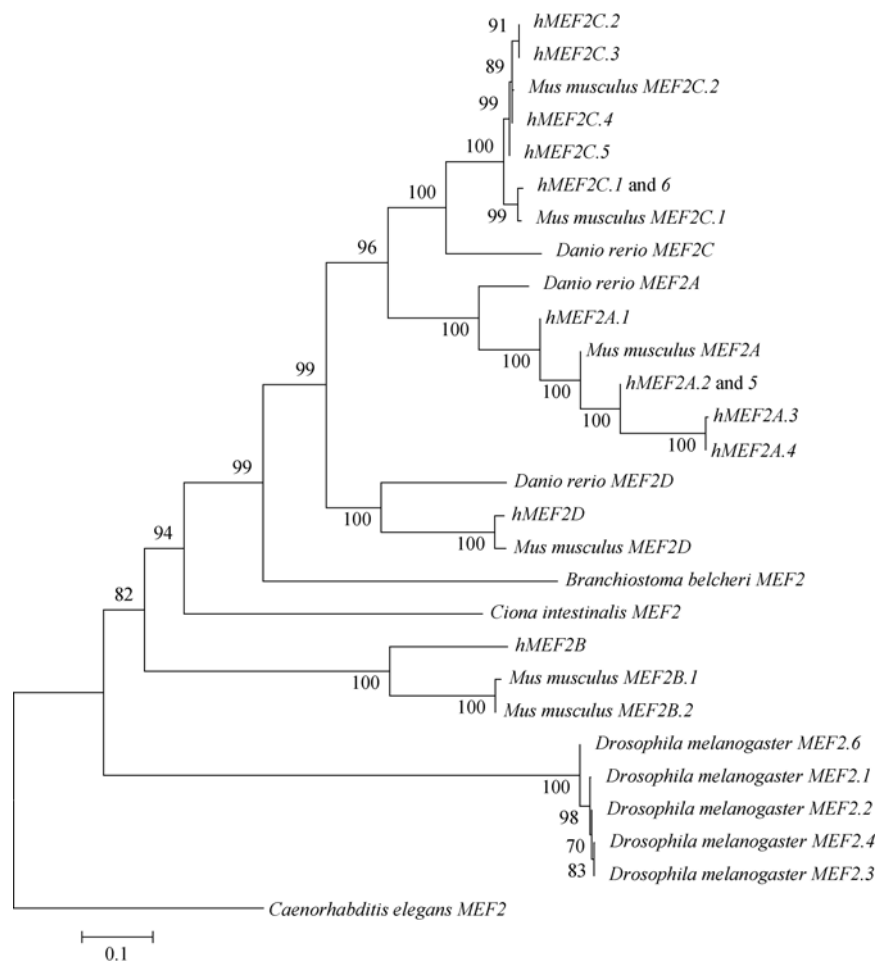


图 6 系统进化树

蛋白有待于进一步研究。

### 3 讨论

基因家族是由祖先基因重复和变异形成的一组基因,可以编码相似的蛋白产物。这些基因可能串联于同一染色体的不同部位,也可能位于不同染色体上。人类编码 MEF2 的 4 个基因分别位于不同染色体上,其表达具一定时空模式。通过数据库搜索可以发现,其基因可以通过形成多种转录产物而产生不同的蛋白,当然,也有的不同转录产物形成相同蛋白产物。这些产物可能产生于不同组织或不同时期,以某种方式参与个体发育的调控。

从理化性质上很难看出各蛋白的主要差异,其可能存在的化学修饰位点情况也相似,糖基化位点和磷酸化位点均位于不太保守的 C 末端区域。翻译后化学修饰对调节蛋白的活性有重要作用,如 MEF2 C 末端可以通过多种通路发生磷酸化,其磷酸化程

度影响到自身的活性<sup>[5]</sup>。

保守的 MADS 和 MEF2 结构域具多处 DNA 结合位点,并能与其他蛋白相互作用,是 MEF2 调控功能的重要保障<sup>[1]</sup>。其中 MEF2 结构域是 MEF2 蛋白区别于其他 MADS 家族成员的重要标志<sup>[20]</sup>,而在人类 MEF2 蛋白中,有一些亚型没有 MEF2 结构域,其功能是否有差异仍需进一步研究。人类 MEF2 蛋白多数存在一个 HJURP\_C 结构域,其在 MEF2 蛋白中的作用仍不甚了解。高级结构也会影响蛋白的功能,MEF2 蛋白 N 末端结构相似,甚至缺少 MEF2 结构域的两个亚型,仍与其他 MEF2 蛋白具类似的空间模式,可能结构上的保守也反映了其功能上的保守性。

人类 MEF2 蛋白产物除少数缺少 MEF2 结构域外,在 N 末端均高度保守,反映了其进化上的同源性。另外,与无脊椎动物不同,脊椎动物 MEF2 蛋白 C 末端同源性稍高,包括不同物种的相同 Mef2 基因的蛋白产物间,如人和小鼠 MEF2A 各亚型之间;也

包括同一物种各 MEF2 间, 如 *hMEF2A* 和 *hMEF2B* 之间, 但不同物种间 MEF2B 蛋白 C 末端差异较大, 有点类似于无脊椎动物 MEF2。

人类 MEF2B 应相对较为原始, 与无脊椎动物关系较近, 这一点也可以从系统进化树上反映出来。其余几种 MEF2 可能存在另外一种进化途径, 亲缘关系较近。而通过不同物种的比较, 各 MEF2 蛋白的分歧要迟于各脊椎动物物种的形成。

MEF2 结构及序列特性仍有许多方面需要进一步研究, 其在人体内更多更复杂的作用有待于进一步去认识。

综上所述, 本文分析了人类 MEF2 在人体内以多种形式存在的特点, 并利用生物信息学方法, 借助多种生物信息资源, 对与人类 MEF2 同源的多种蛋白的特性进行了多方面的比较研究, 加深了对其结构、功能和系统进化特征的理解。这种生物信息学分析方法为我们研究多基因家族和蛋白序列特征、结构及与其功能的关系提供了新的思路。由于, 所有分析是依靠数据库中已有序列进行的理论预测, 而各种分析软件及参数的选择将可能对分析结果产生一定影响, 其结果需要更多的实验数据来验证。

#### 参考文献(References):

- [1] Lyons GE, Micales BK, Schwarz J, Martin JF, Olson EN. Expression of *Mef2* genes in the mouse central nervous system suggests a role in neuronal maturation. *J Neurosci*, 1995, 15(8): 5727–5738.
- [2] Breitbart RE, Liang CS, Smoot LB, Laheru DA, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. A fourth human MEF2 transcription factor, *hMEF2D*, is an early marker of the myogenic lineage. *Development*, 1993, 118(4): 1095–1106.
- [3] 张颖, 王利凤, 邵明, 张红卫. 文昌鱼 *AmphiMef2* 基因的特征及其发育表达. 中国科学(C 辑: 生命科学), 2007, 37(4): 422–426.
- [4] Chambers AE, Kotecha S, Towers N, Mohun TJ. Muscle-specific expression of SRF-related genes in the early embryo of *Xenopus laevis*. *EMBO J*, 1992, 11(13): 4981–4991.
- [5] Ticho BS, Stainier DYC, Fishman MC, Breitbart RE. Three zebrafish *Mef2* genes delineate somitic and cardiac muscle development in wild-type and mutant embryos. *Mech Dev*, 1996, 59(2): 205–218.
- [6] Gossett LA, Kelvin DJ, Sternberg EA, Olson EN. A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol*, 1989, 9(11): 5022–5033.
- [7] 程震龙, 朱大海, 张志谦. MEF2 与肌肉发生. 遗传, 2002, 24(5): 581–585.
- [8] Cripps RM, Black BL, Zhao B, Lien CL, Schulz RA, Olson EN. The myogenic regulatory gene *Mef2* is a direct target for transcriptional activation by Twist during *Drosophila myogenesis*. *Genes Dev*, 1998, 12(3): 422–434.
- [9] Shalizi A, Bonni A. Not just for muscle anymore: activity and calcium regulation of MEF2-dependent transcription in neuronal survival and differentiation. In: Dudek SM, ed. Transcriptional Regulation by Neuronal Activity. New York: Springer, 2008: 229–250.
- [10] Kim MK, Kim SC, Kang JI, Hyun JH, Boo HJ, Eun SY, Park DB, Yoo ES, Kang HK, Kang JH. 6-Hydroxydopamine-induced PC12 cell death is mediated by MEF2D down-regulation. *Neurochem Res*, 2011, 36(2): 223–231.
- [11] Pereira AHM, Clemente CFMZ, Cardoso AC, Theizen TH, Rocco SA, Judice CC, Guido MC, Pascoal VDB, Lopes-Cendes I, Souza JRM, Franchini KG. MEF2C silencing attenuates load-induced left ventricular hypertrophy by modulating mTOR/S6K pathway in mice. *PLoS One*, 2009, 4(12): e8472.
- [12] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM, ed. The Proteomics Protocols Handbook. Totowa: Humana Press, 2005: 571–607.
- [13] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol*, 1999, 294(5): 1351–1362.
- [14] Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Brunak S. Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*, 2005, 15(2): 153–164.
- [15] Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, He SQ, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke ZX, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu CL, Lu F, Lu SN, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Tasneem A, Thanki N, Yamashita RA, Zhang DC, Zhang NG, Bryant SH. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(Suppl.1): D205–D210.
- [16] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195–201.
- [17] Kumar S, Dudley J, Nei M, Tamura K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*, 2008, 9(4): 299–306.
- [18] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [19] Zuckerkandl E, Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson V, Vogel HJ, eds. Evolving Genes and Proteins. New York: Academic Press, 1965: 97–166.
- [20] Olson EN, Perry M, Schulz RA. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev Biol*, 1995, 172(1): 2–14.