

بیان ژن CGRP در کبد گاو و بررسی تنوع آن بین گونه‌های مختلف جانوری

Investigation of CGRP gene expression in cow liver tissue and its variety among different species of animal

حمیده کشاورزی^{۱*}، محمدعلی ادریس^۲، حمیدرضا رحمانی^۳
۱، ۲، ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار، دانشگاه صنعتی اصفهان

Keshavarzi H^{*1}, Edris MA², Rahmani HR³

1,2,3. MSc Student, Professor and Associate Professor, Isfahan University of Technology, Isfahan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: h.keshavarzi_313@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۹)

چکیده

پپتید همراه ژن کلسی‌تونین (CGRP) یک نوروپپتید با ۳۷ اسید آمینه است که در پستانداران وجود دارد. از نظر پاتولوژیکی، CGRP در تنظیم آزادسازی فاکتورهای التهابی نظیر $IL-1\beta$ ، $TNF\alpha$ و نوراپی نفرین نقش دارد. از آنجا که غلظت CGRP در زمان بیماری تغییر کرده و این نوروپپتید با آزادسازی فاکتورهای التهابی در ارتباط است، می‌توان از CGRP به عنوان یک فاکتور تشخیص بیماری استفاده کرد. در بررسی بیان ژن CGRP در بافت کبد گاو ابتدا نمونه کبد از گاوهای مورد نظر (۲ گاو تا ۶۰ روز شیردهی و ۸ گاو کشتارگاهی که گاو خشک و گاو نر بودند) گرفته شد و بلافاصله به ازت اضافه شده و به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه پس از استخراج RNA و ارزیابی کیفیت RNA، سنتز cDNA و RT-PCR برای بررسی بیان ژن انجام شد. در این تحقیق مشخص شد که ژن CGRP در بافت کبد گاوهای شیری (تا روز ۶۰ شیردهی) قابلیت بیان دارد ولی بر اساس نتایج این تحقیق احتمالاً در بافت کبد گاوهای نر و گاوهای دوره خشک قابلیت بیان ندارد. همچنین در این تحقیق تنوع اسید آمینه‌ای ژن CGRP با استفاده از نرم‌افزارهای DNAMAN، MEGA و Multaline براساس توالی اسید آمینه‌ای آن در پایگاه اطلاعاتی NCBI بررسی شد. از نظر تنوع اسید آمینه‌ای این ژن در گاو بیشترین همولوژی را با گوسفند، موش، موش صحرائی و سگ دارد. همچنین میزان همولوژی این ژن در انسان و گاو بالاست (۹۴ درصد)، بنابراین احتمالاً در صورت نیاز به اندازه‌گیری و بررسی بیان این فاکتور در خون گاو می‌توان از کیت موش یا انسان استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

بافت کبد،
بیان ژن،
پپتید همراه ژن کلسی‌تونین،
تنوع ژنتیکی،
RT-PCR

مقدمه

پپتید همراه ژن کلسی‌تونین (*CGRP*)^۱، یک نوروپپتید با ۳۷ اسیدآمینو است که در سیستم عصبی محیطی پستانداران وجود دارد. این نوروپپتید در سال ۱۹۸۲ بوسیله کلونینگ مولکولی ژن کلسی‌تونین کشف شد. بر اساس تفاوت در ژن کد کننده، *CGRP* به دو نوع α -*CGRP* و β -*CGRP* تقسیم می‌شود (Brain and Grant 2004; Pin and Bahr 2008). این ژن و گیرنده‌های آن در سیستم‌های عصبی مانند نواحی مغزی و سیستم قلبی-عروقی قرار دارد و در عملکرد فیزیولوژیکی و حفظ هموستازی سیستم‌های تولیدمثل، گوارش، تنفسی، عصبی، قلب و عروق پستانداران نقش دارد. از نظر ساختاری *CGRP* خانواده پپتیدی متشکل از *CGRP*، کلسی‌تونین، آدرنومدولین و آمیلین است (Hongbao 2004). در سیستم عصبی محیطی، *CGRP* به همراه ماده P در نورون‌های حسی گانگلیا و در نورون‌های حرکتی به همراه استیل کولین وجود دارد. بیان این نوروپپتید در هیپوتالاموس بوده در حالی که mRNA ژن کلسی‌تونین در تیروئید موجود است (Bell and McDermott 1996; Brain and Grant 2004; Lerner and McDermott 2006). ژن *CGRP* بطور اختصاصی در برخی سلول‌ها بیان و تنظیم می‌شود. راه‌انداز این ژن توسط دو المنت ویژه، المنت پاسخی *cAMP* پروکسیمال و یک تقویت کننده ویژه تنظیمی دیستال، تنظیم می‌شود که این المنت‌ها توسط مسیرهای سیگنال-دهی پروتئین کیناز فعال کننده میتوژن (*MAPK*)، فعال می‌شوند (Gracious et al. 2008). نوروپپتید *CGRP* به همراه ماده P در نورون‌های حسی حساس آوران ذخیره و جابجا می‌شود (Springer et al. 2003). از عوامل مؤثر بر آزادسازی *CGRP*، محرک‌های شیمیایی و الکتریکی هستند. از آنجا که گیرنده‌های واسطه‌های التهابی نظیر هیستامین روی نورون‌های حسی قرار دارند، این واسطه‌های التهابی و همچنین دیگر مواد نظیر اکسید نیتریک و لوکوترین‌ها سبب آزاد سازی *CGRP* می‌شوند. سیتوکین‌های التهابی مانند اینترلوکین بتا ($IL-1\beta$) و فاکتورهای رشد عصبی (*NGF*) سبب فعال‌سازی *cAMP*، *PKC* و نهایتاً *MAPK* شده و با فعال کردن راه‌انداز این ژن سبب بیان و آزادسازی آن می‌شوند (Eynott et al. Springer et al. 2003).

¹ Calcitonin gene related peptide

(2002). استروژن و پروژسترون اثر مستقیمی بر سنتز و آزادسازی *CGRP* ندارند ولی این دو هورمون استروئیدی در اعصاب گانگلیای پشتی و در حضور *NGF* باعث افزایش آزادسازی *CGRP* می‌شوند (Wimalawansa 1996).

نوروپپتید *CGRP* دارای فعالیت بیولوژیکی است که گشادکردن عروق خونی، مصونیت قلبی و اثرات متابولیکی گوناگونی مانند تعدیل حساسیت انسولین در ماهیچه اسکلتی و کبد را برعهده دارد و به‌عنوان یک تنظیم کننده گردش خون و نوروترانسمیتر مشخص شده است (Bell and McDermott 1996). این نوروپپتید سبب کاهش فشار خون از طریق تنظیم درون سلولی کلسیم (Ca^{2+}) با مهار جریان آزادسازی Ca^{2+} از شبکه سارکوپلاسمی، کاهش حساسیت عضلات به انقباض در پاسخ به Ca^{2+} ، افزایش درون سلولی *cAMP*، فعال کردن کانال پتاسیم با صرف *ATP* و آزادسازی اکسید نیتریک می‌شود (Bell and McDermott 1996). پپتید *CGRP* در دستگاه گوارش باعث مهار ترشح اسید معده با تحریک ترشح سوماتواستاتین می‌شود و در کبد، در انقباض کیسه صفرا با مهار *CCK* و متابولیسم کبدی نقش دارد (Saitou and Nei 1987). در طی آبستنی استروژن و پروژسترون باعث افزایش سنتز و آزادسازی *CGRP* می‌شوند. افزایش *CGRP* باعث تنظیم جریان خون جفت و تأمین مواد مغذی جنین می‌شود و در تکامل جنین و نگهداری رحم در طی دوران آبستنی نقش دارد (Wimalawansa 1996).

پپتید *CGRP* به‌عنوان یک نوروپپتید ترشحی از اعصاب خودکار عصبی ترشح شده و به‌همراه ناقلین عصبی *VIP*، *NPY* و ماده P، در تنظیم ترشحات، حرکات و کنترل اعصاب دستگاه گوارش و اشتها دخالت دارد. به‌طوری که با توجه به نقش این نوروپپتید در بیماری‌های متابولیکی، یک نقش عصبی-تغذیه‌ای برای آن مطرح شده است (Pin and Bahr 2008). مطالعات دیگر نشان داده که *CGRP* اثرات تغذیه‌ای روی سوبستراهایی نظیر فیبریل‌های ماهیچه‌ای و نورون‌های محیطی دارد. همچنین این پپتید با اعصاب پانکراس و تحریک آزادسازی انسولین و هم چنین با تأثیر بر انتقال مواد مغذی جذب شده از روده به کبد، نقش مهمی در کنترل تغذیه و بیماری‌های متابولیکی دارد (Liyu et al. 2000). از نظر پاتولوژیکی، *CGRP* در تنظیم آزادسازی عوامل التهابی

نظیر $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ و نوراپی نفرین نقش دارد. از آنجا که غلظت CGRP در زمان بیماری تغییر می‌کند و این نوروپپتید با آزادسازی فاکتورهای التهابی در ارتباط است، می‌توان از CGRP به عنوان یک فاکتور تشخیص بیماری استفاده کرد (Beer et al. 2002). میزان این نوروپپتید بعد از زایش در خون گاوهای مبتلا به کبد چرب بیشتر از گروه کنترل بود (Ametaje 2005). بنابراین از آنجا که CGRP می‌تواند بعنوان یک فاکتور تشخیص بیماری‌ها از جمله کبد چرب استفاده شود و با توجه به اینکه بیان این ژن در بافت کبد انسان و موش بررسی شده بود و اطلاعی در مورد بیان این ژن در بافت کبد گاو و دیگر دام‌های اهلی وجود نداشت این تحقیق به منظور بررسی بیان این ژن در بافت کبد گاو طراحی شد. از طرف دیگر چون آغازگری برای این ژن در گاو طراحی نشده بود تنوع این نوروپپتید جهت بررسی میزان همولوژی آن در میان گونه‌ای جانوری بررسی شد تا اینکه مشخص شود که آیا در صورت عدم امکان و یا دسترسی به آغازگر اختصاصی گاو یا برای تعیین میزان نوروپپتید آن در خون می‌توان از آغازگر یا کیت دیگر گونه‌های جانوری استفاده کرد یا خیر. هدف از این تحقیق بررسی بیان ژن CGRP در بافت کبد گاو و بررسی تنوع این نوروپپتید در گونه‌های جانوری بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

برای انجام این طرح، نمونه‌های کبد مورد نیاز از کشتارگاه دام نجف آباد (گاو نر پروراری) و گاوداری‌های فکا و لورک (گاوهای شیری) تهیه شد. نمونه‌ها (۲ نمونه کبد گاو تازه‌زا و ۸ نمونه کبد کشتارگاهی گاو خشک و گاونر) بعد از جمع‌آوری بلافاصله در ازت مایع قرار گرفت و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل شد و تا زمان استخراج RNA در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

استخراج RNA

به منظور استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری RNXTM (cat. RN7713C) به ترتیب مراحل زیر انجام شد:

در ابتدا نمونه بافت با استفاده از ازت مایع درون هاون همگن شده و سپس $100-50$ میلی گرم از نمونه آسیاب شده با یک میلی

لیتر از محلول RNX (جهت هموژن کردن از سرنگ با سرسوزن 20 استفاده شد) هموژن شد و به مدت پنج دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. 350 میلی‌لیتر کلروفرم 99 درصد به محلول فوق اضافه شد، به مدت 15 ثانیه به شدت تکان داده شد، و محلول برای 10 دقیقه روی یخ قرار گرفت و سپس به مدت 15 دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و 12000 g سانتریفیوژ شد. مایع بالایی به یک تیوب تیمار شده با دی‌ای پی سی منتقل شد و هم حجم مایع رویی ایزوپروپانول به محلول اضافه شد و، به آرامی تکان داده و برای 15 دقیقه روی یخ نگهداری شده و سپس با شرایط قبلی سانتریفیوژ شد. مایع رویی از پلت جدا شد و یک میلی‌لیتر اتانول 75 درصد به پلت داخل تیوب اضافه شد و بعد از ورتکس کردن محلول به مدت هشت دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و 7500 g دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی از پلت جدا شد و بعد از خشک شدن در دمای اتاق برای چند دقیقه 30 میلی‌لیتر آب DEPC به پلت اضافه شد و تیوب در دمای 70 درجه سانتی‌گراد به منظور حل شدن پلیت در آب قرار گرفت و سپس تیوب در فریزر -80 درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده بعدی ذخیره شد. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از بارگذاری روی ژل و جذب نوری بررسی شد. کلیه وسایل مورد نیاز در طی آزمایش با DEPC تیمار شده و تمامی مراحل کار با RNA از دستکش و ماسک استفاده شد.

سنتز cDNA

پس از اطمینان از کیفیت RNA، سنتز cDNA انجام شد. برای سنتز cDNA، ابتدا یک میکرولیتر RNA (غلظت $100-10$ نانوگرم) را با یک میکرولیتر oligodt 20 میلی‌مولار و $10/5$ میکرولیتر آب به مدت 5 دقیقه در دمای 60 درجه سانتی‌گراد حرارت داده تا ساختار نوع دوم RNA از بین برود. سپس آن را روی یخ قرار داده تا آغازگر به mRNA متصل شود. در مرحله بعد یک میکرولیتر از آنزیم رونوشت بردار معکوس، $0/5$ میکرولیتر آنزیم RNase، چهار میکرولیتر بافر آنزیم رونوشت بردار معکوس و دو میکرولیتر مخلوطی از داکسی نوکلئوتید 10 میلی‌مولار را به محلول حاوی RNA اضافه کرده و به مدت یک ساعت در دمای 42 درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از آن

مقطر شستشو داده شده و تحت تأثیر اشعه UV و با دستگاه Viber-Geldocumentation20M عکسبرداری انجام شد.

جهت بررسی تنوع ژن CGRP در بین حیوانات مختلف، به دلیل تفاوت در تعداد آگزون و اینترون و طول قطعات، از توالی پروتئین استفاده شد. برای تعیین توالی، توالی اسیدآمینه‌ای مشخص شده برای ژن CGRP در گاو (Hongbao 2004) با توالی دیگر حیوانات موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (www.NCBI.nlm.nih.gov) موجود در بانک ژن BLAST شد و توالی‌های نزدیک به این توالی انتخاب شدند.

به منظور رسم درخت فیلوژنتیکی، قطعات پروتئین BLAST شده از پایگاه اطلاعاتی NCBI جمع‌آوری شد. از نرم‌افزار Multaline برای هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی داده‌ها و رسم درخت از نرم‌افزار MEGA. Ver 4.0 و DNAMAN.exe استفاده شد. درخت‌های فیلوژنتیکی بر اساس چهار روش Maximum Parsimony (MP)، حداکثر درست‌نمایی^۱ (ML)، نزدیکترین همسایه‌ها^۲ (NJ) و حداقل تکامل^۳ (ME) ترسیم شدند (Saitou and Nei 1987).

نتایج و بحث

بیان ژن CGRP برای نمونه کبد گاوهای تا روز ۶۰ بعد از زایمان مشاهده شد ولی دارای باندهای اضافی بود (شکل ۱) و با تغییر شرایط PCR باند اضافی همچنان مشاهده شد ولی برای نمونه‌های کبد گاو نر و گاوهای دوره خشک در طی این تحقیق بیان ژن CGRP مشاهده نشد. بنابراین به نظر می‌رسد مطالعه این ژن در نمونه‌های کبد گاوهای تا روز ۶۰ بعد از زایش انجام شود و شرایط PCR بصورت جامع‌تری مورد بررسی قرار گیرد و در صورت امکان از Real Time-PCR برای اندازه‌گیری بیان این ژن استفاده شود. تحقیقات نشان داد که ژن CGRP در بافت کبد انسان (Bracca et al. 1994) و غده تیروئید موش (Liyu et al. 2000) بیان می‌شود. با توجه به این تحقیقات انتظار می‌رفت که این ژن در بافت کبد گاو هم بیان شود.

محلول را بر روی یخ منقل کرده و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در این تحقیق نمونه کبد از گاوهای گشتارگاهی و گاوداری جمع‌آوری شد و بیان ژن برای ژن کنترل (بتا-اکتین) و ژن CGRP انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ژن CGRP (β -actin (بعنوان یک ژن کنترل) بعد از سنتز cDNA صورت گرفت. مواد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای این دو ژن شامل دو میکرولیتر cDNA، دو میکرولیتر بافر (10X)، ۰/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰mM)، ۰/۶ میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتیدها (۱۰mM)، یک میکرولیتر آغازگر رفت (۱۰mM)، یک میکرولیتر آغازگر برگشت (۱۰mM)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مرز (۵ واحد) و ۱۲/۶ میکرولیتر آب مقطر بود.

با انجام PCR و با استفاده از آغازگرهای ژن β -actin که در اکثر بافت‌ها بیان می‌شود، نرمال کردن بافت‌ها صورت گرفت. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن β -actin و CGRP مطابق جدول یک بود. برای ژن بتا-اکتین واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد دو دقیقه، ۲۵ سیکل واسرشت ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، اتصال ۵۴ درجه ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه ۴۵ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه صورت گرفت. واکنش PCR برای ژن CGRP بصورت واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد دو دقیقه، ۳۰ سیکل واسرشت ۹۴ درجه یک دقیقه، اتصال ۶۰/۹ درجه یک دقیقه و گسترش در دمای ۷۲ درجه یک دقیقه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انجام شد.

برای الکتروفورز محصولات PCR پنج میکرولیتر از محصولات PCR با ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری بر روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد. الکتروفورز با ولتاژ ۸۵ و به مدت یک ساعت انجام شد. در کنار نمونه‌ها، سه میکرولیتر نشانگر اندازه به منظور مقیاس برای اندازه‌گیری و تخمین اندازه قطعه و همچنین بررسی چگونگی انجام الکتروفورز بارگذاری شد. پس از انجام الکتروفورز ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس در آب

^۱ Maximum Likelihood

^۲ Neighbor Joint

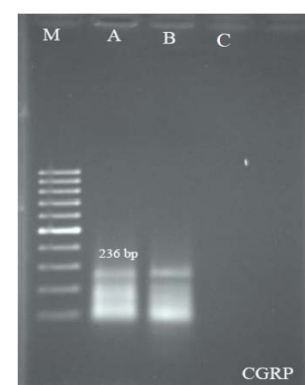
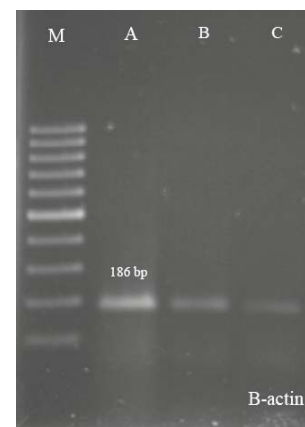
^۳ Minimum Evolution

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن *β-actin* و *CGRP*

ژن	آغازگرها	توالی‌ها	اندازه قطعه (bp)
ژن <i>β-actin</i>	آغازگر رفت	5' TGGGACGACATGGAGAAGATCTGGC 3'	۱۸۶
	آغازگر برگشت	5' CAGCACAGCCTGGATGGCCACGTAC 3'	
ژن <i>CGRP</i>	آغازگر رفت	5' GCTGCCCTCTCTCTGGTCTCTCA 3'	۲۳۶
	آغازگر برگشت	5' TGGCGGCATTACTGGTTCTCTCTCTG 3'	

نتایج هم‌ردیف‌سازی توالی اسیدآمینه‌ای این ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA نشان داد که این ژن در گونه‌های مختلف دارای نقاط حفاظت شده بالایی است (شکل ۲). همچنین نتایج حاصل از BLAST توالی ژن *CGRP* گاوی با دیگر گونه‌ها توسط توسط نرم‌افزار DNAMAN و پایگاه اطلاعاتی NCBI مشخص شد. نتایج حاصل از مقایسه توالی در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان داد که این ژن در گاو بیشترین همولوژی را بترتیب با ژن *CGRP-II* موش صحرایی (۹۷ درصد) و کمترین همولوژی را با ژن *CGRP* ماهی (۸۳ درصد) دارد (جدول ۲). همچنین درصد همولوژی این ژن در گاو و انسان ۹۴ درصد گزارش شده است، بنابراین احتمالی‌توان از کیت *CGRP* انسانی برای اندازه‌گیری این پپتید در گاو استفاده کرد. نتایج حاصل از هم‌ردیف‌سازی این ژن توسط نرم‌افزار DNAMAN نشان داد که درصد همولوژی این ژن بین ۱۶ گونه مورد مطالعه از ۷۸/۴ تا ۱۰۰ درصد متغیر است که مشخص‌کننده همولوژی بالای این ژن در گونه‌های مختلف است. همچنین نتایج هم‌ردیف‌سازی با این نرم‌افزار نشان داد که ژن *CGRP* گاوی دارای همولوژی بالایی با دیگر گونه‌هاست (جدول ۲). همچنین توالی اسید آمینه‌ای این ژن در گونه‌های مختلف جانوری دارای اسید آمینه‌های حفاظت شده زیادی است (شکل ۳).

در درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس مجموعه داده کل، گاو با ضریب اطمینان متوسط تا قوی در کنار خرگوش قرار گرفت و بیشترین شباهت را با این حیوان داشت. از نظر تکاملی و نزدیکترین همسایه‌ها^۱ (شکل ۵) گوسفند و خرگوش نزدیکترین حیوانات به گاو بودند و این حیوانات به همراه موش، موش صحرایی و خوک با ضریب اطمینان متوسط



شکل ۱- بررسی بیان ژن بتا اکتین (الف) و *CGRP* (ب) در بافت کبد گاوهای شیری. (M) مارکر؛ A و B به ترتیب بیان ژن در گاو مربوط به طرح و نمونه کشتارگاهی.

استروژن و پروژسترون اثر مستقیمی بر سنتز و آزادسازی *CGRP* ندارند ولی این دو هورمون استروئیدی در اعصاب گانگلیای پشتی و در حضور NGF باعث افزایش آزادسازی *CGRP* می‌شوند (Yallampalli et al. 2002). بنابراین احتمالاً یکی از دلایل بیان این ژن در گاوهای شیری و عدم مشاهده بیان این ژن در گاوهای نر و گاوهای دوره خشک اثر استروژن و پروژسترون بر بیان و آزادسازی این ژن باشد.

^۱ Neighbor joint

Protein Sequences	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Mouse_CGRP1	G	C	N	A	C	V	H	L	A	G	L	L	S	P	G	G	V	F	V	A
Rat_CGRP1	G	C	N	A	C	V	H	L	A	G	L	L	S	P	G	G	V	F	V	A
Rat_CGRP2	G	C	N	A	C	V	H	L	A	G	L	L	S	P	G	G	V	F	V	A
Canine_CGRP	G	C	N	A	C	V	H	L	A	G	L	L	S	P	G	G	V	F	V	A
Mouse_CGRP2	G	C	N	A	C	V	H	L	A	G	L	L	S	P	G	G	V	F	V	A
Porcine_CGRP	G	C	N	A	C	V	H	L	A	G	L	L	S	P	G	G	M	F	V	A
Equine_CGRP	G	C	N	A	C	V	H	L	A	G	L	L	S	P	G	G	V	F	V	A
Ovis_CGRP	G	C	N	A	C	V	H	L	A	G	L	L	S	P	G	G	V	F	V	A
Bovine_CGRP	A	C	N	A	C	V	H	L	A	G	L	L	S	P	G	G	V	F	V	A
Rabbit_CGRP	G	C	N	A	C	V	H	L	A	G	L	L	S	P	G	G	M	F	V	A
Human_CGRP_2	A	C	N	A	C	V	H	L	A	G	L	L	S	P	G	G	M	F	V	A
Monkey_CGRP	A	C	N	A	C	V	H	L	A	G	L	L	S	P	G	G	M	F	V	A
Human_CGRP1	A	C	N	A	C	V	H	L	A	G	L	L	S	P	G	G	V	F	V	A
Chicken_CGRP	A	C	N	A	C	V	H	L	A	G	F	L	S	P	G	G	V	F	V	A
Frog_CGRP	A	C	N	A	C	V	H	L	A	G	F	L	S	P	G	G	M	F	V	A
fish_CGRP	A	C	N	A	C	V	H	L	A	G	F	L	S	P	G	G	M	F	V	A

شکل ۲- هم‌ردیف‌سازی توالی اسید آمینه‌ای ژن *CGRP* در گونه‌های مختلف جانوری.

جدول ۲- ماتریس همولوژی توالی CGRP گونه‌های مختلف حیوانات

16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1		
															100	Fish <i>CGRP</i> -1	
															100	91/9	Frog <i>CGRP</i> -2
													100	11/1	11/1	Ovis <i>CGRP</i> -3	
												100	94/6	11/1	78/4	Rat <i>CGRP1</i> -4	
											100	94/6	91/9	11/1	78/4	Rat <i>CGRP2</i> -5	
										100	91/9	97/3	94/6	13/1	78/4	Canine <i>CGRP</i> -6	
									100	94/6	19/2	94/6	94/6	78/4	78/4	Equine <i>CGRP</i> -7	
								100	16/5	91/9	19/2	19/2	19/2	16/5	11/1	Human <i>CGRP1</i> -8	
							100	91/9	19/2	19/2	19/2	19/2	91/9	19/2	19/2	Monkey <i>CGRP</i> -9	
						100	12/9	12/9	94/6	97/3	94/6	100	94/6	11/1	78/4	Mouse <i>CGRP1</i> -10	
					100	91/9	11/1	11/1	91/9	19/2	16/5	91/9	16/5	11/1	78/4	Mouse <i>CGRP2</i> -11	
				100	13/1	91/9	94/6	16/5	91/9	91/9	16/5	91/9	91/9	13/1	13/1	Rabbit <i>CGRP</i> -12	
			100	94/6	16/5	94/6	94/6	91/9	94/6	94/6	19/2	94/6	94/6	13/1	13/1	Bovine <i>CGRP</i> -13	
		100	16/5	11/1	13/1	13/1	16/5	19/2	11/1	16/5	13/1	13/1	13/1	94/6	91/9	Chicken <i>CGRP</i> -14	
	100	16/5	94/6	94/6	11/1	19/2	100	91/9	19/2	19/2	19/2	19/2	91/9	19/2	19/2	Human <i>CGRP2</i> -15	
100	91/9	78/4	91/9	94/6	19/2	91/9	91/9	13/1	97/3	91/9	16/5	91/9	91/9	11/1	11/1	Porcine <i>CGRP</i> -16	

خوک، گوسفند و خرگوش در یک دسته قرار گرفت. درخت MP شباهت گاو با انسان و خرگوش را با ضریب اطمینان قوی (۹۷-۱۰۰ درصد، PP1.0) تایید کرد.

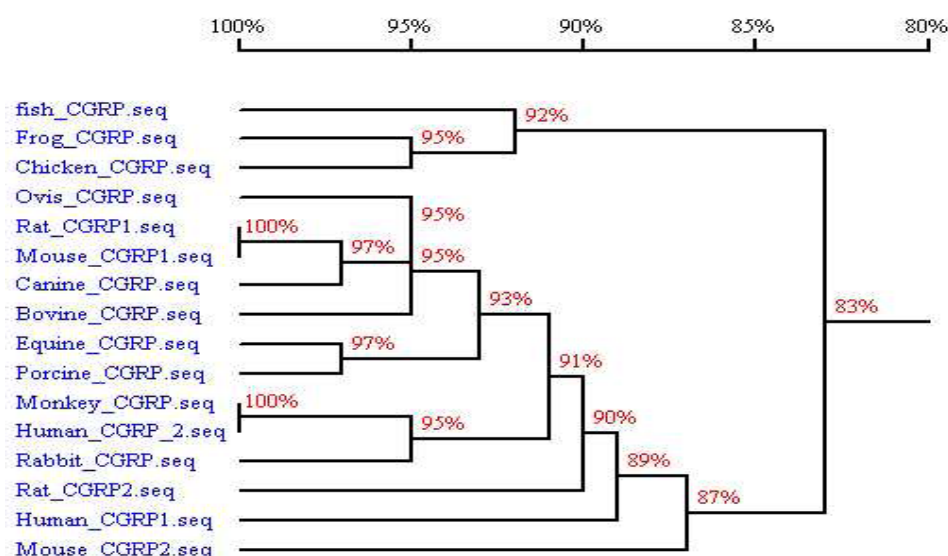
درخت همولوژی شباهت بالای این حیوانات از نظر این پپتید را تایید کرد. از نظر همولوژی *CGRP* بین این حیوانات

در یک دسته قرار گرفتند (۷۴ درصد، PP1.0). در درخت UPGMA^۱ (شکل ۶) ترسیم شده حیوانات در دو دسته قرار گرفتند که در این درخت گاو با ضریب اطمینان متوسط (۶۷ درصد، PP1.0) با انسان، موش، موش صحرائی، میمون، اسب،

¹ Maximum likelihood

	S	C	N	T	A	T	C	V	T	H	R	L	A	G	L	S	R	S	G	G	V	V	K	D	N	F	V	P	T	N	V	G	S	E	A	F	
✓ 1. Mouse CGRP1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 2. Rat CGRP1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 3. Rat CGRP2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.
✓ 4. Canine CGRP	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 5. Mouse CGRP2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 6. Porcine CGRP	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	.	S	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 7. Equine CGRP	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 8. Ovis CGRP	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	.
✓ 9. Bovine CGRP	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 10. Rabbit CGRP	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
✓ 11. Human CGRP 2	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	
✓ 12. Monkey CGRP	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	
✓ 13. Human CGRP1	A	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.
✓ 14. Chicken CGRP	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	F	.	.	.	.	.	.	G	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	
✓ 15. Frog CGRP	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	F	.	.	.	.	.	.	M	A	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	
✓ 16. fish CGRP	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	F	.	.	.	.	.	.	M	G	N	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	

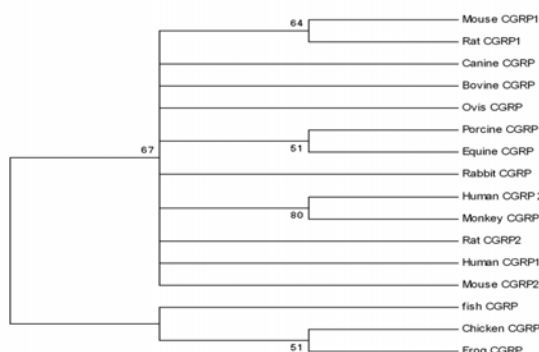
شکل ۳- توالی هاپلوتایپ‌های پروتئین CGRP در گونه‌های مختلف جانوری. نقاط جدول نشان‌دهنده اسیدآمینه‌های حفاظت شده است و اسیدآمینه‌های غیر حفاظت شده با حروف مشخص شده است.



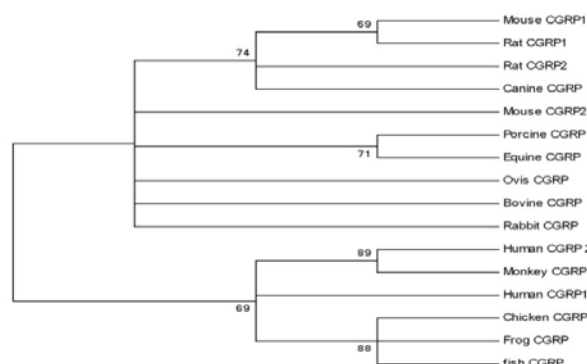
شکل ۴- درخت همولوژی گونه‌های مختلف دامی با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN. گونه‌های موجود در یک شاخه دارای همولوژی یکسان هستند.

این نوروپپتید در سرم گاوهای مورد مطالعه بود. نتایج مقایسه توالی اسید آمینه‌ای این نوروپپتید در گونه‌های مختلف دامی هم نشان داد که از نظر همولوژی این پپتید در گاو، انسان و موش به همدیگر نزدیک هستند (جدول ۲) بنابراین احتمالاً می‌توان از کیت انسان و یا موش جهت اندازه‌گیری CGRP در گاو استفاده کرد.

دارای همولوژی بالا (۸۳ درصد) بود و گاو بیشترین همولوژی (۹۵ درصد) را با گوسفند، موش (CGRP1)، موش صحرایی (CGRP1) و سگ داشت (شکل ۴). در مقایسه توالی اسیدآمینه‌ای ژن CGRP هدف بررسی میزان تشابه اسید آمینه‌ای این نوروپپتید جهت استفاده از کیت CGRP انسان و یا موش جهت اندازه‌گیری



شکل ۶- درخت UPGM حاصل از مجموعه داده اسیدآمینهای توالی کدکننده ژن CGRP. گونه‌های موجود در یک شاخه بر اساس روش نزدیکترین همسایه‌ها در یک دسته از نظر یکسانی در توالی ژن CGRP قرار دارند.



شکل ۵- درخت NJ حاصل از مجموعه داده اسیدآمینهای توالی کدکننده ژن CGRP. گونه‌های موجود در یک شاخه بر اساس روش نزدیکترین همسایه‌ها در یک دسته از نظر یکسانی در توالی ژن CGRP قرار دارند.

منابع

- Ametaje NB (2005) A New Understanding of the Causes of Fatty Liver in Dairy Cows. *Advances in Dairy Technology* 17: 97.
- Beer S, Weighardt H, Emmanuilidis K, Harzenetter MD, Matevossian H, Heidecke CD, Bartels H, Siewert JR, Holzmann B (2002) Systemic neuropeptide levels as predictive indicators for lethal outcome in patients with postoperative sepsis. *Critical Care Medicine* 30:794-1798.
- Bell D, McDermott BJ (1996) Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: characterization of receptor populations and their (patho) physiological significance. *Pharmacology Reviews* 48:253-288.
- Bracqa S, Clementb B, Pidoux E, Moukhtara MS, Jullienne A (1994) CGRP is expressed in primary cultures of human hepatocytes and in normal liver. *FEBS Letters* 351:63-66.
- Brain S, Grant AD (2004) Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Journal of Physiological reviews* 84:903-934.
- Eynott PR, Groneberg DA, Caramori G, Adcock IM, Donnelly LE, Kharitonov S, Barnes PJ, Chung KF (2002) Role of nitric oxide in allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *European Journal of Pharmacology* 452:123-133.
- Gracious RR, Uma Y, Chandra Y (2008) Cyclic AMP-independent CGRP 8-37 –sensitive receptors mediate adrenomedullin-induced decrease of CaCl_2 -contraction in pregnant rat mesenteric artery. *Journal of Vascular Research* 45:33-44.
- Hongbao M (2004) Calcitonin gene-related peptide (CGRP). *Journal of Natural Science* 2:41-47.
- Lasmoles F, Minvielle S, Cohen R, Guliana JM, Delehay MC, Segond N, Calmettes C, Milhaud G, Lought DS, Muller LD, Kensinger RS, Sweeney TF, Griel LF (1998) Effect of added dietary fat and bovine somatotropin on

the performance and metabolism of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 277:243-246.

Lerner UH (2006) Deletions of genes encoding calcitonin, CGRP, amylin and calcitonin receptor have given new and unexpected insights into the function of calcitonin receptor and calcitonin receptor-like receptor in bone. *Journal of Musculoskeletal Neurology Interactions* 6: 87-95.

Liyu X, Jingxuan G, Xian W (2000) Induction and expression of β - calcitonin gene-related peptide in rat T lymphocytes and its significance. *Journal of Natural Science* 39:4360-4366.

Pin SS, Bahr BA (2008) Protein kinase C is a common component of CGRP receptor desensitization induced by distinct agonists. *Journal of Pharmacology* 587:8-1.

Rachel ND, Kerry ML, Bridget LL, Lynda W, Debbie LH, Lance YX, Edward WK, Anthony RJP, Grath JSC (2008) Evidence that α -calcitonin gene-related peptide is a neurohormone that controls systemic lipid availability and utilization. *Journal of Endocrinology* 149:154-160.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biotechnology and Evolution* 4: 406-425.

Springer J, Geppetti P, Fischer A, Groneberg DA (2003) Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator. *Pulmonary Pharmacology Therapeutics* 16:121-130.

Storry JE, Hall AJ, Johnson VW (1973) The effects of increasing amounts of dietary tallow on milk-fat secretion in the cow. *Journal of Dairy Research* 40:293.

Wimalawansa SJ (1996) Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocrine Reviews* 17: 533-585.

Yallampalli C, Chauhan M, Thota CS, Kondapaka S, Wimalawansa SJ (2002) Calcitonin gene-related peptide in pregnancy and its emerging receptor heterogeneity. *Trends Endocrinol Metab* 13: 263-269.