ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲
صفحه ۲۳۲- ۲۲۵

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]
۲،۱و۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار، دانشگاه صنعتی اصفهان

Keshavarzi H*[1], Edris MA[2], Rahmani HR[3]

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

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: h.keshavarz_313@yahoo.com

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

چکیده

پپتید همراه ژن کلسی‌تونین (*CGRP*) یک نوروپپتید با ۳۷ اسیدآمینه است که در پستانداران وجود دارد. از نظر پاتولوژیکی، *CGRP* در تنظیم آزادسازی فاکتورهای التهابی نظیر TNFα، IL-1β و نوراپی‌نفرین 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 اسیدآمینه‌ای این ژن در گاو بیشترین همولوژی را با گوسفند، موش، موش صحرایی و سگ دارد. هم‌چنین میزان همولوژی این ژن در انسان و گاو بالاست (۹۴ درصد)، بنابراین احتمالا 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

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

پپتید همراه ژن کلسی‌تونین (*CGRP*)[1]، یک نوروپپتید با ۳۷ اسیدآمینه 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 سیستم-های 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* به‌همراه ماده P در نورون‌های حسی گانگلیا و در نورون‌های حرکتی به‌همراه 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 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* به‌همراه 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 لوکوترپن‌ها سبب آزاد سازی *CGRP* می‌شوند. سیتوکین‌های التهابی مانند اینترلوکین بتا (IL-1β) 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; 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 انبساط 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

[1] Calcitonin gene related peptide

Archive of SID
www.SID.ir

نظیر TNFα، IL-1β و نوراپی‌نفرین 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 به‌عنوان 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 ازجمله 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 پرواری) 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 ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

استخراج RNA

به‌منظور استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری RNX^{TM}(cat. RN7713C) به ترتیب مراحل زیر انجام شد:

در ابتدا نمونه بافت با استفاده از ازت مایع درون هاون همگن شده و سپس ۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم از نمونه آسیاب شده با یک میلی لیتر از محلول RNX (جهت هموژن کردن از سرنگ با سرسوزن۲۰ استفاده شد) هموژن شد و به مدت پنج دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. ۳۵۰ میلی‌لیتر کلروفرم ۹۹ درصد به محلول فوق اضافه شد، به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد، و محلول برای ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع بالایی به یک تیوب تیمار شده با دی ای پی سی منتقل شد و هم حجم مایع رویی ایزوپروپانول به محلول اضافه شد و، به آرامی تکان داده و برای ۱۵ دقیقه روی یخ نگهداری شده و سپس با شرایط قبلی سانتریفیوژ شد. مایع رویی از پلت جدا شد و یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به پلت داخل تیوب اضافه شد و بعد از ورتکس کردن محلول به مدت هشت دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و g ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی از پلت جدا شد و بعد از خشک شدن در دمای اتاق برای چند دقیقه ۳۰ میلی‌لیتر آب DEPC به پلت اضافه شد و تیوب در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به منظور حل شدن پلیت در آب قرار گرفت و سپس تیوب در فریزر ۸۰- 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 ۱۰۰-۱۰ نانوگرم) را با یک میکرولیتر oligodt ۲۰ میلی‌مولار و ۱۰/۵ میکرولیتر آب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۰ 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، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم RNase، چهار میکرولیتر بافر آنزیم رونوشت بردار معکوس و دو میکرولیتر مخلوطی از داکسی نوکلئوتید ۱۰ میلی‌مولار را به محلول حاوی RNA اضافه کرده و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از آن

Archive of SID
www.SID.ir

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

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

در این تحقیق نمونه کبد از گاوهای کشتارگاهی و گاوداری جمع‌آوری شد و بیان ژن برای ژن کنترل (بتا-اکتین) و ژن *CGRP* انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن *CGRP* و *β-actin* (بعنوان یک ژن کنترل) بعد از سنتز cDNA صورت گرفت. مواد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای این دو ژن شامل دو میکرولیتر cDNA، دو میکرولیتر بافر (۱۰X)، 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* پلی‌مراز (۵ واحد) و۱۲/۶ میکرولیتر آب مقطر بود.

با انجام PCR و با استفاده ازآغازگرهای 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 به‌مدت 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 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، به‌دلیل تفاوت در تعداد اگزون 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.ninigov) موجود در بانک ژن BLAST شد و توالی‌های نزدیک به این توالی انتخاب شدند.

به‌منظور 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 درست نمایی[1](ML)، نزدیکترین همسایه‌ها[2](NJ) و حداقل تکامل[3] (ME) ترسیم شدند (Saitou and Nei 1987).

نتایج و بحث

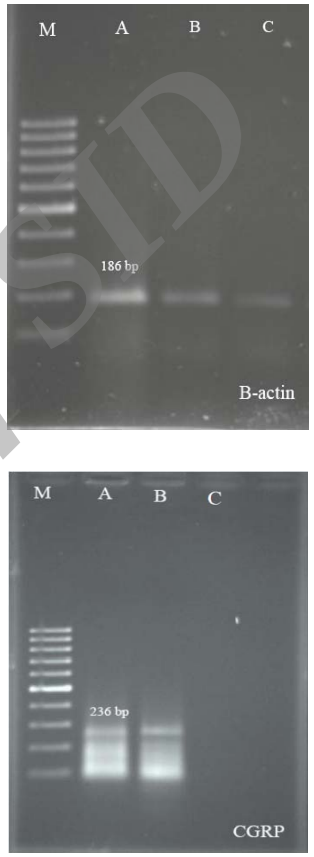
بیان ژن *CGRP* برای نمونه کبد گاوهای تا روز ۶۰ بعد از زایمان مشاهده شد ولی دارای باندهای اضافی بود (شکل۱) و با تغییر شرایط PCR باند اضافی همچنان مشاهده شد ولی برای نمونه‌های کبد گاو نر و گاوهای دوره خشک در طی این تحقیق بیان ژن *CGRP* مشاهده نشد. بنابراین به نظر می‌رسد مطالعه این ژن در نمونه‌های کبد گاوهای 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 (Bracqa 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.

[1] Maximum Likelihood
[2] Neighbor Joint
[3] Minimum Evolution

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- توالی آغازگرهای ژن *β-actin* و *CGRP*

ژن	آغازگرها	توالی‌ها	اندازه قطعه (bp)
ژن *β-actin*	آغازگر رفت	5′ TGGGACGACATGGAGAAGATCTGGC 3′	۱۸۶
	آغازگر برگشت	5′ CAGCACAGCCTGGATGGCCACGTAC 3′	
ژن *CGRP*	آغازگر رفت	5′ GCTGCCCCTCTTCCTGGTCCTCA 3′	۲۳۶
	آغازگر برگشت	5′ TGGCGGCATTACTGGTTCTCTCCTG 3′	



شکل۱- بررسی بیان ژن بتا اکتین (الف) و *CGRP* (ب) در بافت کبد گاوهای شیری. M) مارکر؛ A و B به‌ترتیب بیان ژن در گاو مربوط به طرح و نمونه کشتارگاهی.

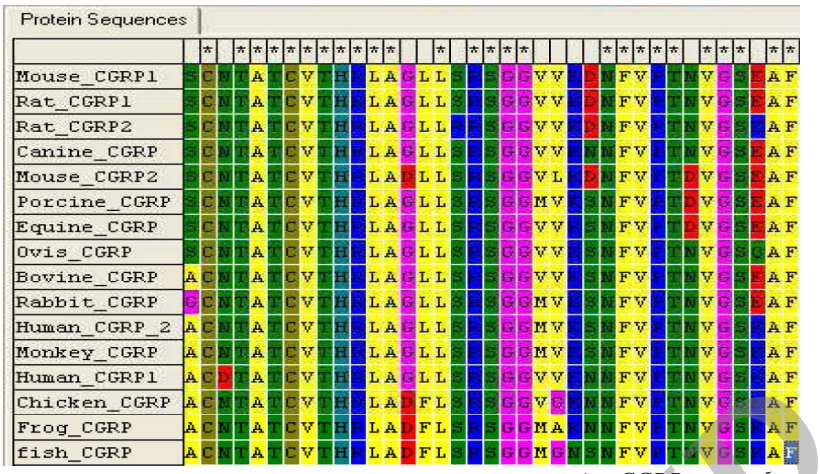
استروژن و پروژسترون اثر مستقیمی بر سنتز و آزادسازی CGRP ندارند ولی این دو هورمون استروئیدی در اعصاب گانگلیای پشتی و در حضور NGF باعث افزایش آزادسازی CGRP می‌شوند (Yallampalli et al. 2002). بنابراین احتمالا یکی از دلایل بیان این ژن در گاوهای شیری و عدم مشاهده بیان این ژن در گاوهای نر و گاوهای دوره خشک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

نتایج همردیف‌سازی توالی اسیدآمینه‌ای این ژن با استفاده از نرم-افزار MEGA نشان داد که این ژن در گونه‌های مختلف دارای نقاط حفاظت شده بالایی است (شکل۲). همچنین نتایج حاصل از BLAST توالی ژن *CGRP* گاوی با دیگر گونه‌ها توسط توسط نرم-افزار 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 (جدول۲). همچنین درصد همولوژی این ژن در گاو و انسان ۹۴ درصد گزارش شده است، بنابراین احتمالاًمی‌توان 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 مشخص کننده 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 (جدول۲). هم‌چنین توالی اسید آمینه‌ای این ژن در گونه‌های مختلف جانوری دارای اسید آمینه‌های حفاظت شده زیادی است (شکل۳).

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[1] (شکل۵) گوسفند و خرگوش نزدیکترین حیوانات به گاو بودند و این حیوانات به همراه موش، موش صحرایی و خوک با ضریب اطمینان متوسط

[1] Neighbor joint

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۲- همردیف‌سازی توالی اسید آمینه‌ای ژن *CGRP* در گونه‌های مختلف جانوری

* ستون‌های ستاره‌دار نشان‌دهنده اسید آمینه‌های حفاظت شده در گونه‌های مختلف جانوری است.

جدول ۲- ماتریس همولوژی توالی *CGRP* گونه‌های مختلف حیوانات

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
Fish *CGRP*-۱	۱۰۰															
Frog *CGRP*-۲	۹۱/۹	۱۰۰														
Ovis *CGRP*-۳	۸۱/۱	۸۱/۱	۱۰۰													
Rat *CGRP*1 -۴	۷۸/۴	۸۱/۱	۹۴/۶	۱۰۰												
Rat *CGRP*2 -۵	۷۸/۴	۸۱/۱	۹۱/۹	۹۴/۶	۱۰۰											
Canine *CGRP* -۶	۷۸/۴	۸۳/۸	۹۴/۶	۹۷/۳	۹۱/۹	۱۰۰										
Equine *CGRP*-۷	۷۸/۴	۷۸/۴	۹۴/۶	۹۴/۶	۸۹/۲	۹۴/۶	۱۰۰									
Human *CGRP*1-۸	۸۱/۱	۸۶/۵	۸۹/۲	۸۹/۲	۸۹/۲	۹۱/۹	۸۶/۵	۱۰۰								
Monkey *CGRP* -۹	۸۹/۲	۸۹/۲	۹۱/۹	۸۹/۲	۸۹/۲	۸۹/۲	۸۹/۲	۹۱/۹	۱۰۰							
Mouse *CGRP*1-۱۰	۷۸/۴	۸۱/۱	۹۴/۶	۱۰۰	۹۴/۶	۹۷/۳	۹۴/۶	۸۲/۹	۸۲/۹	۱۰۰						
Mouse *CGRP*2-۱۱	۷۸/۴	۸۱/۱	۸۶/۵	۹۱/۹	۸۶/۵	۸۹/۲	۹۱/۹	۸۱/۱	۸۱/۱	۹۱/۹	۱۰۰					
Rabbit *CGRP*-۱۲	۸۳/۸	۸۳/۸	۹۱/۹	۹۱/۹	۸۶/۵	۹۱/۹	۹۱/۹	۸۶/۵	۹۴/۶	۹۱/۹	۸۳/۸	۱۰۰				
Bovine *CGRP*-۱۳	۸۳/۸	۸۳/۸	۹۴/۶	۹۴/۶	۸۹/۲	۹۴/۶	۹۴/۶	۹۱/۹	۹۴/۶	۹۴/۶	۸۶/۵	۹۴/۶	۱۰۰			
Chicken *CGRP*-۱۴	۹۱/۹	۹۴/۶	۸۳/۸	۸۳/۸	۸۳/۸	۸۶/۵	۸۱/۱	۸۹/۲	۸۶/۵	۸۳/۸	۸۳/۸	۸۱/۱	۸۶/۵	۱۰۰		
Human*CGRP*2-۱۵	۸۹/۲	۸۹/۲	۹۱/۹	۸۹/۲	۸۹/۲	۸۹/۲	۸۹/۲	۹۱/۹	۱۰۰	۸۹/۲	۸۱/۱	۹۴/۶	۹۴/۶	۸۶/۵	۱۰۰	
Porcine *CGRP*-۱۶	۸۱/۱	۸۱/۱	۹۱/۹	۹۱/۹	۸۶/۵	۹۱/۹	۹۷/۳	۸۳/۸	۹۱/۹	۹۱/۹	۸۹/۲	۹۴/۶	۹۱/۹	۷۸/۴	۹۱/۹	۱۰۰

در یک دسته قرار گرفتند (۷۴درصد، PP1.0). در درخت UPGMA[1] (شکل۶) 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 صحرایی، میمون، اسب، 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.

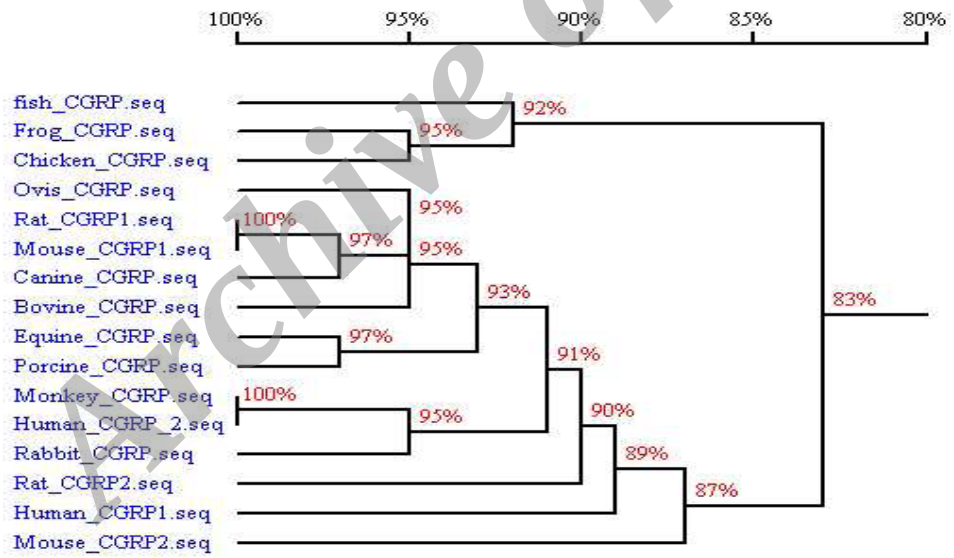
درخت همولوژی شباهت بالای این حیوانات از نظر این پپتید را تایید کرد. از نظر همولوژی *CGRP* بین این حیوانات

[1] Maximum likelihod

Archive of SID
www.SID.ir

	S	C	N	T	A	T	C	V	T	H	R	L	A	G	L	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	.	.

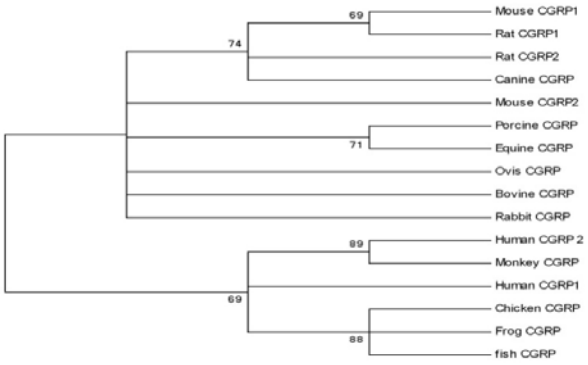
شکل۳- توالی هاپلوتایپ‌های پروتئین *CGRP* در گونه‌های مختلف جانوری. نقاط جدول نشان‌دهنده اسیدآمینه‌های حفاظت شده است و اسیدآمینه‌های غیر حفاظت شده با حروف مشخص شده است.



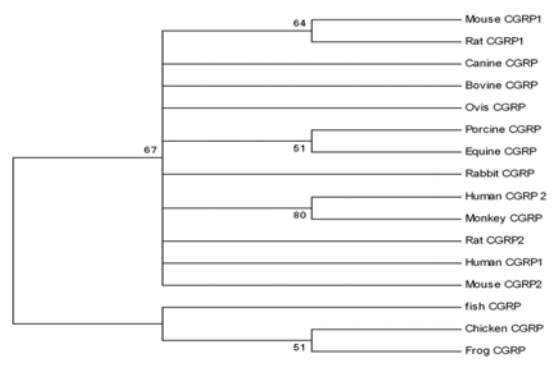
شکل۴- درخت همولوژی گونه‌های مختلف دامی با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN. گونه‌های موجود در یک شاخه دارای همولوژی یکسان هستند.

دارای همولوژی بالا (۸۳ درصد) بود و گاو بیشترین همولوژی (۹۵ درصد) را با گوسفند، موش (*CGRP*1)، موش صحرایی (*CGRP*1) و سگ داشت (شکل۴). 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 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 (جدول۲) بنابراین احتمالاً می‌توان از کیت انسان و یا موش جهت اندازه‌گیری *CGRP* در گاو استفاده کرد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۵- 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.



شکل۶- درخت UPGM حاصل ازمجموعه 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-relatedpeptide and adrenomedulin. 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, Delehaye 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 insightsinto the function of calcitonin receptor and calcitonin receptor-like receptor in bone. Journal of Musculoskeletal Neurology Intractions 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 sestemic 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.

Archive of SID

www.SID.ir