رهیافت‌های نوین در علوم سلولی و مولکولی
JNACMS
دوره ۲ شماره ۳ پاییز ۱۴۰۳
Journal homepage: https://sanad.iau.ir/journal/nacms

بررسی فراوانی جهش در بیماران SARS-CoV-2 مثبت

مژده لشکری ۱، اشرف کریمی نیک*[۲،۱]، محمد جواد سلطانی بناوندی ۱
۱. گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
۲. مرکز تحقیقات ایمن سازی مواد غذایی و کشاورزی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

چکیده

شیوع بیماری کروناویروس ۲۰۱۹، ناشی از سندرم حاد تنفسی جدید کروناویروس (SARS-CoV-2)، به یک بحران بهداشت جهانی در حال تکامل تبدیل شده است. ژن اسپایک (*S*)، مسئول تولید پروتئین اسپایک است که به ویروس کمک می‌کند تا به سلول‌های انسانی متصل شود و وارد آن‌ها شود. جهش‌های این ژن می‌توانند تأثیرات قابل توجهی بر روی قابلیت انتقال ویروس، شدت بیماری و همچنین اثربخشی واکسن‌ها داشته باشند. هدف از تحقیق حاضر بررسی میزان فراوانی جهش در بیماران بستری آلوده به SARS-CoV-2 بوده است. تحقیق حاضر نوعی تحقیق توصیفی- مقطعی است و بر روی ۷۰ بیمار مبتلا به کووید-۱۹ بستری در بیمارستان افضلی پور شهر کرمان، انجام شد. استخراج RNA از نمونه تنفسی افراد مورد مطالعه و سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت انجام شد. شناسایی ویروس، به روش ریل تایم پی سی ار سایبرگرین انجام پذیرفت. همچنین نمونه های کوید مثبت، به روش سنگر تعیین توالی شدند و فراوانی جهش در آن ها بررسی شد. کلیه نمونه های مثبت مورد بررسی SARS-CoV-2، شامل جایگزینی در موقعیت ۲۴۵۲۵ از ژن S بودند و نوکلئوتید C با T جایگزین شده بود که منجر به جایگزینی اسید آمینه هیستیدین به تیروزین شده است. تحلیل توالی پروتئین با استفاده از نرم‌افزار آنلاین نشان داد که این جهش‌ها باعث تغییر در سطح اسیدآمینه شده و قادر به تغییر ساختار سه‌بعدی پروتئین اسپایک در SARS-CoV-2 نبودند. هر چند جهش های با عدم توانایی تغییر در ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها به گیرنده‌های مرتبط با سیستم ایمنی به واکنش نشان نمی‌دهند و با وجود این بررسی جهش‌های می‌تواند به توسعه داروهای جدید برای مهار ویروس و کاهش عوارض بیماری کووید-۱۹ کمک کند.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:
دریافت:۱۴۰۳/۰۹/۲۱
پذیرش:۱۴۰۳/۱۰/۰۷
چاپ:۱۴۰۳/۱۱/۲۳
DOI:

کلمات کلیدی: کووید ۱۹، ژن اسپایک، موتاسیون

* نویسنده مسئول: *Email*
a.kariminik@iauk.ac.ir

مقدمه

کوید ۱۹، بیماری مسری است که در سال ۲۰۱۹ شناسایی و نام آن از coronavirus disease 2019 (بیماری کروناویروس ۲۰۱۹) گرفته شد. این بیماری توسط ویروس SARS-CoV-2 ایجاد می‌شود و به طور عمده با عفونت ریه ها و سایر سیستم های بدن مربوط به تنفس مرتبط است (۱). کروناویروس‌ها از راستهٔ Nidovirales، خانواده Coronaviridae، زیرخانوادهٔ *Coronavirinae* بوده که بسته به سروتیپ و ژنوتیپ ویروس‌های کرونا به چهار جنس تقسیم می‌شوند و شامل: *α-coronavirus*، β-*coronavirus*،γ-*coronavirus* وδ-*coronavirus* هستند (۳, ۲). کرونا ویروس‌های انسانی (HCoVs) متعلق به دو مورد اول هستند.HCoVs عمدتاً برای این شناخته شده هستند که باعث عفونت دستگاه تنفسی فوقانی و تحتانی می‌شوند، ولی علائم ممکن است شامل علائم مرتبط با سیستم عصبی و گوارشی نیز باشد (۴). در حال حاضر، خانواده کروناویروس‌ها شامل چندین گونه است. از این گونه‌ها، تعدادی به انسان‌ها عفونت می‌دهند و برخی از آن‌ها می‌توانند بیماری‌های جدی به وجود آورند. گونه‌های مهم کروناویروس‌ها که بیشتر به انسان‌ها انتقال می‌یابند عبارتند از: کروناویروس سندروم تنفسی حاد شدید (SARS-CoV)، که این ویروس باعث بروز بیماری سندروم تنفسی حاد شدید (SARS) در سال ۲۰۰۳ شد. کروناویروس سندروم تنفسی خلیج فارس (MERS-CoV)، که این ویروس برای اولین بار در سال ۲۰۱۲ در خلیج فارس شناسایی شد. بیماری سندروم تنفسی خلیج فارس (MERS) در برخی مناطق جهان، به ویژه منطقه خاورمیانه، منتشر شده است. کروناویروس جدید (SARS-CoV-2)، در سال ۲۰۱۹ شناسایی شد و عامل اصلی بیماری کووید-۱۹ است. ویروس کووید-۱۹ به طور گسترده در سراسر جهان منتشر گردید و منجر به شیوع جهانی و پاندمی شد (۵). ژنوم کروناویروس، یک رشته طولانی و پیچیده است که می‌تواند تا به ۳۰ کیلوبایت، طول داشته باشد. این ژنوم درون نوکلئوکپسید قرار گرفته است و توسط پروتئین نوکلئوکپسید، محافظت می‌شود (۶). مطالعه ژنوم کروناویروس و تحلیل توالی آن می‌تواند به پژوهشگران این عرصه کمک کند تا خصوصیات و عملکرد ویروس را درک بهتری داشته باشند. ژنوم کروناویروس SARS-CoV-2، حاوی حدود ۳۰،۰۰۰ نوکلئوتید است و حاوی ژن‌های مختلف است که کدگذاری برای تولید پروتئین‌های مختلف در ویروس را انجام می‌دهند. ژن‌های ساختمانی، که کدگذاری برای پروتئین‌های ساختاری مانند پروتئین اسپایک، پروتئین انولوپ، پروتئین ماتریکس و پروتئین نوکلئوکپسید را دارند. ژن‌های تنظیمی که نقش در کنترل فعالیت‌های ژنتیکی و ترجمه پروتئین‌ها را دارند و ژن‌های مربوط به آنزیم‌ها، که کدگذاری برای آنزیم‌هایی که در فرآیندهای تکثیر ویروس نقش دارند را انجام می‌دهند. ژن‌های دیگری هم شناسایی شده که وظیفه کدگذاری برای پروتئین‌های مهم در عملکرد ویروس دارند، مانند: آنزیم‌هایی که در فعالیت‌های مهار و تغییر پاسخ ایمنی میزبان نقش ایفا می کنند (۷). ژن S یا ژن اسپایک[1] مسئول تولید پروتئین اسپایک، است. این پروتئین بر روی سطح خارجی ویروس قرار دارد و نقش کلیدی در ورود ویروس به سلول میزبان، اتصال به سلول میزبان و ایجاد پاسخ ایمنی دارد. پروتئین اسپیک، به ویروس شکل منحصر به فردی می‌دهد و می‌تواند هدف برخی واکسن‌ها و داروها باشد (۸). با مطالعه جهش در ژن های ویروس، می توان درک بهتری از نحوه تغییر ویروس پیدا کرد و پیش‌بینی کرد که آیا ممکن است ویروس به گونه‌های جدیدی تبدیل شود. همچنین توسعه واکسن‌های مؤثرتر تسهیل گردیده و استراتژی‌های بهداشتی و درمانی را بهبود بخشیده می شود (۹). بنابراین بررسی جهش در سطح تغییر اسیدآمینه و پروتئین در نمونه های کوید مثبت و تحلیل جهش‌های موجود در ژن S ویروس کووید-۱۹ در جهت توسعه و بهبود واکسن‌ها برای سازگاری با نسخه‌های جدید ویروس بسیار مفید بوده و بررسی جهش‌های در ژن S با هدف توسعه داروهای جدید برای مهار ویروس و کاهش عوارض بیماری کووید-۱۹ شامل طراحی داروهایی که قادر به تعامل موثر با نسخه‌های جدید

[1] Spike protein

ویروس باشند، می تواند جنبه های نوینی از تحقیق را نشان دهد.

روش کار

تحقیق حاضر نوعی تحقیق توصیفی- مقطعی است. جامعه آماری این تحقیق شامل تعداد ۷۰ نفر از بیماران بزرگسالی است که تست کوید آن ها مثبت بوده و دارای علایم بالینی حاد شامل: سرفه خشک، تب، کسلی، خستگی و بی حالی، سنگینی تنفس و کاهش اکسیژن بوده اند. سطح اکسیژن در تمامی بیماران کمتر از ۹۰ درصد بود که این بیماران از دو جنس زن و مرد در بخش بیماری های عفونی بیمارستان افضلی پور شهر کرمان بستری شده بودند. رده سنی بیماران از ۱۸ تا ۷۰ سال و از هر دو جنس زن و مرد بود. در این پژوهش برای تعیین نمونه از روش نمونه‌گیری، تصادفی ساده استفاده گردید. جهت تعیین حجم نمونه از فرمول کوکران استفاده شده است. باتوجه‌به اینکه جامعه آماری ۸۵ بیمار در رده سنی مدنظر (۱۸-۷۰ سال) در دوره زمانی تحقیق در بیمارستان بستری بودند، حجم نمونه با میزان خطای ۵ درصد ۷۰ بیمار بدست آمد و بنابراین ۷۰ بیمار جهت انجام آزمایش ها انتخاب گردید.

N= **۸۵**

d=۰/۰۵ z=۱/۹۶ q=۰/۵ p=۰/۵

$$n = \frac{\frac{z^2 pq}{d^2}}{1 + \frac{1}{N}\left(\frac{z^2 pq}{d^2} - 1\right)}$$

$$= \frac{\frac{(1.96^2) * 0.5 * 0.5}{0.5^2}}{1 + \frac{1}{85}\left(\frac{(1.96^2) * 0.5 * 0.5}{0.1^2} - 1\right)} \approx 70$$

قبل از اقدام به نمونه گیری، جهت انجام این تحقیق کد کمیته اخلاق زیست پزشکی به شماره IR.IAU.KERMAN.REC.1401.052 از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان اخذ گردید.

شناسایی ویروس SARS-CoV-2

از نمونه های تنفسی گرفته شده از بیماران استخراج ژنومی توسط کیت تجاری (KPG-VDREK، ایران) طبق دستورالعمل آن، انجام شد. جهت شناسایی و تشخیص ویروس از روش ریل تایم پی سی ار با استفاده از کیت تجاری (KPG-VDREK، ایران) استفاده شد. این کیت به طور اختصاصی برای تشخیص ژن ORF1، ویروس طراحی شده و قادر به تشخیص ۵ کپی بر میلی لیتر می باشد.

بررسی جهش در سویه های SARS-CoV-2

جهت بررسی موتاسیون یا جهش در ژنوم سویه های کوید مثبت، نقاط HOT SPOT با توجه به بررسی مقالات معتبر منتشر شده شناسایی گردید. لذا ژن S انتخاب گردید. ژن S از SARS-CoV-2در بازه ۲۳۲۷۴ تا ۲۳۶۴۱ با استفاده از پرایمر خاص (جدول ۱)، برای این ژن تکثیر شد. به این ترتیب، RNA ویروسی استخراج شد و سپس با استفاده از کیت‌های تجاری کارمانیا پارس ژن، سنتز cDNAانجام شد و سپس ژن SARS-CoV-2 S با استفاده از مستر میکس پی سی ار، در دستگاه ترمال سایکلر تکثیر شد. برنامه تکثیر: ۹۴ درجه سانتی گراد، ۲ دقیقه، ۴۰ چرخه به ترتیب ۹۴ درجه سانتی گراد، ۲۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد، ۲۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد، ۶۰ ثانیه. با تکثیر PCR به طول ۳۸۹ جفت بازی، محصول PCR مخصوص ژن-SARS CoV-2 Sتأیید شد. سپس محصول PCR توسط شرکت Microsynth Seqlab در سوئد با استفاده از تکنیک تعیین توالی سنگر Sanger تعیین سکانس شد. نتایج توالی یابی با استفاده از نرم افزارهای آنلاین NCBI و UCSC Blat به ژن مرجع (NC_045512v2:23274+23662) همگام سازی شدند. تصاویر سه بعدی (3D) پروتئین‌های سویه طبیعی و جهش یافته با استفاده از نرم افزار آنلاین Swiss Model، ترسیم گردید. توالی یابی با استفاده از UCSC Blatو با استفاده از تارنمای https://genome.ucsc.edu، انجام شد. نتایج Blat با قطعه اصلی آن سویه مقایسه گردید. بازهایی در دو رشته با هم یکسان نبودند و به عبارتی جایگزین شده اند، شناسایی گردید همچنین موقعیت جهش ها بدست آمد. در توالی هایی که تغییر باز وجود داشت آن توالی در برنامه Gene runner برای تعیین تغییر اسید آمینه مورد بررسی قرار گرفت (۱۰).

جدول ۱- توالی ژن *S* جهت بررسی موتاسیون در نمونه های SARS-CoV-2 مثبت

طول قطعه (bp)	توالی('5-'3)	نام ژن
۳۸۹	F: ACACTACTGATGCTGTCCGT R: ACCAAGTGACATAGTGTAGGCA	*S*

نتایج

در این تحقیق بیماران SARS-CoV-2 مثبتی که در بیمارستان افضلی‌پور بستری شدند و فرم رضایت‌نامه را امضا نموده و موافقت خود را به همکاری در این پژوهش اعلام نمودند، وارد مطالعه شدند. نمونه‌ها شامل ۷۰ نمونه بیمار مبتلا به SARS-CoV-2 بود که بر اساس تست ریل تایم پی‌سی‌آر مطالعه شدند. نسبت زنان به مردان ۲/۴ بود. رده سنی آن ها از ۱۸ تا ۷۰ بود.

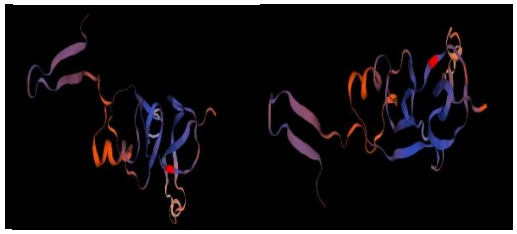
نتایج بررسی جهش در نمونه های Sars cov-2 مثبت

در جدول (۲)، توالی پروتئینی ژن *S* ویروس کوید ۱۹ در دو حالت وحشی (طبیعی) و جهش یافته (موتان) نشان داده شده است. اسید آمینه تغییر یافته با رنگ زرد مشخص گردیده شده است که اسید آمینه به رنگ زرد به اسید آمینه به رنگ قرمز جهش پیدا کرده است و جهش یافته محسوب می شود. یا فته ها نشان داد که کلیه ویروس‌های مورد بررسی SARS-CoV-2 شامل جایگزینی در موقعیت ۲۴۵۲۵ از ژن *S* هستند که نوکلئوتید C با T جایگزین شده است که منجر به جایگزینی اسید آمینه His هیستیدین به تیروزین Thy (p. His23525Thy) شده است.

جدول ۲- نمونه توالی پروتئینی ژن S ویروس کوید ۱۹ در دو حالت وحشی (طبیعی) و جهش یافته

ژن S	توالی اسید آمینه
Wild وحشی	TTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVS VITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPV AIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAG CLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQT QTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLG
Mutated جهش یافته	TTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVS VITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPV AIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAG CLIGAEYVNNSYECDIPIGAGICASYQT QTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLG

شکل (۱)، ساختار سه بعدی ژن *S* در SARS-COV-2 S در دو حالت وحشی و جهش یافته را نشان می دهد. همان طور که در شکل مشخص شده و با علامت پیکان نشان داده شده است با تغییر اسید آمینه در فرم جهش یافته، هیچ تغییری در ساختار پروتئین ایجاد نشده است. علاوه بر این، چندین جایگزینی صامت در ژن *S* ویروس SARS-CoV-2 مشاهده گردید که به تفصیل در جدول (۳)، ذکر شده است. به طور نمونه: در ردیف اول، در موقعیت ۲۳۵۹۹، تغییر باز تیمین به جای سیتوزین به صورت جهش صامت در ۱۰۰ درصد نمونه ها یافت شده است و در مورد ردیف آخر در موقعیت ۲۳۶۵۵، تغییر باز سیتوزین به جای گوانین به صورت جهش صامت در ۱۱ درصد نمونه ها یافت شده است.



شکل ۱- ساختار سه بعدی ژن S در SARS-COV-2در دو حالت وحشی (سمت چپ) و جهش یافته (سمت راست). تصاویر سه بعدی با استفاده از نرم‌افزار Swiss Model نشان داد که جایگزینی قادر به تغییر ساختار سومی ژن SARS-CoV-2 نبوده‌اند.

جدول ۳- جهش‌ها و درصد فراوانی آن ها در نمونه های SARS-COV-2 مثبت

موقعیت جهش و تغییر باز مربوطه	نوع جهش	میزان فراوانی (درصد) در کل نمونه ها
23599 T>G	جهش صامت	۱۰۰
23604 C>A	جهش صامت	۱۰۰
23427A>T	جهش صامت	۲۲
23442C>G	جهش صامت	۲۲
23473G>T	جهش صامت	۱۱
23476G>A	جهش صامت	۱۱
23466 T>A	جهش صامت	۱۱
23421 T>C	جهش صامت	۱۱
23479A>T	جهش صامت	۱۱
23480A>T	جهش صامت	۱۱
23494C>A	جهش صامت	۱۱
23391 T>G	جهش صامت	۱۱
23403 A>G	جهش صامت	۲۲
23430 C>T	جهش صامت	۲۲
23440 A>T	جهش صامت	۲۲
23441 G>C	جهش صامت	۲۲
23420 G>T	جهش صامت	۲۲
23371 T>C	جهش صامت	۱۱
23417 G>C	جهش صامت	۱۱
23487 T>G	جهش صامت	۱۱
23483 A>C	جهش صامت	۱۱
23484 A>T	جهش صامت	۱۱
23493 A<C	جهش صامت	۱۱
23520 C>T	جهش صامت	۱۱
23516 G>T	جهش صامت	۱۱
23546 T>A	جهش صامت	۱۱
23558 A>C	جهش صامت	۱۱
23563 T>G	جهش صامت	۱۱
23580 G>T	جهش صامت	۱۱
23569 T>G	جهش صامت	۱۱
23593 G>C	جهش صامت	۱۱
23628 G>T	جهش صامت	۱۱
23623 A>G	جهش صامت	۱۱
23617 T>C	جهش صامت	۱۱
23655 C>G	جهش صامت	۱۱

بحث

SARS-CoV-2، یکی از ویروس‌های کروناویروس جدید است که منجر به شیوع جهانی بیماری کووید-۱۹ گردید (۱۱). طبق داده‌های ذخیره سازمان بهداشت جهانی براساس آمار تا نوامبر ۲۰۲۳، تعداد موارد تایید شده این بیماری به تعداد ۷۷۲، ۰۵۲، ۷۵۲ مورد می‌رسد و کووید-۱۹ تاکنون منجر به ۶، ۹۸۵، ۲۷۸ مورد فوت شده است (۱۲). ویروس کووید-۱۹، که ناشی از ویروس SARS-CoV-2 است، در طول زمان جهش‌های متعددی را تجربه کرده است (۱۳). برخی از این جهش‌ها باعث ایجاد واریانت‌های جدیدی شده‌اند که ممکن است بر روی انتقال، شدت بیماری یا اثربخشی واکسن‌ها تأثیر بگذارند. از جمله واریانت‌های شناخته شده می‌توان به آلفا، بتا، گاما و دلتا اشاره کرد (۱۴). هر یک از این واریانت‌ها ویژگی‌های خاص خود را دارند و در برخی موارد، ممکن است باعث افزایش سرعت انتشار ویروس شوند. واریانت‌های آلفا، بتا، گاما و دلتا از جمله واریانت‌های شناخته شده ویروس SARS-CoV-2 هستند که باعث بیماری COVID-19 می‌شوند. واریانت آلفا (B.1.1.7)، نخستین بار در سپتامبر ۲۰۲۰ در انگلستان شناسایی شد. آلفا به دلیل افزایش قابلیت انتقال و احتمال بالاتر ابتلا به بیماری شدید، توجه زیادی را جلب کرد. واریانت بتا (B.1.351)، در مه ۲۰۲۰ در آفریقای جنوبی شناسایی شد. بتا دارای جهش‌هایی است که می‌تواند به کاهش اثر واکسن‌ها و درمان‌ها منجر شود و همچنین قابلیت انتقال بالایی دارد. واریانت گاما (P.1)، در نوامبر ۲۰۲۰ در برزیل شناسایی شد.

گاما نیز به دلیل جهش‌های خاص خود، می‌تواند به فرار از سیستم ایمنی و کاهش اثر واکسن‌ها کمک کند. واریانت دلتا (B.1.617.2)، نخستین بار در اکتبر ۲۰۲۰ در هند شناسایی شد و به سرعت در سراسر جهان گسترش یافت (۱۵-۱۷). این واریانت به دلیل قابلیت انتقال بسیار بالا و شدت بیماری‌زایی بیشتر، نگرانی‌های زیادی را به وجود آورد. در تحقیق حاضر، بررسی ژن SARS-CoV-2، نشان داد که همه ویروس‌های مورد بررسی SARS-CoV-2 شامل جایگزینی در موقعیت ۲۴۵۲۵ از ژن *S* هستند که نوکلئوتید C با T جایگزین شده است که منجر به جایگزینی اسید آمینه His هیستیدین به Thy (p. His23525Thy) تیروزین شده است. تحلیل توالی پروتئین با استفاده از نرم‌افزار آنلاین (مدل Swiss) نشان داد که این جهش‌ها قادر به تغییر ساختار سه‌بعدی پروتئین اسپایک در SARS-CoV-2 نیستند. از این رو، ممکن است فرض بر این باشد که این جهش‌ها، با وجود تغییرات در اسیدهای آمینه، تأثیر قابل توجهی بر ساختار پروتئین اسپایک نداشته باشند. این نتیجه به معنای عدم تأثیر جهش‌ها بر پاسخ‌های ایمنی مرتبط با سیستم ایمنی است، زیرا گیرنده‌های مرتبط با سیستم ایمنی به ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها واکنش نشان می‌دهند. به عبارت دیگر، به نظر می‌رسد که جهش‌ها احتمالاً تأثیر چندانی در پاسخ‌های ایمنی به ویروس نداشته و احتمالاً باعث فرار از سیستم ایمنی توسط SARS-CoV-2 نمی‌شوند. با این حال، باید توجه داشت که تعامل پروتئین اسپایک در SARS-CoV-2 با گیرنده‌های خود روی سلول‌های انسانی ممکن است تحت تأثیر قرار بگیرد و این موضوع نیازمند بررسی‌های بیشتر است (۱۸). به طور معمول، جهش‌ها می‌توانند تأثیر مستقیمی بر تعامل پروتئین ویروسی با گیرنده‌های سلولی داشته باشند. همچنین، درست است که مدل Swiss با استفاده از الگوهای قبلی پروتئین‌ها، ساختار سه‌بعدی آن‌ها را نشان می‌دهد، اما این روش ممکن است با برخی اشتباهات همراه باشد و نتایج آن نمی‌تواند به‌طور مطلق برای شرایط واقعی صدق کند. بنابراین، بررسی ساختار سه‌بعدی پروتئین اسپایک با استفاده از تکنیک‌هایی مانند کریستالوگرافی اشعه ایکس (۱۹)، ضروری است تا تأثیر جهش‌ها در واقعیت بررسی شود. این روش‌ها به ما امکان می‌دهند تا به طور دقیق تر و جزئی‌تر به ساختار پروتئین و تغییرات ناشی از جهش‌ها در آن پی ببریم. مدل Swiss یکی از الگوریتم‌های محاسباتی است که برای پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها استفاده می‌شود. در حالی که این الگوریتم مفید و قدرتمند است، اما ممکن است با برخی از اشتباهات مواجه شود.. مدل Swiss معمولاً بر اساس الگوهای قبلی پروتئین‌ها، ساختار سه‌بعدی را پیش‌بینی می‌کند. اما در برخی موارد، این پیش‌بینی ممکن است با ساختار واقعی پروتئین مطابقت نداشته باشد. به عبارتی، ممکن است به دلیل تغییرات و تنوع زیستی، الگوهای قبلی در تمامی موارد قابل استفاده نباشند. همچنین ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها تحت تأثیر عوامل محیطی مانند pH، دما، نیروی یونی، محلول، و غیره قرار می‌گیرد (۲۰). الگوریتم‌های محاسباتی مانند Swiss معمولاً این تأثیرات را در نظر نمی‌گیرند و فرض می‌کنند که ساختار پروتئین در شرایط استاندارد را نشان می‌دهند. این ممکن است با واقعیت تفاوت داشته باشد. در بعضی موارد، مدل Swiss ممکن است در جزئیات جزیره‌های آمینو اسیدی کوچک شکست بخورد و ساختار دقیق را به طور کامل پیش‌بینی نکند. این اشتباهات به خصوص در بزرگنمایی و کوچک نمایی رشته‌های پروتئینی ممکن است رخ دهند. بنابراین، برای اطمینان حاصل کردن از صحت ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها، استفاده از روش‌های تجربی مانند کریستالوگرافی اشعه ایکس که به طور مستقیم ساختار پروتئین را تعیین می‌کند، ضروری است. نکته قابل توجه در این مطالعه تعداد نمونه‌های مورد بررسی است. در خصوص محدودیت های تحقیق حاضر، باید گفت که در این مطالعه، ۷۰ بیمار مورد بررسی قرار گرفت که بر اساس تعداد بیماران بستری در دوره زمانی تحقیق حاضر انتخاب شد. با توجه به اینکه بیماری کووید-۱۹ به طور شدید در جوامع انسانی شیوع یافته است و تقریباً اکثر افراد را آلوده کرده و در برخی موارد عفونت‌های مکرر رخ می‌دهد، بررسی ۷۰ نمونه بیمار به دلیل محدودیت‌های نمونه گیری و جامعه مبتلادر یک منطقه، قادر به درک جامعی از کل کشور نخواهد بود. اما در عین حال، بررسی جمعیت‌های کوچک می‌تواند با تعیین نقشه راه، به محققان داده‌های بیشتری برای بررسی رفتارهای سیستم ایمنی در برابر ویروس ارائه دهد و در ترسیم مطالعات با اندازه‌های بزرگتر کمک کند. بررسی جهش‌های در ژن *S*

می‌تواند به توسعه داروهای جدید برای مهار ویروس و کاهش عوارض بیماری کووید-۱۹ کمک کند. این شامل طراحی داروهایی است که قادر به تعامل موثر با نسخه‌های جدید ویروس باشند. و نیز بررسی جهش‌ها در ژن S می‌تواند به درک بهتر از پاسخ ایمنی بدن در برابر ویروس کووید-۱۹ کمک کند (۲۱).

نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان می‌دهد که جهش‌های مشاهده شده در نمونه‌های مثبت SARS-CoV-2، به ویژه جایگزینی نوکلئوتید C با T در موقعیت ۲۴۵۲۵ از ژن S، منجر به تغییر در سطح اسید آمینه (از هیستیدین به تیروزین) شده است. با این حال، تحلیل توالی پروتئین نشان می‌دهد که این تغییرات قادر به تغییر ساختار سه‌بعدی پروتئین اسپایک در SARS-CoV-2 نیستند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که این جهش‌ها ممکن است تأثیرات خاصی بر عملکرد ویروس داشته باشند، اما به نظر نمی‌رسد که ساختار پروتئین اسپایک را به طور قابل توجهی تحت تأثیر قرار دهند. تحلیل جهش‌های موجود در ژن S ویروس کووید-۱۹ به محققین کمک می‌کند تا تغییرات و تحولات این ویروس را بهتر درک کنند. بررسی جهش‌های این ژن، نشان می دهد که چگونه ویروس ممکن است تغییر کند و به نسخه‌های جدیدی تبدیل شود و لذا این اطلاعات برای توسعه و بهبود واکسن‌ها بسیار حیاتی است. واکسن‌ها باید به گونه‌ای طراحی شوند که بتوانند با این جهش‌ها سازگار شوند و همچنان ایمنی مؤثری را فراهم کنند. به عبارت دیگر، اگر بتوان پیش‌بینی کرد که ویروس چگونه تغییر می‌کند، می‌توانیم واکسن‌هایی طراحی نمود که در برابر این تغییرات مقاوم باشند و به این ترتیب، از شیوع بیشتر بیماری جلوگیری شود.

مراجع

1. Wu Y, Ho W, Huang Y, Jin D-Y, Li S, Liu S-L, et al. SARS-CoV-2 is an appropriate name for the new coronavirus. The Lancet. 2020;395(10228):949-50.
2. Mavrodiev EV, Tursky ML, Mavrodiev NE, Ebach MC, Williams DM. On Classification and Taxonomy of Coronaviruses (Riboviria, Nidovirales, Coronaviridae) with special focus on severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-Cov-2). bioRxiv. 2020:2020.10. 17.343749.
3. Verma T, Sinha M, Nitin B, Yadav SR, Shah K, Chauhan NS. A review on Coronavirus Disease and potentially active drugs targeting Coronavirus. Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ). 2021;5(2):110-20.
4. Malik YA. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. The Malaysian journal of pathology. 2020;42(1):3-11.
5. Rabaan AA ,Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: a comparative overview. Infez Med. 2020;28(2):174-84.
6. Bai C, Zhong Q, Gao GF. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. Science China Life Sciences. 202.۲۸۰-۹۴:(۲)۶۵;۲
7. Tam D, Lorenzo-Leal AC, Hernández LR, Bach H. Targeting SARS-coV-2 non-structural proteins. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24(16):13002.
8. Yadav R, Chaudhary JK, Jain N, Chaudhary PK, Khanra S, Dhamija P, et al. Role of structural and non-structural proteins and therapeutic targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. Cells. 2021;10(4):821.
9. Dong Y, Dai T, Wei Y, Zhang L, Zheng M, Zhou F. A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. Signal transduction and targeted therapy. 2020;5(1):237.
10. Lehrer S, Rheinstein PH. Sars-CoV-2 *orf1b* gene sequence in the *ntng1* gene on human chromosome 1. in vivo. 2020;34(3 suppl):1629-32.
11. Wu D, Wu T, Liu Q, Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. International journal of infectious diseases. 2020;94:44-8.
12. Creecy A, Awosanya OD, Harris A, Qiao X, Ozanne M, Toepp AJ, et al. COVID-19 and bone loss: a review of risk factors, mechanisms, and future directions. Current Osteoporosis Reports. 2024;22(1):122-34.
13. Yu Z, Zhang J, Zhang Y, Cong X, Li X, Mostafa AM. Mathematical modeling and simulation for COVID-19 with mutant and quarantined strategy. Chaos ,Solitons & Fractals. 2024;181:114656.
14. Sarkar M, Madabhavi I. COVID-19 mutations: An overview. World Journal of Methodology. 2024;14(3):89761
15. Vieira DFB, Bandeira DM, Silva MANd, Almeida ALTd, Araújo M, Machado AB, et al. Comparative analysis of SARS-CoV-2 variants Alpha (B. 1.1. 7), Gamma (P. 1), Zeta (P. 2) and Delta (B. 1.617. 2) in Vero-E6 cells: ultrastructural characterization of cytopathology and replication kinetics. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2024;28(1):103706.
16. Alam MM, Hannan SB, Saikat TA, Limon MBH, Topu MR, Rana MJ, et al. Beta, delta, and omicron, deadliest among SARS-CoV-2 variants: a computational repurposing approach. Evolutionary Bioinformatics. 2023;19:11769343231182258.
17. Salah KT, Fadhil HY. Clinical Characteristics of the SARS-CoV-2 Alpha, Delta, Delta plus and Omicron Variants versus the Wild Type in Iraqi Patients. Iraqi Journal of Science. 2023:4329-39.
18. Magazine N, Zhang T, Wu Y, McGee MC, Veggiani G, Huang W. Mutations and evolution of the SARS-CoV-2 spike protein. Viruses. 2022;14(3):640.
19. Lee J, Kenward C, Worrall LJ, Vuckovic M, Gentile F, Ton A-T, et al. X-ray crystallographic characterization of the SARS-CoV-2 main protease polyprotein cleavage sites essential for viral processing and maturation . Nature Communications. 2022;13(1):5196.
20. Chu W-T, Zheng Q-C. Conformational changes of enzymes and DNA in molecular dynamics: Influenced by pH, temperature, and ligand. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. 2013;92:179-217.
21. Park T ,Hwang H, Moon S, Kang SG, Song S, Kim YH, et al. Vaccines against SARS-

in Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 8 (2023), 361-369.

CoV-2 variants and future pandemics. Expert review of vaccines. 2022;21(10):1363-76.

ntibiotic resistance profile of bacteria isolated from the most popular street food (Phuchka)

Mutation investigation frequency in SARS-CoV-2 positive patients

Mojdeh Lashkari[1], Ashraf Kariminik[1,2]* Mohammad Javad Soltani-Banavandi[1]

[1]Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

[2]Food and Agricultural Safety Research Center, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

*Corresponding author: a.kariminik@iauk.ac.ir

Abstract

The outbreak of the coronavirus disease 2019, caused by the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2), has evolved into a global health crisis. The spike gene (S) is responsible for producing the spike protein, which helps the virus attach to and enter human cells. Mutations in this gene can have significant effects on the virus's transmissibility, disease severity, and the effectiveness of vaccines. The aim of the present study was to investigate the frequency of mutations in hospitalized patients infected with SARS-CoV-2. This study is descriptive cross-sectional research conducted on 70 COVID-19 patients admitted to Afzalipour Hospital in Kerman city. RNA was extracted from the respiratory samples of the subjects, and then cDNA was synthesized using a kit. The identification of the virus was performed using Cyber Green real-time PCR. Additionally, positive COVID samples were sequenced using the Sanger method, and the frequency of mutations in them was examined. All positive samples analyzed for SARS-CoV-2 included a substitution at position 24525 of the S gene, where nucleotide C was replaced by T, resulting in the substitution of the amino acid histidine with tyrosine. Protein sequence analysis using online software showed that these mutations caused changes in the amino acid level but were unable to alter the three-dimensional structure of the spike protein in SARS-CoV-2. Although mutations that do not affect the three-dimensional structure of proteins do not elicit a response from immune system-related receptors, examining these mutations could aid in the development of new drugs to inhibit the virus and reduce the complications of COVID-19.

Keywords: COVID-19, spike gene, mutation.