

بررسی جهش‌های پروتئین نوکلئوکپسید (N) ویروس کرونا در دامنه موثر در قدرت ایمنی زایی و تأثیر آن بر تست‌های تشخیصی سرولوژیک در نمونه‌های جدا شده از

بیماران مبتلا در استان زنجان

سمانه کریم خانی لویی^۱، سعید قربیان^۲، ساناز مهمازی^۳، چنگیزاحمدی زاده^۴، کیوان ندائی^۵

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

۲- دانشیار گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران. نویسنده مسئول: ghorbian20@yahoo.com

۳- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.

۴- استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

۵- استادیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: کووید-۱۹ یک بیماری ویروسی با شیوع جهانی است که به دلیل جهش‌های مختلفی که در ژنوم ویروس رخ می‌دهد، دارای واریانت‌های متعددی بوده و شدت و تظاهرات بالینی متنوعی دارد. یکی از پروتئین‌های مهم در پاتوژنز و ایمنی زایی ویروس، پروتئین نوکلئوکپسید یا پروتئین N است که دومین‌های مختلفی دارد و ایمونوژن‌ترین دومین آن جهت ارزیابی جهش‌های موجود در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه در مجموع از ۸۵ بیمار مبتلا به کرونا در استان زنجان نمونه برداری صورت گرفت، و سپس از این نمونه‌ها RNA ویروسی استخراج شده و cDNA ساخته شد. سپس با انجام PCR برای نقاط Hot Spot پروتئین N محصول PCR توالی‌یابی گردید. توالی‌ها از نظر وجود جهش مورد غربالگری قرار گرفته و فاکتورهای سرمی IgM و IgG مربوط به پروتئین N به روش الیزا مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: جهش‌های $28881-2-3GGG>AAC$ ، $C28977T$ ، $C28932T$ ، $C28854T$ ، $G28975T$ ، $G28881T$ ، $C28830T$ ، $C28905T$ و $C28977T$ در پروتئین N مشاهده شدند، که این جهش‌ها در تشخیص ویروس با روش‌های مولکولی تداخل ایجاد می‌کنند. میزان آنتی‌بادی‌های سرمی IgG و IgM با تست الایزا در بیماران بررسی شد. بیشترین میزان جهش در نوکلئوتید $C28854T$ بود که منجر به تبدیل $S194L$ می‌شد. همچنین این موارد جهش یافته تیتراژ IgG بالاتری داشتند. یک مورد جهش $C28830T$ مشاهده شده در نمونه‌ها از جهش‌های شناسایی شده در نمونه‌های ایران بوده است، که منجر به تغییر $S186F$ شده است.

نتیجه‌گیری: منطقه مورد بررسی شامل بخشی از ژنوم ویروس بود که دامنه اتصال به RNA ویروسی پروتئین N را شامل می‌شد. این دومین قدرت ایمنی زایی بالایی داشته و می‌تواند در طراحی کیت‌های تشخیصی ایمونولوژیک سریع، همچنین در پروب کیت‌های تشخیصی مولکولی مورد استفاده قرار گیرد. این پروتئین که توالی آن نسبتاً حفاظت شده است، در واریته‌های مختلف ویروس به علت اهمیت عملکردی و با توجه به جهش‌های اختصاصی می‌تواند در طراحی واکسن‌ها با در نظر گرفتن انواع ساب‌تایپ‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: کووید-۱۹، جهش، نوکلئوکپسید، IgG، IgM، پروتئین N

مقدمه

در اواخر سال ۲۰۱۹ در ووهان چین موارد مشکوکی از ابتلا به یک پنمونی ناشناخته مشاهده شد که بعدها مقامات چینی عامل این بیماری را یک ویروس از خانواده کرونا ویروس تحت عنوان ویروس کرونای سندروم تنفسی حاد ۲ (SARS-CoV-2) اعلام نمودند. با همه گیری جهانی این بیماری، سازمان بهداشت جهانی (WHO) کووید-۱۹ را بعنوان مخفف این بیماری مطرح نمود (۱). این ویروس تنفسی در یک دوره کوتاه در مناطق جغرافیایی گسترده ای پخش و سطوح بالایی از شیوع و مرگ و میر را به دنبال داشت به طوری که تا ۲۸ ژانویه ۲۰۲۲، در مجموع ۳۶۴,۱۹۱,۴۹۴ مورد ابتلا به کووید-۱۹ تایید شده است که شامل ۵,۶۳۱,۴۵۷ مورد مرگ می شود. در مجموع، صدها نوع ویروس کرونا وجود دارد که بیشتر آن ها در میان حیواناتی مانند خوک ها، شترها، خفاش ها، مارها، و گربه ها شیوع دارند. اکثر کرونا ویروس های انسانی چیزی جز سرماخوردگی معمولی ایجاد نمی کنند. قبل از همه گیری SARS-CoV-2، گزارشاتی از شیوع دو ویروس دیگر مشترک بین انسان و حیوان، تحت عنوان SARS-CoV (در پایان سال ۲۰۰۲ در چین و هنگ کنگ شناسایی شد) و سندرم تنفسی خاورمیانه (MERS-CoV) (در سال ۲۰۱۲ در شبه جزیره عربستان شناسایی شد) وجود داشت. با این حال شیوع کووید-۱۹ به یک پاندمی تبدیل شد (۲). کووید-۱۹ یک بیماری ایمنی التهابی است که دستگاه تنفسی و دستگاه گوارش را درگیر کرده و باعث ایجاد طوفان سایتوکاینی، التهاب تهاجمی، آسیب بافتی و نارسایی سیستمیک در افراد مبتلا می شود (۳). کرونا ویروس SARS-CoV-2 متعلق به خانواده بزرگی از RNA ویروس های تک رشته ای است که می تواند بسیاری از گونه ها از جمله پرندگان، پستانداران و خصوصا انسان را آلوده کند (۴). این ویروس کروی شکل و دارای پوشش بوده و اسید

ریبونوکلئیک آن در جهت ۳'-۵' است که آن را به یک ویروس دارای رشته مثبت که بطور مستقیم بعنوان یک RNA پیام رسان عمل می کند، تبدیل می نماید. SARS-CoV-2 دارای چهار پروتئین ساختاری و ۱۶ پروتئین غیر ساختاری است. پروتئین های ساختاری شامل پروتئین نوکلئوکپسید (N)، غشاء (M)، پروتئین S و پروتئین پوششی (E) می باشند (۵، ۶) که در میان آن ها، پروتئین N هدف مناسبی به منظور کشف دارو و ارتقاء درمان محسوب می شود. این پروتئین در تشکیل نوکلئوکپسید و مونتاژ ذرات ویروس نقش داشته و از طرفی یک آنتی ژن با ایمنی زایی بالا است. علاوه بر این، تعیین کننده حدت و بیماری زایی ویروس نیز می باشد (۷، ۸) چرا که با فعال کردن سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2) و مهار اینترفرون نوع I به ترتیب بروز التهاب در ریه و محدود کردن پاسخ های ایمنی ایجاد شده توسط بدن میزبان را در پی دارد. این پروتئین همچنین در روند چرخه سلولی و تخریب وابسته به پروتئازوم پروتئین های ویروسی تداخل ایجاد می کند. از طرفی هنگامی که پروتئین N با ریبونوکلئوپروتئین هسته ای ناهمگن (hnRNPA1) برهمکنش می کند، سنتز RNA ویروسی افزایش می یابد (۹). پروتئین های غیرساختاری SARS-CoV-2 نیز در تکثیر ویروس، تنظیم سیستم ایمنی میزبان و تنظیم چرخه حیات ویروسی نقش دارند که از آن جمله می توان به پروتئاز شبه پاپائین (nsp3)، پروتئاز اصلی شبیه کیموتریپسین (CL³ پروتئاز، nsp5)، RdRp (nsp12)، هلیکاز (nsp13) و اگزوریبونوکلئاز (nsp14) اشاره کرد. جهش در ویروس ها شایع بوده و آن ها به طور مداوم به دو روش رانش آنتی ژنی و شیفت آنتی ژنی در توالی ژنتیکی خود تغییر ایجاد می کنند. ژنوم SARS-CoV-2 نیز مستعد جهش های مختلفی است که منجر به رانش آنتی ژنی و در نتیجه فرار از تشخیص ایمنی می شود. البته پروتئین غیر ساختاری ۱۴ (nsp14) در این ویروس

بیمارستان‌های استان زنجان و در بازه زمانی مهر ماه سال ۱۳۹۹ تا فروردین سال ۱۴۰۱ انجام گردید، و سپس به آزمایشگاه جامع ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی زنجان و با رعایت اصول ایمنی زیستی ارجاع داده شده. مولکول RNA از نمونه بیماران مشکوک استخراج شده و با استفاده از تست Real Time PCR، بیماران مبتلا به COVID-19 شناسایی شدند. تعداد ۸۵ نمونه RNA بیماران مبتلا به COVID-19 به صورت تصادفی ساده از میان نمونه های مثبت به عنوان جامعه آماری مطالعه انتخاب شدند. نمونه RNA و همچنین نمونه مخاطی نگهداری شده در VTm این بیماران، در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد و در مرحله بعدی با توجه به جهش‌های مشاهده شده در افراد از نمونه سرمی آنها جهت تست سرولوژیک استفاده شد.

استخراج RNA ویروسی:

استخراج RNA ویروسی بوسیله کیت ویراژن (ساخت ایران) صورت گرفت. به طور خلاصه با توجه به پروتکل مربوط به کیت ابتدا مقدار $200 \mu l$ از محلول Lysis حاوی RNA Carrier و $20 \mu l$ Proteinase K به میکروتیوب‌های حاوی $200 \mu l$ نمونه اضافه شد و به مدت ۵ ثانیه ورتکس صورت گرفت. نمونه‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه روی دستگاه هیتر بلات انکوبه شدند. پس از آن دوباره $100 \mu l$ محلول Lysis به میکروتیوب‌ها افزوده و پیتاژ صورت گرفت. سوسپانسیون حاصله به ستون استخراج انتقال داده شده و به مدت ۳۰ ثانیه با دور 12000 rpm سانتریفیوژ شدند. در مراحل بعدی محلول‌های شست و شو (Wash Solution) به ستون‌ها اضافه و سانتریفیوژ به مدت ۳۰ ثانیه با دور 12000 rpm انجام شد. ستون‌ها به داخل میکروتیوب‌های $1/5$ سی سی انتقال یافته و مقدار ۴۰ الی ۵۰ میکرولیتر Elution Buffer به آنها اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه با دور rpm

دارای فعالیت تصحیح‌کنندگی است که مانع افزایش میزان جهش‌ها می‌شود (۱۰). ژنوم‌هایی که از نظر توالی ژنتیکی با یکدیگر متفاوت هستند واریانت نامیده می‌شوند. واریانت‌ها در نتیجه بروز جهش ایجاد می‌شوند و در یک یا چند جهش با یکدیگر تفاوت دارند (۱۱). برای SARS-CoV-2 نیز واریانت‌های متعددی گزارش شده است (۱۲، ۱۳). انواع نوظهور نه تنها می‌توانند باعث افزایش شیوع و مرگ و میر ناشی از بیماری شوند، بلکه در روند تشخیص و درمان بیماری نیز اختلال ایجاد می‌کنند. از این رو پایش ژنومی ویروس و شناسایی واریانت‌ها و بررسی عوارض ناشی از آنها اهمیت ویژه‌ای در انتخاب رویکردهای درمانی ایفا می‌کند (۱۰). از این رو در این مطالعه پروتئین N، که آنتی ژنی است که ایمنی‌زایی بالایی دارد، و به موجب آن هدف تولید واکسن و دارو و نیز کیت‌های تشخیصی قرار گرفته، از لحاظ جهش‌های شایع در نمونه‌های جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به کووید ۱۹ در زنجان بررسی گردید. با بررسی ارتباط این جهش‌ها با عوارض مشاهده شده در بیماران در سایر نقاط جهان عوارض احتمالی ناشی از این جهش‌ها در این مقاله ارائه می‌شود. همچنین جهش‌ها از نظر تداخل در تست‌های تشخیصی مولکولی و تست سرولوژیک بررسی آنتی‌بادی‌های سرمی بعنوان تست تشخیصی مکمل در این مطالعه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

اخذ کد اخلاق:

اخذ کد اخلاق جهت محرمانه بودن هویت اشخاص مورد مطالعه، پس از بررسی موضوع پروژه و هدف‌های آن به شناسه IR.IAU.TABRIZ.REC.1400.180 انجام شد.

نمونه برداری:

نمونه‌گیری از انتهای گلو یا مخاط بینی از افراد مشکوک دارای علائم در مراکز بهداشت و افراد بستری در

آن جهت ساخت cDNA از نمونه RNA استخراج شده از کیت پارس طوس ساخت ایران استفاده شد. نمونه های RNA با مقادیر مشخصی از اجزای کیت شامل-Buffer mix (2x) و Enzyme mix طبق دستورالعمل کیت ترکیب شدند. مواد فوق با دور کم و زمان کوتاه با استفاده از دستگاه اسپین کاملاً مخلوط شدند. سپس نمونه ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفته و طبق پروتکل کیت زمان و دما در دستگاه تنظیم شد. بعد انجام واکنش سنتز، نمونه ها تا استفاده بعدی به فریزر ۷۰- منتقل شدند.

واکنش زنجیره ای پلیمرز:

به منظور بررسی ژن N از مستر میکس Ampliqon RED استفاده شد. در یک میکروتیوب ۱/۵ سی سی Taq 2x با cDNA RNase, DNase Free Master mix، پرایمرهای مربوطه و نیز آب دیونیزه با توجه به پروتکل مربوطه روی یخ ترکیب شدند و سپس به میکروتیوب ۰/۲ سی سی RNase, DNase Free انتقال یافته و در دستگاه ترموسایکلر (ABI) قرار گرفت. در این پژوهش با کمک نرم افزار GENERUNNER پرایمرهای Forward و Reverse با توجه به نقاط Hot Spot ژن نوکلئوکپسید طراحی شد (جدول ۱).

۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. در مرحله آخر نمونه ها جهت نگهداری به فریزر ۷۰- انتقال داده شدند.

بررسی بیان ژن:

این مرحله با استفاده از دستگاه REAL-TIME PCR (Rotor Gene Qiagene) و کیت ADD BIO (ساخت کره) انجام شد. طبق دستورالعمل کیت مقادیر مشخصی از پرایمرها، آنزیم، 2X qRT-PCR Buffer و آب دیونیزه به ۴ μl از نمونه ها افزوده شد. در نهایت میکروتیوب ها به داخل دستگاه Real-Time منتقل شدند. سپس بعد از انجام PCR، CT های نمونه ها و Melt carve آن ها مورد بررسی قرار گرفته، و نمونه بیمارانی که در تست Real time PCR، به طور همزمان سیگنال های مربوط به تکثیر قطعه ویروسی و ژن کنترل داخلی را داشتند شناسایی شده، و نمونه VTM و RNA استخراج شده آن ها از بقیه نمونه ها جدا شده و در رک های جداگانه در طبقه ای مخصوص در یخچال ۷۰- نگه داری شدند.

ساخت cDNA از نمونه RNA استخراج شده:

ابتدا به منظور حذف آلودگی DNA ژنومی از نمونه RNA استخراج شده، DNase Treatment با کیت Thermo Scientific (ساخت آمریکا) انجام شد. پس از

جدول ۱: توالی مربوط به پرایمرهای Forward و Revers ژن N

Gene	Forward	Revers	Size (bp)	TM
N	AGATCACATTGGCACCCGCA	TGGCAGTACGTTTTTGCCGAG	365	59°C

Scholar استخراج شده و با جهش های یافت شده در این مقاله مقایسه گردید. سپس از بین مقالات عوارض گزارش شده ناشی از این جهش ها و نیز تأثیر آن ها بر تشخیص ویروس مورد بررسی قرار گرفته و لیست شدند.

انجام بررسی سرولوژیک روی نمونه بیماران دارای

جهش:

انجام توالی یابی سنگر برای محصولات PCR:

پس از تایید صحت اندازه باندهای نمونه ها (شکل ۱)، مقدار ۲۰ λ از محصولات حاصل از PCR به همراه ۸۵ λ از پرایمر Forward برای انجام توالی یابی سنگر به شرکت توپاز ژن ارسال شدند. مقالات مرتبط با جهش های یافت شده در ژن N از پایگاه های داده Pubmed و Google

گرفت. سپس با توجه به جهش‌های مشاهده شده، همه جهش‌ها با نمونه وحشی مقایسه شده و P value، تعیین و گزارش گردید. نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزارهای SPSS در سطح معنی داری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

بررسی نتیجه‌ی PCR ژن N توسط ژل الکتروفورز

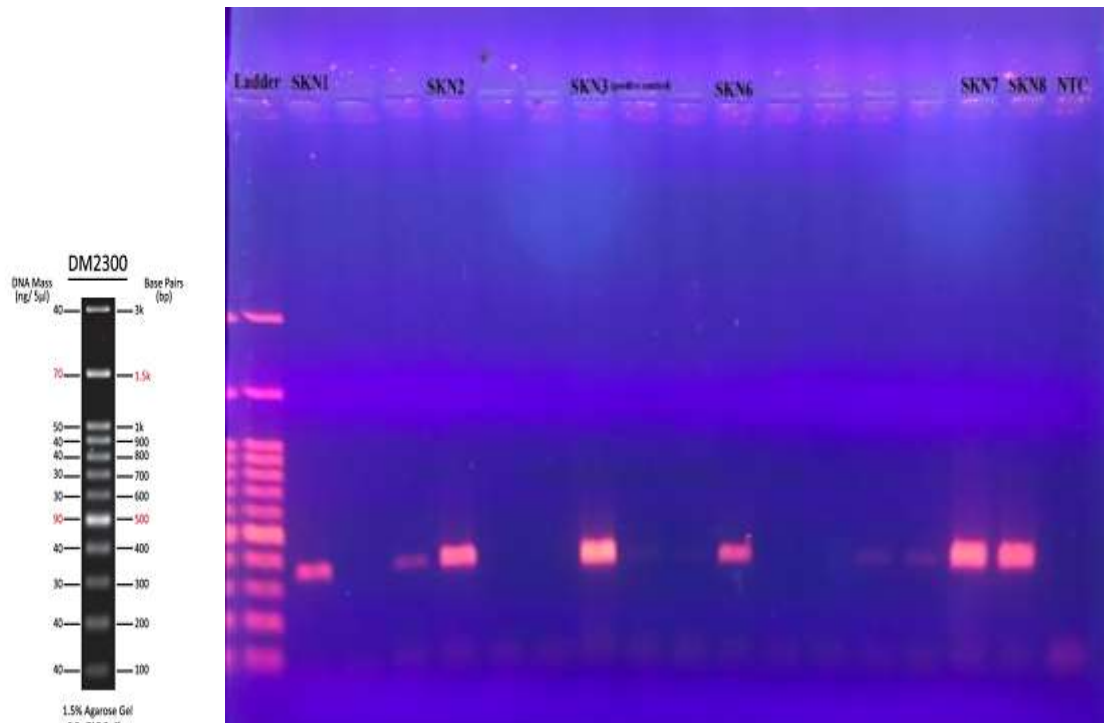
با توجه به شکل - ۱، طی واکنش PCR محصول PCR در دمای °C ۵۷ برای ژن N حاصل گردید. سپس محصولات PCR بر روی ژل الکتروفورز ۱٪ لود شدند. لازم به ذکر است که نمونه‌های دارای باند شارپ در مراحل بعدی مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه‌های با باندهای ضعیف از مطالعه خارج شدند. قطعه حاصل ۳۶۵ باز بود که برای تعیین توالی ارسال گردید.

از تست الایزا (کیت SARS-COV-2 NCP IGG

,Germany ELISA KIT) به منظور بررسی آنتی‌بادی‌های سرمی IgM و IgG استفاده شد. بدین منظور ابتدا پلیت الایزا با آنتی ژن‌های ویروسی در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک شب کوت شد. پس از شستشو، پلیت‌ها بلاک، شسته و با نمونه‌های سرم ۱:۱۰۰ رقیق شده انکوبه شدند. پس از آن، پلیت‌ها شسته و با آنتی IgG / آنتی IgM انسانی کونژوگه به HRP انکوبه شدند. سپس پلیت‌ها شسته شده و با سوبسترای ۳، ۳، ۵، ۵-تترا متیل بنزیدین (TMB) انکوبه شدند. در انتها واکنش با اسید سولفوریک ۰.۱۶ مولار متوقف شد و برای اندازه‌گیری جذب در ۴۵۰ نانومتر از دستگاه میکروپلیت ریدر استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری و بیوانفورماتیکی:

برای تعیین SNP ها در ژن N پس از انجام سکانس با نرم‌افزارهای MEGA و Chromas pro همترازی صورت



شکل ۱- نتایج انجام PCR بر RNA استخراج شده ی COV-SARS 2 با پرایمر های اختصاصی ژن N و مشاهده باند شارپ ۳۶۵ bp

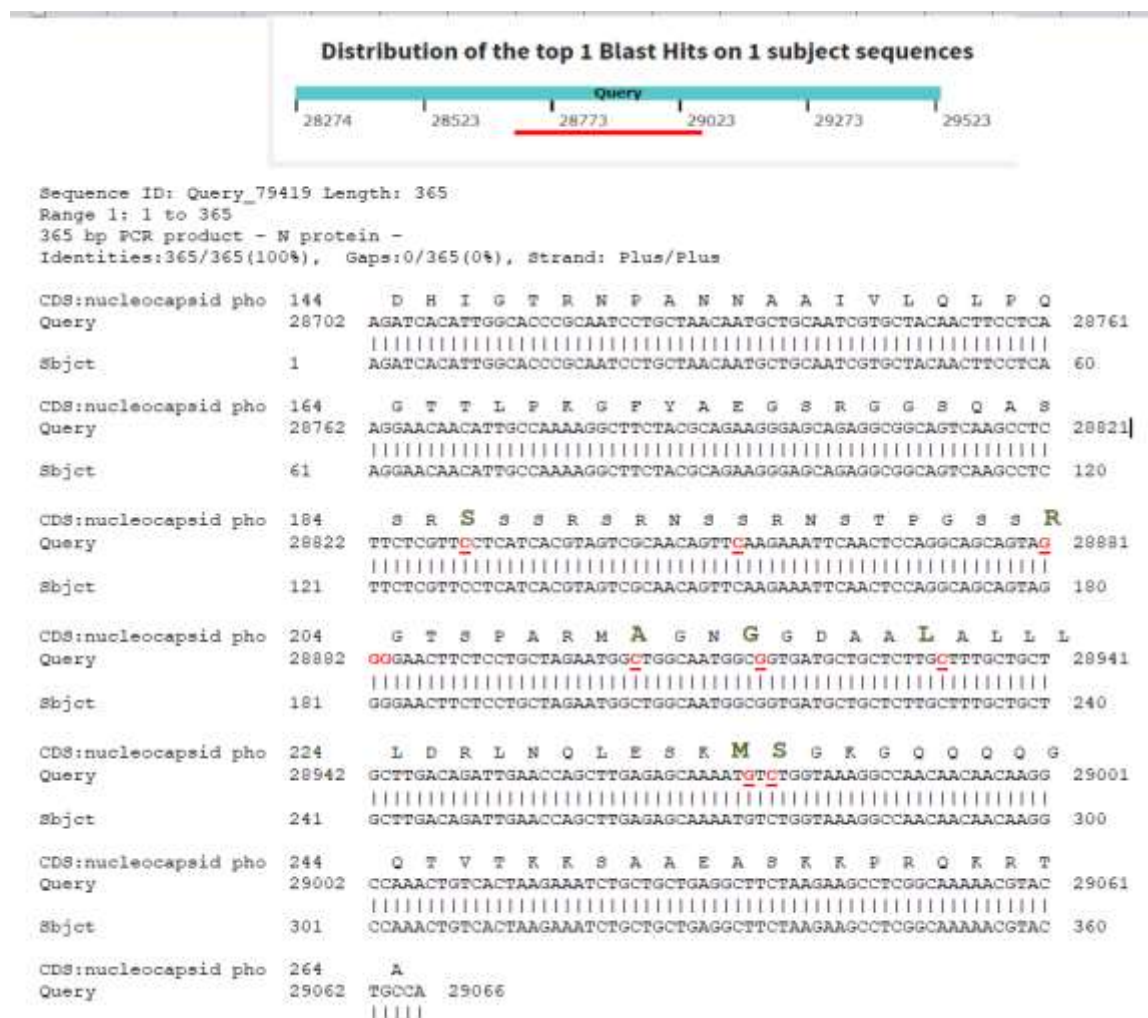
(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_Query_79419)

مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۲-). پس از انجام همترازی برای تایید جهش‌ها گراف‌های مربوط به نمونه‌ها از لحاظ صحیح بودن و نداشتن نویز در نرم افزار Chromaspro نیز مورد بررسی قرار گرفته و تایید شدند. سپس نمونه‌هایی که دارای جهش‌های یکسان در همترازی با ژنوم رفرنس Sars COV 2- Wuhan بودند مشخص شدند (نمودار ۱).

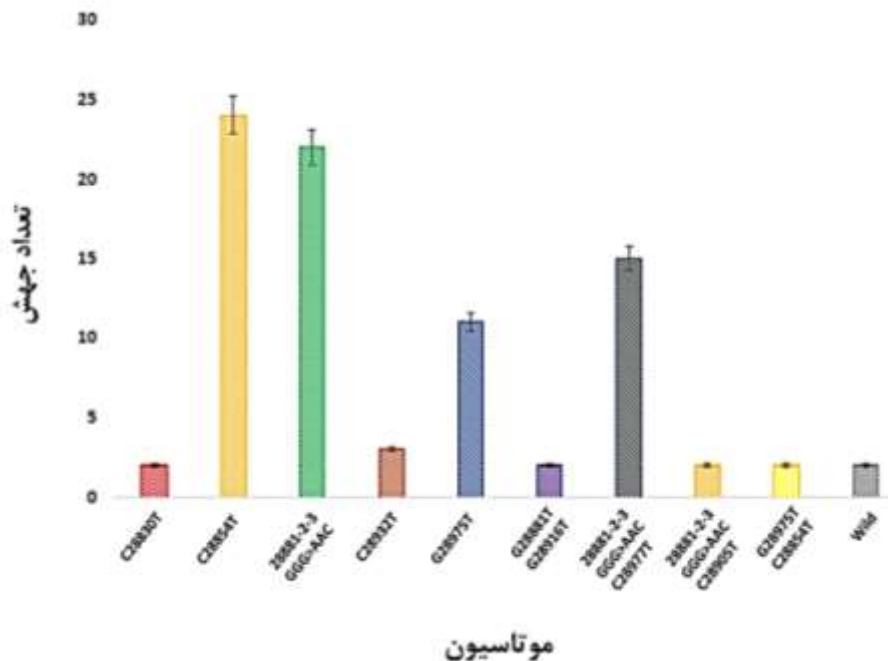
تعیین جهش‌ها بر اساس نتایج توالی‌یابی سنگر

محصولات PCR برای ژن N

بعد از تایید نمونه‌های محصولات PCR بر روی ژل الکتروفورز و مشاهده باندهای مورد نظر (شکل ۱-)، نمونه‌ها برای توالی‌یابی ارسال شدند. طول ژن پروتئین نوکلئوکپسید ۱۲۶۰ باز است که پروتئینی با ۴۱۹ اسید آمینه کد می‌کند. از این ژن ۳۶۵ باز، از باز ۲۸۲۷۴ تا باز ۲۹۵۳۳ با متد PCR تکثیر شد و در بخش BLAST



شکل ۲- توالی ۳۶۵ بازی محصول PCR از ۱۲۶۰ باز. مناطق جهش یافته در تصویر به رنگ قرمز و آمینواسید متاثر از جهش به رنگ سبز مشخص شده است. ۹ جهش در ژن از اسید آمینه ۱۸۶ تا ۲۳۵ مورد بررسی قرار گرفت.



نمودار ۱- جهش های شناسایی شده در ۸۵ نمونه مورد بررسی. از ۹ جهش مورد مطالعه سه جهش به تنهایی رخ نداده و مشترک با جهش های دیگر مشاهده اند و ۲ مورد فرم بدون جهش مطابق الگوی ثبت شده در NCBI است.

خصوصاً تست Real Time PCR تأثیر گذاشته و باعث ایجاد جواب های منفی کاذب در این تست شود. از این رو در این مطالعه جهش های یافت شده در پروتئین N از نظر تداخل در تشخیص ویروس نیز با مطالعات دیگر مورد بررسی قرار گرفتند. لیستی مربوط به جهش های مداخله کننده در تشخیص ویروس در جدول شماره ۳ گردآوری شده است.

بررسی تیتر آنتی بادی های خنثی کننده سرمی در واریانت های دارای جهش در پروتئین N:

تست سرولوژیک بررسی تیتر آنتی بادی های سرمی IgG و IgM امکان مطالعه میزان مواجهه و ابتلای افراد قبل و بعد از بروز اپیدمی در یک منطقه را با بررسی تیتر و مدت زمان تولید آنتی بادی های خنثی کننده در افرادی که در معرض ویروس قرار گرفته اند، فراهم می سازد. مطالعات مختلفی روی بررسی تیتر آنتی بادی های خنثی کننده سرمی

بررسی میزان شیوع جهش های یافت شده با داده های جهانی و بررسی اثرات ناشی از جهش ها در روند بیماری:

بررسی مقالات مربوط به مطالعه جهش های پروتئین N نشان داد که جهش های یافت شده در نمونه های بیماران استان زنجان با جهش های یافت شده در نقاط مختلف جهان مطابقت دارد. این جهش های نقطه ای گاه با تعویض اسید آمینه، بر روی ساختار و عملکرد پروتئین تأثیر می گذارند. لیستی مربوط به جهش های مطابق با جهش های یافت شده در این مطالعه با مطالعات دیگر و اثرات جهش در جدول شماره ۲ گردآوری شده است.

بررسی جهش های موثر بر کاهش کارایی تست های تشخیصی مولکولی در شناسایی ویروس
بروز جهش های ژنومی در پروتئین های ویروالانس COVID-19 می تواند بر کارایی تست های تشخیصی

IgM و IgG با تست الیزا در سرم افراد مبتلا به کووید ۱۹ که به علت جهش در پروتئین N، تست‌های مولکولی قادر به تشخیص آن‌ها نیستند، صورت گرفته است که لیستی از این مطالعات در جدول شماره ۴ گردآوری شده است.

جدول ۲- لیست جهش‌های مشاهده شده در پروتئین N مطابق مطالعات انجام شده

ژن	منطقه جغرافیایی مطالعه	جهش (اسید آمینه / نوکلئوتید)	اثر عملکردی جهش	رفرنس
N	ایران	S186F 28830 C>T	افزایش تعداد جهش‌های نقطه‌ای در ژنوم ویروس	(۱۴)
N	انگلستان، ایالت متحده آمریکا، آسیا	S235F 28977 C>T	مشاهده شده در واریانت B.1.1.7، افزایش نرخ انتقال بیماری	(۲۰-۱۵)
N	هند و ایران	S194L 28854 C>T	همراه با جهش C>T22444 (D294D) در پروتئین S مشاهده می‌شود	(۲۲، ۲۱، ۱۷)
N	چین	R203M 28881 G>T	مشاهده شده در واریانت‌های B.1.351 و دلتا، افزایش نرخ انتقال بیماری	(۲۳، ۲۰)
N	اروپا و آمریکا	G>T 28975 M234I	مشاهده شده در واریانت‌های B.1.160، B.1.1.397 و B.1.526	(۲۶-۲۴)
N	مشاهده شده در ۱۱۳ کشور شامل مراکش و اسپانیا	A220V 28932 C>T	افزایش شدت بیماری و نیز بروز تظاهرات بالینی نورولوژیک	(۲۷، ۱۵)
N	هند، مکزیک، آمریکای جنوبی، آسیا و استرالیا، اروپا	28881-2-3 GGG>AAC 203-204: RG (arginine-) (glycine)>KR (lysine-arginine)	بر موتیف غنی از پروتئین (سرین-آرژنین)، منطقه‌ای حیاتی برای رونویسی RNA ویروسی و تکثیر ویروس تأثیر می‌گذارد. بنابراین انتظار می‌رود باعث تعدیل بیماری‌زایی SARS-CoV-2 شود.	(۲۸، ۲۱، ۱۵) (۳۳)
N	گسترش جهانی	28916 G>T G215C	مشاهده شده در واریانت دلتا و تأثیر بر تشخیص بیماری	(۳۶-۳۴)
N	روسیه	28905 C>T A211V	مشاهده شده در واریانت‌های B.1.1.7 و B.1.1.317، افزایش نرخ انتقال بیماری و نیز فرار از سیستم ایمنی	(۳۸، ۳۷)

جدول ۳- لیست جهش‌های مداخله‌کننده در تشخیص، پروتئین N گزارش شده در سایر مطالعات

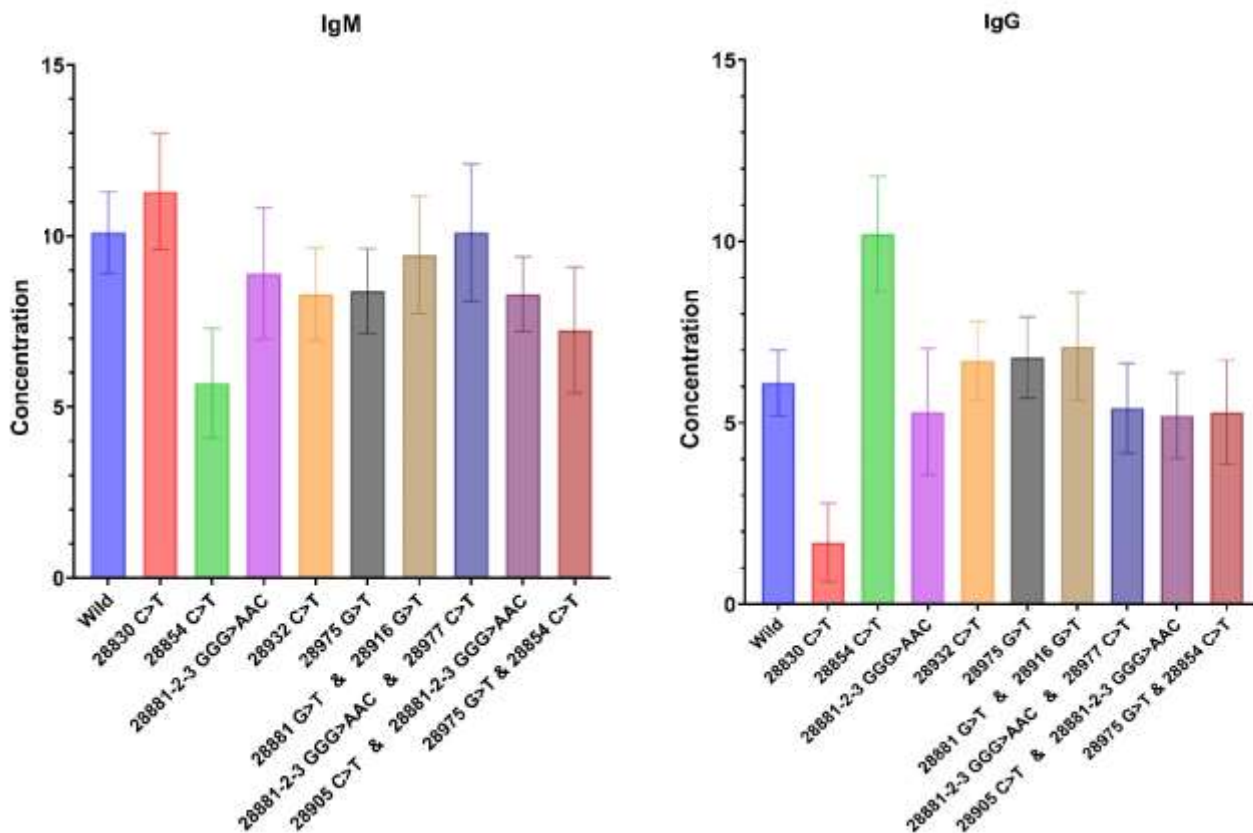
ژن	جهش	تأثیر	رفرنس
N	28881-2-3 GGG>AAC	تغییر در قسمت 5' ناحیه اتصال پروب در تست qRT-PCR	(۴۰، ۳۹)
N	28916 G>T G215C	تغییر در جایگاه شناسایی اپیتوپ B سل و کاهش حساسیت به سنجش‌های تشخیصی qRT-PCR	(۴۱، ۳۴)
N	S235F 28977 C>T	افزایش ریسک جواب منفی کاذب واریانت آلفا در تست‌های تشخیصی	(۲۲، ۲۰)
N	R203M 28881 G>T	افزایش ریسک جواب منفی کاذب واریانت دلتا در تست‌های تشخیصی	(۲۰)
N	A220V 28932 C>T	افزایش ریسک جواب منفی کاذب مربوط به واریانت اروپایی 20A.EU1 در تست‌های تشخیصی	(۲۰)
N	S194L 28854 C>T	افزایش ریسک جواب منفی کاذب در تست qRT-PCR	(۲۲)

جدول ۴- بررسی تیتراژ آنتی بادی IgM و IgG در افراد دارای جهش در پروتئین N

ژن/اوریانت دارای جهش	آنتی بادی خنثی کننده سرمی	رفرنس
N	IgM و IgG	(۴۲)
سویه‌های آلفا، بتا، گاما، دلتا، کاپا، امیکرون و R.1	IgG	(۴۳)
N	IgG and IgA	(۴۴)
N	IgG and IgA	(۴۵)
جهش پروتئین N 28881-2-3(GGG>AAC) RG203KR	IgM و IgG	(۴۶)

بررسی قرار گرفتند (نمودار ۲) (جدول ۵). در تمام نمونه‌ها سطح IgM بالا و IgG نیز به نسبت IgM بالا بود.

نمونه‌های مورد مطالعه از بابت تیتراژ آنتی بادی های IgM و IgG با کیت‌های بر پایه آنالیز ایمنی‌زایی پروتئین N مورد



نمودار ۲- تیتراژ آنتی بادی های IgM و IgG در نمونه‌های مورد مطالعه.

جدول ۵- نتایج آنالیز جهش و تیتراژ آنتی بادی ۸۵ نمونه مورد بررسی .

P value	نمونه های دارای جهش						نمونه Wild			آنتی بادی
	انحراف از معیار	میانگین	تعداد	جهش آمینواسید	جهش ژنی	عنوان جهش	انحراف از معیار	میانگین	تعداد	
۰/۵	۱/۷	۱۱/۳۰	۲	S186F	28830 C>T	S1	۱/۲۰	۱۰/۱۰	۲	IgM
۰/۰۰۰۹	۵/۷	۱/۶	۲۴	S194L	28854 C>T	S2				
۰/۴	۱/۹۲	۸/۹	۲۲	RG203-204KR	28881-2-3 GGG>AAC	S3				
۰/۲	۱/۸	۷/۲۵	۲	M234I S194L	28975 G>T & 28854 C>T	S4				
۰/۲۲	۱/۳۵	۸/۳	۳	A220V	28932 C>T	S5				
۰/۱	۱/۲۴	۸/۴	۱۱	M234I	28975 G>T	S6				
۰/۷	۱/۷۲	۹/۴۵	۲	R203M G215C	28881 G>T & 28916 G>T	S7				
۰/۹۹۹	۲/۰۱	۱۰/۱	۱۵	RG203-204KR S235F	28881-2-3 GGG>AAC & 28977 C>T	S8				
۰/۲۵	۱/۰۹	۸/۳	۲	A211V RG203-204KR	28905 C>T & 28881-2-3 GGG>AAC	S9				
۰/۰۴	۱/۰۸	۱/۷۰	۲	S186F	28830 C>T	S1	۰/۹	۶/۱	۲	IgG
۰/۰۰۱	۱/۶	۱۰/۲۰	۲۴	S194L	28854 C>T	S2				
۰/۵	۱/۷۵	۵/۳۰	۲۲	RG203-204KR	28881-2-3 GGG>AAC	S3				
۰/۵	۱/۴۳	۵/۲۹	۲	M234I S194L	28975 G>T & 28854 C>T	S4				
۰/۵	۱/۰۹	۶/۷	۳	A220V	28932 C>T	S5				
۰/۴۲	۱/۱۲	۶/۸	۱۱	M234I	28975 G>T	S6				
۰/۵	۱/۴۹	۷/۱۰	۲	R203M G215C	28881 G>T & 28916 G>T	S7				
۰/۴۵	۱/۲۴	۵/۴	۱۵	RG203-204KR S235F	28881-2-3 GGG>AAC & 28977 C>T	S8				
۰/۴۸	۱/۱۸	۵/۲۰	۲	A211V RG203-204KR	28905 C>T & 28881-2-3 GGG>AAC	S9				

بحث:

پروتئین N در ساختار ویروس کرونا نقش‌های اساسی متعددی در چرخه عفونت ویروس ایفا می‌کند. نقش اصلی پروتئین N، مونتاژ RNA ویروسی و بسته بندی در مجموعه ریبونوکلوکسپید است. با این وجود این پروتئین در قدرت آنتی ژنی ویروس در بدن میزبان و همچنین تسهیل تکثیر و ترجمه RNA ویروسی حائز اهمیت است (۴۷). پروتئین N یک پروتئین ایمنی زای قوی است که به RNA ویروس متصل شده و نقش مهمی در پاتوژنز ویروس دارد. به همین دلیل در بین کرونا ویروس‌ها پروتئین N بیشتر حفاظت شده است. این پروتئین می‌تواند کاندیدای مناسبی برای طراحی تست‌های تشخیصی و همچنین اهداف کمک درمانی باشد. آنتی‌بادی‌های ضد نوکلئوکسپید مانع ورود ویروس به سلول نمی‌شوند اما پروتئین N به دلیل قدرت ایمنی زایی بالا و تجمع داخل سلولی قبل از بسته بندی ویروس کاندیدای مناسبی برای تشخیص زود هنگام عفونت می‌تواند باشد و حساسیت تست‌های مبتنی بر پروتئین N می‌تواند از حساسیت بالایی برخوردار باشند و حتی برای تست‌های تشخیصی سریع نیز می‌تواند کاندیدای اول باشد (۴۸).

دو ناحیه ساختاری حفاظت شده پروتئین N یکی در انتهای آمینی است که حوزه اتصال RNA است که باقی مانده‌های آمینواسیدی ۴۴-۱۷۴ را شامل می‌شود. بخش دیگر انتهای کربوکسیل است که حوزه دیمیرزاسیون بوده و باقی مانده‌های آمینواسیدی ۲۵۵-۳۶۴ را شامل می‌شود. این دو حوزه توسط سه منطقه که می‌تواند متغیر باشند احاطه شده‌اند، که شامل بازوی N (باقی‌مانده‌های ۱-۴۳)، یک ناحیه پیوند دهنده مرکزی (باقی‌مانده‌های ۱۷۵-۲۵۴)، و دم C (باقی‌مانده‌های ۳۶۵-۴۱۹) است. ناحیه پیوند دهنده مرکزی حاوی یک موتیف غنی از SR است که با باقی مانده‌های سرین و آرژنین غنی شده است. این دامنه با

بازو N و دم C که در دو طرف دامنه N ترمینال و C ترمینال وجود دارد باعث اتصال N ترمینال (انتهای آمینی) و دامنه C ترمینال (انتهای کربوکسیل) به هم می‌شود (۴۹). با توجه به نقش مهم این مناطق در جمع آوری و سنتز RNA ویروسی، نظارت بر SARS-CoV-2 باید شامل ردیابی تکامل جهش‌ها در این مناطق و تأثیرات این جهش‌ها بر ویژگی‌های ویروس باشد. به همین دلیل یکی از دامنه‌های مهم و جهش‌های مطرح در منطقه اتصال به RNA ویروسی که قدرت ایمنی زایی بالایی دارد مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس بررسی‌های انجام شده مطابق جدول ۵ در بین جهش‌های مورد مطالعه بیشترین تعداد جهش در ۸۵ نمونه مورد بررسی مربوط به جهش S194L و پس از آن جهش RG203-204KR و جهش مشترک RG203-204KR همراه با S235F می‌باشد.

بررسی موتاسیون‌های بوجود آمده در ویروس SARS-CoV-2 از لحاظ تشخیص بیماری، شدت بیماری و نیز اتخاذ استراتژی درمانی حائز اهمیت است (۵۰). از این میان بسیاری از مطالعات جهش‌های مربوط به پروتئین N را به دلیل اهمیت ویژه این پروتئین در تکثیر و بیماری‌زایی ویروس مورد بررسی قرار داده‌اند (۳۰، ۵۱، ۵۲). در این مطالعه در پروتئین N ۹ جهش مشاهده شد که از این میان جهش‌های C28977T، C28905T و C28977T در واریانت B.1.1.7 (آلفا) رایج هستند (۱۵-۱۹، ۳۲، ۳۷، ۳۸). جهش C28905T در واریانت B.1.1.317 نیز گزارش شده است، که با ایجاد تغییر در ساختار پروتئین مانع شناسایی آن و در نتیجه فرار ویروس از سیستم ایمنی می‌شود (۵۳). علاوه بر این موتاسیون G28975T در واریانت‌های B.1.160 و B.1.526 (۲۵) و موتاسیون G28916T نیز در واریانت دلتا دیده شده است. این جهش حد تشخیصی ویروس را در تست‌های تشخیصی افزایش داده و تشخیص ویروس را چالش برانگیز می‌کند (۳۴-۳۶).

جهش B.1.1 GGG>AAC 28881-2-3 در کلاد بسیار شایع بوده و بر موتیف غنی از پروتئین (سرین-آرژنین) پروتئین N که منطقه ای حیاتی برای رونویسی RNA ویروسی و تکثیر ویروس است، تأثیر گذاشته و باعث تعدیل بیماری‌زایی SARS-CoV-2 می‌شود (۵۴). موتاسیون C28932T از نظر بالینی بسیار حائز اهمیت بوده چرا که با بروز مشکلات نورولوژیک حاد در بیماران در ارتباط است (۲۷). جهش دیگر یافت شده در بیماران C28854T است که گزارشات مربوط به این جهش از هند بوده و غالباً همراه با جهش C22444T در پروتئین S مشاهده می‌باشد (۱۷، ۲۱). با توجه به مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با سایر مطالعات می‌توان گفت که جهش‌های یافت شده در این مطالعه در سایر نقاط جهان نیز شیوع داشته و فقط جهش C28830T تنها در بیماران مربوط به ایران مشاهده شده است که با افزایش نرخ وقوع جهش در ویروس همراه است (۱۴). تشخیص آزمایشگاهی SARS-CoV-2 با شناسایی و جداسازی افراد آلوده مبنای کلیدی در کاهش شیوع بیماری است. از آنجایی که الیگونوکلئوتیدها، پرایمرها و پروب‌های RT-qPCR به یک ناحیه کوچک ۲۰ تا ۲۵ جفت باز متصل می‌شوند، جهش‌ها در این ناحیه می‌توانند اتصال پرایمر و یا پروب را مختل کرده و باعث ایجاد جواب‌های منفی کاذب شود. با توجه به قابلیت انتقال بالای SARS-CoV-2، این نتایج منفی کاذب می‌توانند تأثیر مهمی بر مهار شیوع COVID-19 داشته باشد (۳۹). طبق جدول شماره ۵، اکثر جهش‌های یافت شده در این مطالعه تأثیر بالقوه در ریسک عدم تشخیص ویروس با تست‌های تشخیصی مولکولی موجود دارند. بیماران آلوده به COVID-19 آنتی‌بادی‌های مختلفی از جمله ایمونوگلوبولین M (IgM)، ایمونوگلوبولین G (IgG) و ایمونوگلوبولین A (IgA) تولید می‌کنند، به ویژه، آنتی‌بادی‌های IgG علیه پروتئین

نوکلئوکپسید (N) که از ابتدا به عفونت ویروسی جلوگیری می‌کند. تیتراژ آنتی‌بادی anti-N-IgG تولید شده پس از عفونت طبیعی SARS-CoV-2 در افراد واکنش‌ناهن شده بیش از ۱۰ برابر در زمان نقاهت است (۴۳). بنابراین روش‌های دیگر شناسایی مانند الایزا برای تشخیص IgG یا IgM پس از عفونت کاربردهای گسترده‌ای در ردیابی افراد آلوده در یک جمعیت بزرگ دارند. علاوه بر این، این متد برای انتخاب افراد با تیتراژ بالایی از آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده برای درمان یا پیشگیری به عنوان یک رویکرد ایمنی غیرفعال مفید است. این متد می‌تواند بعنوان یک متد مکمل برای غربالگری نمونه‌های منفی کاذب استفاده شود. در واقع در این روش با بررسی تیتراژ IgG و IgM در سرم افراد می‌توان افراد مبتلا به کووید ۱۹ که به علت وجود جهش در پروتئین N، تست RT-qPCR منفی دارند را از افراد غیر مبتلا افتراق داد (۴۲). در این پژوهش نیز تیتراژ آنتی‌بادی‌های سرمی IgG و IgM در افراد نمونه برداری شده بررسی شد و نتایج آن در راستای سایر پژوهش‌ها دلالت بر اهمیت گنجاندن آزمایش‌های سرولوژیکی به منظور کاهش خطا و ارائه نتایجی با دقت تشخیصی بالا برای جلوگیری از شیوع سریع ویروس در آینده و کمک به مهار شیوع ویروس دارد (۴۵).

نتیجه‌گیری:

با توجه به اهمیت پروتئین N در بیماری‌زایی و ایمنی‌زایی ویروس کرونا این پروتئین می‌تواند هدف طراحی کیت‌های تشخیصی و حتی اهداف درمانی برای ویروس کرونا در انواع واریته‌های آن باشد. این پروتئین به دلیل اهمیت بالای آن در فرآوری و بسته‌بندی ویروس در سلول‌های مورد تهاجم بسیار حفاظت شده است و هر گونه جهش در ساختار آن می‌تواند باعث تغییر در قدرت پاتوژنز و تهاجم و ایمنی‌زایی ویروس شود. بنابراین آنالیز جهش‌های

ژنوم صورت می‌گیرد مشخص شدن مناطق با قدرت تغییر پذیری بالا باعث طراحی پروب‌های تشخیصی با ضریب خطای منفی کاذب کمتر می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله تعارض در منافع ندارند.

موجود در مناطق جغرافیایی مختلف و در قومیت‌های گوناگون می‌تواند راهگشای طراحی واکسن‌های اختصاصی برای ایمنی‌زایی بالاتر و یا واکسن‌های با اپی‌توپ‌های ترکیبی جهت تاثیر وسیع‌تر بر سویه‌ها و واریته‌های گوناگون شود. با توجه به این که کیت‌های تشخیص مولکولی نیز با طراحی پروب برای قسمت‌های ساختاری و حفاظت شده

فهرست منابع

1. Hadj Hassine I. Covid-19 vaccines and variants of concern: a review. *Reviews in medical virology*. 2022;32(4):e2313.
2. Soraci L, Lattanzio F, Soraci G, Gambuzza ME, Pulvirenti C, Cozza A, et al. COVID-19 vaccines: current and future perspectives. *Vaccines*. 2022;10(4):608.
3. Trougakos IP, Stamatelopoulos K, Terpos E, Tsitsilonis OE, Aivalioti E, Paraskevis D, et al. Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. *Journal of Biomedical Science*. 2021;28:1-18.
4. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature reviews microbiology*. 2019;17(3):181-92.
5. Atri D, Siddiqi HK, Lang JP, Nauffal V, Morrow DA, Bohula EA. COVID-19 for the cardiologist: basic virology, epidemiology, cardiac manifestations, and potential therapeutic strategies. *Basic to Translational Science*. 2020;5(5):518-36.
6. Cascella M, Rajnik M, Cuomo A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19)[Updated 2020 Apr 6].

StatPearls [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2020.

7. Zinzula L, Basquin J, Bohn S, Beck F, Klumpe S, Pfeifer G, et al. High-resolution structure and biophysical characterization of the nucleocapsid phosphoprotein dimerization domain from the Covid-19 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Biochemical and biophysical research communications*. 2021;538:54-62.
8. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology journal*. 2016;11(1):22.
9. Satarker S, Nampoothiri M. Structural proteins in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2. *Archives of medical research*. 2020;51(6):482-91.
10. Vasireddy D, Vanaparthi R, Mohan G, Malayala SV, Atluri P. Review of COVID-19 variants and COVID-19 vaccine efficacy: what the clinician should know? *Journal of Clinical Medicine Research*. 2021;13(6):317.
11. Luring AS, Hodcroft EB. Genetic variants of SARS-CoV-2—what do they mean? *Jama*. 2021;325(6):529-31.
12. Chen J, Gao K, Wang R, Wei G-W. Prediction and mitigation of mutation threats to COVID-19 vaccines and antibody

therapies. *Chemical science*. 2021;12(20):6929-48.

13. Khan NA, Al-Thani H, El-Menyar A. The emergence of new SARS-CoV-2 variant (Omicron) and increasing calls for COVID ۱۹-vaccine boosters-The debate continues. *Travel medicine and infectious disease*. 2022;45:102246.

14. Karamipour S, Mojibafan M, Fard RMN. Comparative Analysis of 198 SARS-CoV-2 Genomes from Iran and West Asia, February 2020 to December 2021. *Iranian Journal of Pathology*. 2023;18(3):289.

15. Uğurel OM, Ata O, BALIK D. Genomic chronicle of SARS-CoV-2: a mutational analysis with over 1 million genome sequences. *Turkish Journal of Biology*. 2021;45(7):425-35.

16. Gómez CE, Perdiguero B, Esteban M. Emerging SARS-CoV-2 variants and impact in global vaccination programs against SARS-CoV-2/COVID-19. *Vaccines*. 2021;9(3):243.

17. Saha I, Ghosh N, Sharma N, Nandi S. Hotspot mutations in SARS-CoV-2. *Frontiers in Genetics*. 2021;12:753440.

18. Ahmad W, Ahmad S, Basha R . Analysis of the mutation dynamics of SARS-CoV-2 genome in the samples from Georgia State of the United States. *Gene*. 2022;841:146774.

19. Negara MRM, Krissanti I, Pradini GW. Analysis of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein sequence variations in ASEAN countries. *Medical Journal of Indonesia*. 2021;30(2):89–95-89–95.

20. Thakur S, Sasi S, Pillai SG, Nag A, Shukla D, Singhal R, et al. SARS-CoV-2 mutations and their impact on diagnostics, therapeutics and vaccines. *Frontiers in medicine*. 2022;9:815389.

21. Banerjee A, Sarkar R, Mitra S, Lo M, Dutta S, Chawla-Sarkar M. The novel coronavirus enigma: phylogeny and analyses of coevolving mutations among the sars-cov-2 viruses circulating in India. *JMIR Bioinformatics and Biotechnology*. 2020;1(1):e20735.

22. Maleki A, Fereydouni Z, Tavakoli M, Ezani A, Hosseini M, Nemati AH, et al. Novel Mutations Associated with N-Genes Target Failure in SARS-COV-2 Genome in Iran, Case Series. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*. 2022;10(3):141-5.

23. Zhao N, Zhou N, Fan H, Ding J, Xu X, Dong X, et al. Mutations and phylogenetic analyses of SARS-CoV-2 among imported COVID-19 from abroad in Nanjing, China. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:851323.

24. Klink GV, Safina KR, Garushyants SK, Moldovan M, Nabieva E, Consortium C, et al. Spread of endemic SARS-CoV-2 lineages in Russia. *MedRxiv*. 2021:2021.05.25.21257695.

25. Annavajhala MK, Mohri H, Wang P, Nair M, Zucker JE, Sheng Z, et al. Emergence and expansion of SARS-CoV-2 B. 1.526 after identification in New York . *Nature*. 2021;597(7878):703-8.

26. Cubuk J, Alston JJ, Incicco JJ, Singh S, Stuchell-Breton MD, Ward MD, et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. *Nature communications*. 2021;12(1):1936.

27. Vicco A, Caccuri F, Messali S, Vitiello A, Emmi A, Del Vecchio C, et al. Genomic surveillance of SARS-CoV-2 in patients presenting neurological manifestations. *PloS one*. 2022;17(6):e0270024.

28. Laamarti M, Alouane T, Kartti S, Chemao-Elfihri M, Hakmi M, Essabbar A, et al. Large scale genomic analysis of 3067 SARS-CoV-2 genomes reveals a clonal geodistribution and a rich genetic variations of hotspots mutations. *PLoS one*. 2020;15(11):e0240345.
29. Ayub MI. A Unique Trinucleotide-Bloc Mutation-Based Two SARS-CoV-2 Genotypes with Potential Pathogenic Impacts. *Advances in Virology*. 2022;2022.
30. Lesbon JCC, Poleti MD, de Mattos Oliveira EC, Patané JSL, Clemente LG, Viala VL, et al. Nucleocapsid (N) gene mutations of SARS-CoV-2 can affect real-time RT-PCR diagnostic and impact false-negative results. *Viruses*. 2021;13(12):2474.
31. Samoilov AE, Kaptelova VV, Bukharina AY, Shipulina OY, Korneenko EV, Saenko SS, et al. Case report: change of dominant strain during dual SARS-CoV-2 infection. *BMC Infectious Diseases*. 2021;21(1):1-8.
32. Caserta L, Mitchell PK, Plocharczyk E, Diel DG. Identification of a SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 virus in New York following return travel from the United Kingdom. *Microbiology resource announcements*. 2021;10(9):10.1128/mra.00097-21.
33. Majumdar P, Niyogi S. SARS-CoV-2 mutations: The biological trackway towards viral fitness. *Epidemiology & Infection*. 2021;149.
34. Cao L, Xu T, Liu X, Ji Y, Huang S, Peng H, et al. The Impact of Accumulated Mutations in SARS-CoV-2 Variants on the qPCR Detection Efficiency. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;12:823306.
35. Hilti D, Wehrli F, Roditscheff A, Risch M, Risch L, Egli A, et al. SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Mutations Found in Switzerland Disrupt N-Gene Amplification in Commonly Used Multiplex RT-PCR Assay. *Pathogens*. 2023;12(12):1383.
36. Zhao H, Nguyen A, Wu D, Li Y, Hassan SA, Chen J, et al. Plasticity in structure and assembly of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *PNAS nexus*. 2022;1(2):pgac049.
37. Kiryanov SA, Levina TA, Konopleva MV, Suslov AP. Identification of hotspot mutations in the N gene of SARS-CoV-2 in Russian clinical samples that may affect the detection by reverse transcription-PCR. *Diagnostics*. 2022;12(1):147.
38. Kozlovskaya L, Pinaeva A, Ignatyev G, Selivanov A, Shishova A, Kovpak A, et al. Isolation and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 variants collected in Russia during the COVID-19 outbreak. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;99:40-6.
39. Hasan R, Hossain ME, Miah M, Hasan MM, Rahman M, Rahman MZ. Identification of novel mutations in the N gene of SARS-CoV-2 that adversely affect the detection of the virus by reverse transcription-quantitative PCR. *Microbiology Spectrum*. 2021;9(1):e00545-21.
40. Laine P, Nihtilä H, Mustanoja E, Lyyski A, Ylinen A, Hurme J, et al. SARS-CoV-2 variant with mutations in N gene affecting detection by widely used PCR primers. *Journal of Medical Virology*. 2022;94(3):1227-31.
41. Holland SC, Bains A, Holland LA, Smith MF, Sullins RA, Mellor NJ, et al. SARS-CoV-2 Delta variant N gene mutations reduce sensitivity to the TaqPath COVID-19 multiplex molecular diagnostic assay. *Viruses*. 2022;14(6):1316.

42. Zhou Y, Zhang L, Xie Y-H, Wu J. Advancements in detection of SARS-CoV-2 infection for confronting COVID-19 pandemics. *Laboratory investigation*. 2022;102(1):4-13.
43. Tsuchiya K, Maeda K, Matsuda K, Takamatsu Y, Kinoshita N, Kutsuna S, et al. Neutralization activity of IgG antibody in COVID-19-convalescent plasma against SARS-CoV-2 variants. *Scientific Reports*. ۲۰۲۳;(۱)۱۳:۲۰۲۳.
44. Jalkanen P, Pasternack A, Maljanen S, Melén K, Kolehmainen P, Huttunen M, et al. A combination of N and S antigens with IgA and IgG measurement strengthens the accuracy of SARS-CoV-2 serodiagnostics. *The Journal of infectious diseases*. 2021;224(2):218-28.
45. Alamri SS, Alsaieedi A, Khouqeer Y, Afeef M, Alharbi S, Algaissi A, et al. The importance of combining serological testing with RT-PCR assays for efficient detection of COVID-19 and higher diagnostic accuracy. *PeerJ*. 2023;11:e15۰۲۴.
46. Raheja H, Das S, Banerjee A, P D, Mukhopadhyay D, Ramachandra SG, et al. RG203KR mutations in SARS-CoV-2 nucleocapsid: assessing the impact using a virus-like particle model system. *Microbiology Spectrum*. 2022;10(4):e00781-22.
47. Alsuwairi FA, Alsaleh AN, Alsanea MS, Al-Qahtani AA, Obeid D, Almaghrabi RS, et al. Association of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Mutations with Patient Demographic and Clinical Characteristics during the Delta and Omicron Waves. *Microorganisms*. 2023;11(5):1288.
48. Mitani A, Horie T, Yokoyama R, Nakano Y, Hamada K, Inoue Y, et al. Interpretations of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibody titers in the seroepidemiological study of asymptomatic healthy volunteers. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2022;28(2):266-72.
49. Dang M, Song J. CTD of SARS-CoV-2 N protein is a cryptic domain for binding ATP and nucleic acid that interplay in modulating phase separation. *Protein Science*. 2022;31(2):345-56.
50. Cosar B, Karagulleoglu ZY, Unal S, Ince AT, Uncuoglu DB, Tuncer G, et al. SARS-CoV-2 mutations and their viral variants. *Cytokine & growth factor reviews*. 2022;63:10-22.
51. Eskier D, Karakulah G, Suner A, Oktay Y. RdRp mutations are associated with SARS-CoV-2 genome evolution. *PeerJ*. 2020;8:e9587.
52. Abbasian MH, Mahmanzar M, Rahimian K, Mahdavi B, Tokhanbigli S, Moradi B, et al. Global landscape of SARS-CoV-2 mutations and conserved regions. *Journal of Translational Medicine*. 2023;21(1):152.
53. Jungreis I, Sealfon R, Kellis M. SARS-CoV-2 gene content and COVID-19 mutation impact by comparing 44 Sarbecovirus genomes. *Nature communications*. 2021;12(1):2642.
54. Ayub MI. Reporting two SARS-CoV-2 strains based on a unique trinucleotide-bloc mutation and their potential pathogenic difference. 2020.



Investigating Corona virus nucleocapsid protein (N) mutations in the domain effective in immunogenicity and its effect on serological diagnostic tests in samples isolated from infected patients in Zanjan

Samaneh Karimkhanilouei¹, Saeid Ghorbian², Sanaz mahmazi³, Changiz Ahmadizadeh⁴, Keyvan Nedae⁵

1-PhD student of molecular genetics, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

2- Associate Professor, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.
Corresponding Author: ghorbian20@yahoo.com

3- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

4- Assistant Professor, Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

5- Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Received:2023.09. 09

Accepted: 2024.01.12

Abstract

Background & Aim: Wellness requires the proper functioning of the immune system in all of the body systems. The immune system active by the cooperation of several immune sections. The immune cells and substances can identify and destroy foreign viral and microbial agents that worn out cells and cancer cells in the body. The aim of this study was to investigate the effect of high-speed sports activity on the anti-inflammatory factors lysozyme, LL-37 and HDB-2 in the saliva of obese adolescent boys.

Materials & Methods: 32 male students voluntarily participated in the present study and were randomly assigned to four groups: 1) obese aerobic exercise, 2) normal weight aerobic exercise, 3) obese control without exercise, and 4) normal weight control without exercise. Anthropometric indices of height, weight and body mass index were measured. Before and after eight weeks of practice, Shatell-Run standard test was performed. Salivary samples of lysozyme, lactoferrin, lactate and C-reactive protein concentrations were taken after eight weeks of training with a frequency of three sessions per week with an intensity of 30 to 90% of maximum aerobic power. Using analysis of covariance, variables with a significance level of less than ($p \geq 0.05$) were included in the analysis.

Results: The results showed that the salivary levels of lysozyme ($p=0.001$), LL-37 ($p=0.002$), and HDB2 ($p=0.001$) increased significantly, and the amount of increase in obese students was higher than in people with normal weight.

Conclusion: The increased response of some salivary anti-inflammatory proteins following eight weeks of high-speed exercise training after increased activity may be due to the short-term responses of the immune system against the pressures caused by intense activity.

Key words: Covid-19, mutation, nucleocapsid, IgG, IgM, protein N