

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۱۹، مهر ۱۳۹۹، ۷۴۴-۷۴۹

دلائل ظهور کرونا ویروس جدید ۲۰۱۹ (SARS-CoV2): جهش طبیعی یا دستکاری ژنتیکی شده
آزمایشگاهی-نقطه نظرمهدی زین الدینی^۱

دریافت مقاله: ۹۹/۲/۱۶ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۹/۴/۹ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۹/۶/۱۹ پذیرش مقاله: ۹۹/۶/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: پس از ظهور بیماری کووید-۱۹ ناشی از ویروس سارس-کوو۲ (SARS-CoV2)، دلائل ظهور این ویروس نوین مورد توجه محققین زیست شناسی مولکولی و محافل خبری قرار گرفته است. در این مقاله تلاش شده است ضمن تأکید بر توجه به تمامی جوانب ظهور این ویروس، آخرین اطلاعات مرتبط با ایجاد آن مورد بحث قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: از سایت اصلی مربوط به مقالات منتشر شده در خصوص کووید-۱۹ (LitCovid)، تا ۲۲ ژوئیه بیش از ۳۴۰۰۰ مقاله به چاپ رسیده است. اما بحث علمی در خصوص دلائل ظهور این ویروس از نظر منشاء طبیعی یا دستکاری ژنتیکی بودن آن در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی، صورت نگرفته است. در این مقاله مروری، با تحلیل ۱۵ مقاله مرتبط با این موضوع، دلائل علمی ظهور این ویروس مورد تحلیل قرار می‌گیرد.

یافته‌ها: فناوری ژنتیک معکوس ابزاری قدرتمند در جهت دستورزی‌های ژنتیکی و طراحی ویروس‌های مهندسی شده جهت تولید داروها و واکسن‌های موثر بر علیه عفونت‌های ویروسی است. ولی ممکن است بر این اساس ویروس‌های خطرناکی نیز شکل گیرد که خصوصیات ناشناخته‌ای از خود بروز دهد. مطالعات نشان داده است که سارس-کوو۲ دارای ترادف منحصر به فردی در وسط گلیکوپروتئین اسپایک (S) است که با دیگر کروناویروس‌ها مشابهت ندارد.

نتیجه‌گیری: با توجه به ویژگی‌های اختصاصی سارس-کوو۲ و مقایسه آن با سایر کروناویروس‌ها، نوپدید و نوظهور بودن آن بر جامعه علمی مشخص شده است. بر این اساس، تولید آزمایشگاهی و دستکاری ژنتیکی بودن آن محتمل است ولی تصادفی یا عمدانه بودن ظهور آن، نیازمند به انجام تحقیقات بیش‌تر دارد.

واژه‌های کلیدی: سارس-کوو ۲، ویروس نوترکیب، کووید-۱۹، دستکاری ژنتیکی، جهش

۱- دانشیار بیوشیمی، مجتمع دانشگاهی شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، ایران
تلفن: ۰۲۱-۲۲۹۷۴۶۰۰، دورنگار: ۰۲۱-۲۲۹۷۴۶۰۵، پست الکترونیکی: zeinoddini52@mut.ac.ir

مقدمه

ویروس سارس-کوو ۲ به عنوان عامل بروز بیماری جدید کرونا (کووید-۱۹، COVID-19، CoronaVirus Disease، 2019)، پس از شیوع در آخرین روزهای سال ۲۰۱۹، توسط سازمان بهداشت جهانی (World Health Organisation, WHO) به عنوان یک معضل بهداشتی در جهان مطرح شده است که تعداد مبتلایان این بیماری هر روزه در حال افزایش است. بر اساس آمار ارائه شده توسط WHO تا اول مرداد ماه ۱۳۹۹ (۲۲ ژوئیه ۲۰۲۰)، تمامی کشورهای دنیا درگیر این بیماری بوده، بیش از ۱۵ میلیون نفر به این ویروس آلوده شده و بیش از ۶۰۰ هزار نفر در اثر این بیماری از بین رفته‌اند که بالاترین میزان مرگ و میر را تاکنون در بین مبتلایان به کرونا ویروس‌ها از خود نشان داده است [۱-۳]. در برخی مقالات، امکان ارتباط همه گیری سال ۲۰۰۳ کرونا ویروس سارس (SARS-CoV) با همه‌گیری ۲۰۲۰ کرونا ویروس عامل کووید-۱۹ مورد مقایسه و بررسی قرار گرفته است. اگرچه شباهت‌های زیادی بین کرونا ویروس سارس و سارس-کوو ۲ وجود دارد، اما تفاوت‌هایی در خصوصیات این دو ویروس و شناسایی آنها وجود دارد. این اختلافات از نظر دوره عفونت‌زایی، انتقال، سرعت انتشار و ویژگی‌های کلینیکی بیش‌تر نمایان است [۴-۵]. هم‌چنین بین سارس-کوو ۲ با سایر کرونا ویروس‌ها از جمله ویروس عامل سارس و سویه‌های شبه سارس، ۳۸۰ اسید آمینه متفاوت وجود دارد که بیان‌گر واگرایی

(Divergenic) بودن سارس-کوو ۲ با سایر کروناویروس‌ها است. بر اساس مقایسه ترادف ژنومی ویروس‌های عامل بروز کووید-۱۹، سارس و مرس، مشخص شده است که سارس-کوو ۲ از نظر ژنومی بسیار شبیه (۸۲ درصد) کرونا ویروس سارس (SARS-CoV) است تا کرونا ویروس مرس (MERS-CoV) [۶]. به همین دلیل در بسیاری از منابع علمی کروناویروس عامل کووید-۱۹ بنام SARS-CoV2 نیز نام‌گذاری می‌گردد. کرونا ویروس‌ها به طور عمده بر اساس آلوده کردن سیستم تنفسی و سیستم گوارشی و هم‌چنین بر مبنای ساختار ژنتیکی به چهار گروه و جنس تقسیم می‌شوند: آلفا کروناویروس‌ها، بتا کرونا ویروس‌ها، گاما کروناویروس‌ها و دلتا کرونا ویروس‌ها. تا قبل از همه‌گیری اخیر، ۶ نوع کرونا ویروس انسانی (آلوده کننده انسان) شناسایی شده‌اند: دو سویه HCoV-NL63 و HCoV-229E که متعلق به جنس آلفا کرونا ویروس هستند، چهار نوع دیگر یعنی HCoV-OC43، HCoV-HKU1، SARS و MERS، متعلق به بتا کرونا ویروس‌ها هستند [۶-۷]. تا سال ۲۰۰۳ که پاندمی سارس در جهان شکل گرفت، هیچ پاندمی و همه‌گیری از خانواده و جنس کرونا ویروس‌ها گزارش نشده بود. در ادامه پاندمی سارس، در سال ۲۰۱۲ پاندمی مرس (MERS) شکل گرفت و امروزه در سال ۲۰۲۰ پاندمی شدیدتر کووید-۱۹ به وجود آمده است. از نظر انتقال بین موجودات، ویروس سارس و مرس از خفاش به نوعی راسو (Palm Civets) منتقل، سپس به شتر و در نهایت به

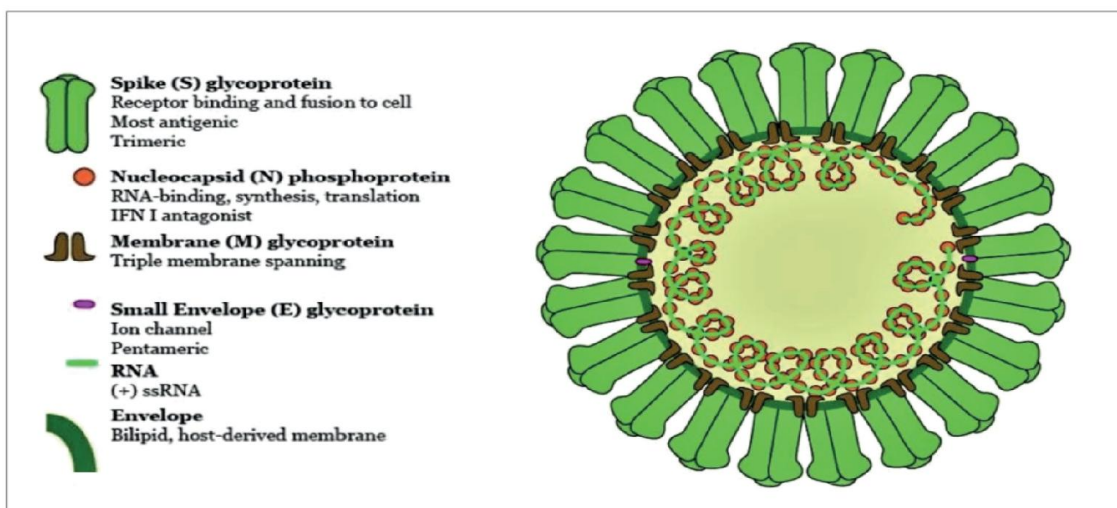
انتقال از طریق حیوان هنوز تأیید نشده است. مار به عنوان یک احتمال انتقال بیماری نیز مطرح است ولی این نظریه بوسیله برخی محققین تأیید نشده است. بسیاری از محققین اعتقاد دارند که این ویروس‌ها دارای طیف وسیعی از آلودگی از حیوانات تا پرندگان هستند [۹]. محققان هم‌چنان در حال بررسی و تحقیق بر روی احتمال واسطه‌گری حیوانات در انتقال بیماری کووید-۱۹ به انسان هستند. گزارشات اولیه بیان‌گر این است که بیمارانی که مبتلا به کووید-۱۹ شدند دارای فعالیتهای مرتبط با فروشگاه‌ها بوده‌اند. به صورت حیرت‌انگیز هم برخی گزارشات تأیید می‌کند که بیمارانی که از نظر کرونا ویروس جدید مثبت شده‌اند، ارتباط نزدیکی با فروشگاه‌ها نداشته‌اند. مسئولان بهداشتی در بسیاری از کشورها بعد از بررسی موارد مؤثر بر بیماران عفونی به این نتیجه رسیدند که انتقال انسان به انسان سارس-کوو ۲ نیز بسیار محتمل است. درضمن با توجه به تولید آئروسول و قطرات تنفسی بزرگ، سارس-کوو ۲ می‌تواند در مدفوع و ادرار بیماران عفونی با عوارض اسهالی نیز مشاهده گردد [۱۰-۱۱]. ظهور ناگهانی این بیماری و انشعاب عامل ایجاد کننده آن (سارس-کوو ۲) از ویروس‌های شبه سارس، فکر متخصصین زیست‌شناس را به امکان طراحی آزمایشگاهی این ویروس سوق داده است. در این مقاله مروری، تلاش شده است بصورت علمی امکان این موضوع مورد بررسی قرار گیرد. درنتیجه با مطالعه مقالات علمی مرتبط با این ویروس، ضمن معرفی ساختار ویروس سارس-کوو ۲، تنوع و

انسان منتقل گردید. اما در مورد سارس-کوو ۲، حیوان حدواسط خفاش، مورچه خوار و حتی مار مطرح شده است. با توجه به سه ژنومی که برای اولین بار از سارس-کوو ۲ شناسایی و منتشر شد یعنی Wuhan/IVDC-HB-01/2019 (HB01) (GISAID accession ID:EPI-ISL-402119)، Wuhan/IVDC-HB-04/2019 (EPI-ISL-402120) و Wuhan/IVDC-HB-05/2019 (EPI-ISL-402121) (HB05)، یک قرابت ژنتیکی عمیقی بین این ویروس در مقایسه با کرونا ویروس‌های مرتبط از جمله عامل ویروسی سارس انسانی، شبه سارس خفاش و مرس انسانی که ژنوم آنها تا قبل از ۱۲ ژانویه ۲۰۲۰ (نشر اطلاعات: ۱۲ سپتامبر ۲۰۱۹) از مرکز آنالیز و بانک اطلاعاتی پاتوژن‌های ویروسی (Virus Pathogen Database and Analysis Resource, ViPR) گزارش شده بود، حاصل شده است [۹-۸]. از سوی دیگر همه گیری کووید-۱۹ براساس اطلاعات مربوطه از محل فروش غذاهای دریایی در جنوب چین و از حیوانات وحشی آغاز گردید. بسیار قابل توجه است که همه‌گیری سارس نیز در سال ۲۰۰۳ از جنوب چین همانند همه گیری اخیر کووید-۱۹ در زمستان و در اثر تماس با حیوانات زنده فروخته شده در فروشگاه‌ها، اتفاق افتاده است. آزمایشات اولیه آشکار کرد که برخی نمونه‌های محیطی برای کووید-۱۹ در فروشگاه‌های غذاهای دریایی در استان هوانان، شهر ووهان چین، مثبت بوده است. برپایه گزارش سازمان بهداشت جهانی، هرچند مکان فروشگاه‌ها، از نظر آلودگی به کروناویروس جدید مثبت ارزیابی شدند، ولی نقش معنادار

گلیکوپروتئین غشایی (M) که به صورت سه تایی پوشاننده غشاء ویروس است. (د) گلیکوپروتئین پوششی کوچک (E) که به صورت پنتامریک (پنج رشته‌ای) به عنوان کانال‌های یونی عمل می‌کند. (ه) یک رشته RNA مثبت (+ssRNA)، که نقش توارث و تکثیری را برعهده دارد. (و) پوشش دو تایی لیپیدی که از سلول‌های میزبان گرفته شده است (شکل ۱). سارس-کوو ۲ علاوه بر موارد فوق دارای یک گلیکوپروتئین اضافی با ویژگی‌های آسیتیل استراز و هم آگلوتیناسیونی است که از این جهت با دیگر کرونا ویروس‌ها متفاوت است [۱۲].

همسانی ژنتیکی آن با دیگر کرونا ویروس‌های انسانی و حیوانی، مقایسه می‌گردد تا به استناد دلایل علمی و فناورانه، ظهور و بروز این ویروس در بخش‌های بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

ذرات ویروسی کرونا دارای پوشش و به صورت دایره‌ای شکل در ابعاد ۱۵۰ تا ۱۶۰ نانومتر است که دارای اجزاء مشخصی است: (الف) گلیکوپروتئین اسپایک (S) که به صورت تریمر بوده و نقش آنتی ژنیک اصلی ویروس را داشته و همچنین قابلیت اتصال به گیرنده سطح سلول را به عهده دارد. (ب) فسفوپروتئین نوکلئوکپسیدی (N) که نقش اتصال به RNA، سنتز و ترجمه آن را برعهده دارد. (ج)

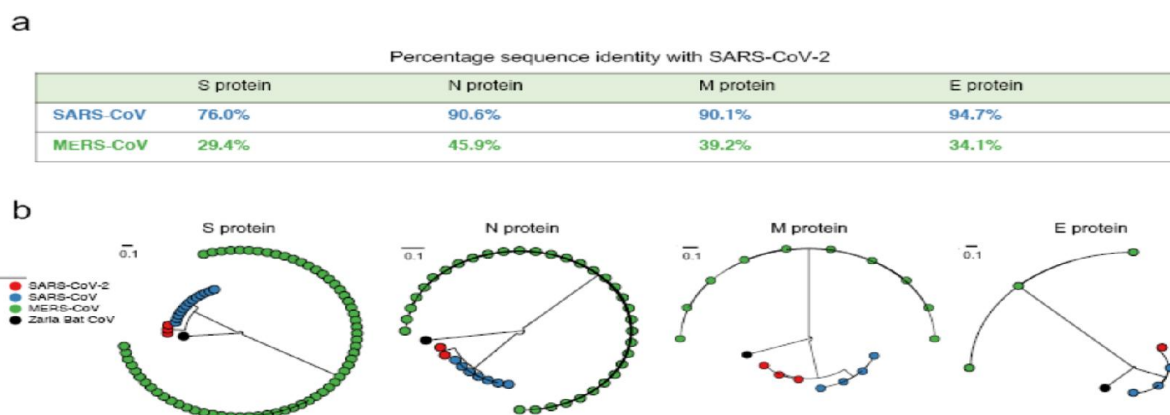


شکل ۱- تصویری شماتیک از ذره ویروسی کرونا [۱۲].

M و N بین ویروس سارس-کوو ۲ و ویروس عامل سارس نشان می‌دهد که سه پروتئین E، M و N دارای ۹۰ درصد تشابه و یکسانی از نظر ژنتیکی بین سارس-کوو ۲ و ویروس عامل سارس است، در صورتیکه پروتئین S مستثنا بوده و

پروتئین‌های ساختاری سارس-کوو ۲ به صورت ژنتیکی مشابه ویروس عامل بیماری سارس (SARS-CoV) است ولی تشابهی با ویروس عامل بیماری مرس (MERS-CoV) ندارد. اطلاعات حاصل از آنالیز پروتئین‌های ساختاری S، E،

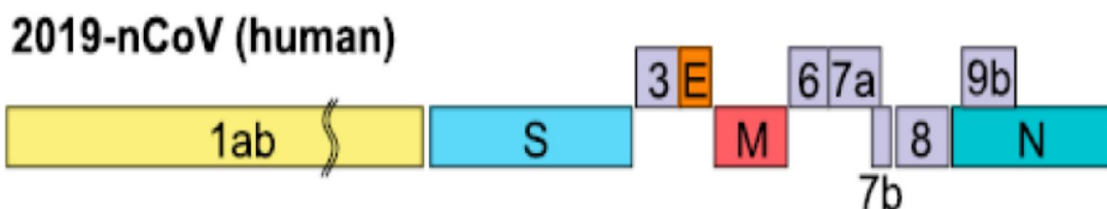
تشابه کمتری (ولی هم چنان بالا، ۷۶ درصد) را نشان می‌دهد (شکل ۲-ا). از سوی دیگر شباهت بین سارس-کوو ۲ و ویروس عامل بیماری مرس از نظر چهار پروتئین ساختاری بسیار کمتر است (شکل ۲-ب) [۱۳].



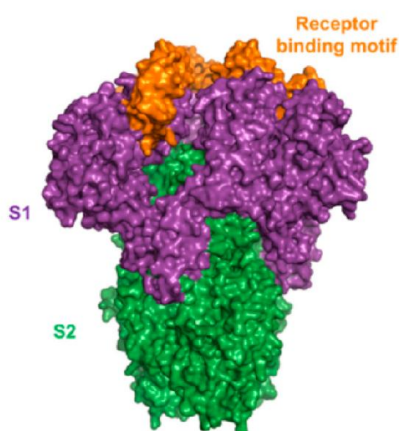
شکل ۲- مقایسه شباهت پروتئین‌های ساختاری سارس-کوو ۲ با پروتئین‌های هم‌نظیر آن در ویروس سارس و مرس. (a) درصد شباهت ژنتیکی هر کدام از پروتئین‌های ساختاری سارس-کوو ۲ با ویروس‌های سارس و مرس. (b) فیلوگرام چرخه‌ای از درخت فیلوژنی چهار پروتئین ساختاری در بین چهار ویروس سارس-کوو ۲، سارس، مرس و کرونا ویروس خفاشی (Bat CoV). لازم به توضیح است که تمامی درخت‌های فیلوژنی با استفاده از نرم افزار PASTA و ترفادف‌های منحصر به فرد مربوط به هر نمونه و با ریشه اولیه نژاد کرونا ویروس خفاشی (accession ID: HQ166910.1) مورد بررسی قرار گرفته است [۱۳].

می‌کند. گلیکو پروتئین سطحی اسپایک مربوط به ویروس‌های عامل بیماری سارس و مرس به گیرنده‌های میزبان براساس دومین‌های متفاوت اتصالی به گیرنده، باند می‌شوند. کرونا ویروس عامل بیماری سارس از آنزیم ۲ تبدیل کننده آنژیوتنسیین (ACE2، angiotensin-2 converting enzyme) به عنوان یک گیرنده اصلی استفاده می‌کند. این درحالی است که از دی پپتیدیل پپتیداز ۴ (DPP4، به نام CD26 نیز شناخته می‌شوند) به عنوان گیرنده اولیه استفاده می‌کند. آنالیز اولیه بیان‌گر این است که سارس-کوو ۲ از نظر تکاملی دارای شباهت با کرونا ویروس‌های شبه سارس با منشا خفاشی است.

ژنوم کروناویروس اندازه‌ای بین ۲۶۰۰۰ تا ۳۲۰۰۰ باز دارد. که از این بین، ۶ تا ۱۱ هزار نوکلئوتید مربوط به Open Reading Frames (ORFs) است. اولین قطعه با نام ORF1 تقریباً ۶۷ درصد ژنوم ورودی، رمزکننده ۱۶ پروتئین غیر ساختاری (Non structural proteins, nsps) است و باقی مانده ORFs رمزکننده پروتئین‌های اضافی (تکمیلی) و پروتئین‌های ساختاری است. همان‌گونه که در بالا اشاره شد، چهار پروتئین عمده ساختاری شامل پروتئین‌های S، E، M و N است که به ترتیب در ساختار ژنومی ویروس قرار گرفته است (شکل ۳). گلیکو پروتئین سطحی اسپایک (S) یک نقش کلیدی در اتصال به گیرنده سطح سلول میزبان بازی



شکل ۳- ساختار ژنومی سارس-کوکو ۲ که دارای اجزاء ژنتیکی (ORFs (1ab, 3, 6, 7a, 7b, 8, 9b)، S، E، M و N می‌باشد و به ترتیب در ساختار RNA ویروس قرار گرفته است.



شکل ۴- تصویری شماتیک از دو زیر واحد ساختاری پروتئین سطحی اسپایک در کرونا ویروس عامل بیماری سارس و سارس-کوکو ۲ که به رنگ سبز و بنفش نمایش داده شده است. موتیف اتصال به گیرنده به صورت زرد رنگ نشان داده شده است.

مواد و روش‌ها

پس از شیوع ویروس سارس-کوکو ۲، یک سایت اختصاصی در خصوص مقالات مرتبط با این ویروس و بیماری مرتبط با آن (کووید-۱۹) به نام LitCovid شکل گرفت که در این سایت کلیه مقالات علمی مرتبط با بیماری و عامل بروز دهنده آن یعنی سارس-کوکو ۲ از نظر اپیدمی، مکانیسم، ساختار، ژنوم، شناسایی و غیره ارائه داده شده است.

ترادف اسید آمینه‌ای سارس-کوکو ۲ از دیگر کرونا ویروس‌ها در مناطق پلی پروتئین ORF1ab و گلیکوپروتئین سطحی اسپایک، متفاوت است. پروتئین اسپایک (S) دارای دو زیر واحد مشخص S1 و S2 است (شکل ۴) [۱۴]. زیر واحد S1، زیرواحدی است که دارای موتیف اتصال به گیرنده بوده و به طور مستقیم به گیرنده میزبان متصل شده و زمینه ساز ورود ویروس به درون سلول میزبان می‌شود. دومین اتصال مربوط به پروتئین S در سارس-کوکو ۲ دارای یک همولوژی بالایی با ویروس عامل بیماری سارس است. در این خصوص برخی اسیدهای آمینه کلیدی برای اتصال گیرنده متفاوت است، براین اساس رزیدوهای غیر یکسان کانفورماسیون ساختاری بدون تغییر دارند.

مطالعات مختلف نشان داده است که گیرنده انسانی برای سارس-کوکو ۲ می‌تواند آنزیم ۲ تبدیل کننده آنژیوتنسنین (ACE2) باشد. دیگر کرونا ویروس‌ها هم‌چون عامل بیماری سارس نیز از طریق گیرنده ACE2، وارد سلول میزبان می‌شود [۱۵-۱۶].

به بیان دیگر این سایت وظیفه جمع آوری تمامی گزارشات علمی و مقالاتی که در سایر سایت‌های تخصصی (از جمله NCBI، Science Direct و Google Scholar) در خصوص بیماری کووید-۱۹، ارائه شده است را بر عهده دارد. در نتیجه در این مطالعه تحلیل با رجوع به این سایت تمامی اطلاعات منتشر شده در این خصوص تهیه گردید. تا ۲۲ ژوای ۲۰۲۰، بیش از ۳۴۰۰۰ مقاله و گزارش علمی که در مجلات معتبر بین المللی به چاپ رسیده در این سایت ارائه شده است. اما از این بین، تعداد کمی در خصوص دلایل ظهور این ویروس از نظر منشاء طبیعی یا دستکاری ژنتیکی بودن آن در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی، بحث علمی صورت گرفته است. در روش استخراج مطالب، با استفاده از تحلیل و تفسیر اطلاعات به دست آمده و بر اساس دسته بندی مقالات مرتبط، در مرحله اول، حدود ۱۵ مقاله قابل مطالعه جهت بررسی موضوع دستکاری ژنتیکی بودن این ویروس نوپدید تشخیص داده شد. لازم به ذکر است با استفاده از کلیدواژه‌های نظیر دستکاری ژنتیکی، ژنتیک معکوس، منشاء ژنومی و منشاء آزمایشگاهی بودن سارس-کوو ۲، این مقالات دسته بندی و به دست آمد. بر این اساس با استفاده از مطالعات مقایسه‌ای از نظر ساختاری، ژنومی و عملکردی بین سارس-کوو ۲ با سایر کروناویروس‌های مشابه، می‌توان به اطلاعات مهمی از نظر منشاء ظهور و بروز کرونا ویروس جدید دست یافت. از سوی دیگر شکل‌گیری و توسعه فناوری‌هایی پیشرفته‌ای همچون مهندسی ژنتیک، ژنتیک معکوس، زیست شناسی مصنوعی و ویرایش ژنی، بستری مناسب را جهت تحقیقات بنیادی و

پایه‌ای فراهم می‌سازد و سبب می‌شود ابزارها و روش‌های لازم جهت دستکاری ژنتیکی ویروس‌های کرونا، در اختیار دانش‌مندان و محققان زیست شناسی قرار گرفته و محققان با استفاده از این ابزارهای مولکولی می‌توانند در طراحی و مهندسی ویروس‌های جدید اقدام نمایند [۱۷].

نتایج

در یک مطالعه بر روی ۸۶ سویه و نژاد از سارس-کوو ۲، تحقیقات مقایسه‌ای صورت گرفت. این سویه‌ها از بیماران آلوده قطعی به این ویروس از چین (۵۰ مورد)، آمریکا (۱۱)، استرالیا، ژاپن (۵)، فرانسه (۴)، سنگاپور (۳)، انگلیس (۲) تایوان (۲)، کره جنوبی، بلژیک، آلمان و ویتنام (هرکدام یک مورد)، به دست آمد. براساس داده‌های به دست آمده از آنالیز ژنتیکی این ژنوم‌ها نشان داده شد که سه حذف در ژنوم سارس-کوو ۲ از نمونه ژاپن، آمریکا و استرالیا، به دست آمد. هم چنین دو حذف ژنی (سه نوکلئوتید و ۲۴ نوکلئوتید) در پلی پپتید ORF1ab و یک حذف (۱۰ نوکلئوتید) در انتهای ۳' ژنوم مشاهده شد (شکل ۵). هم‌چنین آنالیز الایمنت نوکلئوتیدها مشخص کرد که ۹۳ جهش درون ژنوم سارس-کوو ۲ وجود دارد. ۴۲ جهش بی معنی نیز در تمامی پروتئین‌های ساختاری و غیرساختاری به جز پروتئین E، مشاهده می‌گردد. ۲۹ جهش بی معنی نیز در پلی پپتید ORF1ab، ۸ تا در گلیکوپروتئین سطحی S، یک مورد در پروتئین M و چهار جهش در پروتئین نوکلئوکپسید (N) وجود دارد. از این بین سه جهش D354، Y364 و F367 در دمین و موتیف اتصال به گیرنده S قرار گرفته است [۱۶]. این نتایج بیان‌گر تغییرات و وجود جهش‌های متنوع در

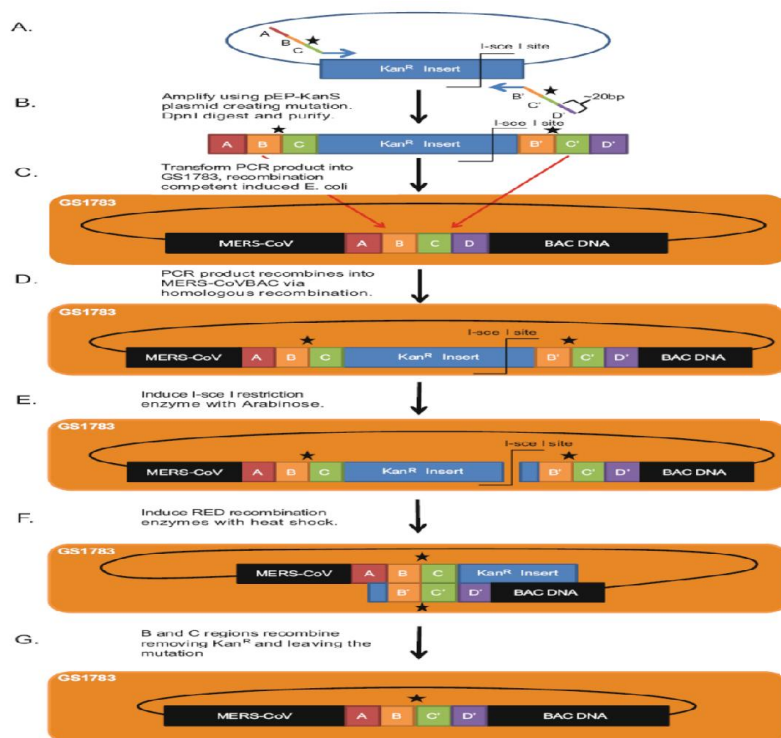
سطح ژنوم سارس-کوو ۲ استخراجی از افراد بیمار در سطح جهان است.



شکل ۵- مقایسه توالی ژنی سویه‌های مختلف سارس-کوو ۲ به دست آمده از بیماران مناطق مختلف جهان که بیان‌گر تنوع ژنتیکی در بین سویه‌های مختلف این کرونا ویروس است [۱۶].

جدیدی از آنها را طراحی و توسعه داد. در خصوص کرونا ویروس عامل بیماری مرس با استفاده از وکتور نوترکیبی لامبدا این کار صورت گرفته است (شکل ۶). در نتیجه این عمل هر نوع تغییر اساسی در سطح ژنوم ویروس، نظیر ورود یا حذف قطعه ژنی و جهش‌های نقطه‌ای می‌تواند در جهت طراحی و تولید ویروس مصنوعی، صورت گیرد [۱۸]. با در نظر گرفتن این موضوع که از این فناوری در جهت طراحی نمونه‌های ویروسی مثل عامل بیماری مرس استفاده شده است، لذا برخی محققین معتقدند عامل بروز بیماری کووید-۱۹ نیز می‌تواند حاصل استفاده از ژنتیک معکوس در آزمایشگاه بر روی ساختار ژنتیکی ویروس‌های مشابه آن (مثل کرونا ویروس عامل بیماری سارس) باشد [۱۸].

هم‌چنین امروزه از فناوری ریورس ژنتیک یا ژنتیک معکوس جهت طراحی و اصلاح سویه‌های مختلف میکروارگانیسمی استفاده زیادی می‌شود. با کمک این فناوری می‌توان ژنوم ویروس‌ها را جهت فهم بهتر خصوصیات زیستی آن، توسعه واکسن‌های جدید و درمان هدفمند عفونت‌های ویروسی، تغییر داد. درحقیقت ژنتیک معکوس، ابزاری قدرتمندی است که بوسیله وکتورهای ویروسی نوترکیب، اتصال خارج بدنی قطعات ژنی و هم‌چنین کروموزوم‌های مصنوعی باکتری (BACs Bacterial, artificial chromosomes)، می‌توان در راستای شناسایی و تهیه واکسن و پپتیدهای درمانی ویروس‌ها اقدام نمود. به این وسیله می‌توان ویروس‌ها را مهندسی کرده و نمونه‌های



تکثیر با استفاده از پلاسمید سبب ایجاد جهش می شود. هضم DpnI انجام و تخلیص می شود.

انتقال محصول PCR درون پلاسمید انجام و باکتری نوترکیب القاء می گردد.

محصول PCR درون کرونا ویروس مرس. با توجه به همولوژی قطعات ژنی، نوترکیبی ایجاد می کند.

القاء آنزیم محدودکننده I-sce I با آرابینوز انجام می شود.

القاء آنزیم های نوترکیب با استفاده از شوک حرارتی.

مناطق B و C نوترکیب، ژن مقاوم به کانامایسین را رفع کرده و جهش رهاسازی می گردد.

شکل ۶- مراحل مختلف القاء نوترکیبی بر روی کرونا ویروس عامل بیماری مرس با استفاده از وکتور نوترکیبی لامبدا، آنزیم های محدود کننده و BAC. نمایش داده شده است [۱۸].

اند و به عقیده دکتر Shi، منشاء کرونا ویروس های انسانی از خفاش است چرا که ظهور همه گیری سارس و مرس نیز براساس منشاء کرونا ویروس های خفاشی بوده است. او معتقد است دو کرونا ویروس انسانی 229E و NL63 دارای خصوصیات ژنتیکی مشابه کرونا ویروس خفاشی بوده و حتی پروتئین سطحی اسپایک آنها نیز مشابه هم بوده و در حضور گیرنده سلولی مشابه، وارد میزبان می شوند [۲۰].

Baric و Shi در کار مشترک خود، به منظور ارزیابی پتانسیل بیماریزایی کرونا ویروس های شبه سارسی و احتمال انتقال بین گونه ای آنها در همه گیری های انسان، با فناوری ژنتیک معکوس، کرونا ویروس شبه سارسی SHC014-CoV که در جمعیت خفاش های نعل اسبی چین در گردش است را به

در سال ۲۰۱۵ فناوری ژنتیک معکوس توسط دو محقق ویروس شناسی از آمریکا (دکتر رالف باریک، Ralph S Baric) و چین (دکتر زنگلی شی، Zhengli Shi) در جهت طراحی و مهندسی یک ویروس شبه سارس تحت عنوان SHC014-CoV مورد استفاده و بهره برداری قرار گرفت و یافته های حاصل از این تحقیق در شماره ۲۱ مجله Nature Medicine به چاپ رسیده است [۱۹].

پروفسور Baric، عضو دانشکده اپیدمیولوژی و میکروب شناسی از دانشگاه کارولینای شمالی است و پروفسور Shi (که به زن خفاشی نیز در چین شهرت دارد)، عضو آزمایشگاه اختصاصی با سطح ایمنی ۴ و انستیتو ویروس شناسی ووهان است. خفاش ها به عنوان مخزن طبیعی انواع زیادی از ویروس ها شناخته شده

صورت مولکولی (مهندسی ژنتیک) دستکاری کرده و ویروس مصنوعی (کایمریک) را تولید نمودند که دارای پایه کروناویروس سارسی سازگار شده با موش ولی بیان کننده پروتئین سطحی اسپایک (S) با منشاء SHC014-CoV بود. نتایج کار این دو دانشمند ویروس شناس نشان داد که کرونا ویروس‌هایی که پروتئین S مربوط به SHC014 را به رمز در می‌آورند در پایه نوع وحشی خود با کارایی بالا به گیرنده ACE2 سارسی، متصل شده و در سلول‌های تنفسی اولیه انسانی تکثیر می‌یابند. هم‌چنین در شرایط خارج بدنی نیز تیترو ویروسی معادل با نمونه اپیدمیک کرونا ویروس عامل بروز بیماری سارس را از خود نشان می‌دهد. به علاوه آزمایشات درون بدنی نیز اثبات نمود که تکثیر این ویروس کایمریک در ریه موش همراه با بیماری‌زایی قابل توجه، صورت می‌گیرد. ولی ارزیابی روش‌های ایمنی درمانی و پیشگیری کننده مبتنی بر سارس، اثربخشی ضعیفی را در هر دو مورد آنتی بادی منوکلونال و واکسن نشان داد، به طوری که خنثی سازی و محافظت از عفونت با کروناویروس‌ها با استفاده از این پروتئین سطحی نوین (S)، مشاهده نشد [۱۹]. دکتر Baric و دکتر Shi در کار مشترک دومی که بر روی کرونا ویروس عامل بیماری مرس (MERS-CoV) انجام دادند، اعلام کردند که دو جهش برای انتقال MERS-CoV بین خفاش و انسان، دارای اهمیت است. این دو برای بررسی چگونگی انتقال MERS-CoV از خفاش به انسان، پروتئین سطحی اسپایک مربوط به MERS-CoV و کرونا ویروس مرتبط با خفاش (HKU4) را مقایسه کردند. نتایج کار ایشان نشان داد که اگرچه پروتئین اسپایک HKU4 نمی‌تواند برای

ورود ویروس به سلول‌های انسانی اقدام نماید ولی اعمال دو جهش مشخص، ویروس را قادر می‌سازد در اثر پروتئین‌های انسانی، فعال گردد. این جهش‌ها در پروتئین اسپایک MERS-CoV وجود دارد و دلیل آلوده سازی سلول‌های انسانی به MERS-CoV می‌باشد. در نتیجه این دو جهش برای انتقال ویروس عامل مرس از خفاش به انسان، بسیار کلیدی و ضروری است [۲۱]. براین اساس امکان دستورزی ژنتیکی کروناویروس‌ها و طراحی ویروس‌های مهندسی شده با فناوری ژنتیک معکوس قوت می‌گیرد و دکتر Baric و Shi از آمریکا و چین به عنوان پیشگامان ورود به این عرصه معرفی می‌گردند. لازم به ذکر است دکتر Shi در مقاله اخیر خود با ارزیابی ترادف ژنوم کامل ۵ کروناویروس جدید که سبب بروز بیماری کووید-۱۹ در پنج نفر شده بود، اعلام می‌کند که ۷۹/۵ درصد از این ترادف مشابه کروناویروس عامل سارس و ۹۶ درصد مشابه کروناویروس خفاش است. هم‌چنین آنالیز ترادف دو طرفه پروتئینی مربوط به ۷ منطقه حفاظت شده از پروتئین‌های غیر ساختاری نشان داد که این ویروس متعلق به ویروس‌های شبه سارسی وابسته به گونه است. نتایج تحقیق او بیان‌گر ورود کروناویروس عامل کووید-۱۹ به سلول میزبان از طریق ACE2، مشابه کروناویروس عامل سارس است [۲۲]. ارزیابی و آنالیز جدید بر روی ترادف RNA سلول میزبان نیز نشان داده است که مردان آسیایی دارای سطح بیان بالاتر گیرنده ACE2، نسبت به سایر جمعیت‌ها می‌باشد [۲۳].

بحث

دکتر جیمز لیونز وایلر (James Lyons-Weiler)، مدیر علمی هسته آنالیز بیوانفورماتیک دانشگاه پیتسبورگ، اولین بار در ۳ فوریه ۲۰۲۰ اعلام کرد که سارس-کوو ۲ که مسئول همه‌گیری اخیر کرونا است، می‌تواند در اثر یک نوترکیب آزمایشگاهی حاصل شده باشد. در نتیجه این آنالیزها، او نشان داد که سارس-کوو ۲ دارای یک ترادف اضافه شده (۱۳۷۸ بازی) منحصر به فردی است که در وسط ژن گلیکوپروتئین اسپایک (S) قرار گرفته و با دیگر کرونا ویروس‌ها، یک‌سان نبوده و اصطلاحاً میچ (match) نمی‌شود. به علاوه او ادعا می‌کند که این ترادف بی‌نظیر بسیار مشابه برخی ترادف‌ها در وکتور pShuttle-SN، یک وکتور بیانی عمومی مورد استفاده در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی، است. براین اساس او نتیجه‌گیری می‌کند که منشاء سارس-کوو ۲ می‌تواند (نه لزوماً) محصول آزمایشگاه‌های تحقیقاتی باشد [۲۴].

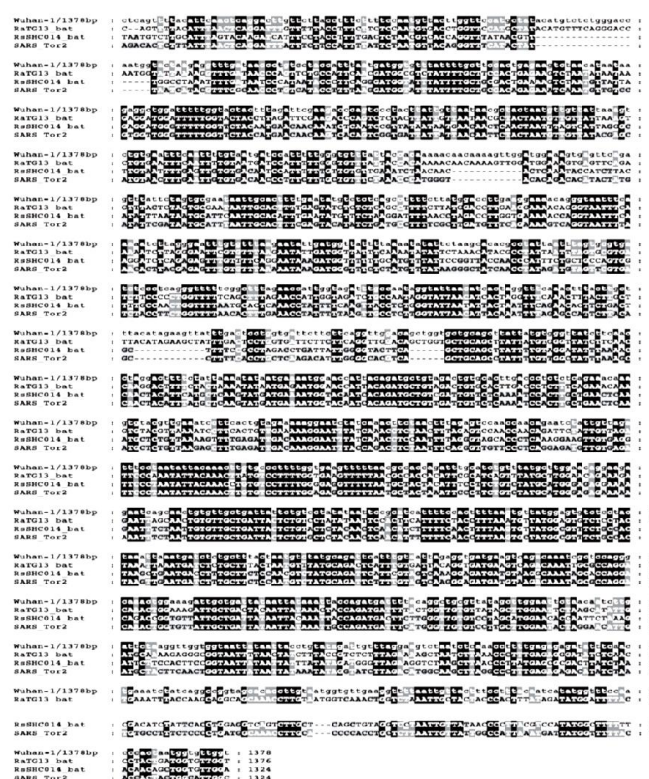
برای بررسی این ادعا دکترهائو (Hao) و همکارانش در ۸ مارس ۲۰۲۰ نتایج مربوط به مطالعات دکتر وایلر را مورد بررسی و آنالیز قرار دادند و بیان نمودند که اختلافات فاحشی از نتایج وی به دست آمده است. دکترهائو ضمن رد ادعای دکتر وایلر، فرضیه او در خصوص آزمایشگاهی بودن سارس-کوو ۲ را بدلائل زیر مورد تأیید قرار نمی‌دهد. اول اینکه این ترادف بی‌نظیر، اختصاصی سارس-کوو ۲ نیست. با استفاده از الایمنت کشف شده از منابع طبیعی چندین کرونا ویروس، مشخص می‌گردد که این ترادف ۱۳۷۸ بازی مورد ادعای دکتر وایلر در دیگر کرونا ویروس‌ها نیز مشاهده شده

است (شکل ۷) که شباهت ترادفی بالایی نیز دارد. در نتیجه این توالی بی‌نظیر در سایر کرونا ویروس‌ها نیز وجود دارد و نمی‌تواند حاصل فعالیت آزمایشگاهی باشد. دوم این‌که چگونه می‌توان توضیح داد که شباهت بین ترادف قطعه ژنی اسپایک سارس-کوو ۲ با ترادف وکتور pShuttle-SN وجود دارد؟ این یکی دیگر از جملات اشتباه دکتر وایلر است که چگونه این توالی را به عنوان وکتور pShuttle-SN معرفی و تشریح می‌کند. نویسندگان این مقاله به طور دقیق منشا وکتور pShuttle-SN را آنالیز کردند و مشخص شد که این وکتور در سال ۲۰۰۵ به عنوان یک پلاسمید بیانی دارای ترادف ژنی اسپایک از ویروس سارس (مسئول بیماری اپیدمیک کرونا ویروس سارس در سال ۲۰۰۳) است [۲۵].

در نتیجه وکتور pShuttle-SN نباید به عنوان وکتور جدید نامیده شود بلکه یک پلاسمید تولیدی شرکت Adeno-X™ برای مطالعه کرونا ویروس عامل سارس بوده است. در حقیقت وکتور اولیه، سیستم بیانی Adeno-X™ (Clontech Laboratories, Inc.) است که همولوژی معنی داری برای هیچ بخشی از ژنوم سارس-کوو ۲ را ندارد. با توجه به این‌که وکتور pShuttle-SN دارای یک قطعه از ژن اسپایک ویروس بیماری سارس است، یک‌سان بودن قطعه ژنی اسپایک سارس-کوو ۲ (۱۳۷۸ بازی) با برخی ترادف‌ها در pShuttle-SN، جای تعجب ندارد. براین اساس نتایج تحقیقات دکترهائو و همکارانش نشان داد که شباهت ترادف آن با قطعه pShuttle-SN، کم‌تر از ترادف‌های کروناویروس طبیعی بود (شکل ۷). در نتیجه برخلاف ادعای دکتر وایلر، او یافت که ترادف بی‌نظیر ۱۳۸۷ بازی در ژن اسپایک سارس-

می‌باشد. لازم به ذکر است که نویسندگان این مقاله با دکتر وایلر نیز تماس گرفتند و اعلام کردند که با ادعای ایشان مخالف هستند [۲۵].

کوکو ۲ مشاهده شده، به‌طور وسیعی در منابع طبیعی کروناویروس قابل دسترس نیز وجود دارد. پلاسمید شامل یک قطعه از ژن اسپایک از کرونا ویروس عامل سارس است که باعث بیش‌ترین تشابه بین آن و ترادف ژنی سارس-کوکو ۲



شکل ۷- قطعه ۱۳۷۸ بازی ژن اسپایک سارس-کوکو ۲، با ترادف‌های حاصل از منابع طبیعی هم‌ترازی (alignment) شدند و مشخص شد شباهت‌های زیادی با دیگر کروناویروس‌های طبیعی دارد [۲۵].

نتیجه‌گیری
با درنظر گرفتن تنوع ژنتیکی و تکاملی سریع در ظهور عامل کووید-۱۹ و حسب این که کرونا ویروس جدید (سارس-کوکو ۲) دارای شباهت‌های زیادی با کرونا ویروس عامل بیماری سارس است، محققین با آنالیز جهش‌های موجود بر روی ژنوم سارس-کوکو ۲ توانستند تمامی جهش‌ها و حذف‌ها بر روی مناطق رمزگذاری یا غیر رمزگذاری این

ویروس را شناسایی نمایند و حتی شبکه ارتباطی بین هاپلوتا‌پ‌های حاصل از این جهش‌ها را نیز ترسیم نمایند [۲۶]. این یافته‌ها دلیلی بر تنوع ژنتیکی و تکامل سریع کروناویروس جدید می‌باشد. با وجود تنوع ژنتیکی در ژنوم این ویروس، ولی این تغییرات زیاد نبوده و در حد جهش‌های نقطه‌ای قیاس می‌گردد. از سوی دیگر با توجه به شباهت زیاد این ویروس با کرونا ویروس عامل بیماری سارس، هم

و دانشمندان بر نوپدید بودن کروناویروس جدید هم نظر هستند ولی عامدانه بودن یا تصادفی بودن تولید آن نیاز به تحقیقات بیشتر دارد. در این مقاله تلاش شد از جنبه علمی به موضوع توجه شود و موارد علمی که در این خصوص مطرح شده را بررسی نماییم و از پرداختن به مسائل سیاسی و خبری در این راستا اجتناب شده است.

تشکر و قدردانی

این مطالعات در دانشگاه صنعتی مالک اشتر، مجتمع شیمی و مهندسی شیمی و پژوهشکده علوم و فناوری زیستی انجام شده است که از مسئولین دانشگاه تشکر می‌گردد.

چنین توسعه و پیشرفت‌های بالای فناوری‌هایی همچون مهندسی ژنتیک، ژنتیک معکوس، زیست شناسی مصنوعی و ویرایش ژنی، این قابلیت برای محققین علوم زیستی فراهم است تا در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی خود، ویروس‌های مهندسی شده و حمل کننده‌ای را در راستای تولید واکسن و یا داروهای درمان اختصاصی، طراحی و بوجود آورند. بر این اساس امکان طراحی و تولید ویروس‌های مصنوعی و آزمایشگاهی وجود دارد. ولی این‌که ویروس عامل بروز کووید-۱۹ می‌تواند حاصل آزمایشگاه‌های تحقیقاتی باشد، نیازمند گذشت زمان و تحقیقات گسترده‌تر برای مشخص شدن تمامی جوانب علمی آن است. در نتیجه اکثر محققین

References

- [1] Petersen E, Koopmans M, Go U, Hamer DH, Petrosillo N, Castelli F, et al. Comparing SARS-Cov-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect Dis* 2020;S1473-3099(20)30484-9.
- [2] Taherizadeh M, Tabibzadeh A, Panahi M, Safarnezhad F, Golahdooz M, Karbalaie Niya MH. An introduction to SARS coronavirus 2; Comparative analysis with MERS and SARS coronaviruses: A brief review. *Iran J Public Health* 2020; 49(1):30-37.
- [3] Smith AW, Chiew C, Lee V. Can we contain the COVID-19 outbreak with the same measures for SARA? *Lancet Infect Dis* 2020, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30129-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30129-8)
- [4] Pormohammad A, Ghorbani S, Khatami A, Farzi R, Baradaran B, Turner DL, et al. Comparison of confirmed COVID-19 with SARS and MERS cases- Clinical characteristics, laboratory findings, radiographic signs and outcomes: A systematic review and meta analysis. *Rev Med Virol* 2020; 30(4): e2112.
- [5] Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel

- coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395(10223):497-506.
- [6] Chan JFW, Kok KH, Zhu Z, Chu H, To KKW, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microb Infect* 2020; 9:221-36 .
- [7] Zeng ZQ, Chen DH, Tan WP, Qiu S-Y, Xu D, Liang H-X, et al. Epidemiology and clinical characteristics of human coronaviruses oc43, 229e, nl63, and hku1: A study of hospitalized children with acute respiratory tract infection in guangzhou, china. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; 37:363-9.
- [8] CoV2020. GISAID EpifluDB. Archived from the original on 12 January 2020. Retrieved 12 January 2020.
- [9] Schlottau K, Rissmann M, Graaf A, Schon J, Sehi J, Wylezich C, et al. SRAS-COV-2 in fruit bats, ferrets, pigs and chickens: an experimental transmission study. *Lancet Microbe* 2020; [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30089-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30089-6)
- [10] Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X, Wang X, Niu P, et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microb* 2020; 27: 325-8.
- [11] Wu D, Wu T, Liu Q, Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. *Int J Infect Dis* 2020; <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.004>
- [12] Kannan S, Shaik Syed Ali P, Sheeza A, Hemalatha K. COVID-19 (novel coronavirus 2019) recent trends. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020; 24: 2006-11.
- [13] Ahmed SF, Quadeer AA, McKat MR. Preliminary Identification of potential vaccine targets for the COVID-19 coronavirus (SARS-CoV-2) based on sars-CoV immunological studies. *Viruses* 2020; 12(254):1-15.
- [14] Phan T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infect Gen Evol* 2020; 81: 104260.
- [15] Pang J, Wang MX, Ang IYH, Tan SHX, Lewis RF, Chen JI-P. Potential rapid diagnostics, vaccine and therapeutics for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV): a systematic review. *J Clin Med* 2020; 9(263):1-33.
- [16] Chen Y, Guo Y, Pan Y, Zhao ZJ. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. *Biochem Biophys Res Com* 2020; 525(1):135-40.
- [17] Avila-Perez G, Nogales A, Martin V, Almazan F, Martinez-Sobrido L. Reverse genetic approaches for the generation of recombinant Zika virus. *Viruses* 2018; 10: 597-618.

- [18] Vijay R. MERS coronavirys, methods and protocols. Humana Press, 2020; Chapter 5, pp53-68. potential bat origin. 2020 doi: <https://doi.org/10.1101/2020.01.22.914952>
- [19] Menachery VD, Jr BLY, Debbink K, et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat Med* 2015; 21(12): 1508-13.
- [20] Hu B, Ge X, Wang LF, Shi Z. Bat origin of human coronaviruses. *Virol J* 2015; 12:221.
- [21] Yang Y, Liu C, Du L, Jiang S, Shi Z, Baric RS, et al. Two mutations were critical for bat-to-human transmission of MERS coronavirus. *J Virol* 2015; 89(17):9119-23.
- [22] Zhou P, Yang XL, Wang X-G, Hu B, Lei Z, Wei Z et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. 2020 doi: <https://doi.org/10.1101/2020.01.22.914952>
- [23] Cao Y., Li L., Feng Z., Wan S, Hung P, Sun X, et al. Comparative genetic analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV/SARS-CoV-2) receptor ACE2 in different populations. *Cell Dis* 2020;6: 11.
- [24] <https://jameslyonsweiler.com/2020/02/02/moderatelystrong-confirmation-of-a-laboratory-origin-of-2019-ncov/>.
- [25] Hao P, Zhong W, Song S, Fan S, Li X. Is SARS-CoV-2 originated from laboratory? A rebuttal to the claim of formation via laboratory recombination. *Emerg Microb Infect* 2020; 9:1-3.
- [26] Yi H. 2019 novel coronavirus is undergoing active recombination. *Clin Infect Dis* 2020; <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa219>.

Reasons for the Creation of the New Coronavirus 2019 (SARS-CoV2): Natural Mutation or Genetically Laboratory Manipulation-Point of View

M. Zeinoddini¹

Received: 05/05/2020 Sent for Revision: 29/06/2020 Received Revised Manuscript: 09/08/2020 Accepted: 09/08/2020

Background and Objectives: Following the emergence of COVID-19 caused by the SARS-CoV2, the reasons for the emergence of the novel virus have been the subject of interest for molecular biology researchers and news agencies. This article attempted to emphasize all aspects of the emergence of this virus and discuss the latest information related to its development.

Materials and Methods: From the main site for articles published on COVID-19 (LitCovid), more than 34000 articles have been published, until July 22. But there have been no scientific discussion about the reasons for the emergence of the virus due to its natural origin or genetic manipulation in research laboratories. In this review study, by collecting and reviewing 15 articles related to this topic, the scientific reasons for the emergence of this virus is analyzed.

Results: Reverse genetic technology is a powerful tool for genetic instructions and design of engineered viruses to produce effective drugs and vaccines against viral infections. But dangerous viruses may also be created in this way that exhibit unknown properties. Studies have shown that SARS-CoV2 has a unique sequence in the middle of the gene encoding glycoprotein Spike (S) that is not similar to other coronaviruses.

Conclusion: Due to the specific features of SARS-CoV 2 and its comparison with other coronaviruses, its emergence and novel agents has been determined in the scientific community. For this, laboratory production and genetic manipulation are possible, but whether its occurrence is accidental or intentional requires further investigation.

Key words: SARS-CoV2, Recombinant virus, COVID-19, Genetic manipulation, Mutation.

Ethical approval: None declared.

Funding: This study did not have any funds.

Conflict of interest: None declared.

How to cite this article: Zeinoddini M. Reasons for the Creation of the New Coronavirus 2019 (SARS-CoV2): Natural Mutation or Genetically Laboratory Manipulation-Point of View. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2020; 19 (7): 749-64. [Farsi]

*I- Associate Prof. of Biochemistry, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Iran
ORCID: 0000-0002-9500-1334
Tel: (021) 22974600, Fax: (021) 22974605, E-mail: zeinoddini52@mut.ac.ir*