ارزیابی بیولوژیکی کروناویروس‌ها و مطالعهٔ داکینگ مولکولی، لینالول و تیمول به‌عنوان مهارکنندهٔ پروتئین orf1ab و نقش ویروس SARS-CoV-2 در بیوتروریسم

بهمن فاضلی‌نسب[۱،۲*]

۱) گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲) گروه بیوتکنولوژی و به نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۲۵ **تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۷/۱۲**

چکیده

مقدمه: کروناویروس‌ها جزء ویروس‌های پوشش‌دار با منشأ جانوری هستند که علاوه بر بیماری تنفسی و گوارشی، در بیماری‌های عصبی نیز دیده شده‌اند؛ همچنین برخی از گونه‌های آن سبب نفریت گشته و یا در بیماران مبتلا به اماس و هپاتیت موش نیز دیده شده‌اند؛ اما در مجموع، مهم‌ترین تأثیر کروناویروس‌ها بر سیستم تنفسی و گوارشی است. هدف از تحقیق حاضر مقایسهٔ ژنوم ویروس SARS-CoV-2 با سایر ویروس‌های خانوادهٔ کروناویروس، بررسی احتمال ساختگی بودن آن و درنهایت، ارزیابی تأثیر لینالول و تیمول بر فعالیت نداشتن پروتئین orf1ab ویروس SARS-CoV-2 است.

مواد و روش‌ها: توالی ژنوم ویروس‌های خانوادهٔ Coronaviridae از پایگاه NCBI تهیه و پس از هم‌ردیف شدن، تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، تعداد جایگاه‌هایی که در آن‌ها جایگزینی مشابه اتفاق افتاده، خوشه‌بندی، تعیین شباهت و فاصلهٔ ژنتیکی و شاخص dN/dS ارزیابی شد. ساختار سه‌بعدی پروتئین orf1ab پیش‌بینی و دقت الگوی پیش‌بینی‌شده بررسی گردید. موتیف و دومین‌های حفاظت‌شده برای ژن orf1ab در همهٔ ویروس‌های خانوادهٔ Coronaviridae و همچنین دومین‌های غشایی، سیتوپلاسمی و کینازی در orf1ab ویروس SARS-CoV-2 بررسی شد. برای داکینگ مولکولی، از لینالول (مهم‌ترین مادهٔ تشنه‌داری Scrophularia striata) گیاه مدل یعنی آرابیدوپسیس و تیمول (Thymol) (مهم‌ترین مادهٔ زنیان) برای فعالیت نداشتن پروتئین orf1ab کروناویروس SARS-CoV-2 استفاده گردید.

یافته‌های پژوهش: ویروس SARS-CoV-2، ۱۱ دومین حفاظت‌شده و از سویی، ۱۱ ژن دارد. حضور دومین‌های NSP13 super family و SUD-M super family در ژنوم ویروس SARS-CoV-2، نشان‌دهندهٔ توانایی و تلاش این ویروس برای پایداری بیشتر در محیط است. بر اساس مقدار عددی شاخص‌های dN/dS (۱/۰۳۶) و Tajima´s D (۴/۳۹) برای orf1ab، شیب تغییرات در طول تکامل برای ژن orf1ab بسیار کند و عدم انتخاب جهت‌دار در تغییرات ویروس‌ها است. بر اساس بیشترین اثر متقابل میان پروتئین لینالول و پروتئین orf1ab (۴۱/۰-) و بیشترین دقت (۰/۱۷۲) و بر اساس کمترین سطح انرژی (ΔG=-۶/۲۳Kcal/mol) و بهترین ترکیب (Full Fitness=-۱۳۴۰/۱۸Kcal/mol) میان مادهٔ فیتوشیمیایی تیمول و پروتئین orf1ab، نتایج داکینگ مولکولی نشان داد که هم پروتئین لینالول و هم مادهٔ تیمول بر پروتئین orf1ab پیوند گردیده و مانع فعالیت آن خواهند شد.

بحث و نتیجه‌گیری: لینالول و تیمول بر فعالیت نداشتن پروتئین orf1ab ویروس SARS-CoV-2 مؤثر بوده‌اند، هرچند برای اثبات این قضایا، باید تست بالینی خاصیت درمانی لینالول و تیمول انجام و در صورت تائید، استفاده از آن پیشنهاد شود. ضمناً با بررسی شاخص dN/dS، شاخص D و ارزیابی سینگلتن‌ها، دومین‌ها و مناطق حفاظت‌شدهٔ همهٔ ویروس‌ها مشخص شد که ویروس SARS-CoV-2 نمی‌تواند ساختگی باشد.

واژه‌های کلیدی: زنیان، تشنه‌داری، آویشن، کووید-۱۹

* نویسنده مسئول: گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران-گروه بیوتکنولوژی و به نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

Email: bfazeli@uoz.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

مقدمه

یکی از علل نام‌گذاری ویروس‌های عامل حاد تنفسی به نام کرونا، حضور اشکال تاج (کرونا) مانند بر روی سطح ویروس است که به کروناویروس معروف شده‌اند و این ویروس‌ها جزء ویروس‌های پوشش‌دار، یکپارچه (non-segmented) و با منشأ جانوری بوده؛ اما گزارش‌شده که خفاش‌ها مخازن طبیعی بیشتر کروناویروس‌ها ازجمله SARS هستند (۱). ویروس برونشیت عفونی مرغی (IBV) اولین کروناویروس جداشده از مرغ‌های خانگی بود و در دههٔ ۱۹۳۰ تکثیر شد که علاوه بر بیماری تنفسی و گوارشی (که می‌تواند مرغ‌ها را در اثر عفونت‌های احتمالی باکتریایی ثانویه بکشند)، بعضی از سویه‌های آن نیز سبب نفریت (Nephrite) می‌شوند (۲). از سویی، شواهدی مبنی بر وجود coronaviruses در بافت‌های گرفته‌شده از بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس (MS) وجود دارد (۳)؛ همچنین برخی از دیگر ویروس‌های کرونا مانند ویروس‌های هپاتیت موش (MHV) و ویروس انسفالومیلیتیت هموگلوتین کنندهٔ خوک (HEV)، جزو علل شناخته‌شدهٔ بیماری‌های عصبی هستند (۴)؛ اما در کل، مهم‌ترین تأثیر کروناویروس‌ها بر سیستم تنفسی و گوارشی است.

کروناویروس‌های گوناگونی ازجمله coronavirus گاو (BCV)، کروناویروس بوقلمون (TCV؛ ویروس bluecomb)، کروناویروس گربه (FCV)، کروناویروس سگ (CCV) و ویروس اسهال اپیدمی خوک (PEDV) شناسایی شده‌اند که مسئول تعدادی از بیماری‌های مهم اقتصادی ازجمله ابتلا به آنتریت هستند (۲). یکی دیگر از ویروس‌های عامل سندرم تنفسی حاد شدید (SARS) معروف به SARS-CoV است که در سال ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۳ در جنوب چین پدیدار شد (۱). با آنکه تاکنون هفت کروناویروس انسانی کشف شده است که آخرین نوع آن‌ها، در دسامبر ۲۰۱۹ در شهر ووهان چین با همه‌گیری در انسان شیوع پیدا کرده است (۵)؛ اما انسان‌ها، بیشتر توسط دو نوع کروناویروس به نام‌های HCoV-OC43 و HCV-2293 آلوده می‌شوند که هر دو عامل سرماخوردگی هستند (۲).

در اوایل شناسایی کروناویروس‌ها، از آنالیز سرولوژیکی برای تمایز گونه‌ها استفاده می‌شد و نشان دادند که می‌توان آن‌ها را به چهار گروه (آلفا، بتا، گاما و دلتا) تقسیم کرد؛ همچنین حدود ۳۰ نوع کروناویروس در انسان، پستانداران و پرندگان مشترک است که کروناویروس‌های انسانی (MCOV-EMC) از نوع آلفا و بتا گزارش‌شده‌اند (۶). با تجزیه‌وتحلیل آنتی‌بادی مونوکلونال، تعیین توالی نوکلئوتیدها و گروه‌های پروتئینی مشابه، بدون در نظر گرفتن توالی پروتئین ساختاری و مشخص شدن ارتباط نزدیک میان گونه‌ها و تقسیمات گروهی ویروس‌های گوناگون مانند TCV و BCV، ویروس‌های کرونا را در سه گروه طبقه‌بندی کردند (۷). بعدها کروناویروس‌ها را متعلق به یک جنس Coronavirus و خانوادهٔ Coronaviridae برشمردند[۸]. Coronaviridae یک ربع قرن در یک خانوادهٔ تک‌ژنتیکی باقی‌مانده بود تا آنجا که مشاهدات فراوانی نشان می‌داد که بسیاری از ویژگی‌هایی که تصور می‌شد از ویژگی‌های Coronaviridae باشد، به همان اندازه به جنس Torovirus نیز مربوط می‌شده است که به‌طور رسمی به یک خانواده اختصاص یافته بود (۲)؛ اما در سال ۱۹۹۳، کمیتهٔ بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها (ICTV) به‌طور رسمی Coronaviridae را گسترش داد تا Torovirus را نیز شامل شود (۹).

جمع شدن Coronavirus و Torovirus در یک خانواده، پایان داستان طبقه‌بندی نبود و از سویی انتظار می‌رفت که Arteriviridae بر اساس ساختار و استراتژی‌های رونویسی و ترجمه، به Coronaviridae بپیوندد[۷]؛ اما تفاوت‌های اساسی در اندازهٔ ژنوم و پروتئین‌های ساختاری مانع ورود Arteriviruses به Coronaviridae شده است. Arteriviruses ها به علت داشتن یک هستهٔ RNP (ribonucleoprotein) با حلقهٔ آکوسوئیدال (icosahedral) متفاوت از سایر کروناویروس‌ها و تورویروس‌ها، در یک جنس جداگانه قرار گرفتند (۱۰)؛ اما کشف‌های اخیر حلقهٔ آکوسوئیدال (icosahedral) در کروناویروس‌ها (۱۱) این تمایز را تار کرده و درنهایت، آخرین تقسیم‌بندی در سال ۲۰۱۹ صورت گرفت و کروناویروس‌ها را به یک خانواده (Coronaviridae)، دو زیرخانواده (Letovirinae و

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

Orthocoronavirinae)، پنج جنس (جنس Alphaletovirus از زیرخانوادهٔ Letovirinae و جنس‌های Alphacoronavirus، Betacoronavirus، Deltacoronavirus و Gammacoronavirus از زیرخانوادهٔ Orthocoronavirinae)، ۲۶ زیرجنس و ۴۶ گونه تقسیم کردند (۱۲).

ماهیت ژن بیشتر کرونا‌ویروس‌ها، RNA بدون قطعه، تک‌رشته و دارای رشتهٔ مثبت است. اندازهٔ آن‌ها بین ۲۷ تا ۳۲ کیلوباز بوده که در مقایسه با سایر ویروس‌های RNA بسیار چشمگیر است. ژن پلیمراز کروناویروس با اندازهٔ ۲۰ تا ۲۲ کیلوباز به‌تنهایی، تقریباً به‌اندازهٔ کل ژنوم پیکورناویروس (تقریباً با ۸ کیلوباز) است. ژن رمزگذاری‌شدهٔ گلیکوپروتئین آن سطح بزرگی تا ۴/۴ کیلوباز داشته که پروتئینی کاملاً گلیکوزیله‌شده و محکم را رمزگذاری و ویروسی با ظاهری تاج مانند، حدود ۲۰ نانومتر را در بر گرفته و کپسوله می‌کند. ژن‌های کرونا‌ویروس‌ها از دو نوع (ساختاری و عملکردی) تشکیل شده که در زمان شناسایی گمان می‌کردند که ژن‌های ساختاری مهم نیست؛ اما بعدها مشخص شد که حتی نقش این ژن‌ها در بیماری‌زایی نیز اثبات شده است. سوپرخانوادهٔ پلی‌پروتئین NSP13 و SUD-M در کرونا‌ویروس‌ها، عملکردی متیل ترانسفرازی دارد و ناحیهٔ cap-1 از mRNA را از دسترس نوکلئازها خارج و طول عمر mRNA یعنی همان کروناویروس‌ها را بیشتر می‌کند (۲).

در انتهای سال ۲۰۱۹، چندین نفر در شهر ووهان چین به یک ذات‌الریهٔ غیرمعمول مبتلا شدند که آشکار گشت عامل آن، یک نوع بتا کروناویروس با نام علمی SARS-CoV-2است و بیماری حاصل از آن را Covid19 نامیدند[۶]. نرخ مرگ‌ومیر ناشی از SARS-CoV-2 (۴/۳ درصد گزارش‌شده) بسیار پایین‌تر از سایر کروناویروس‌ها نظیر SARS و MERS و ویروس‌های دیگری نظیر HIV و ابولاست. SARS-CoV-2 سومین بیماری شناخته‌شدهٔ مشترک انسان و حیوان، پس از SARS و سندرم تنفسی خاورمیانه (MERS) است که این دو نیز به دستهٔ بتای کرونا‌ویروس تعلق دارند (۵). علائم اولیهٔ SARS-CoV-2 شامل پنومونی، تب، دردهای عضلانی و خستگی است. در حال حاضر با توجه به نبود درمان و واکسن مؤثر، بهترین راه برای مقابله با این بیماری، اجتناب از آلودگی و جلوگیری از انتشار آن از راه اقدامات محافظتی و بهداشت شخصی بیان‌شده است (۵).

بشر از بدو خلقت، گیاهان دارویی مصرف می‌کرد، به‌طوری‌که پس از تأمین نیازهای اولیه خود، در اثر مواجهه با بیماری‌های ساده تا مزمن، از گیاهان برای تسکین و بهبود خود بهره می‌گرفت و گیاهان سمی را از گیاهان غیرسمی تفکیک می‌نمود (۱۳). یکی از مشکلات صنعت غذا و دارو، گسترش سویه‌های میکروبی مقاوم به داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها است و بعدها به علت خاصیت سمی و سرطان‌زایی ترکیبات شیمیایی و سنتزی، استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌های مزمن (مثل سرطان) توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف کرد و ازاین‌رو، استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی طبیعی مانند اسیدهای آلی، اسانس (عطرمایه)ها و عصاره‌های گیاهی می‌توانند جایگزین مناسب و ایمنی در مواد غذایی باشند (۱۵ ، ۱۴).

مطالعات در داخل و خارج از کشور دربارهٔ تهیهٔ واکسن و دارو آغاز شده؛ لذا با توجه به سابقهٔ استفاده از تشنه‌داری (Scrophularia striata) به صور گوناگون برای درمان بیماری‌های متفاوت ازجمله التهاب و عفونت چشم و گوش، سوختگی‌های پوستی، زخم‌های عفونی، سرماخوردگی، هموروئید، کورک، ضدعفونی مجاری اداری و گوارشی (۱۶) و همچنین اثر ضدعفونی (۱۷)، درمان کیست (۱۸)، ضد میکروبی، ضد اسپاسم و قارچ‌کش (۱۹) و ضد باکتریایی عطرمایهٔ زنیان (Trachyspermum ammi) بر باکتری‌های Streptococcus haemolyticus، Staphylococcus aureus، Corynebacterium diphtheria، Proteus vulgaris، Klebsiella و Escherichia Coli و باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (۲۰) و اینکه به‌صورت سنتی از آن در درمان بیماری‌های تنفسی در منطقهٔ سیستان استفاده می‌شود (۲۲، ۲۱) ؛ درنتیجه، در این تحقیق سعی شد ابتدا ژنوم ویروس SARS-CoV-2 با سایر ویروس‌های خانوادهٔ

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

کروناویروس (Coronaviridae) مقایسه و تجزیه‌وتحلیل شود و سپس احتمال ساختگی و بیوتروریستی بودن آن بررسی گردد و درنهایت، آنالیز بیوانفورماتیکی لینالول (linalool) (مهم‌ترین مواد تشکیل‌دهندهٔ عطرمایهٔ تشنه‌داری با میزان ۱۸/۳ درصد) (۲۳) و تیمول (thymol) (مهم‌ترین مادهٔ زنیان با حدود ۵۰ درصد عطرمایه) (۲۴) بر عدم فعالیت پروتئین orf1ab کروناویروس SARS-CoV-2 بررسی شود.

مواد و روش‌ها

توالی ژنوم ویروس‌های خانوادهٔ Coronaviridae از پایگاه NCBI (http://ncbi.nlm.nih.gov) تهیه (جدول شمارهٔ ۱)، ساختار ژنوم ویروس SARS-CoV-2 با استفاده از نرم‌افزار SnapGene (from Insightful Science; available at snapgene.com) طراحی (شکل شمارهٔ ۱)، اطلاعات همهٔ ژنوم‌ها با استفاده از نرم‌افزار R بررسی، سپس همهٔ توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega6 و روش ClustalW هم‌ردیف شدند. پس از هم‌ردیف کردن، مقایسهٔ توالی‌ها و اطلاع از فراسنجه‌های (پارامترهای) ژنتیکی از قبیل تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، تعداد جایگاه‌هایی که در آن‌ها جایگزینی مشابه اتفاق افتاده و همچنین تنوع آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Dnasp5 انجام گردید. خوشه‌بندی بر اساس روش Neighbor Joining (مقادیر Bootstrap به‌وسیلهٔ ۵۰۰ بار نمونه‌گیری مجدد به دست آمد) و همچنین تعیین شباهت و فاصلهٔ ژنتیکی با استفاده روش نی و لی (Nei and Li) (۲۵) از نرم‌افزار Mega vol.6 صورت پذیرفت. جانشینی نوکلئوتیدی از روش حداکثر درست‌نمایی، بر اساس الگوی Tamura-Nei model، به‌صورت میزان جانشینی‌های نوع انتقالی (Transition) و متقاطع (Transversionsal) در بازهای پورینی و پیریمیدینی محاسبه شد. بررسی تغییرات نوکلئوتیدی که سبب تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (dN)، نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسیدآمینهٔ حاصله نداشته‌اند (dS)، روش مفید و بسیار کارآمدی برای تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها است. مقادیر d_N و d_S به ترتیب با استفاده از روابط زیر قابل‌محاسبه هستند.

$$d_N = -3/4Ln(1 - 4/3P_N)$$
$$d_S = -3/4Ln(1 - 4/3P_S)$$

در این روابط، P_N نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی، نامشابه و P_S نیز نسبت به جایگاه‌های دارای جایگزینی، مشابه است. معنادار بودن مقدار عددی d_N/d_S با آزمون فیشر در سطح احتمال ۵ درصد، با استفاده از نرم‌افزار Dnasp vol.5 انجام شد.

پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین orf1ab و بررسی دقت الگوی پیش‌بینی‌شده با استفاده از SWISS-MODEL انجام گردید. برای ارزیابی ساختار و کیفیت شیمی فضایی دو مدل طبیعی و جهش‌یافته، از نقشه‌های راماچاندران و سرور Pro-SA استفاده شد. سرور Pro-SA کیفیت مدل تولیدشده را با محاسبه Z-score بیان می‌کند. Z-score معیاری است که کیفیت کلی مدل را نشان می‌دهد.

موتیف‌های حفاظت‌شده برای ژن orf1ab در همهٔ ویروس‌های خانواده Coronaviridae، با استفاده از برنامهٔ Multiple Em for Motif Elicitation (MEME; version4.8) در سراچهٔ (http://meme.nbcr.net/meme/meme.html) جستجو شد. پارامترهایی که در آنالیز MEME به کار گرفته شدند؛ عبارت‌اند از: کمترین و بیشترین اندازه برای هر موتیف به ترتیب ۶ و ۳۰۰، حداکثر تعداد موتیف‌های جستجو شده ۱۰ و تعداد تکرار برای هر توالی ۱ است. دومین‌های غشایی، سیتوپلاسمی و کینازی در orf1ab ویروس SARS-CoV-2، با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Phobius بررسی شد. دومین‌های حفاظت‌شدهٔ orf1ab ویروس SARS-CoV-2 با استفاده از نرم‌افزار CDART محاسبه گردید.

از پروتئین لینالول (مهم‌ترین مادهٔ گیاه تشنه‌داری) گیاه مدل یعنی آرابیدوپسیس و ماده فیتوشیمیایی تیمول (Thymol) (مهم‌ترین مادهٔ گیاه زنیان با حدود ۵۰ درصد عطرمایه) استفاده و سپس آنالیز بیوانفورماتیکی آن‌ها (داکینگ مولکولی) بر عدم فعالیت پروتئین orf1ab کرونا‌ویروس SARS-CoV-2 بررسی شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

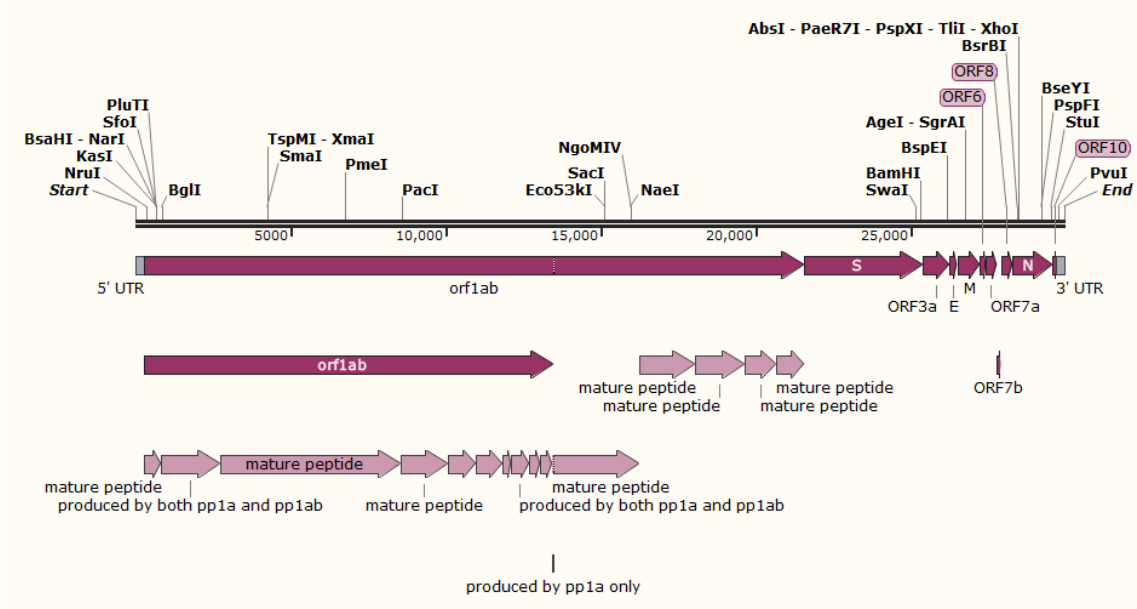
[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

برای تعیین ساختار سوم و همچنین داکینگ مولکولی بر اساس همولوژی، از نرم‌افزار Swiss-Model و ESYPred3D و همچنین Galaxy Web استفاده گردید. برای تجسم این مدل از نرم‌افزار Weblab ViewerLite 4 و RASmol 2.5.7 (http://rasmol.org) و UCSF Chimera بهره گرفته شد. ارزیابی کیفیت استروکیمیکال ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها به‌وسیلهٔ آنالیز PROCHECK (http://wwwebi.ac.uk/pdbsum/procheck) صورت گرفت و نمودار راماچاندران مربوط به ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها رسم گردید؛ سپس نرم‌افزار آنلاین Plantcare (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html) برای یافتن عناصر تنظیمی موجود در ناحیهٔ پروموتور ژن‌ها به‌کار گرفته شد.

یافته‌های پژوهش

ژنوم SARS-CoV-2 (NC_045512) ۲۹۹۳۰ باز، ۱۱ ژن، ۱۲ پروتئین و GC برابر با ۳۸ درصد دارد (شکل شمارهٔ ۱ و جدول شمارهٔ ۱). با توجه به میانگین تعداد ژن (۸/۲۶)، تعداد پروتئین (۸/۵)، درصد GC (۳۹/۲۴ درصد) و اندازهٔ ژنوم (۲۸/۹۴ کیلو باز) در میان همهٔ ویروس‌های خانوادهٔ Coronaviridae، ویروس SARS-CoV-2 از لحاظ بیشترین صفات، اندازهٔ بزرگی دارد و بر اساس آزمون نرمال بودن داده‌ها مشخص شد که ویروس SARS-CoV-2 از لحاظ همهٔ صفات، در محدودهٔ نرمال بود و جزء ویروس‌هایی با اندازهٔ خارج از محدودهٔ نرمال و یا به‌اصطلاح دادهٔ پرت نیست.

توالی‌های ارائه‌شده برای DNA و پروتئین همهٔ ویروس‌های کرونای خانوادهٔ Coronaviridae از سراچهٔ NCBI تهیه و سپس از لحاظ شاخص dN/dS، مناطق حفاظت‌شده، موتیف‌ها (در محدودهٔ ۶ تا ۳۰۰ بازی) و دومین‌ها بررسی شد و آشکار گردید که همهٔ ویروس‌های خانوادهٔ Coronaviridae موتیف‌های کاملاً حفاظت‌شده و یکسان دارند (شکل شمارهٔ ۲). می‌توان نتیجه گرفت که این ویروس‌ها چون موتیف‌های شبیه به همدیگری دارند، بایستی عملکردی شبیه به هم نیز داشته باشند.



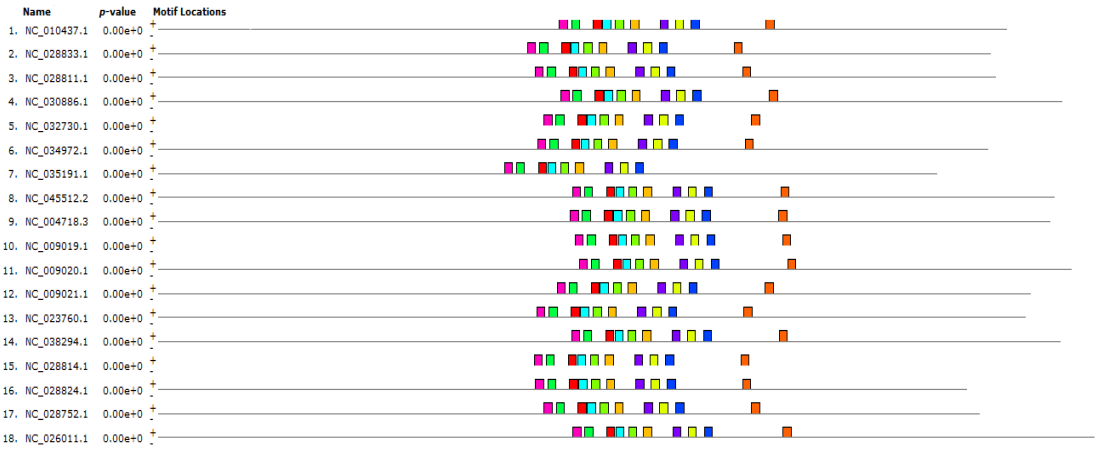
شکل شمارهٔ ۱. ژنوم ویروس SARS-CoV-2 به همراه موقعیت ژن‌ها و نوع و نواحی آنزیم‌های برش مؤثر بر ژنوم

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

جدول شمارهٔ ۱. انواع ویروس‌های کرونا به همراه نام، مد دسترسی، اندازهٔ ژنوم، تعداد ژن و تعداد پروتئین

RefSeq	INSDC	اندازه ژنوم (Kb)	GC%	تعداد پروتئین	تعداد ژن	نام ویروس‌ها
NC_028833.1	KJ473809.1	۲۷/۷۸	۴۱/۸	۶	۶	BtNv-AlphaCoV/SC2013
NC_028811.1	KJ473806.1	۲۷/۹۴	۴۱	۶	۶	BtMr-AlphaCoV/SAX2011
NC_030886.1	KU762338.1	۳۰/۱۶	۴۵/۳	۱۰	۱۰	Rousettus bat coronavirus
NC_032730.1	KF294380.2	۲۸/۷۶	۴۰/۲	۵	۵	Lucheng Rn rat coronavirus
NC_034972.1	KX964649.1	۲۷/۶۸	۴۱/۱	۹	۹	Coronavirus AcCoV-JC34
NC_035191.1	KY967717.1	۲۶	۳۲	۵	۵	Wencheng Sm shrew coronavirus
NC_010437.1	EU420138.1	۲۸/۳۳	۳۸/۱	۷	۶	Miniopterus bat coronavirus 1
NC_045512.2	MN908947.3	۲۹/۹	۳۸	۱۲	۱۱	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
NC_004718.3	AY274119.3	۲۹/۷۵	۴۰/۸	۱۴	۱۳	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus
NC_009019.1	EF065505.1	۳۰/۲۹	۳۷/۸	۹	۹	Tylonycteris bat coronavirus HKU4
NC_009020.1	EF065509.1	۳۰/۴۸	۴۳/۲	۹	۹	Pipistrellus bat coronavirus HKU5
NC_009021.1	EF065513.1	۲۹/۱۱	۴۱	۸	۸	Rousettus bat coronavirus HKU9
NC_023760.1	HM245925.1	۲۸/۹۴	۳۷/۵	۱۰	۱۰	Mink coronavirus 1
NC_038294.1	KC164505.2	۳۰/۱۱	۴۱/۲	۱۰	۹	Middle East respiratory syndrome-related coronavirus
NC_028814.1	KJ473807.1	۲۷/۶۱	۳۸/۳	۷	۷	BtRf-AlphaCoV/HuB2013
NC_028824.1	KJ473808.1	۲۶/۹۸	۳۷/۸	۶	۶	BtRf-AlphaCoV/YN2012
NC_028752.1	KT368907.1	۲۷/۴	۳۸/۴	۷	۷	Camel alphacoronavirus
NC_026011.1	KM349742.1	۳۱/۲۵	۴۰/۱	۱۰	۱۰	Betacoronavirus HKU24
NC_025217.1	KF636752.1	۳۱/۴۹	۴۱/۳	۹	۹	Bat Hp-betacoronavirus/Zhejiang2013
NC_022103.1	KF430219.1	۲۸/۰۴	۴۰/۸	۷	۷	Bat coronavirus CDPHE15/USA/2006
NC_019843.3	JX869059.2	۳۰/۱۲	۴۱/۲	۱۱	۱۰	Human betacoronavirus 2c EMC/2012
NC_018871.1	JQ989270.1	۲۸/۴۹	۳۸/۵	۹	۹	Rousettus bat coronavirus HKU10
NC_017083.1	JN874559.1	۳۱/۱	۳۷/۶	۱۱	۱۱	Rabbit coronavirus HKU14
NC_010646.1	EU111742.1	۳۱/۶۹	۳۹/۲	۱۴	۱۴	Beluga whale coronavirus SW1
NC_010438.1	EU420139.1	۲۸/۷۷	۴۱/۸	۸	۷	Miniopterus bat coronavirus HKU8
NC_009988.1	EF203064.1	۲۷/۱۷	۳۹/۳	۸	۸	Rhinolophus bat coronavirus HKU2
NC_009657.1	DQ648858.1	۲۸/۲	۴۰/۱	۶	۶	Scotophilus bat coronavirus 512
NC_006577.2	AY597011.2	۲۹/۹۳	۳۲/۱	۸	۸	Human coronavirus HKU1
NC_005831.2	AY567487.2	۲۷/۵۵	۳۴/۵	۶	۶	Human coronavirus NL63
NC_002645.1	AF304460.1	۲۷/۳۲	۳۸/۳	۸	۷	Human coronavirus 229E



شکل شمارهٔ ۲. تعداد، نوع و موقعیت موتیف‌ها در ژنوم همهٔ ویروس‌های خانوادهٔ کرونا ارائه‌شده در سراچهٔ NCBI

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

دومین‌های ژنوم SARS-CoV-2 بررسی و مشخص شد که ۱۱ دومین حفاظت‌شده دارد. از سویی، این ویروس ۱۱ ژن نیز دارد؛ همچنین با توجه به اینکه ژنوم ویروس SARS-CoV-2، از نوع RNA است و از طرفی، طول عمر هر نوع RNA وابسته به عوامل گوناگونی ازجمله کلاهک و دم پلی A هست؛ بنابراین، حضور دومین‌های NSP13 super family و SUD-M super family (جدول شمارهٔ ۲) در ژنوم ویروس SARS-CoV-2 نشان‌دهندهٔ توانایی و تلاش این ویروس برای پایداری بیشتر است؛ همچنین یکی از راه‌های طراحی و ساخت دارو علیه ویروس SARS-CoV-2، از کار انداختن پروتئین دومین‌های سازندهٔ کلاهک و یا دم پلی A است تا ژنوم ویروس توسط آنزیم‌های نوکلئازی بدن میزبان تجزیه شود. افزون بر این، حضور دومین Nsp3_PL2pro super family در ویروس SARS-CoV-2 (NC_045512) و قرار گرفتن این ویروس در کنار ویروس SARS (NC_004718)، در تجزیهٔ خوشه‌ای انجام‌شده (شکل شمارهٔ ۴)، نشان‌دهندهٔ شباهت این دو ویروس نسبت به همدیگر است؛ همچنین مشخص شد که ویروس کرونای SARS-CoV-2 از ویروس سارس کوچک‌تر و ویروس سارس نیز از بتا کرونا‌ویروس (NC_025217.1) کوچک‌تر است.

بر اساس شباهت میان SARS-CoV-2 و سارس، پروتئین حاصل از همهٔ orfهای این دو ویروس باهم مقایسه و مشخص شد که orfهای ۸، ۶ و ۱۰ دو ویروس بسیار باهم متفاوت هستند (شکل شمارهٔ ۵)؛ اما orf شمارهٔ ۱۰ ویروس SARS-CoV-2 بزرگ‌تر و بسیار متفاوت با ویروس سارس است. orf1ab این دو ویروس نیز اختلافاتی دارد؛ اما این orf آن‌قدر بزرگ است که دست‌کاری آن قابل پیش‌بینی نیست و از سویی، پژوهشگران معمولاً در دست‌کاری‌های ژنتیکی سراغ پروتئین‌هایی با توالی کمتر می‌روند؛ درنتیجه، اگر در زمینهٔ بیوتروریسم اتفاقی هم افتاده باشد، باید برای این نوع orf و یا از این دسته orfها اتفاقاتی افتاده باشد و چون هنوز برای این نوع orf نیز عملکردی شناخته‌نشده؛ بنابراین، ارائهٔ هر نوع نتیجه‌گیری دربارهٔ دست‌کاری این قبیل orfها نیازمند بررسی‌های بیشتر است.

تجزیهٔ خوشه‌ای ویروس‌های خانوادهٔ Coronaviridae (شکل شمارهٔ ۴) نشان داد که بعضی از ویروس‌ها بر اساس میزبانی که از آن شناسایی شده‌اند، در گروه جداگانه‌ای قرار گرفته‌اند (مانند ویروس‌های جداسازی‌شده از خفاش‌ها)؛ اما در مجموع، بیشتر ویروس‌ها بر اساس میزبانی که از آن شناسایی شده‌اند، جدا نشده‌اند. چون کروناویروس‌ها به‌ویژه بتا کروناویروس‌ها از میزبان‌های بسیاری جدا شده‌اند؛ بنابراین، جدا نشدن بر اساس میزبان شناسایی‌شده می‌تواند به علت تروپیسم بالای ویروس در اثر شباهت گیرنده و لیگاند باشد و یا در حقیقت، میزبان اصلی این ویروس‌ها متفاوت از موجودی بوده که از آن شناسایی‌شده است.

کمترین فاصلهٔ ژنتیکی (۰/۰۰۳) میان کروناویروس مدیترانه (NC_019843.3) و بتا کروناویروس انگلستان (NC_038294.1) و بیشترین فاصلهٔ ژنتیکی (یک) میان بتا کروناویروس سویهٔ HKU24 (NC_026011.1) و BtMr-AlphaCoV/SAX2011 (NC_028811.1) مشاهده شده و میانگین فاصلهٔ ژنتیکی برابر با ۰/۷۸ است که فاصلهٔ نسبتاً فراوانی میان همهٔ ویروس‌ها است. با توجه به نتایج تجزیهٔ خوشه‌ای و همچنین ماتریس فاصلهٔ ژنتیکی میان ویروس‌های کرونا، می‌توان نتیجه گرفت که هرکدام از این ویروس‌ها، خود ساختار متفاوتی دارند و امکان اینکه در اثر جهش و نوترکیبی و یا هر عامل دیگر از همدیگر به‌دست‌آمده باشند، اندک است.

با توجه به قرار گرفتن ویروس‌های NC_045512.2 (SARS-CoV-2)، NC_004718.3 (سارس) و NC_025217.1 (بتا کروناویروس ژجیان) در یک شاخه، orf1ab ژنوم SARS-CoV-2 با هر دو ژنوم سارس و بتا کروناویروس ژجیان بررسی شد.

در بررسی orf1ab ویروس SARS-CoV-2 با سارس مشخص شد که در مجموع، ۲۱۲۷۳ جایگاه (۲۱۱۶۲ جایگاه حذف و اضافه، ۴۲۳۲ جایگاه پلی‌مورف، ۱۶۹۳۴ جایگاه مونومورف و ۱۰۷ جایگاه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

بدون حذف و اضافه)، ۴۲۳۲ سینگلتن و ۲ هاپلوتیپ (شاخص و واریانس تنوع هاپلوتیپی به ترتیب برابر با یک و ۰/۲۵ بود) میان آن‌ها وجود داشته است؛ همچنین ۱۴۳ منطقهٔ حفاظت‌شده با طول ۱۱۷۸۲ باز (از ۲۱۱۸۰ باز کل orf1ab) داشتند و تنوع نوکلئوتیدی میان آن‌ها نیز برابر با ۰/۲۵ بود.

در بررسی orf1ab ویروس SARS-CoV-2 با بتا کروناویروس ژجیان مشخص شده که درمجموع ۲۱۸۲۰ جایگاه (۲۱۱۳۴ جایگاه حذف و اضافه، ۸۳۴۶ جایگاه پلی‌مورف، ۱۲۷۸۸ جایگاه مونومورف و ۶۸۶ جایگاه بدون حذف و اضافه)، ۸۳۴۶ سینگلتن و ۲ هاپلوتیپ (شاخص و واریانس تنوع هاپلوتیپی به ترتیب برابر با یک و ۰/۲۵ بود) میان آن‌ها وجود داشته است و نیز ۴۰ منطقهٔ حفاظت‌شده با طول ۸۹۵۲ باز (از ۲۱۱۸۰ باز کل orf1ab) داشتند و تنوع نوکلئوتیدی میان آن‌ها نیز برابر با ۰/۲۵ بود.

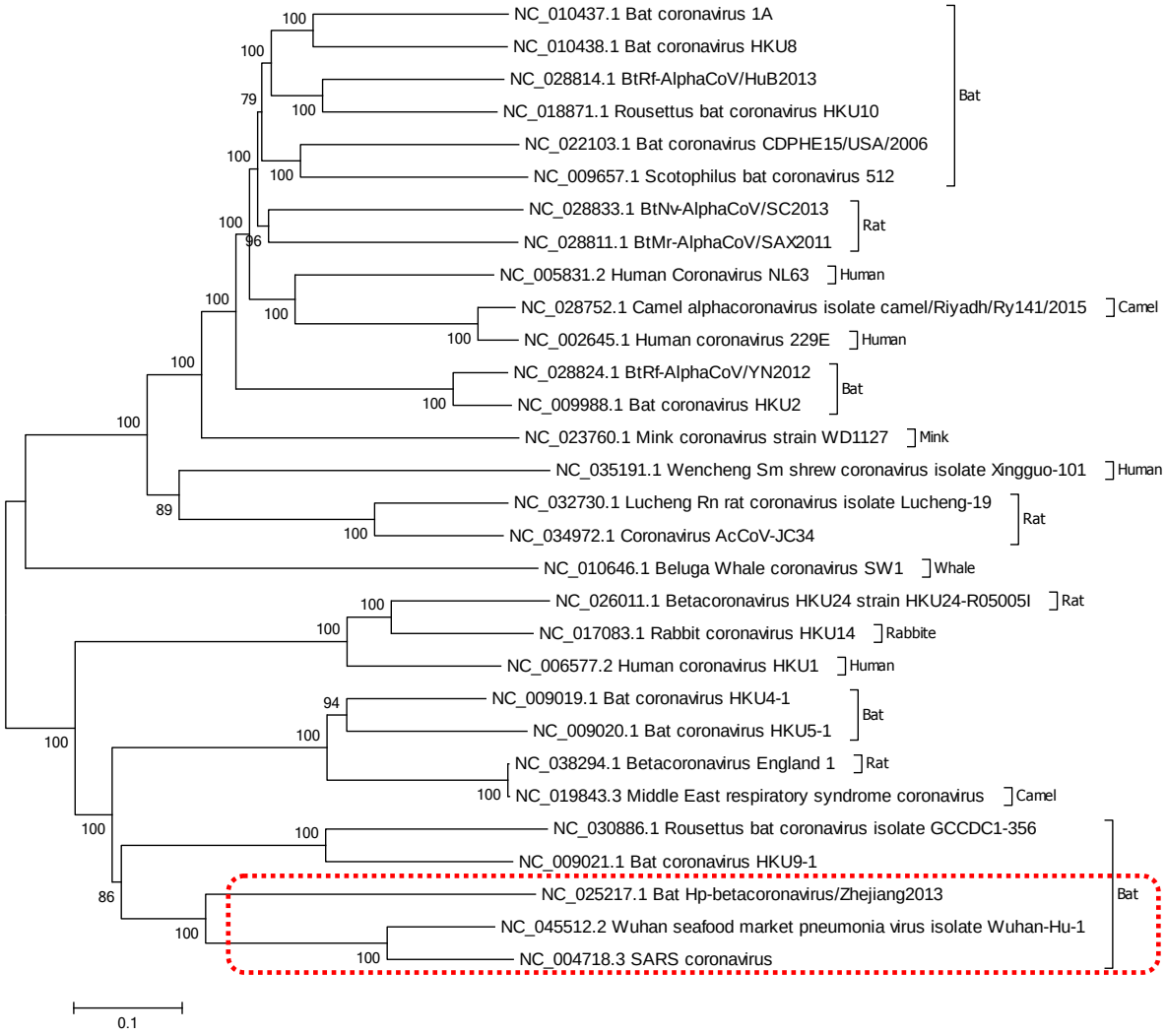
با بررسی orf1ab ویروس‌های NC_045512.2 (SARS-CoV-2)، NC_004718.3 (سارس) و NC_025217.1 (بتا کروناویروس ژجیان) مشخص شد که به دست آمدن ویروس کرونای SARS-CoV-2 از ویروس سارس و یا بتا کروناویروس ژجیان، در مدت‌زمان کم امکان‌پذیر نیست.

جدول شمارهٔ ۲. نوع و کارکرد دومین‌های حفاظت‌شده در orf1ab در ویروس SARS-CoV-2 (NC_045512)

Name	Accession	کارکرد	محدوده (bp)	E-value
NSP11 super family	cl05798	این منطقه از پلی‌پروتئین‌های کروناویروس، پروتئین NSP11 را کدگذاری می‌کند.	۴۴۹۸-۴۰۸۷	۱/۱۱e-۸۴
Corona_RPol_N super family	cl05803	این خانواده ناحیهٔ N ترمینال RNA پلیمراز چسبیده به کروناویروس را تحت پوشش قرار می‌دهد.	۳۲۴۱-۲۹۹۵	۲/۰۵e-۴۳
NSP13 super family	cl20156	این خانواده منطقهٔ NSP13 پلی‌پروتئین کروناویروس را در بر می‌گیرد. این پروتئین عملکرد پیش‌بینی‌شده‌ای از عملکرد متیل ترانسفراز mRNA cap-1 دارد.	۴۸۸۳-۴۶۷۷	۸/۱۴e-۴۱
Peptidase_C30 super family	cl05132	این دومین با خانوادهٔ Merops C30 مطابقت دارد. این پپتیدازها در تکثیر پلی‌پروتئین ویروسی نقش دارند.	۲۴۱۴-۲۲۲۶	۱/۰۴e-۲۷
NSP10 super family	cl09649	پروتئین غیرساختاری ۱۰ (NSP10) در ترکیب RNA نقش دارد. این ماده به‌عنوان یک پروتئین سنتز می‌شود که در آن، شکاف پروتئین‌های غیرساختاری ایجاد می‌گردد.	۲۹۸۲-۲۸۹۳	۱/۱۷e-۲۰
SUD-M super family	cl13138	این خانواده از پروتئین‌ها Nsp3c را تشکیل می‌دهند که محصول ORF1a در گروه ۲ کروناویروس است.	۹۷۳-۸۸۱	۵/۳۸e-۱۷
nsp8 super family	cl07366	پروتئین غیرساختاری ۸، یک ابرکمپلکس هگزادکامری با nsp7 را تشکیل می‌دهد که یک ساختار شبیه سیلندر توخالی را اتخاذ می‌کند. ابعاد کانال مرکزی و خصوصیات الکترواستاتیک مثبت سیلندر حاکی از آن است که این فرایند به پلیمراز RNAوابسته به RNA اعطا می‌کند.	۲۸۰۱-۲۶۷۸	۱/۵۳e-۱۵
Viral_protease super family	cl09459	این خانواده از پروتئازهای ویروسی شبیه به پروتئیناز پاپائین هستند و برای پردازش پروتئولیتیک پلی‌پروپئین‌های ماکت موردنیاز هستند. ساختار این پروتئین نشان داده است که برابر مشابهی از آنزیم‌های کاهش‌دهنده جذب می‌کند.	۱۲۳۸-۱۰۱۵	۲/۸۲e-۱۰
Corona_NSP4_C super family	cl24800	NSP4 پروتئینی است که در فرایندهای غشایی نقش دارد و مجتمع ونویسی ویروسی (RTC) را به غشاهای شبکهٔ آندوپلاسمی وصل می‌کند. این حوزه، عمدتاً آلفا-مارپیچ، ممکن است در تعامل پروتئین-پروتئین نیز نقش داشته باشد.	۲۱۹۴-۲۱۵۳	۸/۲۵e-۰۶
nsp9 super family	cl07363	nsp9 یک پروتئین ویروسی متصل به RNA تک‌رشته‌ای است که احتمالاً در ترکیب RNA نقش دارد. ساختار آن شامل یک بشکه بتا است.	۲۸۸۰-۲۸۰۸	۵/۷۱e-۰۵
Nsp3_PL2pro super family	cl13549	این دومین در SARS یافت می‌شود و طول آن حدود ۷۰ اسید آمینه است. به علت خاصیت پلی‌پروتئین، با دیگر پروتئین‌های کروناویروس همراه است. دومین PL2pro یک پروتئین غیرساختاری nsp3 است. این دومین، سه شکاف موردنیاز برای جدا کردن پروتئین ترجمه‌شده در پروتئین‌های مجزا خود را انجام می‌دهد.	۱۰۰۲-۹۷۴	۴/۷۷e-۰۳

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

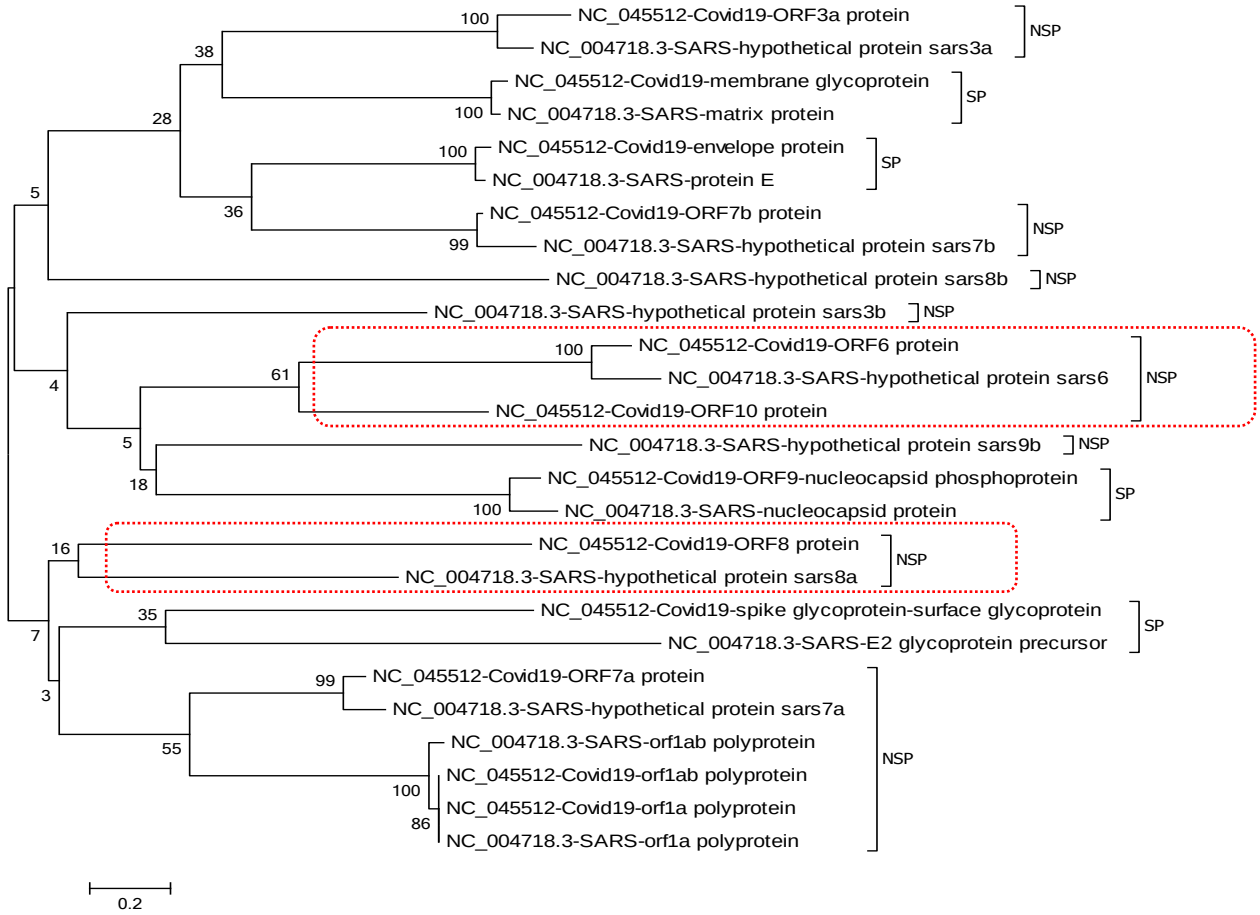
[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]



شکل شمارهٔ ۴. تجزیهٔ خوشه‌ای حاصل از ژنوم ویروس‌های خانواده Coronaviridae بر اساس ماتریس فاصله نی و لی (Nei and Li) و روش NJ در نرم‌افزار Mega vol.6

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]



شکل شمارهٔ ۵. تجزیهٔ خوشه‌ای حاصل از همهٔ orfهای ویروس‌های SARS-CoV-2 و سارس بر اساس ماتریس فاصلهٔ نی و لی (Nei and Li) و روش NJ در نرم‌افزار Mega vol.6

نتایج محاسبات شاخص‌های ژنتیکی بر اساس جایگاه‌های نوکلئوتیدی: بر اساس مقایسهٔ توالی ژنوم ویروس‌های خانوادهٔ Coronaviridae با کمک نرم‌افزار Dnasp، درمجموع ۳۴۸۴۱ جایگاه شناسایی شد که از این تعداد، ۲۰۰۵۷ جایگاه حذف و اضافه (۱۷۴۱۹ جایگاه پلی‌مورف، ۲۶۳۸ جایگاه مونومورف) داشتند و ۱۴۸۲۴ جایگاه، بدون حذف و اضافه بودند. در همهٔ ژنوم، ۶۸۶ سینگلتن و ۳۰ هاپلوتیپ (شاخص تنوع هاپلوتیپی برابر با یک و واریانس تنوع هاپلوتیپی برابر با ۰/۰۰۰۷ بود) شناسایی شد؛ همچنین تنوع نوکلئوتیدی برابر با ۰/۴۶ بود (جدول شمارهٔ ۴).

جانشینی نوکلئوتیدی بر اساس الگوی Tamura-Nei model و به‌صورت میزان جانشینی‌های نوع انتقالی و متقاطع محاسبه و هم‌چنین نسبت نوکلئوتیدهای گوناگون به کل نوکلئوتیدها نیز محاسبه شد (جدول شمارهٔ ۳). نسبت بازهای آلی در همهٔ ژنوم ویروس‌های خانوادهٔ Coronaviridae برای تیمین (و یا اوراسیل)، سیتوزین، آدنین و گوانین، به ترتیب برابر با ۳۴/۶۸، ۱۷/۰۷، ۲۶/۶۲ و ۲۱/۶۳ درصد به دست آمد. بالاترین مقدار جانشینی انتقالی (۱۲/۱۶ درصد) در بازهای پورین برای تبدیل گوانین به آدنین و در بازهای پیریمیدین (۱۷/۱۹ درصد) مربوط به تبدیل سیتوزین به تیمین و همچنین بیشترین مقدار جانشینی متقاطع (۹/۰۷ درصد) برای تبدیل آدنین و گوانین به تیمین و کمترین میزان (۴/۶۶ درصد) مربوط به آدنین و گوانین به سیتوزین به دست آمد؛ همچنین نسبت Transition/Transversion، R=100 بود.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

جدول شمارهٔ ۳. درصد جابجایی توالی نوکلئوتیدهای ژن orf1ab در ویروس‌های خانوادهٔ کرونا بر اساس روش حداکثر درست‌نمایی

نوکلئوتید	A	T	C	G
A	--	۹/۰۷	۴/۴۶	۹/۸۸
T	۶/۹۶	-	۸/۴۶	۵/۶۶
C	۶/۹۶	۱۷/۱۹	-	۵/۶۶
G	۱۲/۱۶	۹/۰۷	۴/۴۶	-

نتایج حاصل از آنالیز نواحی حفاظت‌شده (منطقهٔ عملکردی ژنوم) نشان داد که این بخش از توالی کل ژنوم کرونا‌ویروس‌ها، ۵۷ ناحیهٔ حفاظت‌شده دارد ($P<0.05$) که این نواحی بخش بزرگی از توالی کل ژنوم کرونا‌ویروس‌ها (حدود یک‌سوم) از نوکلئوتید ۸۳۹۸ تا ۲۳۱۷۱ را پوشش می‌دهد؛ بنابراین، نواحی حفاظت‌شده بخش بزرگی از توالی ژنوم (به‌ویژه در بخش ژن‌های ساختاری و عملکردی) کرونا‌ویروس‌ها را تشکیل می‌دهد که این امر نشان‌دهندهٔ چندشکلی اندک این نواحی در ژنوم کرونا‌ویروس‌ها است که نداشتن استعداد آن‌ها به تغییرات نوکلئوتیدی و جهش‌های بسیار را نشان می‌دهد که این امر در کوتاه‌مدت، سبب به وجود آمدن پروتئین‌های جدید و همچنین عملکردهای جدید نخواهد شد.

مقدار عددی نسبت dN/dS بر اساس ژن orf1ab در میان همهٔ ویروس‌ها، در سطح پنج درصد معنادار و به‌طور میانگین برابر ۱/۰۳۶ است که می‌توان نتیجه گرفت روند انتخاب خنثی، اما با تمایل بسیار اندکی به‌سوی مثبت بوده که نشان‌دهندهٔ شیب بسیار کند این تغییرات در طول تکامل برای این ژن (orf1ab) است. در تحقیق حاضر به‌منظور هرگونه انحراف از فرضیهٔ صفر تکامل خنثی، تست‌های تکامل خنثی (Neutrality Test) شامل Tajima´s D (جدول شمارهٔ ۴) و شاخص‌های Fu و Li's D* (برابر با ۰/۹۳)، Fu و Li's F* (برابر با ۰/۵۶)، Fu و Li's D (برابر با ۰/۶۰)، شاخص Fu و Li's F (برابر با ۰/۲۰) و شاخص D (۴/۳۹)، در میان همهٔ ژنوم‌ها بررسی و مشخص شد که مقادیر مثبت و غیر معنادار بوده که نشان‌دهندهٔ عدم انتخاب جهت‌دار در تغییرات ویروس‌های است.

جدول شمارهٔ ۴. نتایج حاصل از تست‌های تکامل خنثی در ژنوم ویروس‌های خانوادهٔ کرونا (۴۴)

m	S	p_s	Θ	Π	D
۳۰	۱۷۴۱۹	۰/۸۶۸۷۶۳	۰/۲۱۹۲۹۳	۰/۴۶۵۱۷۹	۴/۳۹۵۹۹۸

خلاصه‌ها؛ m = تعداد ویروس‌ها، S = تعداد کل جایگاه‌های پلی‌مورف، $p_s = S/n$، $\Theta = p_s/a_1$، π = تنوع نوکلئوتیدی و D = شاخص آماری تاجیما است.

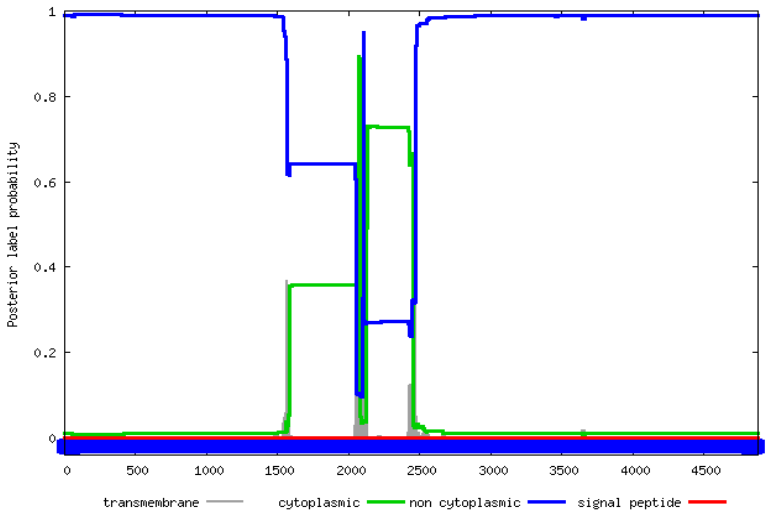
عملکرد و کارکرد اصلی ژن‌ها و پروتئین‌ها، مربوط به مناطق حفاظت‌شده، دومین‌ها و موتیف‌های آن‌ها است؛ بنابراین، تنها تغییرات در این بخش‌ها می‌تواند به تولید ژن‌ها و حتی پروتئین‌های جدید منجر شود؛ همچنین تغییرات در سایر بخش‌های ژنوم ممکن است درنهایت، به تولید اسید آمینه‌ای جدید منجر شود؛ اما این اسید آمینه چون جزء اسید آمینه‌های شاخص پروتئین نیست؛ لذا تغییری در عملکرد پروتئین ایجاد نخواهد کرد (۲۸-۲۶). بر اساس نتایج تجزیهٔ خوشه‌ای (شکل شمارهٔ ۴) و فاصلهٔ ژنتیکی میان گونه‌های مختلف کرونا‌ویروس‌ها و همچنین نتایج حاصل از آنالیز نواحی حفاظت‌شده و شناسایی دومین‌ها و موتیف‌ها (شکل‌های شمارهٔ ۲) می‌توان نتیجه گرفت مهم‌ترین تغییراتی که در ویروس‌های خانوادهٔ کرونا اتفاق افتاده و سبب ایجاد گونه‌های جدید شده، در بخش‌هایی از ژنوم رخ داده که کمترین تأثیر در عملکرد پروتئین‌ها داشته؛ اما همین مقدار اثر نیز سبب تولید گونه‌هایی از کرونا شده است که بخش‌های گوناگونی از ساختار تنفسی را درگیر می‌کنند و عملکرد متفاوت‌تری خواهند داشت.

بر اساس اینکه ویروس SARS-CoV-2 برای

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

بیماری‌زایی، باید وارد سلول شود؛ بنابراین می‌تواند پروتئین‌هایی با دومین غشائی (مهم‌ترین دومین‌های غشائی شامل SP و TAT هستند) و احتمالاً دومین‌های سیتوپلاسمی و کینازی نیز داشته باشد تا با اتصال به غشای سلول‌ها بتواند ژنوم خود را وارد و نهایت پس از آلودگی و خروج مجدد نیز بتواند با چسبیدن به غشا خارج شود و چون وظیفهٔ اتصال به سلول میزبان، چه در زمان آغاز عفونت‌زایی و چه در زمان خروج از پیکرهٔ سلول میزبان، بر عهدهٔ پروتئین‌های سطحی ویروس است، در کروناویروس، این وظیفه بر عهدهٔ پروتئین اسپایک آن است. محصول ORF1 کروناویروس‌ها که پروتئین‌های آنزیمی (تکثیر ژنوم) و غیرساختاری هستند، نقشی در اتصال به سلول میزبان برای آلوده‌سازی ندارند؛ اما چون ژنوم ویروس‌ها کوچک بوده، درنتیجه ممکن است موتیف‌ها در جاهای مختلف ویروس قرار گرفته باشند؛ بنابراین، برای صحت مراحل آنالیز بیوانفورماتیکی و اطمینان بیشتر سعی شد orf1ab که بخش اعظم ویروس را تشکیل می‌دهد و حاوی چند ORF ساختاری (ازجمله ORF1) و غیرساختاری است، برای بررسی و حضور دومین‌های نامبرده ارزیابی شود. درنهایت مشخص شد که ORF، orf1ab هر سه نوع دومین مدنظر را دارد (شکل‌های شمارهٔ ۶). هرچند، همهٔ ویروس‌هایی که پوشش‌دار هستند، در سطح خود، پروتئین‌هایی به نام پپلومر دارند که همهٔ این گلیکوپروتیین‌ها، حتماً دومین‌های غشایی دارند و حضور این دومین‌ها نیز الزامی برای ورود به سلول نیست، از سویی، حتی ویروس‌های بدون پوشش (غشاء) ی هستند که چنین پروتئین‌هایی در سطح خود ندارند؛ اما وارد سلول می‌شوند و عفونت‌زایی می‌کنند؛ با این حال، قطعاً حضور هر سه دومین غشائی، سیتوپلاسمی و کینازی در یک ویروس پوشش‌دار می‌تواند نشانهٔ بیماری‌زا بودن آن باشد.



شکل شمارهٔ ۶. حضور دومین‌های غشایی، سیتوپلاسمی و کینازی در orf1ab ویروس SARS-CoV-2 (رنگ قرمز (دومین کینازی)، رنگ سبز (سیتوپلاسمی) و رنگ خاکستری (غشائی))

با توجه به اینکه ژنوم ویروس SARS-CoV-2 از نوع RNA است و بخش بزرگ این ویروس را یک ORF به نام orf1ab (که حاوی چند ORF ساختاری و غیرساختاری است) تشکیل داده است؛ لذا برای استفاده، ابتدا همهٔ ORF، orf1ab و سپس ORF، YP_009725295 به‌منظور داکینگ مولکولی انتخاب شدند.

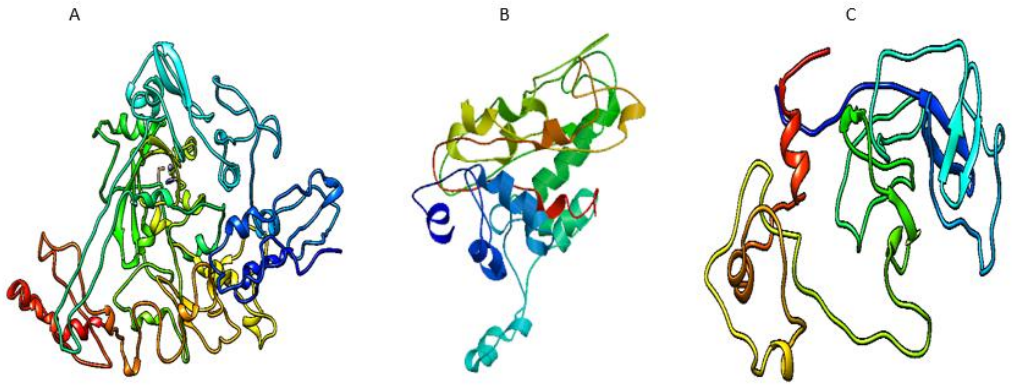
برای تأثیر احتمالی پروتئین لینالول بر پروتئین orf1ab و همچنین تأثیر تیمول بر YP_009725295، ابتدا ساختار سوم پروتئین orf1ab (شکل شمارهٔ ۷A)، لینالول (شکل شمارهٔ ۷B) و YP_009725295 (شکل شمارهٔ ۷C) به همراه کیفیت ساختار سوم پیش‌بینی (شکل شمارهٔ ۸) و سپس مناطق حفاظت‌شده و موتیف‌ها را شناسایی و درنهایت، بخشی از منطقهٔ حفاظت‌شدهٔ پروتئین لینالول بر پروتئین orf1ab داکینگ مولکولی شد و بر اساس

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

اینکه لینالول بر orf1ab واکنش نشان خواهد داد و به آن پیوند و مانع فعالیت آن خواهد شد، الگوهایی پیش‌بینی‌شده بود که درنهایت، بهترین الگو بر اساس بیشترین اثر متقابل میان پروتئین لینالول و پروتئین orf1ab (۴۱/۰-) و بیشترین دقت (۰/۱۷۲) انتخاب گردید (شکل شمارهٔ ۹). گفتنی است که در ساختار هر دو پروتئین لینالول و orf1ab، گروهای گوناگونی ازجمله گروه‌های آلیفاتیک (چربی) و آب‌دوست موجود است (شکل شمارهٔ ۹B و ۹A)، به‌ویژه در پروتئین orf1ab گروه‌های آب‌دوست بیشترند (شکل شمارهٔ ۹A) و به پروتئین ویروس SARS-CoV-2 این توانایی را داده که تا زمان خروج ویروس از سلول میزبان و متلاشی کردن آن، به‌راحتی در سیتوپلاسم سلول میزبان محلول باشد. با توجه به تأثیر مثبت گیاه تشنه‌داری در درمان عفونت‌های مختلف و حضور فراوان لینالول در این گیاه و از سویی، حضور گروه‌های چربی‌دوست و آب‌دوست در لینالول و همچنین نتایج تحقیق حاضر امید می‌رود این پروتئین بتواند پروتئین orf1ab ویروس کرونا SARS-CoV-2 را مهار کند. علاوه بر این، نتایج In-Silico تحقیق حاضر برای خاصیت ضد عفونت بودن تشنه‌داری، در کنار اینکه می‌تواند صحتی بر تحقیقات انجام‌شدهٔ پیشین باشد (۲۹ ، ۱۶)، می‌تواند به‌عنوان پایه‌ای برای پژوهش‌های آینده برای ارزیابی تأثیر تک‌تک مواد مؤثرِ تشنه‌داری به‌ویژه لینالول، بر ویروس‌های خانوادهٔ کرونا مخصوصاً SARS-CoV-2 باشد و درنهایت، برای کم کردن و یا از بین بردن آثار این نوع ویروس‌ها استفاده شود.

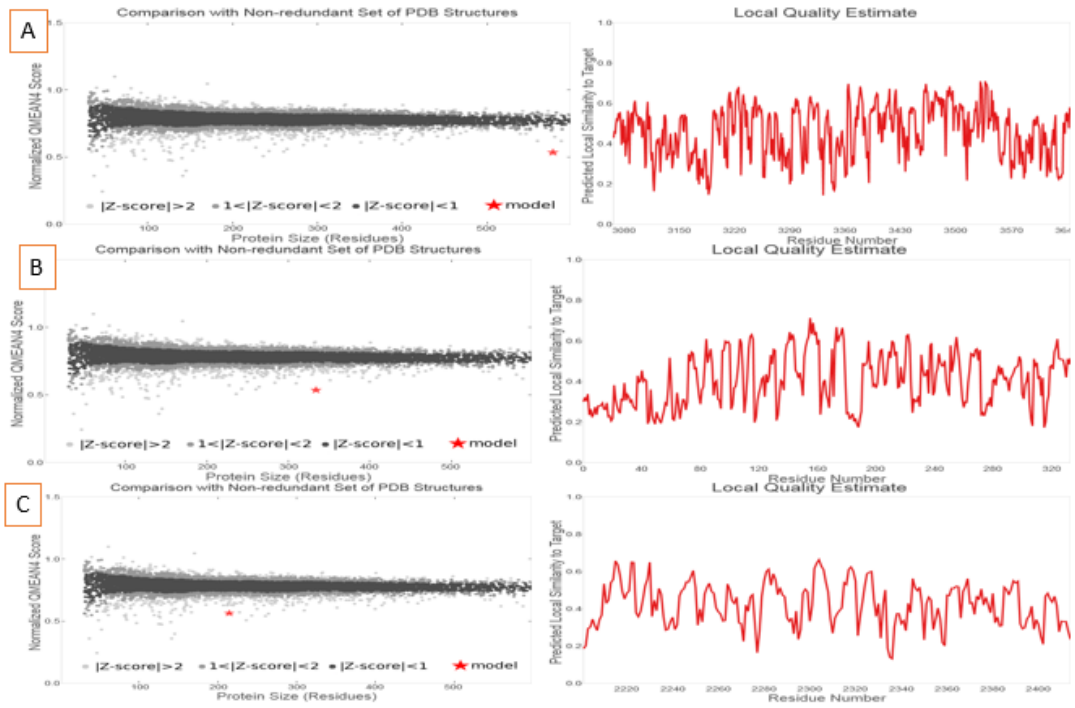
علاوه بر لینالول ($C_{10}H_{18}O$)، مادهٔ دیگری به نام تیمول (با فرمول شیمیایی $C_{10}H_{14}O$) (کد ZINC967597)، بر یکی از ORFهای کلیدی ویروس کرونا SARS-CoV-2 (YP_009725295) داکینگ شد و بر اساس اینکه تیمول بر orf1ab واکنش نشان خواهد داد و پس از اتصال به آن، مانع فعالیت آن خواهد شد، مدل‌هایی پیش‌بینی‌شده بود که درنهایت، بهترین مدل بر اساس کمترین سطح انرژی (ΔG=-۶/۲۳Kcal/mol) و بهترین ترکیب (Full Fitness=-۱۳۴۰/۱۸Kcal/mol) انتخاب گردید (جدول شمارهٔ ۴، شکل شمارهٔ ۱۰B). گفتنی است که تیمول سبب متلاشی شدن پروتئین YP_009725295 می‌شود (شکل‌های شمارهٔ ۷C و ۱۰A و شکل شمارهٔ ۱۰B) و کاملاً بر غیرفعال کردن این پروتئین مؤثر است. شاید نقش بیشتر تیمول بر orf1ab نسبت به لینالول، به این علت باشد که تیمول یک ترکیب شیمیایی فنولی است؛ اما لینالول یک پروتئین است. تیمول به علت ساختار و نوع مولکولی که دارد، قابلیت بیشتری برای ترکیب با سایر مولکول‌ها دارد؛ اما قابلیت ممکن است عوارضی نیز داشته باشد؛ ولی لینالول چون پروتئین بوده و ساختار بزرگ‌تر و پیچیده‌تری دارد؛ بنابراین، اختصاصی‌تر عمل می‌کند و بر اساس این، عوارض کمتری دارد.



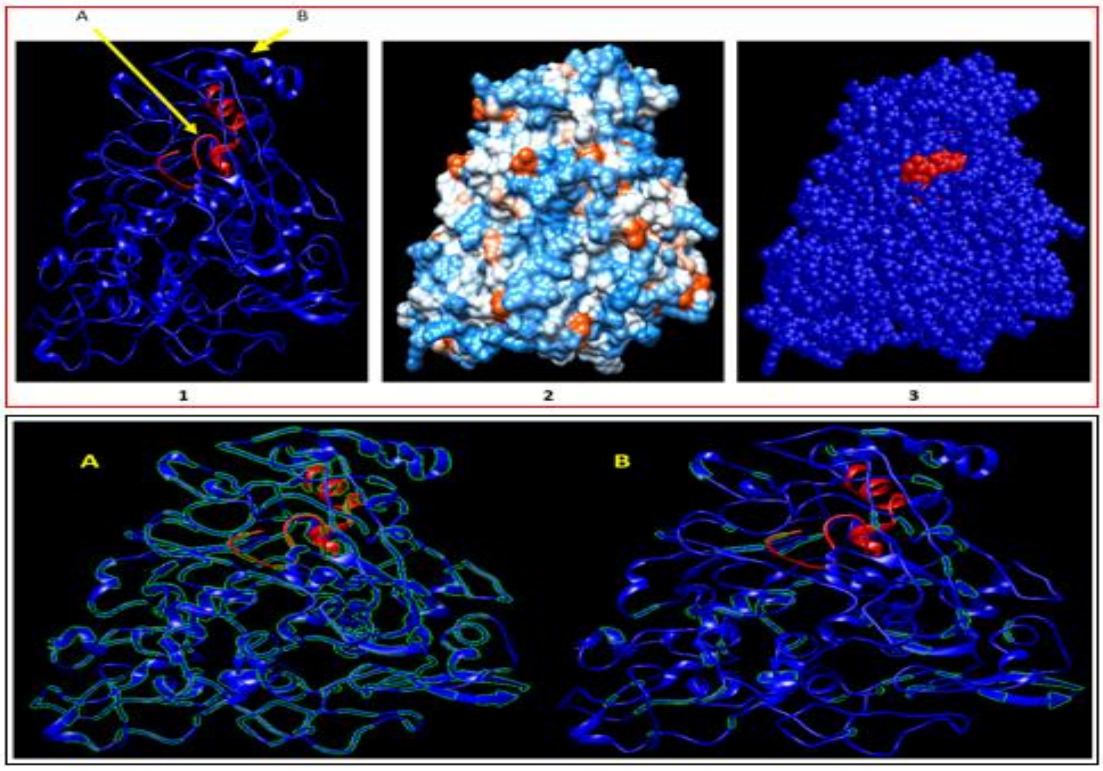
شکل شمارهٔ ۷. ساختار سوم پروتئین orf1ab کروناویروس SARS-CoV-2 (A)، لینالول آرابیدوپسیس (B) و YP_009725295 کروناویروس SARS-CoV-2 (C)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]



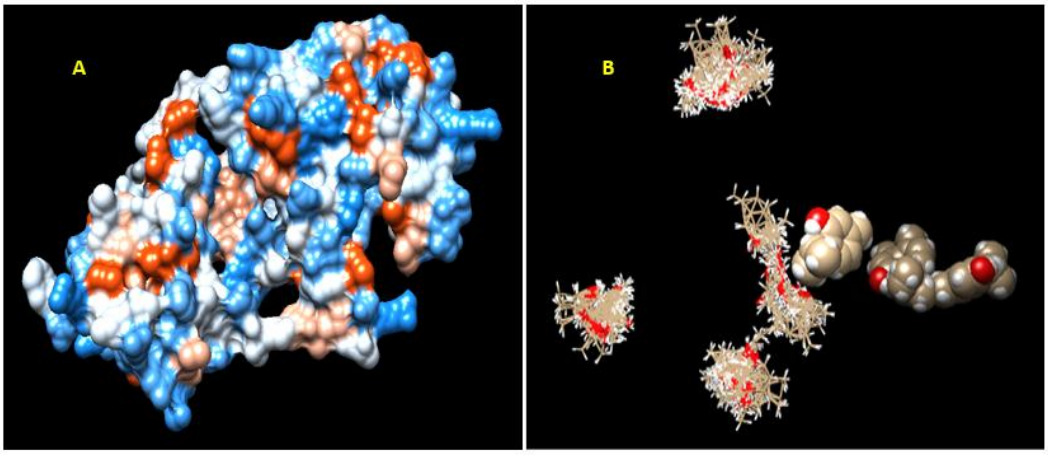
شکل شمارهٔ ۸. نمودارهای کیفیت مدل ساخته‌شدهٔ ساختار سوم پروتئین orf1ab کروناویروس SARS-CoV-2 (A)، لینالول آرابیدوپسیس (B) و YP_009725295 کروناویروس SARS-CoV-2 (C)



شکل شمارهٔ ۹. نتیجهٔ داکینگ مولکولی پروتئین لینالول آرابیدوپسیس (1A) بر پروتئین orf1ab کروناویروس SARS-CoV-2 (1B)، ساختار سه‌بعدی پروتئین نهایی (۲) و ساختار سه‌بعدی پروتئین لینالول به همراه لیگاند (۳)؛ موقعیت گروه‌های مختلف آب‌دوست (A) و آلیفاتیک (B) در مدل نهایی به‌دست‌آمده از ترکیب لینالول و orf1ab کروناویروس SARS-CoV-2

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]



شکل شمارهٔ ۱۰. ساختار سوم پروتئین orf1ab کروناویروس SARS-CoV-2 (A) و نتیجهٔ داکینگ مولکولی مادهٔ تیمول زنیان بر پروتئین YP_009725295 کروناویروس SARS-CoV-2 (B)

جدول شمارهٔ ۵. انواع مدل‌های پیش‌بینی‌شده برای داکینگ مولکولی میان تیمول و پروتئین YP_009725295 کروناویروس SARS-CoV-2

ردیف	ΔG (kcal/mol)	Full Fitness (kcal/mol)	عناصر	خوشه
۱	−۶/۲۳	−۱۳۴۰/۱۸	۰	۰
۲	−۶/۲۳	−۱۳۴۰/۱۷	۱	۰
۳	−۶/۲۳	−۱۳۴۰/۱۴	۲	۰
۴	−۶/۲۳	−۱۳۴۰/۰۸	۳	۰
۵	−۶/۲۳	−۱۳۴۰/۰۷	۴	۰
۶	۶−/۲۱	−۱۳۳۷/۸۰	۵	۰
۷	−۶/۲۱	−۱۳۳۷/۷۹	۶	۰
۸	−۶/۰۹	−۱۳۳۹/۰۶	۰	۱
۹	−۶/۰۶	−۱۳۳۸/۹۱	۱	۱
۱۰	−۶/۰۶	−۱۳۳۶/۸۷	۲	۱
۱۱	−۵/۸۴	−۱۳۳۶/۶۶	۳	۱
۱۲	−۵/۸۴	−۱۳۳۶/۲۲	۴	۱
۱۳	−۵/۸۴	−۱۳۳۶/۲۱	۵	۱
۱۴	−۵/۹۱	−۱۳۳۵/۵۸	۶	۱

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تغییرات نوکلئوتیدی که سبب تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (d_N)، نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسید آمینهٔ حاصله نداشته‌اند (d_S)، روش مفید و بسیار کارآمدی برای تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها است (۳۰). اگر این نسبت بیشتر از یک باشد، انتخاب مثبت، اگر کمتر از یک باشد، انتخاب خالص و اگر برابر یک باشد، انتخاب خنثی را در طول تکامل این ژن‌ها نشان می‌دهد (۳۱). مقدار عددی این نسبت (d_N/d_S) در میان ژنوم (orf1ab) همهٔ ویروس‌ها، در سطح پنج درصد معنادار و به‌طور میانگین برابر ۱/۰۳۶ است که می‌توان نتیجه گرفت روند انتخاب خنثی، ولی با تمایل بسیار اندکی به‌سوی مثبت بوده است که شیب بسیار کند این تغییرات در طول تکامل برای این ژن (orf1ab) را نشان می‌دهد. این نوع انتخاب در مدت‌زمان اندکی، سبب به وجود آمدن سویه‌های جدید، پروتئین‌های جدید و عملکرد جدید برای این پروتئین‌ها نخواهد شد و برای رسیدن به این تغییرات، نیازمند مدت‌زمان فراوانی در تکامل خواهد بود؛ برای همین است که مدت‌ها طول خواهد کشید تا یک ویروس از گونهٔ پیشین به وجود بیایید. از اولین ویروس کرونایی شناخته‌شده تاکنون، بیش از ۹۰ سال می‌گذرد (۲) و هنوز هم ممکن است با فاصلهٔ زمانی بیشتر، ویروس‌هایی با فرم جدیدتر به وجود بیایند؛ همچنین مقادیر بالای نرخ جانشینی انتقالی به متقاطع

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

نوکلئوتیدی و وجود بخش‌های پروتئینی حفاظت‌شده، ازجمله علل وقوع انتخاب خنثی در تکامل این ژن است. با توجه به تعداد بسیار نواحی پروتئینی حفاظت‌شده، دقت برآورد انتخاب بالا است (۳۳ ، ۳۲).

پارامترهای تنوع ژنتیکی در میان گونه‌هایی که انتخاب جهت‌دار داشته یا افزایش معناداری در اندازهٔ جمعیت مؤثر آن‌ها اتفاق افتاده است، مقادیر تست‌های خنثی و منفی و معنادار هستند، درحالی‌که مقادیر مثبت و معنادار این آزمودن‌ها، نشان‌دهندهٔ آثار مربوط به رانش ژنتیکی، تنگناهای ژنتیکی و یا اثر انتخاب متعادل‌کننده در طول تاریخ تکاملی گونه‌ها است (۳۴).

در تحقیق حاضر، به‌منظور هرگونه انحراف از فرضیهٔ صفر تکامل خنثی، تست‌های تکامل خنثی (Neutrality Test)، شامل Tajima´s D و شاخص‌های Fu و *Li's D (برابر با ۰/۹۳)، Fu و *Li's F (برابر با ۰/۵۶)، Fu و Li's D (برابر با ۰/۶۰) و شاخص Fu و Li's F (برابر با ۰/۲۰)، در میان همهٔ ژنوم‌ها بررسی و مشخص شد که مقادیر مثبت و غیر معنادار بوده است که نشان‌دهندهٔ عدم انتخاب جهت‌دار در تغییرات ویروس‌ها است. این نتایج می‌تواند به این علت باشد که ژنوم ویروس‌ها، تک‌والدی و هاپلوئیدند و نسبت به تنگناهای ژنتیکی و رانش ژنتیکی حساس نیستند و تغییرات جهت‌دار نیست.

بر اساس ساختار نوکلئوتیدهای کدون، آثار مخرب موتاسیون حداقل است؛ زیرا اگر موتاسیون در اولین نوکلئوتید یک کدون انجام شود، معمولاً یک اسید آمینه مشابه (اگر همان اسید آمینه نباشد) قرار می‌گیرد (۳۵). از سویی، بر اساس اینکه بیشتر موتاسیون‌ها از نوع جانشینی انتقالی (پورین با پورین و پیریمیدین با پیریمیدین) هستند؛ درنتیجه، تغییر در نوکلئوتید دوم یک کدون، معمولاً سبب جابجایی اسیدهای آمینه مشابه می‌شود؛ همچنین اگر موتاسیون از نوع جانشینی انتقالی در نوکلئوتید سوم یک کدون رخ دهد، تقریباً هیچ‌گاه آن اسید آمینه تغییر نمی‌کند، حتی دربارهٔ موتاسیون‌های متقاطع، در نیمی از مواقع تغییری رخ نخواهد داد (۳۶). گفتنی است اگر نوکلئوتید اول و دوم یک کدون G و یا C باشد، نوع اسید آمینه وابسته به نوکلئوتید سوم نخواهد بود؛ اما اگر نوکلئوتید اول و دوم یک کدون A و یا U باشد، نوع اسید آمینه کاملاً وابسته به نوکلئوتید سوم خواهد بود[۳۷]. در فرایند ساخت پروتئین توسط ریبوزوم‌ها ممکن است تنها سه اسید آمینهٔ غلط به ازای هر ده هزار اسید آمینهٔ درست استفاده شود. از طرفی، در هر بار همانندسازی و نسخه‌برداری، این امر به ترتیب حدود یک به ده میلیارد و یک به صد هزار نوکلئوتید نادرست به درست است و در بعضی از منابع نیز، متوسط نرخ جهش، حدود ۱۷۵ موتاسیون به ازای یک ژنوم دیپلوئید در هر نسل بیان شده؛ اما برای موتاسیون از نوع جانشینی انتقالی و متقاطع در جزایر CpG، این نرخ یک مرتبه بزرگ‌تر از میزان جهش در سایر ناحیه‌های دیگر گزارش‌شده است (۳۸).

در تحقیق حاضر، در بررسی orf1ab ویروس SARS-CoV-2 با سارس که نزدیک‌ترین ویروس‌ها به هم هستند، مشخص شده که ۴۲۳۲ سینگلتن و ۱۴۳ منطقهٔ حفاظت‌شده با طول ۱۱۷۸۲ باز (از ۲۱۱۸۰ باز کل orf1ab) و در بررسی orf1ab ویروس SARS-CoV-2 با بتا کروناویروس ژجیان مشخص شده که ۸۳۴۶ سینگلتن و ۴۰ منطقهٔ حفاظت‌شده با طول ۸۹۵۲ باز (از ۲۱۱۸۰ باز کل orf1ab) دارند و بر اساس آنچه دربارهٔ نرخ جهش‌های طبیعی یاد شد، می‌توان نتیجه گرفت این‌همه تغییر، در مدت‌زمان کوتاهی، در یک ویروس مانند سارس اتفاق نیفتاده است که سبب به وجود آمدن ویروس Covi19 شود؛ بنابراین می‌توان گفت که SARS-CoV-2 یک گونهٔ جدید است؛ اما حاصل ساخت بشر نیست. در تحقیقی نیز گزارش‌شده که ویروس SARS-CoV-2 یک ویروس هدفمند و ساخته‌شده در آزمایشگاه نیست (۳۹).

با توجه به مطالعات داخل و خارج از کشور دربارهٔ تهیهٔ واکسن و دارو و همچنین بر اساس استفادهٔ مردمان غرب ایران از گیاه دارویی تشنه‌داری برای درمان بیماری‌های عفونی و مردمان شرق ایران (سیستان) از زنیان به‌منظور درمان بیماری تنفسی، در تحقیق حاضر نیز اثر لینالول (Linalool) (مهم‌ترین مادهٔ گیاه تشنه‌داری) و تیمول (Thymol) (مهم‌ترین مادهٔ گیاه زنیان)، با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی بر پروتئین orf1ab کروناویروس SARS-CoV-2

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

بررسی شد و مشخص گردید که هر دو ماده، توانایی از میان بردن پروتئین شاخص SARS-CoV-2 را دارند. گفتنی است که در مجامع گوناگون نیز از آویشن به‌عنوان یکی از موارد درمانی SARS-CoV-2 یاد شده است که بر اساس بیشترین مادۀ فیتوشیمیایی موجود زنیان و آویشن یعنی تیمول می‌توان نتیجه گرفت که تیمول بر درمان این بیماری مؤثر است، هرچند برای اثبات این قضایا، باید آزمایش بالینی خاصیت درمانی لینالول و تیمول انجام و در صورت تائید، استفاده از آن پیشنهاد شود.

کد اخلاق: مقاله حاضر در دانشگاه زابل با کد اخلاق IR.UOZ.REC.1399.003 به تصویب رسیده است.

References

1.Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, et al. Bats are natural reservoirs of SARS like coronaviruses. Science 2005; 310: 676-79. doi.10.1126/science.1118391

2.Lai MM, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. 1 th ed. Adv Virus Res Elsevier Publication. 1997; P.1-100.

3. Cavanagh D, Macnaughton M. Coronaviruses in principles and practice of clinical virology. 2 th ed. Wiley Chichester Publication.1995; P.325-36.

4. Talbot PJ, Paquette JS, Ciurli C, Antel JP, Ouellet F. Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross reactive T cells in multiple sclerosis. Annal Neurol 1996; 3: 233-40. doi. 10.1002/ana.410390213

5. Tavakoli A, Vahdat K, Keshavarz M. Novel coronavirus disease 2019 an emerging infectious disease in the 21st century. Iranian South Med J 2020; 22: 432-50.

6. Danesh F, Ghavidel S. Coronavirus scientometrics of 50 years of global scientific productions. Iranian J Med Microbiol 2020; 14: 1-16.

7.Siddell S. The small membrane protein in the coronaviridae. 2 th ed. Plenum NY Publication. 1995; P.1-86.

8. Groot RJ, Baker S, Baric R, Enjuanes L, Gorbalenya A, Holmes K, et al. Family coronaviridae. Virus Tax 2012;2: 806-28.

9. Cavanagh D, Brian DA, Brinton MA, Enjuanes L, Holmes KV, Horzinek MC, et al. In virus taxonomy. 6 th ed. Springer Verlag Vienna NY Publication.1995; P. 407-11..

10. Snijder EJ, Spaan WJ. The coronaviruslike superfamily. 1 th ed. Springer Publication. 1995; P.239-55.

11. Risco C, Antón IM, Enjuanes L, Carrascosa JL. The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. J Virol 1996; 70: 4773-77.

12. Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adriaenssens EM, Dempsey DM, et al. Changes to virus taxonomy and the statutes ratified by the international committee on taxonomy of viruses. 1 th ed. Springer Publication. 2020;P.111-20.

13. Fazelinasab B, Mirzaei N. [Evaluation of total phenol and flavonoid content in a wide variety of native and imported plants]. Sci J Ilam Uni Medical Sci 2018; 26: 141-54. (Persian) doi.10.29252/sjimu.26.2.141

14. Keikhaie KR, Fazelinasab B, Jahantigh HR, Hassanshahian M. Antibacterial activity of ethyl acetate and methanol extracts of securigera securidaca withania sominefra rosmarinus officinalis and Aloe vera plants against important human pathogens. J Med Bacteriol 2018; 7: 13-21.

15. Valizadeh M, Beigomi M, Fazelinasab B. Antibacterial and Anti biofilm effects of ethanol and aceton leaf extract of Momordica charantia and Tecomella undulata against Acinetobacter baumannii. Int J Adv Biol Biomed Res 2020; 8: 403-18. doi.10.33945/sami/ijabbr.2020.4.6

16. Rezaeinasab M, Komeili G, Fazelinasab B. Gastroprotective effects of aqueous and hydroalcholic extract of Scrophularia striata on ethanol induced gastric ulcers in Rats. Der Pharm Lett 2017; 9: 84-93.

17. Khan R, Zakir M, Khanam Z, Shakil S, Khan AU. Novel compound from Trachyspermum ammi seeds with antibiofilm and antiadherence activities against Streptococcus mutans a potential chemotherapeutic agent against dental

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

caries. J Appl Microbiol 2010; 109: 2151-9. doi.10.1111/j.1365-2672.2010.04847.x
18. Moazeni M, Saharkhiz MJ, Hosseini AA. In vitro lethal effect of ajowan Trachyspermum ammi L. essential oil on hydatid cyst protoscoleces. Vet Parasitol 2012; 187: 203-8. doi.10.1016/j.vetpar.2011.12.025
19. Ashraf M, Orooj A. Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in an arid zone traditional medicinal plant ajwain Trachyspermum ammi L sprague. J Ar Environ2006; 64: 209-20.
20.Singh G, Kapoor I, Pandey S, Singh U, Singh R. Studies on essential oils part 10 antibacterial activity of volatile oils of some spices. Phytotherapy Res An International J Dev Pharmacol Toxicol Eval Natural Prod 2002; 16: 680-82. doi.10.1002/ptr.951
21. Fazelinasab B. The effect of explant BAP and 2,4-D on callus induction of trachyspermum ammi. Potravinarstvo Slovak J Food Sci 2018; 12: 578-86. doi.10.5219/953
22. Fazelinasab B, Fooladvand Z. A review on Iranian Carum copticum composition and biological activities. European J Med Plant 2016; 12: 1-8. doi.10.9734/EJMP/2016/17584
23. Amiri H, H LY, Esmaeili A, Samsamnia F, Eghbali D, Viskarami G, et al. Essential oil composition and anatomical study of Scrophularia striata boiss. Iranian J Med Arom Plant 2011; 27: 271-78.
24. Bekhechi C, Boti JB, Bekkara FA, Abdelouahid DE, Casanova J, Tomi F. Isothymol in ajowan essential oil. Nat Prod Commun 2010; 5: 1107-10.
25.Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proce National Acad Sci1979; 76: 5269-73.
26. Datta PP, Sharma MR, Qi L, Frank J, Agrawal RK. Interaction of the G domain of elongation factor G and the C terminal domain of ribosomal protein L7/L12 during translocation as revealed by cryo EM. Mole Cell 2005; 20: 723-31. doi.0.1016/j.molcel.2005.10.028
27.Marchlerbauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, et al. CDD NCBI's conserved domain database. Nucle Acids Res 2014; 43: 222-26. doi.10.1093/nar/gku1221
28. Grimanelli D, Ingouff M. DNA methylation readers in plants. J Mole Biol 2020; 432: 1706-17. doi.10.1016/j.jmb.2019.12.043
29.Shoohani B, Hemati AA, Taherimoghadam M. [Effects of Scrophularia striata extract on wound healing in Rabbit]. Sci J Ilam Uni Med Sci 2009; 17: 9-16. (Presian)
30. Kryazhimskiy S, Plotkin JB. The population genetics of dN/dS. PLoS Genet 2008; 4: 1000304.
31. Buschiazzo E, Ritland C, Bohlmann J, Ritland K. Slow but not low genomic comparisons reveal slower evolutionary rate and higher dN/dS in conifers compared to angiosperms. BMC Evol Biol2012; 12: 1-15. doi.10.1186/1471-2148-12-8
32. Ngandu NK, Scheffler K, Moore P, Woodman Z, Martin D, Seoighe C. Extensive purifying selection acting on synonymous sites in HIV-1 group M sequences. Virol J2008; 5: 1-11. doi.10.1186/1743-422X-5-160
33. Monnin A, Nagot N, Peries M, Vallo R, Meda N, Singataet al. Mitochondrial DNA parameters in blood of infants receiving lopinavir ritonavir or lamivudine prophylaxis to prevent breastfeeding transmission of HIV-1. J Clin Med 2020; 9: 2972. doi.10.3390/jcm9092972
34. Manfredi G, Thyagarajan D, Papadopoulou LC, Pallotti F, Schon EA. The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. Am J Hum Gen1997; 61: 953-60.
35.Knight RD, Freeland SJ, Landweber LF. A simple model based on mutation and selection explains trends in codon and amino acid usage and GC composition within and across genomes. Gen Biol 2001; 2: 1-10. doi.10.1186/gb-2001-2-4-research0010
36. Levin DE, Ames BN. Classifying mutagens as to their specificity in causing the six possible transitions and transversions a simple analysis using the Salmonella mutagenicity assay. Environ Mutagene 1986; 8: 9-28. doi.10.1002/em.2860080103
37. Sueoka N. Two aspects of DNA base composition G+ C content and translation coupled deviation from intra strand rule of A=T and G=C. J Mol Evol 1999; 49: 49-62. doi.10.1007/PL00006534

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. Nature Med 2020: 1-3. doi.10.1038/s41591-020-0820-9

38. Nachman MW, Crowell SL. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. Genetics 2000; 156: 297-304.

39.Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI,

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]

Biological Evaluation of Coronaviruses and the Study of Molecular Docking, Linalool, and Thymol as orf1ab Protein Inhibitors and the Role of SARS-CoV-2 Virus in Bioterrorism

Fazelinasab B [1,2]*

(Received: April 13, 2020 Accepted: October 3, 2020)

Abstract

Introduction: Coronaviruses are animal-derived enveloped viruses that in addition to respiratory and digestive diseases have also been found in neurological diseases, some of which have caused nephritis or have been observed in patients with Multiple Sclerosis and mouse hepatitis. However, in general, the most important effect of coronaviruses is on the respiratory and digestive systems. This study aimed to compare the genome of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-28) with that of other viruses of the coronavirus family. Moreover, it was attempted to investigate the possibility of its falsification and finally evaluate the effect of linalool and thymol on the inactivity of the orf1ab protein of SARS-CoV-2.

Materials & Methods: The Coronaviridae family virus genome sequence was obtained from the NCBI database. After alignment, the number of mutations, nucleotide diversity, number of sites in which the same substitution occurred, clustering, similarity and genetic distance, as well as dN/dS index were evaluated in this study. The three-dimensional structure of the orf1ab protein prediction and the accuracy of the predicted model was also investigated. Furthermore, this study examined the motif and the domains conserved for the orf1ab gene in all viruses of the Coronaviridae family, as well as the membrane, cytoplasm, and kinase domains in the orf1ab virus of SARS-CoV-2. Regarding the molecular docking, linalool (the most important thirst-suppressing substance of Scrophularia striata) of the model plant (i.e., araboidopsis) and thymol (the most important ingredient of Trachyspermum ammi L.) were used to prevent the inactivation of the orf1ab protein of SARS-CoV-2.*Ethics code:* IR.UOZ.REC.1399.003

Findings: The SARS-CoV-2 virus has 11 conserved domains and 11 genes. The presence of the NSP13 superfamily and SUD-M superfamily in the SARS-CoV-2 virus genome indicate the ability and effort of this virus to be more stable in the environment. Based on the numerical value of dN/dS (1.036) and Tajima´s D (4.39) for orf1ab, the slope of the changes during evolution for the orf1ab gene is very slow, and there is no choice of direction in virus changes. Based on the highest interaction between linalool protein and orf1ab protein (-41.0), the highest accuracy (0.172), lowest energy level (ΔG=-6.23Kcal/mol), and the best combination (Full Fitness=-1340.18 Kcal/mol) between thymol phytochemical and orf1ab protein, molecular docking results showed that both linalool protein and thymol substance bound to orf1ab protein and inhibited its activity.

Discussions & Conclusions: Linalol and thymol affected the inactivity of the orf1ab protein in the SARS-CoV-2 virus. However, clinical trials on linalool and thymol should be performed to confirm these hypotheses. If the hypothesis approves, it is suggested to use them in this regard. In addition, by examining the dN/dS indices, as well as evaluating the singletons, domains, and conserved areas of all viruses, it was found that the SARS-CoV-2 virus could not be purposefully manipulated.

Keywords: Carum copticum, COVID-19, Scrophularia striata, Zataria multiflora

1.Research Dept of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran
2.Dept of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
**Corresponding author Email: bfazeli@uoz.ac.ir*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.6.77]