



Comparative Genome Analysis of Infectious Human and Domestic Animal *Coronaviruses*

Taraneh Rajaei¹, Gholamreza Nikbakht Brujeni², Fateme Frootan³, Jalil Mehrzad², Pouya Houshmand¹¹ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran² Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran³ Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

Received: 17 December 2022, Accepted: 1 March 2023

[10.22059/jvr.2022.346341.3289](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.346341.3289)[20.1001.1.20082525.1402.78.1.6.8](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.1.6.8)

Abstract

BACKGROUND: *Coronaviruses*, which mainly cause gastrointestinal and respiratory infections, have been identified in various species. Among the extensive genomic data of disease-causing *Coronaviruses* in humans and animals, some similarities can be analyzed by in-silico methods.

OBJECTIVES: In the present study, comparative genome analysis of medical and veterinary medicine *Coronaviruses* was performed to obtain more accurate information about the genetic similarities and differences of different members of this family.

METHODS: The genomic sequences were retrieved from NCBI and Virus Pathogen Resource databases. Using the NCBI database blast algorithm, all sequences were aligned with the SARS-CoV-2 genome sequence, and similarity was obtained. Amino acid sequences of structural and non-structural proteins associated with coding regions (CDS) were aligned separately with the SARS-CoV-2, and their similarities were calculated. The 3D structure from each protein was compared with the corresponding protein in SARS-CoV-2, and Template Modeling Scores (TM-Score) were obtained. A phylogenetic tree of different species of the *Coronaviridae* family was drawn based on nucleotide and amino acid sequence data.

RESULTS: Nonstructural coding gene sequences detected the highest interspecies similarities in nucleotide, amino acid sequence, and 3D structure (nsp12, nsp13, nsp14, and nsp16). The ORF1ab, encoding non-structural proteins, carries essential functions for viral replication.

CONCLUSIONS: This study showed that the transcription complex is highly conserved among human and animal *Coronaviruses*. A comparison and analysis of the *Coronaviridae* transcription complex can be considered a key target for diagnosing, developing antiviral therapies, and designing vaccines.

Keywords: *Coronavirus*, Domestic, Genome, Phylogenetic, Transcription complex

Copyright © Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s)
Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Gholamreza Nikbakht Brujeni, Tel/Fax: 021-61117057



How to cite this article:

Rajaei, T., Nikbakht Brujeni, G., Frootan, F., Mehrzad, J., Houshmand, P. Comparative Genome Analysis of Infectious Human and Domestic Animal *Coronaviruses*. *J Vet Res*, 2023; 78(1): 51-65.
doi: 10.22059/jvr.2022.346341.3289

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The hosts and accession numbers of the studied coronaviruses.

Table 2. 3D models of the non-structural proteins of coronaviruses and their PDB IDs.

Table 3. Percentage of similarity of amino acid sequences of different *Coronaviruses* compared to their corresponding sequences in SARS-CoV-2.

Table 4. Results of the nucleotide sequence alignment of the ORF1ab region of important members of the *Coronaviridae* family and the SARS-CoV-2 genome.

Table 5. Results of the pairwise structure alignment analyses of encoded proteins by the ORF1ab gene region.

Figure 1. Composition and structure of SARS-CoV-2 (WH-Human 1 CoV) genome in comparison with the genome of veterinary coronaviruses.

Figure 2. The percentage of similarity of amino acid sequences of proteins encoded by ORF1ab region in different coronaviruses compared to the corresponding sequences in SARS-CoV-2.

Figure 3. Comparison of the 3D structures of (A) nsp12 and (B) nsp13 proteins in SARS-CoV-2 (brown structures) and IBV (blue structures).

Figure 4. Comparison of the 3D structures of (A) nsp12 and (B) nsp13 proteins in SARS-CoV-2 (brown structures) and FCoV (blue structures).

Figure 5. Comparison of the 3D structures of (A) nsp12 and (B) nsp13 proteins in SARS-CoV-2 (brown structures) and CCoV (blue structures).

Figure 6. Comparison of the 3D structures of (A) nsp12 and (B) nsp13 proteins in SARS-CoV-2 (brown structures) and BCoV (blue structures).

Figure 7. The phylogenetic tree that obtained from the comparison of the complete genome of SARS-CoV-2 and other members of the *Coronaviridae* family.

Figure 8. The phylogenetic tree was obtained by comparing the amino acid sequences encoded by the ORF1ab gene region in SARS-CoV-2 and other members of the *Coronaviridae* family.



تحلیل مقایسه‌ای ژنوم کروناویروس‌های بیماری‌زای انسان و دام

ترانه رجائی^۱، غلامرضا نیکبخت بروجنی^۲، فاطمه فروتن^۳، جلیل مهرزاد^۲، پویا هوشمند^۱^۱ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران^۲ گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران^۳ پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۶ آذر ماه ۱۴۰۱، تاریخ پذیرش: ۱۰ اسفند ماه ۱۴۰۱

doi 10.22059/jvr.2022.346341.3289



20.1001.1.20082525.1402.78.1.6.8

چکیده

زمینه مطالعه: کروناویروس‌هایی که عمدتاً عامل عفونت‌های گوارشی و تنفسی هستند، در طیف وسیعی از میزبانان شناسایی شده‌اند. در بین انبوه داده‌های ژنومی به دست آمده از این خانواده تفاوت‌ها و تشابهاتی دیده می‌شود که قابل تحلیل با روش‌های مجازی می‌باشد.

هدف: در مطالعه حاضر مقایسه ژنومی کروناویروس‌های مهم در حوزه پزشکی و دامپزشکی با هدف دستیابی به اطلاعات بیشتر و دقیق‌تر از تشابهات و تفاوت‌های ژنتیکی اعضای مختلف این خانواده صورت گرفته است.

روش کار: توالی‌های ژنومی گونه‌های مهم بیماری‌زای کرونا ویروس از پایگاه‌های داده NCBI و VPR استخراج شد. در ادامه، با استفاده از الگوریتم بلاست توالی‌های سایر گونه‌ها با توالی ژنوم ویروس SARS-CoV-2 هم‌ردیف و درصد تشابهات محاسبه شد. توالی‌های اسیدآمین پروتئین‌های ساختاری و غیرساختاری مرتبط با نواحی کدشونده (CDS) به صورت جداگانه هم‌ردیف شدند و میزان شباهت آن‌ها محاسبه شد. ساختارهای فضایی هر پروتئین با پروتئین متناظر در ویروس SARS-CoV-2 مقایسه شدند و میزان تشابهات به صورت مدل امتیاز دهی قالبی (TM-Score) به دست آمد. در پایان، درخت سلسله‌تبار گونه‌های کروناویروس بر مبنای داده‌های توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمین رسم شد.

نتایج: بیشترین تشابهات بین گونه‌ای، از لحاظ توالی نوکلئوتیدی، آمینواسیدی و اشکال فضایی، در پروتئین‌های غیرساختاری nsp12، nsp13، nsp14 و nsp16 مشاهده شد. ژن‌های کدکننده این پروتئین‌ها در ناحیه ژنی ORF1ab قرار دارند که در رونوشت برداری ویروس نقشی حیاتی دارد.

نتیجه‌گیری نهایی: بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر مجتمع رونوشت برداری شباهت‌های زیادی در بین کروناویروس‌های انسانی و دامی دارد. داده‌های تطبیقی و تحلیلی مجتمع رونوشت برداری ویروس‌های خانواده کروناویروس را می‌توان به عنوان یک هدف مهم جهت توسعه روش‌های تشخیص، انواع درمان‌های ضد ویروسی و طراحی واکسن مورد استفاده قرار داد.

کلمات کلیدی: دامی، ژنوم، سلسله‌تبار، کروناویروس، مجتمع رونوشت برداری

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: غلامرضا نیکبخت بروجنی، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

اعضای خانواده کرونا (*Coronaviridae*)، ویروس‌هایی پوشش‌دار با ژنوم RNA تک رشته‌ای مثبت می‌باشند. در بین ویروس‌های RNA، کروناویروس‌ها (*Coronaviruses*) با دارا بودن ژنومی به طول ۲۵ تا ۳۲ کیلوباز، طویل‌ترین توالی ژنومی را دارند (۱-۳). ویروس‌های این خانواده قادرند طیف وسیعی از میزبانان شامل پرندگان، دوزیستان، جوندگان، پستانداران وحشی و اهلی و انسان را آلوده کنند (۴-۶). تعدادی از اعضای این خانواده در اوایل دهه ۱۹۳۰ به عنوان عامل ایجاد برونشیت عفونی پرندگان، گاستروانتریت خوک، هیپاتیت حاد و عوارض عصبی در موش شناخته شدند (۶، ۷). کرونا ویروس‌های عامل بیماری انسان مدتی بعد و در دهه ۱۹۶۰ از میان پاتوژن‌های تنفسی انسان جداسازی و تشخیص داده شدند (۸، ۹). در اواخر سال ۲۰۰۲ میلادی، شیوع یکی از گونه‌های این خانواده با نام سارس (SARS-CoV) باعث بروز

عوارض تنفسی شدید (سندرم حاد تنفسی) در انسان شد. مرگ و میر ناشی از ابتلا به این ویروس حدود ۱۵ درصد اعلام شد (۱۰). تاکنون بیش از ۳۰ گونه جانوری مختلف از جمله خفاش نعل اسبی و انواعی از سیکوت‌ها به عنوان مظنونین انتقال ویروس به انسان معرفی شده‌اند (۱۱). ده سال پس از آن، در سال ۲۰۱۲ کرونا ویروس دیگری در منطقه خاورمیانه شیوع یافت که مرس (MERS-CoV) نام گرفت و مرگ و میر حدود ۳۷ درصدی را ثبت نمود (۱۰). در مورد ویروس MERS مطالعات متعدد نشان داد که شتر عامل اصلی انتقال آن به انسان بوده است (۱۲-۱۴). در سال ۲۰۱۹ میلادی، بیماری دیگری با علائم نسبتاً مشابه در کشور چین ظاهر شد و مطالعات بعدی ثابت کرد که عامل این بیماری از نظر ژنتیکی شباهت بسیار زیادی به ویروس سارس دارد. به همین دلیل ویروس نوظهور را سارس کوو-۲ (SARS-CoV-2) و بیماری ناشی از آن را کووید-۱۹ (COVID-19) نامیدند (۱۵، ۱۶). در مورد منشأ پیدایش بیماری همچنان فرضیه‌های متعددی مطرح است اما به نظر می‌رسد خفاش‌ها همانند اپیدمی ناشی از ویروس SARS-CoV یکی از عوامل اصلی انتقال این ویروس به انسان بوده‌اند (۱۷، ۱۸). بیماری کووید ۱۹ برخلاف اپیدمی‌های SARS و MERS زمانی شناسایی شد که تعداد زیادی از افراد آلوده به ویروس SARS-CoV-2 به مناطق مختلف جهان سفر کرده بودند. این مسئله سبب شد تا موارد متعددی از این بیماری به سرعت از سرتاسر جهان گزارش شود. به همین دلیل سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۲۰ برای این بیماری وضعیت همه‌گیری جهانی اعلام کرد (۱۹). بر اساس اطلاعات پایگاه Worldometer تا لحظه نگارش این مطالعه بیش از پانصد و شصت میلیون مورد از این بیماری در جهان گزارش شده است و بیش از ۶ میلیون نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست داده‌اند.

بر اساس طبقه‌بندی جدید، خانواده *Coronaviridae* را به دو زیر خانواده *Orthocoronavirinae* و *Letovirinae* تقسیم می‌کنند. زیرخانواده *Orthocoronavirinae* شامل چهار جنس آلفاکروناویروس، بتاکروناویروس، گاما کروناویروس و دلتاکروناویروس است (۶). به طور کلی آلفا و بتا کروناویروس‌ها عمدتاً پستانداران را آلوده کرده و موجب درگیری تنفسی در انسان و گوارشی در حیوانات می‌شوند (۲۰). گاما کروناویروس‌ها و دلتا کروناویروس‌ها عمدتاً پرندگان را آلوده می‌کنند؛ با این حال بعضی از آن‌ها می‌توانند پستانداران را نیز آلوده کنند (۲۱). تاکنون هفت کرونا ویروس انسانی شناسایی شده است که دو مورد آن یعنی (HCoV-229E) Human coronavirus 229E و (HCoV-NL63) Human coronavirus NL63 در جنس آلفا کرونا ویروس و پنج مورد دیگر یعنی (HCoV-HKU1) Human coronavirus HKU1، (HCoV-OC43) Human coronavirus OC43، MERS-CoV، SARS-CoV و SARS-CoV-2 در جنس بتا کرونا ویروس قرار دارند. با مشخص شدن توالی ژنومی SARS-CoV-2، این ویروس نیز در جنس بتا کروناویروس قرار داده شده است (۲۲، ۲۳).

در میزبان‌های مستعد، کرونا ویروس‌ها بیشتر از راه تنفسی و یا مدفوعی-دهانی منتقل می‌شوند و عموم آن‌ها اولین تکثیر خود را در یاخته‌های اپی‌تلیال انجام می‌دهند (۲۴، ۲۵). برخی نظیر HCoV-229E، HCoV-OC43 و Porcine respiratory coronavirus (PRCoV) اغلب در یاخته‌های اپی‌تلیال سیستم تنفسی تکثیر می‌شوند (۲۶). مابقی کرونا ویروس‌ها نظیر Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)، Bovine coronavirus (BCoV)، Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV)، Canine coronavirus (CCoV)، Feline coronavirus (FCoV) و سویه گوارشی Mouse hepatitis virus (MHV) یاخته‌های اپی‌تلیال لوله گوارش را آلوده می‌کنند (۲۷).

علائم ناشی از عفونت‌های کرونا ویروسی بسیار متنوع است. برخی از این ویروس‌ها عفونت‌های روده‌ای بی‌علامت ایجاد می‌کنند که در حیوانات بالغ موجب بقا ویروس در جمعیت می‌شود. از طرف دیگر برخی از این ویروس‌ها ممکن است باعث بروز بیماری شدید در میزبانان خود شوند. TGEV منجر به ایجاد اسهال در حیوانات جوان می‌شود و معمولاً کشنده است (۲۷، ۲۸). همچنین، SARS-CoV پس از ایجاد عفونت در مسیر هوایی فوقانی، باعث عفونت شدید مسیر تنفسی تحتانی شده و یا Feline infectious peritonitis virus (FIPV) به صورت سیستمیک گسترش می‌یابد و منجر به بیماری‌های تحلیل‌برنده در گربه‌سانان می‌شود (۲۹، ۳۰). گونه‌های کروناویروس موشی نیز موجب عفونت‌های تنفسی یا غدد اشکی و بزاقی می‌شوند و در صورت تداخل با سیستم ادراری-تناسلی ماده در تولید مثل نیز اختلال ایجاد می‌کنند. PHEV در خوک عمدتاً عفونت روده‌ای ایجاد می‌کند ولی می‌تواند نوروتروپیک هم باشد. عفونت حاصل از این ویروس اعصاب معده را درگیر کرده و مانع از تخلیه معده می‌شود که حاصل آن استفراغ و بیماری تحلیل‌برنده است (۳۱-۳۳).

ژنوم کرونا ویروس‌ها دو ناحیه UTR در دو سمت 3' و 5' دارد که شامل 7 تا 11 قاب خوانش (ORF) می‌شود. اولین ORF از سمت 5' UTR، ORF1ab است که دو سوم ژنوم ویروس را تشکیل می‌دهد و شانزده پروتئین غیر ساختاری را کد می‌کند که در فعالیت‌های رونوشت‌برداری و همانندسازی ژنوم نقش دارند. یک سوم باقی مانده ژنوم، پروتئین‌های ساختاری شامل گلیکوپروتئین اسپایک (S)، پروتئین ماتریکس (M)، پروتئین پوششی (E)، پروتئین نوکلئوکپسید (N) و هم چنین تعدادی پروتئین فرعی را تولید می‌کند که در بین کروناویروس‌های مختلف متفاوت است (۲۲، ۳۴، ۳۵).

با توجه به این که SARS-CoV-2 سومین کرونا ویروسی می‌باشد که پس از دو ویروس SARS-CoV و MERS-CoV در طول دو دهه اخیر توانسته است با عبور از گونه‌های حیوانی، انسان را آلوده کند، زنگ خطر توجه بیشتر به روند شیوع و بیماری‌زایی کرونا ویروس‌ها به صدا در آمده است. نظر به نقش مهم حیوانات در انتقال گونه‌های مختلف کروناویروس به انسان و احتمال بروز اپیدمی‌های زئونوتیک مشابه در دهه‌های آینده، مقایسه ژنومی و پروتئومی گونه‌های مختلف کروناویروسی و دستیابی به توالی حراست شده (Conserved) در بین اعضای این خانواده برای اهداف تشخیصی و یا درمانی و همچنین تولید واکسن کارآمد بسیار مفید است. در مطالعه حاضر مقایسه ژنومی، پروتئینی و سلسله تبار کروناویروس‌های مهم در حوزه پزشکی و دامپزشکی با هدف دستیابی به اطلاعات بیشتر و دقیق‌تر از تشابهات و تفاوت‌های ژنتیکی اعضای مختلف این خانواده صورت گرفته است.

مواد و روش کار

جمع‌آوری داده‌ها و مقایسه توالی‌ها: توالی کامل ژنوم و پروتئین‌های گونه‌های ویروسی مهم از لحاظ دامپزشکی از بانک ژن NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استخراج شد (جدول ۱). هر توالی با توالی متناظر خود در ویروس SARS-CoV-2 با استفاده از الگوریتم بلاست NCBI مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج به صورت درصد شباهت (Similarity) گزارش شد (جدول ۳). همچنین، توالی نوکلئوتیدی ژنوم هر یک از ویروس‌ها از پایگاه داده Virus Pathogen Resource (ViPR) دریافت و با استفاده از الگوریتم بلاست از نظر هومولوژی با ژنوم ویروس SARS-CoV-2 مورد مقایسه قرار گرفت (جدول ۴). در ادامه درصد شباهت توالی پروتئین‌های غیرساختاری در گونه‌های مختلف این خانواده در مقایسه با توالی متناظر آن‌ها در ویروس SARS-CoV-2 مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن در تصویر ۲ قابل مشاهده است.

پیش‌بینی شکل فضایی پروتئین‌ها: پس از مقایسه توالی‌های خطی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی، جهت ترسیم و پیش‌بینی شکل فضایی پروتئین‌ها، از سرور Robetta استفاده شد. این سرور جهت ترسیم ساختار سه بعدی پروتئین‌ها از مدل‌سازی‌های هومولوژی و *ab initio* به صورت ترکیبی استفاده می‌کند. در مدل‌سازی هومولوژی، اشکال سه بعدی پروتئینی که ساختاری نامشخص دارد را بر اساس تشابه توالی با پروتئین‌های واجد اشکال مشخص ترسیم می‌کنند. در مدل‌سازی *ab initio* ساختار سه بعدی مد نظر محققین فقط بر اساس اطلاعات مربوط به توالی پروتئین ترسیم می‌شود. لازم به ذکر است که برخی از مدل‌های سه بعدی پروتئین‌های غیرساختاری کرونا ویروس‌ها قبلاً در سایر مطالعات گزارش شده است. این مدل‌ها از پایگاه RCSB (<https://www.rcsb.org/>) استخراج گردید. لیست این مدل‌ها و PDB ID هر کدام از آن‌ها در جدول ۲ قابل مشاهده است.

جدول ۱. میزبان و شماره دسترسی به مرجع اخذ داده برای گونه‌های کرونا ویروسی مورد مطالعه در پژوهش حاضر.

Accession Number (NC)	میزبان	گونه
۰۴۵۵۱۲/۲	انسان	SARS-COV-2
۰۰۴۷۱۸/۳	انسان	SARS CoV Tor2
۰۱۹۸۴۳/۳	انسان	MERS
۰۰۵۸۳۱/۲	انسان	HCoV-NL63
۰۰۶۵۷۷/۲	انسان	HCoV-HKU1
۰۰۳۰۴۵/۱	گاو	BCoV
۰۰۱۴۵۱/۱	طیور	IBV
۹۸۱۶۴۴/۱	سگ	CCoV
۰۰۲۳۰۶/۳	گره	FCoV

جدول ۲. مدل‌های سه بعدی مربوط به پروتئین‌های غیرساختاری کرونا ویروس‌ها و PDB ID هرکدام از آن‌ها.

PDB ID	نوع ویروس	نوع پروتئین	ردیف	PDB ID	نوع ویروس	نوع پروتئین	ردیف
7E6R	NL63HCoV-	nsp5	۱۱	K7P7	CoV-2SARS-	nsp1	۱
3D23	HCoV-HKU1	nsp5	۱۲	2HSX	SARS-CoV	nsp1	۲
6WXD	CoV-2SARS-	nsp9	۱۳	6W9C	CoV-2SARS-	nsp3	۳
1QZ8	SARS-CoV	nsp9	۱۴	7LFU	SARS-CoV	nsp3	۴
5C94	IBV	nsp9	۱۵	4RNA	MERS-CoV	nsp3	۵
6ZCT	CoV-2SARS-	nsp10	۱۶	7NTT	CoV-2SARS-	nsp5	۶
2GA6	SARS-CoV	nsp10	۱۷	7K0H	SARS-CoV	nsp5	۷
6W01	CoV-2SARS-	nsp15	۱۸	4RSP	MERS-CoV	nsp5	۸
2H85	SARS-CoV	nsp15	۱۹	2Q6D	IBV	nsp5	۹
5YVD	MERS-CoV	nsp15	۲۰	4ZRO	FCoV	nsp5	۱۰

جدول ۳. درصد شباهت توالی‌های اسیدآمین‌ه کرونا ویروس‌های مختلف درمقایسه با توالی‌های متناظر آن‌ها در SARS-CoV-2.

HKU1	SARS-CoV	BCoV	IBV	MERS	NL۶۳	FCoV	CCoV	
۴۸/۸۵	۸۶/۰۹	۴۹/۰۸	۴۴/۴۱	۵۰/۸۵	۴۷/۰۰	۴۵/۳۷	۴۵/۸۳	ORF1ab
۵۵/۴۳	۷۵/۹۶	۳۷/۶۸	۳۵/۹۱	۳۵/۱۰	۳۰/۷۸	۳۱/۹۵	۳۲/۰۷	S
۳۶/۳۶	۹۰/۵۴	۳۹/۰۷	۳۴/۳۸	۴۲/۸۶	۳۱/۱۰	۳۱/۵۸	۳۲/۰۸	M
۳۶/۷۴	۹۰/۵۲	۳۸/۹۴	۲۹/۶۶	۴۸/۴۹	۴۸/۲۸	۳۱/۸۸	۳۰/۵۶	N
۳۱/۵۱	۹۴/۷۴	۳۰/۷۷	۲۱/۳۳	۳۶/۰۰	۱۸/۴۶	۲۸/۹۵	۳۳/۳۳	E
-	۱۱/۶۱	-	NS	-	NS	NS	NS	ORF3a
-	۸۲/۲۵	-	-	-	۳۸/۸۹	NS	-	ORF3b
-	۸۱/۴۰	-	-	-	-	NS	NS	ORF7a
-	۸۱/۴۰	-	-	-	-	NS	NS	ORF7b
-	۶۸/۸۵	-	-	-	-	-	-	ORF6
-	۳۱/۷۱	-	-	-	-	-	-	ORF8a
-	۴۰/۴۰	-	-	-	-	-	-	ORF8b

-: این ناحیه ژنی در این ویروس کد نمی‌شود. NS: شباهت معنی‌داری یافت نشد.

تحلیل دو به دو تشابهات ساختاری: از میان مدل‌های سه بعدی موجود در پایگاه RCSB و همچنین براساس نتایج پیش‌بینی و ترسیم اشکال پروتئین‌هایی که مدل سه بعدی آن‌ها در دسترس نبود، مجموعه‌ای از مدل‌ها با ۳ شرط جهت ورود به تحلیل‌های بعدی انتخاب شدند: ۱- در رابطه با مدل‌هایی که ساختار آن‌ها با سرور Robetta پیش‌بینی شد، تنها مدل‌هایی انتخاب شدند که سطح اطمینان سرور از دقت کلی ساختار فضایی آن‌ها بالاتر از ۷۰ درصد بود. ۲- مدل‌های فضایی مربوط به توالی‌های اسیدآمین‌ه که کمتر از ۳۰ درصد شباهت با توالی متناظر خود در ویروس SARS-CoV-2 داشتند از مجموعه کنار گذاشته شدند. ۳- توالی‌های اسیدآمین‌ه که با توالی متناظر خود در ویروس SARS-CoV-2 کمتر از ۹۰ درصد هم‌پوشانی (Covariance) داشتند از مجموعه حذف شدند. در ادامه با استفاده از روش "تحلیل دو به دو تشابهات ساختاری" (Pairwise structure alignment analysis) که در پایگاه RCSB موجود است (www.rcsb.org/alignment)، میزان شباهت ساختاری و ترکیبی (Conformation) پروتئین‌های ویروس SARS-CoV-2 با پروتئین‌های متناظر موجود در سایر کرونا ویروس‌ها (پروتئین‌های حائز ۳ شرط مطرح شده) محاسبه شد. بدین منظور برای مقایسه‌ها از الگوریتم jFATCAT (rigid) استفاده شد. از این الگوریتم معمولاً هنگام مقایسه ساختار فضایی پروتئین‌هایی که از نظر تکاملی قرابت زیادی دارند استفاده می‌شود. نتایج این مرحله با شاخص مدل امتیازدهی قالبی یا (Template modeling score (TM-score) گزارش شده است. امروزه این شاخص یکی از مهم‌ترین شاخص‌های بررسی میزان شباهت ساختار فضایی دو پروتئین می‌باشد. میزان TM-score می‌تواند بین مقادیر صفر و یک متغیر باشد و هر چه TM-score به عدد یک نزدیک‌تر باشد، آن دو پروتئین از نظر ساختار فضایی به هم شبیه‌تر هستند (۳۶، ۳۷).

جدول ۴. نتایج حاصل از هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی ناحیه ORF1ab اعضای مهم خانواده *Coronaviridae* و ژنوم ویروس SARS-CoV-2.

Identity(درصد)	Score(bits)	Protein sequence	Blast Report (nt)	Query
۸۱	۷۵/۸	ORF 1Ab	۲۰۸۷۲-۲۰۷۱۵	BCoV
۸۴	۶۱/۹	polyprotein	۱۵۰۰۴-۱۴۹۲۲	
۸۲	۶۰/۰		۱۵۷۶۰-۱۵۶۶۳	
۹۰	۶۰/۰		۱۹۱۷۴-۱۹۱۲۵	
۸۸	۵۸/۰		۱۷۳۲۳-۱۷۲۷۱	
۸۹	۵۴/۰		۱۵۱۹۰-۱۵۱۴۴	
۸۹	۵۲/۰		۱۴۳۴۴-۱۴۲۹۹	
۹۱	۵۰/۰		۱۴۶۵۵-۱۴۶۱۹	
۸۷	۴۶/۱		۱۷۴۸۲-۱۷۴۳۶	
۹۷	۸۱/۸	ORF 1Ab	۱۴۲۱۸-۱۴۱۷۴	IBV
۹۰	۵۲/۰	polyprotein	۱۳۷۱۴-۱۳۶۷۳	
۸۴	۴۶/۱		۱۸۱۲۴-۱۸۰۶۶	
۸۵	۱۲/۵	ORF 1Ab	۱۹۴۳۰-۱۹۲۸۴	HKU2
۸۰	۸۱/۸	polyprotein	۱۵۲۶۳-۱۵۰۶۷	
۸۱	۷۵/۸		۲۱۱۱۹-۲۰۹۷۴	
۸۳	۶۵/۹		۱۶۰۲۵-۱۵۹۲۵	
۱۰۰	۶۰/۰		۱۵۴۳۲-۱۵۴۰۳	
۹۱	۶۰/۰		۱۵۵۷۷-۱۵۵۳۲	
۸۸	۵۰/۰		۱۷۵۸۲-۱۷۵۳۳	
۹۱	۵۰/۱		۱۷۰۹۸-۱۷۰۶۲	
۸۵	۴۸/۱		۱۴۲۴۹-۱۴۱۹۴	
۸۴	۱۱/۹		۱۹۴۳۰-۱۹۲۷۹	
۹۵	۷۹/۸	ORF 1Ab	۱۴۲۸۶-۱۴۲۳۹	Human coronavirus NL63
۸۷	۶۳/۹	polyprotein	۱۳۰۶۱-۱۲۹۹۸	
۸۷	۶۰/۰		۱۴۰۴۷-۱۳۹۹۰	
۸۵	۵۶/۰		۱۸۲۸۶-۱۸۲۲۳	
۸۹	۵۴/۰		۱۹۸۲۵-۱۹۷۷۹	
۹۵	۷۹/۸		۱۴۲۸۶-۱۴۲۳۹	
۸۹	۸۹/۷	ORF 1Ab	۱۵۰۷۸-۱۵۰۰۲	MERS
۸۶	۷۵/۸	polyprotein	۱۶۰۱۴-۱۵۹۲۹	
۷۹	۷۱/۹		۱۴۸۱۵-۱۴۶۲۸	
۹۳	۶۹/۹		۱۵۲۹۴-۱۵۲۴۸	
۹۲	۵۸/۰		۲۰۸۳۲-۲۰۷۹۲	
۸۶	۵۶/۰		۱۶۷۸۵-۱۶۷۲۶	
۹۰	۵۴/۰		۱۵۵۰۰-۱۵۴۵۸	
۹۴	۵۴/۰		۱۷۷۶۹-۱۷۷۳۵	
۹۲	۵۲/۰		۱۵۸۰۷-۱۵۷۷۰	
۹۲	۵۲/۰		۱۷۰۸۵-۱۷۰۴۸	
۹۰	۵۰/۱		۱۴۳۱۰-۱۴۲۷۰	
۹۱	۴۶/۱		۱۷۸۲۹-۱۷۷۹۵	
۸۵	۹۰/۱۰	ORF 1Ab	۲۱۴۸۵-۱۱۰۸۶	SARS-CoV
۸۲	۷۳/۳	polyprotein	۱۰۹۰۲-۹۶۹۴	
۸۱	۴۴/۲		۱۰۹۱-۲۶۵	
۷۹	۴۱/۴		۸۴۹۴-۷۲۷۶	
۷۷	۲۷/۶		۶۴۱۳-۴۸۹۳	
۸۲	۲۵/۰		۹۲۶۳-۸۸۲۷	
۸۱	۱۴/۹		۳۰۶۲-۲۷۶۱	
۸۱	۹۷/۶		۶۸۷۰-۶۶۹۴	
۸۴	۹۱/۷		۸۷۲۴-۸۶۰۷	

۸۷	۷۳/۸		۴۳۴۲-۴۲۸۶	
۸۶	۶۲/۹		۱۵۴۷-۱۴۸۰	
۸۳	۶۰/۱۰		۱۳۱۰-۱۲۲۵	
۹۰	۶۰/۱۰		۱۷۲۱-۱۶۷۲	
۹۶	۵۶/۱۰		۳۳۱۱-۳۲۸۰	
۸۷	۵۲/۱۰		۴۱۵۵-۴۱۰۲	
۹۰	۴۸/۱		۹۵۵۷-۹۵۱۸	
۱۰۰	۶۹/۹	ORF 1Ab	۱۸۴۷۰-۱۸۴۳۶	CCoV
۸۹	۶۱/۹	polyprotein	۱۸۱۶۹-۱۸۱۱۵	
۸۴	۶۰/۱۰		۱۷۷۶۱-۱۷۶۸۰	
۸۹	۴۶/۱		۱۶۷۹۳-۱۶۷۵۵	
۹۲	۷۷/۸	ORF 1Ab	۱۸۲۵۰-۱۸۱۹۶	FCoV
۸۵	۶۱/۹	polyprotein	۱۷۸۳۵-۱۷۷۶۱	
۹۳	۴۸/۱		۱۸۵۴۸-۱۸۵۱۷	

جدول ۵. نتایج بررسی تشابهات دوبه دو ساختاری پروتئین‌های کدشونده توسط ناحیه ژنی ORF1ab.

۱۶	۱۵	۱۴	۱۳	۱۲	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	nsp1	-----
nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	SARS
۰/۹۹	۰/۹۹	۰/۹۸	۰/۹۹	۰/۹۹	۰/۹۳	۰/۹۴	*	۰/۹۸	۰/۷۱	۰/۹۷	*	۰/۹۵	*	۰/۷۷	
۰/۹۶	۰/۹۵	۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۹۹	۰/۸۳	۰/۸۶	*	۰/۸۳	*	۰/۹۴	*	۰/۸۴	-	-	MERS
۰/۹۵	۰/۸۹	۰/۹۷	۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۸۵	۰/۷۶	*	۰/۷۵	-	۰/۸۸	-	-	-	-	IBV
۰/۹۷	۰/۹۰	۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۹۸	۰/۸۷	۰/۸۵	*	۰/۶۸	-	۰/۹۲	-	-	-	-	FCoV
۰/۹۷	۰/۸۹	۰/۹۴	۰/۹۵	۰/۹۸	۰/۸۷	۰/۸۶	*	۰/۶۶	*	۰/۸۸	-	-	-	-	CCoV
۰/۹۸	۰/۸۷	۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۹۸	۰/۸۷	۰/۸۶	*	۰/۷۲	۰/۶۱	۰/۹۳	*	-	-	-	B CoV
۰/۹۴	۰/۸۹	۰/۹۲	۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۸۷	۰/۸۴	*	۰/۶۶	۰/۵۰	۰/۹۲	-	-	-	-	NL63HCoV-
۰/۹۷	۰/۸۶	۰/۹۸	۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۸۳	۰/۸۸	*	۰/۷۶	۰/۵۶	۰/۹۳	*	-	-	-	HKU1HCoV-

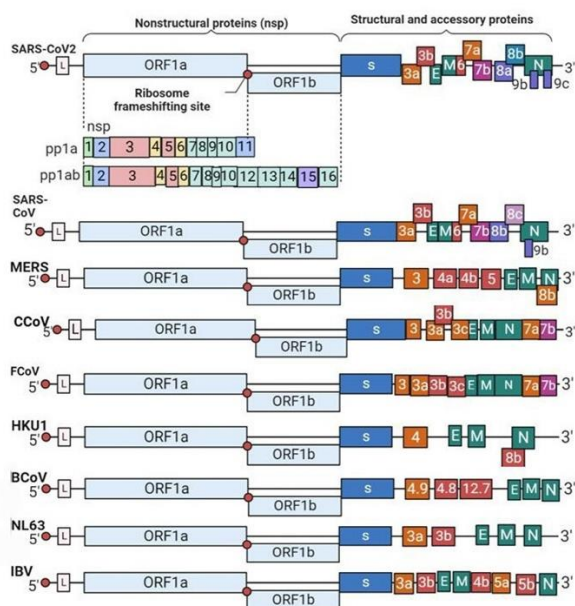
*عدم دقت کافی (کمتر از ۷۰ درصد) مدل‌های سه بعدی پیش بینی شده توسط سرور *Robetta* - خطوط تیره نشان‌دهنده شباهت کمتر از ۳۰ درصد توالی‌های اسیدآمینه ویروس SARS-CoV-2 با سایر کرونا ویروس‌ها است. همچنین، اعداد گزارش شده نشان‌دهنده میزان شاخص TM-score حاصل از مقایسه ساختار فضایی پروتئین غیرساختاری مربوطه در ویروس SARS-CoV-2 و سایر اعضای خانواده *Coronaviridae* است.

تحلیل سلسله تبار: به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، درخت سلسله تبار بر اساس توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژنوم کامل و همچنین توالی‌های اسیدآمینه و با استفاده از متد Neighbor-joining با کمک روش Clustal W و با Bootstrap 1000 رسم شد. برای ترسیم درخت سلسله تبار از نرم‌افزار MEGA Version 7 استفاده شد.

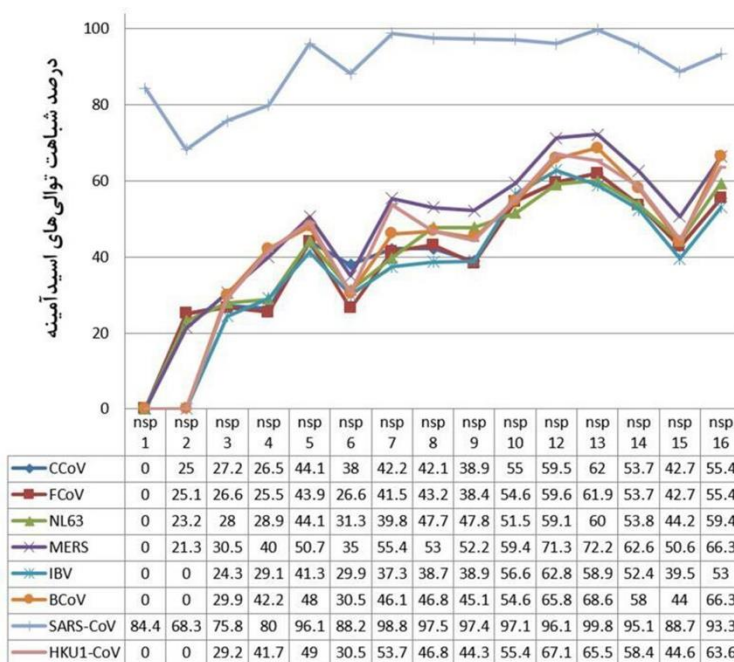
نتایج

نتایج تحلیل همسانی (هومولوژی): در تصویر ۱ ساختار ژنوم ویروس SARS-CoV-2 با ژنوم سایر کروناویروس‌های مهم بیماریزا در دام مقایسه شده است. نتایج بررسی توالی پروتئین‌ها نشان داد که پروتئین‌های ساختاری S، M، N و E در گونه SARS-CoV درصد شباهت بالایی با SARS-CoV-2 دارد ولی در سایر گونه‌ها شباهت پایین‌تر از ۵۰ درصد است (جدول ۳). همچنین، یافته‌های حاصل از هم‌ریدی سازی ژنوم کامل کرونا ویروس‌ها و ویروس SARS-CoV-2 نشان‌دهنده نواحی مشترک حراست شده در توالی پروتئینی ناحیه ORF1ab است (جدول ۴). با توجه به نتایج به‌دست آمده ناحیه ORF1ab برای تحلیل هم‌ریدی انتخاب شد. این ناحیه در بین گونه‌های مختلف بررسی و داده‌های مربوط به هر توالی (nt) با مشابهت بالاتر از ۸۰ درصد گزارش شدند (جدول ۴).

هومولوژی پروتئین‌های کد شده توسط ناحیه ژنومی ORF1ab در گونه‌های مهم بیماریزای کرونا ویریده به تفکیک با پروتئین مترادف آن‌ها در SARS-CoV-2 بررسی شد. نتایج این مقایسه نشان داد که پروتئین غیر ساختاری nsp1 به غیر از گونه SARS-CoV که هومولوژی بالایی با SARS-CoV-2 دارد (۸۴/۴۴ درصد)، در سایر گونه‌ها از تنوع زیادی برخوردار است که در مقایسه با SARS-CoV-2 درصد شباهت قابل ارزیابی ندارد.

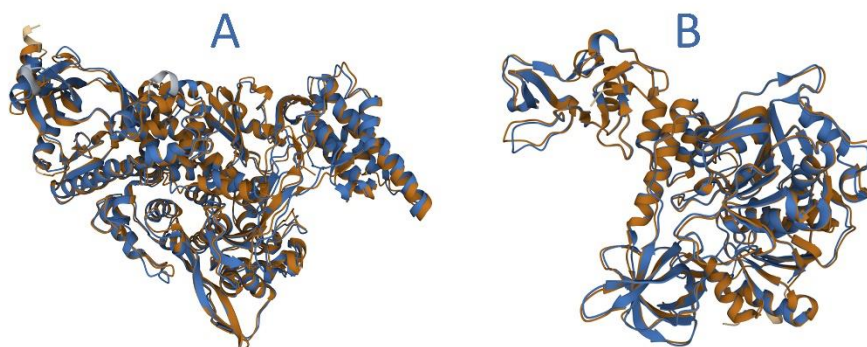


تصویر ۱. ترکیب و ساختار ژنوم کروناویروس SARS-CoV-2 (strain WH-Human 1 CoV) در مقایسه با کرونا ویروس‌های مهم دامپزشکی. در ساختار ژنوم کرونا ویروس‌ها ORF1ab اولین قاب خوانش از سمت 5'UTR است که دو سوم ژنوم ویروس را تشکیل می‌دهد و شانزده پروتئین غیر ساختاری را کد می‌کند. یک سوم باقی مانده ژنوم، پروتئین‌های ساختاری شامل گلیکوپروتئین اسپایک (S)، ماتریکس (M)، پوشش ویروس (E) و نوکلئوکپسید (N) را کد می‌کند.

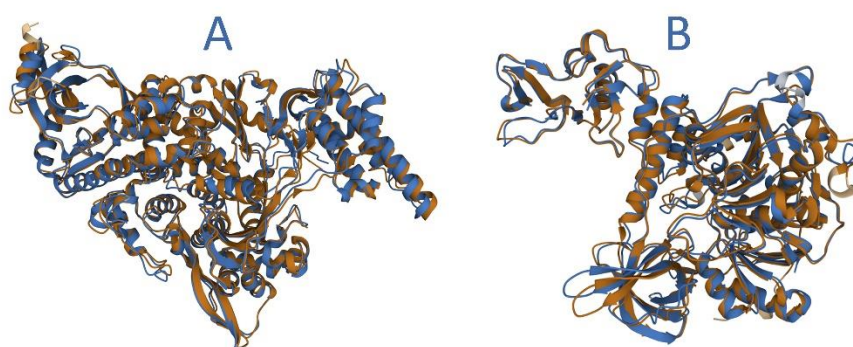


تصویر ۲. درصد شباهت توالی‌های اسیدآمینه پروتئین‌های کد شونده توسط ORF1ab در کرونا ویروس‌های مختلف در مقایسه با توالی‌های متناظر در ویروس SARS-CoV-2.

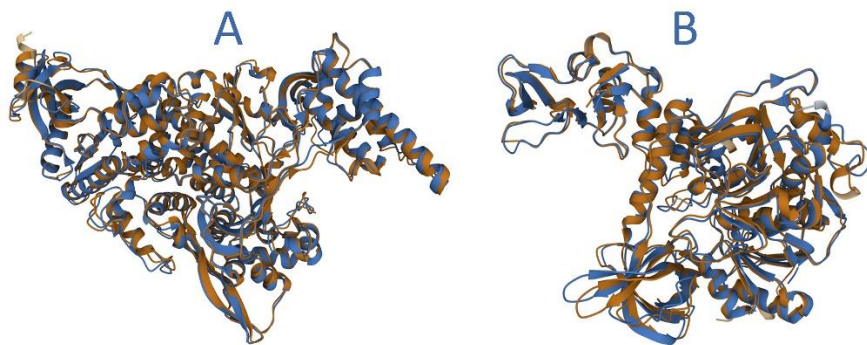
همچنین، بررسی هومولوژی سایر پروتئین‌های غیر ساختاری نشان داد که پروتئین‌های غیر ساختاری nsp2، nsp3، nsp4، nsp5، nsp6، nsp7، nsp8، nsp9 و nsp15 در کرونا ویروس‌های انتخاب شده درصد شباهت پایینی به پروتئین متناظر خود در SARS-CoV-2 دارند و از این بین nsp2، nsp3 و nsp4 درصد شباهت بسیار پایینی داشتند، به استثنای SARS-CoV که در تمام پروتئین‌های ساختاری و غیر ساختاری درصد شباهت بالایی با SARS-CoV-2 داشت.



تصویر ۳. مقایسه ساختار سه بعدی پروتئین‌های (A) nsp12 و (B) nsp13 در ویروس SARS-CoV-2 (ساختار قهوه‌ای) و ویروس IBV (ساختار آبی).



تصویر ۴. مقایسه ساختار سه بعدی پروتئین‌های (A) nsp12 و (B) nsp13 در ویروس SARS-CoV-2 (ساختار قهوه‌ای) و ویروس FCoV (ساختار آبی).



تصویر ۵. مقایسه ساختار سه بعدی پروتئین‌های (A) nsp12 و (B) nsp13 در ویروس SARS-CoV-2 (ساختار قهوه‌ای) و ویروس CCoV (ساختار آبی).

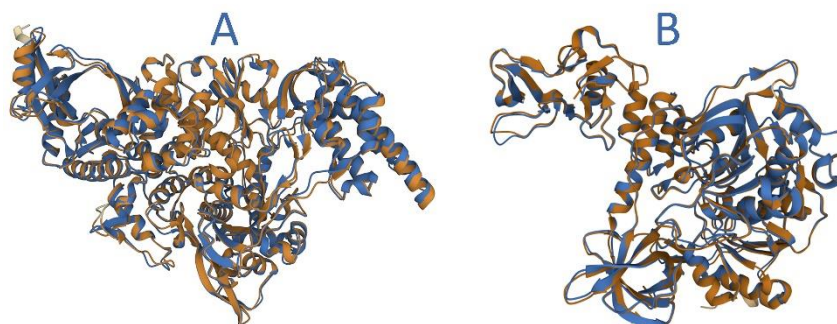
در بین پروتئین‌های ساختاری و غیر ساختاری، نواحی مربوط به پروتئین‌های غیر ساختاری nsp12، nsp13، nsp14 و nsp16 بیشتر حراست شده‌اند و در این بین پروتئین‌های nsp12 و nsp13 بالاترین درصد شباهت بین گونه‌ای را دارا بودند (تصویر ۲).

نتایج بررسی دو به دو تشابهات ساختاری: به طور کلی به نظر می‌رسد نتایج این بخش با نتایج ذکر شده در بخش تحلیل همولوژی توالی‌ها مطابقت داشت. همان طور که در جدول ۵ قابل مشاهده است، TM-score حاصل از مقایسه ساختار فضایی پروتئین‌های nsp12، nsp13، nsp14 و nsp16 در ویروس SARS-CoV-2 و دیگر اعضای کروناویروس از سایر پروتئین‌های غیرساختاری بیشتر بود. در رابطه با پروتئین‌های nsp12 و nsp13 مقدار TM-score در تمام گونه‌ها بزرگ‌تر یا مساوی با ۰/۹۵ بود که نشان‌دهنده وجود نوعی ساختار فضایی حراست شده در این پروتئین‌ها می‌باشد. مقدار TM-score حاصل از مقایسه ساختار فضایی پروتئین nsp12 در ویروس SARS-CoV-2 و ویروس‌های IBV، FCoV، CCoV و BCoV برابر با عدد ۰/۹۸ بود (به ترتیب تصاویر ۳-۶). مقدار این شاخص در مقایسه ساختار فضایی پروتئین nsp13 در ویروس‌های پیش‌تر ذکر شده نیز به ترتیب برابر ۰/۹۷، ۰/۹۵، ۰/۹۵ و ۰/۹۸ بود که نتایج آن در تصاویر ۳ تا ۶ قابل مشاهده

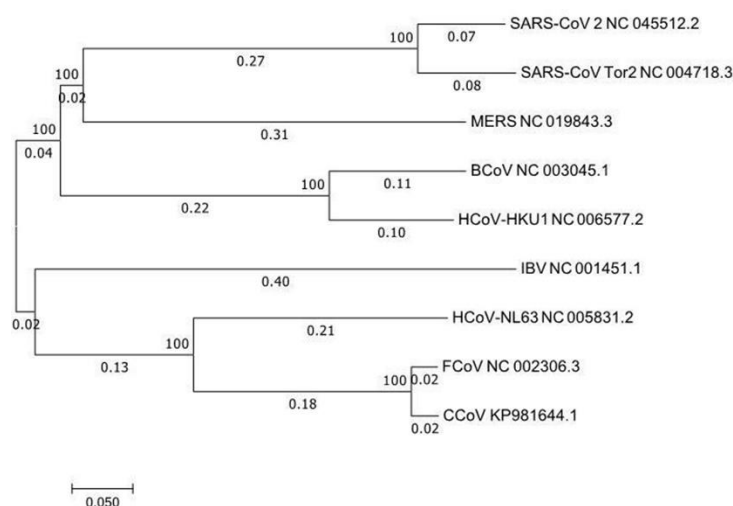
می‌باشد. همچنین مقدار TM-score پروتئین‌های nsp14 و nsp16 در تمام گونه‌ها به ترتیب از عدد ۰/۹۴ و ۰/۹۲ بیشتر بود. در رابطه با TM-score سایر پروتئین‌ها یک یا چند عدد کوچک‌تر از ۰/۹ وجود داشت.

نتایج تحلیل سلسله‌تبار: مطابق با نتایج به دست آمده از تحلیل ژنوم کامل ویروس‌ها، گونه‌های SARS-CoV، SARS-CoV-2، MERS-CoV، BCoV و HCoV-HKU1 نیای مشترکی داشتند. کرونا ویروس گاو (BCoV) و انسان (HKU1) قرابت ژنتیکی بیشتری داشتند و همچنین ویروس‌های SARS-CoV و SARS-CoV-2 در یک زیرشاخه قرار گرفته و به هم نزدیک‌تر بودند. این دو با یک شاخه از MERS-CoV جدا شده‌اند. کرونا ویروس‌های FCoV و CCoV نیز قرابت ژنتیکی بیشتری داشتند و با کرونا ویروس انسانی NL63 دارای یک نیای مشترک بودند و همچنین کروناویروس IBV از طریق یک شاخه بلند با این سه گونه نیای مشترکی داشت (تصویر ۷).

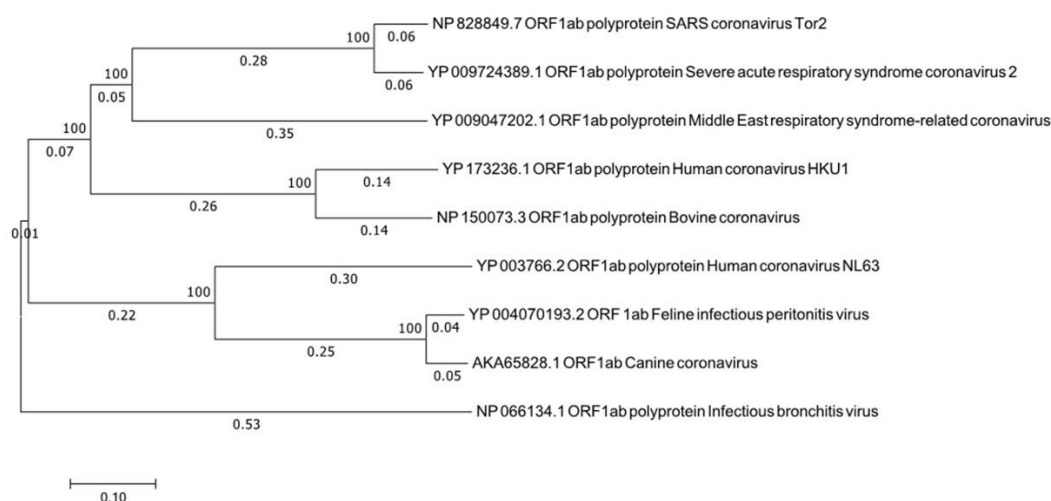
در ادامه، توالی ORF1ab مبنای رسم درخت سلسله‌تبار در نظر گرفته شد. همانند تحلیل قبل، نتایج این تحلیل نیز نشان داد که گونه‌های SARS-CoV، SARS-CoV-2، MERS-CoV، BCoV و HCoV-HKU1 نیای مشترکی داشتند. بر اساس نتایج حاصل، قرابت ژنتیکی بالایی میان SARS-CoV و SARS-CoV-2 و همچنین FCoV و CCoV مشاهده شد. گونه HCoV-NL63 و دو گونه CCoV و FCoV نیز دارای نیای مشترکی بودند. کرونا ویروس IBV نیز از طریق یک شاخه بلند از سایر گونه‌ها جدا شده بود. نتایج این تحلیل در تصویر ۸ قابل مشاهده است.



تصویر ۶. مقایسه ساختار سه بعدی پروتئین‌های (A) nsp12 و (B) nsp13 در ویروس SARS-CoV-2 (ساختار قهوه‌ای) و ویروس BCoV (ساختار آبی).



تصویر ۷. درخت سلسله‌تبار حاصل از تحلیل و مقایسه ژنوم کامل ویروس SARS-CoV-2 و سایر گونه‌های کروناویروس. این درخت بر اساس توالی ژنوم کامل مرتبط با ۹ کروناویروس انسانی و دامی رسم شد. درخت با مجموع طول شاخه ۲/۲۰۴۹۲۲۴۸ نشان داده شده است. طول شاخه‌ها در کنار شاخه‌ها نمایش داده شده است. برای محاسبه فاصله تکاملی از متد Maximum Composite Likelihood و با Bootstrap 1000 استفاده شده است.



تصویر ۸. درخت سلسله تبار بر اساس توالی پروتئینی ORF1ab مرتبط با ۹ کروناویروس انسانی و دامی رسم شد. درخت با مجموع طول شاخه ۲/۸۱۰۹۲۹۲۰ نشان داده شده است. طول شاخه‌ها در کنار شاخه‌ها نمایش داده شده است. برای محاسبه فاصله تکاملی از متد Maximum Composite Likelihood و با Bootstrap 1000 استفاده شده است.

بحث

کروناویروس‌ها طیف وسیعی از میزبانان را آلوده کرده و برخی از گونه‌های جانوری در انتقال بیماری‌های ناشی از این خانواده ویروسی به انسان نقش مهمی دارند. با توجه به این موارد، امکان انتقال بین گونه‌ای از حیوانات به انسان و بروز اپیدمی‌ها و همه‌گیری‌های مشابه در آینده دور از انتظار نیست. این مسئله لزوم توجه به کروناویروس‌های جانوری را بیش از پیش برجسته می‌سازد. بنابراین، بررسی تشابهات و تفاوت‌های بین گونه‌ای اعضای خانواده کرونا در سطح نوکلئوتید، اسیدآمینه و ساختار فضایی پروتئین‌ها با هدف دستیابی به نواحی حراست شده می‌تواند برای تشخیص ویروس و طراحی واکسن‌هایی که قادر به تحریک ایمنی سلولی هستند و همچنین تولید پادتن‌های خنثی کننده متقاطع (Cross-neutralizing antibodies) بسیار مفید باشد. اثر این پادتن‌ها اگر بر علیه طیف وسیعی از کروناویروس‌ها مؤثر باشند از اهمیت زیادی در پزشکی و دامپزشکی و به‌ویژه سلامت واحد برخوردار است.

در مطالعه حاضر، یافته‌های حاصل از هم‌ردیفی توالی ژنوم برخی از ویروس‌های کروناویروس (دارای اهمیت از نظر دامپزشکی و پزشکی) و ویروس SARS-CoV-2 نشان داد که نواحی حراست شده عمدتاً در ناحیه ORF1ab قرار گرفته‌اند. این یافته در برخی از مطالعات پیشین برای سایر گونه‌ها نیز گزارش شده است (۳۸، ۳۹). به عنوان مثال در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ (قبل از شیوع ویروس‌های MERS-CoV و SARS-CoV-2) توسط Woo و همکاران به چاپ رسیده است نیز از ORF1ab به عنوان محل قرارگیری عمده توالی‌های حراست شده برخی از اعضای خانواده *Coronaviridae* یاد شده است (۴۰). در ادامه، بررسی دقیق‌تر ORF1ab مشخص کرد که از میان پروتئین‌های کد شونده توسط این ناحیه، nsp12، nsp13، nsp14 و nsp16 بیشترین شباهت بین گونه‌ای را دارا هستند و گونه‌های مختلف این خانواده از نظر توالی اسیدآمینه مربوط به این ۴ پروتئین حداقل ۵۰ درصد شباهت با توالی‌های متناظر SARS-CoV-2 دارند. این شباهت سبب شد تا در مرحله بعد با استفاده از سرور Robetta ساختار فضایی پروتئین‌های کدشونده توسط ناحیه ژنی ORF1ab پیش‌بینی شود تا علاوه بر مقایسه توالی‌های خطی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی، بتوان ساختار فضایی پروتئین‌های مربوطه را در ویروس SARS-CoV-2 و سایر کرونا ویروس‌ها مقایسه کرد (۴۱).

همان‌طور که ذکر شد، امروزه به فراوانی از شاخص TM-score در مطالعات ایمونوبیوانفورماتیک استفاده می‌شود. بنا بر نتایج مطالعات پیشین، TM-score کمتر از ۰/۲ معمولاً نشان‌دهنده عدم وجود شباهت ساختاری میان دو پروتئین است، حال آن‌که در صورتی که این شاخص از عدد ۰/۵ بزرگ‌تر باشد در اغلب موارد نشان‌دهنده نحوه تاخوردگی (Folding) یکسان دو پروتئین است (۳۶، ۳۷). اعداد موجود در **جدول ۵** نشان‌دهنده آن است که شاخص TM-score مربوط به همه پروتئین‌های غیرساختاری بالاتر از عدد ۰/۵ است. این موضوع نشان داد

که اساس ساختار فضایی مربوط به پروتئین‌های غیرساختاری در همه گونه‌های کرونا ویروسی یکسان می‌باشد و شباهت غیرقابل انکاری میان آن‌ها مشاهده می‌شود. میزان این شباهت‌ها در پروتئین‌های nsp12، nsp13، nsp14 و nsp16 به حداکثر می‌رسد و این نتیجه‌گیری با نتایج حاصل از تحلیل هومولوژی توالی‌ها کاملاً مطابقت دارد.

نتایج حاصل از تحلیل سلسله تبار بر مبنای ORF1ab نشان داد که گونه‌هایی که قرابت بیشتری داشتند، درصد شباهت بالاتری نیز در توالی ORF1ab دارند. در مطالعات پیشین نیز از بخشی از پروتئین‌های کدشونده توسط ناحیه ژنی ORF1ab جهت انجام تحلیل سلسله تبار استفاده شده است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای از RNA پلیمرز وابسته به RNA جهت ترسیم درخت سلسله تبار اعضای خانواده *Coronaviridae* استفاده شد. نتایج این مطالعه مطابقت بالایی با نتایج مطالعه حاضر دارد (۴۰). لازم به ذکر است که nsp12 و nsp13 برخی از کرونا ویروس‌های جدا شده از خفاش‌ها شباهت بالایی با SARS-CoV-2 دارند. این یافته یکی از دلایل مطرح بودن خفاش‌ها به عنوان عامل انتقال ویروس SARS-CoV-2 به انسان است (۴۲).

مطابق با نتایج مطالعات پیشین، nsp12 یک RNA پلیمرز وابسته به RNA است و nsp13 هم نقش هلیکازی دارد. همچنین، عملکرد nsp14 غلطگیری (proofreading) است و nsp16 به عنوان یک ریبوز متیل ترانسفراز فعالیت می‌کند. به بیان دقیق‌تر، نقش اصلی این ۴ پروتئین غیرساختاری، تنظیم فعالیت‌های مرتبط با رونوشت برداری ویروس می‌باشد (۴۳-۴۶). بنابراین، به نظر می‌رسد سازوکارهای مرتبط با رونوشت برداری ویروس‌های این خانواده تا حد زیادی میان اعضای آن حفظ شده است.

برخلاف ORF1ab، پروتئین‌های ساختاری مهم این خانواده نظیر گلیکوپروتئین اسپایک، پروتئین ماتریکس، پروتئین پوششی و پروتئین نوکلئوکپسید تنوع بالایی در میان اعضای مختلف دارند و به نظر می‌رسد توالی‌های حفاظت شده قابل توجهی در مقایسه با پروتئین‌های کدشونده توسط ناحیه ژنی ORF1ab در آن‌ها وجود ندارد. البته در رابطه با وجود یا عدم وجود ساختار فضایی حفاظت شده در پروتئین‌های ساختاری نیاز است تا مطالعات بیشتری انجام شود.

همان‌طور که در جدول ۳ مشخص است، شباهت فضایی بالایی میان پروتئین‌های غیرساختاری اعضای خانواده کروناویریده وجود دارد. این شباهت فضایی می‌تواند سبب ایجاد نتایج مثبت کاذب در تشخیص مبتنی بر شناسایی پروتئین شود. در این صورت می‌توان بخش‌هایی از ژن را که اختصاصی هر ویروس است با استفاده از روش‌هایی نظیر PCR هدف قرار داد. البته در مورد داروها و واکسن‌ها عکس این موضوع صادق است. پروتئین‌های غیرساختاری به دلیل شباهت ساختار فضایی خود می‌توانند اهداف بسیار مناسبی برای توسعه و تولید انواع داروها و واکسن‌های ضد کروناویروس‌ها باشند. عوامل هدف قرار دهنده این پروتئین‌ها می‌توانند به‌طور همزمان بر علیه طیف وسیعی از کروناویروس‌ها مؤثر باشند. به عنوان مثال، داروی Remdesivir که در عفونت‌های ویروسی به فراوانی از آن استفاده می‌شود، کمپلکس رونویسی ویروس را هدف قرار می‌دهد (۴۷). با استراتژی مشابهی، می‌توان به تولید انواع داروهای ضد ویروس که کمپلکس رونویسی را هدف قرار می‌دهند پرداخت. همچنین از مناطق حفاظت شده در پروتئین‌های غیر ساختاری می‌توان برای روش‌های تشخیصی مبتنی بر تفکیک افراد بیمار از واکسینه (DIVA) نیز بهره برد.

برخی از مطالعات پیشین با استفاده از ابزارهای ایمونوفورماتیک به بررسی قابلیت تحریک پاسخ ایمنی سلولی پروتئین‌های غیرساختاری کدشونده توسط ناحیه ژنی ORF1ab در سطح *in silico* پرداخته‌اند. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط Gustiananda و همکاران در سال ۲۰۲۱ به چاپ رسیده است گزارش شده است که برخی از اپی‌توپ‌های پروتئین‌های غیرساختاری ویروس SARS-CoV-2 می‌تواند به خوبی توسط مولکول‌های MHC کلاس ۱ و ۲ به گیرنده‌های یاخته‌های T عرضه شود و آن‌ها را تحریک کند (۴۸). در رابطه با قابلیت پروتئین‌های غیرساختاری در تحریک پاسخ ایمنی هومورال مطالعه‌ای تا به امروز به چاپ نرسیده است.

نتیجه‌گیری نهایی: پیش از این نیز مقایسه ژنومی برای کروناویروس‌ها انجام شده است اما در مرور این یافته‌ها به کرونا ویروس‌های انسانی و دامی یا به عبارتی مهم از نظر دامپزشکی اشاره‌ای نشده است. مطالعه حاضر اولین بررسی بیوانفورماتیک برای مقایسه و تحلیل توالی و ساختارهای کروناویروس‌های مهم بیماریزا در دامپزشکی است که به پیشینی ساختار سه بعدی پروتئین‌های کدشونده توسط ناحیه ژنی حفاظت شده ORF1ab پرداخته است. با توجه به مواردی که ذکر شد و نظر به چالش‌های توسعه واکسن و دارو علیه ویروس‌های رنا (به دلیل نرخ بالای وقوع جهش در این ویروس‌ها)، استفاده از پروتئین‌های دخیل در رونوشت برداری ویروس‌های خانواده *Coronaviridae* می‌تواند به

عنوان یک راهکار مناسب جهت توسعه دارو و واکسن‌های مؤثر بر ویروس‌های این خانواده در نظر گرفته شود. توجه به این موضوع می‌تواند از بروز اپیدمی‌های ناشی از کروناویروس‌های انسانی و دامی در آینده پیشگیری کند.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و دانشکده دامپزشکی جهت تأمین اعتبار و امکانات مطالعه حاضر قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

- Alexandersen S, Chamings A, Bhatta TR. SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication. *Nat Commun.* 2020;11:1-13. doi: [10.1038/s41467-020-19883-7](https://doi.org/10.1038/s41467-020-19883-7) PMID: [33247099](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33247099/)
- Cao C, Cai Z, Xiao X, Rao J, Chen J, Hu N, et al. The architecture of the SARS-CoV-2 RNA genome inside virion. *Nat Commun.* 2021;12:1-14. doi: [10.1038/s41467-021-22785-x](https://doi.org/10.1038/s41467-021-22785-x) PMID: [34168138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34168138/)
- Viehweger A, Krautwurst S, Lamkiewicz K, Madhugiri R, Ziebuhr J, Hölzer M, et al. Direct RNA nanopore sequencing of full-length coronavirus genomes provides novel insights into structural variants and enables modification analysis. *Genome Res.* 2019; 29: 1545-1554. doi: [10.1101/gr.247064.118](https://doi.org/10.1101/gr.247064.118) PMID: [31439691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31439691/)
- Fung TS, Liu DX. Human coronavirus: Host-pathogen interaction. *Annu Rev Microbiol.* 2019;73:529-557. doi: [10.1146/annurev-micro-020518-115759](https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759) PMID: [31226023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31226023/)
- de Wilde AH, Snijder EJ, Kikkert M, van Hemert MJ. Host factors in coronavirus replication. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018;419:1-42. doi: [10.1007/82_2017_25](https://doi.org/10.1007/82_2017_25) PMID: [28643204](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28643204/)
- Zhou Z, Qiu Y, Ge X. The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order. *Anim Dis.* 2021;1:5. doi: [10.1186/s44149-021-00005-9](https://doi.org/10.1186/s44149-021-00005-9)
- Peiris JSM. Coronaviruses. *Medical microbiology: eighteenth edition.* 2012;2:587-593.
- Hu B, Ge X, Wang L-F, Shi Z. Bat origin of human coronaviruses. *Virology.* 2015;12:1-10. doi: [10.1186/s12985-015-0422-1](https://doi.org/10.1186/s12985-015-0422-1)
- Kahn JS, McIntosh K. History and recent advances in coronavirus discovery. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24:223-227. doi: [10.1007/7653_2020_47](https://doi.org/10.1007/7653_2020_47)
- Abdelghany TM, Ganash M, Bakri MM, Qanash H, Al-Rajhi AMH, Elhussieny NI. SARS-CoV-2, the other face to SARS-CoV and MERS-CoV: Future predictions. *Biomed J.* 2021;44:86-93. doi: [10.1016/j.bj.2020.10.008](https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.10.008) PMID: [33602634](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33602634/)
- Shi Z, Hu Z. A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus. *Virus Res.* 2008;134:74-87. doi: [10.1016/j.virusres.2007.03.012](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.03.012) PMID: [17451830](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17451830/)
- Mohd HA, Al-Tawfiq JA, Memish ZA. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir. *Virology.* 2016; 13:87. doi: [10.1186/s12985-016-0544-0](https://doi.org/10.1186/s12985-016-0544-0) PMID: [27255185](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27255185/)
- Reusken CEM, Haagmans BL, Koopmans MPG. [Dromedary camels and Middle East respiratory syndrome: MERS coronavirus in the 'ship of the desert']. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde.* 2014;158:1-15. PMID: [25248734](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25248734/)
- Adney DR, Letko M, Ragan IK, Scott D, van Doremalen N, Bowen RA, et al. Bactrian camels shed large quantities of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) after experimental infection*. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8:717-723. doi: [10.1080/22221751.2019.1618687](https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1618687) PMID: [31119984](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31119984/)

15. 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; 20: 238-244. [doi: 10.1016/S1473-3099\(20\)30484-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30484-9) PMID: 32628905
16. Chen Z, Boon SS, Wang MH, Chan RWY, Chan PKS. Genomic and evolutionary comparison between SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *J Virol Methods.* 2021;289:1-12. [doi: 10.1016/j.jviromet.2020.114032](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114032) PMID: 33290786
17. Latinne A, Hu B, Olival KJ, Zhu G, Zhang L, Li H, et al. Origin and cross-species transmission of bat coronaviruses in China. *Nat Commun.* 2020;11:1-15. [doi: 10.1038/s41467-020-17687-3](https://doi.org/10.1038/s41467-020-17687-3) PMID: 32843626
18. Wong YC, Lau SY, Wang To KK, Mok BWY, Li X, Wang P, et al. Natural transmission of bat-like severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 without proline-arginine-arginine-alanine variants in Coronavirus disease 2019 patients. *Clin Infect Dis.* 2021;73:437-444. [doi: 10.1093/cid/ciaa953](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa953) PMID: 32649739
19. Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomedica.* 2020;91:157-160. [doi: 10.23750/abm.v91i1.9397](https://doi.org/10.23750/abm.v91i1.9397) PMID: 32191675
20. Monchatre-Leroy E, Boué F, Boucher JM, Renault C, Moutou F, Gouilh MA, et al. Identification of alpha and beta coronavirus in wildlife species in france: bats, rodents, rabbits, and hedgehogs. *Viruses.* 2017;9:364-376. [doi: 10.3390/v9120364](https://doi.org/10.3390/v9120364) PMID: 29186061
21. Milek J, Blicharz-Domańska K. Coronaviruses in avian species-review with focus on epidemiology and diagnosis in wild birds. *J Vet Res.* 2018;62:249-255. [doi: 10.2478/jvetres-2018-0035](https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0035)
22. Brian DA, Baric RS. Coronavirus genome structure and replication. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;12:1-30. [doi: 10.1007/3-540-26765-4_1](https://doi.org/10.1007/3-540-26765-4_1) PMID: 15609507
23. Keshavarz Valian N, Pourakbari B, Asna Ashari K, Hosseinpour Sadeghi R, Mahmoudi S. Evaluation of human coronavirus OC43 and SARS-COV-2 in children with respiratory tract infection during the COVID-19 pandemic. *J Med Virol.* 2022;94:1450-1456. [doi: 10.1002/jmv.27460](https://doi.org/10.1002/jmv.27460) PMID: 34786736
24. Vella F, Senia P, Ceccarelli M, Vitale E, Maltezou H, Taibi R, et al. Transmission mode associated with coronavirus disease 2019: A review. *Eur Rev Med Pharmacol.* 2020; 24: 7889-7904. [doi: 10.26355/eurev_202007_22296](https://doi.org/10.26355/eurev_202007_22296) PMID: 32744718
25. Zhou L, Aye SK, Chidambaram V, Karakousis PC. Modes of transmission of SARS-CoV-2 and evidence for preventive behavioral interventions. *BMC Infect. Dis.* 2021;21:496. [doi: 10.1186/s12879-021-06222-4](https://doi.org/10.1186/s12879-021-06222-4) PMID: 34049515
26. Corman VM, Lienau J, Witznath M. Coronaviruses as the cause of respiratory infections. *Internist.* 2019;60:1136-1145. [doi: 10.1007/s00108-019-00671-5](https://doi.org/10.1007/s00108-019-00671-5) PMID: 31455974
27. Luo X, Zhou GZ, Zhang Y, Peng LH, Zou LP, Yang YS. Coronaviruses and gastrointestinal diseases. *Mil Med Res.* 2020;7:49-56. [doi: 10.1186/s40779-020-00279-z](https://doi.org/10.1186/s40779-020-00279-z) PMID: 33054860
28. Yuan D, Yan Z, Li M, Wang Y, Su M, Sun D. Isolation and Characterization of a Porcine Transmissible Gastroenteritis Coronavirus in Northeast China. *Front Vet Sci.* 2021;8:1-12. [doi: 10.3389/fvets.2021.611721](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.611721)
29. Gu J, Korteweg C. Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Am J Clin Pathol.* 2007;170:1136-1147. [doi: 10.2353/ajpath.2007.061088](https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061088) PMID: 17392154
30. Tekes G, Thiel HJ. Feline Coronaviruses: Pathogenesis of feline infectious peritonitis. *Adv Virus Res.* 2016;96:193-218. [doi: 10.1016/bs.aivir.2016.08.002](https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.002) PMID: 27712624
31. Hosking MP, Lane TE. The pathogenesis of murine coronavirus infection of the central nervous system. *Crit Rev Immunol.* 2010;30:119-130. [doi: 10.1615/critrevimmunol.v30.i2.20](https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v30.i2.20) PMID: 20370625
32. Cowley TJ, Weiss SR. Murine coronavirus neuropathogenesis: Determinants of virulence. *J NeuroVirology.* 2010;16:427-434. [doi: 10.3109/13550284.2010.529238](https://doi.org/10.3109/13550284.2010.529238) PMID: 21073281
33. Mora-Díaz JC, Piñeyro PE, Houston E, Zimmerman J, Giménez-Lirola LG. Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus: A review. *Front Vet Sci.* 2019;6:1-12. [doi: 10.3389/fvets.2019.00053](https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00053) PMID: 30873421

34. Brant AC, Tian W, Majerciak V, Yang W, Zheng ZM. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci.* 2021;11:1-17. doi: [10.1186/s13578-021-00643-z](https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z)
35. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2020;1866:1-16. doi: [10.1016/j.bbadis.2020.165878](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878) PMID: [32544429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32544429/)
36. Xu J, Zhang Y. How significant is a protein structure similarity with TM-score = 5/0? *Bioinformatics.* 2010;26:889-895. doi: [10.1093/bioinformatics/btq066](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq066) PMID: [20164152](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20164152/)
37. Zhang Y, Skolnick J. TM-align: A protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:2302-2309. doi: [10.1093/nar/gki524](https://doi.org/10.1093/nar/gki524) PMID: [15849316](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15849316/)
38. Mei H, Pond SK, Nekrutenko A. Stepwise evolution and exceptional conservation of ORF1a/b overlap in coronaviruses. *Mol Biol Evol.* 2021;38(12):5678-5684. doi: [10.1093/molbev/msab265](https://doi.org/10.1093/molbev/msab265) PMID: [34505896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34505896/)
39. Velazquez-Salinas L, Zarate S, Eberl S, Gladue DP, Novella I, Borca M V. Positive selection of ORF1ab, ORF3a, and ORF8 genes drives the early evolutionary trends of SARS-CoV-2 during the 2020 COVID-19 pandemic. *Front Microbiol.* 2020;11:1-13. doi: [10.3389/fmicb.2020.550674](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.550674)
40. Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen KY. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses.* 2010;2:1804-1820. doi: [10.3390/v2081803](https://doi.org/10.3390/v2081803) PMID: [21994708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21994708/)
41. Kim DE, Chivian D, Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:526-531. doi: [10.1093/nar/gkh468](https://doi.org/10.1093/nar/gkh468) PMID: [15215442](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15215442/)
42. Tabibzadeh A, Esghaei M, Soltani S, Yousefi P, Taherizadeh M, Safarnezhad Tameshkel F, et al. Evolutionary study of COVID-19, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as an emerging coronavirus: Phylogenetic analysis and literature review. *Vet Med Sci.* 2021;7:559-571. doi: [10.1002/vms3.394](https://doi.org/10.1002/vms3.394) PMID: [33210477](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33210477/)
43. Wang W, Zhou Z, Xiao X, Tian Z, Dong X, Wang C, et al. SARS-CoV-2 nsp12 attenuates type I interferon production by inhibiting IRF3 nuclear translocation. *Cell Mol Immunol.* 2021;18:945-953. doi: [10.1038/s41423-020-00619-y](https://doi.org/10.1038/s41423-020-00619-y) PMID: [33637958](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33637958/)
44. White MA, Lin W, Cheng X. Discovery of COVID-19 Inhibitors Targeting the SARS-CoV-2 Nsp13 Helicase. *J Phys Chem Lett.* 2020;11:9144-9151. doi: [10.1021/acs.jpcclett.0c02421](https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.0c02421) PMID: [33052685](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33052685/)
45. Ma Y, Wu L, Shaw N, Gao Y, Wang J, Sun Y, et al. Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015; 112: 9436-9441. doi: [10.1073/pnas.1508686112](https://doi.org/10.1073/pnas.1508686112) PMID: [26159422](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26159422/)
46. Vithani N, Ward MD, Zimmerman MI, Novak B, Borowsky JH, Singh S, et al. SARS-CoV-2 Nsp16 activation mechanism and a cryptic pocket with pan-coronavirus antiviral potential. *Biophys J.* 2021;120:2880-2889. doi: [10.1016/j.bpj.2021.03.024](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.03.024) PMID: [33794150](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33794150/)
47. Kokic G, Hillen HS, Tegunov D, Dienemann C, Seitz F, Schmitzova J, et al. Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir. *Nat Commun.* 2021. doi: [10.1038/s41467-020-20542-0](https://doi.org/10.1038/s41467-020-20542-0) PMID: [33436624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33436624/)
48. Gustiananda M, Sulisty BP, Agustriawan D, Andarini S. Immunoinformatics analysis of sars-cov-2 orf1ab polyproteins to identify promiscuous and highly conserved t-cell epitopes to formulate vaccine for indonesia and the world population. *Vaccines.* 2021. doi: [10.3390/vaccines9121459](https://doi.org/10.3390/vaccines9121459)