

Introducing a New SYBR green Real-time PCR for Detection of SARS-CoV2 Virus Genome

Alireza Mardomi¹,
Saeid Abediankenari²

¹ PhD in Immunology, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Immunogenetics Research Center, Department of Immunology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 2, 2021 ; Accepted February 9, 2022)

Abstract

Background and purpose: There are various methods for molecular detection of SARS-CoV2 genome among which, PCR-based methods are the most reliable for making diagnosis. The majority of approved PCR kits for detection of Coronavirus are based on TaqMan real-time PCR which is expensive due to incorporating fluorescent and quencher-harboring probe. The aim of this study was to design a simple and affordable method for detection of SARS-CoV2 based on a more affordable SYBR green qPCR method.

Materials and methods: Specific primers were designed for the virus nucleocapsid gene and the human control gene using Oligo software. The specificities of the primers were examined by Primer-BLAST capability according to NCBI database. Nasal swab samples were obtained from 10 PCR-confirmed COVID-19 patients and 10 healthy control people.

Results: The designed reactions were performed in full compliance with the kit approved by the Ministry of Health to discriminate healthy individuals from COVID-19 patients. The Ct cut-off values calculated for N1 and N2 reactions were 39.72 and 39.69, respectively.

Conclusion: The designed SYBR green-based reaction showed a potential role for detection of SARS-CoV2 genome in clinical samples and this method can be considered as a less-expensive alternative to TaqMan real time PCR if the primers and standard reaction conditions are properly designed.

Keywords: COVID-19, Real-time PCR, specific primers

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31 (206): 154-159 (Persian).

* **Corresponding Author:** Saeid Abediankenari- Immunogenetics Research Center, Department of Immunology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk)

معرفی یک متد تشخیصی برای شناسایی ژنوم ویروس SARS-CoV2 با استفاده از روش SYBR green Real-time PCR

علیرضا مردمی¹
سعید عابدیان کناری²

چکیده

سابقه و هدف: روش های متفاوتی برای تشخیص مولکولی ژنوم ویروس کرونا معرفی شده است که روش های مبتنی بر تکثیر ژنوم از موثرترین تست ها برای تشخیص ویروس هستند. از آنجایی که اکثر کیت های تایید شده PCR برای تشخیص ویروس کرونا بر پایه TaqMan real time PCR هستند که به دلیل استفاده از پروب های حاوی فلورسنت و کوئنچر هزینه تمام شده بالایی دارند. لذا، هدف از این مطالعه طراحی روشی ارزان و ساده برای تشخیص ژنوم ویروس کرونا براساس تست کمی SYBR green- PCR برای ژن نوکلئوکپسید ویروس بوده است.

مواد و روش ها: پرایمرهای اختصاصی برای ژن نوکلئوکپسید ویروس و نیز ژن کنترل انسانی به وسیله نرم افزار Oligo طراحی شد و از نظر اختصاصیت به وسیله قابلیت Primer-BLAST پایگاه NCBI مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های سواب بینی از 10 بیمار کرونایی تایید شده به وسیله PCR و نیز 10 فرد کنترل دریافت گردید و وارد مطالعه شدند.

یافته ها: واکنش های طراحی شده با انطباق کامل با کیت مورد تایید وزارت بهداشت عمل افتراق افراد سالم از افراد بیمار انجام گرفت به طوری که Cut-off برای Ct واکنش برای جفت پرایمر N1 برابر با 39/72 و برای جفت پرایمر N2، 39/69 محاسبه گردید.

استنتاج: واکنش طراحی شده براساس SYBR green real time PCR پتانسیل شناسایی ژنوم ویروس کرونا در نمونه های بالینی را از خود نشان داد و این روش در صورت طراحی مناسب پرایمرها و شرایط استاندارد واکنش می تواند به عنوان جایگزین کم هزینه تری برای روش TaqMan real time PCR مطرح گردد.

واژه های کلیدی: کرونا، واکنش زنجیره ای پلیمرز، پرایمر اختصاصی

مقدمه

می باشد که با توجه قیمت قابل توجه پروب های حاوی فلورسنت و کوئنچر، هزینه تمام شده قابل ملاحظه ای دارند (2). از دیگر روش های Real-Time PCR می توان به روش SYBR green اشاره کرد که بدون پروب های حاوی فلورسنت و به وسیله فلورسنت های DNA-intercalating انجام می گیرد.

یکی از موارد تاثیرگذار بر کاربرد گسترده تست های تشخیصی، هزینه تمام شده آن ها می باشد و طی بحران های اپیدمیک، اهمیت اقتصاد سلامت بیش از پیش عیان می گردد (1).
تست های PCR مورد تایید برای تشخیص ژنوم ویروس کرونا براساس TaqMan Real-Time PCR

E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk

مؤلف مسئول: سعید عابدیان کناری - ساری، کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبراعظم، دانشکده پزشکی

1. دکترای ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استاد، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1400/7/10 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/8/9 تاریخ تصویب: 1400/11/20

صحت و اختصاصیت واکنش SYBR green ارتباط تنگاتنگی با کیفیت پرایمرهای طراحی شده داشته و در صورت طراحی مناسب پرایمر، می تواند اختصاصیت قابل رقابتی با روش TaqMan ارائه نماید (3). بنابراین توسعه دقیق کیت های تشخیصی کرونا بر اساس SYBR green Real-Time PCR می تواند به کاهش هزینه های تمام شده این تست تشخیصی کمک شایانی کند (4). این مطالعه با هدف طراحی یک روش بر پایه SYBR green برای تشخیص ژنوم ویروس کرونا و نیز ارزیابی آن در نمونه های بالینی انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

طراحی پرایمر

پرایمرهای این مطالعه براساس توالی RefSeq از پایگاه NCBI برای ویروس کرونای ایزوله ووهان (NC_045512.2) و به وسیله نرم افزار Oligo 7.0 و براساس پنتل تشخیصی توصیه شده برای مصرف اضطراری توسط CDC در تاریخ (2020/05/02) که از دو جفت پرایمر برای ژن Nucleocapsid ویروس و یک جفت پرایمر به عنوان کنترل استخراج RNA برای ژن Rnase P انسانی تشکیل شده است، طراحی گردید. در فرآیند طراحی سعی گردید پرایمرها فاقد هر گونه ساختار ثانویه و فاقد قابلیت ایجاد پرایمر-دایمر باشند. همچنین توالی پرایمرها به نوعی تنظیم گردید تا دمای ذوب (Tm) پرایمرها یک دمای مشخص باشد. جدول شماره 1 نشان دهنده توالی پرایمرهای طراحی شده می باشد. تصاویر شماره 1 و 2 به ترتیب نشان دهنده نتایج BLAST پرایمرهای N1 و N2 می باشند. براساس BLAST انجام شده، پرایمرهای N1 و N2 با RNA و DNA انسانی هیچ برهمکنشی نداشته و تنها قابلیت تکثیر ژنوم ویروس کرونای ایزوله ووهان را دارا هستند. در این طرح از 10 نمونه سواب بینی مربوط به بیماران تایید شده کرونایی از مرکز آموزشی درمانی امام خمینی (ره) شهر ساری و نیز 10 نمونه سواب بینی افراد کنترل فاقد علامت که

عدم ابتلا آنها با تست PCR تایید شده بود، استفاده گردید. واکنش Real-Time PCR به وسیله مستر میکس SYBR green از شرکت یکتا تجهیز آزما و با مقادیر اجزای واکنش ارائه شده در جدول شماره 2 و با استفاده از ترموسایکلر ABI طبق برنامه زمانی ذکر شده در جدول شماره 3 و به تعداد 50 چرخه انجام گردید. به منظور به دست آوردن Cut-off تست پیشنهادی در افتراق بیماران کرونایی از افراد سالم، ROC curve براساس حساسیت و اختصاصیت رسم شده و آستانه Ct که دارای قدرت افتراق باشد، تعیین گردید. مقایسه گروه های سالم و بیمار از طریق t-test و به وسیله نرم افزار GraphPad Prism (Version 6.0) انجام شد.

جدول شماره 1: توالی پرایمرهای استفاده شده واکنش های qPCR

Primer	Product size	Reference
N1 Forward: TGGACCCCAAAATCAGCGAAAT N1 Reverse: TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCT	74 bp	MT705206.1
N2 Forward: CTGGCAGTAACCGAATGGAGAAC N2 Reverse: TTCCTTGCCATGTTGAGTGAGAG	116 bp	LC528233.1
RNase P Forward: CCGCTCACCTTGGCTATTGAG RNase P Reverse: ACATTGCAGTGAGATGGATCCG	193 bp	NM_001104546.2

جدول شماره 2: اجزای واکنش qPCR استفاده شده در این مطالعه

حجم (میکرولیتر)	جزء واکنش	تعداد
10	2x SYBR Green qPCR Mix	1
0/5	Forward Primer (10 μM)	2
0/5	Reverse Primer (10 μM)	3
0/5	cDNA	4
0/5	Passive reference Dye (50X)	5
8	Water, nuclease-free	6
20	کل	

جدول شماره 3: شرایط دمایی واکنش qPCR انجام شده در این مطالعه

مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد
Initial Denaturation	95	3 دقیقه	1
Denaturation	95	5 ثانیه	50 چرخه
Annealing	59	5 ثانیه	
Extension	72	5 ثانیه	
Melting curve analysis			1

یافته ها و بحث

بررسی اختصاصیت واکنش Real-Time PCR که از طریق رسم منحنی ذوب بررسی گردید، نشان از اختصاصی

Input PCR template: none
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Nucleotide collection (nt) (Organism limited to Coronaviridae)
 Other reports: [Search Summary](#)

BLAST with coronaviridae

Detailed primer reports

Primer pair 1	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGGACCCCAAAATCAGCGAAAT	22	60.82	45.45	3.00	2.00
Reverse primer	TCTGGTACTGCCAGTTGAATCT	23	59.67	43.48	7.00	3.00

Products on target templates
 >_M756266.1 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/NL/Leiden-0008/2020, complete genome
 product length = 76
 Forward primer 1 TGGACCCCAAAATCAGCGAAAT 22
 Template 28280
 Reverse primer 1 TCTGGTACTGCCAGTTGAATCT 23
 Template 28353
 Template 28331

Input PCR template: none
 Specificity of primers: No target templates were found in selected database: Nucleotide collection (nt) (Organism limited to Homo sapiens)
 Other reports: [Search Summary](#)

BLAST with human DNA

Detailed primer reports

Primer pair 1	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGGACCCCAAAATCAGCGAAAT	22	60.82	45.45	3.00	2.00
Reverse primer	TCTGGTACTGCCAGTTGAATCT	23	59.67	43.48	7.00	3.00

Input PCR template: none
 Specificity of primers: No target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)
 Other reports: [Search Summary](#)

BLAST with human RNA

Detailed primer reports

Primer pair 1	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGGACCCCAAAATCAGCGAAAT	22	60.82	45.45	3.00	2.00
Reverse primer	TCTGGTACTGCCAGTTGAATCT	23	59.67	43.48	7.00	3.00

تصویر شماره 1: نتایج Primer-BLAST جفت پرایمر N1 با ژنوم کروناویریدانه، DNA انسان و RNA انسانی. نتایج BLAST نشان می دهد پرایمر طراحی شده فقط با ژنوم کروناویریدانه واکنش داده و با DNA و RNA انسانی واکنش نمی دهد.

Input PCR template: none
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Nucleotide collection (nt) (Organism limited to Coronaviridae)
 Other reports: [Search Summary](#)

BLAST with coronaviridae

Detailed primer reports

Primer pair 1	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTDGGAGTAAGGAGATGGAGAAAG	24	61.40	50.00	5.38	0.00
Reverse primer	TTGGTTGGCAGTTGAGTGGAGAG	23	60.81	47.82	4.38	0.00

Products on target templates
 >_G628322.3 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 SARS-CoV-2/hu/DP/Ky/19-0227 RNA, complete genome
 product length = 154
 Forward primer 1 CTDGGAGTAAGGAGATGGAGAAAG 24
 Template 28282
 Reverse primer 1 TTGGTTGGCAGTTGAGTGGAGAG 23
 Template 28408

Input PCR template: none
 Specificity of primers: No target templates were found in selected database: Nucleotide collection (nt) (Organism limited to Homo sapiens)
 Other reports: [Search Summary](#)

BLAST with human DNA

Detailed primer reports

Primer pair 1	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTDGGAGTAAGGAGATGGAGAAAG	24	61.40	50.00	5.38	0.00
Reverse primer	TTGGTTGGCAGTTGAGTGGAGAG	23	60.81	47.82	4.38	0.00

Products on target templates
 >_G628322.3 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 SARS-CoV-2/hu/DP/Ky/19-0227 RNA, complete genome
 product length = 154
 Forward primer 1 CTDGGAGTAAGGAGATGGAGAAAG 24
 Template 28282
 Reverse primer 1 TTGGTTGGCAGTTGAGTGGAGAG 23
 Template 28408

Input PCR template: none
 Specificity of primers: No target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)
 Other reports: [Search Summary](#)

BLAST with human RNA

Detailed primer reports

Primer pair 1	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTDGGAGTAAGGAGATGGAGAAAG	24	61.40	50.00	5.38	0.00
Reverse primer	TTGGTTGGCAGTTGAGTGGAGAG	23	60.81	47.82	4.38	0.00

تصویر شماره 2: نتایج Primer-BLAST جفت پرایمر N2 با ژنوم کروناویریدانه، DNA انسان و RNA انسانی. نتایج BLAST نشان می دهد پرایمر طراحی شده فقط با ژنوم کروناویریدانه واکنش داده و با DNA و RNA انسانی واکنش نمی دهد.

در مطالعه حاضر یک راهبرد تشخیصی مبتنی بر SYBR green real time PCR برای تشخیص ژنوم ویروس کرونا در نمونه‌های بالینی پیشنهاد گردید که با هزینه تمام شده به مراتب پایین تر نسب به روش TaqMan real time PCR فرآیند تشخیص را به انجام می‌رساند. هر چند مطالعات گسترده‌تری با تعداد نمونه‌های بالا برای تعیین دقیق حساسیت و اختصاصیت و نیز بررسی امکان تشخیص سویه‌های جدید مورد نیاز می‌باشد.

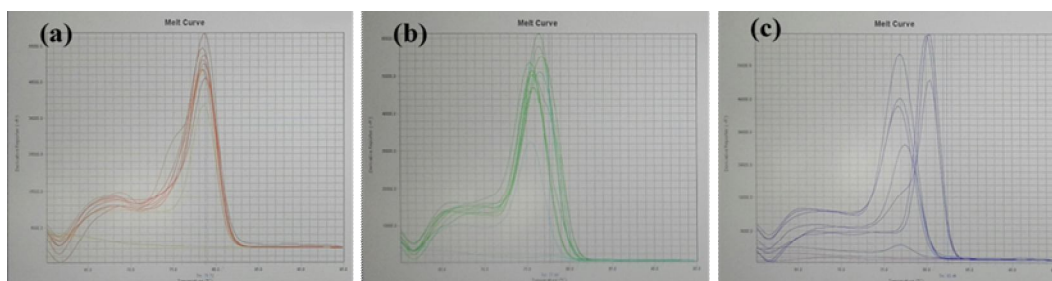
جدول شماره 4: مقایسه مقادیر Ct به دست آمده در واکنش های N1، N2 و RNase P برای نمونه های بیماران مورد مطالعه

واکنش	بیمار (Mean ± SD)	سالم (Mean ± SD)	سطح معنی داری
Ct N1	33/81 ± 2/16	44/83 ± 4/15	< 0/001
Ct N2	34/43 ± 1/73	45/26 ± 2/12	< 0/001
Ct RNase P	28/94 ± 4/13	29/81 ± 3/69	0/622

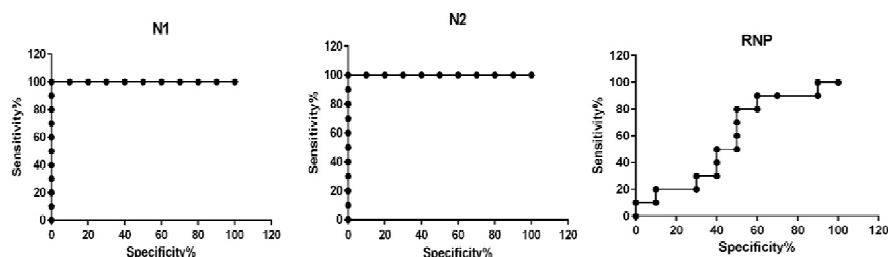
سپاسگزاری

این مطالعه طرح پژوهشی مصوب دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه و با کد طرح 7280 و کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1399-7280 به انجام رسیده است.

بودن واکنش داشت. به طوری که در نمودار تمامی واکنش‌ها، وجود تک پیک مشهود بود (تصویر شماره 3). در مورد Ct ژن RNase P، تمامی نمونه Ct پایین تر از 30 نشان دادند. مقایسه Ct های به دست آمده برای RNase P و نیز N1 و N2 در جدول شماره 4 ارائه گردیده است. با آنالیز منحنی ROC، مقادیر Ct ای که قادر به افتراق بیماران کرونایی از افراد سالم بودند برای ژن های N1 و N2 تعیین گردید به طوری که در مورد جفت پرایمر N1، مقدار Ct زیر 39/72 قادر نشان دهنده وجود ژنوم ویروس کرونا با اختصاصیت و حساسیت نزدیک به 100 درصد می‌باشد. همچنین در مورد جفت پرایمر N2، Ct زیر 39/69 همراه با اختصاصیت و حساسیت نزدیک به 100 درصد برای افتراق بیماران از افراد سالم به دست آمد. همچنین براساس منحنی ROC به دست آمده برای ژن RNase P انسانی، Ct بالاتر از 37 برای این ژن مرتبط با کاهش اختصاصیت بوده و توصیه می‌گردد تا نمونه‌گیری تکرار گردد. منحنی‌های ROC ژن های N1، N2 و RNase P در تصویر شماره 4 نمایش داده شده‌اند.



تصویر شماره 3: منحنی‌های ذوب واکنش های qPCR (a) N1، (b) N2 و (c) RNase P. وجود تک پیک در تمام واکنش های انجام شده مشهود می‌باشد.



تصویر شماره 4: نشان دهنده منحنی های ROC برای واکنش های qPCR انجام شده با پرایمرهای N1، N2 و RNase P. طبق محاسبه منحنی های ROC، مقادیر Cut-off برای N1 و N2 به ترتیب برابر است با 39/72 و 39/69.

References

1. thar S, Das S, Nagpure A, Madhurantakam C, Tiwari SB, Gahlot P, et al. Epidemiology and diagnosis, environmental resources quality and socio-economic perspectives for COVID-19 pandemic. *J Environ Manage* 2021; 111700.
2. Liu Y, Wang Y, Wang X, Xiao Y, Chen L, Guo L, et al. Development of two TaqMan real-time reverse transcription-PCR assays for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2. *Biosafety and health* 2020; 2(4): 232-237.
3. Cao H, Shockey JM. Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. *J Agric Food Chem* 2012; 60(50): 12296-12303.
4. Dorlass EG, Monteiro CO, Viana AO, Soares CP, Machado RRG, Thomazelli LM, et al. Lower cost alternatives for molecular diagnosis of COVID-19: conventional RT-PCR and SYBR Green-based RT-qPCR. *Braz J Microbiol* 202051(3): 1117-1123.