BRIEF REPORT

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

Alireza Mardomi[1],
Saeid Abediankenari[2]

[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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-21]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و یکم شماره 206 اسفند سال 1400 (159-154)

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

علیرضا مردمی[1]
سعید عابدیان کناری[2]

چکیده

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

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

یافته‌ها: واکنش‌های 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 می‌تواند به عنوان جایگزین کم هزینه‌تری برای روش TaqMan real time PCR مطرح گردد.

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

مقدمه

یکی از موارد تاثیرگذار بر کاربرد گسترده تست‌های تشخیصی، هزینه تمام شده آن‌ها می‌باشد وطی بحران‌های اپیدمیک، اهمیت اقتصاد سلامت بیش از پیش عیان می‌گردد(1).

تست‌های PCR مورد تایید برای تشخیص ژنوم ویروس کرونا براساس TaqMan Real-Time PCR می‌باشند که با توجه قیمت قابل توجه پروب‌های حاوی فلئورسنت و کوئنچر، هزینه تمام شده قابل ملاحظه‌ای دارند(2). از دیگر روش‌های Real-Time PCR می‌توان به روش SYBR green اشاره کرد که بدون پروب‌های حاوی فلئورسنت و به وسیله فلئورسنت‌های DNA-intercalating انجام می‌گیرد.

مولف مسئول: سعید عابدیان کناری - ساری، کیلومتر 17 جاده فرح‌آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبراعظم، دانشکده پزشکی E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk
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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-21]

صحت و اختصاصیت واکنش SYBR green ارتباط تنگاتنگی با کیفیت پرایمرهای طراحی شده داشته و در صورت طراحی مناسب پرایمر، می‌تواند اختصاصیت قابل رقابتی با روش TaqMan ارائه نماید(3). بنابراین توسعه دقیق کیت‌های تشخیصی کرونا بر اساس SYBR green Real-Time PCR می‌تواند به کاهش هزینه‌های 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 نمونه‌های 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 به‌وسیله نرم‌افزار Oligo 7.0 و براساس پنل 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 نشان‌دهنده توالی پرایمرهای طراحی شده می‌باشد. تصاویر شماره 1 و 2 به‌ترتیب نشان‌دهنده نتایج BLAST پرایمرهای N1 و N2 می‌باشند. 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 به‌وسیله مسترمیکس 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 به‌دست 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 گروه‌های سالم و بیمار از طریق t-test و به وسیله نرم‌افزار GraphPad Prism (Version 6.0) انجام شد.

جدول شماره 1: توالی پرایمر های استفاده شده واکنش های qPCR

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

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

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

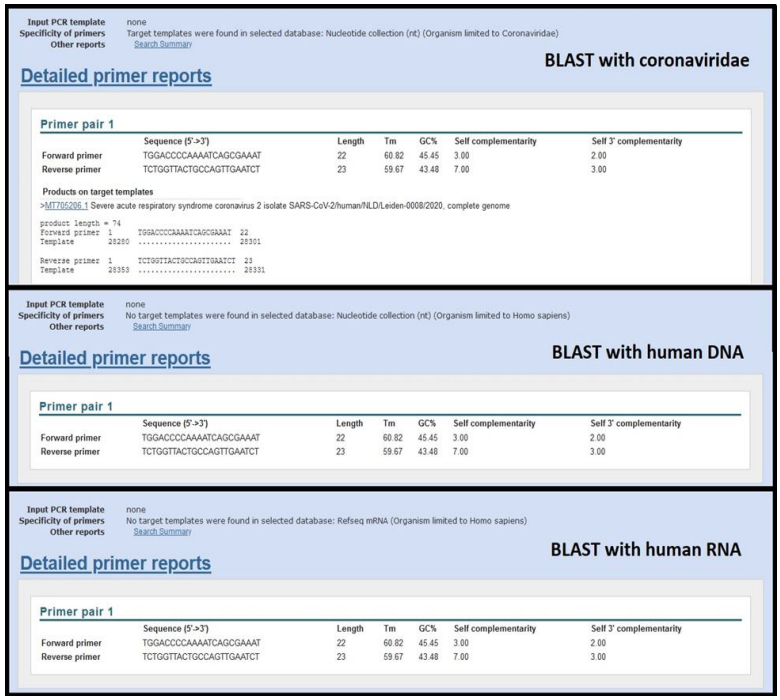
جدول شماره 3: شرایط دمایی واکنش qPCR انجام شده در این مطالعه

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

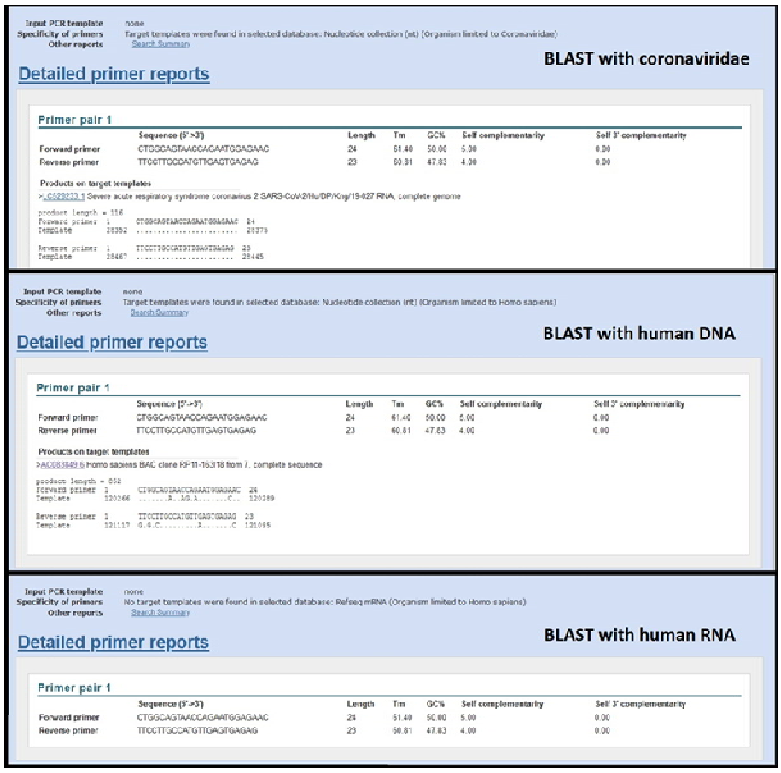
یافته ها و بحث

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-21]



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



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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-21]

بودن واکنش داشت. به‌طوری‌که در نمودار تمامی واکنش‌ها، وجود تک پیک مشهود بود (تصویر شماره 3). در مورد Ct ژن RNase P، تمامی نمونه Ct پایین‌تر 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 ژن‌های 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 به‌دست 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 ژن‌های N1، N2 و RNase P در تصویر شماره 4 نمایش داده شده‌اند.

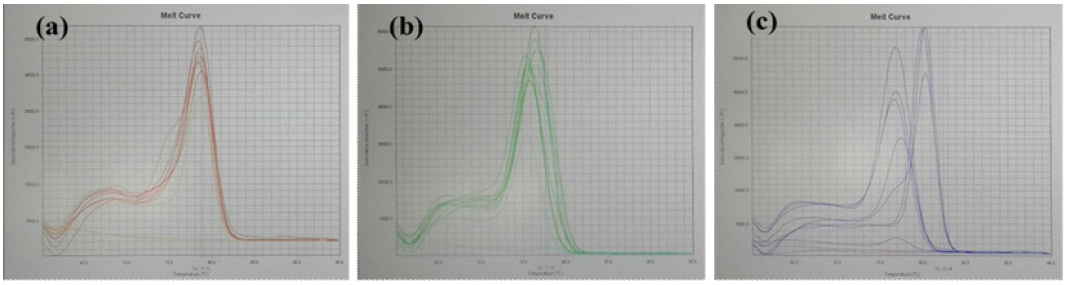
در مطالعه حاضر یک راهبرد تشخیصی مبتنی بر SYBR green real time PCR برای تشخیص ژنوم ویروس کرونا در نمونه‌های بالینی پیشنهاد گردید که با هزینه تمام شده به مراتب پایین‌تر نسب به روش TaqMan real time PCR فرآیند تشخیص را به انجام می‌رساند. هر چند مطالعات گسترده‌تری با تعداد نمونه‌های بالا برای تعیین دقیق حساسیت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

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

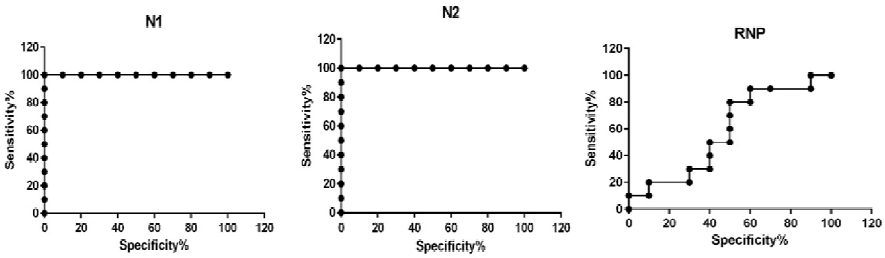
واکنش	بیمار (Mean ± SD)	سالم (Mean ± SD)	سطح معنی داری
Ct N1	33/81 ± 2/16	44/83 ± 4/15	< 0/001
Ct N2	34/43 ± 1/73	45/26 ± 2/12	< 0/001
Ct RNase P	28/94 ± 4/13	29/81 ± 3/69	0/622

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.



تصویر شماره 3: منحنی‌های ذوب واکنش‌های qPCR (a) N1، (b) N2 و (c) RNase P. وجود تک پیک در تمام واکنش‌های 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-21]

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-21]