

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: روش‌های متفاوتی برای تشخیص مولکولی ژنوم ویروس کرونا معرفی شده است که روش‌های 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 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 نوکلئوکسپید ویروس بوده است.

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

واژه‌های کلیدی: کرونا، واکنش زنجیره ای پلیمرز، پرایمر اختصاصی

مقدمه

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.

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

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 گروه‌های سالم و بیمار از طریق t-test و به وسیله نرم افزار GraphPad Prism (Version 6.0) انجام شد.

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 روش‌ها

طراحی پرایمر

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: CTGGCAGTAACCCAGAATGGAGAAC N2 Reverse: TTCCTTGCCATGTTGAGTGAGAG | 116 bp | LC528233.1 |
| RNase P Forward: CCGCTCACCTTGGCTATTTCAG RNase P Reverse: ACATTGGCAGTGAGATGGATCCG | 193 bp | NM_001104546.2 |

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

| حجم (میکرولیتر) | جزء واکنش | شماره |
|-----------------|-----------------------------|-------|
| 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 |

یافته‌ها و بحث

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

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 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 به ترتیب 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

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

>_M776026.1 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 28301

Reverse primer 1 TCTGGTACTGCCAGTTGAATCT 23

Template 28353 28331

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 |

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.

BLAST with coronaviridae

Detailed primer reports

| Primer pair 1 | Sequence (5'-3') | Length | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
|----------------|----------------------------|--------|-------|-------|----------------------|-------------------------|
| Forward primer | CTGCGACTAAGAGAGCAATGCGAAGC | 24 | 61.44 | 50.00 | 5.00 | 0.00 |
| Reverse primer | TTGGTTGCCAGTTGCAATGAGAG | 23 | 60.81 | 47.82 | 4.00 | 0.00 |

Products on target templates

>_CC28322.3 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 SARS-CoV-2/Hu/DP/Kyrg/19427/RNA, complete genome

product length = 134

Forward primer 1 CTGCGACTAAGAGAGCAATGCGAAGC 24

Template 28282 28277

Reverse primer 1 TTGGTTGCCAGTTGCAATGAGAG 23

Template 28487 28485

BLAST with human DNA

Detailed primer reports

| Primer pair 1 | Sequence (5'-3') | Length | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
|----------------|----------------------------|--------|-------|-------|----------------------|-------------------------|
| Forward primer | CTGCGACTAAGAGAGCAATGCGAAGC | 24 | 61.44 | 50.00 | 5.00 | 0.00 |
| Reverse primer | TTGGTTGCCAGTTGCAATGAGAG | 23 | 60.81 | 47.82 | 4.00 | 0.00 |

Products on target templates

>_M0035642.3 Homo sapiens SMC4, clone KP-B1-75318 from 1, complete sequence

product length = 819

Forward primer 1 CTGCGACTAAGAGAGCAATGCGAAGC 24

Template 529366 529369

Reverse primer 1 TTGGTTGCCAGTTGCAATGAGAG 23

Template 529117 529116

BLAST with human RNA

Detailed primer reports

| Primer pair 1 | Sequence (5'-3') | Length | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
|----------------|----------------------------|--------|-------|-------|----------------------|-------------------------|
| Forward primer | CTGCGACTAAGAGAGCAATGCGAAGC | 24 | 61.44 | 50.00 | 5.00 | 0.00 |
| Reverse primer | TTGGTTGCCAGTTGCAATGAGAG | 23 | 60.81 | 47.82 | 4.00 | 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 پایین‌تر نسبت 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.

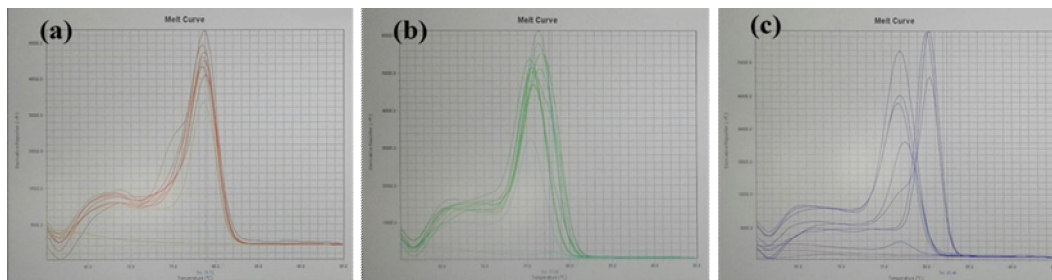
جدول شماره 4: مقایسه مقادیر Ct به دست آمده در واکنش‌های N1،

| 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 |

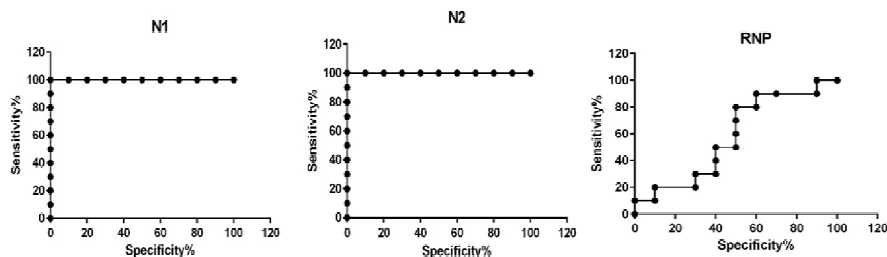
سپاسگزاری

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 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 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 ژن‌های N1، N2 و RNase P در تصویر شماره 4 نمایش داده شده‌اند.



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 منحنی‌های ROC برای واکنش‌های qPCR انجام شده با پرایمرهای N1، N2 و RNase P. طبق محاسبه منحنی‌های 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.