ORIGINAL ARTICLE

# *Development of an Optimized Gel-Based Microreactor for Colorimetric Point-of-Care Detection of SARS-CoV-2 Using RT-LAMP*

Adele Rafati[1]
Pooria Gill [2]
Sayed Mahmoud Mahdi Zadeh Diva[3]

[1] Associated Professor, Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Professor, Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3]M.Sc, Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 17, 2026; Accepted September 28, 2026)

## *Abstract*

**Background and purpose:** This study aimed to develop and optimize a hydrogel-based RT-LAMP microreactor for pH-dependent colorimetric detection of SARS-CoV-2 at the point of care (POC), without the need for sophisticated equipment. Given the fundamental limitations of the reference RT-qPCR method, including its reliance on expensive equipment, specialized laboratory infrastructure, and lengthy processing times, the main goal was to design an integrated, rapid, and portable platform that integrates isothermal amplification and visual detection without requiring complex RNA extraction or cold-chain maintenance.

**Materials and methods:** Specific RT-LAMP primers targeting the conserved S region of the viral genome were designed. The pH-dependent colorimetric detection system was optimized using phenol red as an indicator, with a color change from pink to yellow in positive samples, and the reaction components were immobilized in an agarose hydrogel matrix.

**Results:** The stability of the reaction components in the gel matrix was maintained for more than 45 days at 4°C, whereas in the standard reaction mixture, activity decreased significantly after 5 days and was no longer detectable after 14 days. The RT-LAMP reaction in the gel matrix produced a classic ladder-like pattern, although the amplification efficiency was adequate; under gel-based conditions, the capillary tube showed better performance than the microtube.

**Conclusion:** Based on the study's findings, this innovative platform, which offers long-term stability and simple visual readout without requiring conventional laboratory infrastructure, may be a useful tool for rapid SARS-CoV-2 detection in resource-limited settings. Furthermore, the system may provide a framework for the development of molecular diagnostic tools for emerging infectious pathogens.

***Keywords:*** point-of-care diagnostics, gel-embedded microreactor, isothermal amplification, gel-based microfluidics

**J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 36 (Supple 1): 75-90 (Persian).**

**Corresponding Author: Adele Rafati** - Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: a.raafati@mazums.ac.ir )

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و ششم شماره ویژه نامه آبان سال ۱۴۰۵ (۹۰-۷۵)

# توسعه ریزراکتور ژلی بهینه‌شده برای تشخیص رنگی ویروس SARS-CoV-2 با روش RT-LAMP در نقطه مراقبت

عادله رافتی[۱]

پوریا گیل[۲]

سید محمود مهدی زاده دیوا[۳]

## چکیده

**سابقه و هدف:** در این مطالعه، ریزراکتور مبتنی بر هیدروژل برای واکنش RT-LAMP توسعه یافته و بهینه‌سازی شد که امکان تشخیص رنگ‌سنجی وابسته به pH ویروس SARS-CoV-2 را در نقطه مراقبت (POC)، بدون نیاز به تجهیزات پیچیده، فراهم می‌سازد. با توجه به محدودیت‌های بنیادین روش مرجع RT-qPCR، از جمله وابستگی به تجهیزات گران‌قیمت، زیرساخت‌های تخصصی آزمایشگاهی و زمان‌بر بودن فرایند، هدف اصلی این پژوهش طراحی یک سامانه یکپارچه، سریع و قابل‌حمل بود که مراحل تکثیر هم‌دما و آشکارسازی بصری را بدون نیاز به فرآیندهای پیچیده استخراج RNA یا نگهداری در زنجیره سرد پشتیبانی می کند.

**مواد و روش ها:** در این پژوهش، پرایمرهای اختصاصی RT-LAMP برای ناحیه حفاظت‌شده S از ژنوم ویروس طراحی شدند. همچنین، سامانه آشکارسازی رنگ‌سنجی وابسته به pH با استفاده از شناساگر فنول رد بهینه‌سازی شد، به‌طوری‌که در نمونه‌های مثبت تغییر رنگ از صورتی به زرد مشاهده گردید. افزون بر این، اجزای واکنش در یک ماتریس هیدروژلی از آگاروز تثبیت شدند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که پایداری اجزای واکنش در ماتریس ژلی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بیش از ۴۵ روز حفظ شد؛ درحالی که در مخلوط واکنش استاندارد، فعالیت سامانه پس از ۵ روز به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت و پس از ۱۴ روز به‌طور کامل متوقف شد. واکنش RT-LAMP در بستر ژلی با تشکیل الگوی نردبانی کلاسیک همراه بود و اگر چه کارایی تکثیر مناسب ارزیابی شد، لوله مویین در شرایط مبتنی بر ژل عملکرد بهتری نسبت به میکروتیوب نشان داد.

**استنتاج:** براساس نتایج این مطالعه این پلتفرم نوآورانه با فراهم آوردن پایداری بلندمدت، آشکارسازی بصری ساده و عدم وابستگی به زیرساخت‌های آزمایشگاهی، ابزاری کارآمد برای تشخیص سریع SARS-CoV-2در محیط‌های کم‌برخوردار از منابع در نظر گرفته می شود. همچنین، سامانه مذکور می‌تواند به‌عنوان چارچوبی عمومی برای توسعه نسل آینده ابزارهای تشخیص مولکولی در برابر پاتوژن‌های عفونی نوپدید مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه های کلیدی:** تشخیص در نقطه مراقبت، ریزراکتور تعبیه‌شده در ژل، تکثیر هم‌دما، میکروسیالات مبتنی بر ژل

**مولف مسئول: عادله رافتی**- ساری، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص) دانشکده فناوری های نوین پزشکی گروه نانوتکنولوژی پزشکی **E-mail:** a.raafati@mazums.ac.ir

۱. دانشیار، گروه آموزشی نانوتکنولوژی پزشکی ، دانشکده فناوری های نوین پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی مازندران ، ساری، ایران

۲. استاد، گروه آموزشی نانوتکنولوژی پزشکی ، دانشکده فناوری های نوین پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی مازندران ، ساری، ایران

۳. کارشناسی ارشد ناوتکنولوژی پزشکی، گروه آموزشی نانوتکنولوژی پزشکی ، دانشکده فناوری های نوین پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی مازندران ، ساری، ایران

تاریخ دریافت : ۱۴۰۵/۲/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۵/۲/۱۱ تاریخ تصویب : ۱۴۰۵/۷/۶



[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]

## مقدمه

ظهـور ناگهـانی پانـدمی COVID-19 ناشـی از کروناویروس ۲ عامل سندرم حاد تنفسی شدید (SARS-CoV-2) در اواخـر سـال ۲۰۱۹، یکـی از مهم‌تـرین چالش‌های بهداشت عمومی در قرن حاضر را پدید آورد و در مـدتی کوتـاه بـه بحرانـی در مقیـاس جهـانی تبـدیل شد(۱). از این‌رو، توسعه روش‌های تشخیصی سریع، دقیق و در دسترس به ضـرورتی فـوری بـدل شـد(۲، ۳). در ایـن میـان، RT-qPCR (Real-Time Quantitative PCR) به‌عنوان روش مرجع و معیـار طلایـی تشـخیص مولکـولی، علـی‌رغـم برخـورداری از حساسـیت و ویژگـی بـالا، بـا محدودیت‌های اساسی نظیر نیاز بـه تجهیـزات گران‌قیمـت ترموسایکلر، زیرساخت‌های آزمایشگاهی پیشرفته، نیـروی متخصص و زمان‌بر بودن فرایند آزمون مواجه است(۴، ۵).

روش‌هـای تکثیـر هم‌دمـای اسـیدهای نوکلئیـک به‌عنوان گزینه‌هایی امیدبخش مطـرح شـده‌اند(۶، ۷). در ایـن میـان، فنـاوری LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)و RT-LAMP (Real Time Loop Mediated Isothermal Amplification)، بـه سبب سادگی اجرا، سرعت بالا، حساسیتی هم‌تـراز بـا PCRو عدم نیاز به چرخـه‌های حرارتـی، مـورد توجـه گسترده قرار گرفته‌انـد(۱۰-۸). از سـوی دیگـر، امکـان آشکارسـازی بصـری فرآورده‌هـای تکثیـر بـه کمـک روش‌هـای رنگ‌سـنجی یـا سـامانه‌های وابسـته بـه pH ، امکان حذف تجهیزات اپتیکی پیچیده و انجام تشخیص تنها با مشاهده چشمی را فراهم کرده است(۱۱، ۱۲).

به‌رغم این پیشرفت‌ها، موانع متعـددی همچنـان بـر سر راه کاربرد وسیع و تجـاری‌سـازی RT-LAMP در شرایط POC وجود دارد(۱۳). محـدودیت در پایـداری معرف‌های واکـنش در دمـای محـیط، نیـاز بـه زنجیـره سـرد، پیچیـدگی اسـتخراج RNA ویروسـی، و نبـود سـامانه‌های یکپارچـه‌ای کـه همـه مراحـل تشـخیص را به‌شـکل پایـدار و کاربرپسـند در خـود ادغـام کننـد، از مهم‌ترین این چالش‌هـا بـه شـمار مـی‌رونـد(۱۶-۱۴). در مطالعه حاضر، رویکردی نوآورانه مبتنـی بـر اسـتفاده از آگـاروز بـا نقطـه ذوب پـایین بـه‌عنوان مـاتریس ژلـی پایدارساز واکنش اتخاذ شد. این بستر ژلی ضمن حفـظ طـولانی‌مـدت اجـزای واکـنش، از تخریـب آنزیمـی و آلودگی متقاطع جلوگیری کـرده و امکـان فعال‌سـازی انتخابی فرایند تکثیر در شرایط بهینه را فراهم مـی‌کنـد. افزون بر آن، ادغام این ماتریس با سـامانه آشکارسـازی رنگ‌سنجی وابسته به pH، بستری کاملاً بصری، ساده و قابل‌اعتمـاد ایجـاد می‌کنـد کـه در آن تغییـر رنـگ از صورتی به زرد به‌وضوح قابل مشاهده است. این سامانه، رویکردی نوین در توسـعه کیت‌هـای تشخیصـی POC (Point of Care) محسوب می‌شود که در آن پایـداری بلندمدت، سهولت کاربرد، عدم وابستگی به زیرساخت آزمایشگاهی و مقرون‌به‌صرفه بودن، به‌صورت هم‌زمان تأمین شده‌اند. در مجموع، نتایج این پژوهش افـزون بـر ارائه یک پلتفرم کارآمد برای تشخیص سریع و حساس SARS-CoV-2، چـارچوبی تعمیم‌پـذیر بـرای توسـعه ابزارهای تشخیص مولکولی نسل آینـده در مواجهـه بـا همـه‌گیری‌هـای آتـی و بیمـاری‌هـای عفـونی نوپدیـد، به‌ویژه در مناطق کم‌برخوردار، فراهم می‌آورد(۲۱-۱۷).

## مواد و روش‌ها

پرایمرهای مـورد اسـتفاده در واکنش‌هـای LAMP و PCR توسـط شـرکت Metabion GmbH (آلمـان) سـنتز شدند. دئوکسی‌ریبونوکلئوتیـد تـری‌فسـفات‌ها (dNTPs)، آنزیم رونویسـی معکـوس و بـافر RevertUP© و نردبـان ژنـی DNA 1000 bp Plus از شـرکت سـیناکلون تهیـه شـدند. آنـزیم Bst DNA polymerase (large fragment)، بـافر واکـنش Bst و سـولفات منیـزیم ($MgSO_4$) از شـرکت New England Biolabs تـأمین شدند(۲۲). مستر میکس EmeraldAmp PCR از شـرکت Takara Bioscience Inc (ژاپن) خریـداری شـد. شـرایط حرارتی لازم برای انجام واکنش‌هـا بـا اسـتفاده از دسـتگاه Mastercycler Gradient (Eppendorf، آلمـان) فـراهم

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]

شـد. بـرای الکتروفـورز، از دسـتگاه OA-78 (Fargen، ایـــران) اســـتفاده شـــد. کداخلاق ایـــن طـــرح IR.MAZUMS.REC.1401.198 است.

*- شناسایی ناحیه هدف اختصاصی و حفاظت‌شده و طراحی پرایمرها برای تشخیص ویروس SARS-CoV-2*

توالی‌های ژنومی اختصاصی و حفاظت‌شده ویـروس SARS-CoV-2 که به‌عنوان اهـداف واکنش‌هـای شناسـایی عمل می‌کنند، از طریـق پایگـاهNCBI شناسـایی شـدند(۲۵-۲۳). مشخصـات ویـروس SARS-CoV-2، سـویه-Wuhan Hu-1، شـماره مرجـع NCBI: NC_045512.2 ؛ طـول ۲۹۹۰۳ جفت‌باز؛ ماهیت RNA خطی تک‌رشته‌ای گـزارش شده است(۲۶).

ناحیـه S (Spike protein) یـا گلیکـوپروتئین سـطحی ویروس SARS-CoV-2، که دربـازه نوکلئوتیـدی ۲۱۵۶۳– ۲۵۳۸۴) در(NC_045512.2 واقـع شـده و طـولی برابـر بـا ۳۸۲۲ نوکلئوتید دارد، به‌عنوان یکی از نـواحی حفاظت‌شـده ژنوم ویروس در پایگاه NCBI معرفی شده است(۲۶- ۲۷).

به‌منظور طراحی و ساخت کانستراکت ژنی ( gene construct)، تـوالی مـورد نظـر در وکتـور اسـتاندارد pUC57، تولیدی شـرکت GenScript (چـین)، کلـون گردید(۲۹). این وکتور پلاسمیدی دارای طـولی معـادل ۲۷۱۰ جفت‌باز است. سازه DNA مطلوب با طـول ۲۴۰ جفت‌بـاز در ناحیـه MCS (Multiple Cloning Site) پلاسـمید جایگـذاری شـد. کـه شـامل بخشـی از ناحیـه پروموتر T7 با طولی تقریبی ۳۰ نوکلئوتید است(۳۰).

*- سـنتز آزمایشـگاهی تـوالی RNA ناحیـه S ویـروس SARS-CoV-2 و توالی‌های cDNA*

سنتز مصنوعی توالی RNA ناحیه S ویـروس SARS-CoV-2 با بهره‌گیری از RNA پلی‌مراز T7 و یک الگـوی DNA سنتزی حاوی تـوالی هـدف انجـام شـد(۳۱) اجـزای واکنش در(جدول شماره ۱) شده اند. واکنش بـه مـدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبـه شـد تـا سـنتز RNA تکمیل شود. به منظور تأییـد سـنتز RNA، محصـول واکنش ابتدا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی F3وB3 به cDNA تبـدیل شـد (جـدول شـماره ۲) و سـپس از طریـق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیـر گردیـد (جـدول شماره ۳)(۳۳، ۳۴).

**جدول شماره ۱:** مخلوط واکنش رونویسی برای ناحیه S

| ردیف | واکنش‌گر(Reagent) | غلظت دسته(Batch conc.) | غلظت نهایی(Mix conc.) |
|---|---|---|---|
| ۱ | الگوی DNA (DNA Template) | — | — |
| ۲ | بافر رونویسی آنزیم T7 RNA پلیمراز ۵ برابر (T7 RNA polymerase transcription buffer 5X) | ۵برابر) ۵X | ۱ برابر) ۱X |
| ۳ | نوکلئوتیدهای چهارگانه(NTPs 2mM) | ۱۰ میلی‌مولار) ۱۰mM | ۲ میلی‌مولار) ۲mM |
| ۴ | آنزیم T7 RNA پلیمراز (T7 RNA polymerase) | ۱۵ واحد بر میکرولیتر) ۱۵ U/ µL | ۰.۶ واحد بر میکرولیتر) ۰.۶ U/ µL |

**جدول شماره ۲:** مخلوط واکنش برای سنتز cDNA

| ردیف | واکنش‌گر(Reagent) | غلظت دسته (Batch conc.) | غلظت نهایی (Mix conc.) |
|---|---|---|---|
| ۱ | آب بـدون نوکلئـاز (H2O DNAase free) | — | — |
| ۲ | بـافر واکـنش (Reaction buffer) | ۵ برابر) ۵X | ۱ برابر) ۱X |
| ۳ | پرایمرCF3/CB3 | ۱ میکرومولار) ۱µM | ۰,۲ میکرومولار) ۰,۲ µM |
| ۴ | نوکلئوتیـدهای چهارگانـه (dNTPs) | ۱۰ میلی‌مولار) ۱۰ mM | ۱ میلی‌مولار) ۱mM |
| ۵ | الگوی RNA (RNA template) | ۲۰ میکرولیتر) ۲۰µL | ۱ میکرولیتر) ۱µL |
| ۶ | آنزیم ترنسکریپتاز معکوس (Reverse transcriptase enzyme) | ۲۰۰ واحـد بـر میکرولیتر) ۲۰۰U/ µL | ۱۰ واحـد بـر میکرولیتر) ۱۰U/ µL |

**جدول شماره ۳:** توالی های پرایمراهـای طراحـی شـده اختصاصـی برای ناحیه هدف

| Name of Primer | Primer Seq |
|---|---|
| Forward bumper primer (CF3) | 5' CTG ACA AAG TTT TCA GAT CCT CAG 3' |
| Backward bumper primer with T7 handle (CB3) | 5' (Biotin) AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AAG GAG TAC CAA AAA TCC AGC CTC TT 3' |

*- واکنش PCR برای تأیید پرایمرهای CB3 و CF3*

برای ارزیابی عملکرد و اختصاصیت پرایمرهای پیش رو (CF3) و معکـوس(CB3) ، واکـنش PCR اسـتاندارد انجام شد. مخلوط واکنش در حجـم نهـایی ۲۵ میکرولیتـر تهیه شد. برنامه دمـایی ترموسـایکلر مطـابق پروتکـل کلـی

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]

اجـرا شـد. محصـولات تکثیرشـده پـس از جداسـازی بـا الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۵درصد، تأیید شدند.

*- واکنش RT-LAMP برای RNA ویروسی*

واکـنش RT-LAMP بـا پرایمرهـای اختصاصـی (جدول شـماره ۴) و در حجـم نهـایی ۲۵ میکرولیتـر طبـق پروتکـل بهینـه شـده در مطالعـه پیشـین نویسـندگان انجـام شد(۳۴).

**جدول شماره ٤:** توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش LAMP

| Name of Primer | Primer Seq |
|---|---|
| Forward bumper primer (CF3) | 5' CTG ACA AAG TTT TCA GAT CCT CAG 3' |
| Backward bumper primer with T7 handle (CB3) | 5' (Biotin) AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AAG GAG TAC CAA AAA TCC AGC CTC TT 3' |
| Forward inner primer (FIP) | 5′TCCCAGAGACATGTATAGCATG GAATCAACTCAGGACTTGTTCTT ACC3′ |
| Backward inner primer (BIP) | 5′TGGTACTAAGAGGTTTGATAAC CCTGTTAGACTTCTCAGTGGAAG CA3′ |
| Loop forward primer (CLF) | 5′CCAAGTAACATTGGAAAAGAA A3′ |
| Loop backward primer (CLB) | 5′GTCCTACCATTTAATGATGGTG TTT3′ |

*- بهینه‌سازی شناساگر pH برای تشخیص بصری RT-LAMP*

بـرای ارتقـاء کـاربردی بـودن روش RT-LAMP، رنگ فنول رد به عنوان یک شناساگر وابسته بـه pH بـه کار گرفته شد. این امر امکان تشخیص سـریع و بصـری نمونه‌های مثبت و منفی را درلحظـه مبتنـی بـر تغییـرات رنگـی ناشـی از تغییـرات غلظـت پروتـون در محـیط واکنش فراهم می‌آورد. در نمونه‌های مثبت، آزادسازی پروتـون در طـول فراینـد تکثیـر ایزوترمـال، منجـر بـه کاهش pH محیط واکـنش و تغییـر رنـگ شناسـاگر از صورتی به زرد مـی شـود. در حـالی کـه در نمونـه‌های منفی، به دلیل فقدان تکثیر، رنـگ اولیـه صـورتی بـاقی می‌ماند. اعتبارسـنجی نتـایج حاصـل از تغییـر رنـگ، از طریق الکتروفورز ژل آگاروز صورت پـذیرفت. بـدین منظور، pH اولیه محلول فنول رد ۲ میلی‌مولار با افزودن هیدروکسـید پتاسـیم ۱۰۰ میلـی‌مـولار، بـر روی عـدد تقریبی ۵ تنظـیم گردیـد. ایـن تنظـیم اولیـه، پاسـخ‌دهی مناسب شناساگر به تغییـرات اسـیدی ناشـی از واکـنش مثبت را تضمین می‌کند(۳۴).

*- RT-LAMP با استفاده از RNA ویروسی استخراج شده روی نانوپروب مغناطیسی*

واکـنش تکثیـر ایزوترمـال وابسـته بـه رونویسـی معکوس (RT-LAMP) در حجم نهـایی ۲۵ میکرولیتـر انجام شد که در مطالعه پیشین نویسندگان پروتکل بهینه سازی شده است(۳۳، ۳۴).

جهت آماده‌سازی نانوپروب‌ها، ۱۰۰ میکرولیتـر از استوک نانوذرات مغناطیسـی Streptavidin-MNP (بـا اندازه ۸۰ نانومتر و غلظت ۲۵ نانومولار) با ۴ میکرولیتـر از پرایمر بیوتینیله اختصاصی CB3 بـه مـدت ۱۵ دقیقـه در دمای اتـاق روی شـیکر انکوبـه انجـام شـد. پـس از جداسازی مغناطیسی کمپلکس MNP-CB3 روی پلیت مغناطیسی و حذف مایع رویی، رسوب به‌دسـت‌آمده بـا ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر شستشو داده شده و در نهایت در ۱۰ میکرولیتـر آب مقطـر بـازتعلیق گردیـد. بـرای جلـوگیری از تـداخل رنگـی پس‌زمینـه نـانوذرات قهوه‌ای‌رنـگ بـا معـرف رنگ‌سـنجی (Phenol Red)، آنالیز رقت‌سازی متوالی انجام شد. بر این اساس، رقـت بهینـه ۱:۱۰۰ از کمـپلکس MNP-CB3 (تهیـه شـده در آب عـاری از نوکلئـاز) بـه عنـوان رقـت هـدف تعیـین گردید به‌طوری‌که، تغییر رنگ پس‌زمینه کاملاً حـذف شـده و پایـداری شناسـاگر در وضـعیت اسـیدی (زرد رنـگ) حفـظ شـد. در نهایـت، واکـنش RT-LAMP مغناطیسی در حجم ۲۵ میکرولیتر شـامل ۱۲ میکرولیتـر پـری‌میکس پرایمرهـا و dNTPs بـر پایـه پرایمرهـای اختصاصـی FIP، BIP، F3، LF و LB، ۱ میکرولیتـر آنـزیم Bsm DNA Polymerase، ۱ میکرولیترآنـزیم RevertAid reverse transcriptase، ۱ میکرولیتـر از RNA استخراج‌شده توسط نانوپروب، ۱,۲۵ میکرولیتـر معـرف Phenol Red و ۱ میکرولیتـر از رقـت بهینـه کمـپلکس MNP-CB3 (رقـت ۱:۱۰۰) فرمولـه شـده و واکنش تکثیر بـه مـدت ۹۰ دقیقـه در دمـای ۵۰ درجـه سانتی‌گراد انجام پذیرفت(۳۴).

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]

*- بهینه‌سازی واکنش RT-LAMP مبتنی بر ژل*

در میان انواع میکرو راکتورهای یکپارچه و قابل‌حمل در تشخیص نقطه مراقبت ، ساختار ژل به عنوان اقتصادی‌ترین و کارآمدترین گزینه شناسایی شد (۳۵، ۳۶). این ساختار، یک هیدروژل پایدار است که در دمای محیط (معمولاً دمای اتاق) حالت جامد و ژل‌مانند دارد و با افزایش دما به نقطه معینی، فاز آن به حالت مایع تغییر می‌کند. این تغییر فاز برگشت‌پذیر اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا امکان حرکت سیال و اختلاط مناسب واکنش‌دهنده‌ها را در سیستم‌های میکروفلوئیدیک فراهم می‌کند. در روش‌های LAMP و RT-LAMP، دمای واکنش ایزوترمال معمولاً در محدوده ۶۰ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد است؛ بنابراین، ژل‌هایی با نقطه ذوب نزدیک یا کمی پایین‌تر از این محدوده دمایی، گزینه‌های ایده‌آلی محسوب می‌شوند. چنین ژل‌هایی پایداری ساختاری خود را در دمای اتاق حفظ کرده و از نشت یا مهاجرت ناخواسته معرف‌ها جلوگیری می‌کنند، اما با رسیدن به دمای واکنش، به سرعت مایع شده و اجازه می‌دهند فرایند تکثیر اسید نوکلئیک به طور کارآمد پیش برود. به منظور شناسایی یک ژل مناسب، محصولات شرکت‌های تولیدکننده مواد پلیمری و هیدروژل‌های حساس به دما، مورد بررسی شد (جدول شماره ۵)(۳۷).

عامل ژل‌کننده بر اساس معیارهای زیر انتخاب شد:

- پایداری ساختاری در دمای اتاق (کمتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد)

نقطه ذوب نزدیک به دمای بهینه واکنش LAMP (حدود 65°C) به‌گونه‌ای که با رسیدن به دمای واکنش، ژل به‌طور کامل ذوب شده و اختلاط آزادانه معرف‌ها و تکثیر ایزوترمال مؤثر را امکان‌پذیر سازد.

*- دسترسی آسان و قیمت مناسب*

پس از بررسی دقیق مشخصات فنی شامل نقطه ذوب، خلوص، پایداری مکانیکی و قیمت، محصول شرکت BioBasic با کد کاتالوگ AB0015 به‌عنوان گزینه برتر انتخاب شد. این محصول که از آگاروز با کیفیت بالا تشکیل شده است، دارای نقطه ذوب حدود ۶۵ درجه سانتی‌گراد و دمای ژل‌شدن کمتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد است. همچنین، مقدار و غلظت ژل مورد استفاده در واکنش LAMP در برخی مطالعات به‌صورت محلول آگاروز با نقطه ذوب پایین و غلظت ۰/۷۵ درصدگزارش شده است. در مطالعه‌ای دیگر نیز از غلظت ۱/۰ درصد آگاروز با نقطه ذوب پایین در واکنش استفاده شده بود. بنابراین، تهیه اولیه محلول آگاروز با نقطه ذوب پایین و غلظت ۰/۷۵ درصد به‌عنوان نقطه آغاز این مرحله در نظر گرفته شد.

*- بررسی تأثیر محیط ژل پلیمر بر کارایی و پایداری حرارتی آنزیم‌ها در واکنش تکثیر ایزوترمال LAMP*

در این مرحله یک آزمایش اختصاصی با هدف بررسی توانایی ساختار ژلی در حفظ فعالیت و پایداری بلندمدت معرف‌های واکنش LAMP طراحی و اجرا شد. برای این منظور، نمونه‌ها بر اساس پروتکل بهینه‌شده پیشین، در یک ماتریس آگاروز-ژل کپسوله شدند؛ ماتریسی که شامل پرایمرها، آنزیم‌ها، dNTPها، بافر، نشانگر فنل‌رد و نانوپروب مغناطیسی بود. نمونه‌ها تحت شرایط کنترل‌شده (۴ °C درجه سانتی‌گراد دمای استاندارد یخچال خانگی) داخل یک رک مخصوص نگهداری شدند. پایداری سامانه در بازه‌های زمانی مختلف، با استفاده از نمونه‌های جداگانه در روزهای ۰، ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۴، ۲۰، ۳۰ و ۴۵ مورد ارزیابی قرار گرفت.

در هر بازه زمانی تعیین‌شده، یکی از نمونه‌ها از یخچال خارج شد و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد درترموسایکلر قرار گرفت تا تغییر فاز ژل به مایع رخ داده و واکنش LAMP فعال شود. پس از پایان مرحله حرارتی، محصولات تکثیرشده با الکتروفورز ژل آگاروز جدا شدند و الگوی باندهای حاصل مورد تحلیل قرار گرفت.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]

**جدول شماره ۵ :** پلیمرهای مورد نظر برای بستر ماتریکس ژلی

| شرکت سازنده | نام محصول | درصد سولفات (٪) | استحکام ژل($g/cm^2$) | دمای ژل شدن(Gelling T) | دمای ذوب ™ | شاخص*EEO |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SIGMA (A0701) | آگاروز نوع :VII-A دمای ژل شدن پایین (مناسب برای واکنش‌های آنزیمی درون ژل و کلونینگ) | %۰.۱۰ | ۲۵۰ (در ۱٪) <br>500 (در ۱.۵٪) | ۲۶ ± ± ۲ °C (در ۱.۵٪) | °C۶۵.۵ | 0.12 |
| SIGMA (A9414) | آگاروز: نقطه ذوب پایین) مناسب برای بیولوژی مولکولی؛ فاقد DNase, RNase و پروتاز( | %۰.۱۰< | — | °C۳۰~ | ~65 °C | 0.10 |
| SIGMA (A2790) | آگاروز: محدوده وسیع (مناسب برای جداسازی قطعات ۵۰ تا ۱۰۰۰ جفت‌باز در یک ژل ۳٪) | %۰.۳۵< | — | °C۳۵ | 65 °C | < 0.15 |
| ThermoFisher | آگاروز با نقطه ذوب پایین (Low Melting Point Agarose) | — | 500 <(در ژل ۱.۵درصد) | ۲۶ ± ± ۲ °C (در ۱.۵درصد) | <۶۵.۵) °C در ۱.۵درصد) | — |
| Bio Basic | آگاروز با نقطه ذوب پایین (Low Melting Point Agarose) | ≤ ≤ 0.15% | ≥ ≥ 400 g/cm² | 26 ± ± 0.5 °C | 62-68 °C | ≤ ≤ 0.12 |

این رویکرد امکان ارزیابی دقیق حفظ ساختار ژل، فعالیت آنزیمی، و کارایی کلی تکثیر را در بازه‌ای تا ۴۵ روز فراهم ساخت. به‌منظور مقایسه اثر محیط ژل بر پایداری بلندمدت فعالیت آنزیم‌ها، چهار نمونه شاهد نیز از مخلوط استاندارد واکنش LAMP، بدون محصورسازی در ژل، تهیه شد.

*- انتخاب و ارزیابی ساختارهای ماتریس ژلی برای پیاده‌سازی میکروراکتورهای ایزوترمال مبتنی بر RT-LAMP*

به‌منظور تعیین غلظت بهینه آگاروز برای حفظ ساختار ژل در دمای واکنش LAMP (۶۵ درجه سانتی‌گراد)، پایداری حرارتی هیدروژل‌های آگاروز با درصدهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، ژل‌های آگاروز با غلظت‌های(۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰درصد) (w/v) تهیه شدند و پودر آگاروز در بافر TAE ×۱,۰ (Tris-Acetate-EDTA) حل شد. هدف این آزمایش، شناسایی غلظتی بود که در دمای(° ۶۵ درجه سانتی‌گراد) کمترین تغییر فاز را نشان داده و تا حد امکان حالت جامد خود را حفظ کند؛ به‌طوری‌که در کاربرد عملی میکروراکتور، معرف‌های محبوس‌شده پیش از فعال‌سازی عمدی واکنش، پایداری ساختاری خود را از دست ندهند. نتایج این مطالعه، مبنایی برای انتخاب غلظت نهایی آگاروز بود.

*- ارزیابی و انتخاب بهینه ساختار سیستم‌های میکروفلوئیدیک مبتنی بر ژل*

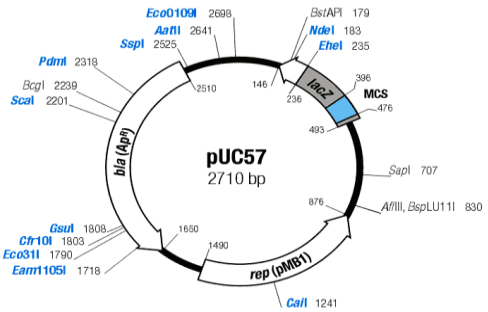
به‌منظور شبیه‌سازی ساختار سیستم میکروفلوئیدیک مبتنی بر ژل و بررسی امکان‌پذیری انجام واکنش تکثیر ایزوترمال (LAMP) در محیط‌های محصور و ژل پلیمری، ابتدا معرف‌های واکنش در یک ماتریس هیدروژل آگاروز کپسوله شدند. این رویکرد به‌عنوان مدلی برای کانال‌های میکروفلوئیدیک ژل-پلیمری عمل کرد که در آن‌ها معرف‌ها از پیش بارگذاری شده و واکنش از طریق فعال‌سازی حرارتی کنترل‌شده آغاز می‌شود. مخلوط واکنش LAMP/RT-LAMP با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بر اساس پروتکل بهینه‌شده قبلی تهیه شد پودر آگاروز (BioBasic، کد AB0015) در بافر TAE ×۰,۱ با غلظت بهینه حل و مخلوط واکنش به آن افزوده و به‌سرعت همگن‌سازی شد. برای شبیه‌سازی کانال‌های میکروفلوئیدیک با حجم کم و محیط محصور، مخلوط ژل-واکنش در دو فرم بارگذاری شد : میکروتیوب‌های استاندارد به‌عنوان مدلی اولیه برای ارزیابی کلی کیفیت واکنش و پایداری ژل در حجم‌های بالاترو لوله های مویینه(۳۸).

## یافته ها

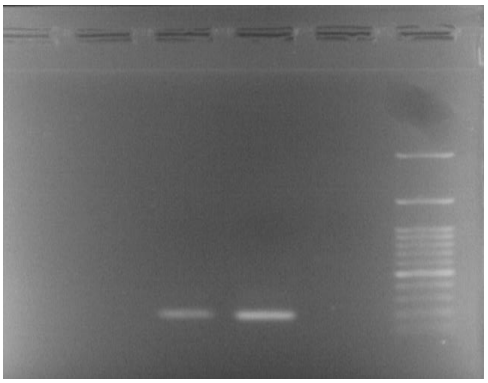
*- ارزیابی نتایج واکنش PCR برای اعتبارسنجی پرایمرهای CB3 و CF3 در تکثیر cDNA سنتزشده*

نتایج با هدف تأیید عملکرد صحیح پرایمرهای CB3و CF3 در تکثیر cDNA سنتزشده از رشته‌های RNAدر تصویر شماره ۱: ارائه شده است. واکنش PCRبا موفقیت انجام شد و پرایمرهای مورد استفاده، توانستند ناحیه هدف را به‌طور اختصاصی از روی قالب cDNAتکثیر کنند. اندازه باند مشاهده‌شده با اندازه مورد انتظار قطعه هدف بین دو پرایمر مطابقت دارد.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]




**تصویر شماره ۱:** نمای شماتیک پلاسمید pUC57 حاوی سازه ژنی مورد استفاده در این مطالعه

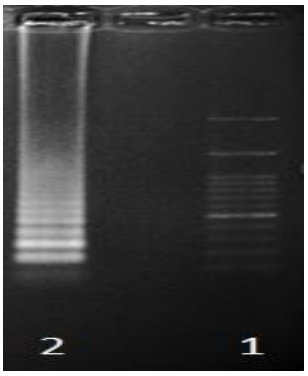


**تصویر شماره ۲:** واکنش PCR و تأیید عملکرد صحیح پرایمرهای CB3 و CF3 در سنتز cDNA از رشته‌های RNA / حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه. از راست به چپ DNA ladder ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز، چاهک (۳) محصول واکنش PCR انجام شده با cDNA سنتز شده بوسیله پرایمر CB3، چاهک (۴) محصول واکنش PCR انجام شده با cDNA سنتز شده بوسیله پرایمر CF3. محصولات واکنش های PCR انجام شده با cDNA سنتز شده بوسیله هر دو پرایمر CB3 و CF3 بر اساس DNA ladder، ۲۰۰ جفت باز دارند.

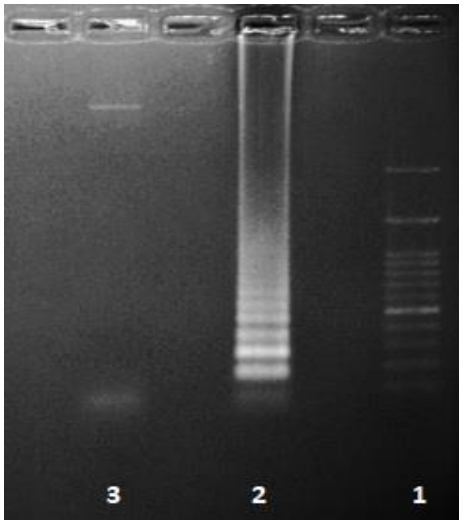
*- بهینه‌سازی واکنش LAMP برای شناسایی ناحیه هدف*

نتایج واکنش تکثیر LAMP با هدف بهینه‌سازی واکنش و تأیید عملکرد صحیح پرایمرها در دو نمونه، درحضور و عدم حضور بتائین، در تصویر شماره ۲ ارائه شده است. نمونه‌هایی که الگوی قوی شبیه به نردبان (ladder-like)یا الگوی پراکنده(smear pattern) نشان می‌دهند، مثبت تلقی شده و نشان‌دهنده حضور توالی هدف SARS-CoV-2 و موفقیت در تکثیر هستند.

*بهینه‌سازی واکنش RT-LAMP برای شناسایی ناحیه هدف*تصویر شماره ۴: الگوی الگوی نردبانی شفاف و قوی بدون باندهای غیر اختصاصی، نشان‌دهنده اختصاصیت بالای پرایمرهای طراحی‌شده و کارایی پروتکل بهینه‌شده در شناسایی توالی هدف SARS-CoV-2 است.




**تصویر شماره۳:** واکنش LAMP و تأیید عملکرد صحیح چاهک ۱: مارکر (DNA ladder) ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت‌باز ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز، چاهک (۲) محصول واکنش RT-LAMP که رفتار الکتروفورزی با الگوی نردبانی(Ladder-like pattern)




**تصویر شماره ٤:** نتیجه الکتروفورز واکنش RT-LAMP برای نمونه حاوی RNA ویروس و نمونه بدون RNA ویروس به عنوان کنترل منفی. چاهک شماره ۱DNA Ladder، ۲ RT-LAMP (مثبت، ۳ RT-LAMP (منفی

*- بهینه‌سازی واکنش رنگ‌سنجی برای مشاهده محصول واکنش RT-LAMP*

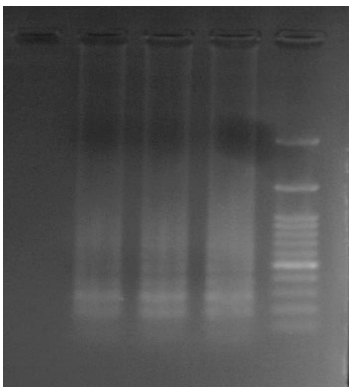
اصل این روش بر تولید یون‌های هیدروژن در طی تکثیر هم‌دمای DNA استوار است؛ این فرایند موجب کاهش pH محیط و در نتیجه تغییر رنگ فنل رد از صورتی

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]

(در pH خنثی یا کمی قلیایی) به زرد (در pH اسیدی) می‌شود. تغییر رنگ واضح از صورتی به زرد در نمونه‌های مثبت در کنار تصویر ژل-الکتروفورز نمونه ها (تصویر شماره ۶)، تأیید می کند که تنظیم اولیه pH مخلوط واکنش (تا حدود ۸/۵ تا ۸/۸ با استفاده از KOH) و نیز غلظت بهینه فنل رد (۲ mM)، حساسیت کافی برای شناسایی حتی واکنش‌هایی با بازده متوسط را فراهم کرده است. حفظ رنگ صورتی در کنترل منفی نیز نشان‌دهنده اختصاصیت بالای سیستم و عدم بروز تغییر رنگ کاذب است.




**تصویر شماره ۵:** بهینه‌سازی واکنش رنگ‌سنجی وابسته به pH در روش RT-LAMP با استفاده از فنل رد برای تشخیص بصری. پنل سمت چپ: نمایش نمونه‌های واکنش که در حضور غلظت‌های متفاوت فنل رد، رنگ صورتی شفاف خود را حفظ کرده‌اند. پنل سمت راست: نتایج واکنش‌های مثبت با شدت‌های گوناگون



**تصویر شماره ۶:** نتیجه الکتروفورز نمونه های حاوی فنل رد بدون تاثیر بر وقوع واکنش. از راست به چپ : DNA Ladder، و سه نمونه کنترل مثبت واکنش RT-LAMP در حضور فنل رد

نتایج نشان داد که هر سه مخلوط واکنش RT-LAMP که حاوی غلظت‌های متفاوتی از فنل‌رد بودند، به‌طور کامل مثبت بوده و تکثیر اختصاصی و کارآمد ناحیه هدف SARS-CoV-2 در آن‌ها حاصل شد. عدم مشاهده تفاوت معنی‌دار در شدت یا الگوی باندها میان سه لاین، تأیید می‌کند که افزایش غلظت فنل‌رد در محدوده بررسی‌شده، هیچ اثر مهاری بر فعالیت پلیمراز، رونویسی معکوس توسط RevertAid یا فرایند کلی تکثیر ایزوترمال نداشته است.

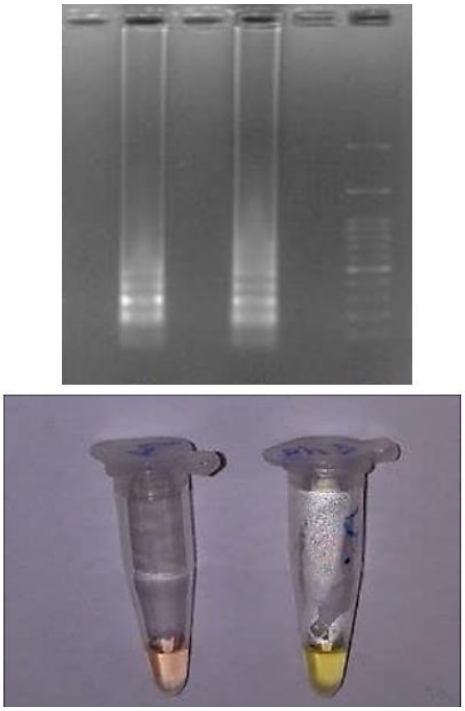
*- بهینه‌سازی واکنش RT-LAMP در حضور الیگوپروپ مغناطیسی و شناساگر PH*

نتیجه واکنش تکثیر RT-LAMP در حضور اولیگوپروب مغناطیسی و شناساگر pH در تصویر۷ ارائه شده است. نتایج به‌وضوح نشان می‌دهند که حضور همزمان اولیگوپروب مغناطیسی و شناساگر فنل‌رد، هیچ‌گونه تداخل یا مهارگری بر واکنش RT-LAMP ایجاد نکرده و تکثیر ایزوترمال با کارایی بالا و اختصاصیت کامل انجام شده است. الگوی نردبانی قوی و یکنواخت در تمام نمونه‌ها، تأییدکننده سازگاری کامل این اجزای نوآورانه (اولیگوپروب برای جداسازی مغناطیسی و فنل‌رد برای تشخیص رنگ‌سنجی چشمی) با سیستم RT-LAMP است.

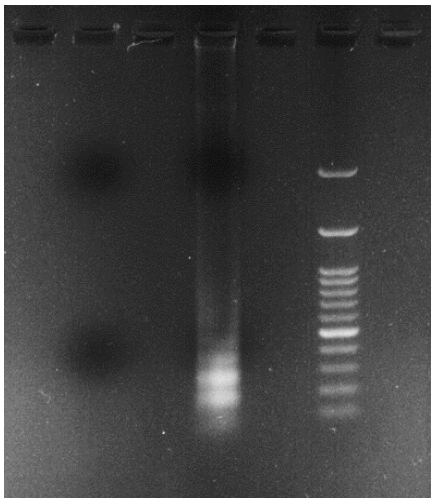
*- بهینه‌سازی واکنش LAMP در یک ماتریس ژل پلیمر*

در تصویر شماره ۸: نشان داده شده است که بهینه‌سازی موفقیت‌آمیز واکنش، امکان دستیابی به تکثیر ایزوترمال بسیار کارآمد در ساختار ژل پلیمر را فراهم می‌کند. الگوی نردبانی قوی در نمونه بهینه‌شده تأیید می‌کند که ماتریس ژل هیچ اثر مهاری بر فعالیت پلیمراز در شرایط مناسب ندارد.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]



**تصویر شماره ۷:** سمت راست (نتایج الکتروفورز ژل آگاروز محصولات واکنش RT-LAMP در حضور همزمان اولیگوپروب مغناطیسی و شناساگر فنل‌رد: از چپ به راست: لاین‌های واکنش RT-LAMP (مثبت با الگوی نردبانی قوی و یکنواخت)؛ لاین کنترل مثبت (با الگوی نردبانی مشابه)؛ لاین نهایی: مارکر مولکولی (Ladder) سمت چپ (نتایج تشخیص رنگ‌سنجی وابسته به pH در واکنشRT-LAMP؛ از چپ به راست: کنترل منفی (بدون تغییر رنگ و حفظ رنگ صورتی، نشان‌دهنده عدم تکثیر)؛ نمونه مثبت (تغییر رنگ واضح به زرد پررنگ، ناشی از کاهش pH به دلیل تولید پروتون در طی تکثیر ایزوترمال موفق).



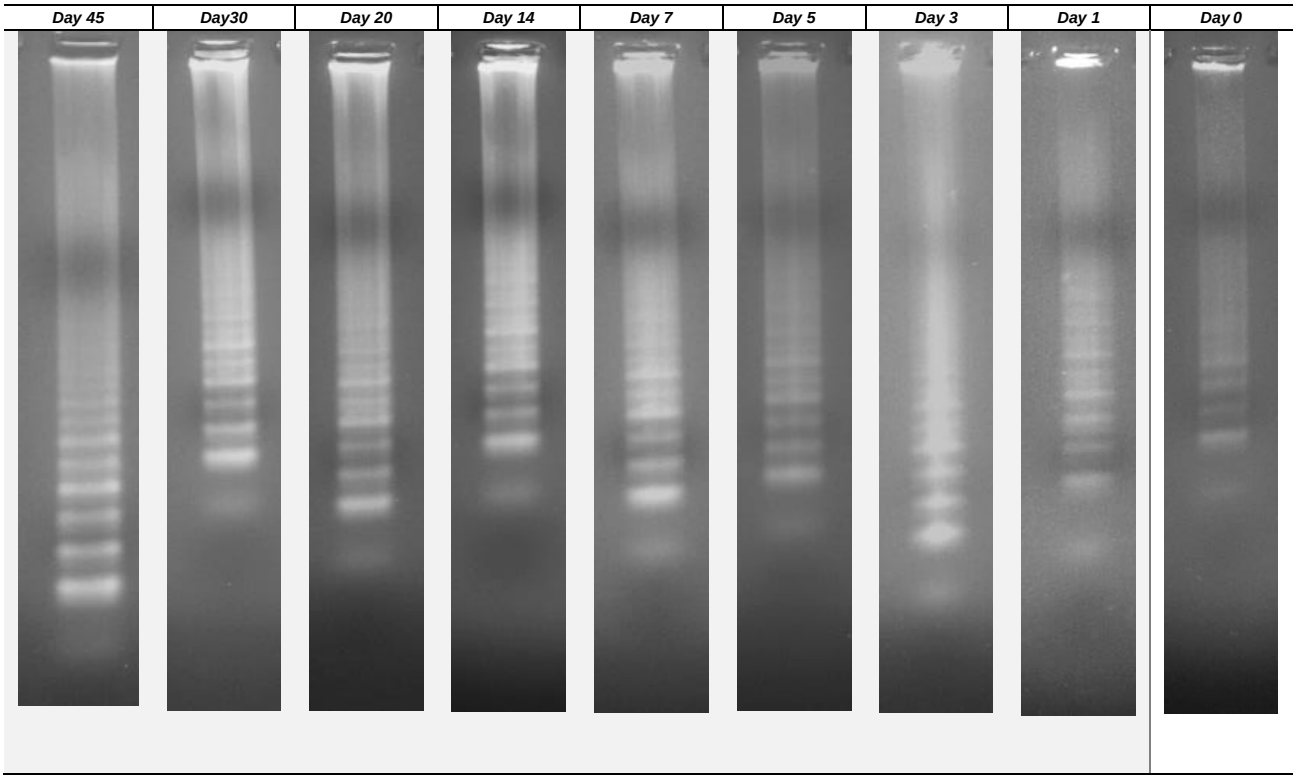
**تصویر شماره ۸:** نتایج بهینه‌سازی واکنش LAMP در محیط ژل پلیمر با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز. الگوی نردبانی قوی و پهن، نشان دهنده تکثیر ایزوترمال در کنار نشانگر مولکولی DNA Ladder

*- واکنش LAMP مبتنی بر ژل برای ارزیابی پایداری طولانی‌مدت تکثیر هدف SARS-CoV-2*

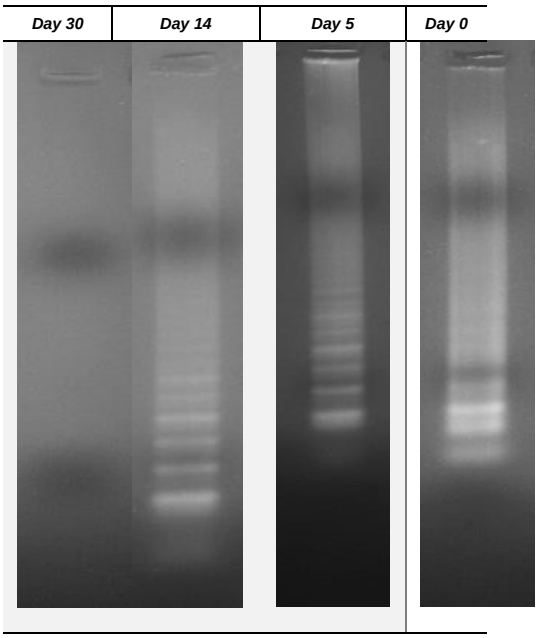
نتایج به وضوح نشان می‌دهد که ساختار ژل پلیمر تأثیر مثبت قابل‌توجهی بر پایداری طولانی‌مدت فعالیت آنزیم پلیمراز و سایر معرف‌های واکنش LAMP داشته است (تصویر شماره ۹). حفظ الگوی نردبانی قوی و یکنواخت تا روز ۴۵ تأیید می‌کند که ماتریس ژل قادر به محافظت از معرف‌ها در برابر تخریب حرارتی، هیدرولیز یا دناتوراسیون احتمالی بوده و تکثیر ایزوترمال کارآمد و اختصاصی ناحیه هدف SARS-CoV-2 را حتی پس از ۴۵ روز نگهداری در دمای یخچال امکان‌پذیر کرده است. این پایداری قابل توجه، برتری آشکار محیط ژل نسبت به سیستم‌های مایع استاندارد را برجسته می‌کند و امکان توسعه کیت‌های تشخیص آماده مصرف در محل مراقبت با ماندگاری طولانی(تا چند هفته)را فراهم می آورد.

حفظ الگوی نردبانی قوی و پهن تا روز ۴۵ نشان دهنده تأثیر مثبت ماتریس ژل در حفظ فعالیت آنزیم پلیمراز و پایداری معرف‌ها در طول ۴۵ روز نگهداری است که احتمال تکثیر کارآمد و اختصاصی را حتی پس از یک دوره طولانی تأیید می‌کند. در مخلوط واکنش LAMP معمولی، فعالیت آنزیم پلیمراز و سایر معرف‌ها به سرعت کاهش می‌یابد. تکثیر موفقیت‌آمیز فقط در نمونه تازه (روز ۰) مشاهده می‌شود و تنها پس از ۵ روز نگهداری، شدت الگو به طرز چشمگیری کاهش می‌یابد و پس از ۱۴ تا ۳۰ روز کاملاً متوقف می‌شود. این یافته نشان دهنده حساسیت بالای معرف‌ها (به ویژه آنزیم‌ها) به تخریب در حالت مایع حتی در دمای یخچال است. همان‌طورکه پیش‌تر اشاره شد (شامل ۹ خط تا روز ۴۵ بود)، الگوی نردبانی قوی و یکنواخت تا روز ۴۵ حفظ شد و حتی در روزهای طولانی‌تر (۱۴، ۲۰، ۳۰ و ۴۵) تکثیر کارآمد مشابه کنترل تازه مشاهده شد (تصویر شماره ۱۰). بنابراین، ساختار ژل پلیمر نه تنها امکان پیش‌بارگذاری و فعال‌سازی تأخیری را فراهم می‌کند، بلکه پایداری سیستم را در مقایسه با فرمولاسیون‌های مایع سنتی به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد و آن را برای توسعه کیت‌های تشخیصی آماده برای مصرف در محل مراقبت با ماندگاری طولانی ایده‌آل می‌کند.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]




**تصویر شماره ۹:** ارزیابی پایداری طولانی‌مدت واکنش LAMP مبتنی بر ژل برای تکثیر هدف SARS-CoV-2 توسط الکتروفورز ژل آگاروز. از چپ به راست: روزهای ۴۵، ۳۰، ۲۰، ۱۴، ۷، ۵، ۳، ۱ و ۰ پس از نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد.

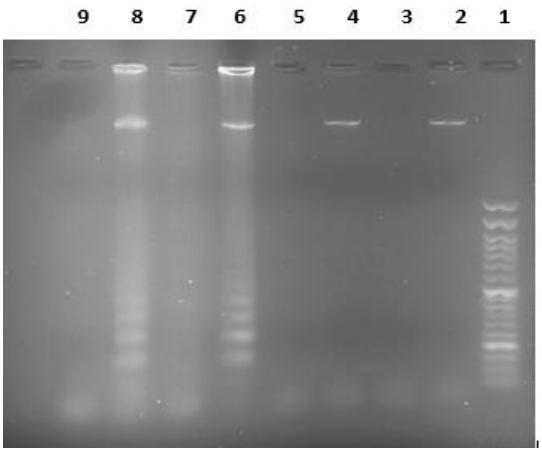



**تصویر شماره ۱۰:** ارزیابی پایداری طولانی‌مدت معرف‌های واکنش LAMP در مخلوط مایع استاندارد (بدون ساختار ژل) برای تکثیر هدف SARS-CoV-2 توسط الکتروفورز ژل آگاروز. از چپ به راست: روزهای ۳۰، ۱۴، ۵ و ۰ پس از نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد.

*- ارزیابی و انتخاب بهینه سازی ساختار سیستم‌های میکروفلوئیدیک مبتنی بر ژل*

الکتروفورز ژل آگاروز محصولات واکنش LAMP تحت شرایط مختلف در تصویر شماره ۱۱ نشان داده شده است. الگوی نردبانی شکل، مشخصه کلاسیک تکثیر موفقیت‌آمیز LAMP است. نتایج حاکی از آن است که بازده واکنش‌های انجام شده در ماتریس ژل، در مقایسه با شرایط مرسوم (محلول آزاد) به‌طور قابل‌توجهی پایین‌تر است ، با این حال، در تنظیمات میکروفلوئیدیک، استفاده از لوله مویین (capillary) در مقایسه با میکروتیوب‌های مرسوم، عملکرد و بازده بهتری را درتکثیر هدف نشان می‌دهد.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]




**تصویر شماره ۱۱:** الکتروفورز محصولات واکنش LAMP در ژل آگاروز تحت شرایط مختلف. خطوط از چپ به راست (۹ تا ۱): ۹: LAMP در ژل منفی – لوله مویین (کنترل منفی) ۸: LAMP در ژل مثبت – لوله مویین (الگوی نردبانی بسیار ضعیف) ۷: LAMP در ژل منفی – میکروتیوب (کنترل منفی) ۶: LAMP در ژل مثبت – میکروتیوب (الگوی نردبانی ضعیف) ۵: LAMP معمولی منفی – لوله مویین (کنترل منفی) ۴: LAMP معمولی مثبت – لوله مویین (الگوی نردبانی متوسط) ۳: LAMP معمولی منفی – میکروتیوب (کنترل منفی) ۲: LAMP معمولی مثبت – میکروتیوب (الگوی نردبانی ملایم) ۱: نردبانی (الگوی نردبانی قوی به عنوان کنترل مثبت استاندارد).

## بحث

در این مطالعه، یک میکروراکتور RT-LAMP مبتنی بر ژل آگاروز با نقطه ذوب پایین برای تشخیص رنگ‌سنجی SARS-CoV-2 در محل مراقبت (POC) طراحی و بهینه‌سازی شد. یافته‌های ما نشان می‌دهد که ماتریس ژل، علاوه بر ایجاد یک محیط واکنش نیمه‌جامد که از آلودگی متقاطع و تخریب آنزیمی جلوگیری می‌کند، پایداری معرف‌ها را تا ۴۵ روز در دمای یخچال تضمین کرده و نیاز به زنجیره سرد را حذف می‌نماید. اگرچه راندمان تکثیر در این بستر ژلی در مقایسه با شرایط محلول آزاد اندکی کمتر است، اما این پلتفرم در لوله‌های مویین عملکرد بهینه‌ای نشان داد که ادغام آن در سیستم‌های میکروفلوئیدیک را تسهیل می‌کند.

در مقایسه با روش‌های رایج تثبیت‌سازی معرف‌ها مانند «لیوفیلیزاسیون» (Lyophilization) که در مطالعات پیشین به عنوان استاندارد طلایی برای افزایش ماندگاری کیت‌های تشخیصی مولکولی در تشخیص عوامل عفونی نظیر ویروس‌های تنفسی و زیکا معرفی شده است [۱, ۲]، روش پیشنهادی ما دارای مزایای عملیاتی قابل‌توجهی است. برخلاف لیوفیلیزاسیون که فرآیندی هزینه‌بر بوده و نیازمند تجهیزات پیشرفته و شرایط انبارداری دقیق (کنترل رطوبت) است، استفاده از ماتریکس ژل آگاروز یک استراتژی مقرون‌به‌صرفه و ساده برای تثبیت‌سازی مواد بیوشیمیایی فراهم می‌کند که نیاز به زیرساخت‌های آزمایشگاهی پیچیده را کاهش می‌دهد. علاوه بر این، در مقایسه با سایر ماتریس‌های جامد نظیر «سنسورهای مبتنی بر کاغذ» (Paper-based sensors) که به طور گسترده برای کاربردهای POC توسعه یافته‌اند [۳, ۴]، پلتفرم ما چالش‌های رایج این سیستم‌ها مانند نوسان در نفوذپذیری سیال و توزیع ناهمگون معرف‌ها را ندارد. شبکه متخلخل ژل آگاروز در مطالعه حاضر، توزیع یکنواخت و پایدار اجزای واکنش را تضمین کرده و از تجمع غیر اختصاصی آنزیم‌ها که در برخی سنسورهای مبتنی بر غشاء دیده می‌شود، جلوگیری می‌کند.

دستیابی به پایداری ۴۵ روزه معرف‌ها در دمای یخچال، در حالی که در مخلوط‌های مایع رایج، فعالیت آنزیمی به سرعت (طی ۱۴ تا ۳۰ روز) متوقف می‌شود، نشان‌دهنده اثربخشی مکانیسم‌های حفاظتی این میکروراکتور است. این پایداری به چند عامل کلیدی نسبت داده می‌شود: نخست، کاهش شدید تحرک مولکولی به واسطه «به‌دام‌اندازی فیزیکی» (Physical entrapment) در شبکه هیدروژل سه‌بعدی که برخورد تصادفی و سرعت واکنش‌های تخریبی مانند پروتئولیز را کاهش می‌دهد. دوم، کاهش «فعالیت آب» (Water activity) که در محیط مایع به عنوان حلال و کاتالیزور برای واکنش‌های هیدرولیتیک عمل می‌کند. در ساختار ژلی، بخش بزرگی از مولکول‌های آب به زنجیره‌های آگاروز متصل شده و در نتیجه سرعت هیدرولیز پیوندهای پپتیدی در آنزیم‌های Bst پلیمراز و

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]

RevertAid کاهش می‌یابد [۵]. علاوه بر این، برهم کنش‌های ضعیف هیدروژنی میان پلی‌ساکاریدهای آگاروز و گروه‌های عاملی پروتئین‌ها، به حفظ ساختار سه‌بعدی (Native conformation) آنزیم‌ها کمک کرده و نقشی مشابه تثبیت‌کننده‌های شیمیایی نظیر گلیسرول یا ترهالوز ایفا می‌کند، بدون آنکه نیاز به افزودن مواد جانبی خارجی باشد.

این پلتفرم با ادغام مراحل استخراج، تکثیر و تشخیص بصری در یک سیستم واحد، ضمن غلبه بر محدودیت‌های روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR و زیرساخت‌های آزمایشگاهی پیچیده، چارچوبی منعطف برای توسعه ابزارهای تشخیصی نسل بعدی فراهم می‌کند. با توجه به سادگی و کارایی این سیستم در شرایط محیطی، این دستاورد می‌تواند ابزاری حیاتی برای مدیریت بیماری‌های عفونی نوظهور در مناطق محروم و شرایط اپیدمیولوژیک باشد. در مجموع، ماتریکس ژل آگاروز نه تنها یک حامل فیزیکی، بلکه یک محیط محافظ فعال است که کارایی و طول عمر کیت‌های تشخیصی POC را به‌طور چشمگیری ارتقا می‌دهد.

## سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران، تحت شماره کمک هزینه ۱۴۲۹۷ انجام شده است.

## References

1- Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature 2020; 579(7798): 270-273. PMID: 32015507

2- Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature 2020; 579(7798): 265-269. PMID: 32015508

3- World Health Organization. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 [Internet]. Geneva: WHO; 2020 [cited 2026 Sep 28]. Available from: https: //www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020

4- Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. ACS Cent Sci 2020; 6(5): 591-605. PMID: 32382657

5- Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill 2020; 25(3): 2000045. PMID: 31992387

6- Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis—a review of current methods. Biosens Bioelectron 2021; 172: 112752. PMID: 33126180

7- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 2000; 28(12): E63. PMID: 10871386

8- Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes 2002; 16(3): 223-229. PMID: 12144774

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]

9- Kashir J, Yaqinuddin A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. Med Hypotheses 2020; 141: 109786. PMID: 32361529

10- World Health Organization. The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: policy guidance. Geneva: World Health Organization; 2016.

11- Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki KI. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. Biotechniques 2009; 46(3): 167-172. PMID: 19317660

12- Tanner NA, Zhang Y, Evans TC Jr. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. Biotechniques 2015; 58(2): 59-68. PMID: 25652028

13- Augustine R, Hasan A, Das S, Ahmed R, Mori Y, Notomi T, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. Biology (Basel) 2020; 9(8): 182. PMID: 32707972

14- Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. J Biochem Biophys Methods 2004; 59(2): 145-157. PMID: 15163526

15- Rabe BA, Cepko C. SARS-CoV-2 detection using isothermal amplification and a rapid, inexpensive protocol for sample inactivation and purification. Proc Natl Acad Sci U S A 2020; 117(39): 24450-24458. PMID: 32900935

16- Thompson D, Lei Y. Mini review: recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. Sens Actuators Rep 2020; 2(1): 100017. PMID: 34766041

17- Zhang Y, Odiwuor N, Xiong J, Sun L, Nyaruaba RO, Wei H, et al. Rapid molecular detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) virus RNA using colorimetric LAMP. medRxiv 2020; : 2020.02.26.20028373.

18- Park GS, Ku K, Baek SH, Kim SJ, Kim SI, Kim BT, et al. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays targeting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). J Mol Diagn 2020; 22(6): 729-735. PMID: 32276051

19- Howson EL, Kidd SP, Armson B, Gubbins S, Sawyer J, Cassar C, et al. Preliminary optimisation of a simplified sample preparation method to permit direct detection of FMDV RNA by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). J Virol Methods 2018; 263: 66-70. PMID: 30389556

20- Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat Protoc 2008; 3(5): 877-882. PMID: 18451795

21- Njiru ZK. Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6(6): e1572. PMID: 22745836

22- New England Biolabs. Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase. Product Manual. Ipswich: NEB; 2021.

23- Shu Y, McCauley J. GISAID: Global initiative on sharing all influenza data—

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]

from vision to reality. Euro Surveill 2017; 22(13): 30494. PMID: 28382917

24- NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res 2016; 44(D1): D7-D19. PMID: 26615191

25- NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res 2018; 46(D1): D8-D13. PMID: 29140470

26- Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature 2020; 579(7798): 265-269. PMID: 32015508

27- Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science 2020; 367(6483): 1260-1263. PMID: 32075877

28- Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. Lancet 2020; 395(10224): 565-574. PMID: 32007145

29- GenScript. pUC57 Vector Information. Technical Manual. Piscataway: GenScript; 2020.

30- Milligan JF, Groebe DR, Witherell GW, Uhlenbeck OC. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. Nucleic Acids Res 1987; 15(21): 8783-8798. PMID: 2446268

31- Davanloo P, Rosenberg AH, Dunn JJ, Studier FW. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A 1984; 81(7): 2035-2039. PMID: 6371808

32- Krupp G. RNA synthesis: strategies for the use of bacteriophage RNA polymerases. Gene 1988; 72(1-2): 75-89. PMID: 2468578

33- Moghadasi S, Rafati A, Haghshenas M, Gill P. Nanomolecular magnetic probe for detection of nucleic acid sequence-based amplification of COVID-19 RNA with the naked eye. BRIAC 2023; 13(2): 140-151.

34- Nikpey N, Rafati A, Haghshenas M, Gill P. Nanomolecular magnetic probe for colorimetric RT-LAMP of viral RNA. BRIAC 2022; 13(3): 292-307.

35- Safavieh M, Kanakasabapathy MK, Tarlan F, Ahmed MU, Zourob M, Asghar W, et al. Robust universal real-time PCR detection system for Ebola, Zika, and Hepatitis B in clinical samples. Sci Rep 2016; 6: 27959. PMID: 27301689

36- Liu C, Geva E, Mauk M, Qiu X, Abrams WR, Malamud D, et al. An isothermal amplification reactor with an integrated isolation membrane for point-of-care detection of infectious diseases. Analyst 2011; 136(10): 2069-2076. PMID: 21409215

37- Wang Y, Wang Y, Ma AJ, Li DX, Luo LJ, Liu DX, et al. Rapid and sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by multiple cross displacement amplification. Sci Rep 2015; 5: 11902. PMID: 26144915

38- Rafati A, Gill P. Microfluidic method for rapid turbidimetric detection of the DNA of Mycobacterium tuberculosis using loop-mediated isothermal amplification in capillary tubes. Microchim Acta 2015; 182(3-4): 523-530.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]

39- Kaur N, Toley BJ. Paper-based nucleic acid amplification tests for point-of-care diagnostics. Analyst 2018; 143(10): 2213-2234. PMID: 29683153

40- Kumar S, Gallagher R, Bishop J, Kline E, Buser J, Lafleur L, et al. Long-term dry storage of enzyme-based reagents for isothermal nucleic acid amplification in a porous matrix for use in point-of-care diagnostic devices. Analyst 2020; 145(21): 6875-6886. PMID: 32820749

41- Yetisen AK, Akram MS, Lowe CR. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. Lab Chip 2013; 13(12): 2210-2251. PMID: 23652632

42- Yang SM, Lv S, Zhang W, Cui Y. Microfluidic point-of-care (POC) devices in early diagnosis: a review of opportunities and challenges. Sensors (Basel) 2022; 22(4): 1620. PMID: 35214519

43- Rajan R, Kumar N, Zhao D, Dai X, Kawamoto K, Matsumura K. Polyampholyte-based polymer hydrogels for the long-term storage, protection and delivery of therapeutic proteins. Adv Healthc Mater 2023; 12(17): e2203253. PMID: 36815203

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16 ]