

Введення в молекулярно-генетичну діагностику



Проф. Весніна Л.Е.

Молекулярно-генетична діагностика -

- галузь біології та медицини, яка використовує методи молекулярної біології для вивчення та діагностики захворювань
- Цей розділ біології швидко розвивається, відкриваючи нові можливості для виявлення, діагностики та лікування різних патологій
- З його допомогою ми можемо досліджувати генетичну структуру організмів, визначати генетичні мутації, що призводять до захворювань, та розробляти ефективні методи терапії



Використання молекулярно-генетичних методів

Фундаментальні дослідження

Молекулярно-генетичні методи дозволяють досліджувати генетичну структуру організмів на молекулярному рівні. Це дає можливість вивчати еволюційні процеси, розкривати генетичні механізми розвитку організмів, досліджувати механізми успадкування та різноманітність генетичного матеріалу

Прикладні дослідження

Молекулярно-генетичні методи застосовуються для діагностики та лікування захворювань, розробки нових ліків та терапевтичних стратегій. Вони дозволяють виявляти генетичні мутації, що є причиною захворювань, та розробляти персоналізовану терапію, враховуючи індивідуальні генетичні особливості пацієнта

Перспективи розвитку

Молекулярно-генетична діагностика продовжує розвиватись, відкриваючи нові можливості для медицини та біології. З розвитком технологій, ми можемо очікувати на розробку нових методів діагностики та терапії, а також на покращення існуючих

Використання молекулярно-генетичних методів:

Фармакогенетика

Медична
генетика

Спортивна
медицина

Мікробіологія

Біотехнології

Ветеринарія

Сільське
господарство





Використання молекулярно-генетичних методів для:

- виявлення інфекційних захворювань на ранній стадії без наявних зовнішніх проявів, що їх неможливо визначити звичайними методами
- дослідження алергічних реакцій
- діагностики спадкових хвороб (синдром Дауна)
- визначення індивідуальних генетичних особливостей й ефективного персоналізованого лікування
- оцінювання спортивних перспектив у дітей
- вивчення генетичного різноманіття генофонду, у якому можуть бути корисні мутації
- моніторингу інфекційних захворювань у домашніх тварин
- контролю якості й безпеки генетично модифікованих продуктів



Значення молекулярно-генетичної діагностики

Точна діагностика

1

Молекулярно-генетичні методи забезпечують точнішу та швидшу діагностику захворювань, що дозволяє призначити ефективне лікування та запобігти ускладненням.

Профілактика

3

Молекулярно-генетична діагностика може допомогти виявити генетичні фактори ризику захворювань та розробити програми профілактики, що зменшує ризик розвитку захворювань.

2

Персоналізована терапія

Використання генетичної інформації для розробки персоналізованої терапії дозволяє підібрати найефективніше лікування, враховуючи індивідуальні генетичні особливості пацієнта.



Організація роботи лабораторії

Оснащення

Лабораторія молекулярно-генетичних досліджень повинна бути оснащена сучасним обладнанням: ПЛР-апаратами, секвенаторами, центрифугами, мікроскопами, холодильниками та іншими необхідними інструментами.

Персонал

Для ефективної роботи лабораторія потребує висококваліфікований персонал, який складається з біологів, генетиків, лаборантів, які володіють необхідними знаннями та навичками.

Реєстрація та збереження даних

Важливим аспектом організації роботи є ретельна реєстрація та збереження всіх даних, отриманих в ході досліджень. Це забезпечує точність, відтворюваність результатів та можливість подальшого аналізу.

Система контролю якості

Для забезпечення точності результатів та дотримання стандартів якості, лабораторія повинна мати чітко визначену систему контролю якості, що включає внутрішні та зовнішні контролю.

Лабораторія молекулярно-генетичних досліджень

Лабораторія має бути забезпечена

- водопроводом,
- каналізацією,
- електрикою,
- опаленням,
- вентиляцією,
- теплопостачанням для повітронагрівачів
- припливних установок

Усі приміщення лабораторії повинні мати природне та штучне освітлення залежно від виду робіт відповідно до вимог



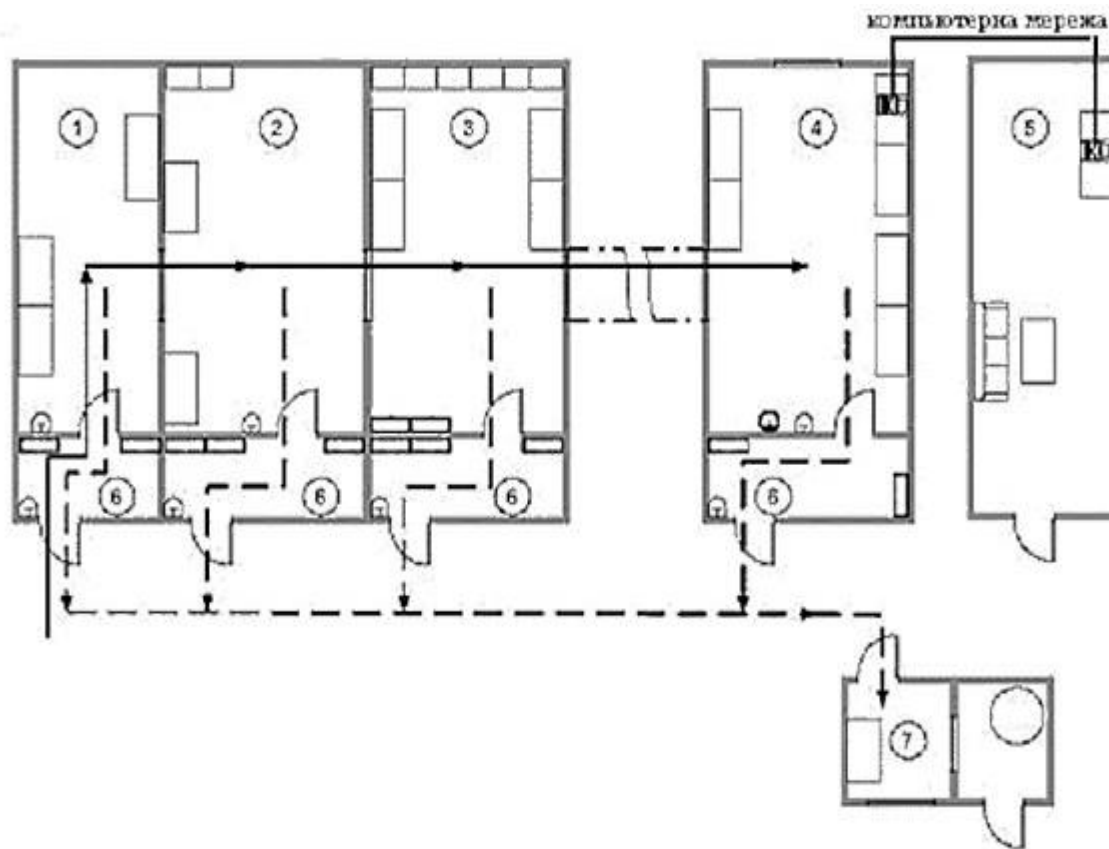
- Поверхня підлоги, стін, стелі в лабораторних приміщеннях має бути
 - гладкою,
 - без щілин,
 - легко оброблятись,
 - стійкою до дії миючих та дезінфікуючих засобів
- підлога **НЕ повинна** бути слизькою





- Лабораторні меблі повинні мати покриття, **стійке** до дії миючих та дезінфікуючих засобів
- Поверхня столів **НЕ повинна** мати швів та тріщин
- Ширина проходів та між двома рядами виступаючого обладнання має бути
- **НЕ менше** 1,5 метрів (з урахуванням виступаючих конструкцій)

Схема організації ПЛР-лабораторії



- 1 - Зона прийому, реєстрації, розбору і первинної обробки матеріалу;
- 2 - Зона виділення НК;
- 3 - Зона приготування реакційних сумішей, проведення ЗТ та ПЛР;
- 4 - Зона детекції продуктів ампліфікації методом електрофорезу або ГІФА;
- 5 - Кімната аналізу результатів;
- 6 - Передбокс;
- 7 - Кімната знезараження матеріалу

- Приміщення лабораторії мають бути поділені на «брудну» та «чисту» зони
- Планування та розміщення обладнання повинні забезпечувати поточність руху біоматеріалу та виконання вимог санітарних норм
- Витяжні установки, що обслуговують заразні зони, витяжні та ламінарні шафи обладнуються ультрафіолетовими стерилізаторами повітря



- Приміщення, в яких встановлені шафи біологічної безпеки з HEPA або ULPA-фільтрами всередині, повинні забезпечуватися припливним повітрям з двоступінчастим попереднім очищенням фільтрами EU-5 та EU-8 класів
- Необхідна вентиляційна камера для припливної системи у чистій зоні та для витяжної вентиляції – у брудній
- Приміщення з витяжною установкою з брудної зони повинно мати УФ-опромінювач для стерилізації повітря в період чищення/заміни фільтра та чищення спиртом ламп каналного УФ-стерилізатора



- Вікна та двері приміщень «брудної» зони лабораторії мають бути герметичними
- Обов'язкове маркування автоклавів, столів, стелажів та поділ руху інфекційного та чистого матеріалу за часом



Техніка безпеки

1

Захист від контамінації

Контамінація - це забруднення зразків або реакційних сумішей сторонніми компонентами, що може призвести до невірних результатів. Для запобігання контамінації необхідно дотримуватися правил асептики та використовувати одноразові матеріали.

2

Захист персоналу

Важливо захищати персонал від впливу потенційно небезпечних речовин, що використовуються в лабораторії. Для цього потрібно використовувати захисний одяг, рукавички, окуляри та маски.

3

Правильне зберігання реагентів

Реагенти повинні зберігатися за відповідними температурами та умовами, щоб запобігти їх псуванню та втраті активності.

4

Правильна утилізація відходів

Всі відходи лабораторії повинні утилізуватися відповідно до правил безпеки, щоб запобігти забрудненню навколишнього середовища.

Контамінація (лат. *Contaminatio* – змішання, злиття)



Дезинфекція ≠ деконтамінація

- Дезинфекція супроводжує деконтамінацію, знижуючи загальний рівень контамінанти
- Дезинфекція, навпаки, може сприяти розповсюдженню контамінанти (амплікони)



3.2.3. ПЛР-лабораторія повинна мати дві умовні зони "чисту" і "брудну" та включати такий мінімальний набір робочих приміщень:

"чиста" зона:

- приміщення прийому, реєстрації, розбору і первинної обробки матеріалу;
- приміщення для виділення НК;
- приміщення приготування реакційних сумішей і проведення ПЛР - ампліфікаційна;

"брудна" зона:

- приміщення детекції продуктів ампліфікації (при застосуванні методів електрофорезу або ГІФА) - форезна;
- секвенаторна



«Чиста» зона ПЛР-лабораторії
приміщення, вільні від синтезованих ампліконів (кімнати
пробопідготовки, виділення НК, приготування реакційної суміші та
ампліфікації)

(Міністерство охорони здоров'я, Наказ "Про затвердження державних
санітарних норм і правил "Організація роботи лабораторій при дослідженні
матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I - IV груп патогенності,
молекулярно-генетичними методами" від 24.01.2008 N 26)





Обладнання

- Ампліфікація та детекція
- Станції автоматичного виділення ДНК та РНК
- Ламінарні шафи
- Бокси для стерильних робіт
- Допоміжне обладнання
- Дозуюче обладнання



Обладнання



Ламінарний бокс
II класу захисту



Детектуючий ампліфікатор
(Real-time)



Швидкісна
центрифуга



Твердотільний
термостат



Вортекс



Ферменти молекулярно-генетичних досліджень

Фермент	Функція	Приклади використання
Полімерази	Синтезують нові нитки ДНК або РНК, використовуючи наявні нитки як матрицю.	ПЛР, секвенування ДНК
Нуклеази	Розщеплюють фосфодієфірні зв'язки в ДНК або РНК, розрізаючи нитки на більш дрібні фрагменти.	Клонування ДНК, секвенування ДНК
Лігази	З'єднують кінці ДНК-фрагментів, утворюючи цілісні молекули ДНК.	Клонування ДНК, репарація ДНК
Фосфатази	Видаляють фосфатні групи з кінців ДНК або РНК, що може бути необхідним для деяких молекулярно-генетичних процедур.	Клонування ДНК, секвенування ДНК

Ферменти рестрикції та модифікації

1

Рестриктази

Рестриктази - це ензими, що розрізають ДНК в певних місцях, які називаються ділянками розпізнавання. Кожна рестриктаза розпізнає певну послідовність нуклеотидів і розрізає ДНК в цьому місці.

2

Метилази

Метилази - це ферменти, які приєднують метильні групи до певних основ ДНК, що може змінити активність гена. Метилування ДНК відіграє важливу роль у регуляції експресії генів.

3

Застосування

Рестриктази та метилази широко використовуються в молекулярній генетиці для клонування генів, створення рекомбінантних ДНК, аналізу генетичного поліморфізму та інших досліджень.



Дякую за увагу!