РЕФЕРАТ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

" ОХРАНА ТРУДА "

ОБЕСПЕЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С РЕКОМБИНАНТНЫМИ МОЛЕКУЛАМИ ДНК

Студент IV курса

биолого-почвенного факультета

кафедры биохимии

Попов Н. Б.

1998

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Студенты кафедры биохимии для исследовательской работы направляются в различные научно-исследовательские институты, а также могут заниматься в лабораториях кафедры. Моя работа проходит в лаборатории "Регуляция экспрессии генов" Института Цитологии РАН. Непосредственно моя научная деятельность не связана с животными и в основном мне приходится иметь дело с культурами клеток млекопитающих или бактериальных клеток. Большую же часть времени отводится на работу с еще более мелкими объектами - молекулами нуклеиновых кислот и белков. Исследования нашей группы связаны с изучением роли продукта гена ретинобластомы (pRb) в регуляции клеточного цикла. Большинство клеток на том или ином этапе своего развития претерпевают деление, т.е. проходят через фазы клеточного цикла. Впервые белок pRb был описан в связи с мутацией кодирующего его гена в трансформированных (т.е. ставших злокачественными) клетках сетчатки глаза. Именно с отсутствием данного белка связаны опухоли этой ткани (ретинобластомы), а также, как выяснилось впоследствии, и других тканей. Белок pRb экспрессируется у всех эукариотических организмов - от дрожжей до человека и у всех выполняет роль супрессора (негативного регулятора) клеточного цикла. Именно поэтому мы считаем, что изучение закономерностей в клеточном цикле, рассмотрение механизмов его регуляции и представляет собой очень важную и интересную область клеточной биологии.

В своей научной работе мы используем самые разные инструменты и методы исследования - от световой микроскопии до радиоактивных изотопов. Находят применение также различные электрические приборы и вычислительные машины - от калькулятора до компьютеров. Непосредственно моя работа связана, как правило, с получением рекомбинантных молекул ДНК и последующим использования их в разнообразных целях.

Необходимо отметить, что администрацией Института Цитологии предусмотрены правила безопасной работы с рекомбинантными молекулам ДНК. Эти правила включают меры безопасности и физические меры защиты.

Меры безопасности слагаются из приемов стандартной микробиологической практики, физической и биологической защиты. В соответствии с правилами к работе с рекомбинантными ДНК допускаются лица, прошедшие медицинский осмотр и получившие подготовку, которая предусматривает знание основ биологии организмов, с которыми предстоит работать, и приемов работы с ними. Подготовка должна быть подтверждена документально.

Физические меры защиты разделяются на несколько уровней.

Минимальный уровень (Ф1)

Эксперименты, требующие физической защиты первого уровня, могут проводится в лаборатории, предназначенной для работы с микроорганизмами ряда Escherichia (штамм E. Coli K-12) с помощью известных и общепринятых микробиологических методов. Работа проводится на открытых поверхностях без специального защитного оборудования. В лаборатории должна поддерживаться строгая чистота. Прием и хранение пищи, курение в этом помещении запрещены. Следует использовать для работы только механические пипетки. В лаборатории Ф1 проводят все эксперименты по клонированию фрагментов ДНК прокариотического и эукариотического направления.

Низкий уровень (Ф2)

Эксперименты, в которых необходима физическая защита вторго уровня, могут проводится в помещениях, подобных лаборатории Ф1, однако доступ посторонних лиц в лабораторию ограничивается. Автоклав (паровой стерилизатор) устанавливается в том же здании, где расположена лаборатория. Рекомендуется использование боксов с ламинарным потоком воздуха и другие устройства физической защиты, сводящие к минимуму опасность утечки материалов. Использованные в опыте материалы, содержащие микроорганизмы, обеззараживаются. Во время работы на двери лаборатории вывешивается знак биологической опасности. Применяются все приемы, обязательные для Ф1. В лаборатории Ф2 проводятся эксперименты по манипуляции с генами животных и человека, могущих нести потенциальную биологическую опасность (в том числе с онкогенами на основе клеток E. Coli K-12 и векторов типа pBR322, pUC и др.).

Средний уровень (Ф3)

Эксперименты, требующие физической защиты третьего уровня, проводятся в лаборатории, имеющей специальные инженерные конструкции и защитное оборудование, а также автономное оборудование: автоклав, СО2 инкубатор, центрифуги, термостаты. Лаборатория отделяется от других помещений дверями с блокировкой, обеспечивающими герметичность. Поверхности стен, полов, столов и потолков должны тщательно очищаться и деконтаминироваться. Внутри лаборатории создается отрицательное давление. Воздух из лаборатории поступает за ее пределы по самостоятельным воздуховодам после предварительной очистки на фильтрах. Работы, проводимые в лаборатории Ф3 включают эксперименты на клетках животных и человека, трансформированных онкогенами и ретровирусами, содержащими различные гены, в том числе онкогены. На дверях лаборатории, оборудовании и материалах устанавливается знак биологической опасности.

Вход в лабораторию Ф3 разрешается только тем лицам, чье присутствие предусмотрено программой исследований и утверждено комиссией института по рекомбинантным ДНК.

Работающие должны пользоваться средствами индивидуальной защиты в соответствии с нормами их бесплатной выдачи.

Непосредственно после работы рабочие поверхности боксов и другого оборудования обеззараживаются, стеклянная посуда стерилизуется непосредственно в лаборатории.

Высокий уровень Ф4 - в Институте Цитологии РАН не предусматривается.

УСЛОВИЯ ТРУДА ВО ВРЕМЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ОБОРУДОВАНИЕ

Для выполнения научной работы я пользуюсь следующим оборудованием:

- термостат (температура до 85С)

- настольная микроцентрифуга (максимальная скорость - 12000 об/мин)

- центрифуги К-23 и К-24 (максимальная скорость - 15000 об/мин)

- камеры для проведения гель-электрофореза

- трансиллюминатор

- аппарат для блоттинга

- электрическая плитка

Регистрация результатов проводится с помощью траниллюминатора, обычных ламп накаливания и фотоаппарата. В связи с этим, определенная часть рабочего времени проходит в фотокомнатах.

Трансиллюминатор представляет собой прибор, состоящей из ламп, испускающих ультрафиолетовый свет и кварцевого стекла (такое стекло используется, поскольку оно пропускает ультрафиолетовые лучи). Так как излучение в ультрафиолетовом диапазоне является небезопасным для глаза, то наблюдение ведется только в специальных очках, приспособленных для этих целей. Ультрафиолетовый свет применяется с целью детекции фрагментов ДНК, разделенных в агарозном геле и связанных со специальным красителем - бромистым этидием, который поглощает свет в указанном диапазоне. Благодаря этому становится возможным наблюдение фрагментов ДНК и определение их размеров, а также получение их в препаративных количествах для последующего использования.

Камеры для электрофореза представляют собой емкости определенной конфигурации, в которые помещается гель, а затем заливается буфер, содержащий заряженные подвижные частицы - ионы. Благодаря такой конструкции обеспечивается подвижность фрагментов нуклеиновых кислот или белков в гелях и их разделение из смеси. Разделение проводится при силе тока до 50 мА и напряжении до 100 V.

Устройство для переноса (блоттинга) состоит из двух платиновых пластин, помещенных в изолирующую камеру. Параметры электрического тока при переносе не превосходят указанных для гель-электрофореза.

Используется термостаты двух типов - воздушный и водяной. Температура в воздушном термостате не превышает 37С, а в водяном - 85С.

Работы проводятся на лабораторном столе. Применяется искусственное освещение рабочей зоны бытовыми лампами накаливания мощностью 100 W. При обработке полученных в ходе исследований данных используется персональный компьютер.

Следует отметить, что поскольку различное оборудование, использующееся в работе, в силу своих естественных габаритов и функционального назначения располагается на различных этажах здания института. Поэтому весьма часто рабочая зона принимает довольно внушительные размеры (с 1-го по 3-ий этаж). Особенно большие неудобства это причиняет, когда в целях экономии электроэнергии, лифты обесточивают, начиная с 16 часов, что позволяет отнести работу в это время к категории IIб. В остальное время работа относится, по всей видимости, к категории легких.

СХЕМА ПОМЕЩЕНИЙ

ВРЕДНЫЕ ФАКТОРЫ

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ТОК

В своей работе мы используем разнообразные приборы, которые питаются от электросети. Гель-электрофорез проводится при силе тока до 50 мА и напряжении до 100 V. Все контакты при этом надежно изолированы. Проводящие ток поверхности присутствуют только в аппарате для переноса (блоттинга), однако они заключены в изолирующую камеру, исключающую контакт с ней во время блоттинга.

ИОНИЗИРУЮЩИЕ И ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫЕ ИЗЛУЧЕНИЯ

Источником таких излучений является монитор персонального компьютера. В принципе он излучает электромагнитные волны сверхнизкой частоты, мягкое рентгеновское излучение. Однако монитор, в настоящее время использующийся в нашей лаборатории обладает низкой интенсивностью излучения и соответствует международному стандарту (LR - "Low Radiation"). Кроме того, время непрерывной работы с компьютером не превышает, как правило, одного часа.

ОСВЕЩЕНИЕ

При работе с компьютером для повышения контраста изображения и устранения бликов экрана используется экранный фильтр. Кроме того, монитор поддерживает режим построчной развертки "NI" и стабилизации изображения для снижения утомляемости глаз во время работы.

По нормативам СНиП II-4-79 минимальная освещенность рабочей поверхности в данном случае должна быть 300-400 лк при комбинированном освещении. В помещении для общих работ освещение создается пятью верхними люстрами по 2 лампы дневного света каждая и настольными лампами на гибких держателях, позволяющих направлять свет в нужную точку стола. Данная система является вполне адекватной и рациональной.

ШУМЫ, ЗВУКИ И ВИБРАЦИЯ

Основными источниками шумов и вибраций являются центрифуги и шейкеры. Центрифуги К-23 и К-24 находятся в специальном помещении, изолированном и допускающем лишь кратковременное нахождение людей. Что касается микроцентрифуги, то она используется, в основном, в изолированном помещении с постоянной температурой от 4 до 8С ("холодная комната"). То же касается и шейкеров, с той оговоркой, что их приходится применять столь же часто и в изолированном помещении с температурой 37С.

ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Химические вещества представляют собой источник наибольшей опасности при работе в нашей лаборатории. Для своей деятельности я использую следующие ядовитые вещества: щелочи (NaOH и KOH) и кислоты (HCl и H3РO4), хлороформ, метанол, фенол, уже упоминавшийся бромистый этидий и другие.

Метанол - сильный, преимущественно нервный и сосудистый яд. В организм человека может поступать через дыхательные органы, желудочно-кишечный тракт и неповрежденную кожу.

Щелочи и кислоты при воздействии на организм человека вызывают:

- раздражение слизистых оболочек глаз и верхних дыхательных путей

- дерматиты, экземы

- коагуляционный некроз тканевых белков

- поражение глаз (возможна полная потеря зрения)

- поражение печени, почек, желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, легких

Степень поражения зависит от концентрации, температуры и времени воздействия. Фенол является высокотоксичным веществом и при попадании на кожу вызывает ожоги. Вдыхание паров фенола даже в очень небольших концентрациях сопровождается раздражением и при больших дозах - поражением слизистых оболочек глаз, носа , зева и т.д., а также дыхательных путей и легких.

Бромистый этидий обладает сильным мутагенным действием.

Следует отметить, что далеко не всегда полностью соблюдаются правила работы с каждым из этих веществ. Связано это не с пренебрежением правилами, а с фактической невозможностью их выполнения. Например, метанол должен отпускаться со склада в лабораторию в количестве, не превышающем суточной потребности. Это требование, к сожалению, не может быть удовлетворено в связи с затруднениями при получении веществ со склада (постоянной их нехваткой и т.д.), а также с самим режимом работы склада (получение веществ со склада требует предварительного оформления и долговременного ожидания).

Тем не менее, работа с указанными веществами проводится в вытяжном шкафу и в перчатках и с соблюдением всех мер предосторожности. Вещества, которые не требуют хранения при низкой температуре (щелочи, кислоты и др.), хранятся также в вытяжном шкафу.

МИКРОКЛИМАТ

Исследования я провожу в холодный и переходный периоды года, поэтому нормой в данном случае являются условия: температура воздуха на постоянном рабочем месте - 16-21С, скорость движения воздуха не более 0,2 м/с, температура воздуха вне рабочего места - 14-20 °С. В здании действует централизованное паровое отопление, однако из-за малой мощности фактически не выполняется ни одна температурная норма даже после тщательного оклеивания окон. Здание Института Цитологии в зимнее время отапливается, однако в связи со своеобразной конструкцией или по другим неизвестным причинам, температура в комнате зимой бывает равной 12-15С.

Предпринимаемые меры по нормализации обстановки с ядовитыми

химическими веществами и микроклимата:

Для увеличения безопасности работы с ядовитыми веществами, они хранятся в специально отведенном для этой цели шкафу в подсобном помещении, которое надежно закрывается и пребывание людей в котором ограничено.

Для более безопасной работы с бромистым этидием, он не добавляется в буфер для электрофоретического разделения, а включается в состав геля, что значительно уменьшает объем загрязненного вещества и облегчает его элиминацию.

Аналогично, для переноса (блоттинга) белков на мембрану из нитроцеллюлозы, в настоящее время используется метод "полусухого" переноса, для которого требуется очень небольшое количество буфера (по сравнению с традиционными методами), в состав которого входит метанол; кроме того перенос этим методом занимает значительно меньше времени. Это также способствует уменьшению контакта сотрудников с ядовитыми веществами и снижению вредных отходов при удалении использованного вещества.

Для повышения температуры на рабочем месте холодный период нами применятся электронагреватели рефлекторного типа. Это, конечно, повышает пожароопасность, но другого выхода в наших условиях не остается, и на это идут, обращая при этом повышенное внимание на пожарную безопасность. По достижении в комнате температуры, соответствующей комфортному климату, приборы выключаются. Последний уходящий в конце рабочего дня отключает групповые щитки розеток и оставляет запись в журнале дежурного по комнате.

ЛИТЕРАТУРА

Милохов В.В., Егоров Е.М., Аксенов А.А. Охрана труда: Учебное

пособие.- Л: Изд-во Ленинградского университета, 1983. 112 с.

Правила безопасной работы с рекомбинантными молекулами ДНК

Инструкция #1 по охране труда при получении, хранении и выдаче метанола

в подразделениях Института Цитологии РАН

Инструкция #3 по технике безопасности при работе с органическими веществами

Инструкция #12 по технике безопасности при проведении работ с

использованием кислот и щелочей в подразделениях Института Цитологии РАН

9