

Кари Маллис,



Кандидат
биологических наук
М.В.Телков

изобретатель ПЦР

Большинство крупных открытий в наше время совершают не гениальные одиночки, как в старые добрые времена, а большие коллективы: лаборатории или даже несколько сотрудничающих (а иногда и соперничающих) междисциплинарных научных групп. Причины для этого несколько: многократно возросла сложность работ, неимоверно увеличилась стоимость оборудования и реактивов, и позволить себе проводить исследования современного уровня могут только большие и хорошо финансируемые коллективы ученых. Кроме того, для успеха порой требуются совместные усилия специалистов разных дисциплин. Скажем, в исследованиях в области современной биологии или медицины взаимодействуют биохимики, молекулярные биологи, генетики, медики, фармакологи, а часто еще и химики-синтетики, физики, математики, специалисты по информационным технологиям, инженеры.

В этих условиях интенсивный обмен информацией и научными кадрами между коллективами становится обычной практикой. Безусловно, это обезличивает научные идеи и открытия, делая почти бесспорной невеселую истину: «гении» теперь все чаще выходят из числа наиболее успешных администраторов (или менеджеров, если хотите), а вовсе не из тех, кто выполняет исследования непосредственно за лабораторным столом или предлагает оригинальные идеи. Кое-кто даже считает, что время гениаль-

ных одиночек прошло. И хотя в этом утверждении есть значительная доля правды, дело, к счастью, не всегда обстоит так.

История открытия ПЦР-амплификации ДНК — блестящий пример эпохального изобретения, сделанного гениальным одиночкой; причем идея осенила изобретателя мгновенно и, как кажется, абсолютно непредсказуемо. Более того, свое авторство ему пришлось отстаивать (и удалось отстоять!) в нелегких сражениях.

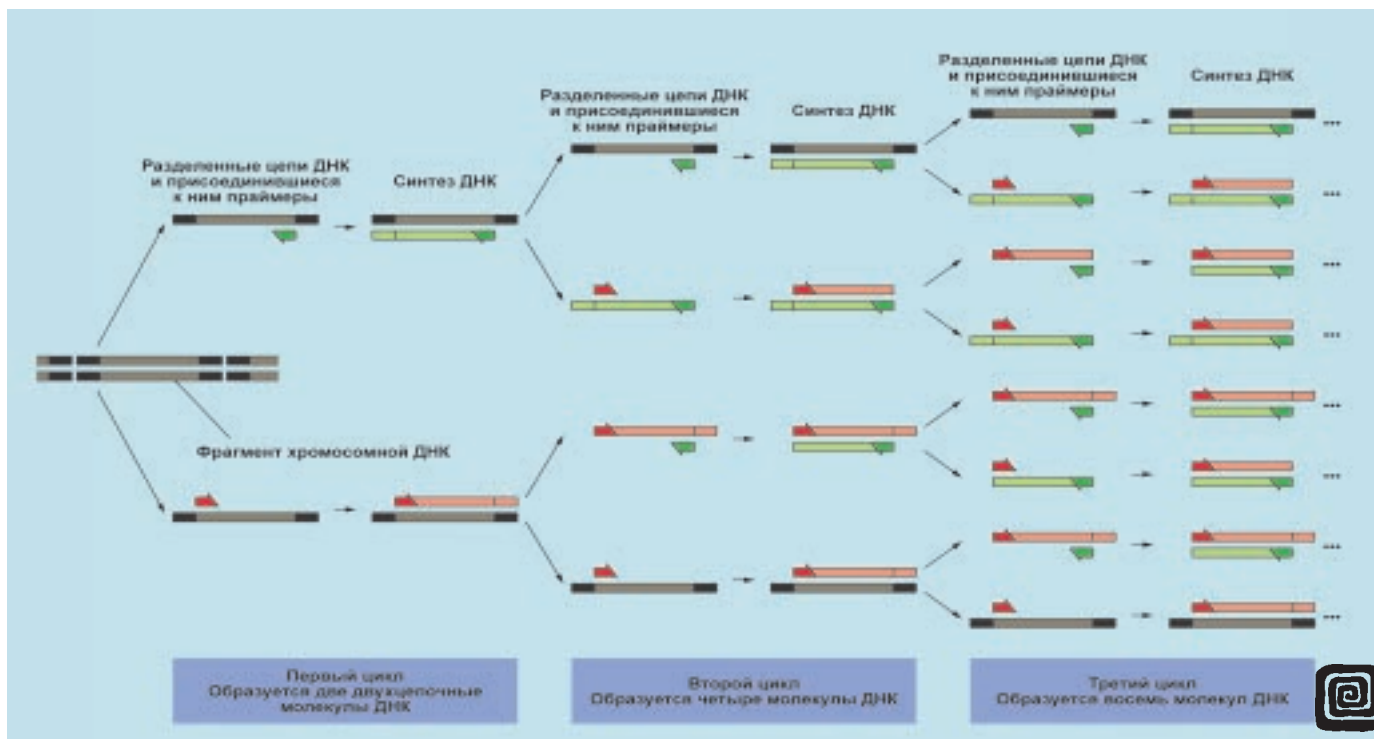
Если кратко — дело было так. Весной 1983 года, в пятницу вечером, Кари Маллис, 39-летний химик-синтетик из мало кому тогда известной калифорнийской биотехнологической фирмы «Cetus», направлялся после работы домой. По пути он размышлял о том, как повысить точность идентификации точечных мутаций в геномной ДНК с помощью недавно предложенного метода олигомерной рестрикции. Суть метода состояла в энзиматическом удлинении олигонуклеотида, наплавленного на участок ДНК, прилегающий к участку мутации. Если дезоксирибонуклеотиды («кирпичики», из которых построена ДНК) добавлять в реакцию не все сразу, а по одному, то удлинение олигонуклеотида будет происходить только тогда, когда добавляемый дезоксирибонуклеотид комплементарен участку мутации. Анализируя результаты реакции, можно было выявлять наличие конкретной мутации в данном гене. (Замены одного нуклеотида на другой

в молекулах ДНК происходят часто и иногда приводят к тяжелым последствиям, поскольку они могут нарушать структуру гена или регуляцию его активности. Такие мутации для многих важных генов картируют — устанавливают их точное расположение, — а затем изучают их генетические и биохимические последствия.)

Метод неплохо работал на относительно короткой ДНК, когда исследуемый ген был уже выделен, то есть когда его доля в общей массе ДНК была сравнительно высокой. Однако при исследовании огромной по длине геномной ДНК чувствительность метода была явно недостаточной, ибо концентрация данного гена оставалась крайне низкой.

Маллис размышлял о том, как повысить чувствительность и специфичность этой реакции. Как он сам писал впоследствии, для того чтобы решить проблему, ему нужно было увеличить количество ДНК исследуемого гена. В мысленном эксперименте он увидел, что точность метода можно повысить, если в дополнительной пробирке провести аналогичную дополняющую реакцию, то есть наращивать олигонуклеотид с другой стороны мутации, используя еще один праймер, расположенный на комплементарной цепи ДНК. Если данные двух этих экспериментов будут согласовываться, то, по крайней мере, вдвое надежнее можно будет судить о наличии или отсутствии мутации в исследуемом участке гена.

Он крутил эту идею и так, и этак, и вдруг его осенила светлая мысль: если реакцию с двумя такими праймерами-олигонуклеотидами проводить не в двух, а в одной пробирке, то количество фрагмента ДНК, ограниченного олигонуклеотидами, увеличится вдвое. Если реакцию повторить — вчетверо! Если ее провести 20 раз (это несложно, поскольку один ее цикл занимает несколько минут) — количество окруженного олигонуклеотидами фрагмента возрастет в миллион раз. А если повторить реакцию 30 раз — в миллиард раз. Эврика! Это означало, что теперь фрагменты геномной ДНК, в том числе и гены, можно будет выделять не за годы упорного и кропотливого труда, а всего за один день!



1
Три цикла реакции ПЦР-амплификации ДНК

ИСТОРИЯ СОВРЕМЕННОСТИ

«Это изменило бы молекулярную биологию», — подумал тогда Маллис. Идея показалась ему настолько красивой, что он остановил машину, зашел в придорожный киоск, купил ручку, бумагу и стал подсчитывать, сколько же в придуманной им реакции получается ДНК. Все сходилось — метод должен работать и продуцировать огромные количества специфической ДНК. Одновременно Маллису стало мниться маловероятным, чтобы эта идея, теперь казавшаяся очевидной, уже не приходила в чью-либо голову. Чтобы найти ошибку в своем рассуждении, во время уик-энда Маллис «исписал формулами все горизонтальные поверхности в своем загородном доме». И, как поведал позднее в Нобелевской лекции, все выходные промучился жесточайшими перепадами настроения от абсолютного восхищения мощью собственного интеллекта и своей удачливостью — и до полнейшего отчаяния при мысли о том, что где-то в рассуждениях он не видит очевидной ошибки. А она должна была присутствовать, ибо идея очевидна, ведь все этапы реакции по отдельности уже были опробованы тысячами молекулярных биологов и постепенно становились лабораторной рутинной. Кто-то наверняка уже реализовал бы эту идею! Но ни о чем подобном ему слышать не приходилось...

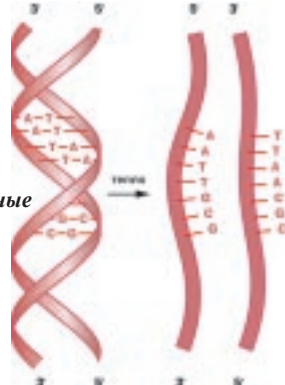
В понедельник рано утром Маллис помчался на работу (что, как он сам отмечал, случалось с ним крайне редко), чтобы в библиотеке выяснить, не опубликовал ли кто-нибудь статьи на эту тему. Каковы же были его удивле-

ние и восторг, когда он понял, что ничего подобного в научной литературе еще описано не было!

И через несколько месяцев, а именно 16 декабря 1983 года, перепробовав со своим сотрудником и учеником Фредом Фалуной множество экспериментальных подходов, Кари Маллис осуществил первую успешную реакцию ПЦР — полимеразную цепную реакцию амплификации ДНК (по-английски — PCR, Polymerase Chain Reaction). И она действительно произвела революцию в современной молекулярной биологии. А вскоре нашла применение в областях, весьма далеких от академической науки.

Постановка реакции ПЦР-амплификации сравнительно проста (рис. 1). В пробирку объемом 0,1–0,5 мл помещают 0,1–0,01 мкг геномной ДНК (а иногда просто содержащий ее материал: каплю мочи, слюны, крови; кусочек ткани или кости, отдельную волосную сумку). Затем добавляют пару олигонуклеотидных праймеров — хи-

2
При нагревании две комплементарные нити ДНК расходятся — она плавится



мически синтезированных кусочков ДНК длиной 20–30 нуклеотидов. Последовательность нуклеотидов в них подбирают так, чтобы они были комплементарны участкам ДНК по краям амплифицируемого фрагмента длиной обычно в несколько сотен нуклеотидов. Своими 3'-концами праймеры направлены друг к другу, то есть внутрь амплифицируемого фрагмента ДНК.

Важнейший компонент реакции — термостабильная ДНК-полимераза, которая катализирует реакцию синтеза ДНК. Она использует олигонуклеотидные праймеры как затравки, а исходную молекулу ДНК — в качестве матрицы для синтеза. В реакционную смесь добавляют также дезоксирибонуклеотиды: А, Т, Г, С — кирпичики, из которого строятся цепи ДНК.

Пробирку с такой смесью нагревают почти до точки кипения воды, чтобы благодаря тепловой денатурации цепи геномной двуспиральной ДНК разошлись в стороны (рис. 2), освободив места для посадки синтетических олигонуклеотидных праймеров (это начало первого цикла). Затем пробирку охлаждают до температуры, оптимальной для наплавления олигонуклеотидных праймеров на соответствующие им места в геномной ДНК. Олигонуклеотидные праймеры выискивают комплементарные им последовательности ДНК и прилипают к ним. После этого начинается синтез новой цепи ДНК. При этом ДНК-полимераза ползет по старой цепи, как по матрице, и синтезирует новую по правилу Уотсона-Крика (А соответствует Т, а Г — С). При этом воспроизводится точная копия

прежней, отплавившейся в результате денатурации нити геномной ДНК. Полимераза синтезирует новую нить всегда в направлении 5'-3', то есть подшивая кирпичики-дезоксинуклеотиды только к одному из концов олигонуклеотидных праймеров (а именно к 3'-концу).

Таким образом, синтез ДНК начинается только с одного конца каждого из двух праймеров, а поскольку праймеры направлены этими концами друг к другу, получается, что ДНК-полимераза синтезирует двуспиральный фрагмент ДНК, ограниченный с каждой стороны олигонуклеотидными праймерами (окончание 1-го цикла, рис. 1). Для прохождения реакции достаточно 1–3 минут. Затем цикл нагревания и охлаждения пробирки многократно повторяют. Делают это на специальном приборе — термоциклере, и вся последовательность событий (денатурация дуплексов ДНК — наплавление праймеров на ДНК — удлинение ДНК) повторяется. Во время каждого цикла (продолжительностью 1–3 мин) количество фрагмента ДНК, ограниченного с обоих концов положением олигонуклеотидных праймеров, удваивается. А после 25–30 температурных циклов этого специфического фрагмента ДНК оказывается в миллионы раз больше, чем в начале реакции. К тому же он получается практически абсолютно чистым.

Этого количества ДНК уже достаточно для дальнейшего анализа амплифицированного фрагмента, например, с помощью электрофореза, или даже для определения его структуры путем секвенирования.

Реакция ПЦР-амплификации во многие тысячи раз упростила, ускорила и удешевила процесс выделения специфического фрагмента ДНК, например, какого-то гена. Если для клонирования участка ДНК классическими генно-инженерными методами требовалось в среднем 0,5–2 года и огромное количество крайне трудоемких генно-инженерных действий высококвалифицированного персонала, то с помощью ПЦР-амплификации фрагмент (правда, лишь если известны его концевые последовательности) можно выделить всего за один рабочий день! В этом и состоит основная ценность метода. За прошедшие годы появилось огромное количество разных модификаций метода и его применений.

Сейчас реакция ПЦР-амплификации — рутинный и ежедневный инструмент в каждой молекулярно-биологической лаборатории. Применяя специфические олигонуклеотидные праймеры (все дело именно в этом), варианты метода теперь используют не только в молекулярной

биологии и биотехнологии, но и в медицине (например, для идентификации микроба или вируса по его ДНК, для контроля излечения пациента от инфекционного заболевания, идентификации типа мутации в геномной ДНК при анализе наследственных заболеваний). Находит применение эта реакция и в криминалистике для идентификации личности по ДНК-содержащим жидкостям и тканям (модификацию исходного метода криминалисты назвали в стиле своей профессии — «геномная дактилоскопия»). Исползуется она и для установления отцовства, степени родства, популяционных исследований — словом, везде, где нужно установить для той или иной цели уникальную последовательность ДНК, опираясь на минимальное количество исходного ДНК-содержащего материала: капелюк крови, мочи, соскоб с ткани, отдельный волос.

А поскольку ДНК сравнительно хорошо сохраняется, этот метод позволяет исследовать даже древние останки. Были проведены научные работы по анализу ДНК неандертальца и египетских мумий, по исследованию ДНК насекомых, законсервированных в янтаре миллионы лет назад, или бактерий из глубоководного древнего арктического льда (что позволяет заглянуть в историю эволюции) — но это уже другая интереснейшая тема. В середине 1990-х с помощью метода ПЦР-амплификации ДНК исследовали останки царской семьи Романовых.

Однако огромные возможности метода ПЦР-амплификации ДНК не всем сразу стали очевидными, и многие из тех, кому Кари Маллис изложил свою идею, отнеслись к ней с прохладцей. Так было и на семинаре фирмы «Cetus» в августе 1984 года, когда он впервые доложил свою идею, так было и когда он все лето этого года излагал ее многим молекулярным биологам и в фирме «Cetus», и вне ее стен... Его коллеги вяло соглашались: дескать, да, должно получиться. И все! Дело в том, что все исходные компоненты предложенной Маллисом реакции были давно описаны и исследованы по отдельности, а вот использовать их совместно, для амплификации ДНК не додумался никто!

Как впоследствии сказал Маллис в своей Нобелевской лекции, единственный человек, который с энтузиазмом поддержал его идею с самого начала, был его друг — основатель фирмы «Biosearch», выпускающей аппараты для автоматического синтеза олигонуклеотидов (одного из компонентов реакции ПЦР-амплификации): «Он знал, что это будет хорошо для его фирмы!»

Кстати, термостабильную ДНК-полимеразу, необходимую для этой реак-

ции, впервые выделили и исследовали за несколько лет до этого советские ученые А.С.Каледин, А.Г.Слюсаренко и С.И.Городецкий из института ВНИИгенетика. Их статья вышла в апреле 1980 года в журнале «Биохимия». С.И.Городецкий и его сотрудники в то время занимались изучением так называемых термофильных бактерий, обитающих в воде гейзеров и горячих источников. Для выяснения причин необыкновенной устойчивости бактерий к высокой температуре они выделяли их ферменты. При этом и была найдена та самая термостабильная ДНК-полимераза, которая с подачи Кари Маллиса нашла применение в реакции ПЦР-амплификации.

В своих статьях Маллис ссылается на работу советских авторов по выделению термостабильной ДНК-полимеразы. Одно время в научной беллетристике даже обсуждали вопрос о том, не должны ли фирмы, продающие этот фермент и получающие миллиардные прибыли, платить определенный процент тем биохимикам, кто опубликовал методику его выделения и впервые исследовал. Но фирмы сослались на то, что молекулярный вес их термостабильной полимеразы несколько отличается от описанной советскими учеными и, стало быть, фирмы якобы выделяют не тот же самый фермент, хотя и по той же методике и из того же вида бактерий!

Это, конечно, грубая натяжка, ведь ошибка в измерении молекулярного веса составляет обычно не менее 15–20%. В этот интервал точности укладывается большое количество разных белков, в том числе, очевидно, и термостабильные полимеразы. Поэтому абсолютно точно установить молекулярный вес фермента А.С.Каледина, А.Г.Слюсаренко и С.И.Городецкого просто не могли, да они и не ставили перед собой такой задачи! А стало быть, и отрицать их авторство на основании неточности в измерении молекулярного веса термостабильной полимеразы неверно с научной точки зрения. Однако спорить с колоссальными фирмами в судах стоит огромных денег, которых, очевидно, нет, — так что богатые продолжают богатеть, а бедные — как вы и сами догадываетесь...

Судьба статьи, в которой Маллис впервые описал метод ПЦР-амплификации, тоже не была простой. Как рассказал сам ученый, первую ее версию редакция международного научного журнала «Science», одного из самых престижных в мире, отклонила. Отписка была стандартной: журнал публикует-де только статьи, которые имеют общенаучное значение, а метод ПЦР-амплификации технический и представляет интерес

только для специалистов. Редакторы рекомендовали Маллису обратиться в более специализированный научный журнал. Щадя самолюбие авторов, так часто отвечают редакции журналов, если не принимают научную статью по тем или иным причинам. Под тем же предлогом отклонил статью и «Nature».

Кари Маллису, который занимался тогда полупромышленным синтезом олигонуклеотидных праймеров в фирме «Cetus», пришлось кооперироваться с соседней лабораторией и на их тематике и объектах продемонстрировать возможности предложенного им метода. Сделать это пришлось ценой уступки мест первого и последнего авторов в статье. (Первой обычно стоит фамилия того, кто внес наибольший экспериментальный вклад в статью, а последней — главного идеолога и руководителя проекта. Так что отстоять свой приоритет в изобретении метода Маллису было уже непросто...) Однако в новом виде статья стала уже вполне полновесной — в ней метод ПЦР-амплификации был продемонстрирован на понятном и имеющем несомненную практическую важность примере — пренатальной диагностике наследственного заболевания. Статья была опубликована в журнале «Science» 20 декабря 1985 года (№ 230). В 1986 году аналогичная статья с участием Маллиса вышла в «Nature» (в № 6093).

И после этих публикаций начался бум: международное научное сообщество сразу оценило важность открытия. Метод нашел огромное количество приложений, в научной литературе пошел вал публикаций о его применении. Вскоре пришло и признание: в 1990 году Маллис был награжден престижной «Preis Biochemische Analytik» — национальной немецкой премией в области аналитической биохимии, в 1992 году признан ученым года штата Калифорния, в 1992 году награжден премией имени Роберта Коха, в 1993 году — Национальной премией Японии, и в том же году ему вручили Нобелевскую премию по химии.

Кари Маллис — очень интересный типаж. Живой и уверенный в своих силах, он всегда стремится жить твор-

Кчески, следуя своим интересам и интуитивным побуждениям. В детстве он мастерил и запускал самодельные ракеты, взлетавшие на несколько километров (даже «пилотируемые» — с лягушкой на борту). Одна из таких ракет не на шутку напугала летчика пассажирского самолета. Экспериментировал с химическими веществами (в основном взрывчатыми); в юности кроме химии, которую избрал своей профессией, всерьез интересовался математикой и физикой.



ИСТОРИЯ СОВРЕМЕННОСТИ

Будучи аспирантом-биохимиком, после посещения краткого курса лекций по астрофизике, вдохновившись некоей умозрительной гипотезой, первую свою научную статью Кари Маллис сумел опубликовать в самом престижном научном журнале «Nature». Она называлась амбициозно — «Космологические последствия обращения времени». Как едко заметил Маллис в своей Нобелевской лекции, «то была типичная «гипотеза первокурсника», и редакции, наверное, до сих пор стыдно за эту публикацию». Но ведь сумел же он чем-то зацепить тогда умудренных рецензентов журнала, опубликоваться в котором считают за честь самые маститые мэтры! Как пошутил Маллис, это ему здорово помогло впоследствии: статья в «Nature» позволила его кураторам дать добро на присуждение ему PhD-степени по биохимии, несмотря на то что он не прошел курса по молекулярной биологии. Взглянув на список его публикаций, рецензенты подумали: «Раз уж он публикуется в «Nature»...» (и, видимо, никто не удосужился уточнить тематику его первой публикации).

За свою научную карьеру неутомимый Кари Маллис переменял несколько тем; уже имея научную степень по биохимии, в один из трудных моментов жизни он даже подрабатывал официантом в ресторане, а из мозгов отловленных там же крыс выделял нейропептиды для своих исследований. Кроме того, он писал («в стол», как мы привыкли говорить) стихи и прозу, однако позднее сам признавал: «Персонажи моих произведений были невыразительными, потому что я был слишком молод и не испытал тогда еще ни одной персональной трагедии и посему не умел описывать их так, чтобы другие поверили мне. Поэтому после неуспешной попытки проявить себя на писательском поприще мне ничего не оставалось, как продолжить работу в науке». Он был трижды женат, стал отцом троих детей, выступал с рядом эксцентричных идей вроде необходимости легализации продажи легких наркотиков, публично заявлял, что американцы на Луне не были, а соответствующий эпизод смонтирован в Голливуде, что СПИДа как единой бо-

лезни нет, а просто люди переполнены молчащими до поры вирусами. В Калифорнии ходят слухи о своеобразной манере его вождения на дорогах, о его эксцентричных выходках в отношении соседей...

Получив Нобелевскую премию, он оставил и производство, и науку и поселился в Калифорнии на берегу океана, где занимается виндсерфингом и (в свободное время) частным научным консультированием. В своем резюме по случаю Нобелевской лекции Маллис заявил, что «с 1993 года он писатель».

Нобелевская лекция и автобиография Кари Маллиса, представленные в ежегоднике «Нобелевские премии 1993 года», — блестящий образец наблюдательной, яркой и сочной, полной лукавого юмора, чуть натуралистичной прозы.

Мне посчастливилось лично присутствовать на этой лекции Кари Маллиса. Когда он читал ее, каждые пять минут аудитория взрывалась гомерическим хохотом, такие едкие юмористические пассажи он отпускал по ее ходу. А на прочитанной за полчаса до этого лекции другого нобелевского лауреата, выдержанной в строгом академическом стиле, почти вся аудитория дремала.

Яркая личность этот Кари Маллис. Неординарно мыслящий человек. Везунчик... И Мастер!

Что еще прочитать об открытии ПЦР-амплификации:

Kary Mullis, The Polymerase Chain Reaction, Nobel Lecture, December 8, 1993. LEX PRIX NOBEL. The Nobel Prizes. Almqvist and Wiksell Int., Stockholm, Sweden.

