

УДК 575

До 70-річчя від дня народження КЕРІ МАЛЛІС – ВИНАХІДНИК ПЛР

Н. Е. ВОЛКОВА

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства
та сортовивчення

Україна, 65036, Одеса, вул. Овідіопольська дорога, 3

e-mail: natavolki@ukr.net



Висвітлено основні віхи життєвого шляху лауреата Нобелівської премії Кері Б. Малліса та історію відкриття полімеразної ланцюгової реакції – революційного методу молекулярної біології і генетики, одного з монументальних наукових методів ХХ століття. Представлено найголовніші наукові здобутки та досягнення К. Малліса. Показано неординарність особистості Кері Малліса.

Ключові слова: Кері Малліс, історія науки, полімеразна ланцюгова реакція.

Наприкінці року ювілей відзначатиме Кері Бенкс Малліс – гуру всіх «ПЛРщиків». Його короткий життєпис такий: народився 28 грудня 1944 року в м. Ленуар (Північна Кароліна, США); отримав ступінь бакалавра наук у галузі хімії в Технологічному інституті Джорджії (Georgia Institute of Technology) в 1966 році, ступінь доктора філософії у галузі біохімії – в Університеті

Каліфорнії (University of California) в 1972 році, де читав лекції з біохімії до 1973 року. У тому ж році став постдокторантом з педіатричної кардіології в Медичній школі Університету Канзаса (University of Kansas Medical School), з акцентом у галузі фізіології легеневих судин. У 1977 році розпочав дворічну докторську роботу з фармацевтичної хімії в Університеті Каліфорнії (University of California). В 1979 році приєднався до корпорації «Cetus Corp.» в Емервільлі (Каліфорнія, США) як хімік ДНК. Протягом семи років досліджував синтез олігонуклеотидів, що привело його до винаходу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). У 1986 році призначений відповідальним за молекулярну біологію в корпорації «Hytronix, Inc» в Сан-Дієго, де зосередив роботу на ДНК і фотохімії. У 1987 році почав консультації з хімії нуклеїнових кислот для десятка корпорацій («Angenics», «Cytometrics», «Eastman Kodak», «Abbott Labs», «Milligen / Biosearch») та спеціалізованих лабораторій. В 1993 році отримав Нобелівську премію з хімії за винахід полімеразної ланцюгової реакції. Після цього він залишив і виробництво, і науку, оселився в Каліфорнії

на березі океану, де займається віндсерфінгом і (у вільний час) приватним науковим консультуванням.

Але це сухе перерахування дат і подій не дає уяви про таку неординарну особистість, як Кері Малліс, та не передає атмосфери, в якій народився один із монументальних наукових методів ХХ століття. Тому далі дозвольте описати історію відкриття ПЛР-ампліфікації – блискучого прикладу епохального винаходу, зробленого геніальним одинаком. Ідея осінила винахідника миттєво і, як здається, абсолютно непередбачувано. Цю історію прекрасно описано Телковим М.В. [1], і ось вона яка.

«Навесні 1983 року, в п'ятницю ввечері, Кері Малліс, 39-річний хімік-синтетик з мало кому тоді відомої каліфорнійської біотехнологічної фірми «Cetus», прямував після роботи додому. По дорозі він роздумував про те, як підвищити точність ідентифікації точкових мутацій в геномній ДНК за допомогою недавно запропонованого методу олігомерної рестрикції. Суть методу полягала в ензиматичному подовженні олігонуклеотиду (праймера), спрямованого на ділянку ДНК, прилеглу до ділянки мутації. Якщо дезоксинуклеотиди додавати в реакцію не всі відразу, а по одному, то подовження олігонуклеотиду буде відбуватися тільки тоді, коли доданий дезоксинуклеотид комплементарний ділянці мутації. Аналізуючи результати реакції, можна було виявляти наявність конкретної мутації в цьому гені. Метод добре працював на відносно короткій ДНК, коли досліджуваний ген був уже виділений, тобто коли його частка в загальній масі ДНК була порівняно високою. Однак при дослідженні величезної за довжиною геномної ДНК чутливість методу була явно недостатньою, бо концентрація даного гена залишалася вкрай низькою.

Малліс роздумував про те, як підвищити чутливість і специфічність цієї реакції. Йому потрібно було збільшити кількість

ДНК досліджуваного гена. В уявному експерименті він побачив, що точність методу можна підвищити, якщо в додатковій пробірці провести аналогічну доповнюючу реакцію, тобто нарощувати олігонуклеотид з іншого боку мутації, використовуючи ще один праймер, що розташовується на комплементарному ланцюзі ДНК. Якщо дані двох цих експериментів будуть узгоджуватися, то, принаймні, вдвічі надійніше можна буде судити про наявність або відсутність мутації в досліджуваній ділянці гена. Роздумуючи над цією ідеєю, він прийшов до світлої думки: якщо реакцію з двома такими праймерами проводити не у двох, а в одній пробірці, то кількість фрагмента ДНК, обмеженого олігонуклеотидами, збільшиться вдвічі. Якщо реакцію повторити – вчетверо; якщо її провести 20 раз, кількість оточеного олігонуклеотидами фрагмента зросте в мільйон разів; а якщо повторити реакцію 30 разів – в мільярд разів. Еврика!

Ідея здалася йому настільки красивою, що він зупинив машину, зайшов у придорожній кіоск, купив ручку, папір і почав підраховувати, скільки ж у вигаданій ним реакції виходить ДНК. Все збіглося – метод повинен працювати і продукувати величезні кількості специфічної ДНК. Одночасно Малліс подумав про малоймовірність того, щоб ця ідея вже не приходила до чийсь голови. Щоб знайти помилку в своєму міркуванні, під час уїк-енду Малліс «списав формулами всі горизонтальні поверхні у своєму замиському будинку». І, як повідав пізніше в Нобелівській лекції, всі вихідні промучився найжорстокішими перепадами настрою від абсолютного захоплення міццю власного інтелекту і своєї удачливості – і до цілковитого розпачу при думці про те, що десь у міркуваннях він не бачить очевидної помилки. А вона мала бути присутньою, бо ідея очевидна, адже всі етапи реакції окремо вже були випробувані тисячами молекулярних біологів і поступово

ставали лабораторною рутиною. Хтось напевно вже реалізував би цю ідею! Але ні про щось подібне йому чути не доводилося... (Примітка. На початку 1970-х років норвезький вчений Хьйолль Клеппе (К. Клерре) з лабораторії нобелівського лауреата Хара Гобинди Хорани (Н. Gobind Khorana) запропонував спосіб ампліфікації ДНК за допомогою пари коротких одноланцюгових молекул ДНК – синтетичних праймерів [2].).

У понеділок рано вранці Малліс помчав на роботу (що, як він сам зазначав, траплялося з ним вкрай рідко), щоб в бібліотеці з'ясувати, чи не опублікував хто-небудь статті на цю тему. Які ж були його здивування і захват, коли він зрозумів, що нічого подібного в науковій літературі ще описано не було!».

Першу успішну полімеразну ланцюгову реакцію ампліфікації ДНК (англ. Polymerase Chain Reaction, PCR) Кері Малліс здійснив через кілька місяців – 16 грудня 1983 року після багаторазових спроб безлічі експериментальних підходів зі своїм співробітником і учнем Фредом Фалуною (F. Faloona).

Концептуально розроблений К. Маллісом метод ПЛР зробив революцію в сучасній молекулярній біології. А незабаром ПЛР знайшла множинні застосування у галузях, дуже далеких від академічної науки. Цей метод у багато тисяч разів здешевив, спростив і прискорив процес виділення специфічного фрагмента ДНК. Якщо для клонування ділянки ДНК класичними генноінженерними методами було потрібно в середньому 0,5–2 роки і величезна кількість вкрай трудомістких дій висококваліфікованого персоналу, то за допомогою ПЛР-ампліфікації фрагмент (якщо відомі його кінцеві послідовності) можна виділити всього за один робочий день. У цьому і полягає основна цінність методу. Опису класичної ПЛР, багатьох її модифікацій, її величезних можливостей присвячено значну

кількість наукових публікацій [3–6], тому зупинятися тут на цьому не будемо.

Зараз ПЛР-ампліфікація – рутинний і щоденний інструмент у кожній молекулярно-біологічній лабораторії. Але величезні можливості методу не всім відразу стали очевидними, і багато з тих, кому Кері Малліс виклав свою ідею, поставилися до неї з прохолодою: і науковці на семінарі фірми «Cetus» у серпні 1984 року, коли він вперше доповів свою ідею, і багато інших молекулярних біологів. Як згодом у Нобелівській лекції скаже К. Малліс, єдина людина, яка з ентузіазмом підтримала його ідею з самого початку, був його друг – засновник фірми «Biosearch», що випускала апарати для автоматичного синтезу олігонуклеотидів.

Доля статті, в якій Малліс вперше описав метод ПЛР-ампліфікації, теж була непростю. Статтю відхилили редакції найпрестижніших міжнародних наукових журналів «Science» і «Nature» під приводом: журнали публікують лише статті, які мають загальнонаукове значення, а метод ПЛР-ампліфікації технічний і представляє інтерес тільки для фахівців. Редактори рекомендували Маллісу звернутися в більш спеціалізований науковий журнал. Тоді Малліс, який займався напівпромисловим синтезом олігонуклеотидів в фірмі «Cetus», на тематиці та об'єктах сусідньої лабораторії продемонстрував можливості запропонованого ним методу на зрозумілому і безсумнівно практично важливому прикладі – пренатальній діагностиці спадкового захворювання. Стаття була опублікована в журналі «Science» 20 грудня 1985 року [7], прізвище К. Малліса – четверте. Це була ціна поступки: зазвичай першим стоїть прізвище того, хто зробив найбільший експериментальний внесок у статтю, а останнім – головного ідеолога та керівника проекту. Відстояти свій пріоритет у винаході методу Маллісу було вже непросто... Малліс оформив всі права на метод ПЛР на

«Cetus», проте після декількох продажів прав зрештою патент перейшов до світового гіганту – швейцарської фармацевтичної компанії «Hoffmann-La Roche Inc», з монопольною політикою якої конкуренти намагалися боротися протягом всього часу дії патенту до 2005 року. Сьогодні користуватися методом ПЛР можуть всі компанії.

Після першої публікації міжнародна спільнота оцінила важливість відкриття, прийшло визнання: в 1990 році Малліс нагороджений престижною національною німецькою премією в галузі аналітичної біохімії «Preis Biochemische Analytik», в 1992 році визнаний Вченим року штату Каліфорнія та нагороджений премією імені Роберта Коха, в 1993 році – Національною премією Японії та Нобелівську премію з хімії. Малліс став єдиним нобелівським лауреатом, який не був науковим співробітником; він трудився в комерційній компанії – корпорації «Cetus», і по суті, зробив своє відкриття, працюючи в бізнесі. До багатьох інших нагород К. Малліса відносяться: премія Американського товариства з генетики людини «William Allan Memorial Award of the American Society of Human Genetics» (1990 р.); Національна премія з біотехнології «National Biotechnology Award» (1991 р.); канадська премія «Gairdner Award» (1991 р.); R & D Вчений року (1991 р.); премія Томаса Едісона «Thomas A. Edison Award» (1993 р.); почесний ступінь доктора наук Університету Південної Кароліни (University of South Carolina) (1994 р.). У 1998 році К. Малліса введено до Національного залу слави винахідників.

Д-р Малліс є автором кількох значних патентів. Його запатентовані винаходи включають технологію ПЛР і УФ-чутливого пластика, який змінює колір у відповідь на світло. Його остання заявка на патент охоплює революційний підхід миттєвої мобілізації імунної системи для нейтралізації хвороботворних патогенів і токсинів. Його

численні публікації включають: «Космологічна роль повернення часу» («The Cosmological Significance of Time Reversal») та «Праймер-спрямована ферментативна ампліфікація ДНК з термостабільною ДНК-полімеразою» («Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase») в «Nature», «Незвичайне походження полімеразної ланцюгової реакції» («The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction») в «Scientific American», «Специфічний синтез ДНК *in vitro* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції» («Specific Synthesis of DNA In Vitro via a Polymerase Catalyzed Chain Reaction») в «Methods in Enzymology» [8].

У 1998 році д-р Малліс написав автобіографічний збірник нарисів «Танцюючи голім в полі розуму» («Dancing Naked in the Mind Field»), що зміцнило його репутацію як науково вільного духом [9]. Це блискучий зразок соковитої і яскравої, повної лукавого гумору, трохи натуралістичної прози.

В останні роки К. Малліс працював заступником науковим співробітником дитячої лікарні та науково-дослідного інституту в Окленді (Каліфорнія, США), входить до складу ради наукових консультантів декількох компаній, надає експертні консультації у правових питаннях, пов'язаних із ДНК, і часто виступає з лекціями в університетських кампусах, корпораціях та на академічних зустрічах по всьому світу. Він також заснував компанію «GeneStones», яка продає штучні дорогоцінні камені з імплантованими ДНК відомих людей, в тому числі Мерилін Монро, Джона Кеннеді, Наполеона. У 2000 році він увійшов до складу ради директорів Національної організації з реформи законів про марихуану (National Organization for the Reform of Marijuana Laws).

Але повернемося до особистості Кері Малліса. Він не є типовим вченим.

Він серфер. Про отримання Нобелівської премії Малліс дізнався, коли повернувся в свій пляжний будинок у Каліфорнії, ще вологий від занять віндсерфінгом.

Він вірить в астрологію – «цінний інструмент для розуміння людини».

Він експериментував з ЛСД (LSD, нем. Lysergsäure-diethylamid) в 1966 році до його заборонення. (Малліс пізніше скаже, що психоделічний препарат зробив можливим його наступні піонерські відкриття в галузі біотехнології).

Він виступав з низкою ексцентричних ідей на кшталт необхідності легалізації продажу легких наркотиків, публічно заявляв, що американці на Місяці не були, а відповідний епізод змонтований в Голлівуді, що СНІДу як єдиної хвороби немає, а просто люди переповнені вірусами, які мовчать до пори, ставив під сумнів теорію глобального потепління (вигадка «паразитів з вищою освітою в області економіки чи соціології»).

Він борець за свободу. Його підхід до політики – «мислення-поза-коробкою» («thinking-outside-the-box approach to politics»). Малліс, говорячи про свою «філософію свободи» («libertarian philosophy») та відзначаючи, що політика є лише одним з його «дико різноманітних інтересів», сказав: «[Уряд] найкраще підходить для захисту групи людей від зовнішнього втручання, але погано підходить для диктування, як люди повинні вести своє приватне життя».

Він майстрував і запускав у дитинстві саморобні ракети, що злітали на кілька кілометрів (навіть «пілотовані» – з жабою на борту). Одна з таких ракет не на жарт налякала льотчика пасажирського літака. Експериментував з хімічними речовинами (в основному вибуховими); в юності крім хімії, яку обрав своєю професією, всерйоз цікавився математикою і фізикою.

Будучи аспірантом-біохіміком, після відвідування короткого курсу лекцій з

астрофізики, надихнувшись, першу свою наукову статтю К. Малліс зумів опублікувати в самому престижному науковому журналі «Nature» [10]. Вона називалася амбітно – «Космологічні наслідки обернення часу». Як потім зауважив Малліс у своїй Нобелівській лекції, «то була типова «гіпотеза першокурсника», і редакції, напевно, до цих пір соромно за цю публікацію» [11]. Але щось «зачепило» тоді навчених рецензентів журналу, опублікуватися в якому вважають за честь наймаститіші метри! Як пожартував Малліс, це йому дуже допомогло згодом: його куратори дали добро на присудження йому PhD-ступеня з біохімії, незважаючи на те, що він не пройшов курсу з молекулярної біології. Поглянувши на список його публікацій, рецензенти подумали: «Раз вже він публікується в «Nature» ...» (і, мабуть, ніхто не уточнив тему його першої публікації).

За свою наукову кар'єру невгамований Кері Малліс перемінив кілька напрямів. Маючи науковий ступінь з біохімії, в один із важких моментів життя він навіть підробляв офіціантом у ресторані, а з мізків відловлених там же щурів виділяв нейропептиди для своїх досліджень. Крім того, він писав («в стил») вірші і прозу, проте пізніше сам визнавав: «Персонажі моїх творів були невиразними, бо я був занадто молодий і не випробував тоді ще жодної персональної трагедії і тому не вмів описувати їх так, щоб інші повірили мені. Тому після неуспішної спроби проявити себе на письменницькому терені мені нічого не залишалось, як продовжити роботу в науці».

Він був тричі одружений, став батьком трьох дітей. Зараз живе зі своєю дружиною, Ненсі Малліс (Nancy Cosgrove Mullis) в Ньюпорт-Біч і Андерсон-Велі (Каліфорнія).

Він завжди прагне жити творчо, слідуючи своїм інтересам та інтуїтивним спонуканням.

Перелік літератури

1. Телков М. В. Кэри Маллис, изобретатель ПЦР // Химия и жизнь. – 2006. – № 8. – С. 6–9.
2. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R. et al. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases // J. Mol. Biol. – 1971. – Vol. 56 (2). – P. 341–361.
3. McPherson M. J., Moller S. G. PCR. Book // CRC Press, Taylor & Francis Group, USA, 2006. – 292 p.
4. PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide. / Editors: S. Kennedy, N. Oswald. – UK: Caister Academic Press, 2011. – 236 p.
5. PCR Technology: Current Innovations. / Editors T. Nolan, S. A. Bustin. – USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2013. – 457 p.
6. Real-Time PCR: Advanced Technologies and Applications. / Editors N. A. Saunders, M. A. Lee. – UK: Caister Academic Press, 2013. – 284 p.
7. Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // Science. – 1985. – Vol. 230 (4732). – P. 1350–1354.
8. <http://www.karymullis.com/index.shtml>
9. Mullis K. Dancing Naked in the Mind Field // USA: Vintage Books, 1998. – 240 p.
10. Mullis K. B. Cosmological Significance of Time Reversal // Nature. – 1968. – Vol. 218. – P. 663
11. Mullis K. The Polymerase Chain Reaction, Nobel Lecture, December 8, 1993. LEX PRIZ NOBEL. The Nobel Prizes. Almquist and Wiksell Int., Stockholm, Sweden.

К 70-летию со дня рождения

КЭРИ МАЛЛИС – ИЗОБРЕТАТЕЛЬ ПЦР

Н.Е. Волкова

Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения
Украина, 65036, Одесса, ул. Овидиопольская
дорога, 3
e-mail: natavolki@ukr.net

Освещены основные вехи жизненного пути лауреата Нобелевской премии Кэри Б. Маллиса и историю открытия полимеразной цепной реакции – революционного метода молекулярной биологии и генетики, одного из монументальных научных методов XX века. Представлены главные научные достижения К. Маллиса. Показана неординарность личности Кэри Маллиса.

Ключевые слова: Кэри Маллис, история науки, полимеразная цепная реакция.

To 70th anniversary

KERI MULLIS – INVENTOR OF PCR

N.E. Volkova

Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation
Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopol's'ka doroga
Str., 3
e-mail: natavolki@ukr.net

The basic milestones in career of Nobel Prize winner Keri B. Mullis and history of the discovery of polymerase chain reaction, a revolutionary method of molecular biology and genetics, one of the monumental scientific techniques of the twentieth century have been highlighted. Most important scientific achievements and accomplishments of K. Mullis are presented. An extraordinary personality of Keri Mullis is shown.

Key words: K. B. Mullis, history of science, polymerase chain reaction.