

THE HISTORY OF BIOCHEMISTRY

УДК 577.213.3

doi: <https://doi.org/10.15407/ubj93.05.122>

ЛАУРЕАТ НОБЕЛІВСЬКОЇ ПРЕМІЇ КЕРІ МАЛЛІС І ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ (ПЛР)

В. М. ДАНИЛОВА[✉], О. П. МАТИШЕВСЬКА, С. В. КОМІСАРЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

[✉]e-mail: valdan@biochem.kiev.ua

Отримано: 11 травня 2021; Затверджено: 22 вересня 2021

*«Наука, як ніщо інше серед інституцій людства,
щороку росте як бур'ян».*

Кері Малліс

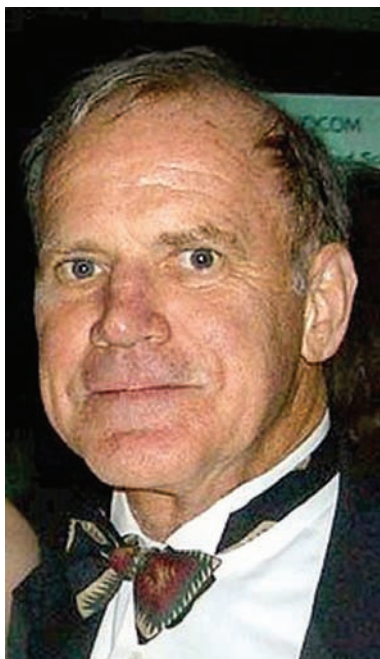
Висвітлено основні віхи життєвого і творчого шляху та неординарність особистості лауреата Нобелівської премії в галузі хімії за 1993 рік Кері Б. Малліса. Описано історію відкриття Кері Маллісом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) – революційного методу молекулярної біології і генетики, одного з монументальних наукових методів ХХ століття. Метод заснований на багаторазовому вибіркового копіюванні певної ділянки ДНК за допомогою ензимів в штучних умовах (in vitro). При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка задовольняє заданим умовам, і тільки в тому разі, якщо вона присутня в досліджуваному зразку. Відкриття методу ПЛР стало одним із найвидатніших подій в галузі молекулярної біології за останні десятиріччя.

Ключові слова: Кері Малліс, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), ДНК, ампліфікація, ДНК-полімераза, історія науки.

На початку 1970-х років норвезький вчений Хьйолль Клеппе (англ. К. Kleppe) з лабораторії нобелівського лауреата Гара Гобінди Корани (англ. Н. Gobind Khogana) запропонував спосіб ампліфікації (копіювання) ДНК за допомогою пари коротких одноланцюгових молекул ДНК – синтетичних праймерів [1]. Однак експонентного збільшення кількості копій фрагмента вихідної ДНК внаслідок реакції досягнуто не було, і на той час ця ідея залишилася нереалізованою.

У 1983 році Кері Малліс запропонував метод, який став надалі відомим як *полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)*. Суть його полягає

в багаторазовому копіюванні (ампліфікації) в пробірці певних ділянок ДНК у процесі повторюваних температурних циклів. На кожному циклі ампліфікації синтезовані раніше фрагменти заново копіюються ДНК-полімеразою (про її відкриття ми писали в попередній статті) [2]. Завдяки цьому відбувається багаторазове збільшення кількості специфічних фрагментів ДНК у мільярди разів, що значно спрощує подальший аналіз. Перша публікація про метод ПЛР з'явилася в листопаді 1985 року в журналі Science [3]. Через 8 років після цього за винахід методу ПЛР К. Mullis отримав Нобелівську премію з хімії [4].



Кері Малліс (1944–2019)

Кері Бенкс Малліс (Мулліс) (англ. *Kary Banks Mullis*) народився в містечку Леноір (англ. *Lenoir*) в Північній Кароліні (США) 28 грудня 1944 р. в сім'ї фермера. Саме життя в сільській місцевості пробудило його ранній інтерес до біології. А дитинство його пройшло в місті Колумбія (Південна Кароліна, США). Вже тоді в Кері виявляються рідкісні риси, за словами Джеймса Вотсона, «відмінника-хулігана» [5]. Коли батьки розлучились, мати пішла працювати ріелтером і багато часу проводила на роботі, а діти залишалися без нагляду. Проте скарг зі школи на них не було, а в матері до них була тільки одна претензія: з кухні мішками пропадав цукор. Виявилося, він мав стати паливом для космічного корабля. Так, у 1959 р. чотирнадцятирічний Кері Малліс спроектував ракету. Сплав цукру з калійною селітрою заливався в металеву трубку довжиною 120 см, запалювання відбувалося за допомогою детонатора (їх тоді продавали дітям без зайвих запитань). Ракета злетіла вгору на цілу милю. Після згоряння твердопаливної частини розкрився парашут населеної кабіни, і пасажир (*Обваляне в азбесті жабеня*) повернувся із тропосфери живим.

Не менш цікаві експерименти Кері продовжував проводити і в студентські роки. Він навчався і отримав ступінь бакалавра наук у галузі хімії в Технологічному інституті Джорджії (Georgia Institute of Technology, Atlanta) в 1966 році, а ступінь доктора філософії в галузі біо-

хімії – в Університеті Каліфорнії (University of California, Berkeley) 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 на галузь фізіологія легеневих судин. У 1977 році розпочав дворічну докторську роботу з фармацевтичної хімії в Університеті Каліфорнії [6].

У студентські роки Кері влаштував у гаражі лабораторію, де виробляв вибухівку, яку потім, як цілком легальний дилер, продавав гірникам. У Малліса з'явилися гроші і на третьому курсі він зумів отримати речовини на кшталт *психоделічних*. Щотижня однокурсники отримували від нього щось новеньке з цього класу речовин на пробу, після чого обмінювались враженнями. На той час це ще було законно.

І от, споживаючи психоделічні речовини в Берклі, аспірант Малліс перейнявся новими *космологічними теоріями*. Він вирішив, що час для спостерігача із Землі і для спостерігача за межами сфери, що випускає реліктове випромінювання, має текти в різні боки. І тут же написав про це псевдонаукову статтю з амбітною назвою «*Космологічні наслідки обернення часу*», нахабно відіславши її в *Nature* [7]. На загальний подив, її було прийнято, хоча журнал *Nature* не друкував статті аспірантів [8]. Як потім зауважив Малліс у своїй нобелівській лекції, «*то була типова «гіпотеза першокурсника», і редакції, напевно, до цих пір соромно за цю публікацію*» [9]. Але щось таки «зачепило» високоповажних рецензентів журналу, опублікуватися в якому вважають за честь наймаститіші метри!

Науковий керівник Малліса, біохімік *Джо Нейландс* (англ. Joe Neilands) дозволяв своїм учням захищати роботи з будь-якої теми, аби вони хоч щось робили самостійно. Оскільки Малліс вирішив після Берклі кинути хімію і стати письменником, то написав свою дисертацію з космології в гумористичному жанрі, через що половина комісії була проти присудження йому наукового ступеня. «*Але стаття в Nature, – як пожартував Малліс, – переважила*»: його куратори дали добро на присудження йому PhD-ступеня з біохімії, незважаючи на те, що він не пройшов курсу з молекулярної біології.

Після Берклі розпочався період пошуків: дитяча кардіохірургія, фармацевтична хімія, невдала спроба стати письменником, бурхливе

особисте життя – і, нарешті, повернення до хімії в біотехнологічній корпорації «Cetus Corp.» в Емервіллі (Каліфорнія, США). Як хімік, що вивчав ДНК, він впродовж семи років досліджував синтез *олігонуклеотидів*, що й привело його до винаходу *полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)* [3]. Але про це відкриття йтиметься нижче, а наразі повернемося до кар'єри Малліса і його особистого життя.

У 1986 році Кері Малліс був призначений відповідальним за дослідження з молекулярної біології в корпорації «Хутронх, Інс» в Сан-Дієго, де зосередився на ДНК і фотохімії. Винайшовши в Хутронх чорнило, чутливе до ультрафіолетового випромінювання, він став скептично ставитись до існування озонової діри.

У 1987 році він розпочав консультації з хімії нуклеїнових кислот для десятка корпорацій («Angenics», «Cytometrics», «Eastman Kodak», «Abbott Labs», «Milligen/Biosearch» тощо) та спеціалізованих лабораторій [10, 11]. Написавши звіт до Національного інституту охорони здоров'я про хід розробки тесту на вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) для спеціальних лабораторій, він скептично поставився до того, що ВІЛ є причиною синдрому набутого імунодефіциту (СНІД) [12].

У 1992 р. Малліс заснував компанію «GeneStones», яка продавала штучні і дорогоцінні камені з імплантованими ДНК відомих людей, в тому числі *Елвіса Преслі, Мерилін Монро, Джона Кеннеді, Наполеона* і багатьох інших [13].

Того самого року він також заснував «Atomic Tags» у місті Ла-Холья (англ. La Jolla), штат Каліфорнія. Підприємство прагнуло розробити технологію з використанням атомно-силової мікроскопії та штрих-кодованих антитіл, позначених важкими металами, для створення високомультимплексованих паралельних імуноаналізів.

Після отримання Нобелівської премії з хімії за винахід полімеразної ланцюгової реакції у 1993 році К. Малліс залишив і бізнес, і науку, оселився в Каліфорнії на березі океану, де займався віндсерфінгом і (у вільний час) приватним науковим консультуванням [5, 14].

У 2000 році він увійшов до складу ради директорів Національної організації з реформи законів про марихуану (National Organization for the Reform of Marijuana Laws).

В останні роки працював заслуженим науковим співробітником дитячої лікарні та науко-



Кері Малліс [5]

во-дослідного інституту в Окленді (Каліфорнія, США), входив до складу ради наукових консультантів декількох компаній, надавав експертні консультації з правових питань, пов'язаних із ДНК, і часто виступав з лекціями в університетських кампусах, корпораціях та на академічних зустрічах по всьому світу.

За свою наукову кар'єру невгамовний Кері Малліс переіменював кілька напрямів діяльності. Маючи науковий ступінь з біохімії, в один із важких моментів життя він навіть підробляв офіціантом у ресторані, а з мозку відловлених там же щурів виділяв нейропептиди для своїх досліджень. Крім того, він писав («в стилі») вірші і прозу, проте пізніше сам визнавав: *«Персонажі моїх творів були невиразними, бо я був занадто молодий, не зазнав тоді ще жодної персональної трагедії і не вмів описувати їх так, щоб інші повірили мені. Тому після неуспішної спроби проявити себе на письменницькому терені мені нічого не залишалося, як продовжити роботу в науці»* [12].

У 1998 році д-р Малліс написав автобіографічну збірку нарисів «Танцюючи голим у полі розуму» («Dancing Naked in the Mind Field»), що зміцнило його репутацію як вільну духом особистість. Це блискучий зразок соковитої і яскравої, повної лукавого гумору, трохи натуралістичної прози [12].

Малліс вирізнявся неординарними і суперечливими поглядами на багато наукових проблем. У своїй біографії він висловив незгоду

з науковими спостереженнями та висновками щодо зміни клімату, виснаження озонового шару і зв'язку між вірусом ВІЛ та СНІДом, пояснюючи це змовою між екологами, урядами і вченими, які, на його думку, такими методами намагаються просунути свої кар'єри і заробити гроші. У книзі він заявив також, що вірить в астрологію.

Як ми вже згадували вище, Малліс експериментував з психоделічними речовинами, зокрема з ЛСД (LSD, нім. Lysergsäurediethylamid). В автобіографії Малліс напише, що цей психоделічний препарат зробив можливим його наступні піонерські відкриття в галузі біотехнології [12].

Він виступав із низкою ексцентричних ідей на кшталт необхідності легалізації продажу легких наркотиків, публічно заявляв, що американці на Місяці не були, а відповідний епізод був змонтований в Голлівуді; що СНІДу як окремої хвороби немає, а просто люди переповнені вірусами, які мовчать до пори; ставив під сумнів теорію глобального потепління (вигадка «паразитів з вищою освітою в галузі економіки чи соціології») тощо [12].

У Малліса було бурхливе особисте життя: він був одружений чотири рази, любив серфінг, гру на гітарі. Від двох дружин у нього народилося троє дітей, він мав і двох онуків.

Малліс помер від пневмонії 7 серпня 2019 року у віці 74 років у Ньюпорт-Біч, штат Каліфорнія. На момент смерті біля нього залишилася четверта дружина *Ненсі Косгроув Малліс*.

Кері Малліс залишив людству величезну спадщину у вигляді патентів і публікацій: ним запатентовано технологію ПЛР і УФ-чутливий пластик, що змінює колір у разі освітлення. Його остання заявка на патент присвячена способу миттєвої мобілізації імунної системи для нейтралізації хвороботворних патогенів і токсинів.

Серед його численних публікацій слід відзначити такі, як: «Космологічна роль повернення часу» («The Cosmological Significance of Time Reversal») та «Праймер-спрямована ферментативна ампліфікація ДНК з термостабільною ДНК-полімеразою» («Primerdirected 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» та інші [10].

Малліс став єдиним Нобелівським лауреатом, який не був науковим співробітником і, по суті, зробив своє відкриття, працюючи в бізнесі. І тільки після опублікування його першої статті в журналі «Science» [3] про відкриття ПЛР до нього прийшло міжнародне визнання наукової спільноти: в 1990 році Малліс був нагороджений престижною національною німецькою премією в галузі аналітичної біохімії «*Preis Biochemische Analytik*»; в 1992 році його визнано Вченим року штату Каліфорнія та нагороджено премією імені Роберта Коха; в 1993 році – Національною премією Японії та Нобелівською премією з хімії. Серед багатьох інших нагород Кері Малліса є: 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.); почесний ступінь фармацевтичної біотехнології в Університеті Болоньї, Італія (2004); почесний ступінь доктора *honoris causa* у галузі біологічних наук Університету Масарика, Чеська Республіка (2010). У 2014 році він був визнаний видатним науковим співробітником Дослідницького інституту дитячої лікарні в Окленді, штат Каліфорнія. У 1998 році К. Малліса введено до Національного залу слави винахідників [14].

Але найголовніше те, що світову славу й визнання він здобув через відкриття методу полімеразної ланцюгової реакції. Його винахід став центральним методом у біохімії та молекулярній біології, як «надзвичайно оригінальний та значущий, фактично поділяючи біологію на дві епохи: до ПЛР та після ПЛР» [5, 11]. Витонченість, простота виконання, неперевершені показники чутливості та специфічності принесли методу полімеразної ланцюгової реакції нечувану популярність у всьому світі. За короткий проміжок часу ПЛР-аналіз перейшов із лабораторій наукових закладів у лабораторії практичної медицини.

Метод ПЛР та історія його відкриття

Як ми писали вище, після дворічного пошуку себе Кері Малліс у 1979 році повернувся до хімії в біотехнологічній корпорації «Cetus Corp.» в Емервіллі (Каліфорнія, США), де впродовж семи років досліджував синтез *олігонуклеотидів*.

Каліфорнійська компанія «Cetus» була однією із перших, де було запроваджено біотехнологічне виробництво. У 1979 році тут виділялись значні фінанси для синтезу ДНК, у великій кількості вироблялись *олігонуклеотиди* (короткі ланцюги ДНК). У зв'язку з цим у К. Малліса виникла низка запитань: як і де їх використати? чи можливо їх застосувати в діагностиці? тощо ...

У 1983 р. у своїй роботі він наштотував на проблему, яка стосувалася виявлення точкових мутацій в ДНК, у тому числі тих, що призводили до тяжких генетичних захворювань, таких як *серпоподібноклітинна анемія*. У своїй біографії Малліс писав, що ідея ПЛР прийшла йому, коли він вночі в своєму автомобілі їхав уздовж Каліфорнійського шосе 1 [12]. Він продумував новий метод аналізу мутацій в ДНК, коли усвідомив, що замість цього винайшов метод ампліфікації будь-якої ділянки ДНК за допомогою повторюваних циклів дублювання, здійснюваних ензимом ДНК-полімеразою. В журналі *Scientific American* Малліс підвів підсумок запропонованому методу: «Починаючи з єдиної молекули ДНК, носія генетичної інформації, ПЛР може надати 100 мільярдів подібних молекул за кілька годин. Реакцію дуже легко провести, вона вимагає однієї пробірки, незначної кількості реагентів та джерела тепла» [15].

Розмірковування Малліса над технічними складнощами вирішення цієї конкретної проблеми (про що детально йдеться в його нобелівській лекції [9]) привели його до відкриття способу одержання величезної кількості копій потрібної ділянки ДНК [16] та до розуміння того, що та процедура, яка прийшла йому випадково в голову для вирішення конкретної задачі, є **універсально значимою**.

Дійсно, ще з ранніх часів молекулярної біології саме розмноження потрібної ділянки ДНК було однією з центральних проблем. Справа в тому, що хромосомна ДНК має величезну протяжність, а кількість її копій в біозразках зазвичай мізерна, іноді це буває тільки одна молекула. А для більш-менш зручних досліджень потрібно, щоб все було навпаки: багато копій порівня-

но невеликої ділянки, з якою можна було б працювати (до ПЛР ці копії одержували методом клонування ДНК за допомогою бактерій; в деяких випадках його застосовують і тепер, але він набагато довший, дорожчий і не дуже зручний).

Ідея ПЛР є надзвичайно простою. Пригадаємо: ДНК складається із ланок-нуклеотидів чотирьох типів: А, G, C і T (від назви азотистих основ, які є в їхньому складі: *аденін, гуанін, цитозин і тимін*). Молекула ДНК складається з двох ланцюгів, кожний з яких повністю визначає інший: навпроти G в одному ланцюзі завжди стоїть C в другому, а навпроти A – завжди стоїть T. І це співвідношення називається *комплементарністю*. Саме завдяки комплементарності молекула ДНК копіює себе під час ділення клітини: ланцюги розділяються і на кожній будується комплементарний ланцюг із нуклеотидів [17, 18], а основний ензим, який за це відповідає, називається ДНК-полімеразою [2]. Ензим ДНК-полімераза зустрічається природно в живих організмах. Цей ензим в живих клітинах виконує функції реплікації ДНК протягом мітозу та мейозу. Полімераза працює, зв'язуючись з одним ланцюжком ДНК та синтезуючи інший, створюючи подвійну спіраль. Внаслідок цього із однієї молекули можна отримати дві тотожні.

Слід зазначити, що два кінці кожного ланцюга не є еквівалентними між собою. Один називають 5'-кінцем, а другий – 3'; приєднання нових нуклеотидів можливе лише з 3'-кінця, тобто у кожного ланцюга є відповідний напрямок. У подвійній спіралі ДНК два комплементарних ланцюги завжди мають протилежний напрямок.

Що ж можна зробити, аби отримати достатньо велику кількість копій потрібної ділянки ДНК-матриці, яку ми назвемо *мішенню*?

Перш за все необхідно синтезувати два *праймери*. Праймери – це короткі ділянки одноланцюгової ДНК, так звані *олігонуклеотиди*, кожний з яких має довжину приблизно з 20 пар основ і які є комплементарними тим ділянкам ДНК, які потрібно ампліфікувати.



Рис. 1. Структура ДНК [8]

Специфічність ПЛР якраз і заснована на властивості утворення комплементарних комплексів між ДНК і праймерами, короткими синтетичними нуклеотидами. Кожний із праймерів є комплементарним одному з ланцюгів дволанцюгової матриці і обмежує початок і кінець ділянки, яка ампліфікується.

Практично ДНК-матриця – це цілий геном, і наша мета – виділити з неї ті фрагменти, які нас цікавлять. Для цього дволанцюгову ДНК-матрицю нагрівають до 95°C кілька хвилин, аби ланцюги ДНК розійшлися. Ця стадія називається *денатурацією*, тому що розриваються водневі зв'язки між двома ланцюгами ДНК. Коли ланцюги розійдуться, температуру знижують, щоб праймери могли зв'язатись з одноланцюговою ДНК-матрицею, після чого ензим ДНК-полімераза починає реплікацію ДНК, зв'язуючись із фрагментом ланцюга нуклеотидів. ДНК-полімераза реплікує матричний ланцюг, використовуючи праймер як затравку, або приклад для копіювання. Після першого циклу одержуємо багаторазове послідовне подвоєння відповідної ділянки ДНК. Далі ця процедура повторюється, і після кожного циклу отримуємо ділянку-мішень в подвійній кількості. Після 35 циклів ПЛР (менше ніж за 2 години) маємо ділянку ДНК, яка нас цікавить, в кількості, що перевищує вихідну у 225 разів (тобто ми ампліфікували її у 34 мільйони разів).

У першому запропонованому прототипі процесу ПЛР ензим використовувався *in vitro*. Дволанцюгова молекула ДНК розділялася на окремі ланцюжки за допомогою нагрівання до 94-95°C. Однак при цій температурі ДНК-полімераза, що використовувалася на той час, денатурувалася, тому ензим доводилося додавати після стадії нагрівання за кожного циклу реакції. Оригінальна процедура була дуже неефективна, тому що вимагала багато часу, великої кількості ДНК-полімерази і безперервної уваги протягом всього процесу.

Пізніше цей оригінальний процес ПЛР був значно вдосконалений внаслідок використання ДНК-полімерази термофільних (теплолюбних) бактерій, що зазвичай ростуть в гейзерах за температури понад 110°C. ДНК-полімераза, отримана з цих організмів, стійка за високих температур, і після використання у ПЛР не пошкоджується за нагрівання до необхідної температури. З тих пір необхідність додавати нову ДНК-полімеразу у разі кожного циклу зникла, процес копіювання ДНК був спрощений і автоматизований.

Одну з перших теплостійких ДНК-полімераз було отримано з бактерії *Thermus aquaticus*, вона стала відома під назвою «Taq» [19, 20]. Taq-полімераза широко використовується для ПЛР і зараз. Проте, її недоліком є те, що через відсутність механізму корекції помилок

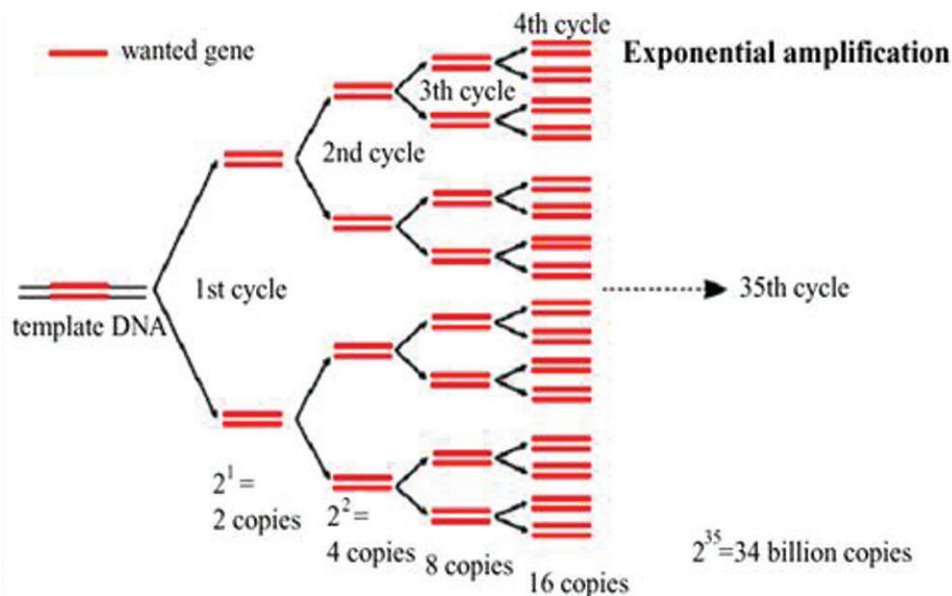


Рис. 2. Ампліфікація потрібної ділянки ДНК: полімеразна ланцюгова реакція (Andy Vierstraete, 2001) [16]

у 3'→5' напрямку, вона робить відносно велику кількість помилок за копіювання ДНК, що призводить до мутацій. Нові полімерази, такі як «Pwo» або «Pfu», отримані з архей, мають необхідний механізм корекції і можуть значно скоротити число мутацій, які зустрічаються у відтвореній послідовності ДНК. Однак, ці ензими полімеризують ДНК набагато повільніше, ніж Taq. Зараз доступні комбінації Taq і Pfu, що забезпечує як високу процесивність (протяжність ділянки, що синтезується за одне зв'язування ензиму та швидкість синтезу), так і високу точність копіювання ДНК.

Отже, для проведення найпростішої ПЛР потрібні такі компоненти:

- ДНК-матриця, тобто фрагмент ДНК, що містить ту ділянку, яку потрібно ампліфікувати.
- Два праймери, комплементарні кінцям необхідного фрагмента.
- Термостабільна ДНК-полімераза.
- Дезоксинуклеотидтрифосфати (A, G, C, T).
- Буферний розчин.

ПЛР проводять в *ампліфікаторі* – приладі, що забезпечує періодичну та швидку зміну температури (охолодження і нагрівання) тестових пробірок із розчином, зазвичай з точністю не менше до 0,1°C.

Зазвичай за проведення ПЛР виконується 20–35 циклів [21], кожен з яких складається з трьох стадій (рис. 2):

1. Дволанцюгову ДНК-матрицю нагрівають до 94–96°C (або до 98°C, якщо використовується особливо термостабільна полімераза) 0,5–10 хв, щоб ланцюги ДНК розділилися. Ця стадія на-



Рис. 3. Типовий ампліфікатор для ПЛР

зивається **денатурацією** – руйнуються водневі зв'язки між двома ланцюгами. Іноді перед першим циклом проводять попереднє прогрівання реакційної суміші протягом 2–5 хв для повної денатурації матриці і праймерів.

2. Коли ланцюги розійшлися, температуру знижують, аби праймери могли зв'язатися з одноланцюговою матрицею; відбувається гібридизація праймерів та матриці. Ця стадія називається **відпалом** (англ. *annealing*). Температура відпалу залежить від послідовності праймерів і зазвичай вибирається на 4–5°C нижче за їхню температуру плавлення. Тривалість стадії – 0,5–2 хв.

3. ДНК-полімераза реплікує матричний ланцюжок, використовуючи праймер як затравку. Це так звана стадія **елонгації**. Температура елонгації залежить від типу полімерази. Полімерази Taq і Pfu, що найчастіше використовуються, найактивніші за 72°C. Час елонгації залежить як від типу ДНК-полімерази, так і від довжини фрагмента, який ампліфікують. Середня швидкість елонгації – 1000 пар основ за 1 хв. Після закінчення всіх циклів зазвичай проводять додаткову стадію фінальної елонгації, щоб добудувати всі одноланцюжкові фрагменти. Ця стадія триває 5–15 хв.

Після кожного циклу кількість синтезованих копій фрагмента ДНК подвоюється. Слід зазначити, що кількість специфічного продукту реакції (обмеженого праймерами) зростає *експоненціально*, а кількість «довгих» копій ДНК *лінійно*, тому в продуктах реакції вони домінують.

За допомогою ПЛР можуть бути ампліфіковані відносно короткі (до 10 kbp) ділянки ДНК з відомими кінцями, в окремих випадках можуть використовуватися ділянки до 40kbp (40 000 пар основ). І все ж це однозначно менше довжини хромосомної ДНК еукаріотичної клітини. Наприклад, **геном людини складається приблизно з 3 млрд пар основ** [10].

Отже, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це метод молекулярної біології, який дозволяє домогтися значного збільшення малих концентрацій певних фрагментів нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) в біологічному матеріалі (пробі).

Наразі ПЛР-ампліфікація – рутинний і щоденний інструмент у кожній молекулярно-біологічній лабораторії. Але величезні можливості методу не всім відразу стали очевидними, і ба-

гато з тих, кому Кері Малліс виклав свою ідею, поставилися до неї з прохолодою, у тому числі й науковці на семінарі фірми «Cetus» у серпні 1984 року, коли він вперше доповів свою ідею, та й багато інших молекулярних біологів. Як згодом у нобелівській лекції К. Малліс скаже, єдина людина, яка з ентузіазмом підтримала його ідею з самого початку, був його друг – засновник фірми «Biosearch», яка випускала апарати для автоматичного синтезу олігонуклеотидів [9].

Доля статті, в якій Малліс вперше описав метод ПЛР-ампліфікації, теж була непростю. Її відразу відхилили редакції найпрестижніших міжнародних наукових журналів «Science» і «Nature» під тим приводом, що ці журнали публікують лише статті, які мають загальнонаукове значення, а метод ПЛР-ампліфікації є технічним і становить інтерес тільки для фахівців. Редактори рекомендували Маллісу звернутися в спеціалізований науковий журнал. Тоді Малліс, який займався напівпромисловим синтезом олігонуклеотидів в фірмі «Cetus», з використанням обладнання сусідньої лабораторії продемонстрував можливості запропонованого ним методу на зрозумілому і безсумнівно практично важливому прикладі – для пренатальної діагностики спадкового захворювання. Стаття була опублікована, як ми зазначали на початку цього огляду, в журналі «Science» 20 грудня 1985 року [3], прізвище К. Малліса там стоїть четвертим. 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 не просто... Малліс оформив всі права на метод ПЛР на «Cetus», проте після декількох продажів прав патент зрештою 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.

Використання ПЛР

Крім ампліфікації ДНК, ПЛР дозволяє проводити безліч інших маніпуляцій з нуклеїновими кислотами (введення мутацій, зрощення фрагментів ДНК) і широко використовується в біологічній і медичній практиці, наприклад: для

діагностики захворювань (спадкових, інфекційних тощо), в сільському господарстві (виявлення збудників інфекційних захворювань в організмі тварин, кормах, навколишньому середовищі; виявлення ГМО; контроль якості сільськогосподарської сировини і продуктів харчування тощо), в наукових дослідженнях (клонування і секвенування генів, виділення нових генів, визначення експресії генів тощо).

Особливо високо ПЛР оцінили лікарі, адже цей метод виявляє ДНК будь-якого патогена, якщо в пробі знайдеться хоч одна бактерія або частка вірусу навіть задовго до того, як цей вирог розмножиться і спричинить хворобу. Нічого подібного медицина раніше не знала. Таке раннє виявлення надає лікарям істотну допомогу в лікуванні. Для прикладу досить згадати паніку з приводу відкритого в свій час СНІДу. Щойно віднайдена технологія ПЛР відразу стала доречною в тих умовах. Скільки людей тоді знайшли спокій і сон, побачивши нуль в результатах своєї ПЛР на ВІЛ! І наразі, під час пандемії COVID-19, метод ПЛР виявився більш ніж доречним!

Основними перевагами ПЛР як методу діагностики інфекційних захворювань є його висока специфічність і чутливість, пряме визначення наявності збудника, висока швидкість отримання результату, можливість діагностики не тільки гострих, а й латентних інфекцій. Так, застосування ПЛР для діагностики туберкульозу дозволяє в короткі терміни (до 48 годин) виявити мікобактерії в будь-якому біологічному матеріалі. Аналітична чутливість комерційних тест-систем дозволяє ідентифікувати поодинокі колонії (до 10 клітин). Це особливо важливо, тому що мікобактерії відрізняються уповільненим ростом за культивування на поживних середовищах.

У медичній практиці цей метод зазвичай використовується також для діагностики онкологічних і генетичних захворювань (лікар може підтвердити діагноз, спостерігаючи відмінності послідовності ДНК, які, як відомо, пов'язані з захворюванням); в трансплантології, судово-медичній експертизі, і що особливо актуально, у фармакогенетиці, так званій персоналізованій медицині, враховуючи індивідуальні відмінності, що існують у дії лікарських препаратів на організм людини. Ці відмінності пов'язані з активністю ензиматичних систем і детермінуються на генетичному рівні. Проведення попе-

реднього генотипування дає змогу встановити індивідуальну дозу препарату для кожного пацієнта.

І за все це людство має бути вдячним неординарній особистості – **Кері Бенксу Маллісу**, про якого засновник і генеральний директор компанії *Wareham Development Піч Роббінс* (англ. Richard K. Robbins) справедливо сказав: «**Він і особисто, і професійно був однією з найбільш знакових постатей, яких коли-небудь спостерігала наука**» [22].

NOBEL PRIZE LAUREATE KARY MULLIS AND THE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

V. M. Danilova[✉], O. P. Matyshevska,
S. V. Komisarenko

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
[✉]e-mail: valdan@biochem.kiev.ua

“Science grows like a weed every year”
Kary Mullis

The article highlights the major life and career milestones and the extraordinary personality of 1993 Nobel Prize laureate in Chemistry Kary B. Mullis. The background of Mullis' invention of the polymerase chain reaction (PCR), a revolutionary and monumental method of molecular biology and genetics of the 20th century, is described. The PCR technique is based on multiple selective copying of a particular segment of DNA with the help of enzymes *in vitro*. Under these conditions, only the target region is copied, and only if it is present in the studied sample. The invention of the PCR method has been one of the most outstanding events in molecular biology in recent decades.

Keywords: Kary Mullis, polymerase chain reaction (PCR), DNA, amplification, DNA polymerase, history of science.

References

1. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol.* 1971; 56(2): 341-361.
2. Matyshevska OP, Danilova VM, Komisarenko SV. The discovery of the mechanisms of biological synthesis of nucleic acids: 1959 Nobel laureates S. Ochoa and A. Kornberg. *Ukr Biochem J.* 2021; 93(1): 129-138.
3. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985; 230(4732): 1350-1354.
4. Regime of access : <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/summary/>
5. Watson J, Berry A, Davis K. DNA. History of the genetic revolution Chapter 7. The human genome. Life scenario. Regime of access : <https://habr.com/ru/company/piter/blog/463873/>
6. Regime of access : https://uk.wikipedia.org/wiki/Kary_Mullis.
7. Mullis K. Cosmological significance of time reversal. *Nature.* 1968; 218: 663-664.
8. Molchanova M. Kary Mullis, great and terrible. *Chem Life.* 2019; (9): 2-5.
9. Mullis K. The Polymerase Chain Reaction, Nobel Lecture, December 8, 1993. LEX PRIX NOBEL. The Nobel Prizes. Almqvist and Wiksell Int., Stockholm, Sweden.
10. Regime of access : <http://www.karymullis.com/pdf/karymullis-cv.pdf>
11. Wade N. Scientist at Work/Kary Mullis; After the 'Eureka,' a Nobelist Drops Out. The New York Times. September 15, 1998.
12. Mullis K. Dancing Naked in the Mind Field. USA: Vintage Books, 1998. 240 p.
13. Regime of access : https://en.wikipedia.org/wiki/Kary_Mullis
14. Volkova NE. Keri Mallis - inventor of PCR (to 70th anniversary). *Bull Ukr Soc Genet Breed.* 2014; 12(1): 122-127.
15. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990; 262(4): 56-61, 64-65.
16. Regime of access : https://studbooks.net/2481604/meditsina/printsip_diagnostiki
17. Danylova TV, Komisarenko SV. Standing on the shoulders of giants: James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins, Rosalind Franklin and the birth of molecular biology. *Ukr Biochem J.* 2020; 92(4): 154-164.
18. Matyshevska OP, Danilova VM, Komisarenko SV. The discovery of the DNA double helix, or the revolution that ushered in the era of molecular biology (Nobel Prize 1962). *Ukr Biochem J.* 2020; 92(6): 183-198.

19. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 1976; 127(3): 1550-1557.
20. Kaledin AS, Sliusarenko AG, Gorodetskii SI. Isolation and properties of DNA polymerase from extreme thermophilic bacteria *Thermus aquaticus* YT-1. *Biokhimiia.* 1980; 45(4): 644-651. (In Russian).
21. Kary Mullis. Regime of access : <https://www.britannica.com/biography/Kary-Mullis>
22. Regime of access : <https://evilleeye.com/wareha...>