

УДК[001+62] (09)

Е.Д.Николаева (6 курс, ФМедФ)

ОБ ИСТОРИИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Этот удивительно простой метод получения фрагментов ДНК в неограниченном количестве копий был придуман при необычных обстоятельствах — ночью, во время автомобильной поездки в горах Калифорнии.

Иногда удачная идея приходит в голову совершенно неожиданно. С Кэри Б. Мюллисом, например, это случилось в одну из апрельских ночей в 1983 г., когда он, сидя за рулем автомобиля, пробирался по освещенной лунной горной дороге в секвойные леса Северной Калифорнии. Его мысль случайно натолкнулась на процесс, благодаря которому можно получать копии генов в неограниченных количествах. Теперь его называют полимеразной цепной реакцией (ПЦР).

Исторически изобретению ПЦР предшествовали несколько важных открытий.

В 70-х годах были открыты ферменты - рестрикционные эндонуклеазы (рестриктазы), которые расщепляют ДНК в специфических точках. При этом легче выделять и изучать фрагменты ДНК с находящимися в них генами.

К концу 70-х годов молекулярные биологи энергично взялись за изучение ДНК с помощью эндонуклеаз и других молекул, называемых олигонуклеотидными пробками (зондами). Олигонуклеотид представляет собой короткую цепь нуклеотидов, расположенных в специфической последовательности. В определенных условиях олигонуклеотид специфически связывается с комплементарной последовательностью нуклеотидов в одноцепочечной ДНК. В 1979 г. Кэри Б. Мюллис поступил на работу в фирму Cetus в Эмервилле (штат Калифорния). Мюллис понимал, как важно разработать простой метод идентификации нуклеотида в заданном положении в молекуле ДНК, особенно для ДНК высокой сложности (например, ДНК человека), а также для малых количеств.

В 1955 г. А.Корнберг и его коллеги из Станфордского университета открыли фермент (выделили из бактерии *Thermus aquaticus*, живущей в горячих источниках), который назвали ДНК-полимеразой. ДНК-полимеразы выполняют ряд функций, в том числе обеспечивают репарацию и репликацию ДНК. Эти ферменты способны удлинять короткие олигонуклеотидные затравки, комплементарно ДНК-матрице. Раствор, в котором происходит эта реакция, должен содержать нуклеозидтрифосфаты (они используются в качестве строительных блоков). Нуклеотид, который присоединяет ДНК-полимераза, комплементарен основанию в соответствующем положении матричной цепи. Мюллис намеревался модифицировать метод секвенирования Сенгера (Сенджера) и частично основывался на методе клонирования.

Однажды поздним вечером в пятницу вместе с подругой, также химиком из компании Cetus, Мюллис ехал в автомобиле в округ Мендоцино. Она спала. Шоссе 101 было пустынным. Руки при этом заняты, а голова свободна. Той ночью Кэри думал о предстоящем эксперименте по секвенированию ДНК. У него был прямой план использовать только полимеразу, один олигонуклеотид и меченых ddNTP.

Чуть погодя ему пришла мысль, что если вместо одного олигонуклеотида использовать два, такое определение будет гораздо точнее. Два праймера будут расположены с обеих сторон от пары нуклеотидов, которую он хотел идентифицировать. Если синтезировать олигонуклеотиды разного размера, их можно будет отличить друг от друга. Если олигонуклеотиды будут комплементарны разным цепям ДНК, можно будет определить

соответствующие последовательности в обеих цепях молекулы. Это позволит без дополнительных сложностей осуществлять внутренний контроль.

Хотя тогда Кэри не отдавал себе в этом отчета, но, задумав использовать два олигонуклеотида, расположенных по обе стороны от исследуемого гена, с 3'-концами, направленными друг к другу, он был очень близок к открытию ПЦР. В тот момент, однако, он был на грани падения с горной дороги и остро ощущал это.

Он вздрогнул от неожиданного прозрения: цепи ДНК в исходной матрице и в удлинённом олигонуклеотиде по последовательности нуклеотидов будут идентичны. В итоге в реакции имитации число ДНК-матриц для секвенирования удвоится! Продуктами реакции всегда будут фрагменты ДНК строго определенной длины.

Взволнованный, он стал перебирать в памяти степени числа 2: 2, 4, 8, 16, 32... Он помнил, что 2 в десятой степени составляет приблизительно 1000, а 2 в двадцатой степени — миллион.

Прошли месяцы, прежде чем он подготовился к своему первому эксперименту по проверке принципа ПЦР. Когда все было готово, он провел эксперимент из тех, что нравились больше всего, — эксперимент, который ставится в одной пробирке и позволяет получить простой ответ: да или нет. Будет ли ПЦР амплифицировать выбранный участок ДНК? И ответ был получен: да, будет. В течение следующих месяцев была подтверждена эффективность ПЦР для плазмидной ДНК все большей длины.

Уже весной 1984 г. Мюллис работал над патентом. В 1993 году Кэрри Мюллис был удостоен Нобелевской премии за такое сложное, но очень простое, по сути, открытие, которое до сих пор, и как мне кажется, еще многие годы будет пользоваться невероятным спросом у всех молекулярных биологов мира.