

LA LUNGA VITA - ISTRUZIONI PER L'USO / 2

La notte della Pcr sulla strada 128

di Kary Mullis*

Oggi in biologia molecolare la maggior parte della gente non ha l'età di ricordare il pre-PCR. Ma provate a farne a meno e vedrete quanta differenza fa una tecnica piccola e semplice. «Reazione a catena della polimerasi» si trova nei vocabolari, e se mettete «PCR» su Google escono 18 milioni di hit. Fatelo con «pcr song» e arrivate a una deliziosa canzoncina di BioRad che vi frullerà nel cervello come un gatto impazzito nel garage. Provatela.

Quando mi sono imbattuto nella PCR, nella primavera del 1983, cercavo di incrementare la domanda di oligonucleotidi, brevi sequenze di Dna o di Rna che prima dell'automazione, erano fatte a mano. La nuova macchina dell'amico Ron Cook della Biosearch, sull'altolito della baia di San Francisco, metteva a rischio posti di lavoro nel nostro laboratorio: faceva in otto ore il nostro lavoro di circa tre settimane - ogni otto ore e niente pause. Ci sono riuscito, la domanda è stata moltiplicata per un milione e alla Cetus nessuno è stato licenziato.

Ero sulla strada tra Cloverdale e Boonville, nella contea di Mendocino, andavo nella mia baita per il week-end. La mia ragazza dormiva, io ero funzionalmente sobrio (o la strada non me l'avrebbe perdonato), era notte tarda e mi sentivo strano. Non vedevo niente. O ero fuori dal tempo. Quel tipo di strada, insomma. E a metà di quelle 46,58 miglia al contatore, in pochi minuti la mia vita stava per subire una svolta colossale. Gli oligonucleotidi sono fantastici. Con uno solo si può localizzare un punto particolare sul Dna. Nei primi anni Ottanta, non c'era verso di esserne certi: i gel dell'intero Dna umano, sezionato in frammenti di restrizione sondati con una serie di 20 oligo, erano pieni di sbavature. Per guardare da vicino una sequenza di Dna umano, toccava clonarla. Sminuzzarla a pezzetti di qualche migliaio di coppie di basi, da isolare una per una coltivandole in particolari colonie di batteri, scoprire quale conteneva il pezzetto preferito e crescerlo. Magia della clonazione. La sentivamo tutti, anche i custodi che di notte passavano la scopa nei laboratori.

Alla fine degli anni Settanta, biologi molecolari di rango avevano convinto tutti gli altri a fermarsi e pensare un po' alla sicurezza. Si convocavano conferenze, si promulgavano perfino leggi a Cambridge, Massachusetts, e a Berkeley, California. Noi di Emeryville, bische tante e leggi poche, eravamo tranquilli. Infilare geni umani in microrganismi che potevano infettare gli esseri umani forse

non era buona idea. Non c'era verso di saperlo ma si poteva trovare un compromesso. Fu deciso che alcuni ceppi di *Escherichia coli* avevano meno probabilità di provocare una catastrofe e accettammo di usare solo quelli. L'*E. coli* K12 non risolveva il problema della nuova macchina che sintetizzava oligo, né quello di stabilire velocemente se il Dna di un embrione conteneva o meno una mutazione sfortunata e di dare ai genitori la scelta di abortire. Inconsciamente, ho incrociato i due problemi. Mi sono messo a progettare metodi che usavano nucleotidi per identificare mutazioni in una sola coppia di basi dell'intero genoma, così le donne incinte non avrebbero più dovuto aspettare i clonatori. Ma i risultati dei gel e delle sonde radioattive erano sfocati, e per decidere tra la vita o la morte, un gel sfocato non va bene. Qualcuno doveva trovare un sistema per concentrare un locus di Dna e solo quello, in presenza di milioni di loci simili eppure diversi, senza l'inevitabile ritardo della clonazione. Stava per accadere quella notte. Il qualcuno sarei stato io e dieci anni dopo a Stoccolma, avrei brindato alla salute dei reali di Svezia.

Sulla strada 128 sporgevano i grappoli bianchi e rosa dei castani, nella luce dei fari sembravano freddi eppure erano carichi di essenze calde che dominavano l'odorato. Sembrava la notte dei castani in fiore, ma qualcosa d'altro stava fremendo. La piccola Honda ci issava su per le montagne, nelle mani sentivo la strada, le curve, ma avevo la mente in laboratorio. Catene di Dna fluttuavano e s'attorcigliavano, immagini sgargianti, blu e rosa, di molecole elettriche s'intromettevano tra i miei occhi e la strada. Vedo le luci negli alberi, ma sto osservando tutt'altro. Mettiamo di estendere un oligo sintetico che deve complementare una base sola sul suo bersaglio di Dna utilizzando la Dna-polimerasi e i deossiribonucleotidi trifosfato, quattro provette contenenti ciascuna le quattro basi, e una sola base in ogni provetta taggata alfa con il ³²fosfato. Da ottimisti potremmo scoprire l'identità del nucleotide sul bersaglio di Dna. Il sequenziamento dideodissi funziona così. Però. PERÒ... solo con il Dna clonato, quando il rapporto bersaglio/non bersaglio è ridotto di circa un milione. Meno male, quella notte non pensavo a quello che poteva andare storto, oltre alla scarsissima probabilità di centrare unicamente la sequenza giusta. Dedicavo al problema l'attenzione che bastava al mio piano: usare due nucleotidi, uno per ogni filamento della sequenza bersaglio che converge da ogni lato fino alla coppia di basi. Nella miscela denaturata della reazione i due lati sarebbero stati molto distanti ma co-

Potete immaginare un mondo senza «reazione a catena della polimerasi»? Era il 1983 e una strana avventura portò il futuro Nobel a scoprirla

munque complementari e se uno mi diceva «T», l'altro doveva dirmi per forza «A». Senza un gran controllo, ma di oligo ne avevo finché volevo. Anzi, stavo proprio cercando di spreca a manetta. Almeno tre fraintendimenti mi spingevano verso la PCR. Ero vicino, ma non sapevo a che cosa. Credevo che la mia procedura avrebbe funzionato. Idea altamente improbabile, data la complessità del campione che la PCR avrebbe risolto da lì a poco. E guidavo.

Il terzo fraintendimento, meno ovvio, era condiviso dai miei colleghi. Esisteva un enzima, la fosfatasi alcalina batterica detta Bap, che poteva eliminare gli ipotetici deossinucleotidi trifosfato. Ne avrebbe tagliato la coda di trifosfato in un lampo. Ma prima di aggiungere i miei preziosi dideoxi, avrei dovuto tagliare la coda all'enzima e sarebbe stata dura. Stavo quindi considerando altri mezzi per liberarmi dai deossinucleotidi trifosfato. Il *Klenow*! La polimerasi che intendevo usare comunque. Un oligo di partenza, una sequenza di Dna come matrice, e avrebbe polimerizzato tutti i nucleotidi. Eccola... la PCR! Ma non riuscivo ancora a vederla.

Una sovrabbondanza di oligomeri, agiunti di fresco, sarebbero atterrati sui filamenti-bersaglio e, incrociando le dita, un nucleotide radioattivo li avrebbe estesi. Che cosa poteva andare storto? E se nella fase «facciam fuori il trifosfato», gli oligomeri fossero stati estesi tanto, ma proprio tanto? Ho fermato la Honda sull'orlo della strada, i camion di legname quasi la sfioravano. Eravamo in pericolo io, la mia ragazza che continuava a dormire, e la mia invenzione, ma dovevo capire cosa sarebbe successo agli oligo estesi proprio tanto. Con altri oligo, i prodotti della loro estensione si sarebbero estesi a loro volta. Avrei raddoppiato il segnale, ancora e ancora con quei deossinucleotidi sovrabbondanti che costavano poco, erano solubili in acqua e in California erano legali. Mi conveniva fermarmi in un altro posto. Poco più avanti sulla 128 c'era un'area di sosta. Il tempo di arrivarci, i tasselli si erano incastrati. Tre cicli avrebbero creato una molecola di Dna a doppio filamento e dieci cicli mille e trenta circa un miliardo. Il prodotto sarebbe stato auto-catalitico, avrebbe sommerso tutti gli altri. Non ho dormito quella notte. L'indomani mattina ho comprato due bottiglie di Pinot Noir delle Navarero Vineyards e a metà pomeriggio sono piombato in un sonno agitato. Nella baita, c'erano diagrammi di PCR su ogni superficie disegnabile a matita. Mi sono svegliato in un nuovo mondo.

- Premio Nobel per la Chimica 1993
(Traduzione di Sylvie Coyaud)

© RIPRODUZIONE RISERVATA