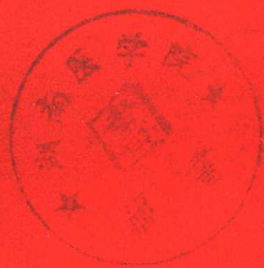


结晶胰岛素的全合成

中国科学院生物化学研究所
北京大学化学系
中国科学院有机化学研究所



科学出版社

R347.17/ksh

結晶胰島素的全合成

中国科学院生物化学研究所
北 京 大 学 化 学 系 著
中国科学院有机化学研究所

科 学 出 版 社

1 9 6 6

结晶胰岛素的全合成

中国科学院生物化学研究所
北 京 大 学 化 学 系 著
中国科学院有机化学研究所

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

北京市书刊出版业营业许可证出字第 061 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1966 年 6 月第 一 版 开本：787×1092 1/27

1966 年 6 月第一次印刷 印张：2 4/27

印数：0001—1,500 字数：45,000

统一书号：13031·2343

本社书号：3547·13-10

定价：[科一] 0.20 元

目 录

I. 序言	1
II. 从天然胰岛素 A 及 B 链重合成结晶胰岛素	8
III. 胰岛素 A 链的合成及其与天然 B 链组合成结晶 胰岛素	21
IV. 胰岛素 B 链的合成及其与天然 A 链组合成结晶 胰岛素	33
V. 结晶胰岛素的全合成	44

1. 序 言*

中国科学院生物化学研究所 北京大学化学系
中国科学院有机化学研究所

世界上第一次用人工方法合成的蛋白质已经于1965年在中华人民共和国诞生了。这是我国科学工作者高举毛泽东思想伟大红旗,在奋力攀登世界科学高峰、赶超世界先进科学水平的伟大进军中,为祖国人民在理论科学研究方面争得的一项世界冠军。

自恩格斯在约90年前预言:“只要把蛋白质的化学成分弄清楚以后,化学就能着手制造出活的蛋白质来。”人们一直殷切地期望能早日完成这一艰巨任务。现在,第一个人工合成蛋白质在中国诞生,这是人类在认识生命、揭开生命奥秘的伟大历程中所迈进的一大步,它标志着人工合成蛋白质的时代已经开始。

胰岛素人工合成工作,是大跃进的产物。1958年全国轰轰烈烈、热火朝天的跃进形势,激发了我们全体同志的革命干劲,大家都希望在较短时间内攀登世界科学高峰,为祖国科学事业作出更大的贡献。经过反复研究,我们决定用人工方法合成胰岛素,在世界上实现第一个人工合成蛋白质。

当时的选题思想是,蛋白质是生命的物质基础之一,凡是有生命的地方都离不开蛋白质和另一重要物质——核酸。蛋白质和核酸都是复杂的生物高分子化合物。胰岛素是最先知道其壹级结

*《结晶胰岛素的全合成》是1965年11月8—10日在上海召开的人工合成胰岛素讨论会上的报告。报告的第二、第四和第五部分的详细论文已先后在《中国科学》上发表。报告的第三部分的简报也已在《科学通报》中文版及《中国科学》上发表。

†本书是根据科学通报第17卷第6期所载原文重印,序言部分作了一些修改。

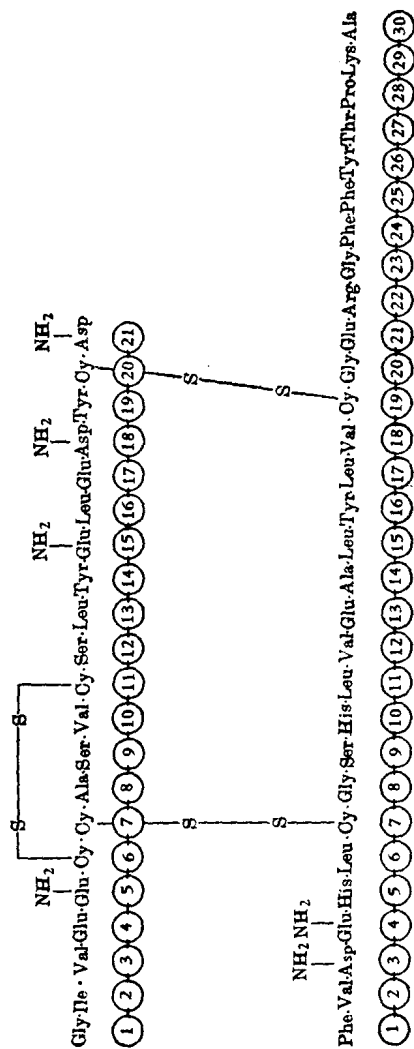


图 1 胰岛素的化学结构

构,也就是最先知道其氨基酸排列次序的一种最小的蛋白质。图 1 表明牛胰胰岛素单体中两条肽链的氨基酸排列次序以及其中三个硫硫键的位置。这个结构是 Sanger 等人花了近十年的时间在 1955 年搞清楚的。蛋白质和多肽的主要不同之处,在于它除了具有一定的壹级结构以外还有特殊的空间构型,即肽链呈 α -螺旋(贰级结构)而 α -螺旋又呈一定的卷曲或折迭(叁级结构)。当这些高级结构被破坏时就会丧失全部活力。人工合成蛋白质,除了要按一定的氨基酸排列次序合成大肽,还要看所合成的大肽是不是能按与天然产物相同的方式,形成一定的螺旋及卷曲,以至于能和天然的一样,获得结晶并表现同样的活力。

在 1958 年我们选定胰岛素作为合成对象时,有许多困难需要克服:首先,需要解决的是,将胰岛素分子中的三个硫硫键拆开以后,必须能再重合成胰岛素(国外学者在过去三十多年中曾经将还原拆开硫硫键而全部失活的产物进行氧化,企图重行恢复活力,但都未成功)。这一问题的解决关系到合成方案的选择。如果成功,便可把胰岛素的合成工作简化到先行合成分别为廿一肽及卅肽的 A 及 B 两条肽链。第二,在解决硫硫键的拆合问题之后,要人工全合成胰岛素,起码必须能合成廿一肽及卅肽。(当时国外在合成方面的最高水平,仅有人工合成十三肽的实例。国内则只有合成催产素的经验)。第三,合成工作中需要大量氨基酸和试剂,必须能自给。第四,合成工作中需要的一整套的蛋白质和多肽的分离分析技术也需要建立或提高。

尽管有着这么多的困难,但是,在党的领导和支持下,在大跃进形势的鼓舞下,我们勇敢地承担了这项工作。我们在上海和北京两地先后开了几次协作会议,同时还举行了一系列的学术报告会,讨论了人工合成胰岛素的具体措施。经过群众热烈讨论,制定出五路进军的研究方案,即:“以天然胰岛素的硫硫键拆合和氨基酸的生产为先行,有机合成为主力,同时建立肽的分离分析技术,并探索肽的激活与酶促转肽等生化合成新方法。”总的精神是:“全面准备,多路探索,上下并举,重点突破。”

1959年初,人工合成胰岛素的工作就全面开始了。

首先是解决了氨基酸的大量供应问题。我们在完全空白的基
础上,自力更生,自己动手生产。结果很快就解决了十几种氨基酸
大量生产的问题,结束了国内不能自制整套氨基酸的历史,保证了
工作的需要。

天然胰岛素的拆合工作一开始曾经遇到很大的困难,我们采
用过好几种文献上拆分A、B链的方法,都没有成功。经过多次失
败,才找到了先用亚硫酸钠和四硫硫酸钠将胰岛素拆分为A及B
链的S-磺酸衍生物,再进行还原重氧化,从而使活力恢复到天然
胰岛素的5—10%。随着条件的改进,又逐步提高到25—50%。并
且将重组合的产物通过抽提结晶等步骤,得到了结晶的重合成胰
岛素。结晶产物的结晶形状,生物活力及酶解图谱均与天然胰岛
素的相同。天然胰岛素拆合的成功指出了人工合成胰岛素完全可
以从A及B链的合成入手。

多肽合成方面,一开始我们还曾摸索过硫硫键的不对称合成,
企图定向合成硫硫键。在胰岛素的A、B链的拆合取得成功以后,
就全力集中于A及B链的合成。合成工作中大抓质量,每一个中
间体往往都曾从许多不同途径合成,并通过多种分析鉴定。在
1961—1964年期间,我们曾先后将A及B链中各个较大的肽段都
先后整理成论文发表。

1964年,经过三年多的比较扎实的工作,人工合成的A链与
天然B链,以及人工合成的B链与天然A链,分别组合所得的半合
成产物,已能表现出2—4%的胰岛素活力,这些结果曾在1964年
北京科学讨论会上作过报告。后来,用人工合成的A链和人工合
成的B链组合所得的全合成产物,也出现了轻微的活力。

显然,要从只具有轻微活力的产物中获得结晶是极困难的。为
了进一步提高全合成产物的活力,我们不断总结经验,每走一步留
下一个脚印,不断改进,不断提高。首先我们在A链及B链的合成
路线方面,作了一些改进。A链的合成原来是将羧端十二肽皂化
后,再和氨端九肽缩合得到廿一肽,现在改用羧基不加保护的冬

酰胺,自 N-端引伸,因而避免了可能由于十二肽皂化所产生的副反应。B 链原来的方案是在廿二肽的阶段皂化,现在提前到十四肽皂化去酯,因而避免了在廿二肽皂化时所产生的断链,并更有利于廿二肽衍生物的提纯。在 A 及 B 链合成的最后几步的大肽合成中,均采用了迭氮法,从而更保证了产物的光学纯度。其次,我们改进了用以脱除廿一肽及卅肽中保护基团的钠-液氨处理的条件,使得保护基团能顺利脱除,而又较少伤及肽链。第三,从天然胰岛素拆合条件的摸索中,我们找到了用以提纯人工合成的还原型 A 链的 pH 3.8 沉淀法,以及用以提纯人工合成的 B 链 S-磺酸衍生物的 pH 5.0 沉淀法。由于这些改进,利用人工合成的并经提纯的 A 链 S-磺酸衍生物或 B 链 S-磺酸衍生物,分别和天然 B 链或 A 链 S-磺酸衍生物进行还原、氧化。所得的产物,一般都能表现 5—10% 的胰岛素活力。这种产物经过抽提、结晶等步骤,均能得到结晶的半合成产物,其生物活力(小白鼠惊厥法)、结晶形状和电泳行为均与天然胰岛素的相同。

在半合成的稳固基础上,我们用部分提纯的人工合成的 A 链及人工合成的 B 链衍生物所进行的全合成,很快就得到了具有 1.2—2.5% 胰岛素活力的粗产品。该产物经过两次酸性仲丁醇系统的抽提。比活力提高了 10—30 倍,并能获得结晶。结晶形状与天然胰岛素的相同。用小白鼠惊厥法和兔血糖降低法所测定的比活力,每毫克在 20 国际单位以上。我们还做了更多的分析:结晶产物的层析和电泳行为,以及其酶水解液的双向电泳层析图谱均和天然胰岛素的相同。结晶产物与抗牛胰岛素血清产生沉淀反应,其双扩散行为亦与天然胰岛素相同。抗牛胰岛素血清亦能中和人工合成的结晶牛胰岛素。

以上各种分析数据都充分地说明了我们所合成的结晶产物与天然的结晶牛胰岛素完全一致,从而继第一次得到两种人工半合成结晶牛胰岛素之后,又实现了第一个蛋白质的人工全合成。

人工合成了胰岛素,便为合成更大的蛋白质,合成以硫硫键连接的多链的蛋白质开辟了途径。以往用合成和置换个别氨基酸组

成的方法，只能对简单的多肽激素或抗菌素进行结构与功能关系的研究，对于蛋白质，则过去仅局限于对侧链基团稍加改变以观测其对生物活力的影响。人工合成了胰岛素，则蛋白质的禁区也打开了。这类研究，无疑地将有助于蛋白质结构与功能之间关系的阐明，有助于模拟酶的探索。还有可能合成特殊重元素标记的胰岛素，制备其晶体，以有助于胰岛素晶体分析工作的进展。

在这个工作中，我们第一次有效地完成了对一个两条肽链的蛋白质，在两链因硫硫键还原而拆开后，通过氧化重组恢复活力的功绩，结束了国外长期以来未能使因还原而失活的胰岛素通过氧化恢复活力的历史。我们第一次用合成的方法，证明在这个体系中，在合适的条件下，硫硫键联结的方式是有选择性的。我们首先通过重合成，以后又通过合成的方法，证明只要氨基酸排得对头，在适当的条件下会自然形成螺旋及盘曲，也就是说，蛋白质的壹级结构在很大程度上可以决定其高级结构，这是有重大意义的。

跳出有机化学和生物化学的范围，从整个自然科学的发展来看，人工合成胰岛素还有其更为深远的意义。1928年味勒把氰酸铵溶液加热获得尿素，突破了无机世界与有机世界之间的界限。在人类正确认识生命本质、从无机物制造生命的历史中，跨出了重要的一步。由于蛋白质和核酸这两类生物高分子在生命现象中所起的主导作用，人工合成了第一个具有生物活力的蛋白质，便突破了一般简单的有机化合物领域和信息高度集中的、生命奥秘主要依据的生物高分子领域之间的界限，在人类正确认识生命本质、从无机物中合成具有生命的物质的长途中，又跨进了重要的一步。

对于具有生物活力的天然多肽的合成，最重要的指标是合成产物的活力一定得与天然的相同。因此，任何合成产物假使只具有微弱活力，又未曾通过提纯步骤使比活力有所提高以至于接近天然的水平，人们便有理由怀疑这些活力的表现会是由于具有低活力水平的、部分接错了或破坏了的类似物所引起的，充其量只能说是合成了具有一些与该天然多肽类似的产物，而不能认为已全合成。由于蛋白质具有特定的空间结构，对于天然蛋白质的合成，

则需要合成的产物除应具有正确的化学结构外，还应具有正确的立体结构，即反映在其生物活力、结晶、免疫特征、层析和电泳行为、酶解图谱等都与天然蛋白质相同。其中生物活力和结晶是合成与否的最敏感、最关键的数据。这些指标我们都已满足，因此第一次实现了胰岛素的全合成。

西德的 Zahn 和同工作者于 1965 年 7 月发表了按羊胰岛素化学结构进行合成的较详细的化学数据。他们从所合成的 A 及 B 链衍生物经钠氨处理脱去保护基团后，直接氧化得到具有 0.5—1.0 % 胰岛素活力的产物。

美国的 Katsoyannis 和同工作者自 1963 年以来，即在一些简讯或简报中几次宣称已经人工合成了胰岛素，但迄今在他们的简讯与简报中都没有给出具体的实验条件、有关活力的量的数据和其他具有说服力的证据，他们只是提到产物“具有微弱但是肯定的活力”。Katsoyannis 在一篇论述多肽合成的文章中曾指出：“不纯样品的生物活力测定常易给予引入歧途的结果”。我们认为这种看法是正确的。Katsoyannis 等没有给出任何证据说明他们合成的产物所具有的“微弱的活力”确实是胰岛素所产生的。

胰岛素人工合成的工作过程中，复旦大学生物系，北京大学生物系，中国科学院药物研究所、生理研究所和化学研究所等单位的许多同志，曾在不同时期参加过这项工作。中国医学科学院，广州中山医学院，上海医药工业研究院，生物制药厂，上海市医药公司，上海市试剂公司，上海试剂厂，五洲制药厂等很多单位，都曾在我们工作中给予很多帮助。我们趁此机会，向他们表示衷心的感谢。

II. 从天然胰岛素 A 及 B 链重合成结晶胰岛素

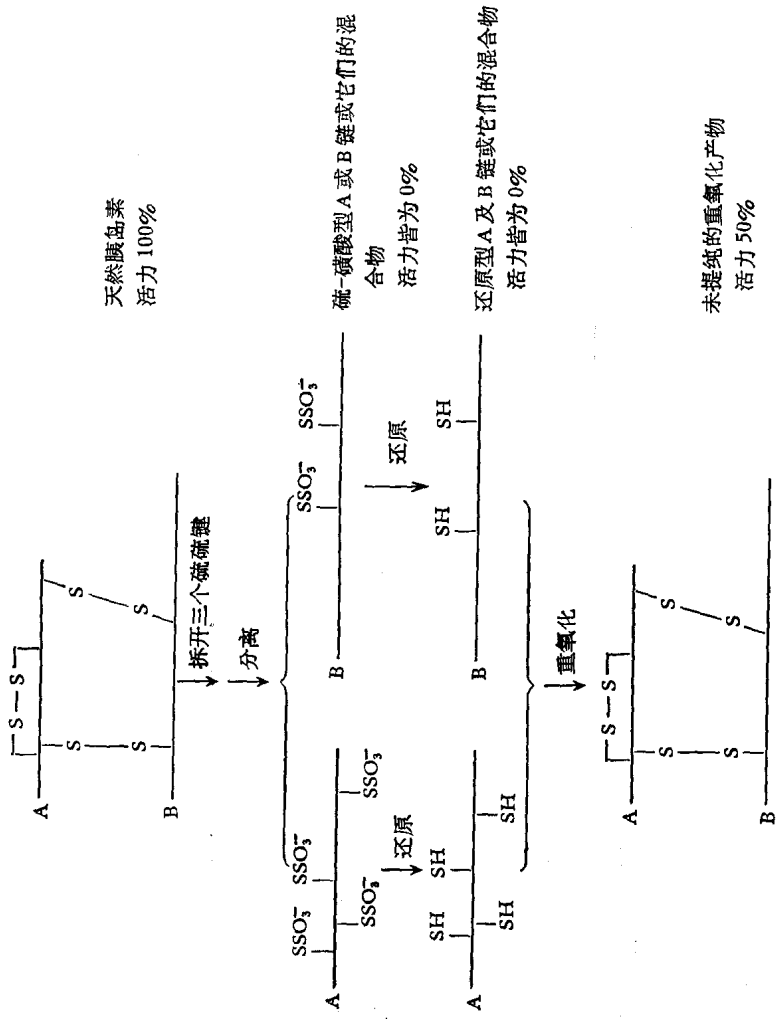
中国科学院生物化学研究所

天然胰岛素的拆合(以下简称拆合)就是指:用化学办法将天然胰岛素分子的三个硫硫键打开,将胰岛素分子分为没有生物活力的 A、B 两条肽链,然后,经过适当处理使此两条链在试管内,重新通过硫硫键接合起来,成为与天然胰岛素生物活力相同的分子。这一工作的过程简单表示如下(图 1)。

自从胰岛素分子的氨基酸排列顺序被确定之后,人们就期待能够用有机合成的方法人工合成胰岛素。但胰岛素分子中除了肽键以外还有和胰岛素的活力功能与貳、叁级结构有密切关系的三个硫硫键。前人的工作认为只要拆开其中一个,胰岛素的活力就丧失。因此要人工合成具有活力的胰岛素必须首先解决含硫硫键的肽的合成方案问题。最理想的解决方法是胰岛素 A 及 B 链可以在人工控制下通过硫硫键正确衔接起来,成为具有活力的胰岛素分子。如果不行,那末多肽合成就要考虑通过两个“工”字形肽的衔接,或者摸索三种巯基保护剂来分别定位接连巯基(图 2)。

因此,胰岛素拆合是一个饶有兴趣的问题。国际上很早就有了这一方面的尝试。虽然曾经有人提到过胰岛素经还原而部分失活后再重氧化,可以恢复一些活力^[1,2](表 1),但大多数学者如 White 和 Stern^[3]以及 du Vigneaud^[4]等人在详细研究之后都报导了还原的胰岛素经过重氧化非但不能复活,反而会使残存的一点活力进一步降低。

作为“胰岛素人工合成”的先遣部队,我们在党的领导下,解放思想,破除迷信,发扬敢想敢干的精神,发挥集体的力量,于 1958 年底开始此项工作,经过多次失败,在 1959 年年中初步解决了天



天然胰岛素
活力 100%

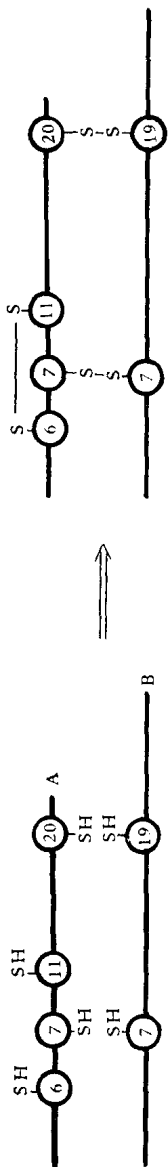
硫-磺酸型 A 或 B 链或它们的混
合物
活力皆为 0%

还原型 A 及 B 链或它们的混合物
活力皆为 0%

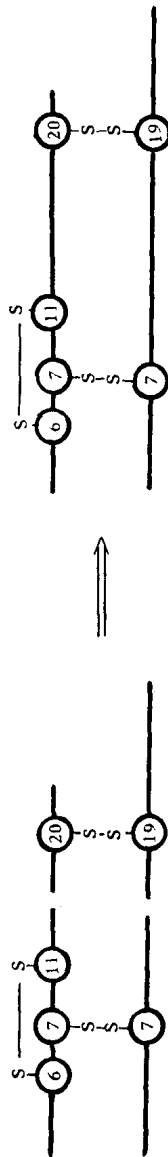
未提纯的重氧化产物
活力 50%

图 1 胰岛素拆合示意图

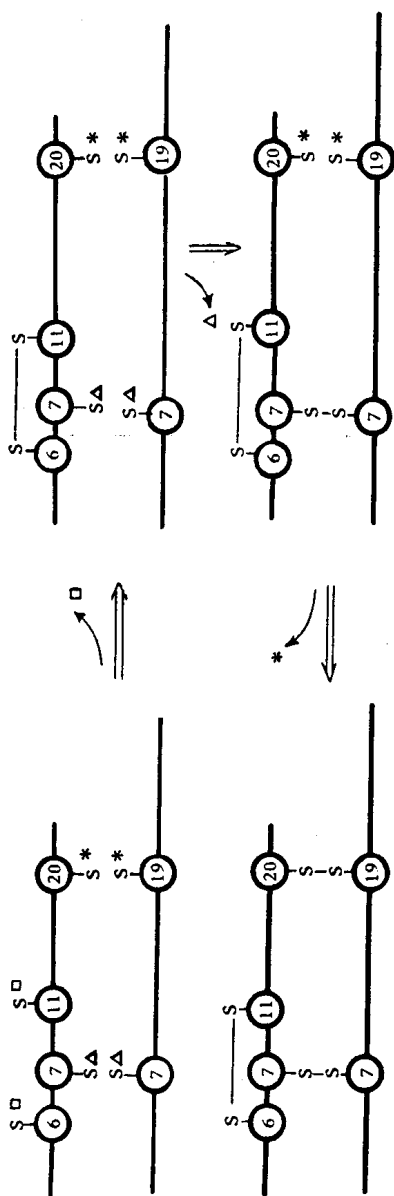
(1) A 与 B 链接合路线



(2) “工”字形接合路线



(3) 三种不同保护基团接合路线(□、△及*代表三种不同的巯基保护基团)



(4) 回路延长接合路线

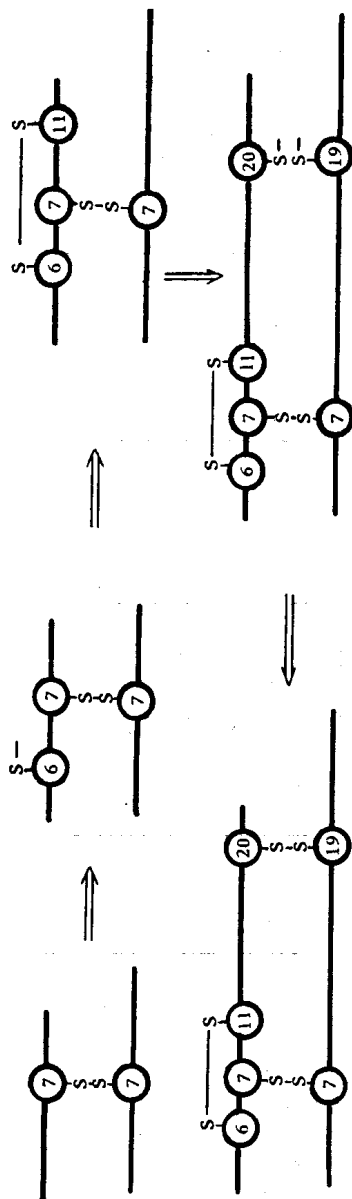


图2 合成方案的示意图

表 1 1960 年前关于胰岛素拆合工作的报导

作 者	年 代	还 原 剂	还原后的活力	重氧化后的活力*	注 解
Allen & Murlin ^[1]	1925	锡箔加 HCl	20%	100%	粗胰岛素未失活
Blatherwick 等 ^[2]	1927		16	12	通空气即降低活力
du Vigneaud 等 ^[3]	1931	谷胱甘肽或半胱氨酸	0	0	不能恢复
Wintersteiner ^[4]	1933	半胱氨酸			还原 1/3 即失活
Freudenberg & Münch ^[5]	1935		6	8	可以部分恢复
White & Stern ^[6]	1937		5.2	4.6	不能恢复
			10	0.2	不能恢复
			20	15	天然胰岛素通空气即降低活力

* 除用活力百分数表达的以外,胰岛素活力都用国际单位表示。

表 2 1960—1964 年国内外有关胰岛素拆合工作的报导

作 者	年 代	氧化后恢复活力百分比	提 纯 后 活 力	注 解
杜雨苍等 ^[7] (中国科学院生物化学研究所)	1959—1960	5—10%	80—100%	提纯并制得结晶,产物经过一系列分析
邹承鲁等 ^[11] (同上)	1961	5%		还原方法为钠-液氮系统
杜雨苍等 ^[8, 9] (同上)	1963—1964	30—50%	80—100%	硫磺键完全拆开,并经分离的材料,初步提纯后的 A、B 链单独经还原重氧化后有 1—2% 活力
Dixon & Wardlaw ^[10] (加拿大)	1960	1—2%		未抽提,无结晶
Wilson, Dixon & Wardlaw ^[12] (同上)	1962	0.5—5%		鱼胰岛素与牛胰岛素的 A 及 B 链,交叉氧化接合
Meienhofer & Brinkhof ^[13] (西德)	1963	4—7%		硫磺键未拆完全,单独 A 链在还原重氧化后有活力 1%,其氧化方法参照我国报导

然胰岛素拆合的关键问题,并在 1960 年初的全国生物化学学术会议上正式报告了天然胰岛素拆合可以恢复活力 5—10% 的结果^[7]。以后拆合条件几经改进,目前在最适合条件下拆合,活力可以达到天然结晶胰岛素活力的 50% 左右^[8,9]。在人工合成 A 及 B 链的接合中所应用的条件一般也是天然拆合中能恢复活力 20—25% 的条件。产物的抽提、结晶及分析的办法在人工合成产物的抽提、结晶及分析中基本上都得到了应用。国际上,与我们差不多同时, Dixon 等人也报导了通过类似途径拆合胰岛素成功,但活力恢复只有 1—2%,而且没有将产物提纯及结晶^[10]。这些结果总结于表 2。现在按工作内容分四个部分叙述于下:

(一) 天然胰岛素拆合的初步成功^[7](1960)

开始我们依国外报导,照一般拆合途径,先将天然胰岛素还原,以求重氧化恢复活力。但还原不完全,活力即使有微量恢复提高亦并不说明问题。而且还原拆开链间硫硫键而后分离 A 及 B 链的尝试一直不能成功。由于巯基比较活泼,要分离 A 及 B 链最好有稳定的中间形式,于是我们将天然胰岛素与亚硫酸钠及四硫酸钠共同保温使胰岛素拆开成硫-磺酸型 A 及 B 链(以下简称 A-SSO₃⁻ 及 B-SSO₃⁻)^[14,15]。此拆开产物经透析后用小白鼠惊厥法测定是完全失活的。在 pH 1.9 进行的纸电泳表明,拆开产物含有与原来胰岛素不相同的两个新物质,一个向正极,一个向负极(但比胰岛素移动得慢),前者对 Pauly 试剂呈粉红色,后者呈红黄色,分别与 Sanger 所得磺酸型 A 及 B 链的性质相似^[16]。从纸上显色可以看到已经没有未拆开的胰岛素残余。用 DNP 末端测定法证明向正极的点是 A-SSO₃⁻,向负极的点是 B-SSO₃⁻。拆开产物通过 Dowex 50-X2 阳离子交换树脂柱可以分离得高度纯化的 A-SSO₃⁻ 及 B-SSO₃⁻, A 链亦可经过纤维素板电泳纯化。高度纯化的 A-SSO₃⁻ 及 B-SSO₃⁻ 经还原重氧化后,活力测定表明,分别含有的 B 及 A 链都低于 0.5%。拆开产物在含豚溶液中用巯基乙酸-甲氧还原,还原后,用丙酮沉淀并洗涤还原产物,在 pH 8.5 水溶液中溶解,并于室温下放置,自动氧化。氧化后以小白鼠惊厥法测定胰岛