V. 结晶胰岛素的全合成

中国科学院生物化学研究所 中国科学院有机化学研究所 北京大学化学系

牛胰岛素的全合成工作是在天然胰岛素的两条链重组成功，并获得重合成的结晶胰岛素^[1]；以及人工合成的A及B链分别与天然胰岛素的B及A链组合成功，并分别获得半合成结晶胰岛素^[2,3]的基础上进行的。我们自1964年第一次获得具有生物活力的全合成产物以来，在工作中不断实践，不断总结，使全合成产物的生物活力逐步提高，抽提纯化的步骤也逐步得到改进。终于在1965年9月17日，获得了首批用人工方法合成的结晶牛胰岛素^[4]，实现了世界上人工合成

蛋白质的创举。

牛胰岛素全合成的具体步骤示于图1。人工合成的带保护基的廿一肽和三十肽衍生物分别进行钠-液氨处理后，用四硫酸钠、亚硫酸钠进行S-磺酸化，将经初步纯化后所得的廿一肽及三十肽的 $-\text{SSO}_3^-$ 衍生物按1.2:1.0的分子比混合，用当量巯基乙酸还原，然后在空气中氧化。所得氧化产物用Folin法测定浓度，用小白鼠惊厥法测定生物活力为天然胰岛素的1.2—2.5%。将此粗产物用酸性仲丁醇抽提两次，可使全合成产物的生物

图1 合成的A链与合成的B链组合的流程图

表1 全合成产物经二次抽提后产物及其结晶的活力

批号	全合成产物的初活力	抽提后的活力		天然胰岛素对照		活力	全合成结晶的活力		天然胰岛素对照		I.U./毫克
		剂量(微克)	反应	剂量(微克)	反应		剂量(微克)	反应	剂量(I.U.)	反应	
7—12	1—2.5%	1	7/15	0.5	5/15	70%	0.25	3/10	0.006	3/15	23 以上
		2	14/15	1	11/15		0.5	10/15	0.012	7/15	
13—27	1.2—2.5%	1	4/15	0.25	3/15	30%	0.44	7/24	0.01	6/24	20 以上
		2	12/15	0.5	10/15		0.88	16/24	0.02	20/24

图2 人工全合成的胰岛素结晶

图3 全合成产物的提纯步骤

* 柠檬酸缓冲液为1%柠檬酸0.13%乙酸铵16%丙酮的水溶液。

** 该结晶若需重结晶仍按上述步骤重复一次。

图4 全合成产物的结晶步骤

活力由原来的 1.2—2.5% 提高到 70% 左右。用这样的产物在含锌离子的柠檬酸缓冲液中进行结晶, 所得的结晶形状与天然牛胰岛素相同(图 2), 生物活力(表 1) 与天然牛胰岛素相等。这个实验的具体步骤如图 3 所示。将全合成的氧化产物(活力为天然胰岛素的 1.2—2.5%) 用 50% 乙酸调至 pH 5.0, 离心, 倾去清液, 将沉淀冰冻干燥。干粉用仲丁醇: 1% 乙酸(1:1) 在 20℃ 平衡的上相抽提, 所得的有机相再用该溶剂系统的下相抽提, 将水相冰冻干燥, 所得干粉再用上述方法进行第二次抽提。将第二次抽提的冻干产物溶于柠檬酸缓冲液中, 取出部分用小白鼠惊厥法测定活力, 活力为天然胰岛素的 70%。剩余部分按图 4 步骤进行结晶。将人工合成的胰岛素溶于含锌离子的柠檬酸缓冲液中, 用 3N 氨水调 pH 至 8.5, 离心除去少量不溶物, 再用 10% 柠檬酸调 pH 至 6.2, 离心除去少量无定形杂质。清液在冰箱中放置, 即获结晶, 用小白鼠惊厥法测定其生物活力为每毫克 23 国际单位以上。

我们曾先后重复上述试验四次, 每次都获得结晶。除了结晶形状、生物活力均与天然胰岛素一致以外, 我们还将人工合成的结晶牛胰岛素进行了兔血糖降低测定, 其效果亦与天然胰岛素相同(图 5)。人工合成的结晶产物的电泳及在两种溶剂中的层析行为均与天然胰岛素一致(图 6)。人工合成的胰岛素结晶经枯草杆菌蛋白酶降解, 其降解产物的电泳及层析双向图谱亦与天然结晶牛胰岛素经过同样处理所得的图谱相同(图 7), 而且含有硫硫键肽的位置亦完全吻合, 说明了人工合成的结晶牛胰岛素的壹级结构, 包括三个硫硫键的位置均与天然胰岛素相同。

另外, 我们还用人工合成的结晶牛胰岛

图 5 兔血糖降低试验

(1) 人工合成胰岛素(H); (2) 天然胰岛素(H);
(3) 天然胰岛素(L); (4) 人工合成胰岛素(L)

(H)——高剂量, 即体重 2.3 公斤的家兔注射 0.9 国际单位胰岛素; (L)——低剂量, 即体重 2.3 公斤的家兔注射 0.32 国际单位胰岛素

表 2 人工合成结晶产物经正常血清和抗血清作用后用小白鼠惊厥法测定所表现的胰岛素活力

样品 \ 注射量(微克)	2.0	1.0	0.5	0.25
人工合成结晶产物	5/5	5/5	4/5	—
人工合成结晶产物 + 豚鼠正常血清	5/5	3/5	1/5	—
人工合成结晶产物 + 豚鼠抗天然结晶牛胰岛素的血清	0/5	0/5	—	—
天然胰岛素	—	6/10	2/10	1/5

图 6 全合成结晶胰岛素的电泳和层析图谱(Pauly 显色)

(a) 电泳条件: pH 1.9 (甲酸:乙酸:4M 尿素=3:2:15);
20 毫安; 60 伏/厘米; 1½ 小时

(b) 层析系统: 仲丁醇:乙酸:水=50:1:49 (取上相)

(c) 层析系统: 甲乙酮:丙酸:水=15:5:6

(a)

(b)

图7 结晶胰岛素的酶解图谱
(茚三酮显色, 箭头所指
之点: 荧光素显影)
(a) 人工合成结晶胰岛素
(b) 天然结晶胰岛素
(c) 重组组合结晶胰岛素

滤纸: 新华1号, 20×15 cm
第一向电泳: 0.26M乙酸溶液
电压梯度 30 伏/厘米
电流 10 毫安
时间 1½ 小时

第二向层析:
正丁醇:吡啶:60%乙醇:水
5 : 1 : 1 : 1
层析时间 9 小时

(c)

素和天然的牛胰岛素对豚鼠抗天然牛胰岛素血清进行了琼脂双扩散试验，二者的沉淀条纹完全吻合（图 8）。人工合成的结晶牛胰岛素能为豚鼠的抗胰岛素血清所中和（表 2）。

此外，我们还曾用带有 C^{14} 标记的甘氨酸合成了 A 链，并用以与人工合成的 B 链组合，得到约 1% 胰岛素活力的产物。该产物

图 8 琼脂双扩散图谱

A_b = 豚鼠抗天然牛胰岛素血清

I_{N_1} = 天然结晶牛胰岛素，每孔~4 微克

I_{N_2} = 天然结晶牛胰岛素，每孔~2 微克

I_{S_1} = 人工合成结晶胰岛素，每孔<4 微克（未定量）

I_{S_2} = 人工合成结晶胰岛素，每孔<1 微克（未定量）

经过两次抽提，并用天然胰岛素稀释，进行结晶。经过多次重结晶后，其放射性与生物活力之比不变，电泳及层析行为亦与天然胰岛素相同。

为了澄清合成的 A 链及 B 链本身氧化后有无生物活力的问题，我们曾将合成的 A 及 B 链按前述的条件，分别单独地进行还原、氧化，氧化产物在 500 微克剂量下仍不能使小白鼠产生惊厥反应。

综上所述，我们所合成的结晶产物，其结晶形状与天然胰岛素相同；通过小白鼠惊厥及兔血糖降低测定其活力与天然胰岛素相等；更加上电泳行为、在两种溶剂系统下的层析行为、酶解图谱，以及免疫性能等性质均与天然胰岛素的完全一致。这充分证明了我们所合成的结晶产物就是结晶牛胰岛素，实现了世界上第一个蛋白质的人工合成。

参 考 文 献

- [1] 杜雨苍、张友尚、鲁子贤、邹承鲁，生物化学与生物物理学报，1，13（1961）。
- [2] 钮经义等，生物化学与生物物理学报，5，565（1965）。
- [3] 汪猷、邢其毅等，科学通报，[12]，1111（1965）。
- [4] 龚岳亭、杜雨苍、黄惟德、陈常庆、葛麟俊、胡世全、蒋荣庆、朱尚权、钮经义、徐杰诚、张伟君、陈玲玲、李鸿谿、汪猷、陆德培、季爱雪、李崇熙、施溥涛、叶蕴华、汤卡罗、邢其毅，科学通报，[11]，941（1965）；中国科学，14，1710（1965）。