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两个硫硫键打开, 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):

图 1 胰岛素拆合示意图

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)。

(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) 迴路延长接合路线

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 ^[5]	1927		16	12	通空气即降低活力
du Vigneaud 等 ^[4]	1931	谷胱甘肽 或半胱氨酸	0	0	不能恢复
Wintersteiner ^[6]	1933	半胱氨酸			还原 $\frac{1}{2}$ 即失活
Freudenberg & Münch ^[2]	1935	{	6	8	可以部分恢复
			5.2	4.6	不能恢复
White & Stern ^[3]	1937	{	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。

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

表2 1960—1964 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-液氨系统
杜雨苍等 ^[8,9] (同上)	1963—1964	30—50%	80—100%	硫硫键完全拆开,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%		硫硫键未拆完全,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

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%。拆开产物在含脲溶液中用巯基乙酸-甲氨还原,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素生物活力,简单结果如图 3。用兔血糖降低法也证实了这产物具有降低血糖的功能。这些结果初步说明了,从胰岛素 A 及 B 链可以通过硫硫键的氧化接合而恢复活力。

(二) 钠氨系统处理后胰岛素活力的恢复(1960 年结果)^[17]

由于人工合成的肽链将含有巯基保护基,因而在氧化接合之前都必须通过金属钠-

图 3 天然胰岛素拆合实验过程

A-SSO₃⁻、B-SSO₃⁻ 及 (A+B)-SSO₃⁻ 分别代表 S-磺酸型 A 链、B 链及其混合物;类似地, A-SH、B-SH 及 (A+B)-SH 分别代表还原型物质。水平向箭头代表分离或混合,例如,拆开产物可以先分离成 A-SSO₃⁻ 及 B-SSO₃⁻ 分别还原后再混合氧化,也可以先混合还原,再氧化,这样经过不同途径所得的最后氧化产物的活力是相近的,都在 5—10% 左右

液氨系统处理(以下简称为钠氨处理)。如此强烈的条件对氧化复活有无影响必须进行研究。实验方法基本上根据 du Vigneaud^[17]。我们初期也经历了一段失败过程,后来改进钠氨处理条件才获得了良好的结果。这些改进是:液体氨经过严格干燥处理;还原样品时控制每次加入金属钠粒的大小,不使钠过量太多;处理时间较短以及最后液氨的冰冻蒸发。实验结果表明,不管是天然胰岛素,其 $-SSO_3^-$ 型衍生物,还是苄基衍生物,经过钠氨处理并重氧化后,都能从无活力的还原产物部分恢复活力。活力恢复程度随着材料的预处理情况而有所高低。天然胰岛素及其拆开产物直接经钠氨还原并重氧化可以恢复活力5%或更多一些。而经柱分离的 $A-SSO_3^-$ 及 $B-SSO_3^-$ 以及大多数胰岛素苄基衍生物都只能恢复活力1—2%。经过两次钠氨处理的样品,复活程度较低一些,可能是由于钠氨处理对于胰岛素分子内部有某种破坏。纯化的 $B-SSO_3^-$ 通过钠氨处理并再通过硫磺酸化前后,进行电泳对比也指出某种破坏作用的存在。然而 $A-SSO_3^-$ 似乎并无此种现象。

(三) 还原重氧化条件的控制与改进

提高还原重氧化过程中活力物质的得率对人工合成胰岛素是相当重要的。1962—1964年间,我们对拆合过程中一系列条件进行了改进^[8,9]。

首先在胰岛素硫磺酸解时及还原过程中避免使用脲(原来包含8M脲),因为脲长时间处理会使胰岛素部分失活。用 Na_2SO_3 加对氯汞苯甲酸的办法可以测知,即使无脲存在时37℃处理90分钟,胰岛素的三个硫硫键也能完全被 Na_2SO_3 和 $Na_2S_4O_6$ 所拆开。拆开产物在pH 1.9进行电泳也可以看到只有 $A-SSO_3^-$ 及 $B-SSO_3^-$,而无天然胰岛素的存在。

利用 $A-SSO_3^-$ 与 $B-SSO_3^-$ 的等电性质,可以用pH 5沉淀法初步分离A及B链。 $B-SSO_3^-$ 经过pH 5反复洗涤及 $ASSO_3^-$ 经过板电泳纯化后,皆可达到单独还原重氧化后1,000微克不引起小白鼠惊厥反应。但是上述初步分离的A及B链经同样还原重氧化后,从产物的活力看来,分别含有B及A链1—2%左右。

还原过程中无脲的结果是使还原时间从10小时延长到18—20小时,但氧化后可恢复活力程度却从5—10%提高到20—25%。无脲还原是不匀相还原,初时估计还原程度不高是影响恢复活力的重要因素。于是改用过量30倍左右的巯基乙醇在100℃ pH 5还原 $-SSO_3^-$ 型A及B链,其还原程度在5分钟后已达70—80%,氧化后恢复活力达50%左右,再延长还原时间巯基呈现量没有增减,但重氧化后最终恢复的活力却迅速下降。采用更强烈的微碱性还原(pH 7—8)条件,蛋白被还原的程度可达90—100%,但可以恢复的活力只有20%左右。以不同比例A及B链的 $-SSO_3^-$ 型混合,进行还原重氧化的实验表明,A链过量(A:B=1.3:1)对活力恢复有利。分别观察A链和B链的还原及氧化速度表明,A链含硫功能团比B链的活泼,但B与A链同时存在时,B链可以受A链的影响而增加其被还原及氧化的速度。

由于过去还原时有脲存在,还原结束后必须用大量含酸丙酮使还原型A及B链沉淀,这一过程中蛋白质损失20—30%。现在无脲还原,就可以改用调pH到等电点的办法沉淀,结果在pH 3.8—4.0左右还原型A及B链几乎完全沉淀,蛋白的回收达90—95%左右,这就可以避免了由A-SH及B-SH损失比例不同而造成活力恢复的降低。同时也避免了丙酮本身对氧化复活及巯基测定中

的不良影响。

控制氧化条件对于提高活力的恢复程度甚为重要。我们看到酸性 pH 不利于氧化。随着溶液碱性的增强,活力恢复程度也相应提高。但 pH 超过 11 以上,活力就迅速下降。最适 pH 为 10.6。同时我们试验了几个温度范围,观察到 3—5℃ 氧化是在这个 pH 下氧化的最适温度。与所有单链蛋白的氧化复活的报导^[18-23]不同,胰岛素 A 及 B 链的重氧化,要求在较浓的条件(5 毫克/毫升)下进行。

(四) 氧化产物的提纯及鉴定

氧化产物的分配性质 在甲乙酮:丙酸:水(15:5:6)系统中进行纸层析,可以看到在相当于天然胰岛素的位置上有一明显的点子。在仲丁醇:1% 乙酸(1:1)系统中进行纸层析结果,还可以看到有活力的产物集中在与天然胰岛素相当的位置上。

抽提及纯化 将活力水平约为 5—10% 的氧化产物调至 pH 5,得到的沉淀冻干成粉,用 1% 乙酸-仲丁醇(1:1)平衡混合液的上相反复抽提 3—4 次,合并上相,再用下相倒抽提 3—4 次,此时活力物质转入下相,收集下相直接冰冻干燥。此冻干粉的胰岛素比活力(以每毫克干重计算)已经比抽提之前提高了 5—7 倍。针对人工合成的 A 链及 B 链通过还原氧化后的抽提中所遇到的问题,如果氧化产物起始活力只有天然胰岛素的 1—2% 左右,则此时虽经一次抽提,比活力已提高到 10% 左右,仍不能获得结晶,必须用上述系统再进行一次分配。收集第二次分配下相并冻干。经过这些抽提步骤,一般总共可以提高比活力 20—50 倍。举例如表 3。

工作初期(1960)所用的抽提方法中,抽提所得的上相需经调碱以促使活力物质进入

表 3 反复抽提的效果

材 料	蛋白量	胰岛素 比活力	回收率 %
混有大量杂质的人工 B 链 与天然 A 链的重氧化产物	56 毫克	~3%	100
经过二次抽提后的产物	1.31 毫克	70—80% (制得结晶)	~60

下相。由于有机溶剂影响 pH 测定,所以后来改用下相倒抽法。另外,用冻干下相的办法来浓缩抽提物,可以比原来吹空气除去仲丁醇的办法保留更多活力,而不被破坏(活力回收从 30% 提高到 60% 左右)。这是允许继续进行反复抽提的重要改进。

结晶 将经过抽提的重氧化产物溶于少量含醋酸锌及丙酮的柠檬酸水溶液中,使最后蛋白浓度为 1—2 毫克/毫升。离心除去不溶物质。先调 pH 到 8—9,后调 pH 到 6.1 左右,如果有无定形沉淀出现,立即迅速离心除去沉淀,清液在 0℃ 下结晶。由于经过几次离心和结晶等步骤,产物的比活力也能有一定程度的提高。天然拆合中重氧化产物恢复活力如果已经达到 20% 以上,就可以不经抽提而直接结晶。

结晶的分析结果如下:

1. 显微镜观察形状为正立方体,与天然胰岛素的结晶形状相同(图 4);

2. 活力分析:以小白鼠惊厥法测定与天然胰岛素活力接近。也有兔血糖降低的功能;

3. 层析:用三种系统,层析结果均与天然胰岛素相同;

4. 电泳:在 4M 脲素, pH 1.9 的缓冲系统中电泳,电泳行为亦与天然胰岛素相同;

5. 酶解图谱:用胃蛋白酶(或枯草枯菌蛋白酶)水解后进行电泳层析或双向层析的结果表明:它与天然胰岛素是基本相同的。

其中含硫硫键的肽段的位置与胰岛素对照中的含硫硫键的肽段位置亦相同。氧化初产物的酶解图谱就与此不同^[18]。

综上所述，我们可以肯定这些有活力的产物就是胰岛素。

分析过去国际上拆合不成功的报导，可以看到，他们所用氧化条件大多偏于酸性，酸性氧化是很慢的，因而这些作者不得不加入一些氧化剂，如过氧化氢或某些金属催化剂。我们的实验表明这些物质都不利于或甚至完全阻碍活力的恢复。1960年 Dixon 和 Wardlaw 发表其拆合工作时并未报导所采用的氧化条件^[10]。我们大部分有关拆合

图 4 从天然胰岛素A及B链重合成的胰岛素结晶

结合	异构体数	二 硫 键 接 连 方 式
A ₁	3
B ₁	1
A ₁ B ₁	12
A ₂	48
B ₂	2
A _n B _m	∞	

A, B 分别代表胰岛素之A及B链；下标为同系物中所含A或B链的个数。

图 5 二硫键接合的可能性

的条件,如A及B链的等电点、氧化、抽提及结晶等办法,都在人工合成工作中得到了应用与肯定。

Kauzmann 曾经计算过^[19],即使在含有一条A链和一条B链的12种 A_1B_1 异构物中(图5),形成胰岛素结构的可能性也在5%以下。必须指出,在理论上A与B链可以不仅以 A_1B_1 而是以 A_nB_m 各种方式结合,此处 n 及 m 可以是0或任何正整数。因此,可以说可能生成的产物几乎无法计算,这样形成正确的胰岛素结构的可能性也就极微。然而,我们的结果表明,胰岛素A及B链在适当条件下氧化可以恢复活力50%,这就指出了:在所有可能的结构中胰岛素是最稳定的结构的一种。

这一结果也成功地表明了蛋白质的高级空间构型主要是由蛋白质分子的壹级结构(即氨基酸顺序)所决定的。

参 考 文 献

- [1] Allen, R. S. & Murlin, J. R., *Proc. Soc. Expl Biol. Med.*, **22**, 492 (1925).
- [2] Freudenberg, K. & Münch, A., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **233**, 159 (1935); **263**, 1 (1940).
- [3] White, A. & Stern, K. G., *J. Biol. Chem.*, **119**, 215 (1937).
- [4] du Vigneaud, V., Fitch, A., Pekarek, E. & Lockwood, W. W., *ibid.*, **94**, 233 (1931).
- [5] Blatherwick, N. R., Bischoff, F., Maxwell, L. C., Berger, J. & Sahyun, M., *ibid.*, **72**, 57 (1927).
- [6] Wintersteiner, O., *ibid.*, **102**, 473 (1933).
- [7] 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).
- [8] 蒋荣庆、杜雨苍、邹承鲁, *生物化学与生物物理学报*, **3**, 176 (1963).
- [9] 杜雨苍、蒋荣庆、邹承鲁, *生物化学与生物物理学报*, **4**, 665 (1964).
- [10] Dixon, G. H. & Wardlaw, A. C., *Nature*, **188**, 721 (1960).
- [11] 邹承鲁、杜雨苍、许根俊, *生物化学与生物物理学报*, **1**, 76 (1961).
- [12] Wilson, S., Dixon, G. H. & Wardlaw, A. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **62**, 483 (1962).
- [13] Meienhofer, J. & Brinkhof, O., *Nature*, **199**, 1095 (1963).
- [14] Swan, J. M., *ibid.*, **180**, 643 (1957).
- [15] Bailey, J. L. & Cole, R. D., *J. Biol. Chem.*, **234**, 1733 (1959).
- [16] Sanger, F., *Biochem. J.*, **44**, 126 (1949).
- [17] Gordon, S. & du Vigneaud, V., *Proc. Soc. Expl Biol. Med.*, **84**, 723 (1953).
- [18] 杜雨苍、张友尚、鲁子贤、许根俊、邹承鲁, *上海市科学技术论文选集*, II8—II22, 上海科学技术出版社, 1960.
- [19] Kauzmann, W., Relative Probabilities of Isomers in Cysteine-containing Randomly Coiled Polypeptides. In Bensech, R. *et al.*, *Sulfur in Proteins*, Academic Press, London, pp. 93—108, 1959.