結晶胰島素的全合成^{*}

I. 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。

人工合成胰岛素的成功，是人类在认识生命、揭开生命奥秘的伟大历程中又迈进了一大步，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、热火朝天的大跃进形势，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(貳级结构)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，究竟有没有可能合成胰岛素，还是一个未知数，有许多困难需要克服：首先，必须解决的是将胰岛素分子中的三个硫硫键拆开以后，有没有再重合成胰岛素的可能。国

^{*} 《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。报告的第二和第四部分的详细论文已先后在《中国科学》上发表。报告的第三及第五部分的简报也已在本刊中文版及《中国科学》上发表，第五部分的详细论文即将在《中国科学》上发表。

图1 胰岛素的化学结构

外学者在过去三十多年中曾经将还原拆开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。这一问题能否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,即使硫键的拆合问题解决,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,而人工合成胰岛素,起码要能合成廿一肽及卅肽,远远超过当时最高水平。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,尚不能自给;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,而且也说明了只要把氨基酸排得对头,在适当的条件下会自然形成螺旋及卷曲,也就是说,蛋白质的壹级结构在很

大程度上可以决定高级结构。这一点，国内外在许多单链的蛋白质的硫硫键的拆合方面也同时或随后得到证实。

多肽合成方面，一开始我们还会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，再和氨基端九肽缩合得到廿一肽，现在改用羧基不加保护的门冬酰胺，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。

对于一种具有生物活力的天然有机化合物的合成来说，最重要的指标首先应当是产物的活力水平必须与天然的相等。因此，当合成出的产物只具有很低的天然产物活力，又不能做到使活力提高接近天然产物的水平，这只能说是合成出具有某些生物活力的物质，不能说是已经合成成功。对于合

成某种蛋白质来说，除了要确定其壹级结构以外，还有目前所知甚少的空间构型上的要求。因此，除了要具备相同的生物活力以外，是不是得到结晶，结晶形状是否和天然产物相同，是判断算不算人工合成了这种蛋白质的重要指标。

我们不论从人工合成的A链与天然B链或人工合成的B链与天然A链所进行的半合成，以及从人工合成的A链与人工合成的B链所进行的全合成，都能得到活力与天然胰岛素相当、结晶形状相同的结晶产物。根据合成路线和分析数据，全合成产物的结晶及其活力、电泳、层析、酶解图谱及免疫化学行为等指标以及天然拆合与半合成的结晶产

物的种种分析数据，都充分说明了我们所获得的全合成产物的结晶就是结晶牛胰岛素，是世界上第一个人工合成的蛋白质。

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。