

长效胰岛素研究*

—— 2Å 分辨率 Arg-B31 人胰岛素晶体结构测定

任 斌 王大成** 常文瑞 张 英

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

R. Obermeier

(Pharma Forschung Biochemie, Hoechst AG, 6230 Frankfurt am Main 80, FRG)

摘 要

本文运用 X 射线分析技术, 在 2 Å 分辨率测定了 Arg-B31- 人胰岛素 (ABHI) 四聚晶型的晶体结构, 最后的晶体学 R 因子为 0.189, 模型的平均键长偏差为 0.018 Å. 精化后的结构模型显示, ABHI 分子 B 链羧端构象比天然分子更加稳定, 在二聚体内, 分子 I 的 Arg-B31 与分子 II 的 Glu-B21 之间形成一对新的侧链间离子键, 从而在 ABHI 六聚体表面增加了三对由相邻分子间形成的次级键. ABHI 是一种长效胰岛素, 上述结构特征揭示了其长效性的主要结构基础: 由于 Arg-B31 的引入使 ABHI 六聚体增加了三对离子键, 从而使其解聚成单体的速率减慢, 在体内形成一个持续供应“库”. 由此, 作用时效得以延长, 产生长效特征. 这一实验结果证实了作者关于“增加次级键, 稳化寡聚体”以产生长效胰岛素的分子设计原理的正确性, 以及通过模型拟合和能量优化对 ABHI 主要结构特征的预测.

关键词 长效胰岛素、胰岛素修饰物、Arg-B31- 人胰岛素、晶体结构

目前广泛应用的长效胰岛素大多是通过引入外源蛋白质和有机化合物, 或改变 Zn^{2+} - 胰岛素颗粒的物理状态和大小来产生长效效应^[1], 其长效作用的基本原理一般认为是改变了胰岛素在生理 pH 的溶解度, 从而使其在皮下注射后吸收减慢. 由于这是一类非均一的复杂化合物, 因此很难研究其精确的分子机理, 这使得这类制剂的开发大多需要大量搜索而经历较长的时间. 事实上, 获得第一个有实用价值的长效胰岛素 (鱼精蛋白胰岛素) 用了近 15 年时间. 由于这类制剂含有外源化合物, 可产生免疫反应、过敏反应、毒性等^[2-5], 在实际应用中有

1991-11-07 收稿, 1992-09-01 收修改稿.

* 国家“863”高技术基金和 UNIDO 基金资助课题.

** 联系人.

明显的缺点. 为了改善这种状况, 目前正通过蛋白质工程途径寻求性能更加优良的新型长效胰岛素制剂. 这类制剂的主要特点是, 其长效性主要通过分子内在因素制导产生, 而无须外源化合物. 为进行有效的分子设计, 高效率地获得目标产品, 了解这类新型制剂的构效关系, 查明其长效作用的结构机理, 显然具有重要意义. 测定这类长效制剂的晶体结构, 是研究这一问题的最直接途径. 目前, 关于这类新型长效制剂的设计和制备已有一系列报道^{[6-8][1]}, 但对这类改性胰岛素的晶体结构尚未见报道. 本文将报道一种长效胰岛素的 2 Å 分辨率结构测定, 并在此基础上讨论长效性的结构基础.

Arg-B31 人胰岛素(以下简称 ABHI)是一种半合成的胰岛素类似物^[9], 其血糖降低曲线非常类似于 NPH-胰岛素, 是一种由于 B31 位残基修饰而产生的长效胰岛素. 测定 ABHI 的晶体结构, 主要目的就是了解其长效效应的精确的结构基础.

以工程化制备为目标, 早在 1987 年我们曾对这类新型长效胰岛素进行分子设计, 其中心思想是: 增加胰岛素寡聚体内分子间的次级键, 以在皮下注射后减缓聚合体解聚成单体的速度, 从而产生长效效应¹⁾. 阐明长效胰岛素 ABHI 的三维结构, 将提供确切的实验观察来验证上述基本原理的正确性. 其结果对胰岛素分子的定向改造研究, 将具有指导意义.

1 材 料 与 方 法

1.1 结晶

Arg-B31 人胰岛素(ABHI)是以猪胰岛素为起点经由半合成方法制备的^[9], 其等电点 $pI=6.5$, 比天然胰岛素稍高. 以血液中葡萄糖含量为指标进行的测试表明, ABHI 表现出比常规作用延长 8 h 的降低葡萄糖效应, 并且有完全的生物活力, 可以作为一种被肌体缓慢吸收的长效胰岛素库.

用于结晶实验的是纯化的 ABHI 样品, 来自德国的 Obermeier (Hoechst 生化药物实验室). 晶体生长采用微量过饱和静置法, 在与天然猪胰岛素类似的晶体生长体系, 可获得 ABHI 的三方四锌和三方二锌两种晶型^[10].

用于结构测定的是 ABHI 三方四锌晶体. ABHI 的三方四锌晶体是在含柠檬酸、醋酸锌、氯化钠、丙酮的结晶母液中培养的, 用于 X 射线衍射分析的晶体在结晶母液中放置约半年, 最大线度可达 1 mm. 这种晶型的晶体生长情况稳定, 晶核可以控制, 因而能获得大晶体, 不过其晶体生长条件比之于天然胰岛素有较大变化^[10]. 晶胞的不对称单位中含 2 个分子, 在 Rigaku 四圆衍射仪上测得的晶胞参数为 $a_H=b_H=80.80 \text{ Å}$, $c_H=37.63 \text{ Å}$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$. ABHI 晶体的晶胞参数与三方四锌人胰岛素晶体^[11]相近, 表明两者基本为同晶型.

1.2 衍射数据收集

晶体的衍射数据是在室温条件(20°C)下运用 Rigaku 四圆衍射仪(日本理学电机)收集的. X 射线采用单色化的 $\text{CuK}\alpha$ 辐射, 数据采集运用 $\omega/2\theta$ 扫描技术. 在数据收集过程中, 选取 3 个分布在不同壳层的参考点, 每小时测定一次, 作为晶体衰减的监测点并用于衰减校正, 每颗晶体的衰减均控制在 15% 以下. 数据收集共用 5 颗晶体完成, 在 100—2 Å 范围内, 按三方晶系 H 格子方式收集了 3 个独立区(半球)的衍射数据 16212 个. 强度数据经 L_p 因子校正; 衰减校正采用插入法, 其效果对高分辨率数据较为明显. 在 R_H 格子的半球衍射空

1) 王大成等, 胰岛素蛋白质工程研究, “863”研究课题论证书, 1987.

间中包含3个以三重对称相关的独立区,我们收集了这一范围的全部衍射点强度数据,然后进行等效点平均,以此方法进行近似的吸收校正,并提高强度数据的精确度。

衍射数据的平均、求比例、合并是用 Steigemann 编写的 PROTEIN 程序系统^[12]完成的,最后在 $d \geq 2$ Å 范围内,从 16212 个观察点中获得 4946 个 $F_o(H) \geq 2\sigma(F_o(H))$ 的独立衍射点,相当于理论上应有点数的 79.8%。合并后的一致性因子 $R_{\text{merge}} = 9.08\%$ ($R_{\text{merge}} = \sum(I(i) - \langle I \rangle) / \sum I(i)$, 式中 $I(i)$ 为单个重复测量点的强度值, $\langle I \rangle$ 为这些重复测量点强度平均值)。

1.3 结构解析

由于 ABHI 晶体与人胰岛素三方四锌晶体基本同晶,所以 ABHI 结构的初始位相运用同晶差值 Fourier 法获得。初始模型采用 1.9 Å 分辨率人胰岛素三方四锌晶体结构^[11],去除不对称单位中2个分子的残基 B1-B3 和 B28-B30。用经初步精化后的初始模型提供的计算相位(α_c)和振幅(F_c)与 ABHI 的观测数据(F_o)相匹配,计算以($F_o - F_c$)为系数的差值 Fourier 图,并配合以($2F_o - F_c$)为系数的电子密度图,在图象显示系统 PS390(Evans & Sutherland)上用 FRODO^[13]程序进行模型重建,确定待测定残基的构象。然后用能量极小化制约的最小二乘修正技术(EREF^[14])对重建后的模型进行晶体学修正,再以精化后的坐标计算新一轮的($F_o - F_c$)图和($2F_o - F_c$)图,在图象显示系统上进行更完善和精确的模型重建,上述模型重建和晶体学修正过程交替反复进行,直到修正过程收敛,获得完善而准确的 ABHI 结构模型。

整个结构解析过程分为 3 Å 和 2 Å 两个阶段,在前一阶段主要确定 ABHI 分子的结构,在后一阶段加入一定量的水分子,并适当进行了 B 因子修正,以使结构更加精确。

1.4 结构比较

ABHI 结构与天然人胰岛素结构的比较运用以最小二乘为基础的模型拟合法,用 ROTMOL 程序实现。

2 结 果

2.1 模型建造和晶体学修正

首先在 3 Å 分辨率进行了 3 次模型重建,在 PS390 图象显示系统上逐步加入 ABHI 两个独立分子的残基 B1-B3, B28-B30 和 B31。在($F_o - F_c$)和($2F_o - F_c$)图上,除分子 II 的残基 B1-Phe 外,其余残基与电子密度的配合均良好。在这一阶段总共进行了 50 轮 EREF 晶体学修正和 2 轮分主、侧链平均 B 的修正,晶体学 R 因子最后达到 0.156,模型平均键长偏差为 0.020 Å(表 1)。在这一基础上,将分辨率提高到 2 Å。进行了更广泛的模型精化工作。一方面对照更精确的($2F_o - F_c$)图对模型局部区域进行了适当的调整,同时进行了 53 轮 EREF 晶体学修正,并对 B 因子分主、侧链平均值进行了 4 轮修正,按原子进行了 3 轮修正。与此同时,参照($F_o - F_c$)图,分步加了共 86 个水分子。最后,在 2 Å 分辨率,晶体学 R 因子达到 0.189,模型键长的平均偏差为 0.018 Å,键角平均偏差为 3.576°,总势能为 -213.54 kcal/mol。这一过程的结果,概列于表 1。

在差值电子密度图上,两个独立分子的 Arg-B31 和 Thr-B30 都有清楚的表现,可以确定其所有原子的位置。图版 I-1 和图版 I-2 示出了残基 Arg-B31 在两个独立分子中的差值电子密度图。在最后的($2F_o - F_c$)图上,分子 II 的 Phe-B1 仍只有弥散的电子密度,不能确定其肯定的构象,表明它可能是柔性的。其余残基,包括 B 链 C 端 B29-B31,都能与电子密度有良好的配

表 1 ABHI 模型重建和晶体学修正过程

步骤	R 值	分辨率 (Å)	原子数	能量 (kcal/mol)	平均键长 偏差(Å)	备注
0	0.271	3.0	712	2.4×10	0.121	初始模型: 4Zn 人胰岛素, 去除 B1-B3, B28-B30
1	0.214	3.0	712	-96.13	0.021	9 轮 EREF 修正
2	0.232	3.0	810	123.08	0.026	加入 B1-B3 和 B28-B30, 11 轮 EREF 修正
3	0.181	3.0	821	10.45	0.021	加入分子 II B31, 细调各残基, 16 轮 EREF 修正
4	0.156	3.0	832	9.76	0.020	加入分子 I B31, 14 轮 EREF 修正; 2 轮平均 B 修正
5	0.242	2.0	832	-27.33	0.019	12 轮 EREF 修正
6	0.208	2.0	886	-88.70	0.020	加入 54 个水分子, 2 轮平均 B 修正, 1 轮分原子 B 修正, 20 轮 EREF 修正
7	0.189	2.0	918	-213.54	0.018	加入 32 个水分子, 2 轮平均 B 和 2 轮分原子 B 修正, 21 轮 EREF 修正

合, 图版 I-3 和图版 I-4 示出了两个独立分子这段区域的电子密度图截面。

2.2 ABHI 单体和 B 链羧端构象

ABHI 单体分子的总体构象与天然 4Zn 胰岛素相似, 为 T3/R3 型结构, 即 B 链螺旋对分子 I 是 B9-B19, 对分子 II 是 B1-B19。A 链和 B 链的螺旋区段都保持得很好, 与天然胰岛素的结构比较表明其主链的平均偏差仅有 0.35 Å。但是, B 链 C 端 B28-B31 的构象与天然结构比较有明显差异, 分子 I 的 B27-B30 和 B28-B31 肽链连续形成 2 段 4 → 1 氢键连接的非标准回折结构, 这对这段末端肽链结构的稳定和 Arg-B31 残基的特定构象看来有重要作用。分子 II 的 B29-B31 也明显偏离天然构象, 伸出在六聚体表面, 有较灵活构象。在整个分子中, 构象不肯定残基是分子 II 的 Phe-B1, 到修正结束仍无良好的电子密度表现。在 4Zn 人胰岛素 1.9 Å 分辨率的结构报道中^[12], 分子 II 的 Phe-B1 Val-B2, Thr-B30 不能确定, Glu-B21 和 Lys-B29 有双构象; 同时, 分子 I 的 B30 主链有两个位置, Lys-B29 侧链有双构象。在 ABHI 结构中, 分子 I 的 B30 主侧链位置都很确定, Lys-B29 侧链也只表现出单一构象; 分子 II 的 B30 残基位置能很好确定, 对 B21 和 B29 侧链没有发现双构象。这些情况表明, ABHI 分子似乎比天然分子更“结实”, 这是与引入 Arg-B31 后在分子间形成了新的次级作用相关的。

ABHI 中 B 链羧端及其附近的立体化学状况是最令人感兴趣的。在这里最引人注目的结构特征是, 分子 I C 末端残基 Arg-B31 的侧链胍基与相邻分子 II 残基 Glu-B21 的侧链羧基取向相对(图版 I-5,6)。其末端原子 $\text{NEH}_1\text{-OE}_2$ 和 $\text{NEH}_2\text{-OE}_1$ 间距离分别为 3.01 Å 和 2.63 Å。ABHI 的晶体生长 pH 为 6.0 左右, 因此在现有结构中 Glu 和 Arg 侧链都应处于解离状态, 其相互间形成的化学作用应是离子键。此外, 在天然结构中, B 链羧端具有比较灵活的构象, 是一段伸展的肽段, 常常难于定位。而在 ABHI 结构中, B27-B31 形成回折结构, 同时残基 Arg-31 的侧链与环境中相邻分子构成离子键, 使这部分肽段有较稳定的构象。在分子 I 中, 从 B27 到 B31 主链构象形成两个回折, 如图版 II-1 所示。在现有模型中, B27 主链 C=O 与 B30 主链 N—H 之间相距 2.79 Å, 形成 4 → 1 氢键, C_{27}^{α} 与 C_{30}^{α} 相距 5.94 Å。从图版 II-1 还可看到, B27 C=O 的氧原子与 B30 位侧链的 O—H 间也处于氢键距离之内(相距 2.75 Å), 可能也有氢键,

这种作用有利于回折的稳定. 在B28之后, 肽链接着又发生了一个转折, 在B28 C=O 与B31 NH间形成4→1氢键(距离2.87 Å), C₂₈与C₃₁相距6.01 Å. 上述两个回折结构, 促使B链羧端的肽链构象比较紧密和稳定.

分子II B链羧端肽段构象也很确定(参见图版I-4), 但与分子I相应肽段有明显差异, 主链构象更加舒张. 从B27到B31有一个大的转折, 其间HOG1-B27与C=O-B30之间距离2.89 Å, 有氢键形成(图版II-2). 在这里, Arg-B31的侧链伸向六聚体表面, 与相邻六聚体的分子II Gln-A5的侧链间有氢键形成(图版II-2). 在分子II B链羧端周围有较多的结合水, 形成一个类似的网络结构, 将分子II的B29, B30, B31以及分子I的A21, B22, 通过水分子以氢键联系起来. 这对于分子II B链羧端构象的稳定是有利的.

表2 ABHI分子中末端残基的温度因子

残基	原子	B因子(Å ²)		备注
		Mol. I	Mol. II	
Thr-B30	N	14.4	39.5	分子中所有原子的 平均温度因子为20.95
	CA	26.0	32.5	
	C	16.8	36.5	
	O	25.3	32.2	
	CB	23.4	35.8	
	OG1	28.7	36.9	
	OG2	25.7	39.5	
Arg-B31	N	28.6	33.4	
	CA	36.6	39.2	
	C	43.0	36.0	
	O	31.5	33.6	
	CB	29.7	35.6	
	CG	15.8	35.9	
	CD	35.6	35.6	
	NE	27.8	38.4	
	CZ	6.6	42.6	
	NEH1	17.3	39.0	
	NEH2	18.4	42.6	

在修正后的结构模型中, ABHI分子B27-B31主链原子的平均温度因子对分子I和分子II分别为29.3和33.8. 表2列出了2个分子末端残基B30和B31全部原子的温度因子. 对分子I, 这2个残基主、侧链的平均温度因子分别为24.3和26.4, 接近全部结构所有原子的平均温度因子值(20.9). 从表2所列这些情况表明, 分子I末端残基的构象是合理而稳定的, 同时也进一步显示, Arg-B31与相邻分子Glu-B21形成的盐键具有重要作用.

2.3 ABHI二聚体和六聚体

ABHI晶体的不对称单位中仍然包含着一个二聚体. 与天然胰岛素比较, ABHI二聚体的组织方式基本相同, B链羧端逆平行折叠层间的4对氢键和结合面上疏水残基的作用都保持得很好. 对于ABHI二聚体, 其特征之处在于, 分子I的Arg-B31与分子II的Glu-B21之间形成了一对新的离子键(图版II-3). 这附加的次级键将使ABHI二聚体比天然结构更加稳定, 在相同条件下的解离速率减慢. 这是ABHI结构的重要特征.

ABHI 六聚体以三方四锌结构方式堆积, 分子 I His-B10 以常规的三重对称方式与 Zn^{2+} 配位; 分子 II 的 His-B10 有 2 个构象位置, 分别与三重轴上和三重轴外两个锌离子位置配位, 同时 His-B5 也参与轴外 Zn 的配位, 在最后的 $(2F_o - F_c)$ 图上, 分子 II His-B10 轴向构象的电子密度较非轴向构象明显地弱, 显示出这两种构象中可能以非轴向构象占优势. 这与 Dodson 等报道的 4Zn 人胰岛素结构中情况相反^[11], 与李密等在研究 4Zn 牛胰岛素结构时的观察相同^[15].

与天然胰岛素相较, ABHI 六聚体结构的一个重要特征是, 由于 Arg-B31 的引入, 在其表面增加了 3 对由相邻分子 Arg-B31 与 Glu-B21 间形成的次级键, 如图版 II-4 所示, 它们像 3 把“锁”一样, 显然会使 ABHI 六聚体结构稳定性增加. 这 3 对次级键的形成虽对 ABHI 分子在晶胞中的堆积无明显影响, 但无疑对其寡聚体的解离聚合行为有重要影响. 由于聚合体内次级作用的增加, 聚合体的解离必然减慢, 这应该是 ABHI 长效效应的重要结构基础.

2.4 与天然胰岛素结构的比较

以三方四锌人胰岛素为天然结构, 通过模型拟合 (ROTMOL) 与 ABHI 结构比较的结果概

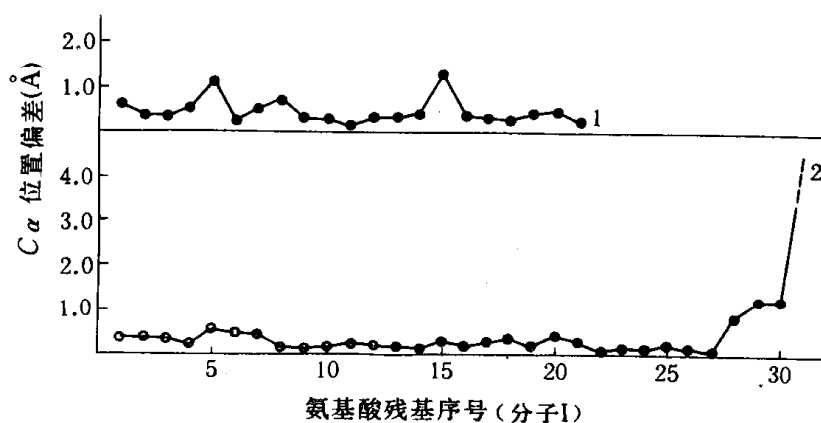


图1 ABHI 与天然胰岛素分子 I $C\alpha$ 位置最佳叠合的偏差
1——A 链, 2——B 链

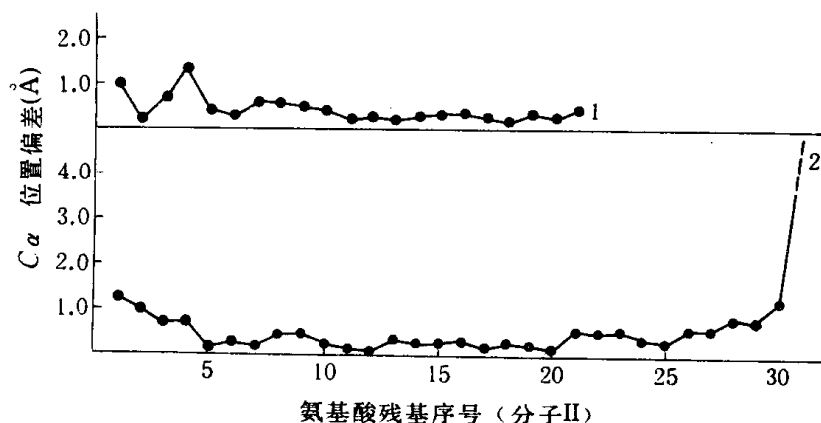


图2 ABHI 与天然胰岛素分子 II $C\alpha$ 位置最佳叠合的偏差
1——A 链, 2——B 链

示于图1和2中. 总的说来, 这两种分子的结构偏差不大. 包括主侧链在内的全部分子(ABHI的残基B31除外)的平均偏差, 对分子I为0.56 Å, 对分子II为0.67 Å. 若仅对其中3段螺旋(A2-A7, A12-A17, B9-B19)进行比较, 则分子I的平均偏差为0.34 Å, 分子II的平均偏差为0.38 Å. 对整个分子而言, 结构差异明显的区段是B27-B31, 主链最大偏差可达2.8 Å. 表3列出了B29-B30所有原子的偏离情况. 这表明, 在B链C端加入Arg-B31对邻近区域残基的构象产生了一定影响, 使这段肽链有所位移, 其详细情况已在前面述及(见2.2节). 显然ABHI保持了天然人胰岛素分子的基本结构, 但残基Arg-B31的加入对B链羧端的构象有明显影响.

表3 ABHI与天然胰岛素的B28-B30原子位置偏差

残基	原子	叠合偏差(Å)	
		Mol. I	Mol. II
Pro-B28	N	1.44	0.87
	CA	0.84	0.84
	C	1.12	0.69
	O	1.29	0.62
	CB	0.99	0.92
	CG	0.20	0.69
	CD	0.20	0.49
Lys-B29	N	1.09	0.70
	CA	1.21	0.77
	C	1.53	0.69
	O	2.85	1.35
	CB	1.25	1.45
	CG	0.78	1.59
	CD	0.83	0.97
	CE	1.24	1.03
Thr-B30	NZ	0.69	1.44
	N	0.59	0.70
	CA	1.23	1.20
	C	1.92	1.77
	O	1.49	3.64
	CB	1.44	3.76
	OG1	1.10	3.53
	OG2	2.89	2.70

3 讨 论

蛋白质工程提供了制备新型长效胰岛素的途径, 在这类长效制剂中没有外源因素, 主要由适当的残基修饰产生长效性. 了解这类分子内制导因素产生的长效作用的结构机理, 是研究这类工程化胰岛素的重要基础性问题之一. Arg-B31人胰岛素(ABHI)正是这类新型长效胰岛素的一种, 其三维结构的阐明清楚地揭示出其长效作用的主要结构基础. 从前述ABHI的主要结构特征可以知道, 与天然人胰岛素结构比较, ABHI结构的主要差异在于, 由于Arg-B31的引入, 使二聚体内增加了一对由Arg-B31(I)与Glu-B21(II)形成的单体间离子键, 在六聚体增

加了 3 对这样的次级键。根据 Fersht 研究, tRNA-氨酰化酶中次级键作用所获结果^[16], 这将使 ABHI 二聚体的结合常数提高约 10^3 倍, 从而使 ABHI 六聚体解聚成单体的速率减慢, 时间过程延长。已经知道, 胰岛素在正常人血液中的浓度为 1.7×10^{-11} — 5.2×10^{-10} mol/L, 在生理浓度下单体与二聚体的摩尔浓度比为 $8 \times 10^5 : 1$ ^[17]。因此, 尽管胰岛素的解离聚合行为很复杂, 它在体内应是以单体形式发挥生物功能的。ABHI 与一般胰岛素制剂一样, 主要以含 Zn^{2+} 的六聚体形式存在于中性溶液中。显然, 将 ABHI 制剂皮下注射进入体内后, 必须经过六聚体→二聚体→单体的解聚过程。根据上述分析, 这一过程比天然胰岛素明显缓慢, 从而在体内形成一个 ABHI“库”, 延长 ABHI 的作用时效, 产生长效作用。显然, 这应该是 ABHI 长效效应的主要结构基础。

为了有目的地获得这类以分子内因素制导的新型长效胰岛素, 我们曾在 1987 年进行分子设计和模型构建研究¹⁾。当时年遵循的基本原理是, 在胰岛素六聚体的分子之间引入新的次级键相互作用, 以适当增加聚合体的稳定性, 减缓其解聚过程, 从而形成能维持供应胰岛素单体的“库”, 产生长效效应。在这一基本思想指导下, 以精确三维结构为基础, 我们提出了 B2-Arg/Lys 和 B31-Arg/Lys 分子改造方案, 并通过模型拟合和构象预测在本结构测定之前预言, Arg-B31 与相邻分子的 Glu-B21 之间可有盐键或氢键形成^[10]。随后, 通过化学半合成制备了 Lys-B2 和 Lys-B31 胰岛素, 确实表现出长效效应^{[18]2)}, 并从 Hoechst 药物生化实验室获得了 Arg-B31 人胰岛素样品。那么, 这种长效效应的结构基础是否确为分子间次级键的增加? 在 ABHI 中, Arg-B31 是否确与相邻分子的 Glu-B21 形成盐键或氢键? 这是需要进一步深入了解的问题。ABHI 三维结构的阐明以实验结果为基础明确回答了上述问题: ABHI 长效作用的主要结构基础是二聚体内分子间次级键的增加, 在分子 I Arg-B31 与分子 II Glu-B21 之间的确形成一对离子键。至少在这一情况下理论预测与实验研究结果是相当一致的。它给我们以下几点有益的启示: 1) 通过增加分子间次级键以稳化寡聚体, 可作为一个指导原则用于搜寻新的长效胰岛素分子改造方案; 2) 在一定条件下, 以精确三维结构为基础的合理分子设计的可信度是高的; 3) 在有限范围内, 通过能量优化进行的构象预测的准确性是好的。当然, 这里的研究结果并不排斥胰岛素的长效性还有其它可能的结构机理, 我们已经获得至少两种其它长效胰岛素的晶体和衍射数据, 它们的结构解析将在这方面提供新的更丰富的信息。

致谢 北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家实验室提供 PS390 图象显示设备和使用经费资助, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Brange, J., *Galenics of Insulin*, Springer-Verlag, Berlin, 1987, 29—40.
- [2] Kurtz, A. B. et al., *Diabetologia*, 1983, 25: 322—324.
- [3] Nordstrom, L. et al., *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 1987, 22: 195—201.
- [4] Weiler, J. M. et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1985, 75: 297—303.
- [5] Horrow, J. C. et al., *Anesth. Analg.*, 1985, 64: 348—361.

1) 见 264 页脚注。

2) 许文清, 中国科学院生物物理研究所学位论文, 1988.

- [6] Markussen J. *et al.*, *Protein Engineering*, 1987, 1: 205—213.
- [7] Markussen J. *et al.*, *Protein Engineering*, 1987, 1: 215—223.
- [8] Markussen J. *et al.*, *Protein Engineering*, 1988, 2: 157—166.
- [9] Obermeier R. *et al.*, *Ger. Offen.*, DE3333640, 1986.
- [10] 万柱礼等, 科学通报, 1990, 35(1): 63—65.
- [11] Smith, G. D. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81: 7093—7097.
- [12] Steigemann, W., *Ph. D Thesis*, TU Muenchen, 1974.
- [13] Jones, A., *J. Appl. Crystallogr.*, 1978, 11: 268—272.
- [14] Jack, A., Levitt, M., *Acta Crystallogr.* 1978, A34: 931—935.
- [15] 李 密等, 中国科学, B 辑, 1989, (9): 940—947.
- [16] Fersht, A. R. *et al.*, *Nature*, 1980, 286: 822—825.
- [17] Pekar, A. H., Frank, B. H., *Biochemistry*, 1972, 11: 4013—4016.
- [18] Cui Da-fu *et al.*, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 1992, 24: 160—164.