



纪念创刊60周年

第一个在体外合成的蛋白质 ——结晶胰岛素全合成的个人追忆

张友尚

(中国科学院上海生命科学研究院, 生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

结晶牛胰岛素的全合成于1958年开始, 到1965年完成. 这项艰巨工作是中国科学院生物化学研究所、有机化学研究所和北京大学化学系合作完成的. 参与这项工作的确切人数很难统计, 因为很多工作人员没有在发表的文章中署名, 其中包括中国科学院生物化学研究所的王应睐所长和曹天钦副所长. 我只参与了这个项目的启动和天然猪胰岛素的重合成, 因此我的追忆只限于我经历过的和我知道的一些事. 1957年, 我考到中国科学院生物化学研究所随导师曹天钦先生研究肌肉蛋白. 1958年, 大跃进的浪潮席卷了全国, 科学院也不例外. 生化所的研究人员分组讨论如何多快好省地发展科学. 在大跃进的影响下, 集中优势兵力研究一些重大的课题被认为是发展科学的最好途径. 在实验室合成一个蛋白质就是这样一个重大课题, 它是生化所的高研人员讨论时提出的. 至于究竟是什么人提出的, 在时隔51年后的今天已被人淡忘. 在我的印象中, 提出的人可能是沈昭文先生, 他是所内最年长的高研人员. 我记得在讨论休息的时候, 我在走廊里遇到他. 他告诉我他们高研组提出了蛋白质的合成, 而且他还说明是化学合成, 不是生物合成. 这个重大课题很快就被中国科学院批准了. 当时合成的对象只能是胰岛素, 因为它是Fred Sanger等人在1955年唯一测出化学结构的蛋白质. 为了启动这个课题, 生化所进行了重组. 研究蛋白质化学、酶学和代谢的科研人员中断了原来的工作, 进入了这个全新的领域. 多肽合成组由钮经义先生任组长, 他原来的专长是氨基酸测序. 当时最长的合成多肽是由13个氨基酸组成的促黑激素, 而胰岛素是含有51个氨基酸和3个二硫键的蛋白质. 在胰岛素合成中如何保证3个二硫键的正确配对



图1 中国科学院生物化学研究所胰岛素人工合成研究人员合影
1959年国庆, 于研究所大楼前

是一个没有解决的难题，于是成立了以邹承鲁先生为组长的拆合小组，它的任务是将天然猪胰岛素的二硫键拆开，再接上后得到重合成的猪胰岛素。为保证二硫键的正确配对，理想的途径是将3个二硫键一个一个还原成巯基，并用不同的基团保护，然后去除保护基将释放的巯基氧化成二硫键。但是这个途径遇到了失败，因为没有办法只打开一个二硫键而不影响其他两个。在一次次失

败后，年轻的实习研究员杜雨苍在 1959 年获得了突破性的进展。他勇敢地将 3 个二硫键同时打开，将胰岛素拆成 A 链和 B 链，然后再将巯基同时连接成二硫键。结果发现重合成产物出现 5%~10% 的胰岛素活力，也就是说有 5%~10% 的重合成产物具有和天然胰岛素一样的二硫键配对。如果二硫键的配对是随机的，正确配对的比例要低得多。显然在 A、B 链之间存在有利于正确配对的相互作用。下一个难题就是如何将重合成胰岛素和 90%~95% 的杂质分离，这也是我所面临的挑战。现在要纯化蛋白质有各种有效的仪器，如高压液相层析仪、快速蛋白层析仪等。但是那时只有离子交换层析，用它可以分离 A、B 链，但分离重合成胰岛素中的大量杂质就无能为力了。经过许多努力后，我终于实验成功一种仲丁醇萃取的方法。这个方法很简单，也不需要高级的逆流分溶仪，但是纯化的效果很好。实验步骤是将重合成粗产物的丙酮粉用混合溶剂(50 mL 水、50 mL 仲丁醇、0.1 mL 醋酸)的上相萃取。重合成胰岛素被优先萃取到上相中，加水并调 pH 至 8~9，将重合成胰岛素转移到水溶液中，再对适于胰岛素结晶的溶液透析。12 h 后，在光学显微镜下惊喜地发现了重合成胰岛素的闪亮晶体，形状和天然猪胰岛素的菱形六面体完全相同。在结晶过程中，杂质在母液中被去除，重合成胰岛素结晶的生物活力已接近天然猪胰岛素。天然猪胰岛素重合成的成功为胰岛素的合成铺设了道路，那就是分别合成 A 链和 B 链，再将它们连接成胰岛素。重合成胰岛素能形成结晶也解除了我们原有的顾虑，那就是我们在实验室合成的胰岛素会不会是没有生物活力的变性蛋白质。在我们研究胰岛素拆合的同时，对核糖核酸酶类似研究也在美国 Anfinsen 的实验室进行。1961 年，Anfinsen 等人报告将还原的核糖核酸酶氧化可以重新产生天然的二、三级结构。以此为根据，Anfinsen 提出蛋白质的氨基酸顺序决定蛋白质的天然结构。我们对胰岛素的研究涉及两条链的结合，难度比核糖核酸酶的研究更高。重合成胰岛素和天然胰岛素的结晶形状和活力相同也明确说明了同样的原理。令人遗憾的是在我们 1961 年发表的论文里没有提出这个原理^[1]。

天然猪胰岛素的重合成及粗产物的纯化结晶在 1959 年已经完成。随后, A 链和 B 链的多肽合成就按下述的分工积极开展起来。生化所负责 B 链的合成以及 A, B 链的结合, 有机所和北大化学系负责 A 链的合成。当时固相多肽合成尚未问世, 液相多肽合成的最高水平是 13 肽。在溶液中用片段缩合法合成

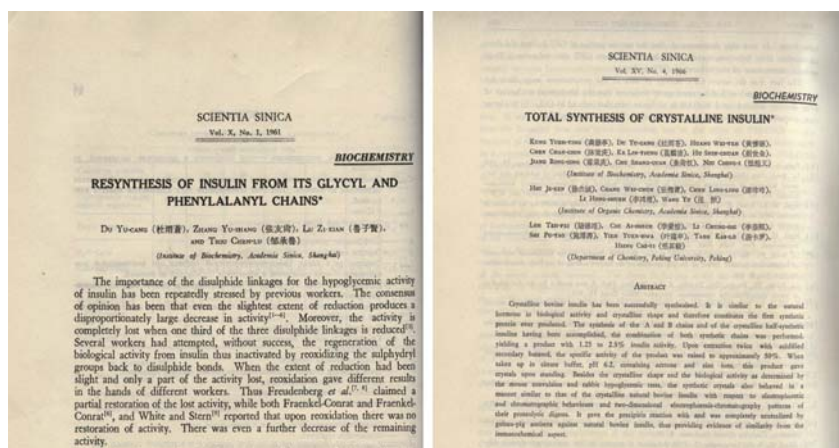


图2 发表在1961年 *Scientia Sinica* 上天然胰岛素重合成的文章与发表在1966年 *Scientia Sinica* 上人工合成结晶胰岛素的文章

A, B 链不仅工作量大, 而且在 A, B 链的合理分段和缩合方法及保护基的选择上需要精心设计. 同时所有的中间产物需要纯化, 合成的 A, B 链的质量要通过和相应的天然链进行半合成来检验. 最后用合成的 A, B 链全合成胰岛素以后还要提纯结晶, 并对其性质和生物活力进行全面的鉴定. 当结晶牛胰岛素全合成的论文在 1966 年的《中国科学》发表以后^[2], 国际科学界感到十分惊讶, 因为人们很难想象这样重要的工作是如何在科学还不很先进的中国完成的.



图3 1978年12月13日, 胰岛素全合成总评会成员合影
就座的为中国科学院学部委员, 站立的为有关研究人员

最后, 我想对结晶胰岛素人工全合成工作进行简短的评论. 首先这项工作是 3 个单位通力合作完成的, 当时的实验条件十分简陋, 许多试剂和氨基酸都是自己制备的. 所以能够成功, 关键在于集体的团队精神. 每个人的聪明才智在团队中得到了充分地发挥. 在科学上, 人工全合成的结晶牛胰岛素是第一个在生物体外合成的蛋白质, 它开启了蛋白质合成的时代, 从开始的化学合成到后来生物合成或是二者相结合的合成. 从那时起, 许多重要的多肽和蛋白质在实验室被合成并在实际中应用, 同时合成蛋白质也是现在“合成生物学”新概念的起源. 为表彰这项工作在科学上的深远影响, 人工全合成牛胰岛素获得了 1982 年国家自然科学一等奖.

参考文献

- 1 Du Y C, Chang Y S, Lu Z X, et al. Resynthesis of insulin from its glycyl- and phenylalanyl chains. *Sci Sin*, 1961, 10: 84—104
- 2 Kong Y T, Du Y C, Huang W T, et al. Total synthesis of crystalline bovine insulin. *Sci Sin*, 1966, 15: 544—561