

結晶牛胰島素的全合成

龔嶽亭 杜雨蒼 黃惟德 陳常庆 葛麟俊
胡世全 蔣榮庆 朱尙权 鈕經义

(中国科学院生物化学研究所)

徐杰誠 张伟君 陈玲玲 李鴻緒 汪猷

(中国科学院有机化学研究所)

陆德培 季爱雪 李崇熙 施溥涛 叶蘊华
湯卡罗 邢其毅

(北京大学化学系)

在这篇简报中,我们将初步报告由于我们三个单位五年以来的通力协作最近获得有关全合成结晶牛胰胰岛素的研究成果。胰岛素的壹级结构是在十年前由 Sanger 等搞清楚的^[1]。

近两年来有关胰岛素合成方面,已有不少报导。Katsoyannis 等^[2,3]报导了羊胰岛素 A 及 B 链的合成,并按 Dixon 和 Wardlaw 的重组方法^[4],将所合成的 A 及 B 链进行组合,只能观察到微弱的胰岛素活力。Zahn、Meienhofer 等^[5,6]从他们所合成的羊胰岛素的 A 及 B 链衍生物经钠氨处理脱去保护基团后,直接氧化得到具有 0.5—1.0% 胰岛素活力的产物。后来,他们又指出人工合成的或天然 A 链本身也能表现出 0.4% 的胰岛素活力^[7]。

中国科学院生物化学研究所在从天然胰

胰岛素的拆合方面所取得的进展,并从组合的产物中经过提纯得到胰岛素的结晶^[8,9],提供了先行合成 A 及 B 链便可以合成胰岛素的重要线索。在最近三年中,我们三个单位已经分别合成了 A 及 B 链中一系列的肽段^[10-14],积累了许多经验,并在今年年中分别用人工合成的牛胰岛素的 A 及 B 链与天然的 B 及 A 链进行氧化组合,并将组合产物分离提纯,都得到半合成的牛胰岛素的结晶产物^[15,16]。

牛胰岛素 A 链及 B 链的 S-磺酸衍生物的人工合成的主要路线总结于图 1 及图 2。合成中的主要关键可以归纳为以下三点:(1) 大肽合成中选氮化物法的广泛应用,往往用分离出的保护肽的固体选氮物与侧链保护的自由肽进行缩合;(2) 在应用钠—液氨于最后一步脱除许多保护基团时采用了非常温

和的条件; (3) 找到了用以初步提纯还原型的人工合成 A 链的 pH3.8 沉淀及提纯人工合成 B 链的 S-磺酸衍生物的 pH5.1 沉淀的方法。由于这些改进, 我们可以较方便地得到纸电泳基本上均一的 A 及 B 链 S-磺酸衍生物的产物, 它们的产率, 从用以分别合成保护二十一肽及保护三十肽的原料, 即自由十二肽及自由二十二肽的用量算起, 均可达到 20—30%。人工合成的 B 链 S-磺酸衍生物进一步用离子交换柱层析提纯后, 其氨基酸定量组成, 末端分析及在酸性与碱性两种介质中的电泳行为均与天然 B 链 S-磺酸衍生物的相同。人工合成的 A 链 S-磺酸衍生物经纸电泳与纸层析的结合使用, 也能分离出与天然 A 链 S-磺酸衍生物相当的产物。

人工合成的 A 及 B 链的组合均按半合成胰岛素中所描述的方法进行^[15,16]。所进行的

几批组合样品的初活力数据均列于表 1。

利用胰岛素在仲丁醇—醋酸水溶液的平衡系统的两相中分配的特性, 我们将人工合成的氧化产物的冻干粉先用上相抽提, 抽出液再用下相抽提, 如是所得抽提液一般可以提高比活力 10—50 倍(表 2)。将抽出液的冻干粉溶于含有锌离子的丙酮—柠檬酸缓冲液中并用离心方法除去在 pH8.5 及 6.2 的不溶部分, 在 pH6.2 时放置冰箱过夜, 便可得到结晶的人工合成的蛋白质(图 3)。经小白鼠惊厥法测定, 这种结晶产物所具有的胰岛素活力, 每毫克在 20 国际单位以上(表 2)。

详文即将发表。

本工作承中国科学院生物化学研究所王应睐、邹承鲁和曹天钦等教授的支持和指导; 陈远聪、汪克臻、刘永福、姚月珍、王思清、方继康、林南琴、邱秀娣、徐求根、朱蝶燕和庄熙孟等同志参加技术工作, 特此一并致谢。

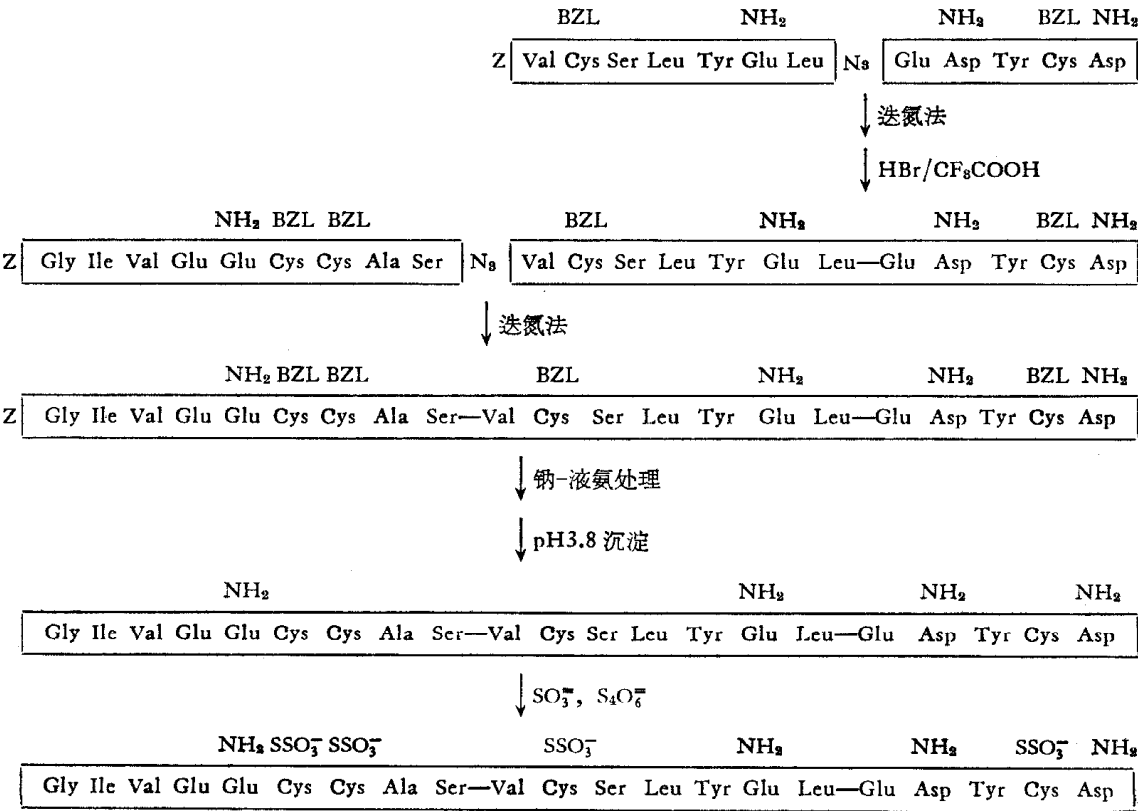


图 1 牛胰岛素 A 链 S-SO₃⁻ 的合成

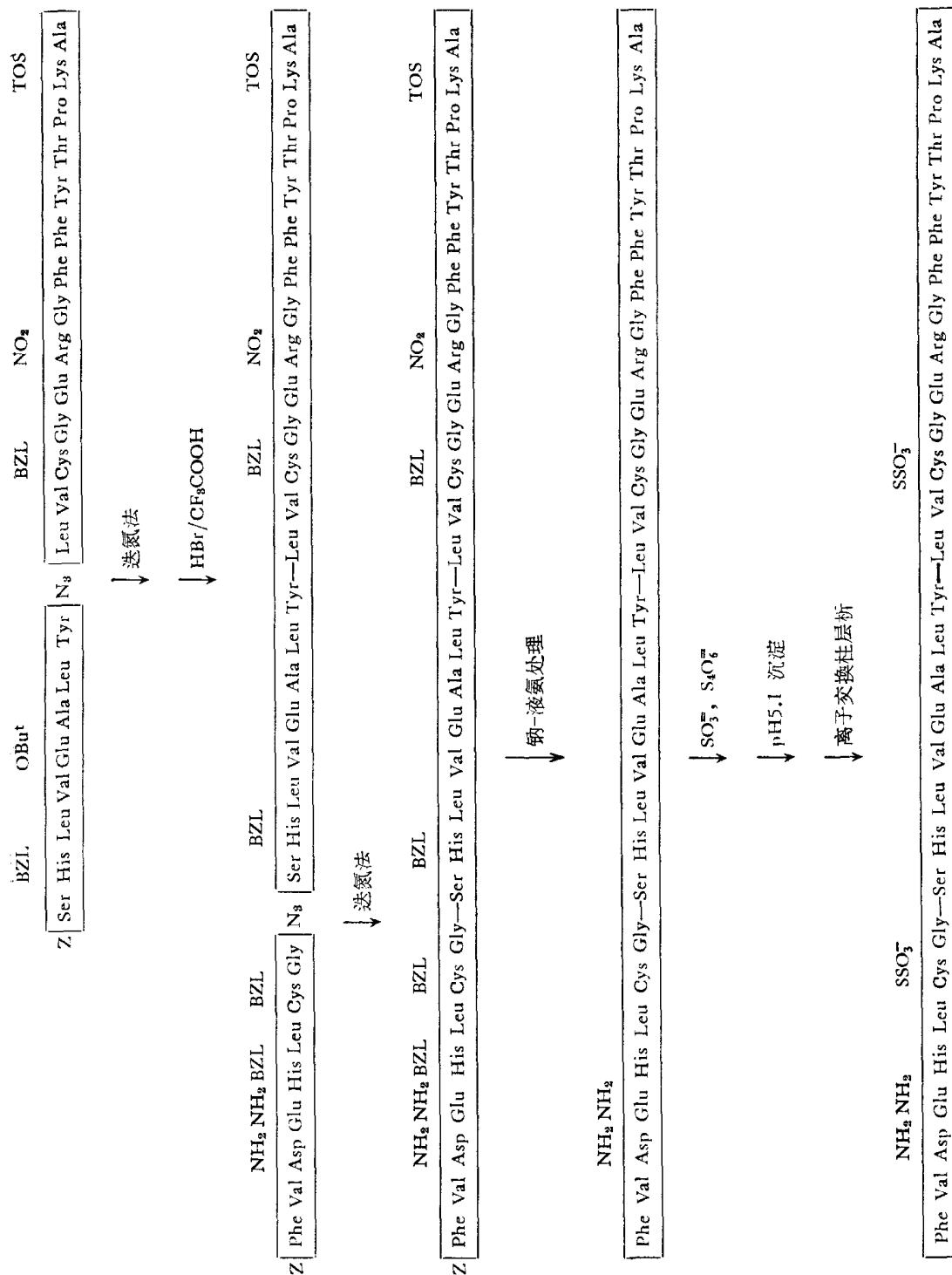


图2 胰岛素B链 S-SO₃⁻ 的合成

表1 人工合成的A及B链组合产物用小白鼠惊厥法测定所表现的胰岛素活力

批号	合 成 样 品					天然牛胰岛素 ^(d)	
	合成 A-SSO ₃ ^(a) (毫克)	合成 B-SSO ₃ ^(b) (毫克)	氧化组合产物 ^(c) (毫克)	注 射 量 (微克)	惊 厥 反 应 (小白鼠)	注 射 量 (微克)	惊 厥 反 应 (小白鼠)
1	2.4	2.0	2.4	40 20	2/5 1/5	1 0.5 0.25	4/5 3/5 1/5
2	6.5	5.9	8.8	40 20	3/5 0/5	1 0.5 0.25	5/5 2/5 0/5
3	6.5	5.9	8.0	40 20	4/5 2/5		
4	5.2	5.0	7.5	40 20	3/5 1/5	1 0.5	7/10 3/10
5	5.2	5.0	7.4	40 20	10/10 5/10		
6	5.2	5.0	6.3	40 20	10/10 2/10		
7	6.4	5.2	7.8	40 20	3/5 1/5	1 0.5 0.25	5/5 2/5 1/5
8	6.1	4.8	8.4	40 20	3/5 2/5	1 0.5 0.25	3/5 1/5 0/5
9	6.1	4.8	8.0	40 20	2/5 1/5		
10	7.7	4.3	10.6	40 20	4/5 2/5	1 0.5 0.25	5/5 7/15 3/15
11	7.7	4.3	10.6	40 20	3/5 0/5		
12	7.7	4.3	7.8	40 20	5/5 3/5		
13	7.7	4.3	8.8	40 20	5/5 2/5		
14	7.7	4.3	8.2	40 20	3/5 0/5		
15	7.7	4.3	10.6	40 20	3/5 1/5		
16	7.0	5.0	7.8	40 20	2/5 4/5	1 0.5 0.25	5/5 4/5 3/5
17	7.0	5.0	7.8	40 20	5/5 3/5		
18	7.0	5.0	8.8	40 20	3/5 2/5		
19	7.0	5.0	8.0	40 20	3/5 0/5		
20	7.0	5.0	8.4	40 20	5/5 1/5		
21	7.0	5.0	8.0	40 20	5/5 2/5		

(a) 用 110 毫克的人工合成的带有保护基团的牛胰岛素的 A 链二十一肽衍生物^[10] 分六批经钠液氨处理^[9]。处理后经冻干并合并的样品溶于水、酸化至 pH3.8 并用 2×6 毫升的 pH3.8 醋酸缓冲液洗涤。洗涤的样品进行 S-磺酸化后透析并冻干。得率约 30 毫克。

(b) 用 110 毫克的人工合成的带有保护基团的牛胰岛素的 B 链三十肽衍生物^[10] 用同样方法脱除保护基团后，干粉直接进行 S-磺酸化。S-磺酸化产物调 pH 至 9.0，离心除去不溶部分，清液用 50% 醋酸调 pH 至 5.1，可得 27 毫克的人

参 考 文 献

- [1] Ryle A. P., Sanger F., Smith L. F. & Kitai R., *Biochem. J.*, **60**, 54 (1955).
- [2] Katsoyannis P. G., Tometsko A. & Fukuda K., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2863 (1963).
- [3] Katsoyannis P. G., Fukuda K., Tometsko A., Suzuki K., & Tilak M., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 930 (1964).
- [4] Dixon G. H. & Wardlaw A. C., *Nature*, **188**, 72 (1960).
- [5] Meienhofer J., Schnabel E., Brenner H., Brinkhoff O., Zabel R., Snoka W., Klostermeyer H., Brendenberg D., Akuda T. und Zahn H., *Z. Naturforsch.*, **18b**, 1120 (1963).
- [6] Zahn H., Brinkhoff O., Meienhofer J., Pfeiffer E. F., Ditschuneit H. und Gloxhuber Ch., *Z. Naturforsch.*, **20b**, 666 (1965).
- [7] Volfin P., Chambant A. M., Ebone-Bonis D., Clauser A., Brinkhoff O., Brenner H., Meienhofer J. & Zahn H., *Nature*, **203** (4943), 408 (1964).
- [8] 杜雨苍、张友尚、鲁子贤、邹承鲁, 中国科学, **10**, 84 (1961)。
- [9] 杜雨苍、蒋荣庆、邹承鲁, 中国科学, **14**, 230 (1965)。
- [10] 汪猷等, 化学学报, **29**, 114 (1963); **29**, 190 (1963); **30**, 49 (1964); **30**, 237 (1964)。
- [11] 李崇熙、陆德培、张明哲、伍少兰、邢其毅, 化学学报, **29**, 133 (1963)。
- [12] 汪猷、徐杰诚、张伟君、陈玲玲、邢其毅、季爱雪、陆德培、李崇熙、施博涛、叶蕴华, 中国科学, **13**, 2030 (1964)。
- [13] 龚嶽亭等, 中国科学, **12**, 1321 (1963); **13**, 1245 (1964)。
- [14] 钮经义、龚嶽亭、黄惟德、葛麟俊、陈常庆、陈远聪、杜雨苍、蒋荣庆、邹承鲁、胡世全、朱尚权、汪克臻, 中国科学, **13**, 1343 (1964)。
- [15] 汪猷、邢其毅等, 中国科学, 即将发表。
- [16] 钮经义、龚嶽亭、黄惟德、葛麟俊、陈常庆、陈远聪、杜雨苍、蒋荣庆、邹承鲁、胡世全、朱尚权、汪克臻, 科学通报, 1965 第 8 期, 722 页; 中国科学, **14**, 1386 (1965)。

图 3 人工合成牛胰岛素结晶

表 2 经过两次抽提及结晶的产物的胰岛素活力

批号	纯化方法	合 成 产 物		天然胰岛素 (对照)	
		注射量 (微克)	小白鼠惊厥反应	注射量 (国际单位)	小白鼠惊厥反应
M128	经过两次抽提的样品 ^(a)	4	5/5	0.024	11/15
		2	14/15	0.012	5/15
		1	7/15		
M134	经过两次抽提的样品 ^(b)	2	12/15	0.012	10/15
		1	4/15	0.006	3/15
M128 _c	从 M128 得到的结晶 ^(c)	1	5/5	0.024	5/5
		0.5	10/15	0.012	7/15
		0.25	3/10	0.006	3/15
M134 _c	从 M134 得到的结晶 ^(d)	0.88	16/24	0.02	20/24
		0.44	7/24	0.01	6/24

(a) 表 1 中批号 1—6 的氧化产物归并后用醋酸调 pH 至 5.1, 沉淀离心并冻干。干粉于匀浆器中用 4×5 毫升的仲丁醇:1% 醋酸系统的上相抽提。合并抽提液再用 4×1.5 毫升该系统的下相抽提。抽提液冻干。干粉再重复用上、下相抽提及冻干一次。干粉溶解后适当稀释进行活力测定。

(b) 表 1 中批号 7—21 的氧化产物归并后依 (a) 法处理。

(c) 从 (a) 所得的干粉 (400 微克, Folin 法测定) 溶于 0.4 毫升的结晶液 (100 毫升水溶液中含丙酮 16 毫升、醋酸铵 0.13 克、柠檬酸 1 克) 中, 用 3N NH₄OH 调 pH 至 8.5, 离心。清液用 10% 柠檬酸调 pH 至 6.2, 离心除去无定形物质, 放置冰箱过夜, 收集所析出的结晶。

(d) 从 (b) 所得的干粉 1080 微克溶于 0.6 毫升结晶液中按 (c) 所描述的方法进行结晶, 并重结晶一次。

工合成的 B-链 S-磺酸衍生物。

(c) 取每份含有约 5—7 毫克 (Folin 法测定浓度, 以天然 A 链 S-磺酸衍生物作为标准) 的人工合成的 A-SSO₃⁻ 溶于 1 毫升水中加入含有 4—5 毫克 (Folin 法测定, 天然 B-SSO₃⁻ 作为标准) 的人工合成的 B-SSO₃⁻ 于 1 毫升 pH5.0 的醋酸缓冲液的悬浮液及 0.5 毫升 N 巯基乙酸。于密闭的 10 毫升离心管中在氮气下于 20℃ 进行还原 18 小时。反应物调 pH 至 3.8 使 SH 型的 A 及 B 链全部析出, 离心, 用无氧水及 pH3.8 醋酸缓冲液洗涤以除去过量巯基乙酸。沉淀悬浮于 1.8 毫升无氧水, 用 2N NaOH 调 pH 至 10.6, 并加入 0.2 毫升 pH10.6 的甘氨酸钠缓冲液, 于 3—5℃ 进行氧化 20—24 小时。氧化产物经 Folin 方法测定蛋白质浓度 (以天然胰岛素作标准) 后, 用生理食盐水稀释, 进行小白鼠惊厥试验。

(d) 商品结晶胰岛素, 比活力为 23.7 国际单位/毫克。