



纪念创刊 60 周年

胰岛素晶体结构研究 40 年回眸

王大成

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

顾孝诚

(北京大学生命科学院, 北京 100871)

“Standards There as High as Achieved Elsewhere”: 《中国科学》传递给世界的信息

40 年前, 在中国处于一个十分特殊和艰难社会环境的历史时期中, 《中国科学》在 1972 年^[1,2], 1973 年^[3], 1974 年^[4]连续发表研究论文, 报道我国科学工作者在分辨率 4, 2.5 和 1.8 Å 分辨率测定猪胰岛素三方二锌晶体结构的研究成果, 在当时我国的科学和文化处于极端封闭的情况下, 向世界传递了中国科学研究的少有信息, 在国内外产生重要影响.

在当时, 我国测定的胰岛素晶体结构是亚洲第一个蛋白质晶体结构, 国际上少数蛋白质晶体结构之一, 并成为我国结构生物学的发端. 国际知名晶体学家、诺贝尔奖获得者 Dorothy Hodgkin 在得知这一信息并亲临北京胰岛素结构研究组进行深度访问和考察后, 于 1972 年 8 月在第 9 届国际晶体学大会上做大会专题报告介绍我国的胰岛素结构研究, 题目是“Standards There as High as Achieved Elsewhere”, 并随后在 *Nature* 上发表专栏述评, 高度评价我国这项研究及所获得的成果. 日本著名晶体学家渡边得之助来函对该项成果表示钦佩, 要求翻译 2.5 埃分辨率的研究论文(中文版)成日文在日本刊印. 当时在这一领域世界知名的实验室的负责人也都先后来北京胰岛素结构研究组进行交流访问.

我国胰岛素晶体结构的特殊研究历程及其所取得的成功, 通过《中国科学》的报道, 反映了中国科学工作者的执着与坚韧, 集体的智慧与才智. 在纪念《中国科学》创刊 60 周年之际, 简要回顾这一段研究历程, 重温其中蕴含的精神和体验, 应该是一件有意义的事情. 由于手边可以查考的文字资料有限, 虽为亲历亲为者亦不免错漏, 笔者不揣冒昧撰写此文, 谨表对《中国科学》创刊 60 周年的贺忱, 以及对参加猪胰岛素三方二锌晶体结构研究的全体成员的历史致意.

不畏艰难, 开拓进取, 确立课题

20 世纪中叶已经清楚认识, 生命活动的主要物质基础是以核酸和蛋白质为主体的生物大分子. DNA 作为基因的载体负责有机体的世代遗传, 蛋白质承担有机体几乎所有的当代生命活动. 与 DNA 以核苷酸序列为密码语言控制遗传不同, 蛋白质以其特定的三维结构(空间结构). 作为行使功能的必要条件, 它以“肢体语言”表现生命活动. 因此, 深入研究重要生命活动的机理, 最终都需要相关蛋白质的三维结构知识.

1965 年, 我国科学工作者通过化学途经在实验室合成了具有充分生物活力的结晶胰岛素, 在世界上首次完成了一类蛋白质的人工合成, 在国内外产生重要影响^[5]为了进一步拓展在这一科学方向上的成就, 深入研究胰岛素的结构与功能关系, 并建立我国的蛋白质三维结构研究基础, 1966 年初, 北京大学和中

国科学院一群以青年专家为主体的科学工作者提出了“测定胰岛素晶体结构”的研究课题, 并得到当时国家科学技术委员会的首肯. 但很快由于“文化大革命”兴起, 国内政治形势急剧变化, 文化、教育、科研和社会生产受到严重冲击, 该项课题停顿下来. 在严峻的形势下, 有关研究人员坚持既定的科学目标, 经过相当时间的多方努力, 争取到有关方面的支持, 在 1969 年 1 月组建了一个胰岛素晶体结构研究协作组, 集体挂靠在中国科学院物理研究所, 当时称为“691 连队”, 后正式定名为“北京胰岛素结构研究组”. 参加这个协作组的主要单位有中国科学院物理研究所、生物物理研究所、上海生物化学研究所和北京大学化学系、生物系. 先后参加过部分工作的还有中国科学院计算技术研究所、上海有机化学研究所和华东物质结构研究所. 这个多学科的综合研究群体, 奠定了有效开展这一边缘性交叉学科领域研究课题的坚实基础.

在立题当时, 这项课题面临一系列严重困难. 20 世纪 50 年代末期英国剑桥的 John C. Kendrew 和 Max F. Perutz 相继运用 X-射线衍射分析测定肌红蛋白(1958 年)和血红蛋白(1960 年)晶体结构, 开辟了蛋白质三维结构研究的新时期, 并因此获得 1962 年的诺贝尔奖. 当时结构解析所用的“多对同晶置换法”对专业知识和技术设施都有很高的要求, 是一般实验室难以具备的. 运用这一方法要求培养足够尺度的蛋白质晶体, 制备多种与母体同晶的重原子衍生物, 准确记录和测量成千上万晶体衍射波的自动化衍射物理仪器, 以及通过“数字透镜”(傅立叶变换)大量计算成像的大型计算机. 这使得蛋白质晶体结构测定成为当时的科学难题. 事实上, 当时只有英、美发达国家中的少数实验室能开展这方面的研究, 到 20 世纪 60 年代末期, 国际上也只有少数几个蛋白质的晶体结构测定获得成功. 而我们在当时处于一个完全封闭和落后的环境中, 没有衍射仪, 没有计算机, 对整个复杂的过程缺乏经验, 不具备现成的条件开展这一课题的研究, 而且有人认为这应该是 10 年后考虑的研究课题. 在这种情况下, 研究组没有动摇, 没有退缩, 而是把这一研究看作是对一个科学前沿的攻坚, 把这些困难当作必须应对的挑战. 自 1969 年确立研究课题以来, 全体参加人员在明确重要科学目标的激励下, 矢志以赴, 克服了各种物质条件的困难和社会政治环境的干扰, 直到取得最后成功. 在这一过程中所表现出来的一批青年科学工作者对重要科学目标的追求, 不畏艰难开拓进取的精神, 是值得记忆和发扬的.

群策群力, 艰苦奋斗, 攻坚难题

面对当时的各项研究难题, 这个研究群体以各学科专业人员的密切合作, 集体智慧, 勤奋踏实, 不拘私利的精神和行动, 逐一攻克.

建立有利合作和群策群力的组织结构 这个研究群体前后数十人参加, 也有一定流动性, 但核心力量是稳定的, 在此基础建立的组织结构有利于群策群力和个人智慧的发挥. 当时按照专业领域和工作性质将全体人员分成 4 个大组: 结晶与衍生物制备, 衍射相位解析, 结构分析与模型构建, 仪器技术与衍射数据收集与分析. 每个大组按分工有自己的专题组, 不定期经常性讨论各自的专业问题, 各大组间一周开一次综合交流会, 讨论解决相互关联的问题和总体安排. 对出现困难的关键问题即时组织“攻关组”, 由于没有“权威”, 讨论能真正做到畅所欲言, 常有激烈的争论, 最后民主决策. 由此形成了一个既能发挥个人的积极性和创造性, 又有利于群策群力形成集体智慧的工作机制, 对在缺乏经验的情况下, 解决各项研究难题发挥了重要作用.

结晶与重原子衍生物制备 这是运用“同晶置换法”解析结构的基础. 在借鉴国际上对胰岛素研究已有经验的基础, 生物物理研究所与上海生物化学研究所有关研究人员密切合作, 在较短的时间里就取得了成功. 在前期工作中曾对胰岛素多种晶系的晶体作过研究, 鉴于三方二锌猪胰岛素晶体具有易长大、

稳定、适于制备重原子衍生物的优点, 选定它作为结构测定对象. 研究用的猪胰岛素制剂全部是由上海生物化学制药厂和北京大学制药厂提供. 当时没有结晶所需要的恒温恒湿环境, 就将结晶实验室放在实验楼的地下室, 并特制水泥台存放结晶制剂, 以保证稳定的环境条件. 对于重原子衍生物制备, 曾较系统地探索通过化学反应引进重原子的方法, 但未获成功. 随后应用重原子试剂浸泡已长大的晶体(浸泡法), 先后尝试过数十种重原子试剂, 获得十几个重原子衍生物, 最后用于结构解析的只有 3 个. 第一个是直接引进铅离子的衍生物(铅-胰岛素); 第二个是通过汞试剂浸泡得到的汞(I)-胰岛素衍生物, 其分辨率比母体还高, 重原子信号强, 是质量最好的一个衍生物, 在结构测定中起了主要作用; 第三个是同时引进铅和汞的衍生物(汞(II)-铅-胰岛素). 这三个优质重原子衍生物先后被成功地用于分辨率 4, 2.5 和 1.8 Å 胰岛素晶体结构的解析, 保证了获得高质量的电子密度图.

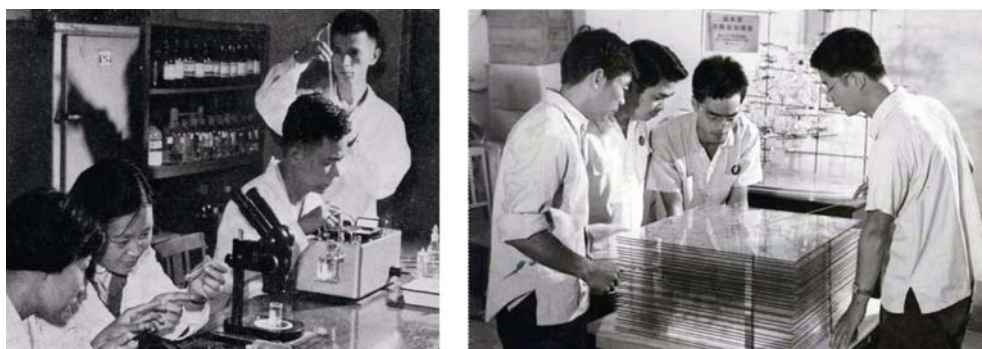


图 1 研究人员在进行重原子衍生物制备实验(左)和三维电子密度图分析(右)

衍射数据收集与相位解析 由于 X 射线波长短(用于晶体结构分析的波长一般在 1~1.5 Å), 基于 X-射线的显微放大系统具有可分辨原子的高分辨率. 但是, 由于 X-射线的极强穿透力, 至今没有以透镜汇聚成像的物理意义的 X-射线显微镜. X-射线晶体结构分析的基本原理就是, 首先用物理的方法获得研究对象的衍射像(衍射数据), 然后用数学方法(Fourier synthesis)将衍射像重构成真实的物像(分子结构), 犹如“数学透镜”. 但完成这一过程时存在一个基本困难: 衍射像的强度(黑度)可以物理方法记录, 但这些衍射波的位相(phase)(各衍射波间的相对时空关系)没有办法进行物理记录. 这至今是 X-射线晶体结构分析方法的基本困难, 在胰岛素结构测定当时, 只有“多对同晶法”可有效用于蛋白质晶体结构的位相问题解析. 在胰岛素结构解析过程中, 需要对母体和各种衍生物晶体数以万计的衍射点进行记录和强度测定, 工作量极大. 开始没有相应设备, 只能用手工照相法进行, 十分困难. 随后, 原由物理研究所订购的一台英国进口线形衍射仪拨归研究组用, 可以自动进行单点测定, 数据收集时 24 h 连续工作, 记录和测量一套完全的衍射数据及完成处理所需时间常以月计时. 各种计算所需的大量成套计算程序, 都需完全由自己编写, 组内计算数学的专业人士为此付出了辛勤劳动. 由于协作组拥有优秀的数、理、化方面的多学科专业人员, 这一系列难题逐一得到解决. 当时, 大量的计算分析开始没有大型计算机, 大家用计算尺、手摇计算机、电动计算机进行计算, 十分艰辛, 后来联系到国防科委一院的大型通用计算机才使情况有了基本改善. 通过反复计算分析, 最后确定了 3 个衍生物中所有重原子的准确位置, 进而解析了位相问题.

胰岛素分子三维结构模型建立 运用解析的相位和母体的衍射数据可以计算组成胰岛素分子所有原子在晶体空间中的电子分布, 也就是胰岛素分子的“像”, 从中分析确定其 51 个氨基酸及组成原子的空间位置, 进而建立胰岛素分子的三维结构模型. 这是一项工作量极大和综合性很强的工作. 在当时, 电子密度是按晶体空间格子点计算并以数字记录的, 要完全用手工还原制作成图像, 需付出极大的工作

量, 如一套 $2.5 \text{ \AA}$ 分辨率的电子密度图, 分布在近 40 万个格子点上, 先由计算机算出每个格子点上的电子密度数值, 再用手工将其电子密度数值填写在分割成 60 个截面的格子图中相应的格子点上, 再按照等密度线标准绘制成图, 移绘到玻璃板上, 最后将 60 层绘有电子密度图像的玻璃板按序叠合起来, 构成一个可透视的三维晶胞空间, 从中获得胰岛素分子的三维结构像。这是一个极为浩繁的工作, 当时有成批的北大同学结队前来帮忙, 才使工作得以顺利进行。在此基础上, 完全通过手工从这一“看得见, 摸不着”的晶体空间中, 逐一确定组成胰岛素分子的氨基酸及原子的位置, 搭建出准确的胰岛素分子模型, 测量各原子的空间坐标, 最后完成胰岛素晶体结构测定。这一环节不仅工作量大, 而且有许多技术上的问题, 解决问题所需的装置都是由研究人员自己设计, 中国科学院物理研究所工厂加工制造的。晶体中的胰岛素分子以六聚体存在, 与它贮存在胰脏中的形态是一样的。最后获得的独立胰岛素结构模型为形成二聚体的 2 个胰岛素分子, 约含 1600 个原子(约 800 个非氢原子)。



图2 研究人员在搭建胰岛素空间结构模型



图3 发表在《中国科学》上的胰岛素晶体结构研究论文

研究成果与鉴定

我国胰岛素三方二锌晶体结构测定工作在 1970 年 9 月完成 $4 \text{ \AA}$ 分辨率的结构解析, 确定了六聚体、二聚体的组织方式和分子轮廓及肽链走向; 1971 年 6 月完成 $2.5 \text{ \AA}$ 分辨率结构解析, 确立了分子两条肽链及其所有侧链的准确取向及聚合分子间的作用方式, 完成胰岛素晶体结构的基本测定; 1974 年完成 $1.8 \text{ \AA}$ 分辨率的结构解析, 确定组成分子的所有原子的空间坐标, 建立胰岛素分子的精确三维结构模型, 完全解析胰岛素的晶体结构。当时, 全国科技期刊都处于停刊状态, 《中国科学》为发表 $2.5 \text{ \AA}$ 分辨率的研究结果于 1972 年专门出版了一期“试刊”, 并在停刊 10 年后的第一期复刊中正式刊载(北京胰岛素结构研究组. 《中国科学》, 1973, 16: 93—95; The Peking Insulin Structure Research Group. *Scientia Sinica*, 1973, 16: 71); 当时唯一的英文对外刊物 *China Reconstructs* 对这一工作做了详细报道。随后, $1.8 \text{ \AA}$ 分辨率精细结构研究结果发表于 1974 年《中国科学》(The Peking Insulin Structure Research Group. *Scientia Sinica*, 1974, 17: 752—778)。

1971 年 7 月底, 中国科学院在北京国务院第一招待所主持召开了为期一周的胰岛素晶体结构研究成果鉴定会, 参会的有卢嘉锡、唐有祺、邢其毅等约 70 名专家。最后的鉴定意见是: “经过细致的审核和讨论认为: 胰岛素晶体结构成果正确可靠, 是继我国在世界上第一个人工合成蛋白质——结晶胰岛素后, 在基础理论研究方面赶超世界先进水平的又一较为重要的成果, 这为研究胰岛素结构和功能的关系提供了新的有利条件, 而且也今后研究生物大分子, 探索‘生命起源’等问题打下了基础。”同期, 《人民日报》、《光明日报》在头版头条报道, 邮政部专门发行一张以胰岛素晶体结构模型为主题的邮票, 作为当时

基础科学研究的代表。

评价与影响

《中国科学》及有关报章的报道, 为当时国门紧闭的中国取得的这项科学成果开启了一扇窗户。英国牛津大学教授、1966 年诺贝尔奖获得者 Dorothy C. Hodgkin 当时也正在进行胰岛素结构研究, 在得知消息后急切要求造访北京胰岛素结构研究组, 并于 1972 年访问北京, 历时一周。在这期间她将牛津小组已取得的结果和关键资料带到北京胰岛素结构研究组, 一一对比, 具体深入了解研究过程, 讨论共同感兴趣的问题。北京胰岛素晶体结构研究经历了又一次完全专业同行的高水平鉴定。她对我国这项研究有文字记载的评价, 反映在她随后第 9 届国际晶体学会(1972 年 8 月, 东京)专门为介绍中国胰岛素晶体结构所作的大会报告中, 大会会刊在头版头条以该期约 1/2 的篇幅详细报道了她的报告内容(结晶(Crystal), 1972, 2: 31)。其报告的标题是“Standards There As High As Achieved Elsewhere”, 开宗名义第一句话就是: “北京以国际上其他地方达到的同样高水平, 完成了对一个重要蛋白质胰岛素的晶体学分析”。并指出, 这是源于中国科学家长时间对蛋白质, 特别是胰岛素的兴趣, 中国科学家曾经在 1965 年合成了胰岛素分子。“他们通过严格控制温度和振动生长出十分漂亮的大晶体, 成功制备了优于牛津的重原子衍生物”, “获得的 2.5 埃分辨率电子密度图明显优于牛津小组的 2.8 埃结果”, 在条件方面, “除了一台线形衍射仪来自英国外, 其他技术需求都是自行解决的, 令人惊异”, “他们获得了很有意义的研究结果, 这是一项令人印象深刻的工作”, “我看到了一群热情而智慧的青年科学家群体, 他们不顾前几年中国的特殊形势, 做了非常踏实的工作……显然, 他们已经具备蛋白质 X-射线分析的足够知识和经验”。在看到我们 1.8 Å 分辨率结果的论文后, Hodgkin 在 *Nature* 杂志撰文评述(Dorothy C. Hodgkin. *Nature*, Chinese work on Insulin, 1975, 255: 103), 指出, “北京小组获得的 1.8 Å 分辨率的胰岛素电子密度图是目前通过实验确定的最精确的结构图, 可能今后也就保持在这一水平”。我国测定的胰岛素晶体结构是当时亚洲第一个蛋白质晶体结构, 日本晶体学家渡边得之助在阅读了 2.5 Å 分辨率的中文论文之后致信给北京胰岛素结构研究组, 在表示钦佩的同时, 要求全文翻译此论文为日文在日本刊出, 认为“将论文内容介绍给日本可以对基础科学的进展做出贡献, 并且将开辟



图 4 “人民日报”、“光明日报”分别以头版头条报道此成果。1976 年国家邮政发行以胰岛素晶体结构研究成果为主题的邮票

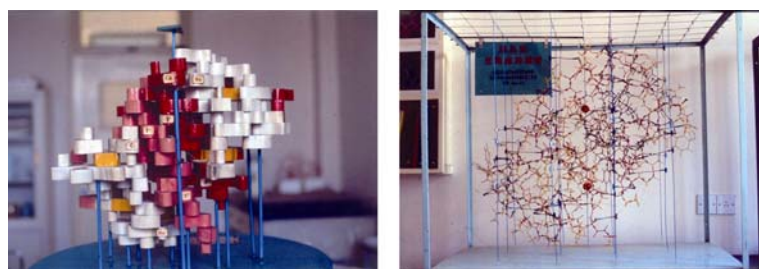


图 5 4 Å 分辨率胰岛素结构模型(1970)(左)和 1.8 Å 分辨率胰岛素原子结构模型(1973)(右)

题是“Standards There As High As Achieved Elsewhere”, 开宗名义第一句话就是: “北京以国际上其他地方达到的同样高水平, 完成了对一个重要蛋白质胰岛素的晶体学分析”。并指出, 这是源于中国科学家长时间对蛋白质, 特别是胰岛素的兴趣, 中国科学家曾经在 1965 年合成了胰岛素分子。“他们通过严格控制温度和振动生长出十分漂亮的大晶体, 成功制备了优于牛津的重原子衍生物”, “获得的 2.5 埃分辨率电子密度图明显优于牛津小组的 2.8 埃结果”, 在条件方面, “除了一台线形衍射仪来自英国外, 其他技术需求都是自行解决的, 令人惊异”, “他们获得了很有意义的研究结果, 这是一项令人印象深刻的工作”, “我看到了一群热情而智慧的青年科学家群体, 他们不顾前几年中国的特殊形势, 做了非常踏实的工作……显然, 他们已经具备蛋白质 X-射线分析的足够知识和经验”。在看到我们 1.8 Å 分辨率结果的论文后, Hodgkin 在 *Nature* 杂志撰文评述(Dorothy C. Hodgkin. *Nature*, Chinese work on Insulin, 1975, 255: 103), 指出, “北京小组获得的 1.8 Å 分辨率的胰岛素电子密度图是目前通过实验确定的最精确的结构图, 可能今后也就保持在这一水平”。我国测定的胰岛素晶体结构是当时亚洲第一个蛋白质晶体结构, 日本晶体学家渡边得之助在阅读了 2.5 Å 分辨率的中文论文之后致信给北京胰岛素结构研究组, 在表示钦佩的同时, 要求全文翻译此论文为日文在日本刊出, 认为“将论文内容介绍给日本可以对基础科学的进展做出贡献, 并且将开辟

中日两国科学工作者协作的道路”。在此前后时期, 英美等国的知名蛋白质晶体学实验室的许多权威学者都来访问过北京胰岛素结构研究组。

胰岛素晶体结构测定是我国第一个蛋白质三维结构研究, 为我国结构生物学研究奠定了坚实基础, 在人才培养、技术方法、经验积累等方面对这一研究领域在我国的开拓与发展发挥了重要作用。目前, 结构生物学研究已成为我国生命科学的一个前沿领域。

开拓进取不畏艰难, 群策群力紧密合作, 追求科学不拘私利, 是这一段历史、这一代人留下的精神。历史不会重复, 但应该记忆, 因为历史的经验和教训值得记取, 历史的精神需要传承和发扬。



图 6 牛津小组访问北京胰岛素结构研究组时对胰岛素晶体结构研究结果进行“一对一”的深入比较和讨论(右排中为 Hodgkin 教授, 后为牛津小组主要成员 T. Blundell, 中为日本名古屋大学教授 N.Sakabe; 左排为中方人员)



图 7 国际蛋白质晶体学权威、诺贝尔奖获得者 Dorothy C. Hodgkin 先后在 1972 年第 9 届国际晶体学大会发表专题大会报告, 1975 年 *Nature* 上发表述评, 高度评价我国胰岛素晶体结构研究。1973 年日本大阪大学教授渡边得之助给北京胰岛素结构研究组来信, 要求翻译论文在日本发表

参考文献

- 1 胰岛素结构研究组. 2.5 埃分辨率胰岛素晶体结构的研究. 中国科学, 1972, 15: 3—20
- 2 上海胰岛素研究小组. 胰岛素的结构与功能关系的研究——B 链羧端肽段与胰岛素功能的关系. 中国科学, 1972, 15: 21—28
- 3 北京胰岛素结构研究组. 胰岛素晶体结构的研究——1.8 Å 分辨率电子密度图的计算. 中国科学, 1973, 16: 93—95
- 4 北京胰岛素结构研究组. 胰岛素晶体结构的研究: 1.8 埃分辨率的胰岛素分子. 中国科学, 1974, 17: 591—661
- 5 张友尚. 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. 中国科学: 生命科学, 2010, 40: