

DOI: 10.13376/j.cblls/2015091

文章编号: 1004-0374(2015)06-0664-04



刘望夷, 1960年北京大学生物系生物化学专业毕业, 1965年中国科学院上海生物化学研究所研究生毕业, 中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所退休研究员, 1959—1960年在邹承鲁先生指导下在胰岛素二硫键拆合组学习做实验。

我在早期胰岛素A、B链拆合组学习的经历和见闻

刘望夷

(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)

今年是我国成功化学合成结晶牛胰岛素发表50周年。我大学毕业前后曾参加过早期牛胰岛素A、B链的二硫键拆合工作, 在工作中学习到很多知识。为纪念半个世纪前我国科学家所作的贡献, 本文记述我参加这项工作的经历、见闻和印象。

1 第一次来生化所

1959年2月寒假结束后, 我读四年级下学期。因为北大生物系和化学系与生化所准备合作做人工合成胰岛素的工作, 开学后区乐昌(助教)先生带领我班几个同学(王志美、汪开圣和我等)从北京来上海到生物化学研究所参观学习。到上海后我们住在桃江路7号科学院宿舍。在实验室参观学习三天, 收获确实不小。我们就像刘姥姥闯进大观园, 大开眼界。很多实验用品, 以前都是闻所未闻, 见所未见。像大大小小的层析柱、纸层析缸、纸电泳仪等这些现在看来很简单的仪器, 当时在北大生化实验室里都没有见过。其实, 柱层析、纸层析这些当时的先进技术, 早在20世纪40年代中后期就用于氨基酸和小肽的分离和鉴定。由于对发展和应用这些实验技术的卓越贡献, A.J.P. Martin和R.L.M. Synge获得1952年诺贝尔化学奖。20世纪50年代连这些简单的实验设备都很少见, 说明当时我国高校实验室的仪器设备实在太落后了。

我们回校不久, 生化所曹天钦先生率邹承鲁先生和钮经义先生等到北京, 同北大化学系和生物系与人工合成胰岛素有关的师生见面, 讨论协作问题。他们在生物楼101教室作了学术报告。出席这次会议的有生物化学教研室的三位教授: 陈同度先生、沈同先生和张龙翔先生, 听学术报告的还有生化专业55、56级高年级学生。参加这次学术报告会的有没有化学系的师生, 现在记不清了。

此后不久, 生物系区乐昌先生和生化专业高年级学生与化学系邢其毅先生和有机化学专业高年级学生在地学楼底层一个教室里联合举行人工合成胰岛素学术讨论会。在当时“大跃进”的发热气氛中, 学生学到的书本知识虽然不多, 但本着“敢想、敢说、敢干”的精神, 大家都踊跃发言, 各抒己见, 争论激烈, 很难达成一致意见。关于人工合成胰岛素的方案(路线), 记得当时会上讨论的主要有两个: (1) 两条链方案。分别合成两条A、B链, 然后氧化合成有活性的胰岛素。这条路线比较容易。(2) “工”字型方案。胰岛素分子内有两个“工”字型含二硫键的多肽链, 分别合成这两个“工”字型多肽链, 再合成有活性的胰岛素。这条路线比较复杂。这些方案究竟是以前就讨论过、议论过, 还是听曹、邹、钮三位先生报告后产生的, 现在就不得而知了。无论怎样, 后来化学系与生物系提出的路线与生化所

的方案是没有矛盾的，没有争议的。因为当时两系有关领导对这项工作有工作经验的不多，最后，各方领导取得共识：分别合成胰岛素A、B两条链，再合成有活力的胰岛素。于是，北大生物系领导决定派区乐昌先生带领我和同班同学程明哲两人再到上海生化所学习胰岛素A、B链拆合和测定胰岛素活性的方法。

2 再来生化所学习

1959年3月，区乐昌先生又带领我和程明哲第二次来到生化所。当时生化所实验室在岳阳路320号大院一幢三层大楼内。这幢大楼是原中央研究院医学筹备处使用的实验室。我们到三楼一个办公室与邹承鲁先生见面。当时邹先生给我的印象是非常年轻。邹先生当时负责领导胰岛素A、B链二硫键拆合组（简称拆合组或二硫键拆合组）。拆合组实验工作主要在三楼一间向南的大实验室。其组员有：杜雨苍、徐琴钰、许根俊、爻邦英、鲁子贤和张友尚。他们各有自己与拆合有关的课题。邹先生安排我和程明哲主要与杜雨苍和徐琴钰在一起学习。

人工合成胰岛素，早期就提出多种途径实现这个目标。A、B链的拆合，大多数人认为是一个比较可行的方案。已经知道，胰岛素A、B链的拆开和分离比较容易。F. Sanger在测定胰岛素的氨基酸序列时，已经用过甲酸氧化后经纸电泳分离，得到 $-SO_3$ （二硫键中的胱氨酸氧化为磺酰丙氨酸，即cysteic acid）型A、B链。用这种A、B链不能直接合成胰岛素，必须还原成 $-SH$ 型A、B链才行。当时尚不能做到直接从 $-SO_3$ 型转变成 $-SH$ 型。直接用巯基乙酸还原胰岛素可得到 $-SH$ 型A、B链，但这种类型的 $-SH$ 基容易氧化，很不稳定。这样看来，用A、B链合成胰岛素这个方案还存在很多尚待解决的困难。生化所所长王应睐先生很重视这些问题，安排邹先生领导拆合组，组内成员大多数有做研究工作的经验，能力强。杜雨苍是1958年北大生物系毕业分配到生化所工作的。他是比我高一级的同学，因为杜和我在学校都当过班长，所以在学校我们就认识。当时在“大跃进”的气氛下，人们的工作热情很高。我们和杜雨苍一起工作，深感他工作积极，学习刻苦，肯动脑子，解决问题的能力强。他一天从早到晚和周末都到实验室工作。但他毕竟到生化所工作时间还不到一年，没有多少实验经验，在遇到不能解决的问题，感到一筹莫展的时候，就

拿着实验记录本到邹先生办公室向邹先生汇报。我和徐琴钰、程明哲总是跟着去。邹先生听了汇报后耐心地详细回答他提出的各种问题，并分析产生这些问题的原因，提出解决方法，指导得非常具体。他有条有理的讲解，既有基础知识又启发我们学习应该怎样从事科学研究，学会从各方面思考问题，要敢于实践（做实验），敢于提出自己的不同想法。我们从他的办公室满意地出来后，就好像刚上完一堂受益匪浅的课，感到学习了很多知识。对那些困扰我们的问题茅塞顿开，知道下一步该怎么做了。

邹先生也常到大实验室看我们做实验，我们有了问题可以随时问他。有一次，他在实验室看到我正在用一支较大的玻璃吸量管吸取5N NaOH溶液。他当场严肃地批评我说：“你这样用嘴吸取浓的NaOH，吸到嘴里要烧伤你的口腔，应该用橡皮球吸取！”我当时感到非常尴尬。邹先生是出于爱护学生批评我的。这件事使我终生不忘。我们在学校时很少做实验，尤其在“大跃进”时期，实验室乱七八糟，闹哄哄的，我们根本没有受过严格训练。从此以后做实验碰到可能有危险的时候，我就非常注意了。做了几十年实验没有受过伤害，再没有做过像用嘴吸量烧碱那样的蠢事了。后来我指导研究生时也曾多次不客气地批评过他们的错误，我想他们同样也会理解我的。

20世纪50~70年代，科学院实验室的仪器设备虽比高校好些，实际上还是很落后的。从国外进口仪器更加困难。当时社会上大力提倡自力更生，研究所更要自己动手制作一些实验必需的仪器设备。生化所有附属工厂，厂内有技术水平很高的熟练工人，如玻璃工、金工、木工、电工和仪器设备维修工等。实验室需要一些特殊仪器设备，市场上买不到的，研究人员可以自行设计，画出图纸交给工厂去做。如有特殊需要，难以画出图纸时，我们与工厂技术人员一起讨论，提出明确要求，他们也能做出合用的仪器或设备。比如当时市场上买不到的实验室用恒温水浴，科研人员与工人合作，就用一个盛有30~40升水的大玻璃缸，上面装一个电热棒（放在水中）和一个小型电动搅拌马达，两者都与一个继电器联在一起，再装上一个盛有水银的小型玻璃管，里面安装一个也与继电器相联可上下调控的金属细针。这样启动了继电器，电热棒将水加热，马达将水搅动起来，直至水热到玻璃管内水银柱与金属针接触，才停止加热，停止搅动水。调节金属针的高度，就可达到所需水温。这种土法装配的恒温

水浴,实验室一直使用到20世纪60年代末。另外,杜雨苍还特别设计了一种专门用于拆合实验的体积很小的三通玻璃管,一个管口加样品,另一个将空气(氧气)直接通入反应液内,第三个在液面通空气。这也是研究所玻璃工的作品。使用这种三通试管做实验效果很好。杜雨苍和我们还经常到楼下冰库用高压电泳仪分离A、B链。这个实验很危险,必须先切断电源才能操作。后来,这种高压电泳仪就不再使用了。

除了参加实验外,空闲时我还常到分院图书馆查阅与胰岛素有关的文献。那时图书馆在320号实验大楼内,不出大楼就可以到图书馆看书,很方便。馆内设有阅览室、参考室,室内专门集中放置生化等生物学方面的杂志和工具书等,还有*Chemical Abstract*,查阅很方便。当时研究胰岛素的文章很多,主要有关它的结构与功能的关系、经过化学修饰后对其活力的影响,以及改善临床应用等方面的文章。查文献主要是为了学习知识和提高英文阅读能力。即使在阅读中产生了一些想法在生化所不能做,回到学校也做不了。因为在当时的政治气氛中,只能做那些工作量较大,能集体工作的,即“大兵团作战”的项目。不提倡个人有什么想法,独立思考做课题。现在的319号分院图书馆当时正在启建。1960年分院图书馆才搬入319号新址。

在三楼大实验室做实验的人比较多。与杜雨苍一起做实验的就有五位。许根俊做钠氨实验常用大实验室通风橱。鲁子贤研究A、B链的物化性质。孙玉琨是邹先生的研究生正在做他的毕业论文,不参加胰岛素合成的工作。张友尚常在楼下冰库里分离A、B链。在大实验室做实验的龚岳亭探索用蛋白水解酶的可逆反应,即转肽法,合成多肽。他一个人做实验,不多讲话,按时上下班。经过一段时间的探索他向胰岛素大组作了工作汇报,认为转肽法此路不通,不再做这个题目,改做别的工作了。

蛋白水解酶在特殊条件下可以合成肽键,即转肽反应,这是常识。一般酶催化的反应除了正向反应外,都有逆反应。这样的例子很多。例如红色面包核酸酶(RNase N1)在特定条件下可以合成有限的寡核苷酸。著名的多核苷酸磷酸化酶(PNPase)更是一个明显例子:在磷酸存在下该酶水解RNA为各种核苷二磷酸(NDP)。没有磷酸条件下,该酶可以将各种NDP合成大分子RNA,从一个NDP中释放一个磷酸。在酶催化反应过程中,正逆两个反应速度常数的大小如果反转,则酶催化的反应向另一

方进行,反之亦然。问题是用酶催化法合成蛋白质与原来提出项目的宗旨是否相悖?至今还在争论。

胰岛素的二硫键拆合工作经过几个月的摸索,不断改进实验条件,约在1959年5月,使用经氧化还原、离子交换或电泳得到的纯A、B链重合成胰岛素终于获得成功。首次观察到将天然A、B链重组的胰岛素注射到小白鼠皮下产生惊厥反应并死亡的实验结果。“小白鼠一跳”当时在生化所备受关注,这是我亲眼看到的。这个结果是以杜雨苍为主获得的,该实验的成功引起胰岛素人工合成大组的高度重视,为此专门召开了一次胰岛素大组会议,确定了A、B链的拆合路线是可行的。

胰岛素大组经常召开会议,各人汇报工作进展,讨论实验中的问题。会议常由曹天钦先生主持,汇报和讨论工作后,曹先生有时会提出北大两位同学有什么想法或者意见。生化所的老师 and 同事都看着我们,希望我们发言。可是我们两个都没有发过言,不是没有想法或不想发言,主要是由于受中国传统文化的影响和社会上不良习惯的束缚。总觉得年轻人要谦虚谨慎,在老师面前要必恭必敬,不可班门弄斧,唯恐一个在校学习的学生给人留下不好的印象。

我们两个北大学生这次住在分院太原路200号一幢三层楼集体宿舍里。后来所里发生过一件大事,据说三楼实验室的一位工作人员手里拿着一个“灯泡瓶”在窗口旋转混匀内有八肽的溶液,一不小心“灯泡瓶”由三楼坠落、粉身碎骨,大家也非常可惜辛辛苦苦合成的八肽不能回收了。这件大事当时称为“八肽跳楼”。7月底系里领导通知我们回学校参加期终考核。于是我们就辞别生化所的老师和朋友回学校去了。

3 回学校断断续续做胰岛素活力测定工作

我们回到学校第一件事就是参加期终考核。有的课程考核已经结束,有的正在进行。我们两人在生化所学习差不多一个学期。学期初有的课程上过几次,有的就根本没有上过。我们只好自学几天,参加考核也就通过了。

在北京大学生物系搞科研,仪器设备非常差,要弄齐必需的仪器得花费很多时间,一面上课一面东奔西跑“跑仪器”。胰岛素合成工作由生物系与化学系合作进行,1960年春季五年级最后一个学期,领导上派我到化学系与他们一起做实验。化学系安排我在化学楼二楼北侧一间大实验室做实验,我负

责测胰岛素活力。测活力用的小白鼠要到生物系动物房去取。因为每次使用的数量不多又不常使用，动物房的人就给了我几十只小白鼠和饲料，要我们自用、自养、自繁殖。这下可麻烦了，小白鼠繁殖力极强，我得喂养、分笼（当时使用的是土瓦罐）、打扫瓦罐，工作量很大，累得我够呛。动物要吃喝，一天不去实验室也不行。有时一不小心，小白鼠逃出瓦罐在实验室到处乱跑。化学系的实验室变成了动物房，满屋一股大小便臭味，但为了工作也要养小白鼠。不久，化学系派一个低年级女学生（步XX）与我合作，学习在小白鼠皮下注射胰岛素测定活力的方法。我们叫她“小步”。她学会后，我就不用来化学楼养小白鼠了。

4 毕业分配到生化所，开始也做有关胰岛素的工作

1960年8月，北大生物系分配我到中国科学院当研究生。我到当时还在文津街的院部报到，院部对我说，因为我是学生化的，已经分配我到生物化学研究所了。同年9月我来上海到生化所报到。人事科张锡铎科长对我说，现在生化所正在准备调整研究工作，以前你曾在胰岛素组学习过，现在暂时安排你在邹承鲁先生胰岛素组学习。邹先生那时是“三大队”的队长。当时所里正处在“大跃进”的尾声。中央已提出“调整、巩固、充实、提高”的方针，所里正在忙于召开各类人员的座谈会。当时叫“神仙会”，征求大家对“大跃进”的意见。我到组里与鲁子贤合作用pH仪测定胰岛素A链的酸性程度，因为当时已经知道A链在pH 1.9的缓冲液中向正极泳动，说明它相当酸。后来听说关于胰岛素A链的性质的这项工作单独发表了一篇短文。这项工作结束以后，邹先生安排我做木瓜蛋白酶的纯化工作。当时孙玉琨有木瓜蛋白酶的粗制品。那时已是寒冬，实验室没有任何取暖设备，很冷。我用平板纸电泳仪在实验室温度较低条件下将这种粗制品分成了几条蛋白带（茚三酮染色）。我向邹先生汇报后，邹先生看了很高兴，说可以测量每

条带的蛋白质含量占多少，是否每条带都有酶活性，各占多少？这些问题现在看来很容易解决。我在当时就不知道怎样做。1961年春节快到了，这个实验没有再做下去。春节过后我就到二楼刚建立的核酸室学习去了。我在邹先生小组前后学习了近一年的时间。虽然我不是他的入室弟子，在讨论工作中从他常说的要学会如何发现问题、提出问题、解决问题、总结问题，学到了许多宝贵知识，初步知道了怎样从事科学研究。我以后再没有遇到能提出好课题并指导学生具体地解决问题的好老师。可以说邹先生实际上是我从事科研工作的启蒙导师。

人工合成胰岛素的科学意义已有许多文章论述。我认为在人工合成牛胰岛素的工作中，二硫键拆合工作是最大的亮点。当时通过我国科学家的二硫键拆合方法的研究使天然A、B链重组活力恢复达到50%，化学合成的结晶胰岛素达到与天然胰岛素相同的活力。就是现在做二硫键拆合的科学家也认为这是很高的水平。这项工作引起国外高度重视，特别是用基因工程法生产胰岛素和其他含二硫键的多肽激素工作，对由A、B链合成胰岛素的条件给予很高的评价。

在人工合成胰岛素的过程中促进了国内生化制品的生产。20世纪50年代我国的科学技术落后，人工合成胰岛素必需的各种氨基酸和有关试剂国内市场上买不到。由国外进口，缺少外汇，必需自力更生，自己生产。生化所因开展这个重大项目创办了由沈昭文先生为厂长的“东风生化试剂工厂”，为人工合成胰岛素生产出各种氨基酸及各种必需的化学试剂。东风厂为人工合成胰岛素立了大功。后来，东风厂还生产很多其他生化制品，如多种酶类等。全国各地高校和科研机构常到东风厂购买这些制品，对推动国内生化教学和科研事业的发展起了很大作用。

在人工合成胰岛素这项工作中，生化所、有机化学所和北大化学系都培养了一批科研人才，后来他们成为我国生物化学界的中坚力量。