

文章编号: 1004-0374(2015)06-0777-03



邹承鲁 (1923—2006), 国际著名生物化学家、近代中国生物化学的奠基人之一、中国科学院院士、发展中国家(原第三世界)科学院院士, 中国科学院生物物理研究所研究员。

邹承鲁先生为我国率先实现胰岛素的人工合成做出了重要贡献, 创立了“邹氏公式”和“邹氏作图法”, 建立了酶活性不可逆抑制动力学的理论体系, 提出了酶活性部位柔性的学说。

## 对人工合成结晶牛胰岛素的回忆

邹承鲁

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

1958年是中国历史上一个令人难忘的年头。在“大跃进”的声浪中, 千百万急于摆脱几个世纪以来贫穷落后帽子的中国人用豪言壮语设定了许多令人难以置信的雄伟目标。中国的科学家们也热切希望做出举世瞩目的科学成就。在当时的中国科学院上海生物化学研究所, 各种各样的想法一个接一个地被提出来, 经过激烈的讨论, 而又一个又一个地被否决掉。当时争论极为热烈, 经常是两三个人同时争着发言, 所以现在很难想起确切地是谁首先提出了人工合成蛋白质的想法。不过, 这一主张一提出, 马上获得一致的赞同。这不仅因为大家都知道蛋白质对生命的重要性, 它是所有生命活动的主要承担者, 还因为在那个时代谈蛋白质的人工合成还有相当的神秘感, 因此人工合成蛋白质无疑是一个惊人的科学壮举。这个想法也赢得了领导的支持, 并且得到此项目得以进行的充足的经费。这在很大程度上真应该归功于思格斯说过的一句话: “蛋白质是生命的存在形式”, 因此合成了蛋白质就是在合成生命的道路上前进了一大步。

在“文革”的困难日子里, 几乎所有严肃的基础研究都被彻底禁止了。而正是因为胰岛素合成的成功, 使得测定胰岛素晶体结构的工作得以启动进行。现在北京生物大分子国家重点实验室的一个优

秀的 X-射线晶体学研究小组的核心便是在那时形成的。

在热火朝天的 1958 年, 我把自己对酶的兴趣暂且放在一边, 参加了上海生物化学研究所牛胰岛素的人工全合成工作。选择胰岛素作为当时人工合成蛋白质的对象是有道理的, 不仅仅因为胰岛素只有 51 个氨基酸, 分子小, 还因为它是当时唯一已知一级序列的蛋白质。其一级序列的测定工作刚刚由英国的 F. Sanger 完成不久, 为此他获得了诺贝尔奖。

回首往事, 今天的肽链合成技术和我们那个时候真有天壤之别。现在我们能用合成仪方便地合成一段合适长度的肽段, 要做的只是设置程序, 加进所需的氨基酸和其他试剂, 按下按钮, 机器就自动工作, 几天之后我们就能收到所要的肽段。现在常用的固相合成方法则是美国的 Merrifield 在 1963 年首创的, 并使他获得诺贝尔奖。可是在 40 年前, 蛋白质的合成, 哪怕只是胰岛素这样一个小蛋白, 都是件令人生畏的事。世界上首例多肽合成, 是 du Vigneaud 在 1953 年合成的一个八肽, 催产素。这项工作使他获得了 1955 年的诺贝尔化学奖。到 1958 年, 人工合成的最长的肽段是促肾上腺皮质激素的一个片段。更为困难的是, 当时我国还没有多

肽合成的经验,除了谷氨酸钠(味精)之外,我国甚至没有制造过任何氨基酸。实际上,这一项目确实也耗资巨大,如一位执异议者后来所言,所用去的化学溶剂之多,足以灌满一个游泳池。

## 1 A链和B链的组合

胰岛素是由两对二硫键连结的两条肽链组成的。除链间二硫键外,在A链上还有一对链内二硫键。因此,在工作初期,曾考虑了三种合成方案以供选择。其中最为现实可行的方案是分别合成A链和B链,然后通过巯基的氧化使两条链正确组合。当时我的任务是摸索胰岛素分子先经过还原、分离纯化之后的A链和B链是否能通过氧化重新组合形成天然的胰岛素分子。这一问题是胰岛素人工全合成成功的关键,而我有幸能和几位才华横溢的年青人在一起工作,他们之中包括杜雨苍、许根俊、鲁子贤和张友尚等,现在都是卓有成就的科学家了。

我们开始查阅文献时发现我们的前景并不乐观,国外许多人都曾尝试过把还原的胰岛素肽链重新组合,以期获得一定产率的天然胰岛素,而这些探索都无一例外地失败了,甚至有人报道说,对于部分还原的胰岛素而言,氧化会导致活力的进一步降低。当时除了像催产素这样的小肽以外,还没有一个含二硫键的蛋白能在还原后通过氧化而成功地再生。等到使 Anfinsen 获得诺贝尔奖的工作,即氧化被还原的核糖核酸酶肽链能得到活力恢复发表时,我们都已经由还原的胰岛素肽链得到相当产率的胰岛素了。Anfinsen 的工作要容易得多,因为核糖核酸酶只有一条肽链,而胰岛素则是由两条肽链组成的,而两条肽链可以以任何比例组合,这就大大增加了问题的复杂性。我们那时没有被洋人的失败吓倒,反而迎难而上,着手分离A链和B链,然后试图使它们正确组合以形成天然的胰岛素。当年我才30多岁,却是小组中最年长也是顾虑最多的人,而我那些年青的同事们则不像我那样担心别人的失败,他们都有股“初生牛犊不畏虎”的劲头。为了氧化被还原的肽段,我们历经艰辛,最终发现了不使用氧化剂而使氧化反应在低温下由空气缓慢完成的方法。这使我们在很短的时间内取得了鼓舞人心的结果,获得10%的活力恢复!由于肽链能以不同比例组合,巯基间形成二硫键的可能性是数不胜数的,在理论上应该说是无穷的。因此我们所得的10%的产率大大超过了巯基间随机配对可能得到的产率。我们的结果暗示着胰岛素的天然结构是

其所有可能结构中最稳定的一个。

我们所得到的粗产物经进一步纯化和结晶,终于得到和天然胰岛素具有相同活力和晶型的晶体,胰蛋白酶水解物双向纸层析和电泳的结果进一步证实氧化后所得的胰岛素与天然胰岛素完全相同,上述这些重要的结果我们在1959年的秋天就得到了,但我们知道德国和英国的研究小组也在进行胰岛素合成的研究,很自然我们必须对我们的结果保密。同时由于“大跃进”的缘故,中国所有的学术刊物都被迫停刊,包括当时国内唯一用英文出版的刊物《中国科学》。再说,那个时代当然是不可能在国外发表论文的。直到1960年Dixon和Wardlaw在*Nature*上发表论文,报道氧化被还原的肽链得到1%~2%的胰岛素之后,我们才决定在《中国科学》(*Scientia Sinica*)发表我们的结果,第一篇论文发表在1961年10月《中国科学》恢复出版后的第一期上。同时我们一直在摸索进一步提高产率的条件。不久,我们把产率提高到了30%~50%!

这些研究为胰岛素的最终全合成扫清了道路。胰岛素的合成是由三个单位协作完成的。上海生物化学研究所由钮经义和龚岳亭领导的小组负责B链的合成;上海有机化学研究所由汪猷领导的小组以及北京大学由邢其毅领导的小组共同负责A链的合成。两条链都是通过传统的片段缩合而合成的,我的小组负责两条肽链的组合。

尽管当时已有了一些保护基团和去除这些基团的方法,但每种蛋白都有其独特的性质,具体问题需具体对待,因此肽链的合成远非是一种成熟的常规的技术,对活泼的侧链基团而言,必须小心地保护它们以防它们参与肽链的延伸反应而形成分叉的肽链。但在必要时,却又要去掉这些保护基团,才能成功地合成所需的胰岛素肽链。

## 2 A链和B链的合成

B链的合成以及由人工合成的B链与天然的A链构建成胰岛素首先获得成功,其结果在1964年发表。而A链的合成却遇到些麻烦,因此龚岳亭加入到上海有机化学研究所的小组中帮助解决问题。

当我们通过小鼠惊厥实验证明纯化的人工合成胰岛素确实具有和天然胰岛素相同的活性时,那一刻真是令人终身难忘。这个最后进行的实验是在1965年的一个清晨进行的。只有与这个实验直接有关的人员才允许观察小鼠经受第一个人工合成蛋白质处理的反应,而其他关注此事的人只能在另一间

屋子里焦急地等待。当注射了合成胰岛素的小鼠惊厥实验宣布成功时，那实在是一个无法用语言形容的激动人心的时刻。

### 3 余波

我们1965年在《中国科学》上发表了一篇简报介绍我们的结果，而这一工作的全文则发表在次年《科学通报》的一期专刊上。当年春天，王应睐先生和我因为另外一项研究工作被邀请参加在华沙召开的一次欧洲生化会议，在胰岛素的化学合成中担当重任的龚岳亭和我们同去。当时我们想在这个国际会议上介绍关于胰岛素人工合成的情况，并准备公布我们的实验结果。我们的发言被安排在一间狭小的房间里并限时为10分钟。Sanger也在听众之中，由于我们早就递交了摘要，我本以为会议会给我们更长一些时间发言，但就会议组织者而言，我是为别的工作被邀请做报告的，而胰岛素又和会议的主题不甚符合，因此我们还是只有短短10分钟时间。后来，我被邀请参加一个只有少数人参加的自助餐宴会。我的老朋友，后来是匈牙利总统的BNno Straub教授告诉我，应邀出席宴会的都是向大会递交了非常重要论文的人。当时我们哪里知道，回国两个月后就迎来了“文化大革命”。

“文革”初期，诺贝尔奖获得者Kendrew爵士来中国访问，他告诉我们，胰岛素人工合成的消息在英国电视的“黄金时间”中播出，上百万人观看了这条新闻。无疑，这是最为英国人所知的中国科学成就，他在上海生物化学研究所做学术报告时，我被安排为他翻译，却又被告知不得透露自己的身份，我在剑桥时就认识他，当时他常来我所在的研究所看望我的导师。此次来中国，我已经离开剑桥15年了，变化之大使他已认不出我。我当时只是个微不足道的翻译，穿着一身旧蓝式制服，无疑和他所认识的那个剑桥年青学生的形象相去甚远。尽管如此，他对我的英语大为惊讶，问我是否到过外国，我只好说没有。他又问我是在哪里学的英语，我就

说是在学校学的。他说：“那你一定在一所非常好的学校上过学。”’

1966年底，A. Tiselius访问了中国，那时我的处境已经恶化到不允许见任何外国客人。由于他当时是瑞典皇家科学院诺贝尔奖评审委员会化学组的主席，人们很自然地把他和物色合适的诺贝尔奖候选人联系起来。有些从未参与胰岛素具体工作的人自己挤到前面，或被领导推至前台，遗憾的是仍然无法和诺贝尔奖联在一起。后来我得知Tiselius对胰岛素全序列人工合成的评价很高。当被问及对中国第一颗原子弹爆炸的看法时，他的回答却是：“你们能从书上学到原子弹的知识，但学不到人工合成胰岛素。”.. “文革”期间，尽管真正的科学研究被压制，但这并不妨碍当时的领导利用胰岛素合成在西方的名气大做文章。1973年，中国与美国的互访成为可能。同年，一个生物化学家代表团访美。当年的胰岛素协作组长，此时在名义上仍是上海生物化学研究所所长的王应睐教授被任命为副团长，而一个在胰岛素化学合成即将结束时才刚毕业参加工作的人，由于人所共知的原因，被指定担任团长。

由A链和B链能成功地组合成胰岛素，并得到相当可观的产率，后来被国外其他从事胰岛素合成的实验室所证实，并应用到70年代末由重组DNA技术得到的A链和B链组合成完整的胰岛素分子的工业生产，所采用的基本上就是我们的方法。虽然胰岛素合成成功已经过去30多年了，但我今天仍想强调，在合成的最后一步，在含有大量其他的因错误连接而产生的非胰岛素肽链的复杂混合物中，A链和B链能彼此识别并通过二硫键正确相连而组合成天然胰岛素分子，说明这两条肽链具有相互识别而正确配对的能力和专一性。可惜的是，在胰岛素合成完成20年后，我们才得以进行这个对蛋白质折叠研究有着重要意义的理论问题的实验证明。

原发表于：光明日报，1998年1月30日