

绿色荧光蛋白发色团类似物的合成：实验报告

中国科学技术大学 赧科材 PB20030874

2022年6月17日

1 实验目的

1. 探索荧光发色团分子上带有不同取代基对于荧光发射的影响；
2. 观察各种荧光发射，认识分子设计在化学、生物学等方面的重要性。

2 实验原理

绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, 简称 GFP), 是一个由约 238 个氨基酸组成的蛋白质, 从蓝光到紫外线都能使其激发, 发出绿色荧光。

荧光蛋白最特别的特点就是能够发出荧光, 其中的发色团起着主要的作用。发色团是在蛋白质成熟过程中, β -螺旋上的丝氨酸、酪氨酸、甘氨酸经过环化、脱氢等作用后形成的。4-芳基-2-甲基恶唑-5-酮, 类似于 GFP 发色团, 它可以很容易由芳醛和 N-乙酰基甘氨酸合成。通过不同的芳醛与 N-乙酰基甘氨酸反应获得的 4-芳基-2-甲基恶唑-5-酮衍生物可以观察到多种荧光颜色。

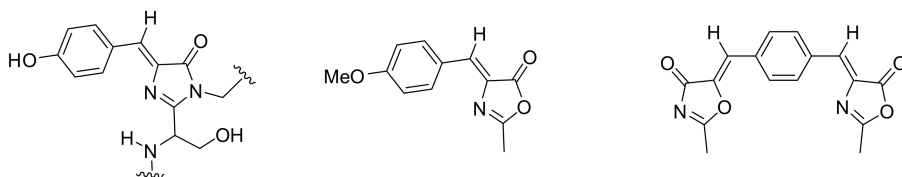


图 1: 从左至右依次为 GFP 发色团、4-芳基-2-甲基恶唑-5-酮

3 实验仪器与药品

仪器：10 ml 圆底烧瓶，球形冷凝管，加热套，表面皿，滤纸

药品：0.21ml 对甲氧基苯甲醛，0.125g 甘氨酸，1ml 醋酸酐，0.05g 醋酸钠

4 实验步骤

1. 向 10 ml 圆底烧瓶中加入 0.21ml 对甲氧基苯甲醛，0.125 甘氨酸和 0.05 g 醋酸钠以及 1 ml 醋酸酐。
2. 加热至 180 C°，待固体完全溶解后，再加热 8~10 分钟。
3. 关闭加热，将反应液转移到表面皿中，冷却至室温。出现大量固体。
4. 取少量固体铺在滤纸上，在 365 nm 灯下观察现象。

5 实验结果

1. 开始反应一段时间后溶液颜色由无色变为红色，并不断加深；
2. 反应 15min 后冷却至室温，溶液澄清，无固体析出；
3. 继续反应 5min，溶液仍然无变化。



图 2: 实验结果

6 实验总结

其他同学使用马尿酸的反应速率非常迅速，基本8min左右即可观察到有黄、红、橙等颜色的固体析出。然而本实验使用的氨基酸为甘氨酸而非马尿酸，使用的氨基酸不同会导致反应速率不同。

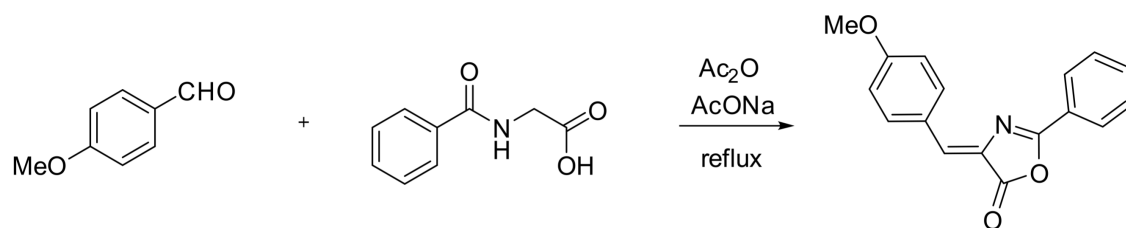


图 3: 马尿酸的反应

(图 3) 为马尿酸与对甲氧基苯甲醛的反应方程式，和实验讲义中其他反应对比可以发现，马尿酸分子同时具有羧基和羰基，其中羧基的 α 位在反应中亲核进攻对甲氧基苯甲醛的醛基，之后脱水形成双键；同时羟基氧进攻分子中另一个羰基，形成五元的恶唑环，脱水得到最终产物。

这一分子内过程不仅在动力学方面非常有利，产物分子还有着遍布整个分子的共轭体系，所以也是热力学稳定的。

然而甘氨酸结构过于简单，在羧基 α 位亲核进攻醛基之后分子中没有另一个羰基等待羟基氧，并且由于四元环内张力较大，无法形成稳定的恶唑环，所以反应速率非常慢。

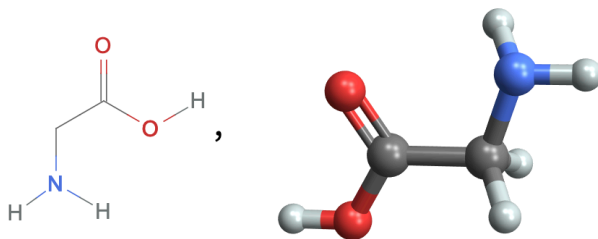


图 4: 甘氨酸的分子结构

7 思考题

1. 首先溶解固体，加入少量碱性物质，比如 NaHCO_3 用以除去反应剩余的氨基酸；通过分液分出有机层，再进行蒸馏，收集对应沸点的馏分，必要时可以进行重结晶。
2. 邻苯二甲醛由于反应空间位阻增大，反应速率比较慢；对于间苯二甲醛，由于吸电子基的间位是富电子的，所以羰基的正电性下降，反应速率较慢；而对苯二甲醛不仅空间位阻最小，而且处于对位的吸电子基使得羰基电子云密度继续下降，正电性增加，有利于羧基 α 位的亲核进攻。

参考文献

- [1] Wolfram Research. Chemicaldata. *Wolfram* 语言函数, 2016.
- [2] 中国科学技术大学化学实验教学中心. 绿色荧光蛋白发色团类似物的合成. 2022.
- [3] 邓洪平. 绿色荧光蛋白启发的发光体系的构建及其光学性质研究. PhD thesis, 上海交通大学, 2016.
- [4] 邢其毅、裴伟伟、徐瑞秋、裴坚. 基础有机化学. 北京大学出版社, 2016.