

# 碱性磷酸酶的体外检测和体内成像研究进展

袁真真, 孙亚玮, 张倩, 张春阳\*

(山东师范大学 化学化工与材料科学学院, 山东 济南 250014)

**摘要:** 碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)是一种水解酶, 可以催化蛋白质、核酸和碳水化合物中磷酸基团的去除。ALP广泛存在于原核生物和真核生物中, 具有调节细胞分裂、增殖、凋亡和信号转导等生物功能。ALP的活性失调与心血管疾病、糖尿病和癌症等疾病密切相关, 是一种重要的生物标志物。ALP的超灵敏检测对临床诊断和生物医学研究具有重要意义, 其体外检测方法主要包括比色法、电化学法、表面增强拉曼散射法和荧光分析法, 体内成像方法主要依赖于荧光成像。该文综述了近年来ALP的体外检测和体内成像研究进展, 进一步展望了ALP的体外检测和体内成像研究所面临的挑战及未来发展趋势。

**关键词:** 碱性磷酸酶; 比色法; 电化学法; 表面增强拉曼散射法; 荧光分析法; 生物成像

**中图分类号:** O657; G353.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2022)04-0467-09

## Advances on *in Vitro* Detection and *in Vivo* Imaging of Alkaline Phosphatase

YUAN Zhen-zhen, SUN Ya-wei, ZHANG Qian, ZHANG Chun-yang\*

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

**Abstract:** Alkaline phosphatase (ALP) is a hydrolase that can catalyze the removal of the phosphate group from proteins, nucleic acids and carbohydrates. ALP widely exists in both prokaryotes and eukaryotes and plays an important role in regulating various biological processes such as cell division, proliferation, apoptosis and signal transduction. The dysregulation of ALP activity is closely associated with a variety of human diseases including cardiovascular diseases, diabetes and cancers, making it a promising biomarker for disease diagnosis. Thus, sensitive detection of ALP activity is essential to clinical diagnosis and biomedical research. In this review, the emerging strategies for *in vitro* detection and *in vivo* imaging of ALP in recent years are summarized. The *in vitro* detection methods include colorimetry, electrochemistry, surface enhanced Raman scattering and fluorescence measurements, while the *in vivo* imaging methods mainly rely on fluorescence imaging. Moreover, new insights into the challenges and future directions of ALP assay are given.

**Key words:** alkaline phosphatase; colorimetry; electrochemistry; surface enhanced Raman scattering; fluorescence analysis; bioimaging

碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)是一种广泛分布在原核和真核细胞中的水解酶, 它能够在碱性条件下去除各种磷酸化底物的磷酸基团, 催化磷酸单酯水解<sup>[1-2]</sup>。每个ALP分子由2个结构相似的单体组成, 每个单体含有2个锌离子、1个镁离子和5个半胱氨酸残基<sup>[1,3]</sup>。ALP在人体中具有4种同工酶, 分别为胎盘碱性磷酸酶、生殖细胞碱性磷酸酶、肠道碱性磷酸酶和组织非特异性碱性磷酸酶<sup>[2]</sup>。ALP广泛存在于人体组织中, 参与细胞周期、生长、凋亡和信号转导等多种过程<sup>[4-7]</sup>。血清中的ALP主要来源于肝脏、骨骼和肾脏组织, 其活性变化与多种疾病如骨质疏松<sup>[8]</sup>、骨软化<sup>[9]</sup>、胆道阻塞<sup>[10]</sup>、肝硬化<sup>[11]</sup>和败血症<sup>[12]</sup>等密切相关。同时, ALP是一些癌症(例如骨癌<sup>[13]</sup>、胰腺癌<sup>[14]</sup>、卵巢癌<sup>[15]</sup>、乳腺癌<sup>[16-17]</sup>和前列腺癌<sup>[17]</sup>)的重要生物标志物。此外, ALP还能将一磷酸腺苷水解, 生成可作为细胞信号分子的腺苷。因此, ALP的超灵敏检测对于临床疾病诊断和生物医学研究具有重要意义。

近年来, 一系列检测ALP活性的方法相继涌现, 主要包括比色法<sup>[18-20]</sup>、电化学法<sup>[21-23]</sup>、表面增强

拉曼散射法<sup>[24-26]</sup>和荧光分析法<sup>[27-28]</sup>。近红外荧光探针的发展突破了 ALP 体外检测的瓶颈,实现了从体外检测到体内成像<sup>[29-31]</sup>的跨越。本文主要综述了近年来 ALP 的检测和成像研究进展,并对该领域所面临的挑战及未来发展趋势进行了展望。

## 1 ALP 的体外检测

### 1.1 比色法

比色法可通过直接观察溶液的颜色变化或测定溶液的吸光度变化对待测组分进行定性/定量分析。Wu 等<sup>[32]</sup>利用四甲基联苯胺(TMB)与氧化型四甲基联苯胺(oxTMB)之间的显色反应,合成了一种新型的仿氧化酶(FeCo NPs@PNC),用于检测 ALP 活性(图 1A)。当 ALP 存在时,其催化 *L*-抗坏血酸-2-磷酸三钠盐(AAP)水解为抗坏血酸(AA),AA 进一步将蓝色 oxTMB 还原为无色 TMB。该方法的线性范围为  $0.6 \sim 10 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,检出限为  $0.49 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。FeCo NPs@PNC 有望替代昂贵的天然酶和基于贵金属的纳米酶,在生物分析中显示出巨大的潜力。Xie 等<sup>[33]</sup>合成了一种具有过氧化物酶样活性的 Fe-N-C 单原子纳米酶(Fe/NC-SAs),用于检测 ALP 活性。该方法的线性范围为  $0.1 \sim 1.5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,检出限为  $0.05 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该方法可进一步应用于人血清样品中 ALP 活性的测定,在临床疾病诊断中具有潜在应用价值。Zhou 等<sup>[34]</sup>利用具有过氧化物酶模拟活性的 Fe/C NS(Fe-doped carbon nanosheet),建立了一种检测 ALP 活性的比色分析法。ALP 能将磷酸苯二钠水解为苯酚,Fe/C NS 在  $\text{H}_2\text{O}_2$  协助下催化苯酚与 4-氨基安替比林的反应产生红醌亚胺。该方法的线性范围为  $0.05 \sim 6.00 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,检出限为  $0.03 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

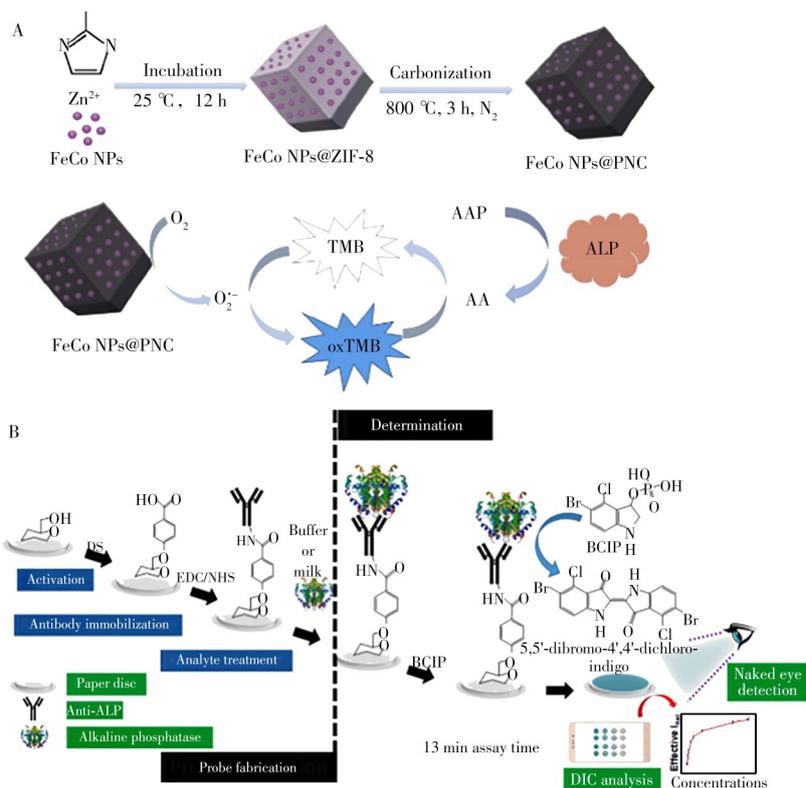


图 1 FeCo NPs@PNC 的合成步骤, FeCo NPs@PNC 类氧化酶活性机制以及 AA 和 ALP 的检测步骤<sup>[32]</sup>(A); ALP 的检测原理示意图<sup>[35]</sup>(B)

Fig. 1 Synthesis of the FeCo NPs@PNC, the mechanism of oxidase-like activity of the FeCo NPs@PNC, and the procedures for AA and ALP detection<sup>[32]</sup>(A); schematic illustration of ALP assay<sup>[35]</sup>(B)

Mahato 等<sup>[35]</sup>发展了一种纸基生物传感器,将 ALP 抗体固定在功能化纸表面,制备了一种可与 ALP 免疫结合的传感探针,用于检测工业牛奶和原料奶样品中 ALP 的活性(图 1B)。ALP 催化 5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸盐(BCIP)产生蓝绿色复合物,利用智能手机拍摄该复合物,采用数字图像比色法即可对 ALP 活性进行定量分析。该方法无需复杂昂贵的分析仪器,检出限达  $0.87 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,线性范围为  $10 \sim 1\,000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

## 1.2 电化学法

电化学法能够检测电极表面的化学物质在电子转移过程中所产生的电信号变化，具有选择性好、成本低和携带方便等优点。二茂铁具有易于衍生化和良好的电化学性质<sup>[36-38]</sup>，通常用作电化学探针的氧化还原活性基团。同时，二茂铁在水中的稳定性较好<sup>[39]</sup>，促进了二茂铁衍生物在生物领域的应用。Goggins等<sup>[40]</sup>开发了一种基于ALP催化二茂铁苯基磷酸盐转化成氨基二茂铁(AFC)反应的比率电化学方法(图2A)。当ALP存在时，它催化二茂铁苯基磷酸盐去磷酸化产生酚类中间体。酚类中间体不稳定，释放出AFC、等量亚甲基苯醌和CO<sub>2</sub>。二茂铁苯基磷酸盐与AFC的电势不同，对两者在微分脉冲伏安(DPV)信号中的峰面积积分可计算出转换率，进而对ALP活性进行检测。该方法通过电化学比率法测定ALP活性，能够有效避免由采样和变更电极/仪器所引起的误差。类似地，Wang等<sup>[41]</sup>发展了一种利用氨基二茂铁检测ALP活性的电化学方法(图2B)。当ALP不存在时，AFC通过与磷酸基结合的方式固定在单链DNA上，产生电信号。当ALP存在时，单链DNA的5'端被去磷酸化，不能与AFC探针相连，无法产生电信号。该方法的检出限可达1.48 mU·mL<sup>-1</sup>，线性范围为20~100 mU·mL<sup>-1</sup>，具有操作简单、快捷和成本低的优点。最近，Zhu等<sup>[42]</sup>发展了一种基于开环聚合信号放大策略检测ALP活性的电化学传感器。该传感器的灵敏度高，检出限达0.66 mU·mL<sup>-1</sup>，线性范围为20~120 mU·mL<sup>-1</sup>。该传感器对人血清样本具有良好的选择性和抗干扰性，检测结果与临床数据的相对误差小于5%，在临床诊断中具有潜在应用价值。

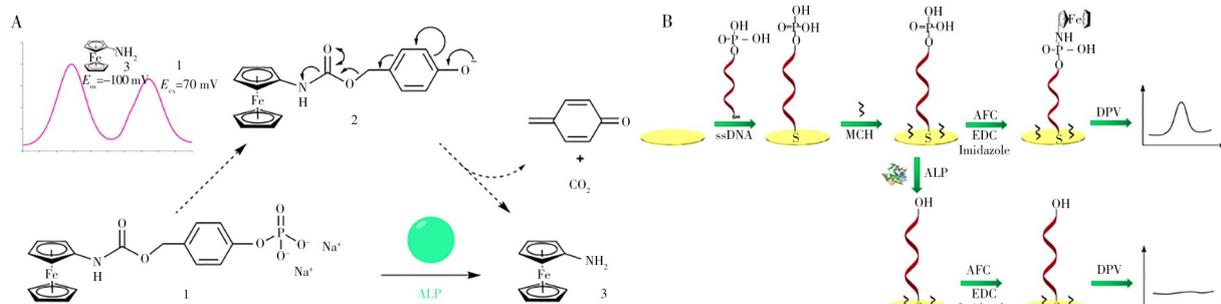


图2 二茂铁苯基磷酸盐的结构和ALP催化氨基二茂铁的降解机理<sup>[40]</sup>(A)；基于酶催化反应的电化学方法检测ALP活性的原理图<sup>[41]</sup>(B)

Fig. 2 Structure of ferrocenylphenyl phosphate and the mechanism of ALP-catalysed breakdown with the subsequent release of ferrocenylamin<sup>[40]</sup>(A); schematic illustration for electrochemical detection of ALP activity based on enzyme-catalyzed reaction<sup>[41]</sup>(B)

将酶介导的信号放大反应引入电化学传感器的构建，可显著提高检测灵敏度。Zhang等<sup>[43]</sup>发展了一种基于T7外切酶辅助信号放大的均相电学生物传感器，用于检测ALP活性(图3A)。该研究组设计了一个3'-磷酸化和5'-亚甲基蓝标记的发夹探针，当ALP存在时，发夹探针中的3'-磷酸基团去磷酸变成3'-羟基。随后，KF DNA聚合酶对3'-羟基进行延伸，启动T7核酸外切酶降解发夹探针中的双链，释放亚甲基蓝标记的单核苷酸和触发DNA探针。触发DNA探针能够与新的发夹探针杂交，启动循环切割过程，释放大量的亚甲基蓝标记的单核苷酸，产生增强的电化学信号。此方法能在均相溶液中进行，无需复杂的电极修饰过程，检出限为0.1 U·L<sup>-1</sup>。Liu等<sup>[44]</sup>发展了一种基于末端转移酶(Terminal transferase, TdT)介导的无模板扩增和血红素/G-四联体DNA酶的电化学传感器，可灵敏检测ALP活性(图3B)。将巯基功能化的DNA 1和3'-磷酸化的DNA 2形成的双链DNA探针固定在金纳米颗粒修饰的玻碳(GC)电极上。当ALP存在时，它催化DNA 2的3'-磷酸基团水解，产生3'-羟基端。随后，TdT催化DNA 2的3'-羟基端延伸出聚T序列。DNA 2的聚T序列能够与富含碱基G的DNA 3的聚A片段杂交，在血红素存在时形成血红素/G-四联体DNA酶。血红素/G-四联体脱氧核酶可将还原型辅酶I(NADH)氧化成辅酶I(NAD<sup>+</sup>)并产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>会进一步被血红素/G-四联体脱氧核酶催化，在硫堇(Thi)作为电子传递介质时产生增强的电化学信号。该方法的灵敏度高，检出限可达0.03 U·L<sup>-1</sup>，线性范围为0.1~5 U·L<sup>-1</sup>。且该生物传感器具有良好的选择性、重现性和稳定性。

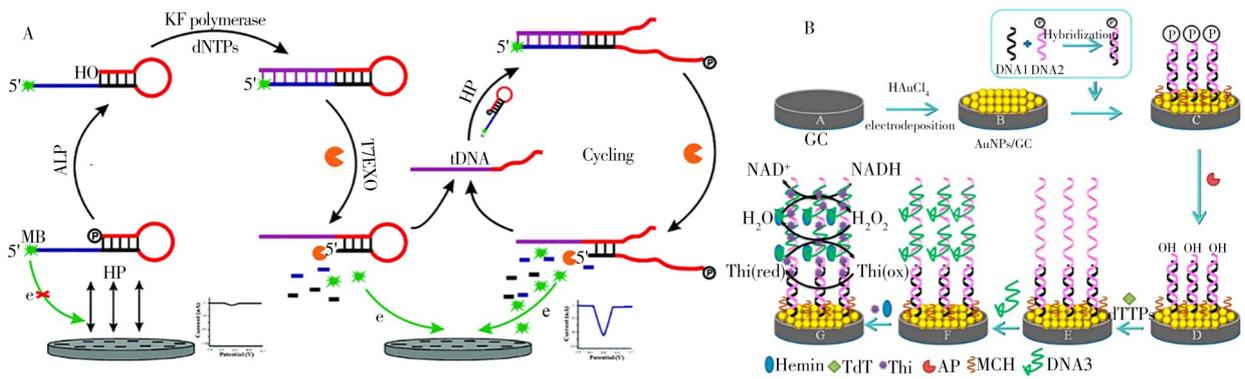


图3 均相电化学法检测ALP活性<sup>[43]</sup>(A)与基于DNA的电化学生物传感器检测ALP<sup>[44]</sup>(B)的原理示意图  
Fig. 3 Principles of homogeneously electrochemical detection of ALP activity<sup>[43]</sup>(A) and DNA-based electrochemical biosensor for ALP activity<sup>[44]</sup>(B)

### 1.3 表面增强拉曼散射法

表面增强拉曼散射(SERS)是由于拉曼探针与贵金属纳米表面接近而产生, 主要来自于金属粒子表面等离子体共振的光激发, 可以提供分子特异性指纹光谱。Sun等<sup>[45]</sup>利用表面增强共振拉曼散射(SERRS)结合液滴微流控技术, 对单细胞中ALP活性进行灵敏检测(图4A)。当BCIP与细胞共孵育时, ALP能催化无色的BCIP水解, 产生的中间产物经氧化生成蓝色物质5, 5'-二溴-4, 4'-二氯-1H, 1H-[2, 2']双吡啶基-3, 3'-二酮(BCI), BCI可以产生拉曼信号。该方法的检出限达 $1.0 \times 10^{-15}$  mol/L。

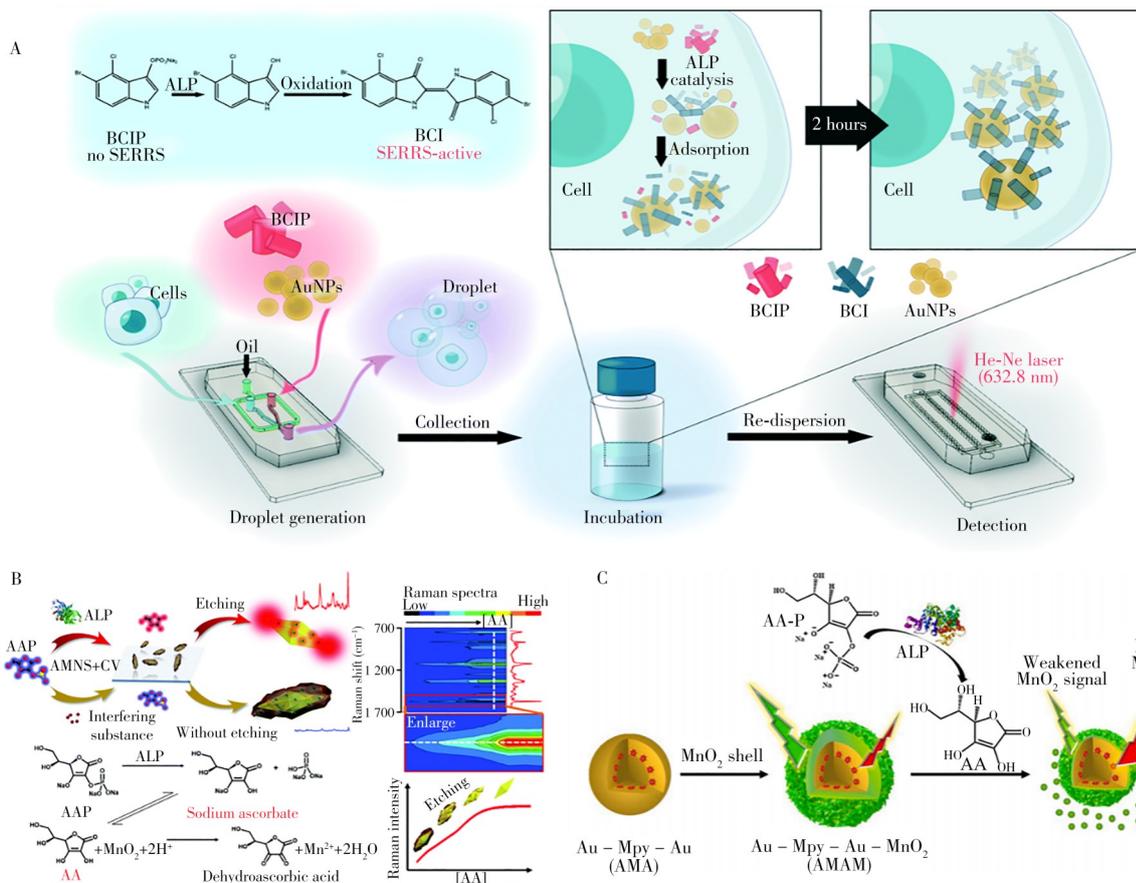


图4 SERS结合液滴微流控法检测单细胞中ALP活性<sup>[45]</sup>(A)、基于MnO<sub>2</sub>壳层厚度依赖性的结晶紫拉曼信号检测ALP活性<sup>[46]</sup>(B)以及用于ALP活性比率检测的AMAM SERS纳米探针<sup>[47]</sup>(C)的原理示意图  
Fig. 4 Schematic illustrations of the droplet-based microfluidic SERRS method for the detection of ALP activity in single cell<sup>[45]</sup>(A), ALP activity detection based on the MnO<sub>2</sub> shell thickness-dependent SERS signal from crystal violet<sup>[46]</sup>(B), and the AMAM SERS nanoprobe for ratiometric sensing of the alkaline phosphatase activity<sup>[47]</sup>(C)

Liu 等<sup>[46]</sup>开发了一种基于金纳米双锥体@MnO<sub>2</sub> 纳米颗粒(Nanobipyramids@MnO<sub>2</sub> nanoparticles, AMNS)的SERS方法,用于检测ALP活性(图4B)。ALP可将AAP水解为AA,AA能将MnO<sub>2</sub>还原为Mn<sup>2+</sup>,进而蚀刻AMNS的外壳,增强电磁场,导致吸附在金纳米双锥体表面上的结晶紫(CV)的拉曼信号强度增强。该方法的检出限为0.04 mU·mL<sup>-1</sup>,线性范围为0.4~20 mU·mL<sup>-1</sup>,有效克服了传统SERS方法标记效率低和耗时长的问题,在生物样品分析中具有良好的应用前景。另外,最新发展的比率型SERS纳米探针能有效减少实验干扰,提高SERS定量分析的准确度。Dai 等<sup>[47]</sup>开发了一种SERS纳米探针(Au-Mpy-Au-MnO<sub>2</sub>, AMAM),用于定量检测血清中ALP的活性(图4C)。MnO<sub>2</sub>壳层具有较强的拉曼振动信号 $I(\text{MnO}_2)$ ,可以作为拉曼参考。AMAM探针中4-巯基吡啶(Mpy)的拉曼强度 $I(\text{Mpy})$ 随着MnO<sub>2</sub>壳层的蚀刻而增强。该方法以 $I(\text{Mpy})/I(\text{MnO}_2)$ 作为输出信号,可同时进行比色和SERS分析,检出限为0.079 U·L<sup>-1</sup>,线性范围为0.1~70 U·L<sup>-1</sup>。该方法可用于直接检测未稀释的微量人血清中ALP的活性。

#### 1.4 荧光分析法

荧光发射是指物质被一定波长的光照射后跃迁到激发态,激发态分子通过辐射返回基态时发射出光量子的过程。荧光分析法可用于待测物质的定性和定量检测。ALP的荧光检测方法具有灵敏度高、选择性好和背景干扰小的优点<sup>[48-51]</sup>。Zhang 课题组<sup>[52]</sup>构建了一种基于循环扩增反应的荧光分析方法,可灵敏检测ALP活性(图5A)。首先,T7启动子与模板链杂交形成双链DNA。当ALP存在时,T7启动链5'端因去磷酸化而不能被λ外切酶(λ-exo)降解。T7启动链在T7 RNA聚合酶作用下激活转录反应,产生大量单链RNA(ssRNAs)。生成的单链RNA可与两端分别标有荧光基团羟基荧光素(FAM)和猝灭基团Eclipse的Taqman探针杂交形成RNA/DNA杂交体。双特异性核酸酶(DSN)能够降解Taqman探针,导致FAM荧光恢复,并释放单链RNA。释放的单链RNA可与新Taqman探针杂交,诱导循环降解Taqman探针,产生增强FAM荧光信号。该方法的灵敏度高,检出限达0.02 U·L<sup>-1</sup>,线性范围为0.05~1 U·L<sup>-1</sup>。Ma 等<sup>[53]</sup>发展了一种仅需1种连接酶即可实现信号放大的量子点纳米传感器,用于ALP的灵敏检测(图5B)。当ALP存在时,它可以催化检测探针3'-磷酸末端去磷酸化,生成3'-羟基末端。3'-羟基化的检测探针、5'-磷酸化的辅助探针和模板可形成检测探针-辅助探针-模板的“三明治”结构。在连接酶作用下,检测探针与辅助探针连接成一个二级模板。二级模板经过变性可与生物素(Biotin)标记的探针和5H-吡啶菁(Cy5)标记的探针形成biotin-Cy5探针。经过无数个退火-连接-变性循环过程,可以产生大量biotin-Cy5双标记信号探针。该探针能够自组装到表面修饰有链霉亲和素的量子点上,形成605 QD/信号探针/Cy5“三明治”结构,在605 QD和Cy5之间发生荧光共振能量转移,产生Cy5信号。该方法的检出限可达 $5.63 \times 10^{-7}$  U·mL<sup>-1</sup>,线性范围为 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-1}$  U·mL<sup>-1</sup>。方法非常简单,只需1种连接酶即可完成信号扩增,有效简化了实验步骤。

Wang 等<sup>[54]</sup>设计了一种基于循环指数扩增反应的ALP荧光检测方法(图5C)。当ALP存在时,3'-磷酸化的引物被去磷酸化,与发夹探针1(HP1)的3'凸出端杂交,启动第一次链置换扩增(SDA),产生触发引物1(Trigger1)和荧光信号。释放的触发引物1与发夹探针2(HP2)的3'凸出端杂交,以启动第二次SDA,产生触发引物2(Trigger2)和荧光信号。触发引物2又可与HP1的3'凸出端杂交,启动两个连续的SDA,产生增强的荧光信号。该方法可在等温条件下进行,灵敏度高,检出限达 $2.0 \times 10^{-10}$  U·μL<sup>-1</sup>,线性范围为 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-4}$  U·μL<sup>-1</sup>。

Wang 等<sup>[55]</sup>发展了一种更为简单的荧光方法,可一步定量检测人血清中的ALP(图5D)。该研究组设计了一种功能化的寡核苷酸探针-聚腺嘌呤分子信标(Poly-AMB),Poly-AMB上标记有1个BHQ1和1个彼此靠近的荧光团FAM,其3'末端修饰了1个磷酸基团,Poly-A被嵌入环中。当ALP存在时,它催化Poly-AMBs的3'端去磷酸化,诱导TdT介导的无模板扩增反应,产生长链聚胸腺嘧啶(Poly-T)序列。长链Poly-T可作为模板与多个Poly-AMBs杂交,导致Poly-AMBs环结构的展开和FAM/BHQ1的分离。随后,3'-羟基化的Poly-AMBs在TdT作用下延伸,生成分支长链Poly-T,导致大量FAM/BHQ1分离。经过循环延伸-组装-激活,Poly-AMBs自组装形成树突状DNA纳米结构,导致大量FAM/BHQ1分离,产生指数放大的荧光信号。该方法的检出限为 $3.2 \times 10^{-7}$  U·μL<sup>-1</sup>,线性范围为 $5 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-3}$  U·μL<sup>-1</sup>。该方法仅需1个DNA探针和1种工具酶,可在等温条件下一步完成ALP活性检测,具有灵敏度高和特异性好的优点。

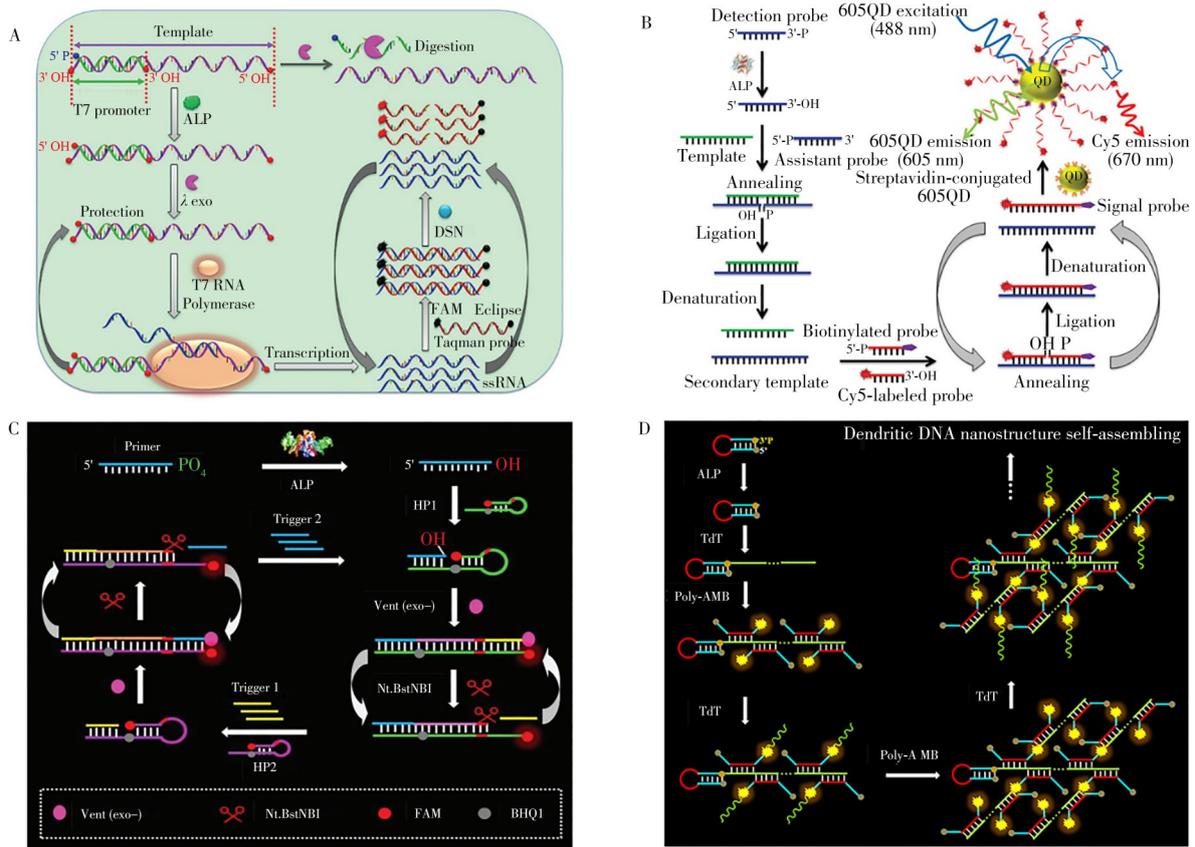


图5 基于去磷酸化启动的转录反应介导的双信号扩增方法检测 ALP 活性的示意图<sup>[52]</sup>(A); 基于连接酶扩增反应的单量子点纳米传感器检测 ALP 活性的示意图<sup>[53]</sup>(B); 基于引物去磷酸化启动的循环指数扩增方法检测 ALP 活性的示意图<sup>[54]</sup>(C); 3'端修复驱动驱动的 Poly-A 分子信标自组装形成树突状纳米传感器一步定量检测人血清中 ALP 的示意图<sup>[55]</sup>(D)

Fig. 5 Schematic illustration of ALP assay based on dephosphorylation-initiated transcription reaction-mediated dual signal amplification<sup>[52]</sup>(A); schematic illustration of ligase amplification reaction-catalyzed assembly of a single QD-based nanosensor for ALP assay<sup>[53]</sup>(B); schematic illustration of ALP assay based on primer dephosphorylation-initiated circular exponential amplification<sup>[54]</sup>(C); schematic illustration of the 3'-terminal repair-powered dendritic nanoassembly of Poly-A molecular beacons for one-step quantification of ALP in human serum<sup>[55]</sup>(D)

## 2 ALP 的体内成像

应当指出的是,上述方法大多不适用于细胞内成像。与传统的在可见波长范围内使用的荧光探针相比,近红外(NIR)荧光探针能够在 NIR 光谱区域成像,对生物体造成的光损伤小,受内源性组织自身荧光的干扰小<sup>[56]</sup>。Liu 等<sup>[57]</sup>发展了一种基于分子内电荷转移(ICT)原理,可用于活体检测 ALP 的近红外荧光探针 NALP(图 6A)。当 ALP 不存在时,磷酸基团保护 NIR 荧光团的羟基,使其无法发射荧光;当 ALP 存在时,磷酸基团被催化水解,释放 NIR 荧光团,产生增强的荧光信号。该探针具有良好的细胞膜通透性和极小的细胞毒性,线性范围为  $1 \sim 30 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,检出限达  $0.28 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,可用于裸鼠活细胞和肿瘤组织中内源性 ALP 的活体成像。类似地,Li 等<sup>[58]</sup>发展了一种基于半水杨酸的近红外荧光探针 CyP,可用于细胞、组织和动物活体内 ALP 的检测。

Park 等<sup>[59]</sup>合成了 2 种 NIR 探针(NIR-Phos-1 和 NIR-Phos-2),用于快速灵敏检测 ALP 活性。该 NIR 探针包含 1 个酚类二氢基蒽荧光团中心和 1 个添加磷酸基的磷酸盐(以增强其在水中的溶解度)。这两种 NIR 探针本身不发光,但经 ALP 催化去磷酸化后可以发出较强荧光。将 NIR 探针标记的骨样 3D CDHA 支架植入裸鼠皮下,可用于检测活体内的 ALP 活性。该探针的灵敏度高、选择性好,可在 1.5 min 内产生应答,对 NIR-Phos-1 和 NIR-Phos-2 的检出限分别为  $10^{-5} \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $10^{-3} \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,可用于活细胞和小鼠内源性 ALP 的原位成像。

单波长发射探针易受多种因素(例如光漂白、探针的不均匀分布和仪器变化)的影响。比率荧光探针可以有效地克服这些干扰,提高检测的准确度<sup>[60-62]</sup>。Zhang 等<sup>[63]</sup>设计了一种 NIR 比率荧光探针 APT

(图6B), 用于实时检测ALP活性。当ALP不存在时, 该探针的末端氨基(TMN)与1个吸电子酯基团相连, 导致电子云分散, APT发出黄色荧光。当ALP存在时, 氨基与ALP发生特异性反应, TMN电子云通过一系列的电子转移和自溶过程恢复, 发出红色荧光。该探针具有响应时间短(小于10 min)、检测线性范围宽、荧光背景低、适用于组织成像等优点, 可用于监测斑马鱼器官损伤引起的内源性ALP升高, 在病理分析中具有潜在的应用价值。

基于聚集诱导发射(AIE)原理的AIEgens(AIE luminogens)探针能够有效限制分子内运动, 提高成像分辨率和原位成像能力<sup>[64-65]</sup>。Li等<sup>[66]</sup>合成了一种可激活的AIEgens探针DQM-ALP, 用于ALP活性成像(图6C)。利用疏水的喹啉-丙二腈(QM)衍生物作为AIE核心, 亲水的磷酸基作为ALP识别单元。DQM-ALP分子在体外具有明显的荧光猝灭特征。ALP可以激活该探针, 诱导DQM-OH原位聚集, 从而限制其分子内运动, 产生AIE荧光。该方法的检出限为 $0.15 \text{ mU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 线性范围为 $0 \sim 60 \text{ mU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 可以有效区分小鼠正常组织和癌变组织。

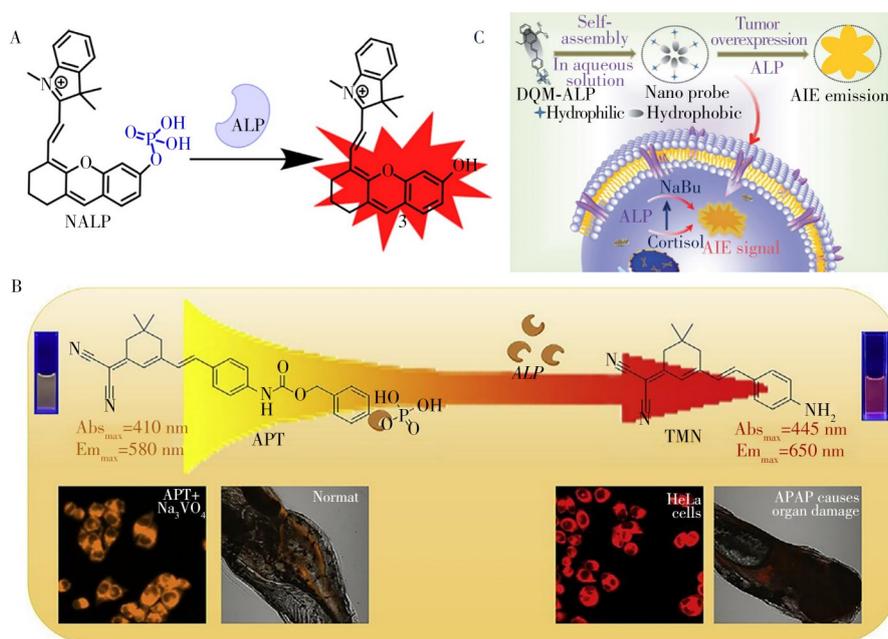


图6 NIR荧光探针NALP的结构及其对ALP的响应机制<sup>[57]</sup>(A); 利用NIR比率探针对活体内ALP成像的原理示意图<sup>[63]</sup>(B); DQM-ALP的组装及AIE在体外和细胞内的激活过程示意图<sup>[66]</sup>(C)

Fig. 6 Structure of NIR fluorescent probe NALP and the response mechanism of NALP towards ALP<sup>[57]</sup>(A); schematic illustration for *in vivo* imaging of ALP activity using the NIR ratiometric probe<sup>[63]</sup>(B); schematic illustration of the assembly of DQM-ALP and process of AIE activation *in vitro* and in cell<sup>[66]</sup>(C)

### 3 结论与展望

ALP是一种广泛分布于生物体内的可以催化蛋白质、核酸和小分子去磷酸化的水解酶, 其活性失调与多种疾病(例如骨质疏松、骨软化、胆道阻塞、肝硬化、败血症和癌症)密切相关, 因而ALP活性分析对疾病诊断具有重要意义。在目前已开发的ALP活性检测方法中, 比色法具有结果直观且无需复杂昂贵仪器的优点, 但灵敏度偏低, 为了获得更好的比色效果, 迫切需要开发具有更好显色性能的新探针。电化学法具有选择性好、成本低和仪器便携的优点, 但存在信号相对较弱、灵敏度较低、ALP底物合成复杂和需使用多种工具酶等缺陷, 需要逐一解决和克服。表面增强拉曼散射法具有灵敏度高和能够提供分子特异性指纹光谱的优点, 然而操作复杂和拉曼信号不稳定仍是迫切需要解决的问题。荧光分析法具有灵敏度高、选择性好、原位实时、背景干扰小和具备活体成像能力的优点, 但在检测特异性、荧光穿透、成像分辨率方面仍存在一定的局限性。基于NIR探针和AIEgens探针的活体成像实现了从体外检测到体内成像的跨越, 但很难实现准确定量, 同时在区分碱性磷酸酶的亚型方面还存在不足。通过对ALP检测研究的回顾, 不难发现ALP检测方法的持续快速发展在很大程度上取决于纳米材料和DNAzymes等新型材料的发现以及这些新型材料与ALP的生物相容性, 因此, 开发更多与

ALP具有生物相容性的新型材料可能是未来ALP活性检测领域的研究热点。值得关注的是,单分子检测作为一种近年来涌现的新技术具有样品消耗低和灵敏度高优点,在ALP活性检测研究中具有广阔的应用前景。另外,链置换扩增、滚环扩增和连接酶链式反应等新型高效扩增技术的引进,将极大促进ALP活性检测方法的飞速发展。

#### 参考文献:

- [1] Coleman J E. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1992**, 21: 441–483.
- [2] Millán J L. *Purinergic Signal.*, **2006**, 2: 335–341.
- [3] Guo J T, Yu H B, Cui T T. *J. Biomed. Mater. Res.*, **2021**, 109(2): 214–226.
- [4] Cohen P. *Trends Biochem. Sci.*, **2000**, 25(12): 596–601.
- [5] Yaffe M B. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2002**, 3(3): 177.
- [6] Johnson L N, Lewis R J. *Chem. Rev.*, **2001**, 101(8): 2209–2242.
- [7] Julien S G, Dubé N, Hardy S, Tremblay M L. *Nat. Rev. Cancer*, **2010**, 11(1): 35.
- [8] Alonso N, Larraz-Prieto B, Berg K, Lambert Z, Redmond P, Harris S E, Deary I J, Pugh C, Prendergast J, Ralston S H. *J. Bone Miner. Res.*, **2020**, 35(4): 657–661.
- [9] Zhu S, Yang Y H, Gao R W, Li R, Zou Y Z, Feng L, Zhang B. *Drug Des. Devel. Ther.*, **2018**, 12: 41–45.
- [10] Jersky J. *Gut*, **1974**, 15(8): 636–643.
- [11] Liu Y, Cavallaro P M, Kim B M, Liu T, Wang H, Kühn F, Adiliaghdam F, Liu E, Vasani R, Samarbafzadeh E, Farber M Z, Li J, Xu M, Mohad V, Choi M, Hodin R A. *Theranostics*, **2021**, 11(1): 14–26.
- [12] Pickkers P, Mehta R L, Murray P T, Joannidis M, Molitoris B A, Kellum J A, Bachler M, Hoste E A J, Hoiting O, Krell K, Ostermann M, Rozendaal W, Valkonen M, Brealey D, Beishuizen A, Meziani F, Murugan R, de Geus H, Payen D, van den Berg E, Arend J. *J. Am. Med. Assoc.*, **2018**, 320(19): 1998–2009.
- [13] Bramer J A, Abudu A A, Tillman R M, Carter S R, Sumathi V P, Grimer R J. *Eur. J. Cancer*, **2005**, 41(18): 2846–2852.
- [14] Xiao Y Y, Lu J, Chang W, Chen Y, Li X M, Li D H, Xu C Z, Yang H J. *BMC Cancer*, **2019**, 19(1): 785.
- [15] Ravenni N, Weber M, Neri D. *MAbs*, **2014**, 6(1): 86–94.
- [16] Wada H G, Shindelman J E, Ortmeyer A E, Sussman H H. *Int. J. Cancer*, **1979**, 23(6): 781–787.
- [17] Ramaswamy G, Rao V R, Krishnamoorthy L, Ramesh G, Gomathy R, Renukadevi D. *Indian J. Clin. Biochem.*, **2000**, 15(2): 110–113.
- [18] Jin L Y, Dong Y M, Wu X M, Gao G X, Wang G L. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(20): 10429–10436.
- [19] Wang L J, Ye K, Pan J M, Song H W, Niu X H. *Anal. Methods*, **2019**, 11(18): 2374–2377.
- [20] Sun J, Zhao J H, Bao X F, Wang Q F, Yang X R. *Anal. Chem.*, **2018**, 90(10): 6339–6345.
- [21] Huang X C, Bian X B, Chen L F, Guo L H, Qiu B, Lin Z Y. *Anal. Chem.*, **2021**, 93(29): 10351–10357.
- [22] Tian J Y, Yang Y T, Huang M J, Zhou C H, Lu J S. *Talanta*, **2019**, 196: 293–299.
- [23] Yan X Y, Bai Y Y, Huangfu Y Y, Guo W J, Yang Y J, Pang D W. *Anal. Chem.*, **2021**, 93(3): 1757–1763.
- [24] Zeng Y, Ren J Q, Wang S K, Mai J M, Qu B, Zhang Y, Shen A G, Hu J M. *ACS Appl. Mater. Interface*, **2017**, 9(35): 29547–29553.
- [25] Zhang J, He L F, Zhang X, Wang J P, Yang L, Liu B H, Jiang C L, Zhang Z P. *Sens. Actuators B*, **2017**, 253: 839–845.
- [26] Sun D, Xu W Q, Liang C Y, Shi W, Xu S P. *ACS Sens.*, **2020**, 5(6): 1758–1767.
- [27] Qian Z S, Chai L J, Tang C, Huang Y Y, Chen J R, Feng H. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(5): 2966–2973.
- [28] Zhang X, Ren C H, Hu F, Gao Y, Wang Z Y, Li H Q, Liu J F, Liu B, Yang C H. *Anal. Chem.*, **2020**, 92(7): 5185–5190.
- [29] Yao D Y, Yang S Y, Wang Y S, Bian K X, Yang W T, Wang D B, Zhang B B. *Nanoscale*, **2019**, 11(13): 6307–6314.
- [30] Jie X, Wu M, Yang H M, Wei W L. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(20): 13174–13182.
- [31] Gao X T, Ma G C, Jiang C, Zeng L L, Jiang S S, Huang P, Lin J. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(11): 7112–7117.
- [32] Wu T T, Ma Z Y, Li P P, Liu X Y, Li H T, Zhang Y Y, Yao S Z. *Talanta*, **2019**, 202: 354–361.
- [33] Xie X L, Wang Y F, Zhou X B, Chen J Y, Wang M K, Su X G. *Analyst*, **2020**, 146(3): 896–903.
- [34] Zhou X B, Wang M J, Wang M K, Su X G. *ACS Appl. Nano Mater.*, **2021**, 4(8): 7888–7896.
- [35] Mahato K, Chandra P. *Biosens. Bioelectron.*, **2019**, 128: 9–16.
- [36] Molina P, Tárraga A, Caballero A. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 22: 3401–3417.
- [37] Beer P D. *Chem. Soc. Rev.*, **1989**, 18: 409–450.

- [38] Beer P D, Gale P A, Chen G Z. *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 185/186: 3–36.
- [39] Staveren D R V, Metzler–Nolte N. *Chem. Rev.*, **2004**, 104(12): 5931–5986.
- [40] Goggins S, Naz C, Marsh B J, Frost C G. *Chem. Commun.*, **2015**, 51(3): 561–564.
- [41] Wang W B, Lu J, Hao L L, Yang H X, Song X J, Si F C. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2021**, 413(7): 1827–1836.
- [42] Zhu X, Wang W B, Lu J, Hao L L, Yang H X, Liu Y J, Si F C, Kong J M. *Anal. Chim. Acta*, **2021**, 1185: 339069.
- [43] Zhang L F, Hou T, Li H Y, Li F. *Analyst*, **2015**, 140(12): 4030–4036.
- [44] Liu Y Q, Xiong E H, Li X Y, Li J J, Zhang X H, Chen J H. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 87: 970–975.
- [45] Sun D, Cao F H, Cong L L, Xu W Q, Chen Q D, Shi W, Xu S P. *Lab Chip*, **2019**, 19(2): 335–342.
- [46] Liu H, Wei L, Hua J H, Chen D, Meng H M, Li Z H, Xiao L H. *Nanoscale*, **2020**, 12(18): 10390–10398.
- [47] Dai X, Lu L W, Zhang X H, Song Z L, Song W J, Chao Q Q, Li Q, Wang W, Chen J F, Fan G C, Luo X L. *Sens. Actuators B*, **2021**, 334: 129605.
- [48] Peng C, Xue Y, Zhu X Y, Fan Y C, Li J, Zhang E K. *Anal. Chem.*, **2022**, 94(2): 1465–1473.
- [49] Liu H W, Chen L, Xu C, Li Z, Zhang H, Zhang X B, Tan W. *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, 47(18): 7140–7180.
- [50] Zhang J, Chai X, He X P, Kim H J, Yoon J, Tian H. *Chem. Soc. Rev.*, **2019**, 48(2): 683–722.
- [51] Qiao Z, Zhang H, Zhang Y, Wang K. *iScience*, **2020**, 23(7): 101294.
- [52] Ma F, Liu W J, Liang L, Tang B, Zhang C Y. *Chem. Commun.*, **2018**, 54(19): 2413–2416.
- [53] Ma F, Liu M, Zhang C Y. *Chem. Commun.*, **2019**, 55(61): 8963–8966.
- [54] Wang L J, Wang Z Y, Zhang C Y. *Analyst*, **2018**, 143(19): 4606–4613.
- [55] Wang L J, Liu H, Zou X R, Xu Q F, Zhang C Y. *Anal. Chem.*, **2021**, 93(30): 10704–10711.
- [56] Quek C H, Leong K W. *Nanomaterials*, **2012**, 2(2): 92–112.
- [57] Liu H W, Hu X X, Zhu L M, Li K, Rong Q M, Yuan L, Zhang X B, Tan W H. *Talanta*, **2017**, 175: 421–426.
- [58] Li S J, Li C Y, Li Y F, Fei J J, Wu P, Yang B, Ouyang J, Nie S X. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(12): 6854–6860.
- [59] Park C S, Ha T H, Kim M, Raja N, Yun H S, Sung M J, Kwon O S, Yoon H, Lee C S. *Biosens. Bioelectron.*, **2018**, 105: 151–158.
- [60] Lee M H, Kim J S, Sessler J L. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44(13): 4185–4191.
- [61] Zhang X X, Hao W, Peng L, Qiu Z J, Tan M Q, Han K L. *Chem. Commun.*, **2016**, 52(53): 8283–8286.
- [62] Zhang X X, Zhou Y, Gu X F, Cheng Y, Hong M X, Yan L Q, Ma F L. *Talanta*, **2018**, 186: 413–420.
- [63] Zhang X Y, Chen X Z, Liu K Z, Zhang Y Y, Gao G, Huang X Q, Hou S C. *Anal. Chim. Acta*, **2020**, 1094: 113–121.
- [64] Huang L, Cao X Z, Gao T, Feng B, Huang X Y, Song R, Du T, Wen S J, Feng X P, Zeng W B. *Talanta*, **2021**, 225: 121950.
- [65] Liu H W, Li K, Hu X X, Zhu L M, Rong Q M, Liu Y C, Zhang X B, Hasserodt J, Qu F L, Tan W H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56(39): 11788–11792.
- [66] Li H D, Yao Q C, Xu F, Li Y Q, Kim D, Chung J, Baek G, Wu X F, Hillman P F, Lee E Y, Ge H Y, Fan J L, Wang J Y, Nam S J, Peng X J, Yoon J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59(25): 10186–10195.

(责任编辑: 丁 岩)