



基于上转换纳米材料的免疫检测技术应用*

黄惠威¹⁾ 李丽华²⁾ 罗 林¹⁾ 沈玉栋¹⁾ 雷红涛¹⁾ 徐振林^{1)**}

(¹⁾ 华南农业大学食品学院, 广东省食品质量安全重点实验室, 广州 510642; ²⁾ 华南师范大学未来科技研究院, 广州 510631)

摘要 免疫分析法具有简便、快速、准确等特点, 广泛应用于医学、食品、环境等领域检测, 将免疫分析方法与纳米材料相结合可以提高免疫分析的性能。与传统纳米材料相比, 上转换纳米颗粒 (upconversion nanoparticles, UCNPs) 具有光稳定性好、发光寿命长和狭窄及可调整的发射带等优秀的光学性质, 与免疫分析相结合可显著降低背景噪声, 提高分析灵敏度。本文简要介绍了 UCNPs 的发光机制, 对 UCNPs 的合成和表面修饰方法进行了总结, 并详细论述荧光共振能量转移、内滤效应、磁分离技术、上转化连接免疫吸附技术和上转换免疫层析技术五种基于 UCNPs 的免疫检测技术, 最后对该技术所面临的挑战和前景进行总结和展望, 以期 UCNPs 免疫检测技术的发展提供理论指导。

关键词 上转换纳米颗粒, 合成方法, 表面修饰方法, 免疫检测技术

中图分类号 TB383

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0131

免疫分析方法是指基于抗原抗体特异性结合建立的方法, 主要检测与食品安全、人类健康和环境污染有关的小分子、大分子和病原体等目标物。与常规理化分析方法相比, 免疫分析方法具有灵敏度高、特异性强、简单快捷、成本低、安全可靠和便于现场快速检测等优点^[1-2], 在医学、食品和环境等领域应用广泛。免疫分析方法与量子点、贵金属纳米颗粒和上转换纳米颗粒 (upconversion nanoparticles, UCNPs) 等信号增强材料结合可以显著降低检测限, 提高灵敏度。UCNPs 是由 Bloembergen 首次提出的一系列能将低能量的近红外光转化为高能量的紫外/可见光的发光纳米材料。与有机染料、量子点、荧光蛋白、金属复合物、半导体和贵金属纳米颗粒等传统纳米材料相比, UCNPs 具有反斯托克斯位移宽、无自体荧光背景、组织穿透能力较强、生物低毒性和对样品损伤小等独特优势而引起广泛关注^[3-5]。

UCNPs 表面易修饰识别分子, 具有高效的传感性能, 常被设计为免疫检测传感器。构建 UCNPs 免疫检测传感器需要抗体、适配体、酶和有机分子等识别配体^[6]。抗体对蛋白质、细胞或其他大分子物质具有高特异性, 通常被修饰在 UCNPs 表面, 广泛应用于医学、食品、环境等免疫检测领域。常见的抗体包括单克隆抗体和多克隆

抗体, 抗原结合片段、纳米抗体和单链抗体等基因工程抗体近几年也被修饰在 UCNPs 表面, 但应用相对较少^[7]。基因工程抗体具有高亲和力、高表达量、高稳定性以及较低生产成本等优点^[8], 有望成为下一代抗体识别配体。基于 UCNPs 的免疫检测传感器由于成本较低、灵敏度高、特异性强和操作简便等优势具备巨大潜力^[9], 主要的应用研究有荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)、内滤效应 (inner filter effect, IFE)、磁分离技术、上转化连接免疫吸附技术 (upconversion-linked immunosorbent assay, ULISA) 和上转换免疫层析技术。

本文简要介绍 UCNPs 的发光机制, 阐述 UCNPs 的合成和表面修饰方法, 重点综述基于 UCNPs 的免疫检测技术并对该技术所面临的挑战和前景进行总结和展望。

* 国家重点研发计划 (2023YFF1105002), 国家自然科学基金 (32061160473), 广东省科技创新战略专项资金基础研究重大项目 (2020B0301030005) 和广东省基础与应用基础研究基金区域联合基金重点项目 (2021B1515120042) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 020-85283448, E-mail: xzlin@scau.edu.cn

收稿日期: 2023-04-07, 接受日期: 2023-05-29

1 稀土元素掺杂的UCNPs发光机制

上转换发光一般是发生在有机或无机材料中, 通过不同机制吸收两个或多个光子并发射比激发波长短的光的反斯托克斯发光过程^[10]。上转换发光材料采用低频率(如近红外光)光子激发, 而低频率光具有组织穿透性强、对生物组织低损伤和降低背景荧光干扰等优势, 因此上转换发光材料广泛应用于生物医学、食品和环境检测等领域。稀土元素掺杂的UCNPs通常由敏化剂(Yb^{3+})、激活剂(Er^{3+} 、 Ho^{3+} 、 Nd^{3+} 和 Tm^{3+} 等)和无机晶体基质构成^[11], 可能存在激发态吸收、能量转移上转换、光子雪崩、合作敏化上转换、合作上转换、交叉弛豫、能量迁移上转换和能量级联上转换8种上转换发光机制^[12](图1)。本文将简述3种常见的上转换发光机制: 激发态吸收、能量转移上转换和光子雪崩。激发态吸收是UCNPs最主要的发光机制, 由单个 Ln^{3+} 活性离子连续吸收两个低能光子, 使激

发态 E_2 发生上转换发光, 激发态 E_1 的稳定性则决定了上转换发射效率, 激发态 E_1 越稳定上转换发光效率越高。除了连续吸收双光子模型的激发态吸收, 连续离子间的能量转移也会产生高效的上转换发光。能量转移上转换发生在激发态 E_1 的敏化剂离子和激活剂离子中。激活剂离子吸收敏化剂离子转移的能量后使敏化剂离子回到基态, 而激活剂离子提升到激发态 E_2 , 实现高效的上转换发光。光子雪崩是由激发态吸收与交叉弛豫结合产生的一个环形过程。低激光功率下, 离子2的激发态 E_1 显示低效激发态吸收; 高激光功率下, 高效激发态吸收增加了离子2的激发态 E_2 群体, 因此离子2和离子1之间会发生高效的交叉弛豫。之后离子1将能量转移到离子2的 E_1 态, 形成完整循环。循环过程中基态的单个离子最终会生成两个离子, 两个离子跃迁至 E_1 态, 像雪崩一样以指数方式产生离子, 持续上转换发光。稀土元素掺杂的UCNPs可以提高上转换发光效率或强度, 具有较长的能级寿命, 因此具有较优越的发光性能。

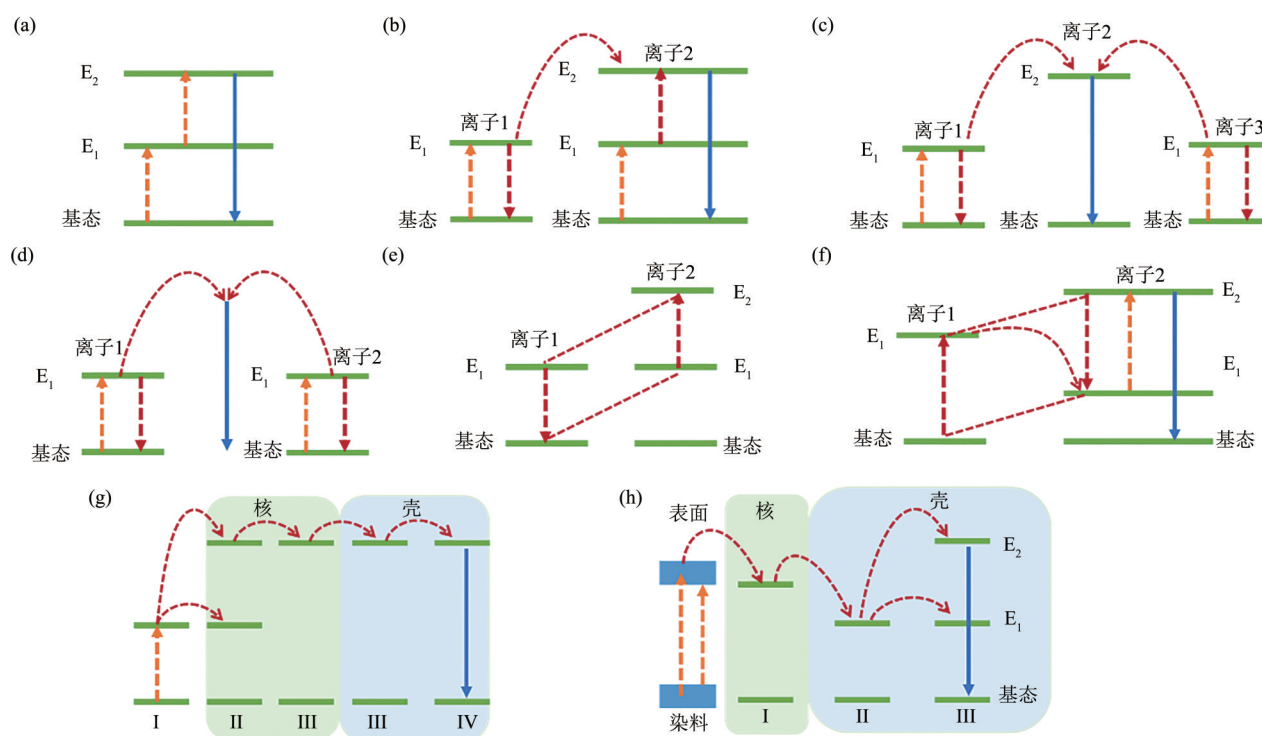


Fig. 1 Simplified energy level diagram of the upconversion luminescence mechanism

图1 上转换发光机制简化能级图

(a) 激发态吸收; (b) 能量转移上转换; (c) 合作敏化上转换; (d) 合作上转换; (e) 交叉弛豫; (f) 光子雪崩; (g) 能量迁移上转换; (h) 能量级联上转换。

2 UCNPs合成方法

UCNPs 的尺寸、形状、晶体结构和单分散性等因素受合成方法的影响^[13], 因此选择合适的合成方法对提高上转换发光效率, 探索其化学和光学性能以及在不同领域的潜在应用至关重要^[14]。UCNPs 的合成方法主要包括共沉淀法^[15-17]、热分解法^[18-20]、水热(溶剂热)法^[21-24]、溶胶-凝胶法^[25-27]、微乳法^[28]和燃烧法^[29-32]等, 下面简述3种最常见的UCNPs合成方法: 共沉淀法、热分解法和水热法。3种合成方法的优缺点对比如表1所示, 期待研究人员未来能够取长补短, 改善技术短板, 促进UCNPs合成方法的发展。

共沉淀法一般包括混合物形成、成核生长、沉淀、过滤和煅烧5个步骤, 是将沉淀剂加入可溶性盐溶液, 溶液中的全部不溶物被析出, 再把不溶物进行洗涤、干燥和退火等处理得到所需材料^[33]。由于共沉淀法具有简单、环保、低成本和高回收率等优点, 在工业应用中是最有前景的合成方法之一^[34-35]。但该方法常因为沉淀剂或其他离子局部浓度过高造成尺寸不均和形貌差异等问题, 而且高温煅烧过程增加了实验风险, 限制了该方法的广泛

应用。因此常添加聚乙烯吡咯、聚乙烯亚胺或乙二醇四乙酸等稳定剂使沉淀物发生配位化合反应^[36-37]控制UCNPs高效生长。

热分解法又称热解法, 在无水厌氧环境添加油酸和十八烯等常用的高沸点有机溶剂制备稀土有机化合前体物, 进而在短时间内合成尺寸和形状可控, 单分散性好且发光效率高的油溶性UCNPs。但该方法存在反应温度高、反应时间长、需无水厌氧环境、成本高、风险高、会产生毒物和污染环境等缺点, 因此期待研究人员未来改善这些技术短板, 促进该方法的更广泛应用^[6]。

与可以仅使用高沸点有机溶剂的热分解法相比, 水热法是以水溶液为基础的一种著名合成方法, 反应温度较低和对环境较友好。水热法是在水溶液中混合 HF、NH₄F、NaF、KF 和 NH₄HF₂ 等氟化物、氯化物、硝酸盐和氧化物等廉价的前体, 密封后转移到高压灭菌器中加热到熔点或高于熔点合成UCNPs。水热法可通过调控反应时间、温度、介质pH值和反应物浓度等反应参数, 控制UCNPs的形状、大小和晶体结构^[38]。但该方法合成的UCNPs尺寸一般较大会影响灵敏度, 且处于密闭环境, 不便观测UCNPs晶体的生长。

Table 1 Advantages and disadvantages of commonly methods for the preparation of UCNPs

表1 合成UCNPs的常用方法的优缺点

方法	优点	缺点	文献
共沉淀法	环保便宜, 操作简单, 产率高	高温煅烧, 尺寸不均, 形状差	[39-42]
热分解法	尺寸较均匀, 形状较好, 单分散好, 质量好	反应温度较高, 条件要求高, 难溶于水	[43-46]
水热法	反应温度较低, 尺寸和结构可控, 操作简单, 效果好	晶体生长过程无法获得, 尺寸较大	[47-49]

3 UCNPs表面修饰方法

UCNPs 合成方法不同会产生不同的表面特性造成表面修饰基团和修饰方法不同, 修饰基团的差异则会影响修饰功能和表面识别配体的修饰效率。表面亲水性修饰和表面靶向性修饰是UCNPs的两大基本表面修饰方法^[50]。表面亲水性修饰对提高疏水性配体覆盖的UCNPs偶联识别配体能力, 进而高特异性结合目标物具有十分重要的意义。本文将详细阐述6种常用的表面亲水性修饰方法(图2), 分别是配体交换法、配体去除法、配体氧化法、表面硅烷化法、两亲聚合物涂层法、逐层组装法。

3.1 配体交换法

UCNPs 最常用的合成溶剂油酸^[51]和油胺^[52]会使其表面覆盖一层疏水基团, 难以分散于水中。配体交换法属于最常用的修饰方法之一, 是将UCNPs表面疏水基团替换成亲水基团, 帮助改善亲水性。常用的亲水性配体有聚丙烯酸^[53]、聚乙二醇^[54]、聚乙烯吡咯烷酮^[55]、聚乙二醇磷酸酯^[56]、柠檬酸^[57]、巯基癸酸^[58]、巯基丙酸^[59]、己二酸^[60]、3-二巯基丁二酸^[61]、聚酰胺胺^[62]、葡聚糖^[63]、壳聚糖^[64]等。配体附带的功能团不仅会增强UCNPs亲水性, 改善生物相容性, 而且会极大提高识别配体的偶联率。但是小分子层的覆盖会增加颗粒厚度, 降低UCNPs的发光性能, 造成免疫检测灵敏度的降低。

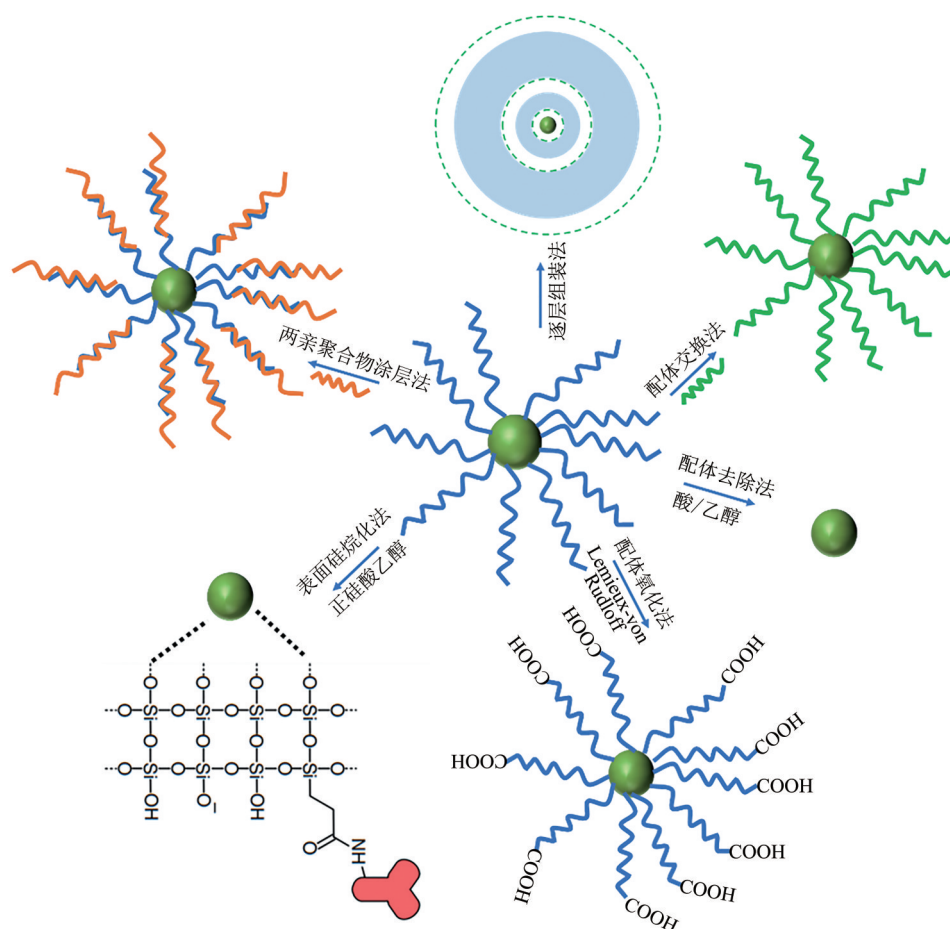


Fig. 2 Simplified surface hydrophilic modification method

图2 简化的表面亲水性修饰方法图

3.2 配体去除法

与配体交换法相比,配体去除法会减少粒径或粒径增加较少,是一种简单、高效、低成本的UCNPs表面修饰方法^[65]。为了去除表面疏水性配体,一般使用酸或乙醇进行搅拌或超声。但处理结束后的UCNPs易聚集,需要通过含有羟基、羧基、氨基和巯基等基团的水溶性新配体进行表面修饰。新配体能够直接附着在表面,能够很好偶联识别配体,获得特异性强、高质量和水溶性好的UCNPs传感器^[66],对UCNPs免疫检测技术具有十分重要的意义。

3.3 配体氧化法

与其他表面修饰方法相比,配体氧化法对UCNPs的形态、相位、组成和发光性能不会产生明显影响,能够直接修饰生物分子。配体氧化法是利用强氧化剂选择性地表面疏水性配体的碳碳双键氧化成亲水性羧基,成功解决UCNPs疏水性问

题。Chen等^[67]首次使用Lemieux-von Rudloff试剂将表面油酸配体氧化为壬二酸,表面存在的羧基,使UCNPs易于在水中分散且有助于生物分子的修饰,大幅度提高检测技术灵敏度和特异性。但该方法氧化反应时间长、产量低、易于聚集,仅适用未被氧化和表面含有碳碳双键的UCNPs,因此限制了该方法的广泛使用。

3.4 表面硅烷化法

表面硅烷化法是一种在UCNPs上覆盖硅壳隔绝水,防止发射猝灭的表面修饰方法,使UCNPs具有高亲水性、高透光性、低毒性、易功能化、良好的生物相容性等优点^[68]。Stöber法^[69]和反向微乳法^[70]是两种常见的硅烷化方法,两种方法使用的试剂不同。Stöber法使用硅酸四乙酯、氨和乙醇发生化学反应,硅酸四乙酯在水解作用下会均匀的覆盖在UCNPs的表面形成二氧化硅层。反向微乳法则是利用硅酸四乙酯、氨、环己烷和表面活性剂

发生化学反应, 使二氧化硅均匀生长在疏水性 UCNP_s 表面。但是二氧化硅包裹的颗粒容易聚集, 影响颗粒溶解度和分散性, 因此需要修改表面亲水基团, 提高颗粒稳定性, 进一步提高 UCNP_s-生物分子复合物偶联率。而且二氧化硅在水溶液中的稳定性较差和增加 UCNP_s 粒径, 从而降低免疫检测技术的灵敏度, 因此控制二氧化硅层的厚度从而控制复合物颗粒的粒径尺寸。

3.5 两亲聚合物涂层法

与表面硅烷化法相比, 两亲聚合物涂层法不仅极大提高了 UCNP_s 的亲水性, 而且提高了 UCNP_s 在水溶液中的单分散性和稳定性^[71]。该方法是通过疏水相互作用使两亲聚合物的疏水端与 UCNP_s 表面的疏水性配体结合, 从而暴露亲水端。常见的两亲聚合物有聚己内酯-聚乙炔聚乙二醇、聚丙交酯-聚(乙二醇)、6-氨基己酸、聚(甲基丙烯酸-共十八烯)、聚(苯乙烯-顺丁烯二酸酐)等^[72-74]。但是两亲聚合物一般难以制造和提纯, 会增加成本和粒径, 不利于建立免疫检测技术, 因此需要科研人员未来改善该方法劣势, 促进基于 UCNP_s 的免疫检测技术的进步。

3.6 逐层组装法

逐层组装法是指不同电荷的聚合物分子间会相

互吸引, 然后自组装到 UCNP_s 表面, 具有操作简单、尺寸和形状可控等优点。但一些聚合电解质浓度会影响多层聚合物的形成和增加 UCNP_s 厚度, 例如依靠静电吸附作用力形成的逐层自组装颗粒在复杂样本中可能出现分子脱附造成修饰结构不稳定, 因此与其他方法相比, 逐层组装法应用较少。

4 基于UCNP_s的免疫检测技术

通过掺杂不同的稀土元素可以调整 UCNP_s 的发光性能。但是 UCNP_s 需要实现高效的传感性能, 表面需要进行生物功能性修饰, 连接识别配体。常用的 UCNP_s 识别配体有抗体、适配体、有机分子、分子印迹聚合物、酶、共价有机框架和金属离子等。抗体一般是指受到抗原刺激后由免疫细胞产生的保护性蛋白, 可对某一特定对象表现出高特异性, 主要有多克隆抗体、单克隆抗体和基因工程抗体。单克隆抗体具有高纯度、高特异性、高效力等优点, 是最常用的 UCNP_s 传感器识别分子^[75]。近几年基因工程抗体修饰在 UCNP_s 表面的方法也在发展, 有望成为下一代广泛应用的抗体识别配体。本文基于 UCNP_s 的 5 种典型免疫检测技术进行了总结 (图 3), 分别是 FRET、磁分离技术、ULISA、IFE 和上转换免疫层析技术。

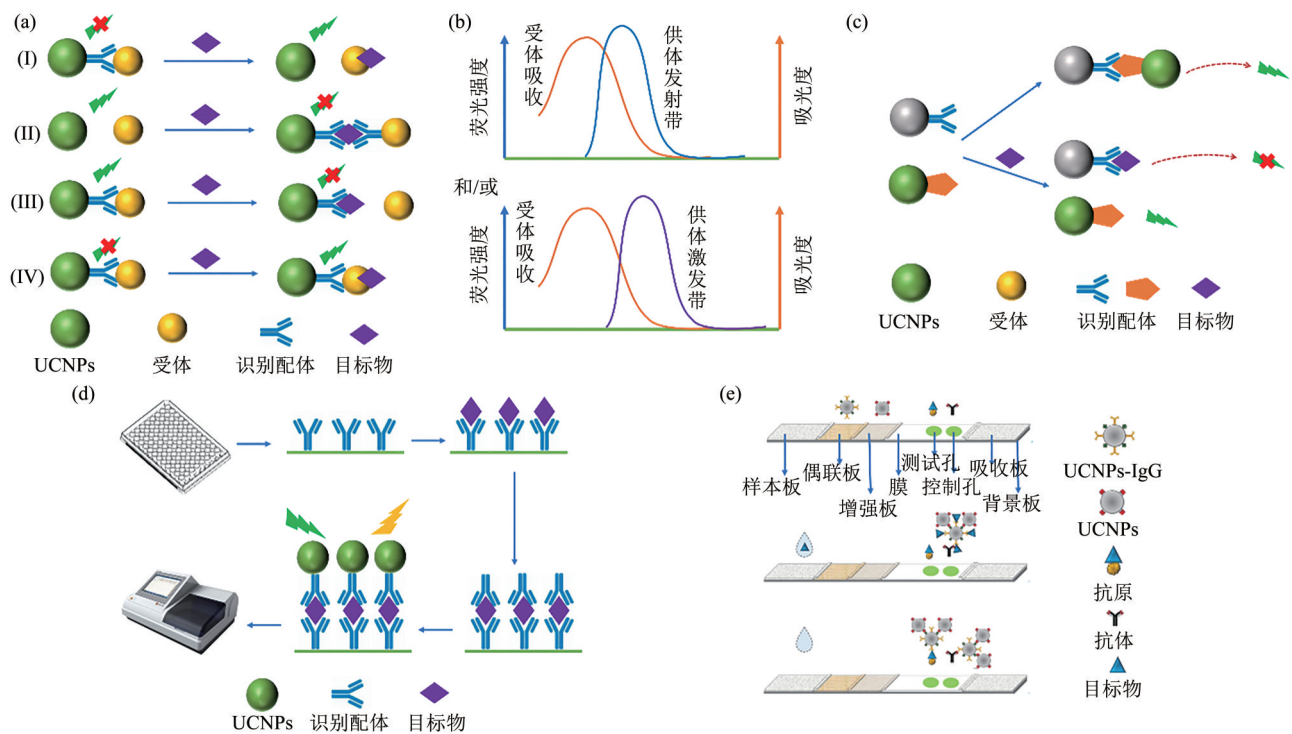


Fig. 3 Strategies for the construction of upconversion based sensors

图3 基于上转换传感器的构造策略

(a) FRET; (b) IFE; (c) 磁分离技术; (d) ULISA; (e) 上转换免疫层析技术。

4.1 基于UCNPs的FRET

上转换免疫检测传感器的研究大部分是基于FRET原理。FRET是一种均相分析检测技术^[76],指通过静电偶极-偶极相互作用将供体荧光体的能量转移到受体荧光体的非辐射性能量转移过程^[77]。一般UCNPs作为能量供体,荧光染料、碳纳米材料、贵金属纳米材料和半导体纳米材料等作为能量受体。只有供体与受体距离足够近且供体发射光谱与受体吸收光谱重叠时才可以发生FRET^[78]。Li等^[79]首次基于特制的UCNPs和金纳米颗粒之间的FRET效应,开发了一种超快速、灵敏、现场检测严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)刺突蛋白的定性定量方法,检测限(LOD)低至1.06 pg/L,线性检测范围为2~32 pg/L。所建立方法优于以往报道的即时生物传感器,为未来的现场快速病毒筛查和即时诊断铺平了新的道路。更关键的是这种设计可以扩展到其他抗原、抗体和蛋白质的检测(表2)。目前也有一些研究基于抗原结合片段、纳米抗体和单链抗体等基因工程抗体建立FRET,该技术的进步将为各种生物分析应用开辟新途径,包括检测蛋白质生物标记物、激素、滥用药物、食物和环境毒素等^[80]。基于FRET的一步免疫分析适用于非专业终端用户,为开发用户友好、

可靠的现场检测奠定良好基础。但传统的FRET方法无法实现高通量检测,因此Shan等^[81]设计了一种基于均质FRET的酶联免疫吸附试验,它不仅具有相当简单的样品预处理操作和简单的一步孵化操作,而且具有灵敏度十分高和高通量的样品检测能力,检测速度快,可在35 min内检测出96孔板中的猪流行性腹泻病毒,检测限低至 $TCID_{50}$ (组织培养感染剂量中位数) $10^4/L$,比胶体金试纸免疫检测技术的灵敏度高10倍。通过验证临床样品,也证明该方法准确性高、重复性高和特异性良好。该方法可很好用于现场检测,为猪流行性腹泻病毒的多样本现场检测提供了一种有前途的方法,在猪业领域具有巨大潜力。虽然基于FRET的酶联免疫吸附方法可以很好用于快速筛选和高通量检测,但由于该方法背景信号相对较高导致灵敏度有限,为了获得更高的灵敏度,未来可将单分子技术与FRET免疫分析法相结合,特别是可现场实施的技术,从而大幅度减少背景值,显著提高灵敏度。

4.2 基于UCNPs的IFE

IFE与FRET原理类似,供体激发和/或发射带和受体吸收带重叠时,可以猝灭荧光,但要求较低,供体受体间距离大于10 nm也会发生IFE,因此将荧光传感器探针功能化的复杂性降至最低。此

Table 2 Summary of the application of the FRET immunoassay sensor based on UCNPs

表2 基于UCNPs的FRET免疫检测传感器的应用总结

目标物	探针材料/UCNPs	合成方法	修饰方法	UCNPs 表面识 别配体	探针材料	探针材 料识别 配体	LOD	线性范围	样品	文献
SARS-CoV-2 刺突蛋白	NaYF ₄ : Yb/Tm	水热法	配体去除法	抗原	金纳米颗粒	抗体	1.06 pg/L	2~32 pg/L	唾液	[79]
糖化血红蛋白	NaYF ₄ : Yb/Er	热分解法	表面硅烷 化法	抗体	糖化血红蛋 白	—	—	5.6%~11.5%	血液	[82]
前列腺特异性 抗原	NaYF ₄ : Yb/Er@NaYF ₄ : Yb/Nd	热分解法	逐层组装法	抗体	金纳米颗粒	抗原	0.01 μg/L	0.1~10 μg/L	—	[83]
降钙素原	NaYF ₄ : Yb/Er	热分解法	配体交换法	抗体	量子点	抗体	0.1 μg/L	0.1~10 μg/L	血清	[84]
山羊IgG	NaYF ₄ : Yb/Er	热分解法	配体去除法	抗体	金纳米颗粒	抗原	0.042 mg/L	0.75~60 mg/L	血液	[85]
人类免疫缺陷 病毒抗体	NaYF ₄ : Yb/Er	热分解法	逐层组装法	抗体	氧化石墨烯	抗原	—	5~150 nmol/L	血清	[86]
孕酮	NaYF ₄ @NaYF ₄ : Yb, Tm@NaYF ₄	热分解法	逐层组装法	抗体	P-HRP染料	抗原	1.36 ng/L	—	血清	[87]
氟喹诺酮类衍 生物	β-NaLuF ₄ : Yb, Er, Gd	热分解法	配体交换法	抗体	金纳米颗粒	抗原	0.19~0.32 μg/L	1~80 μg/L	水	[88]
Cd ²⁺	NaYF ₄ : Yb/Er	热分解法	配体交换法	抗原	金纳米颗粒	抗体	0.01 μg/L	0.05~20 μg/L	自来水	[76]
癌胚抗原	NaYF ₄ : Yb/Tm	溶剂热法	配体交换法	抗体	异硫氰酸荧 光素	抗原	0.1 μg/L	0.1~100 μg/L	血清	[89]

外, 因为没有新的化合物形成, 在 IFE 过程中 UCNPs 的寿命不会改变^[90]。Si 等^[91] 基于抗体修饰的 UCNPs 和抗原修饰的金纳米颗粒间的 IFE, 建立了一种快速检测环境和食品样品中吡虫啉残留的灵敏均质免疫检测方法。 LOD 低至 $0.79\ \mu\text{g/L}$, 恢复 50% 饱和信号的浓度 (SC_{50}) 为 $18.7\ \mu\text{g/L}$, $SC_{10}\sim SC_{90}$ 的线性检测范围为 $1.39\sim 335.81\ \mu\text{g/L}$ 。Chen 等^[92] 采用同样的方法快速检测吡虫啉, SC_{50} 为 $4.3\ \mu\text{g/L}$, $SC_{10}\sim SC_{90}$ 的线性检测范围为 $0.47\sim 21.37\ \mu\text{g/L}$, 提高了灵敏度和改善了线性范围。上述高灵敏度的 IFE 方法是由传感器吸光度的变化转换为荧光强度的变化实现的, 因此通过 IFE 对荧光变化的巧妙响应可应用于检测食品污染物, 具有广阔的应用前景。IFE 的出现大大拓宽了基于配体免疫检测技术的应用范围, 而且要求相对较低。然而, IFE 一般需要发生光化学反应, 有机分子作为主要的识别配体, 但这些分子大部分有毒性, 所以迫切需要寻找更安全无毒或低毒的识别配体例如模拟表位肽检测食品和环境中的污染物。

4.3 基于 UCNPs 的磁分离技术

与 FRET 和 IFE 相比, 磁分离没有改变光学特性, 而是在外部磁场下实现 UCNPs 的富集或分散。磁分离免疫检测技术一般是以 UCNPs 和磁性纳米颗粒作为探针, 当无目标分子时, UCNPs 和磁性纳米颗粒通过识别配体偶联在一起, 形成磁性纳米颗粒-识别配体-UCNPs 夹心复合物, UCNPs 被磁性纳米颗粒富集, 导致溶液中的荧光减少; 目标分子存在时会导致两种纳米颗粒分离, 因此 UCNPs 没有被磁性纳米颗粒富集而被回收。磁性纳米颗粒作为新一代的吸附剂, 具有磁性、低毒和生物相容性良好等优点^[93], 成为理想的生物分离和纯化材料^[94], 被广泛应用于食品检测^[95-96]。磁分离技术与其他技术相比具有简单、高效、快速和灵敏等优点, 成为快速检测食品和环境污染物的绝佳策略。基于磁性纳米颗粒的良好磁性, 它在提高上转换传感器的特异性方面具有很大的潜力。Zhao 等^[97] 在 UCNPs 上修饰拟除虫菊酯抗体, 建立了一种检测拟除虫菊酯农药残留的上转换磁分离免疫分析方法, LOD 均小于 $0.01\ \mu\text{g/L}$, 回收率为 $83.4\%\sim 97.8\%$, 表明该方法灵敏度高。上转换磁分离免疫荧光检测方法的建立, 丰富了快速检测市场的技术手段, 为拟除虫菊酯农药残留或其他农药残留的检测提供了理论支持。与酶联免疫吸附法相比, 该方法准确度更高, 灵敏度更好。与大型仪器检测法相

比, 该方法具有快速、方便、成本低的优点。但是磁分离技术需要高特异性的识别配体抗体, 目前食品和环境污染物相应抗体较少, 因此在未来研究中可开发更多目标物的抗体, 也可通过研究目标物的特性开发出其他特异性好的识别配体。

4.4 基于 UCNPs 的 ULISA

ULISA 与酶联免疫吸附方法测定步骤相似, 一抗固定在 96 孔板, 二抗修饰 UCNPs, 目标物与一抗和二抗结合, 在 $980\ \text{nm}$ 激光激发下产生的荧光信号反应了目标物浓度。但与传统酶联免疫吸附方法相比, ULISA 灵敏度更好和检测范围更宽。这种利用 UCNPs 作为信号传感器的方法未来可能为探索酶联免疫吸附方法的临床应用开辟新道路。Hlaacek 等^[98] 克服目前染色剂和荧光标记方法的缺点, 使用链亲和素提高灵敏度, 利用 UCNPs 建立模拟检测和数字检测两种综合 ULISA 法对前列腺特异性抗原进行检测, 数字检测的 LOD 低至 $0.8\ \text{fmol/L}$, 比传统荧光标签的信噪比高 50 倍。Makhneva 等^[99] 采用链亲和素修饰的 UCNPs 建立 ULISA 法检测前列腺特异性抗原, LOD 低至 $0.46\ \text{ng/L}$, 结果表明 UCNPs 的使用可显著提高异质免疫分析灵敏度。Mickert 等^[100] 采用链亲和素修饰的 UCNPs 建立模拟检测和数字检测两种综合 ULISA 法检测前列腺特异性抗原, 数字检测比相应的模拟检测灵敏 16 倍, LOD 低至 $23\ \text{pg/L}$ 。低浓度目标物采用数字检测会显著提高灵敏度, 但该方法会受到泊松噪声影响, 对高浓度目标物则需要进行模拟检测。与酶联免疫吸附方法相比, ULISA 方法无需酶催化, 缩短了检测时间, 提高了灵敏度。此外, 可进一步开发模拟表位肽或基因工程抗体修饰 UCNPs, 减少毒性和提高方法灵敏度, 促进 ULISA 方法的发展。

4.5 上转换免疫层析技术

上转换免疫层析技术广泛应用于检测感染性细菌、病原体、病毒和食品中残留物以及肿瘤标志物等 (表 3)。上转换免疫层析技术一般是利用抗体修饰的 UCNPs 作为探针用于免疫层析的即时检测技术, 具有简单、快速、低成本和易操作等独特优势^[101]。相比传统的胶体金免疫层析技术, UCNPs 具有光稳定性好和信噪比高的优势, 使上转换免疫层析技术的灵敏度大幅度提高。但该方法无法通过颜色判读结果, 需要外围设备分析实验结果, 这些设备一般昂贵且笨重。Gong 等^[101] 开发了一个小型化、便携式的定制设计的智能手机软件分析仪

(UCNP-LFA 分析仪) 成功用于检测 5 种目标物 (核酸、蛋白质、小分子、重金属离子和细菌), UCNPs-LFAs 平台的精度和准确度与胶体金标准方法相当, 相关系数大于 0.992, 与临床临界值相比 LOD 降低至原来的 1/5~1/10。UCNPs 发光效率低、亲水性差和抗体连接效率低是应用于侧流免疫层析技术需要克服的挑战。Huang 等^[102] 通过结合配体

交换法和超分子自组装策略检测大肠杆菌和达诺沙星, 成功解决上述问题, 灵敏度提高 40 倍, 检测范围扩大一个数量级, 并将成本降低 20%~40%。上转换免疫层析技术还广泛应用于同时检测两个或多个目标物, 形成了多指标上转免疫层析技术, 用于检测样品的各种分析物, 具有很大的应用前景。

Table 3 Summary of the application of UCNPs-based upconversion immunochromatography
表3 基于UCNPs的上转换免疫层析技术的应用总结

目标物	UCNPs	合成方法	修饰方法	检测限	线性范围	文献
杀螟松	NaYF ₄ : Yb/Er	Fluo Nanotech Co. ¹⁾	Fluo Nanotech Co.	—	0.98~250 µg/L	[103]
	NaYF ₄ : Yb/Er	热分解法	配体氧化法	11 µg/L	—	[104]
	β-NaY(Gd)F ₄ : Yb/Er	水热法	配体氧化法	12 µg/L	—	[105]
对硫磷	NaYF ₄ : Yb/Er	Fluo Nanotech Co.	Fluo Nanotech Co.	—	0.98~250 µg/L	[103]
甲基对硫磷	NaYF ₄ : Yb/Er	Fluo Nanotech Co.	Fluo Nanotech Co.	—	1.95~250 µg/L	[103]
2,4-二氯苯氧乙酸	NaYF ₄ : Yb/Er	热分解法	配体氧化法	5 µg/L	—	[104]
乙酸	β-NaYF ₄ : Yb/Er	热分解法	配体氧化法	5 µg/L	—	[105]
达诺沙星	NaYF ₄ : Yb/Er	热分解法	配体氧化法	0.04 µg/L	0.05~5 µg/L	[102]
曲安奈德	NaYF ₄ : Yb/Er	水热法	表面硅烷化法	20 µg/kg	1~100 µg/L	[106]
四氢大麻酚	Creative Diagnostics (NY, USA)	Creative Diagnostics (NY, USA) ¹⁾	配体交换法	2 µg/L	2~15 µg/L	[107]
噻乙醇	NaYF ₄ : Yb/Er	热分解法	配体交换法	1.42 µg/L	0~50 µg/L	[108]
C反应蛋白	NaYF ₄ : Yb/Er	热分解法	表面硅烷化法	0.05 µg/L	0.1~50 µg/L	[109]
心肌肌钙蛋白I	NaYF ₄ : Yb, Tm@NaYF ₄	热分解法	逐层组装机	0.041 µg/L 0.13 µg/L (血浆)、 0.25 µg/L (血清)	— 6.7~77.8 µg/L	[110] [111]
前列腺特异性抗原	NaYF ₄ : Yb/Er	热分解法	表面硅烷化法	0.556 µg/L	—	[110]
8-羟基-2'-脱氧鸟苷	NaYF ₄ : Yb/Er	Ruixi Biological ¹⁾ Technology Co., Ltd. ¹⁾	配体交换法	0.05 nmol/L	0.1~10 nmol/L	[112]
禽流感H5N2	NaYF ₄ : Yb, Tm@NaYF ₄ : Ca	热分解法	逐层组装机	10 ² EID ₅₀ /ml ²⁾	—	[113]
大肠杆菌	NaYF ₄ : Yb/Er	热分解法	配体氧化法	7.2×10 ³ CFU/ml	1×10 ³ ~ 5×10 ⁶ CFU/ml	[102]
鳃弧菌	NaYF ₄ : Yb/Er	溶剂热法	配体交换法	100 CFU/ml	10 ³ ~ 10 ⁹ CFU/ml	[114]
旋毛虫	NaYF ₄ : Yb/Er	Shanghai Shunna Biotech Co. Ltd. ¹⁾	Shanghai Shunna Biotech Co. Ltd.	100%	—	[115]

¹⁾ Fluo Nanotech Co.、Creative Diagnostics (NY, USA)、Ruixi Biological、Technology Co., Ltd.、Shanghai Shunna Biotech Co. Ltd.; UCNPs购买公司名称; ²⁾ EID₅₀: 半数感染量。

5 总结与展望

本文简要介绍了UCNPs的发光机制, 并按照传感器的构造顺序材料合成和改性进行阐述, 对基于UCNPs的免疫检测技术及其原理进行详细回顾。虽然基于识别配体抗体的UCNPs检测技术提供了

生物毒性低、灵敏度高和特异性强的免疫检测方法, 但是在实际应用中还应解决以下问题。a. 与传统荧光纳米材料相比, UCNPs在灵敏度和特异性方面具有显著优势, 但还需进一步开展对它们的研究, 尤其需要解决水溶性和分散度问题。可以合成粒径较小的UCNPs与亲水性配体结合或者去除疏

水性表面配体, 提高 UCNPs 的水溶性和分散度, 促进 UCNPs 的生物功能化。b. 基于 UCNPs 的免疫检测模式普遍单一或者不能同时检测多个样品。可以开发多元检测技术平台和多模式同时检测平台, 尽可能开发新型便携化、微型化、自动化的定性定量检测仪器, 应用于现场快速高通量检测。c. 与成熟的免疫检测技术工业应用相比, UCNPs 免疫检测技术的应用还处在雏形或实验室阶段, 与实际的社会应用存在一定差距, 尚未取得显著的社会和经济效益, 许多技术瓶颈亟待研究人员解决, 例如 UCNPs 的上转换发光效率难维持、合成方式复杂、表面修饰程度和功能化的难控制等问题。可以通过优化稀土掺杂物浓度和核壳结构提高上转换发光效率并延长高效的上转换发光时间, 采用一步法简化合成程序, 添加合适的稳定剂控制表面修饰程度。但本文所述成果已初步证明, UCNPs 独特的光学性质及其表面修饰机制的灵活性, 均为 UCNPs 作为纳米探针在免疫检测方面的应用开辟了广阔前景, 值得广大研究者们去努力挖掘探索。

参 考 文 献

- [1] 赵志高, 骆骄阳, 付延伟, 等. 免疫分析技术在农药残留分析中的研究进展及在中药中的应用展望. 分析测试学报, 2021, **40**(1): 149-158
Zhao Z G, Luo J Y, Fu Y W, *et al.* Journal of Instrumental Analysis, 2021, **40**(1): 149-158
- [2] 孙新琪, 安芳, 鹿倩, 等. 我国中药材禁用农药残留现状、毒性及分析方法研究进展. 中国中药杂志, 2022, **47**(3): 611-627
Sun X Q, An F, Lu Q, *et al.* China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, **47**(3): 611-627
- [3] Dukhno O, Przybilla F, Muhr V, *et al.* Time-dependent luminescence loss for individual upconversion nanoparticles upon dilution in aqueous solution. Nanoscale, 2018, **10**(34): 15904-15910
- [4] Homann C, Krukewitt L, Frenzel F, *et al.* NaYF₄:Yb,Er/NaYF₄ core/shell nanocrystals with high upconversion luminescence quantum yield. Angew Chem Int Ed Engl, 2018, **57**(28): 8765-8769
- [5] Zhong Y T, Ma Z R, Wang F F, *et al.* In vivo molecular imaging for immunotherapy using ultra-bright near-infrared-IIb rare-earth nanoparticles. Nat Biotechnol, 2019, **37**(11): 1322-1331
- [6] Rong Y W, Hassan M M, Ouyang Q, *et al.* Lanthanide ion (Ln³⁺)-based upconversion sensor for quantification of food contaminants: a review. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2021, **20**(4): 3531-3578
- [7] Drees C, Raj A N, Kurre R, *et al.* Engineered upconversion nanoparticles for resolving protein interactions inside living cells. Angew Chem Int Ed Engl, 2016, **128**(38): 11840-11845
- [8] 刘敏玲, 何晓婷, 陈子键, 等. 纳米抗体结构特点及其抗原结合活性研究. 未来食品科学, 2021, **1**(3): 77-87
Liu M L, He X T, Chen Z J, *et al.* Future Food Science, 2021, **1**(3): 77-87
- [9] Li, X, Zhang F, Zeng, C H, *et al.* An instant reused luminescent mixed matrix membrane sensor for convenient phenolic nitro-explosives detection. J Photochem Photobiol A Chem, 2019, **370**: 51-57
- [10] Chen H, Ding B B, Ma P A, *et al.* Recent progress in upconversion nanomaterials for emerging optical biological applications. Adv Drug Deliv Rev, 2022, **188**: 114414
- [11] Wen S H, Zhou J J, Zheng K Z, *et al.* Advances in highly doped upconversion nanoparticles. Nat Commun, 2018, **9**(1): 2415
- [12] Hakeem D A, Su S S, Mo Z R, *et al.* Upconversion luminescent nanomaterials: a promising new platform for food safety analysis. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022, **62**(32): 8866-8907
- [13] 冯鹏程, 王佳玲, 李媛媛, 等. 上转换纳米颗粒在肿瘤诊断与治疗中的研究进展. 生物加工过程, 2018, **16**(5): 1-10
Feng P C, Wang J L, Li Y Y, *et al.* Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2018, **16**(5): 1-10
- [14] Li X M, Zhang F, Zhao D Y. Lab on upconversion nanoparticles: optical properties and applications engineering via designed nanostructure. Chem Soc Rev, 2015, **44**(6): 1346-1378
- [15] Yao W J, Tian Q Y, Tian B, *et al.* Dual upconversion nanophotoswitch for security encoding. Sci China Materials, 2019, **62**(3): 368-378
- [16] Amouroux B, Roux C, Marty J D, *et al.* Importance of the mixing and high-temperature heating steps in the controlled thermal coprecipitation synthesis of Sub-5-nm Na(Gd-Yb)F₄: Tm. Inorg Chem, 2019, **58**(8): 5082-5088
- [17] Chen H Q, Wang W, Ji C C, *et al.* Dye-sensitized core-shell NaGdF₄:Yb,Er@NaGdF₄:Yb,Nd upconversion nanoprobe for determination of H₂S. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2021, **248**: 119281
- [18] Wu Z Z, Xu E B, Jin Z Y, *et al.* An ultrasensitive aptasensor based on fluorescent resonant energy transfer and exonuclease-assisted target recycling for patulin detection. Food Chem, 2018, **249**: 136-142
- [19] Yu Z C, Li X X, Wang X, *et al.* White up-conversion efficiency of Yb³⁺/Er³⁺/Tm³⁺ co-doped β -NaYF₄ nano-crystals. J Lumin, 2019, **207**: 48-52
- [20] Dong J, Zhang J, Han Q Y, *et al.* Tuning and enhancing the red upconversion emission of Er³⁺ in LiYF₄ nanoparticles. J Lumin, 2019, **207**: 361-368
- [21] Liu L, Li R Y, Wang G L, *et al.* Graphene quantum dots-NaYF₄:Yb,Er hybrid with significant enhancement of upconversion emission for fluorescent detection of carcinoembryonic antigen with exonuclease III-aided target recycling amplification. Sens Actuators B Chem, 2019, **285**: 453-461
- [22] Rafique R, Baek S H, Phan L M T, *et al.* A facile hydrothermal synthesis of highly luminescent NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ upconversion nanoparticles and their biomonitoring capability. Mater Sci Eng C

- Mater Biol Appl, 2019, **99**: 1067-1074
- [23] Zhou T, Lun R, Li Y M, *et al.* Yb³⁺, Tm³⁺ co-doped β -NaY_{1-x}Gd_xF₄ (0 ≤ x ≤ 1.00) microcrystals: hydrothermal synthesis, evolution of microstructures and upconversion luminescence properties. J Lumin, 2019, **211**: 363-374
- [24] Chen Z Y, Liu G X, Zhang X D, *et al.* Synthesis of multifunctional rare-earth fluoride/Ag nanowire nanocomposite for efficient therapy of cancer. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019, **104**: 109940
- [25] Wu J H, Du S S, Wang Y H. Photosensitizer coated upconversion nanoparticles for triggering reactive oxygen species under 980 nm near-infrared excitation. J Mater Chem B, 2019, **7**(46): 7306-7313
- [26] Guo T, Deng Q L, Fang G Z, *et al.* Fluorescence sensor based on molecularly imprinted polymers and core-shell upconversion nanoparticles@metal-organic frameworks for detection of bovine serum albumin. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2022, **279**: 121460
- [27] Li F C, Wada H, Kitamoto Y. NIR-responsive upconversion nanoparticles/anatase TiO₂ composite aerogel. Jpn J Appl Phys, 2017, **57**(2): 2S2
- [28] Zhou J, Zhu X J, Chen M, *et al.* Water-stable NaLuF₄-based upconversion nanophosphors with long-term validity for multimodal lymphatic imaging. Biomaterials, 2012, **33**(26): 6201-6210
- [29] Mohan M, Maurya S K, Kumar K, *et al.* In vitro imaging of animal tissue with upconversion nanoparticles (UCNPs) as a molecular probing agent using swept source optical coherence tomography (SSOCT). J Med Biol Eng, 2020, **40**(2): 251-263
- [30] Minh L Q, Anh T K, Hung N D, *et al.* Upconversion luminescence of Gd₂O₃:Er³⁺ and Gd₂O₃:Er³⁺/silica nanophosphors fabricated by EDTA combustion method. J Rare Earth, 2019, **37**(11): 1126-1131
- [31] Abdelrehman M H M, Kroon R E, Yousif A, *et al.* Luminescence properties of Yb³⁺ and Er³⁺ co-doped into Gd₂O₃:Bi³⁺ phosphor powder. J Alloys Compd, 2022, **902**: 163856
- [32] Jiang H M, Jia H, Zhang Y P, *et al.* High-performance dual-mode self-calibrating optical thermometry for Er³⁺, Li⁺ co-doped oxides. J Mater Chem C, 2022, **10**(47): 17917-17924
- [33] Sun L L, Wang T, Sun Y Z, *et al.* Fluorescence resonance energy transfer between NH₂-NaYF₄:Yb,Er/NaYF₄@SiO₂ upconversion nanoparticles and gold nanoparticles for the detection of glutathione and cadmium ions. Talanta, 2020, **207**: 120294
- [34] Tiwari S P, Maurya S K, Yadav R S, *et al.* Future prospects of fluoride based upconversion nanoparticles for emerging applications in biomedical and energy harvesting. J Vac Sci Technol B, 2018, **36**(6): 60801
- [35] Yao J, Huang C, Liu C H, *et al.* Upconversion luminescence nanomaterials: a versatile platform for imaging, sensing, and therapy. Talanta, 2020, **208**: 120157
- [36] Nahorniak M, Patsula V, Marekova D, *et al.* Chemical and colloidal stability of polymer-coated NaYF₄:Yb,Er nanoparticles in aqueous media and viability of cells: the effect of a protective coating. Int J Mol Sci, 2023, **24**(3): 2724
- [37] Su J, Zhang Q L, Shao S F, *et al.* Phase transition, structure and luminescence of Eu:YAG nanophosphors by co-precipitation method. J Alloys Compd, 2009, **470**(1-2): 306-310
- [38] Zhou J, Liu Q, Feng W, *et al.* Upconversion luminescent materials: advances and applications. Chem Rev, 2015, **115**(1): 395-465
- [39] Chen B, Wang F. Recent advances in the synthesis and application of Yb-based fluoride upconversion nanoparticles. Inorg Chem Front, 2020, **7**(5): 1067-1081
- [40] Hong E, Liu L M, Bai L M, *et al.* Control synthesis, subtle surface modification of rare-earth-doped upconversion nanoparticles and their applications in cancer diagnosis and treatment. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019, **105**: 110097
- [41] Liu G F, Sun Z, Jia M C, *et al.* One pot synthesis and optimized luminescent intensity of Gd₂(WO₄)₃:Yb³⁺/Ho³⁺@SiO₂ nanoparticles for biological application. J Lumin, 2019, **206**: 1-5
- [42] Liu H Y, Li J B, Hu P F, *et al.* Facile synthesis of Er³⁺/Tm³⁺ co-doped magnetic/luminescent nanosystems for possible bioimaging and therapy applications. J Rare Earth, 2022, **40**(1): 11-19
- [43] Bogdan N, Vetrone F, Ozin G A, *et al.* Synthesis of ligand-free colloiddally stable water dispersible brightly luminescent lanthanide-doped upconverting nanoparticles. Nano Lett, 2011, **11**(2): 835-840
- [44] Nigoghossian K, Ouellet S, Plain J, *et al.* Upconversion nanoparticle-decorated gold nanoshells for near-infrared induced heating and thermometry. J Mater Chem B, 2017, **5**(34): 7109-7117
- [45] Xu X, Wang Z, Lei P P, *et al.* Alpha-NaYb(Mn)F₄:Er³⁺/Tm³⁺@NaYbF₄ UCNPs as "band-shape" luminescent nanothermometers over a wide temperature range. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, **7**(37): 20813-20819
- [46] Radunz S, Schavkan A, Wahl S, *et al.* Evolution of size and optical properties of upconverting nanoparticles during high-temperature synthesis. J Phys Chem C, 2018, **122**(50): 28958-28967
- [47] Gupta A, Patel D K, Lee S Y, *et al.* Record-high responsivity and high detectivity broadband photodetectors based on upconversion/gold/Prussian-blue nanocomposite. Adv Funct Mater, 2022, **32**(44): 2206496
- [48] Luo R, Chen L, Li Q Y, *et al.* Bi³⁺-doped BaYF₅:Yb,Er upconversion nanoparticles with enhanced luminescence and application case for X-ray computed tomography imaging. Inorg Chem, 2020, **59**(24): 17906-17915
- [49] Luo X L, Chen Q C, Guo H B, *et al.* Water-soluble cit-NaYbF₄:Tm³⁺ with enhanced 802 nm emission by Sr²⁺ ion doping for *in vivo* fluorescence molecular tomography. J Mater Chem C, 2022, **10**(45): 17163-17173
- [50] 燕照霞,姜磊,刘涵云,等. 稀土上转换纳米载体的构建及功能化修饰机制的研究进展. 中国稀土学报, 2017, **35**(3): 301-314
Yan Z X, Jiang L, Liu H Y, *et al.* Journal of the Chinese Society of Rare Earths, 2017, **35**(3): 301-314
- [51] Jia F F, Cong H L, Shen Y Q, *et al.* Synthesis of OA-NaYF₄:Yb,Er and its cytotoxicity. Integr Ferroelectr, 2019, **199**(1): 143-147
- [52] Dhal S, Pal K, Banerjee I, *et al.* Upconversion nanoparticle

- incorporated oleogel as probable skin tissue imaging agent. *Chem Eng J*, 2020, **379**: 122272
- [53] Bhuckory S, Lahtinen S, Hoysniemi N, *et al.* Understanding FRET in upconversion nanoparticle nucleic acid biosensors. *Nano Lett*, 2023, **23**(6):2253-2261
- [54] Malhotra K, Fuku R, Kumar B, *et al.* Unlocking long-term stability of upconversion nanoparticles with biocompatible phosphonate-based polymer coatings. *Nano Lett*, 2022, **22**(18): 7285-7293
- [55] Chen Y, Wang X, Liu H, *et al.* A dual-optical sensor for mancozeb by UCNP@PVP@MnO₂ nanozyme. *Food chem*, 2023, **409**: 135255
- [56] Hu J S, Wang R N, Fan R R, *et al.* Enhanced luminescence in Yb³⁺ doped core-shell upconversion nanoparticles for sensitive doxorubicin detection. *J Lumin*, 2020, **217**: 116812
- [57] Liu C, Shao H, Li D, *et al.* Safety and efficacy of citric acid-upconverting nanoparticles for multimodal biological imaging in BALB/c mice. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2021, **36**: 102485
- [58] Wang J K, Zhu Y L, Grimes C A, *et al.* Eu, Sm, Mn-doped CaS nanoparticles with 59.3% upconversion-luminescence quantum yield: enabling ultrasensitive and facile smartphone-based sulfite detection. *Anal Chem*, 2018, **90**(14): 8658-8664
- [59] Ding C P, Cheng S S, Zhang C L, *et al.* Ratiometric upconversion luminescence nanoprobe with near-infrared Ag₂S nanodots as the energy acceptor for sensing and imaging of pH *in vivo*. *Anal Chem*, 2019, **91**(11): 7181-7188
- [60] Li H, Sun D E, Liu Y J, *et al.* An ultrasensitive homogeneous aptasensor for kanamycin based on upconversion fluorescence resonance energy transfer. *Biosens Bioelectron*, 2014, **55**: 149-156
- [61] Shi Z, Duan Y, Zhu X, *et al.* Dual functional NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺@NaYF₄: Yb³⁺, Nd³⁺ core-shell nanoparticles for cell temperature sensing and imaging. *Nanotechnology*, 2018, **29**(9): 94001
- [62] Wang B Y, Liao M L, Hong G C, *et al.* Near-infrared-triggered photodynamic therapy toward breast cancer cells using dendrimer-functionalized upconversion nanoparticles. *Nanomaterials*, 2017, **7**(9): 269
- [63] Ding C P, Cheng S S, Yuan F, *et al.* Ratiometrically pH-insensitive upconversion nanoprobe: toward simultaneously quantifying organellar calcium and chloride and understanding the interaction of the two ions in lysosome function. *Anal Chem*, 2022, **94**(30): 10813-10823
- [64] Du K M, Lei P P, Dong L L, *et al.* *In situ* decorating of ultrasmall Ag₂Se on upconversion nanoparticles as novel nanotheranostic agent for multimodal imaging-guided cancer photothermal therapy. *Appl Mater Today*, 2020, **18**: 100497
- [65] Chen X, Wan J, Wei M, *et al.* Tandem fabrication of upconversion nanocomposites enabled by confined protons. *Nanoscale*, 2023, **15**(6): 2642-2649
- [66] Kang Y F, Zheng B, Song C Y, *et al.* Evaluation of luminescence properties of single hydrophilic upconversion nanoparticles by optical trapping. *J Phys Chem C*, 2019, **123**(15): 10107-10113
- [67] Chen Z G, Chen H L, Hu H, *et al.* Versatile synthesis strategy for carboxylic acid-functionalized upconverting nanophosphors as biological labels. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(10): 3023-3029
- [68] Zhou L, Wang R, Yao C, *et al.* Erratum: single-band upconversion nanoprobe for multiplexed simultaneous *in situ* molecular mapping of cancer biomarkers. *Nat Commun*, 2015, **6**(1): 7350
- [69] Zuo Y J, Tian M G, Sun J, *et al.* Silica nanoparticles with up-conversion fluorescence based on triplet-triplet annihilation mechanism for specific recognition of apoptosis cells. *Anal Chem*, 2018, **90**(24): 14602-14609
- [70] Nigoghossian K, Messaddeq Y, Boudreau D, *et al.* UV and temperature-sensing based on NaGdF₄: Yb³⁺: Er³⁺@SiO₂-Eu(tta)₃. *ACS Omega*, 2017, **2**(5): 2065-2071
- [71] Chu Z Y, Chen H, Wang P S, *et al.* Phototherapy using a fluoroquinolone antibiotic drug to suppress tumor migration and proliferation and to enhance apoptosis. *ACS Nano*, 2022, **16**(3): 4917-4929
- [72] Xie X, Song J, Hu Y, *et al.* Tailor-made PL-UC-C3 nanoparticles for fluorescence/computed tomography imaging-guided cascade amplified photothermal therapy. *Int J Nanomedicine*, 2018, **13**: 7633-7646
- [73] Wan P P, Fu H M, Zhang Y, *et al.* Engineering a polymer-encapsulated manganese dioxide/upconversion nanoprobe for FRET-based hydrogen peroxide detection. *Analytical and Bioanal Chem*, 2023, **415**(18):4333-4341
- [74] Chien H W, Yang C H, Shih Y T, *et al.* Upconversion nanoparticles encapsulated with molecularly imprinted amphiphilic copolymer as a fluorescent probe for specific biorecognition. *Polymers*, 2021, **13**(20): 3522
- [75] Si F F, Zou R B, Jiao S S, *et al.* Inner filter effect-based homogeneous immunoassay for rapid detection of imidacloprid residue in environmental and food samples. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, **148**: 862-868
- [76] 邓晨, 李琳, 张林威, 等. 基于上转换纳米颗粒和金纳米颗粒的 Cd²⁺免疫检测新方法. *食品与生物技术学报*, 2021, **40**(7):59-64
- [77] Deng C, Li L, Zhang L W, *et al.* Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, **40**(7):59-64
- [77] Zhang Y, Zhu X H, Zhang Y. Exploring heterostructured upconversion nanoparticles: from rational engineering to diverse applications. *ACS Nano*, 2021, **15**(3): 3709-3735
- [78] Zhao M Y, Li B H, Wu Y F, *et al.* A tumor-microenvironment-responsive lanthanide-cyanine FRET sensor for NIR-II luminescence-lifetime *in situ* imaging of hepatocellular carcinoma. *Adv Mater*, 2020, **32**(28): 2001172
- [79] Li L H, Song M L, Lao X Y, *et al.* Rapid and ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 spike protein based on upconversion luminescence biosensor for COVID-19 point-of-care diagnostics. *Mater Design*, 2022, **223**: 111263
- [80] Takkinen K, Zvirbliene A. Recent advances in homogenous immunoassays based on resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, **55**: 16-22
- [81] Shan Y K, Feng Y F, Li J H, *et al.* Rapid on-site PEDV detection using homogeneous fluorescence resonance energy transfer-based ELISA. *Sens Actuators B Chem*, 2023, **378**: 133138

- [82] Jo E J, Mun H, Kim M G. Homogeneous immunosensor based on luminescence resonance energy transfer for glycosylated hemoglobin detection using upconversion nanoparticles. *Anal Chem*, 2016, **88**(5): 2742-2746
- [83] Hu S T, Xu H W, Zhou B S, *et al.* Double stopband bilayer photonic crystal based upconversion fluorescence PSA sensor. *Sens Actuators B Chem*, 2021, **326**: 128816
- [84] Zhou Y, Shao X M, Han Y W, *et al.* Detection of procalcitonin (PCT) using the double antibody sandwich method based on fluorescence resonant energy transfer between upconversion nanoparticles and quantum dots. *Anal Methods*, 2018, **10**(9): 1015-1022
- [85] Li C X, Zuo J, Li Q Q, *et al.* One-step *in situ* solid-substrate-based whole blood immunoassay based on FRET between upconversion and gold nanoparticles. *Biosens Bioelectron*, 2017, **92**: 335-341
- [86] Wu Y M, Cen Y, Huang L J, *et al.* Upconversion fluorescence resonance energy transfer biosensor for sensitive detection of human immunodeficiency virus antibodies in human serum. *Chem Commun*, 2014, **50**(36): 4759-4762
- [87] Kang D, Lee S, Shin H, *et al.* An efficient NIR-to-NIR signal-based LRET system for homogeneous competitive immunoassay. *Biosens Bioelectron*, 2020, **150**: 111921
- [88] Zhang Z, Zhang M, Wu X Y, *et al.* Upconversion fluorescence resonance energy transfer—a novel approach for sensitive detection of fluoroquinolones in water samples. *Microchem J*, 2016, **124**: 181-187
- [89] Xu S, Dong B, Zhou D L, *et al.* Paper-based upconversion fluorescence resonance energy transfer biosensor for sensitive detection of multiple cancer biomarkers. *Sci Rep*, 2016, **6**: 23406
- [90] Xie X J, Lian Y W, Xiao L H, *et al.* Facile and label-free fluorescence sensing of β -galactosidase activity by graphene quantum dots. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2020, **240**: 118594
- [91] Si F F, Zou R B, Jiao S S, *et al.* Inner filter effect-based homogeneous immunoassay for rapid detection of imidacloprid residue in environmental and food samples. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, **148**: 862-868
- [92] Chen H, Sun W L, Zhang Z R, *et al.* Competitive immune-nanoplatfroms with positive readout for the rapid detection of imidacloprid using gold nanoparticles. *Mikrochim Acta*, 2021, **188**(10): 356
- [93] Ozitürk E E, Dalgic B G, Buyukpinar C, *et al.* Magnetic nanoparticles based solid phase extraction methods for the determination of trace elements. *Crit Rev Anal Chem*, 2022, **52**(2): 231-249
- [94] Liao Z Y, Zhang Y, Su L, *et al.* Application of upconversion luminescent-magnetic microbeads with weak background noise and facile separation in ochratoxin A detection. *J Nanopart Res*, 2017, **19**: 60
- [95] Li C Y, Sun W L, Huang L R, *et al.* Development of a multicolor upconversion fluorescence immunoassay for the simultaneous detection of thiamethoxam and dextran by magnetic separation. *RSC Adv*, 2021, **11**(1): 517-524
- [96] Sheng W, Shi Y J, Ma J, *et al.* Highly sensitive atrazine fluorescence immunoassay by using magnetic separation and upconversion nanoparticles as labels. *Mikrochim Acta*, 2019, **186**(8): 564
- [97] Zhao L Y, Jin J Y, Zhu W B, *et al.* Detection of pyrethroids in food by immunofluorescence enhanced method based on three-layer core-shell structure upconversion materials. *Foods*, 2022, **11**(7): 990
- [98] Hlaacek A, Farka Z, Mickert M J, *et al.* Bioconjugates of photon-upconversion nanoparticles for cancer biomarker detection and imaging. *Nat Protoc*, 2022, **17**(4): 1028-1072
- [99] Makhneva E, Sklenarova D, Brandmeier J C, *et al.* Influence of label and solid support on the performance of heterogeneous immunoassays. *Anal Chem*, 2022, **94**(47): 16376-16383
- [100] Mickert M J, Farka Z, Kostiv U, *et al.* Measurement of sub-femtomolar concentrations of prostate-specific antigen through single-molecule counting with an upconversion-linked immunosorbent assay. *Anal Chem*, 2019, **91**(15): 9435-9441
- [101] Gong Y, Zheng Y M, Jin B R, *et al.* A portable and universal upconversion nanoparticle-based lateral flow assay platform for point-of-care testing. *Talanta*, 2019, **201**: 126-133
- [102] Huang Z, Liu Y H, Chen Y, *et al.* Improving the performance of upconversion nanoprobe-based lateral flow immunoassays by supramolecular self-assembly core/shell strategies. *Sens Actuators B Chem*, 2020, **318**: 128233
- [103] Zou R B, Chang Y Y, Zhang T Y, *et al.* Up-converting nanoparticle-based immunochromatographic strip for multi-residue detection of three organophosphorus pesticides in food. *Front Chem*, 2019, **7**: 18
- [104] Yu J C, Guo T T, Zhang W, *et al.* Green upconversion nanoparticles for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and fenitrothion detection. *J Alloys Compd*, 2019, **771**: 187-194
- [105] Yu J C, Guo T T, Zhang W, *et al.* Simultaneous detection of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and fenitrothion through lanthanide doped β -NaYF₄ upconversion nanoparticles with different emitting light colors. *Mater Res Bull*, 2019, **111**: 133-139
- [106] Zhang S W, Yao T Q, Wang S F, *et al.* Upconversion luminescence nanoparticles-based immunochromatographic assay for quantitative detection of triamcinolone acetonide in cosmetics. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2019, **214**: 302-308
- [107] Chend R, Mittal N, Srinivasan S, *et al.* Upconverting nanoparticle clustering based rapid quantitative detection of tetrahydrocannabinol (THC) on lateral-flow immunoassay. *Analyst*, 2021, **146**(2): 574-580
- [108] Wen Z H, Hu X L, Yan R F, *et al.* A reliable upconversion nanoparticle-based immunochromatographic assay for the highly sensitive determination of olaquinox in fish muscle and water samples. *Food Chem*, 2023, **406**: 135081
- [109] Guo J C, Chen S Q, Tian S L, *et al.* A sensitive and quantitative prognosis of C-reactive protein at picogram level using mesoporous silica encapsulated core-shell up-conversion

- nanoparticle based lateral flow strip assay. *Talanta*, 2021, **230**: 122335
- [110] Juntunen E, Arppe R, Kalliomaki L, *et al.* Effects of blood sample anticoagulants on lateral flow assays using luminescent photon-upconverting and Eu(III) nanoparticle reporters. *Anal Biochem*, 2016, **492**: 13-20
- [111] Shapoval O, Brandmeier J C, Nahorniak M, *et al.* PMVEMA-coated upconverting nanoparticles for upconversion-linked immunoassay of cardiac troponin. *Talanta*, 2022, **244**: 123400
- [112] Wu N Y, Wei Y X, Pan L L, *et al.* Lateral flow immunostrips for the sensitive and rapid determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine using upconversion nanoparticles. *Mikrochim Acta*, 2020, **187**(7): 377
- [113] Kim J, Kwon J H, Jang J, *et al.* Rapid and background-free detection of avian influenza virus in opaque sample using NIR-to-NIR upconversion nanoparticle-based lateral flow immunoassay platform. *Biosens Bioelectron*, 2018, **112**: 209-215
- [114] Zhao P, Wu Y Y, Zhu Y H, *et al.* Upconversion fluorescent strip sensor for rapid determination of vibrio anguillarum. *Nanoscale*, 2014, **6**(7): 3804-3809
- [115] Li J, Ding J, Liu X L, *et al.* Upconverting phosphor technology-based lateral flow assay for the rapid and sensitive detection of anti-trichinella spiralis igg antibodies in pig serum. *Parasit Vectors*, 2021, **14**(1): 487

The Application in The Development of Immunoassay Based on Upconversion Nanomaterials*

HUANG Hui-Wei¹⁾, LI Li-Hua²⁾, LUO Lin¹⁾, SHEN Yu-Dong¹⁾, LEI Hong-Tao¹⁾, XU Zhen-Lin^{1)**}

¹⁾Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Safety and Quality, College of Food Science, South China Agricultural University,

Guangzhou 510642, China;

²⁾Institute of Future Science and Technology, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract Immunoassays are widely used in medicine, food, environment and other fields due to having the advantages of simpleness, rapidness and accuracy. Combining immunoassays with nanomaterials can improve the performance of immunoassays. Compared with traditional nanomaterials, upconversion nanoparticles (UCNPs) have excellent optical properties such as good photostability, long luminescence lifetime and narrow and tunable emission bands, which can significantly reduce background noise and improve analytical sensitivity when combined with immunoassay. This paper briefly introduces the luminescence mechanism of UCNPs, summarizes the synthesis and surface modification methods of UCNPs. And then 5 UCNPs-based immunoassay techniques, namely, fluorescence resonance energy transfer, inner filter effect, magnetic separation technique, upconversion-linked immunosorbent assay and upconversion immunochromatography, are discussed in detail. These sensing protocols of UCNPs-based immunoassays have been successfully utilized to detect various targets, including small molecules, macromolecules, and pathogens, all of which closely related to food safety, human health, and environmental pollution. Finally, the challenges and prospects of this technique are summarized and prospected. Although the UCNPs immunoassays based on antibodies and antigens have made great progress, most of the research is still in the stage of laboratory, and there is a long way to go to realize its social applications. There is a series of challenges need to be overcome. (1) Designing excellent water soluble and dispersive upconversion nanomaterials is needed. Hydrophilic ligands are bound to smaller upconversion nanoparticles and removing hydrophobic surface ligands are the most widely used methods to improve solubility and dispersity. (2) Multi-detection technology platforms and multi-mode simultaneous detection platforms have great potential, which will improve the efficiency of point of care detection. (3) The researchers also need to focus on some important problems. For examples, the upconversion luminescence efficiency of UCNPs is difficult to maintain, the synthesis method is complex, and the surface modification degree and functionalization are difficult to control.

Key words upconversion nanoparticles, synthesis method, surface modification method, immunoassay technique

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0131

* This work was supported by grants from The National Key Research and Development Program of China (2023YFF1105002), The National Natural Science Foundation of China (32061160473), Guangdong Science and Technology Innovation Strategy Special Fund Basic Research Major Project (2020B0301030005), and Guangdong Basic and Applied Basic Research Fund Regional Joint Fund Key Project (2021B1515120042).

** Corresponding author.

Tel: 86-20-85283448, E-mail: xzlin@scau.edu.cn

Received: April 7, 2023 Accepted: May 29, 2023