上转换发光纳米技术及其在食品安全检测中应用研究进展

李向丽[1]，谭贵良[2]，张娜[1]，刘垚[2]，吴世嘉[3]，王周平[3]，董军[4]
（1.中山火炬职业技术学院生物医药系，广东中山 528436）（2.广东省中山市质量计量监督检测所，广东中山 528403）（3.江南大学食品学院，江苏无锡 214122）（4.电子科技大学中山学院，广东中山 528403）

摘要：近年来发展起来的上转换发光纳米技术正成为研究的热点。与放射性同位素标记，酶标记、化学发光标记以及有机荧光染料和量子点等其他荧光材料标记相比，上转换发光纳米技术具有灵敏度高、稳定性好、选择性好、便于观察、操作简单且不损伤样本、无背景荧光等诸多优点，克服了放射性污染、酶不稳定、灵敏度差、化学发光重现性差等缺点，在细胞和组织成像研究、生物分子定量检测等方面有着广泛的应用，取得了令人瞩目的研究成果。本文介绍了上转换发光纳米材料的激发态吸收等 3 种发光机制、发光材料组成、水热法等 4 种合成方法以及硅烷化法等 6 种表面修饰方法。在此基础上对上转换发光纳米技术在食品安全检测中的应用进行了总结和展望。

关键词：上转换发光纳米材料；发光机制；合成方法；表面修饰；食品安全；检测
文章篇号：1673-9078(2014)8-280-287

Upconversion Fluorescent Nanoparticles Technology in Food Inspection

LI Xiang-li[1], TAN Gui-liang[2], ZHANG Na[1], LIU Yao[2], WU Shi-jia[3], WANG Zhou-ping[3], DONG Jun[4]
(1.Department of Biomedicine, Zhongshan Torch Technology College, Zhongshan 528436, China)
(2.Zhongshan Supervision Testing Institute of Quality & Metrology, Zhongshan 528403, China)
(3.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)
(4.Zhongshan Institute, University of Electronic Science and Technology of China, Zhongshan 528403, China)

Abstract: Upconversion fluorescent nanoparticles technology) is a new emerging technique that has attracted increasing attention in recent years. Compared with other labeling techniques such as radioisotopic labeling, enzymatic labeling, chemiluminescent labeling, organic fluorescent dyes, and quantum dots (QDs), upconversion fluorescence nanoparticles have unique advantages such as high photostability, high detection sensitivity, good selectivity, easyobservation and operation, no damage to the sample, and no background fluorescence. In addition, this technique has overcome several shortcomings of other prevalent methods, such as radioactive contamination, enzyme-instability, poor sensitivity, and poor reproducibility of chemiluminescence. It has been widely applied to imaging studies of cells and tissues, quantitative detection of biomolecules, etc., and has achieved remarkable outcomes. In this study, three upconversion mechanisms of UCNPs (e.g., excited-state absorption), their composition, four preparation methods (e.g., hydrothermal method), and six surface modification methods (e.g., Stober method) were reviewed. Subsequently, it provides a perspective to the application of UPNT in food inspection.

Key words: upconversion fluorescent nanoparticles; upconversion mechanism; preparation method; surface modification; food safety application

纳米材料是纳米技术领域中被研究最多、应用最广泛的部分。一般认为，纳米材料的颗粒为 1~100 nm，目前被用于生物标记的无机纳米颗粒主要有金纳米颗粒、半导体量子点（quantum dots，QDs）、稀土元素掺杂的发光纳米颗粒以及碳点。与放射性同位素标记、酶标记和化学发光标记相比，上转换发光材料标记具有灵敏度高、选择性好、便于观察、操作简单且不损伤样本等诸多优点，克服了放射性污染、酶不稳定、灵敏度差、化学发光重现性差等缺点[1~3]，在细胞和组织成像研究和生物分子定量检测方面有着广泛的应用。特别是近年来发展起来的上转换发光纳

收稿日期：2014-02-25
基金项目：广东省科技计划项目(2011B031500025)；广东省自然科学基金（S2011010006107）
作者简介：李向丽（1979-），女，博士，副教授，研究方向：食品药品检测
通讯作者：谭贵良（1977-），男，博士，高级工程师，研究方向：食品分子检测技术

米技术（upconversion fluorescence nanoparticles technology，UPNT）正成为研究的热点。上转换荧光（upconversion fluorescence）是一种通过多光子机制吸收长波辐射（近红外光）而发射出比激发光波长短的荧光（紫外可见光）的反 Stokes 发光现象[4]。受到能量较低的长波激发时，能够发射能量较高的比激发波长短的荧光的材料称为上转换发光材料。借助上转换发光纳米材料（upconversion fluorescence nanoparticles，UCNPs）把红外光转换成可见光的有效方法。上转换发光纳米材料可使用红外激光（如 980 nm）激发，其荧光发射在可见光区（如 500~650 nm），若采用适当的光电倍增管作为光信号收集器（如接收光波范围为 300~650 nm 的光电倍增管），可构建无背景光干扰的更灵敏的上转换激光诱导荧光检测方法。同时通过研究，发现掺杂不同稀土元素（Er、Tm、Ho）时，在 980 nm 激光激发下，NaYF4 上转换颗粒的荧光光谱具有明显差异，这与不同稀土离子之间的能级跃迁有关。对于多色上转换荧光材料的研究目前还比较局限。目前上转换发光纳米技术在食品检测方面的研究还较少，才刚开始起步。本文介绍了上转换发光纳米材料的发光机制、发光材料组成、合成方法和表面修饰方法以及在食品安全检测中应用的最新进展。

1 上转换发光机制

与大部分发光遵循的 Stokes 定律不同，上转换发光的发射光波长小于激发光波长，是一种特殊的反 Stokes 定律发光现象，即反 Stokes 发光。其机制是通过双光子或多个光子机制将低能量激发光子（长波长的激发光）转换为高能量发射光子（短波长的发射光）。其机制主要归纳为激发态吸收、能量传递和光子雪崩三种类型[4]。其中激发态吸收是效率最低的上转换过程，而能量传递可提供高效率的上转换发光（比激发态吸收约高两个数量级）[5]。

1.1 激发态吸收（excited state absorption，ESA）

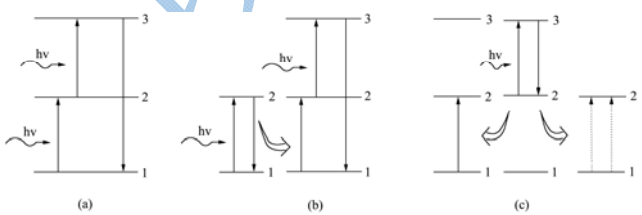


图 1 上转换发光的三种机制

Fig.1 Mechanism of upconversion fluorescence

激发态吸收是上转换发光的基本类型，该原理最早于 1959 年由 Bloembergen 提出[6]。其原理是某一个处于基态能级的离子通过连续的多光子吸收跃升到较高激发态能级的过程，如图 1a 所示。如果上下两个能级的能量符合匹配要求，该过程还可能发生双光子、三光子、四光子吸收等。当离子从激发态能级返回到基态能级时，释放出的光子能量大于单个或多个光子的能量，进而产生发射光波长小于激发光波长的上转换发光。

1.2 能量传递（energy transfer，ET）

能量传递一般发生在不同类型离子间。其原理是处于激发态的一种离子（施主离子，也叫敏化剂）与另一种离子（受主离子，也叫激活剂）满足能量匹配要求发生的相互作用。按照能量转移方式的不同，可以分为伴随激发态吸收的能量转移、连续能量转移、交叉弛豫、协同敏化和协同发光等四种形式。其中伴随激发态吸收的能量转移是一种常见形式，如图 1b 所示。该机制中，处于激发态能级的敏化剂离子将能量传递给激活剂离子，激活剂离子吸收能能量后从基态能级跃升至激发态能级，敏化剂离子则返回到基态能级。处于激发态能级的激活剂离子通过吸收光子能量后又跃升至更高的激发态能级。这个能量传递方式称为伴随激发态吸收的能量转移。

1.3 光子雪崩（photon avalanche，PA）

1979 年，Chivian 等最早提出了光子雪崩的机理[7]。处于中间亚稳定态能级上的离子经过激发态吸收跃升至较高激发态能级上之后，该离子与另一个处于基态能级的离子发生交叉弛豫作用后，后者跃迁至中间亚稳定态能级，而前者本身则以无辐射跃迁的方式返回至中间亚稳定态能级。如此反复，使得处于基态能级的离子越来越少，而处于中间亚稳定态能级的离子数目像雪崩一样呈指数增加。这个过程称为光子雪崩，如图 1c 所示。

2 上转换发光材料

上转换发光材料通常由基质、敏化剂和激活剂三部分组成。敏化剂能将吸收的红外光子能量有效地传递给激活剂。要有效地实现上转换发光过程，需要发光中心的激发态要有较长的能级寿命。普通离子的能级寿命只有10^{-10}~10^{-8}秒，而稀土离子激发态的能级寿命较长，可达10^{-6}~10^{-2}秒。因此，目前有效的上转换发光材料绝大多数是稀土离子双掺杂的上转换发光材料。在稀土上转换发光材料中，基质材料有氟化物（如YF_3、$NaYF_4$）、氧化物（如Y_2O_3、Lu_2O_3）、硫氧化物（如Y_2O_2S、Gd_2O_2S）、磷酸盐（如$LaPO_4$、$LuPO_4$）、钨酸盐（如

$NaY(WO_4)_2$）等。上述众多的基质材料中，$NaYF_4$是目前最为理想的上转换发光基质材料，被应用得最多。用作敏化剂的稀土金属离子通常是Yb^{3+}，此外还有Er^{3+}、Sm^{3+}等。稀土Yb^{3+}的激发光波长是980 nm，吸收截面大，是最为常用且有效的上转换敏化剂[8,9]。常作为激活剂的稀土离子Er^{3+}、Pr^{3+}、Tb^{3+}、Ho^{3+}、Tm^{3+}等。由于Yb^{3+}-Er^{3+}、Yb^{3+}-Tm^{3+}、Yb^{3+}-Ho^{3+}离子对组成的双掺杂的上转换发光材料具有很高的上转换发光效率，目前该类材料用得最多，是当前研究的热点。

3 合成方法

合成上转换发光纳米材料量的方法主要有水热法、共沉淀法、溶剂热法、热分解法等。其合成材料可分为两类：前驱体和稳定剂（又称配体）。前驱体是生成纳米颗粒的核心部分，配体起到有效防止纳米颗粒聚集、调整颗粒粒径、有保护粒子表面、减缓其生长速度的作用。

3.1 水热法

水热法是以水溶液或水蒸气作为反应体系，通过加热使反应体系产生一定的温度和压力，使得物质在水溶液中进行水热反应，合成分散的纳米颗粒的一种方法[3, 10~14]。合成过程见图 2。反应通常在密闭的反应容器（如高压反应釜）中进行。该方法中用作粒度控制剂的主要有乙二胺四乙酸二钠（EDTA）、柠檬酸、油酸等。这种方法的优点是反应条件温和、实验装置简单、操作简便、环境污染少，缺点是只适用于对水不敏感的化合物的制备，合成的纳米材料形状各异，且多为微米级别。

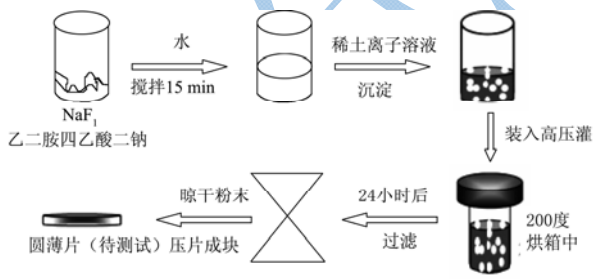


图2 UCNPs的水热法合成示意图[15]

Fig.2 The schematic diagram of hydrothermal method of UCNPs

3.2 共沉淀法

共沉淀法是在可溶性混合盐溶液中加入沉淀剂，促使水溶液进行化学反应，生成难溶性物质，从溶液中析出，然后经过过滤、洗涤、干燥或煅烧等过程，得到所需纳米颗粒。Martin 等[16]最早利用该方法在不添加络合剂的情况下制备合成了 $NaYF_4$:Yb,Pr 上转换材料。由于该方法获得的材料粒径较大且分布很不均匀，随后的一些研究对此进行了改进，在制备过程中加入了络合剂（如 EDTA、DTPA），通过控制被沉淀组分在溶液中缓慢、均匀地释放并与沉淀剂发生沉淀反应[17~19]。该方法具有操作简单、成本低廉、重现性好及合成的颗粒致密等优点，但与其他方法相比，合成的纳米颗粒尺寸还是较宽，颗粒的水溶性差。

3.3 溶剂热法

溶剂热法是以有机溶剂代替水，采用溶剂热反应进行无机合成制备纳米颗粒的方法[20~22]。溶剂通常为乙醇-水、乙酸-水等，用到的配体有 EDTA、聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、聚乙烯亚胺（PEI）、油酸等。该方法是水热法的一种重大改进，弥补了水热法的不足，具有反应条件温和（反应温度一般不超过 200 ℃）、反应活性高、纳米颗粒纯度高、分散性好、易与控制晶体形貌等优点，是较为理想的上转换发光纳米颗粒合成方法。

3.4 热分解法

热分解法是指在无水无氧的条件下将合成上转换发光纳米颗粒的前驱体注射到高沸点的有机溶剂中，利用高温（250~370 ℃）将前驱体迅速分解成核、生长，从而获得纳米颗粒的方法[9, 23~26]。该方法中用到由非配位性溶剂和配位性溶剂组成的混合溶剂，如油酸 - 十八烯（OA/ODE）、油酸 - 油胺 - 十八烯（OA/OM/ODE）等。非配位性溶剂起到为反应提供高温环境的作用，而配位性溶剂则能吸附在纳米颗粒的表面，防止颗粒的进一步长大和聚集。此方法中使用的前驱体通常为三氟乙酸稀土盐。热分解法合成的纳米颗粒结晶性好、尺寸均匀、粒度可调及形貌可控，但是不足之处是反应条件苛刻、过程繁琐、试剂成本高且毒性大、产生有毒副产物（三氟乙酸醋酸酐、三氟乙酰氟、羰基二氟化物等）[15]，颗粒的水溶性不好。

4 表面修饰

要想将上述方法制备获得的上转换发光纳米材料应用于生物领域，必须确保合成的纳米颗粒的粒径足够小且分布均匀，具有较强的发光性能。此外，以上方法合成的上转换发光纳米材料由于通常包覆有憎水性的配体分子（如油酸和油胺）使得纳米颗粒的表面一般是疏水性的，因此还需将其表面的疏水基转变为亲水基团（如-COOH、-NH_2、-SH），才能实现纳米颗粒与生物分子的连接和分子标记。目前对上转换发光纳米颗粒进行表面修饰的主要方法有硅烷化法、表

面钝化法、配体交换法、配体氧化法、聚合物包覆法及主客体相互作用等。

4.1 硅烷化法

硅烷化法是利用硅烷化试剂在上转换发光纳米材料表面包覆上 SiO_2 层的方法。这种方法比较成熟，用到的方法通常是经典的 Stober 法[27]或反相微乳液法。其中，Stober 方法是利用正硅酸乙酯（TEOS）在碱性条件下的水解及缩合反应使纳米颗粒表面形成 SiO_2 层，再利用氨基硅氧烷的水解及缩合反应对 SiO_2 表面进一步修饰出能与生物分子相偶联的氨基基团。Li 等[28]利用溶剂热法合成了 $NaYF_4$:Yb^{3+},Er^{3+}纳米颗粒，接着进行硅烷化修饰后获得了 SiO_2 包覆的上转换纳米颗粒，包覆层厚度约为 10 nm，具有很好的分散性。马小媛等[29]利用水热法制备出 $NaYF_4$:Yb^{3+},Er^{3+}上转换荧光纳米颗粒，粒径约为 40 nm，然后对进行 SiO_2 包覆，获得了氨基化的上转换纳米颗粒，表面功能化后的 $NaYF_4$:Yb^{3+},Er^{3+}发光强度更大，可用于沙门氏菌 DNA 的检测。该方法具有稳定高、水溶性和生物兼容性好等优点，目前正广泛应用于上转换荧光纳米颗粒的表面修饰。

4.2 表面钝化法

表面钝化法即在纳米颗粒表面包覆一层钝化层（如同质稀土层），保护表面裸露的掺杂离子，以有效地避免其激发的能量转移到纳米颗粒表面，从而提高纳米颗粒的发光效率。例如，Mai 等[9]采用热分解法合成了 $NaYF_4$:Yb^{3+},Er^{3+}上转换纳米颗粒，进行 $NaYF_4$ 表面包覆后，制备出的纳米颗粒上转换效率显著增强，α-$NaYF_4$:Yb,Er@α-$NaYF_4$ 的上转换荧光效率增强一倍，而 β-$NaYF_4$:Yb,Er@α-$NaYF_4$ 的荧光效率也增加了 1/2。

4.3 配体交换法

配体交换法是利用配位能力强、带有亲水基团的多功能有机配体取代纳米颗粒表面的原有配体（如油酸和油胺），最终制备出具有亲水性的上转换纳米颗粒的方法。Yi 等[8]采用双极性的 PEG600 二酸作为修饰剂，通过配体交换法成功地将油胺为配体的 β-$NaYF_4$:Yb^{3+},Er^{3+}转化为亲水性的纳米微粒。最近，单爽等[26]选用柠檬酸和 L-半胱氨酸作为修饰剂，在 100 ℃的油-水两相中，对合成的油溶性稀土上转换荧光纳米颗粒 $NaYF_4$:Yb^{3+},Er^{3+}进行配体交换，也得到了水溶性上转换纳米颗粒。

4.4 配体氧化法

配体氧化法是用强氧化剂将纳米颗粒表面的不饱和键氧化成活性官能团（如羧基、醛基等）的一种方法。该方法最早由 Chen 等[30]于 2008 年提出。研究者人员利用 Lemieux-von Rudloff 试剂（0.5 mM $KMnO_4$ +0.105 mM $NaIO_4$ 水溶液）将 $NaYF_4$:Yb^{3+},Er^{3+}上转换纳米颗粒表面油酸配体上的碳-碳双键在 40 ℃的温和条件下氧化成两个羧基，获得了亲水性能良好的相当于壬二酸表面修饰的纳米颗粒。结果还显示，该方法对上转换纳米颗粒的形貌、组成和上转换发光性能无明显的不良影响。然而该方法仅仅适合于颗粒表面配体中含有碳-碳不饱和键的情况。由于大多数纳米颗粒的表面包覆有油酸或油胺配体分子，因此该方法可适用于大部分的上转换纳米颗粒的表面修饰。

4.5 聚合物包覆法

聚合物包覆法是利用具有两亲性的聚合物（如 PEG）的疏水端与上转换纳米颗粒通过范德华力作用包覆在纳米颗粒表面，亲水端与水相容，形成一个疏水/亲水的有机核-壳结构[31]。该方法可有效解决纳米颗粒的水溶性问题，减弱水对纳米颗粒的荧光淬灭效应。但是这种修饰过程相对比较复杂，包覆后的粒径往往会增大。

4.6 主客体相互作用

该方法是利用主体分子与客体分子（上转换纳米颗粒）的相互作用，合成水溶性上转换纳米颗粒。Liu 等[32]首次将 α-环糊精和 β-环糊精分子与合成的纳米颗粒 $NaYF_4$:Yb^{3+},Er^{3+}的油酸分子，通过主客体作用，获得了水溶性的纳米微粒。该方法具有操作简单、修饰效果好的优点，但是只适合对修饰剂与纳米颗粒表面的配体有自主结合作用的纳米颗粒的修饰。

5 上转换发光纳米技术在食品安全领域中的应用

上转换发光特殊的发光机理决定了上转换发光纳米颗粒是一种优越的生物标记材料。相对于有机荧光染料和量子点而言，它具有许多优点，例如毒性小、光学稳定性好、灵敏度高[13~14]、不会对生物体产生损害、吸收和发射带窄（半高线宽，FWHM<12 nm）、荧光寿命长（μs~ms）。因此，作为近期快速发展起来的热门荧光标记技术，目前国内外上转换发光纳米技术（UPNT）在生物学、医学和生命科学领域的细胞成像[33]、组织及活体成像[34]、生物检测[35~36]、药物输送（光动力治疗，PDT）[37]等方面取得了大量的研究

成果，显示出广阔的应用前景。目前国内外上转换发光纳米技术在食品安全领域的应用也陆续有一些报道，这方面的研究主要集中在食品中致病菌、真菌毒素、细菌毒素的检测研究上。

5.1 致病菌检测

王静等[38]利用上转换磷光标记和双抗体夹心免疫层析技术建立了肠出血性大肠杆菌 O157 的检测方法。制备的上转磷光(UCP)颗粒制备采用 EHEC O157 抗体进行标记。结果显示，该法能在 40 min 内完成 O157 检测，通过对 23 种 28 株常见细菌的检测发现，该方法的特异性高, 无交叉反应，方法的检测灵敏度为 5×10^3 CFU/mL，每次最低检测拷贝数为 500 细菌。应用于多种模拟食品样品人工染菌的检测，检测灵敏度最低可达 5×10^3 CFU/mL。此方法敏感性高于胶体金免疫层析方法，可应用于口岸等特殊场所可疑样品现场检测。Duan 等[39]采用水热法合成了 $NaYF_4$:Yb,Er/Tm UCNPs 和 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒（magnetic nanoparticles，MPNs），利用经典的 Stober 法对 UCNPs 和 MNPs 进行了氨基化修饰，分别将 aptamer 1、aptamer 2 两个适配体与 UCNPs 和 Fe_3O_4 MNPs 进行组装后，建立了基于磁分离富集-核酸适配体识别-上转换荧光纳米探针技术检测鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的方法。该方法的检测线性范围为 10^1~10^5 CFU/mL（R^2=0.9964），检测限分别为 5 和 8 个 CFU/mL。马小媛等[29]利用水热法制备了 $NaYF_4$:Yb^{3+},Er^{3+}上转换荧光纳米颗粒，以上转换荧光纳米颗粒为荧光显示探针，结合磁性纳米材料的磁分离富集作用实现了对沙门氏菌目标 DNA 的高灵敏检测，检出下限达 3 fmol/L。目标 DNA 链浓度与荧光强度与成正比，在 0.01~10 pmol/L 范围内呈现良好的线性关系。由此可见，尽管当前在食源性致病菌方面的应用还只局限于少数几个菌种，但是鉴于上转换荧光纳米探针技术的高灵敏度、高特异性等诸多优势，今后该方向的研究还将大有可为。

5.2 真菌毒素检测

江南大学的王周平教授课题组近两年在这方面做了大量创新性的工作。Wu等[3]采用水热法合成了 $NaYF_4$:Yb,Er上转换发光纳米颗粒，一步法合成了 Fe_3O_4 MPNs，获得的$NaYF_4$:Yb,Er颗粒采用Stober方法进行修饰，通过将两个适配体与氨基化的UCNPs和 Fe_3O_4 MNPs进行组装，建立了基于磁分离富集-核酸适配体识别-上转换荧光纳米探针技术的赭曲霉毒素A（OTA）检测技术。发现OTA在 1×10^{-13}~1×10^{-9} g/mL与荧光值呈线性关系，检出限均为 1×10^{-13} g/mL，相对标准偏差RSD为 3.29%，回收率为 90.70%~117.98%。与其他方法相比，该方法的检测灵敏度是最高的。接着，Wu等[40]建立了基于抗原抗体免疫亲和识别-磁分离富集-上转换荧光纳米探针的黄曲霉毒素（AFB1）和OTA真菌毒素检测方法（图 3）。此研究中他们对水热法合成的$NaYF_4$:Yb,Tm/Er两种上转换发光纳米颗粒进行TEOS硅烷化修饰，获得了氨基化修饰的纳米颗粒，最后与毒素抗体结合，制备出了 *anti*-AFB1-$NaYF_4$:Yb,Tm UCNPs（图 3a）和 anti-OTA-$NaYF_4$:Yb,Er UCNPs（图 3b）信号探针。此上转换信号探针与经修饰的与人工抗原结合的磁性纳米捕获探针（AFB1-BSA-MNPs、OTA-BSA-MNPs）通过免疫识别方式结合在一起（图 3a、3b）。检测时加入的AFB1 和OTA标准品将与人工抗原竞争性的与抗体发生特异性识别反应，导致上转换纳米颗粒-磁性纳米颗粒复合物的减少，最后通过外界磁场进行磁分离，将上清液移去，观察复合物的荧光信号，即可实现检测对目标物的检测分析（图 3c）。结果发现，当AFB1 和OTA浓度在 0.01~10 ng/mL之间时与荧光值呈线性关系，检出限均为 0.01 ng/mL，灵敏度非常高，相对标准偏差（RSD）分别为 5.19%和 2.14%，方法重现性良好。后来，Wu等[41]还通过合成$BaYF_5$:Yb,Er/Tm上转换荧光纳米颗粒，以这些UCNPs为能量供体，氧化石墨烯（GO）作为能量受体，建立了$BaYF_5$:Yb,Er和$BaYF_5$:Yb,Tm上转换荧光纳米颗粒与氧化石墨烯荧光共振能量转移体系（FRET）的OTA、FB1 的适配体传感器检测方法。结果发现，OTA在 0.05~100 ng/mL，FB1 在 0.1~500 ng/mL浓度范围内呈良好的线性关系，两者的检出限分别为 0.02 ng/mL和 0.1 ng/mL。该方法应用于被污染玉米的检测。同时，利用荧光共振能量转移模式，前面的作者还在最近的研究中针对其他真菌毒素如伏马菌素B1（FB1）的检测进行了研究[14]。作者分别采用水热法合成了 $NaYF_4$:Yb,Ho上转换荧光纳米材料，对其表面进行了氨基化修饰，建立了上转换纳米颗粒-金纳米颗粒标记分子信标的FRET检测FB1 新型检测技术。通过共价键连接将金纳米颗粒和上转换纳米颗粒分别连接到分子信标“茎状”部分的两端，而“茎状”特殊设计 5 个碱基互补，使得能够将金纳米颗粒受体和上转换纳米颗粒供体靠近在一起，成为AuNPs-MB- UCNPs复合物，最终形成FRET体系上转换荧光被淬灭。检测结果表明，FB1 在 0.01~100 ng/mL浓度范围内呈良好的线性关系，检出限达到 0.01 ng/mL，检测限较之前的方法[41]提高了 10 倍。

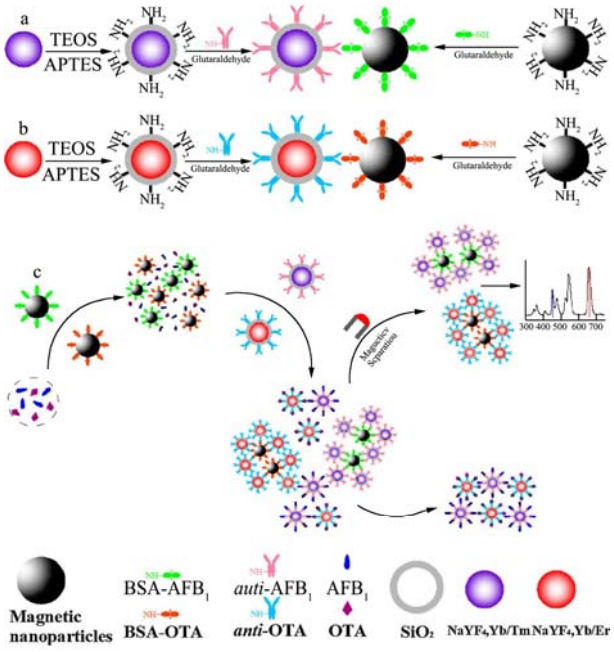


图 3 功能化纳米材料的修饰过程和竞争免疫检测方法的原理[40]

Fig.3 Fabrication process of biofunctionalized nanoparticles and the principle of the performed immunoassay

注：(a) anti-AFB1-$NaYF_4$:Yb,Tm UCNPs 和 AFB1-BSA-MNPs 的修饰，(b) anti-OTA-$NaYF_4$:Yb,Er UCNPs 和 OTA-BSA-MNPs 的修饰，(c) 基于功能化纳米材料竞争免疫反应模式检测的原理图。

5.3 其他毒素检测

除真菌产生的毒素外，其他细菌也会产生毒素，导致细菌性食源性疾病的发生。例如，食品受金黄色葡萄球菌污染后，不仅会腐败变质，而且一些菌株还会产生金黄色葡萄球菌肠毒素（Staphylococcal enterotoxins，Ses），从而引起食物中毒。肠毒素的检测也是当前研究的热点。最近，王周平教授课题组[42]也利用转换发光纳米探针技术对检测葡萄球菌肠毒素进行了检测。建立了基于核酸适配体识别-上转换荧光纳米探针技术的金黄色葡萄球菌肠毒素B（SEB）超灵敏检测方法。方法结合共振能量转移技术和酶催化信号放大技术，有效的提高了目标物的检测灵敏度，SEB在0.001~1 ng/mL浓度范围内呈良好的线性关系，检出限达0.3 pg/mL，成功应用于牛奶样中SEB的检测分析，在供试的12个样品中检测发现了11个为阳性，与传统的ELISA方法检测结果具有很好的相关性，是一种快速超灵敏的方法。

6 结论及展望

作为新一代快速发展的生物标记材料，上转换发光纳米材料具有毒性小、光学稳定性好、穿透能力强、灵敏度高、无背景荧光等诸多优点。虽然对上转换发光纳米材料的研究尚处于起步阶段，还面临材料的有效制备与合成、表面修饰及功能化以及在高通量平台上的应用等很多挑战，但是目前已经取得了令人瞩目的研究成果，引发了广泛关注，近年来发表的论文数量正快速增长。毋庸置疑，上转换发光纳米探针技术已经在生物学、医学和生命科学领域的细胞成像、组织及活体成像、生物检测、光动力治疗等方面取得巨大成功，展现了很好的应用前景。但是在食品安全检测领域的研究还刚开始起步，绝大部分研究还仅仅局限于真菌毒素及个别致病菌的检测，尤其在农药、兽药残留等方面尚未取得进展。在将来的工作中，光谱可分辨的多色上转换纳米颗粒的制备、生物功能化及其检测应用将成为研究重点。我们深信，该技术在食品安全检测领域的应用将会得到极大的发展。

参考文献

[1] Wang F, Tan WB, Zhang Y, et al. Luminescent nanomaterials for biological labeling [J]. Nanotechnology, 2006, 17(1): R1-R13

[2] Male KB, Lachance B, Hrapovic S, et al. Assessment of cytotoxicity of quantum dots and gold nanoparticles using cell-based impedance spectroscopy [J]. Anal. Chem., 2008, 80(14): 5487-5493

[3] Wu SJ, Duan N, Wang ZP, et al. Aptamer-functionalized magnetic nanoparticle-based bioassay for the detection of ochratoxin a using upconversion nanoparticles as labels [J]. Analyst, 2011, 136: 2306-2314

[4] Auzel F. Upconversion and anti-stokes processes with f and d ions in solids [J]. Chem. Rev., 2004, 104: 139-173

[5] 林敏,赵英,董宇卿,等.稀土上转换发光纳米材料的制备及生物医学应用研究进展[J].中国材料进展,2012,31(1):36-43
LIN Min, ZHAO Ying, DONG Yu-qing, et al. Progress in synthesis and biomedical applications of rare earth upconversion luminescent nano materials [J]. Materials China, 2012, 31(1): 36-43

[6] Bloembergen N. Solid state infrared quantum counters [J]. Phys. Rev. Lett., 1959, 2(3): 84-85

[7] Chivian JS, Case WE, Eden DD. The photon avalanche: a new phenomenon in Pr^{3+}-based infrared quantum counters [J]. Appl. Phys. Lett., 1979, 35(2): 124-125

[8] Yi GS, Chow GM. Synthesis of hexagonal-phase NaYF4:Yb,Er and NaYF4:Yb,Tm nanocrystals with efficient

up-conversion fluorescence [J]. Adv. Funct. Mater., 2006, 16(18): 2324-2329

[9] Mai HX, Zhang YW, Sun LD, et al. Highly efficient multicolor up-conversion emissions and their mechanisms of monodisperse NaYF4:Yb,Er core and core/shell-structured nanocrystals [J]. J. Phys. Chem. C., 2007, 111(37): 13721-13729

[10] Wang X, Zhuang J, Peng Q, et al. A general strategy for nanocrystal syn thesis [J]. Nature, 2005, 437(7055): 121-124

[11] Sun YJ, Chen Y, Tian LJ. Controlled synthesis and morphology dependent upconversion luminescence of NaYF4:Yb,Er nanocrystals [J]. Nanotechnology, 2007, 18: 275609

[12] Li CX, Quan ZW, Yang J, et al. Highly uniform and monodisperse β-NaYF4:Ln3+ (Ln=Eu, Tb, Yb/Er, and Yb/Tm) hexagonal microprism crystals: hydrothermal synthesis and luminescent properties [J]. Inorg. Chem., 2007, 46(16): 6329-6337

[13] Wang LY, Li YD. Controlled synthesis and luminescence of lanthanide doped NaYF4 nanocrystals [J]. Chem. Mater., 2007, 19(4): 727-734

[14] Wu SJ, Duan N, Li XL, et al. Homogenous detection of fumonisin B1 with a molecular beacon based on fluorescence resonance energy transfer between NaYF4:Yb,Ho upconversion nanoparticles and gold nanoparticles [J]. Talanta., 2013, 116: 611-618

[15] 詹求强,刘静,赵宇翔,等.多光子发光的稀土上转换纳米颗粒在生物光子学中的研究进展[J].激光生物学报,2013,22(1): 13-25
ZHAN Qiu-qiang, LIU Jing, ZHAO Yu-xiang, et al. Research progress in nonlinear upconversion luminescence of rare-earth nanoparticals in biomedical optics [J]. Acta. Laser. Biology. Sinica., 2013, 22(1): 13-25

[16] Martin N, Boutinaud P, Mahiou R, et al. Preparation of fluorides at 80 ℃ in the NaF-(Y, Yb, Pr) F3 system [J]. J Mater Chem., 1999, 9(1): 125-128

[17] Yi GS，Lu HC，Zhao SY，et al．Synthesis, characterization, and biological application of size-controlled nanocrystalline NaYF4: Yb, Er infrared-to-visible up-conversion phosphors [J]. Nano. Lett., 2004, 4(11): 2191-2196

[18] Wei Y, Lu FQ, Zhang XR, et al. Synthesis and characterization of efficient near-infrared upconversion Yb and Tm codoped NaYF4 nanocrystal reporter [J]. J. Alloys. Compd., 2007(1-2): 333-340

[19] 王猛,密丛丛,王单,等.NaYF4:BYb,Er上转换荧光纳米颗粒的共沉淀法合成及表征[J].光谱学与光谱分析,2009,29(12): 3327-3331
WANG Meng, MI Cong-cong, WANG Shan, et al. Synthesis and characterization of NaYF4:Yb,Er upconversion fluorescent nanoparticles via a co-precipitation method [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(12): 3327-3331

[20] Li Z Q, Zhang Y. Monodisperse silica-coated polyvinylpyrrolidone/NaYF4 nanocrystals with multicolor upconversion fluorescence emission [J]. Angew. Chem., 2006, 118: 7896-7899

[21] Wang F, Chatterjee DK, Li ZQ, et al. Synthesis of polyethylenimine/NaYF4 nanoparticles with upconversion fluorescence [J]. Nanotechnology, 2006, 17(23): 5786-5791

[22] Wang M, Mi CC, Liu JL, et al. One-step synthesis and characterization of water-soluble NaYF4:Yb,Er/Polymer nanoparticles with efficient up-conversion fluorescence [J]. J. Alloys. Compd., 2009, 485(1-2): L24-27

[23] Zhang YW, Sun X, Si R, et al. Single-crystalline and monodisperse LaF3 triangular nanoplates from a single-source precursor [J]. J. Am. Chem. Soc., 2005, 127(10): 3260-3261

[24] Mai HX, Zhang YW, Si R, et al. High-quality sodium rare-earth fluoride nanocrystals: controlled synthesis and optical properties [J]. J. Am. Chem. Soc., 2006, 128(19): 6426-6436

[25] 王猛,刘金玲,密丛丛,等.NaYF4:Yb,Er上转换荧光纳米颗粒的合成及表面修饰[J].东北大学学报(自然科学版),2010, 31(2):232-235
WANG Meng, LIU Jin-ling, MI Cong-cong, et al. Synthesis and surface modification of NaYF4:Yb,Er upconversion fluorescent nanoparticles [J]. Journal of Northeastern University (Natural Science), 2010, 31(2): 232-235

[26] 单爽,吴晶,谭明乾,等.一种水溶性稀土上转换荧光纳米探针及其活体荧光成像研究[J].生物医学工程与临床,2013,17(3): 208-212
SHAN Shuang, WU Jing, TAN Ming-qian, et al. Study on a water-soluble upconversion fluorescent nanoprobe for in vivo fluorescent imaging [J]. BME & Clin. Med., 2013, 17(3): 208-212

[27] Stober W, Fink A. J. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range [J]. Colloid. Interface. Sci., 1968, 26(1): 62-69

[28] Li Z Q, Zhang Y. Monodisperse silica-coated polyvinylpyrrolidone/NaYF4 nanocrystals with multicolor upconversion fluorescence emission [J]. Angew. Chem., 2006, 118: 7896-7899

[29] 马小媛,李双,吴世嘉,等.基于上转换荧光标记和磁分离技术的沙门氏菌DNA检测新方法[J].食品与生物技术学报,2013, 32(12):1303-1310

[30] MA Xiao-yuan, LI Shuang, WU Shi-jia, et al. Magnetic nanoparticles-based bioassay for the detection of Salmonella using upconversion nanoparticles as labels [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(12): 1303-1310

[31] Chen ZG，Chen HL，Hu H，et al．Versatile synthesis strategy for carboxylic acid-functionalized upconverting nanophosphors as biological labels [J]. J. Am. Chem. Soc., 2008, 130(10): 3023-3029

[32] Yi GS, Chow GM. Water-soluble NaYF4: Yb，Er (Tm)/NaYF4/polymer core/shell/shell nanoparticles with significant enhancement of upconversion fluorescence [J]. Chem. Mater, 2007, 19(3): 341-343

[33] Liu Q, Chen M, Sun Y, et al. Multifunctional rare-earth self-assembled nanosystem for tri-modal upconversion luminescence/fluorescence/positron emission tomography imaging [J]. Biomaterials, 2011, 32(32): 8243-8253

[34] Nyk M, Kumar R, Ohulchanskyy TY, et al. High contrast in vitro and in vivo photoluminescence bioimaging using near infrared to near infrared up-conversion in Tm^{3+} and Yb^{3+} doped fluoride nanophosphors [J]. Nano. Letters, 2008, 8(11): 3834-3838

[35] Chatterjee DK, Rufaihah AJ, Zhang Y. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals [J]. Biomaterials, 2008, 29(7): 937-943

[36] Wang LY, Li YD. Green upconversion nanocrystals for DNA detection [J]. Chem. Commun., 2006: 2557-2559

[37] Chen ZG, Chen HL, Hu H, et al. Versatile synthesis strategy for carboxylic acid-functionalized upconverting nanophosphors as biological labels [J]. J. Am. Chem. Soc., 2008, 130 (10): 3023-3029

[38] Zhang P, Steelant W, Kumar M, et al. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation [J]. J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(15): 4526-4527

[39] 王静,周蕾,李伟,等.上转磷光免疫层析检测肠出血性大肠杆菌O157 [J].中国食品卫生杂志,2007,19(1):41-44
WANG Jing, ZHOU Lei, LI Wei, et al. Development of UCP-immunochromatography test for rapid detection of E.coli O157 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2007, 19(1): 41-44

[40] Duan N, Wu SJ, Zhu CQ, et al. Dual-color upconversion fluorescence and aptamer- functionalized magnetic nanoparticles-based bioassay for the simultaneous detection of Salmonella Typhimurium and Staphylococcus aureus [J]. Anal. Chim. Acta., 2012, 723: 1-6

[41] Wu SJ , Duan N , Zhu CQ, et al. Magnetic nanobead-based immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A using upconversion nanoparticles as multicolor labels [J]. Biosens. Bioelectron., 2011, 30(1): 35-42

[42] Wu SJ, Duan N, Ma XY, et al. Multiplexed fluorescence resonance energy transfer aptasensor between upconversion nanoparticles and graphene oxide for the simultaneous determination of mycotoxins [J]. Anal. Chem., 2012, 84(14): 6263-6270

[43] Wu SJ, Duan N, Ma XY, et al. A highly sensitive fluorescence resonance energy transfer aptasensor for staphylococcal enterotoxin B detection based on exonuclease-catalyzed target recycling strategy [J]. Anal. Chim. Acta., 2013, 782: 59-66