

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.11.041

基于新型发光材料的荧光免疫吸附检测技术研究进展*

沈梦飞 武卫杰 刘心怡 李 丹 李万万[△]

(上海交通大学材料科学与工程学院, 金属基复合材料国家重点实验室 上海 200240)

摘要: 荧光免疫吸附检测技术利用荧光物质标记识别分子, 基于待测物与识别分子的特异性结合对待测物进行定性定量分析, 具有操作简单、耗时少、成本低、稳定性好等优点。随着纳米材料的飞速发展及其在荧光免疫吸附检测技术中的广泛应用, 该技术在生物检测的领域具有更加广阔的应用前景。本文介绍了量子点、碳点、稀土上转换纳米粒子、聚集诱导发光材料等新型发光材料的光学性能特点以及将其构建新型荧光免疫吸附检测平台, 综述了近年来基于这些新型发光材料构建荧光免疫吸附检测平台对蛋白、核酸、病毒、细菌和小分子霉菌毒素等物质检测的研究进展, 并讨论了该技术在未来的发展过程中需要解决的问题, 包括进一步提高自动化水平争取实现实时检测, 以及加快检测技术在诊断领域的临床转化等, 希望本文的系统介绍可以助力高性能荧光免疫吸附检测技术的发展。

关键词: 荧光免疫吸附检测; 新型发光材料; 纳米粒子; 生物医学诊断

中图分类号: R318.08; R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)11-2190-05

Research Progress in Novel Luminescent Materials Based Fluorescence-Linked Immunosorbent Assay*

SHEN Meng-fei, WU Wei-jie, LIU Xin-yi, LI Dan, LI Wan-wan[△]

(School of Materials Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University;

State Key Lab of Metal Matrix Composites, Shanghai, 200240, China)

ABSTRACT: Fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA), which is based on fluorescent substance labeling to identify molecules, can be used in qualitative and quantitative analysis of the object through the specific combination of the analytes and the recognition molecules. With the development of the nanotechnology, functional luminescent materials were widely applied in FLISA platform, showing the promising application potential in biodetection. In this paper, the typical performance characteristics of novel luminescent materials such as quantum dots, carbon dots, rare earth upconversion nanoparticles and aggregation-inducing emission luminescent materials are introduced. And the research progress of using these fluorescent materials in detecting proteins, nucleic acids, viruses, bacteria and small molecule mycotoxins in the past few years is reviewed. Moreover, the problems that need to be solved in the future development are also discussed in this paper, including further improving the automation level for real-time detection, and speeding up the clinical transformation of detection technology in the field of diagnosis.

Key words: Fluorescence-linked immunosorbent assay; Novel luminescent materials; Nanoparticles; Biomedical diagnosis

Chinese Library Classification(CLC): R318.08; R446 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)11-2190-05

前言

荧光免疫吸附检测 (Fluorescence-Linked Immunosorbent Assay, FLISA) 是在酶联免疫吸附检测 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 技术的基础上发展起来的一项体外检测技术, 在多种生物分子的检测中发挥着重要的作用^[1]。该检测技术利用荧光物质作为标记信号与识别分子相连, 基于待测物与识别分子的特异性结合, 通过测定荧光强度信号来对待测物进行定性定量分析^[2]。

随着纳米技术的不断发展, 新型发光材料作为信号分子应用于生物检测, 促进了荧光检测技术的进步。生物技术的发展也对免疫检测方法进行不断改进和优化, 包括制备提纯具有更高特异性的抗体、核酸适配体等作为识别分子, 从而使荧光免疫吸附检测技术对生物分子检测的灵敏度和特异性不断提高。本文将介绍几种可作为荧光信号分子的新型发光材料, 综述近几年来基于这些材料的荧光免疫吸附检测技术的应用研究进展, 同时也将讨论该技术在未来的发展过程中需要进一步解决的问题。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81671782)

作者简介: 沈梦飞(1993-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 新型荧光免疫吸附检测技术的研究,

E-mail: shenmengfei147@163.com 电话: 18930319179

[△] 通讯作者: 李万万(1976-), 男, 博士生导师, 研究员, 主要研究方向: 生物医学诊疗用功能微纳米材料,

E-mail: wwli@sjtu.edu.cn, 电话: 021-34202956

(收稿日期: 2020-08-05 接受日期: 2020-08-28)

1 新型发光材料

1.1 量子点

量子点(Quantum Dots, QDs)是特征尺寸通常在 1-20 nm 范围内并具有特定光电特性的半导体。这种光电特性是由电子的强约束作用引起的^[9]。当半导体吸收光子时,电子跃迁到导带,在价带中留下“空穴”,由于库仑作用的影响,电子会以一定的平均距离绕空穴运行,形成“激子”,类似于原子的玻尔模型。当纳米粒子的半径小于激子玻尔半径时,电子和空穴就会受到“挤压”,产生限制能量。量子限制使能级升高或发生蓝移,并且纳米粒子越小,对电子和空穴的挤压作用越大,能级就会越高^[9]。因此,尺寸较大的纳米粒子会发射红光,尺寸较小的纳米粒子发射蓝光。这样发射光的波长便可通过纳米粒子的尺寸大小来调整(见图 1)。并且量子点还具有可用单波长激发、发射光谱狭窄等优点,因此有望进行多重检测^[5-8]。此外,与传统有机荧光染料相比,量子点还具有量子效率高,抗光漂白性好等优点,因此可以提高检测灵敏度。Zhao 等^[9]评估了免疫荧光标记技术中量子点和异硫氰酸荧光素(Fluorescein Isothiocyanate, FITC)的荧光强度和光稳定性。结果表明量子点的荧光强度和光稳定性都比异硫氰酸荧光素更高。Shen 等^[10]报道了基于量子点的荧光免疫吸附检测方法具有比酶联免疫吸附检测技术更低的检测限和更宽的线性检测范围,且总反应时间仅为 50 分钟,比商业化酶联免疫吸附检测技术(约 120 分钟)短得多。然而使用量子点做标记分子也有其局限性,例如若制备的量子点含 Cd 等重金属元素,因其具有高毒性而被禁止用于临床研究^[11,12]。

碳点(Carbon Dots, CDs)是零维碳纳米材料,一般尺寸小于 10 nm,具有大双光子吸收截面,且发射光谱可调,光稳定性高,不会发生荧光闪烁^[13]。虽然已知大多数碳点的发射与激发光有关(见图 2)^[14],但对其具体发射过程的解释仍存在争议^[15,16]。有研究认为碳点的发射通常与带隙以及表面缺陷相关。带隙可通过在碳点表面引入含氧或含氮基团来调节,进而调控碳点的发射波长^[17]。碳点表面的羧酸基团又赋予它们出色的水溶性,使其具有良好的细胞渗透性和生物相容性。此外,碳点的一个重要特征是它们不含任何重金属,因此对环境更加友好。这些优点使得碳点在荧光免疫吸附检测应用中更具吸引力^[18,19]。但只利用碳点进行免疫荧光检测还存在一些不足,例如单个碳点荧光强度不高,直接用小尺寸的碳点标记生物分子也比较困难。并且大多数碳点需用紫外激发,在免疫检测过程中可能会因基质中其他物质的自发荧光产生较大的背景噪声从而降低检测灵敏度。因此在使用碳点进行荧光免疫检测时应设法增大需要的荧光信号。例如, Tang 等^[20]采用在二氧化锰(MnO₂)纳米片上装载碳点制成 CD-MnO₂,借助二氧化锰纳米片的氧化还原来影响碳点荧光的淬灭与增强。相对基于单碳点标记的荧光免疫吸附测定,CD-MnO₂的引入放大了免疫吸附检测的荧光信号。Wang 等^[21]利用碳点和草甘膦抗体偶联,利用磁珠和草甘膦偶联搭建竞争性免疫吸附检测平台,由于结合分离技术减少了来自基质的干扰,从而提高检测的信噪比。

1.2 稀土上转换纳米粒子

稀土元素离子具有独特的发光特性,可通过光子上转换过

程将近红外长波长激发转换为波长较短的可见光辐射。上转换是非线性光学过程,通过具有长寿命的中间能级连续吸收两个或多个泵浦光子,然后发射出比泵浦光子波长更短的高能光子^[22]。上转换过程主要分为三大类:激发态吸收,能量传递上转换和光子雪崩。在激发态吸收阶段采取的是单个离子连续吸收泵浦光子的形式。能量传递上转换过程与激发态吸收过程相似,不同之处在于能量传递上转换过程中的激发是通过两个相邻离子之间的能量转移实现的。光子雪崩过程则要求泵浦强度高于某个阈值。光子雪崩在建立亚稳态能级种群后,激发离子和邻近的基态离子之间将发生交叉弛豫能量转移,并通过激发态吸收使高能级上的粒子呈指数增加,从而产生大量的上转换发射。近年来,镧系掺杂的上转换纳米粒子(Upconversion Nanoparticles, UCNPs)作为一类新的光学标记物,具有反斯托克斯频移较大,发射带宽陡峭,抗光漂白性高以及时间分辨率高等特点,有望成为有机荧光染料和量子点的替代品,用于荧光免疫吸附检测技术。Hua 等^[23]利用铒镱共掺杂四氟铒钠(NaYF₄/Yb, Er)做荧光报告分子检测氯喹啉, Sun 等^[24]也利用 NaYF₄/Yb, Er 来检测黄曲霉毒素 B1, 都取得了不错的检测效果。在检测过程中利用近红外激发而不是紫外线激发,将大大减少背景自发荧光,相较常规方法能有效提高检测灵敏度。但多数稀土上转换纳米粒子发光效率较低^[25,26],发光效率高的粒子制备过程又比较复杂,成本较高,这些因素限制了基于稀土上转换纳米粒子的荧光免疫吸附检测技术的进一步发展。

1.3 聚集诱导发光材料

许多传统的荧光染料存在聚集猝灭(Aggregation-Caused Quenching, ACQ)效应,从而限制了荧光免疫检测灵敏度的进一步提高。与聚集猝灭效应相反,具有螺旋桨形结构的聚集诱导发光(Aggregation-Inducing Emission, AIE)材料在稀溶液中几乎没有发射,在聚集状态下发射增强^[27]。这是因为聚集诱导荧光生色团(Aggregation-Induced Emission Luminogens, AIEgens)的结构具有柔韧性,可在稀溶液中进行分子内自由旋转,该运动通过非辐射衰变模式成功消耗了激发态能量。而当聚集诱导发光材料分子形成聚集体时,分子内旋转受到限制,非辐射衰变减弱,而辐射衰减也不严重,结果导致荧光增强^[28]。此外,聚集诱导发光材料分子在耐光漂白和生物相容性方面都具有优势,这使聚集诱导发光纳米粒子成为生物成像及荧光免疫吸附检测的理想候选者^[29-31]。Wang 等^[32]用聚集诱导发光材料酪氨酸官能化的四苯乙烯(TPE-Tyr)代替 ELISA 试剂盒中的原来的生色底物,结合酶催化过程检测癌胚抗原(CEA)。TPE-Tyr 分子溶解在缓冲液中时,荧光发射可忽略不计,在酶催化作用下形成聚集体,发出强荧光。检测结果显示良好的线性动态范围(0-12 ng/mL),检测限为 2 ng/mL,优于市售试剂盒的 5 ng/mL。但目前大多聚集诱导发光材料激发和发射波长较短,直接进行免疫检测时会受到自发荧光的干扰,在之后的研究工作中,可尝试与其他传感机制结合提高检测灵敏度。

2 荧光免疫吸附技术的生物检测应用

2.1 蛋白检测

蛋白检测多是对肿瘤标志物进行检测。常见的蛋白类肿瘤标志物又分为胚胎性蛋白类(甲胎蛋白 Alpha-Fetoprotein,

AFP^[33]、癌胚抗原 Carcinoembryonic Antigen, CEA^[35]), 糖蛋白抗原类 (Carbohydrate Antigen 724, CA724 等), 以及其他特殊蛋白质类抗原 (前列腺特异性抗原 Prostate Specific Antigen, PSA^[36]) 等。肿瘤标志物检测在协助早期诊断, 判断疾病分期, 病理类型和指导预后方面发挥着作用。

肿瘤标志物通常产生于癌细胞, 也可能产生于身体中的健康细胞。为减少出现假阳性结果, 提高检测灵敏度, Wu 等^[34]在荧光免疫吸附检测甲胎蛋白 AFP 的过程中, 采用碳点标记抗体, 可将临床线性检测范围扩至 0-350 ng/mL, 并且基于碳点的免疫测定结果与使用辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 和异硫氰酸荧光素的传统免疫测定结果相符。除此之外, Tsai 等^[33]将荧光分子与磁性纳米粒子结合, 制成具有高磁化率和高荧光强度的纳米复合材料, 再将其用于荧光免疫吸附检测 AFP, 结果具有更低的检测限和更宽的线性范围。

2.2 核酸检测

荧光免疫吸附检测技术也可用于核酸序列特异性检测。通常在检测过程中, 捕获探针特异性地与目标寡核苷酸序列的一个区域杂交, 而荧光信号探针与靶标上的其他区域杂交, 形成捕获探针 - 目标寡核苷酸 - 荧光信号探针的 "夹心" 形式。与蛋白质的夹心荧光免疫吸附测定法相比, 捕获探针和信号探针在没有靶标的情况下相互作用非常小, 使得背景信号更低, 从而在与靶标结合时能产生较强的信号变化, 得到较低检测限。Gu 等^[37]利用原位纳米晶体生长方法, 合成了具有较高比表面积和丰富的活性基团的上转换纳米粒子 (CaF₂:Yb/Ho @ MSNs), 再通过 DNA 探针进行修饰, 将其用于 miRNA 的定量检测, 检测限可低至 20 pM, 在癌症早期诊断中具有应用潜力。

DNA 损伤是由细胞代谢副产物、环境致癌物质和一些抗炎药物导致 DNA 核苷酸序列发生永久性变化的结果。Hu 等^[38]用荧光免疫吸附检测方法检测受损的 DNA 模型 (DNA-8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, DNA- 8-OHdG) 时, 采用了碳点和金纳米粒子 (Au Nanoparticles, AuNPs) 组成的淬灭剂对作为荧光报告分子。连接 DNA-8-OHdG 的碳点与连接 8-OHdG 抗体的金纳米粒子在免疫检测过程中距离很近, 这时碳点的荧光会被金纳米粒子淬灭掉。通过记录淬灭的荧光光谱来检测目标 DNA-8-OHdG。该方法也可用于检测其它的氧化应激生物标志物。

2.3 病毒检测

通常对病毒的检测是测定与病毒相关的核酸或蛋白质, 也可开发更加廉价灵敏的生物传感器直接检测完整病原体, 这对保证人类健康和预防生物恐怖主义具有非常重要的作用。

黄病毒传染病目前是全球主要的健康威胁, 包括寨卡病毒 (Zika Virus, ZIKV) 和登革热病毒 (Dengue Virus, DENV) 引发的传染病等, 其特点是发病多、分布广、危害较大。然而黄病毒科血清蛋白具有高度相似性, 区分寨卡病毒和登革热病毒感染一直具有挑战性, 对患者的检测也往往因交叉反应得到假阳性结果。Kim 等^[39]通过设计并修饰寨卡病毒包膜蛋白的新表位肽代替抗体, 结合铂纳米粒子作为信号分子, 进行荧光夹心免疫吸附检测, 来评估所选肽和病毒之间的相互作用, 之后利用这种方法来检测血清和尿液中的寨卡病毒。结果显示结合 Z_{10.8} 肽的荧光免疫吸附检测方法能够特异性检测寨卡病毒, 并且使

用肽进行血清检测时观察到的干扰比使用抗体时少。

肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, EV71) 可能引起婴幼儿手足口病, 因此对其进行早期诊断十分重要。Xiong 等^[40]利用多功能聚集诱导发光材料 (TPE-APP) 设计荧光免疫检测平台, 将荧光和等离子比色法集成在一个检测系统中, 可对 EV71 病毒进行高灵敏度和特异性检测。并且这种双模式免疫分析可用于真正的临床样品检测, 为病毒的初步筛查和高精度临床诊断提供便利。

2.4 细菌检测

传统的微生物培养方法只能定性检测食品中特定的单一细菌污染物, 并且可能需要数天或数周才能完成。相比之下, 荧光免疫吸附检测能够在复杂的食品基质中快速定量检测出致病性细菌^[57], 然而在前期的研究中, 采用该方法检测的灵敏度并不是很高, 因此人们在荧光免疫吸附检测的基础上尝试了各种优化改进方法。Chen 等^[42]在荧光免疫吸附检测技术中采用巯基丙酸 (Mercaptopropionic Acid, MPA) 修饰的铈化镉 (CdTe) 量子点来产生荧光信号。由于铈易被过氧化氢 (H₂O₂) 氧化, 导致量子点的荧光对过氧化氢的存在极为敏感, 再加上引入对过氧化氢 H₂O₂ 具有超高催化活性的过氧化氢酶 (Catalase, CAT), 使改进后的荧光免疫分析方法能够检测浓度低至 5×10² CFU/mL 的大肠杆菌。

2.5 霉菌毒素检测

同样的方法也可用于玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 等霉菌毒素的检测^[44]。霉菌毒素是一类对哺乳动物有害的天然真菌代谢物, 包括伏马菌素 (Fumonisin), 黄曲霉毒素 (Aflatoxin, AF), 赭曲霉毒素 (Ochratoxin, OTA) 和玉米赤霉烯酮等, 这些毒素分子若通过食物链进入人体, 可能会损害肝脏和肾脏^[58]。另外霉菌毒素大都是小分子, 若直接用荧光免疫吸附检测是非常困难的, 因此需要先将毒素分子与蛋白结合, 并制备出单克隆抗体与荧光报告分子相连。例如, Yao 等^[43]首先制备出抗赭曲霉毒素的高纯度单克隆抗体, 然后使用铈化镉 (CdTe) 量子点作为荧光标记分子, 分别结合直接和间接竞争荧光免疫吸附检测来量化赭曲霉毒素。比较两种检测方式, 结果显示间接竞争荧光免疫吸附检测更敏感, 能够检测到较低水平的赭曲霉毒素。而直接竞争荧光免疫吸附检测更快速, 更方便, 能够节省孵育和洗涤步骤的时间。还有 Zhang 等^[45]利用铈化镉 / 硫化镉 / 硫化锌 (CdTe/CdS/ZnS) 量子点标记单克隆抗体, 建立荧光免疫吸附平台定量检测玉米中玉米赤霉烯酮和黄曲霉毒素 B1 (AFB1), 得到的检测限比 ELISA 低四倍。

2.6 其它分子检测

除上述生物分子检测外, 荧光免疫吸附检测技术还常用于动物源性食品中的抗性药物残留分析, 如氟喹诺酮类 (Fluoroquinolone)、金刚烷胺 (Amantadine) 等。Hu 等^[47]利用羧基官能化的 NaYF₄/Yb, Er 上转换纳米粒子作为信号标签, 结合荧光免疫吸附检测方法, 在优化的条件下, 得到诺氟沙星的检测限为 10 pg/mL, 并且样本的提取过程快速简单, 无需任何预处理即可直接进行分析。Yu 等^[46]对金刚烷胺的检测结合了聚集诱导发光材料 (TPE-HPro) 和间接竞争性荧光免疫吸附测定的方法, 建立基于荧光 "开启" 探针的免疫传感器。结果显示用 TPE-HPro 作荧光信号分子可将金刚烷胺检测限降至 0.06

ng/mL,灵敏度比常规 ELISA 提高约 2.5 倍。

3 小结与展望

荧光免疫吸附技术检测性能的提升需要纳米材料技术和生物技术的发展来支持。纳米材料技术提供具有光学性能更好的新型发光材料作为信号分子。生物技术对免疫检测方法进行不断改进和优化,二者相辅相成,从而使荧光免疫吸附测定技术对生物分子检测的灵敏度和特异性不断提高。但是,要想实现荧光免疫吸附检测技术在诊断领域的进一步发展,还要克服一些困难:

1). 为减少假阳性诊断结果的出现,需要进行多元检测。然而目前将荧光免疫吸附用于多元检测的研究相对较少,且与单因子检测相比检测灵敏度较低,需有更易区分且性能稳定的荧光信号分子来支持多元检测灵敏度的提高。2). 需要通过大量临床样本来全面检验和评价免疫检测技术的性能。最好在研发早期结合多样性的病人样本,对其进行临床评估,加速其临床转化。3). 尽管有研究显示荧光免疫吸附检测技术操作相对节省了时间,但临床诊断最好使用一体化的设备来实现样本的自动化提纯与检测,减少人为因素的干扰,提高诊断的准确性。4). 此外,自动化检测所用的设备最好是便携,操作简单,以实现即时检测。

综上所述,为解决这些问题,需要继续开发新的发光材料,不断改进制备方法使其成本更低、荧光性能更好;同时结合其它传感信号改善荧光免疫吸附检测平台,提高检测结果稳定性,争取早日实现临床应用。

参考文献(References)

- [1] MAGNUSSON K E, BARTONEK E, NORDKVIST E, et al. Fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA) for quantification of antibodies to food antigens [J]. *Immunol Invest*, 1987, 16 (3): 227-240
- [2] WAGGONER A. Fluorescent labels for proteomics and genomics [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2006, 10(1): 62-66
- [3] ALGAR W R, TAVARES A J, KRULL U J. Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 673(1): 1-25
- [4] SMITH A M, NIE S M. Semiconductor Nanocrystals: Structure, Properties, and Band Gap Engineering [J]. *Accounts Chem Res*, 2010, 43(2): 190-200
- [5] ROSENTHAL S J, CHANG J C, KOVTUN O, et al. Biocompatible Quantum Dots for Biological Applications [J]. *Chem Biol*, 2011, 18 (1): 10-24
- [6] WU F, YUAN H, ZHOU C, et al. Multiplexed detection of influenza A virus subtype H5 and H9 via quantum dot-based immunoassay [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 77: 464-470
- [7] LE T, ZHU L, YU H. Dual-label quantum dot-based immunoassay for simultaneous determination of Carbadox and Olaquinox metabolites in animal tissues [J]. *Food Chem*, 2016, 199: 70-74
- [8] LIU Q, TIAN J, JIANG M, et al. Direct Competitive Biomimetic Immunoassay Based on Quantum Dot Label for Simultaneous Determination of Two Pesticide Residues in Fruit and Vegetable Samples [J]. *Food Analytical Methods*, 2018, 11(11): 3015-3022
- [9] ZHAO J J, CHEN J, WANG Z P, et al. Double labeling and comparison of fluorescence intensity and photostability between quantum dots and FITC in oral tumors [J]. *Mol Med Rep*, 2011, 4(3): 425-429
- [10] LV Y, WU R, FENG K, et al. Highly sensitive and accurate detection of C-reactive protein by CdSe/ZnS quantum dot-based fluorescence-linked immunosorbent assay [J]. *J Nanobiotechnology*, 2017, 15(1): 35
- [11] GEYS J, NEMMAR A, VERBEKEN E, et al. Acute Toxicity and Prothrombotic Effects of Quantum Dots: Impact of Surface Charge [J]. *Environ Health Persp*, 2008, 116(12): 1607-1613
- [12] LIN P, CHEN J W, CHANG L W, et al. Computational and ultrastructural toxicology of a nanoparticle, Quantum Dot 705, in mice [J]. *Environ Sci Technol*, 2008, 42(16): 6264-6270
- [13] SHEN J, ZHU Y, YANG X, et al. Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2012, 48(31): 3686-3699
- [14] SHEN J H, ZHU Y H, CHEN C, et al. Facile preparation and upconversion luminescence of graphene quantum dots [J]. *Chem Commun*, 2011, 47(9): 2580-2582
- [15] BAKER S N, BAKER G A. Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights [J]. *Angew Chem Int Edit*, 2010, 49(38): 6726-6744
- [16] TIAN X T, YIN X B. Carbon Dots, Unconventional Preparation Strategies, and Applications Beyond Photoluminescence [J]. *Small*, 2019, e1901803
- [17] LI B M, YU Q L, DUAN Y X. Fluorescent labels in biosensors for pathogen detection [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2015, 35 (1): 82-93
- [18] LI S J, WANG J P, SHENG W, et al. Fluorometric lateral flow immunochromatographic zearalenone assay by exploiting a quencher system composed of carbon dots and silver nanoparticles [J]. *Microchim Acta*, 2018, 185(8): 388
- [19] YANG L, DENG W F, CHENG C, et al. Fluorescent Immunoassay for the Detection of Pathogenic Bacteria at the Single-Cell Level Using Carbon Dots-Encapsulated Breakable Organosilica Nanocapsule as Labels [J]. *Acs Appl Mater Inter*, 2018, 10(4): 3441-3448
- [20] TANG D P, LIN Y X, ZHOU Q. Carbon dots prepared from Litchi chinensis and modified with manganese dioxide nanosheets for use in a competitive fluorometric immunoassay for aflatoxin B-1 [J]. *Microchim Acta*, 2018, 185(10): 476
- [21] WANG D, LIN B X, CAO Y J, et al. A Highly Selective and Sensitive Fluorescence Detection Method of Glyphosate Based on an Immune Reaction Strategy of Carbon Dot Labeled Antibody and Antigen Magnetic Beads [J]. *J Agr Food Chem*, 2016, 64(30): 6042-6050
- [22] WANG F, LIU X G. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals [J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38(4): 976-989
- [23] HUA X D, YOU H J, LUO P W, et al. Upconversion fluorescence immunoassay for imidaclothiz by magnetic nanoparticle separation [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409 (29): 6885-6892

- [24] SUN C C, LI H H, KOIDIS A, et al. Quantifying Aflatoxin B-1 in peanut oil using fabricating fluorescence probes based on upconversion nanoparticles[J]. *Spectrochim Acta A*, 2016, 165: 120-126
- [25] CHEN G Y, DAMASCO J, QIU H L, et al. Energy-Cascaded Upconversion in an Organic Dye-Sensitized Core/Shell Fluoride Nanocrystal [J]. *Nano Lett*, 2015, 15(11): 7400-7407
- [26] FISCHER S, MEHLENBACHER R D, LAY A, et al. Small Alkaline-Earth-based Core/Shell Nanoparticles for Efficient Upconversion[J]. *Nano Lett*, 2019, 19(6): 3878-3885
- [27] GU X G, KWOK R T K, LAM J W Y, et al. AIEgens for biological process monitoring and disease theranostics[J]. *Biomaterials*, 2017, 146, 115-135
- [28] HONG Y, LAM J W, TANG B Z. Aggregation-induced emission: phenomenon, mechanism and applications [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2009, 29: 4332-4353
- [29] ENGELS J F, ROOSE J, ZHAI D S, et al. Aggregation-induced emissive nanoparticles for fluorescence signaling in a low cost paper-based immunoassay[J]. *Colloid Surface B*, 2016, 143: 440-446
- [30] SONG Z G, KWOK R T K, DING D, et al. An AIE-active fluorescence turn-on bioprobe mediated by hydrogen-bonding interaction for highly sensitive detection of hydrogen peroxide and glucose[J]. *Chem Commun*, 2016, 52(65): 10076-10079
- [31] NICOL A, QIN W, KWOK R T K, et al. Functionalized AIE nanoparticles with efficient deep-red emission, mitochondrial specificity, cancer cell selectivity and multiphoton susceptibility[J]. *Chem Sci*, 2017, 8(6): 4634-4643
- [32] WANG X R, HU J M, ZHANG G Y, et al. Highly Selective Fluorogenic Multianalyte Biosensors Constructed via Enzyme-Catalyzed Coupling and Aggregation-Induced Emission[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(28): 9890-9893
- [33] TSAI H Y, LI S Y, FUH C B. Magnetofluorescent nanocomposites and quantum dots used for optimal application in magnetic fluorescence-linked immunoassay[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410 (7): 1923-1929
- [34] WU Y, WEI P, PENGUMKIAT S, et al. Development of a carbon dot (C-Dot)-linked immunosorbent assay for the detection of human alpha-fetoprotein[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(16): 8510-8516
- [35] TIAN J N, ZHOU L J, ZHAO Y C, et al. Multiplexed detection of tumor markers with multicolor quantum dots based on fluorescence polarization immunoassay[J]. *Talanta*, 2012, 92: 72-77
- [36] LI X, WEI L, PAN L L, et al. Homogeneous Immunosorbent Assay Based on Single-Particle Enumeration Using Upconversion Nanoparticles for the Sensitive Detection of Cancer Biomarkers [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(7): 4807-4814
- [37] GU T, REN Z, LI X, et al. A flexible smart membrane consisting of GO composite fibres and upconversion MSNs for microRNA detection[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2019, 55(62): 9104-9107
- [38] HU W, CHEN T, ZHANG Y, et al. A carbon dot and gold nanoparticle-based fluorometric immunoassay for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in oxidatively damaged DNA [J]. *Mikrochim Acta*, 2019, 186(5): 303
- [39] KIM D T H, BAO D T, PARK H, et al. Development of a novel peptide aptamer-based immunoassay to detect Zika virus in serum and urine[J]. *Theranostics*, 2018, 8(13): 3629-3642
- [40] BABAMIRI B, HALLAJ R, SALIMI A. Solid surface fluorescence immunosensor for ultrasensitive detection of hepatitis B virus surface antigen using PAMAM/CdTe@CdS QDs nanoclusters [J]. *Methods Appl Fluoresc*, 2018, 6(3): 035013
- [41] XIONG L H, HE X W, ZHAO Z, et al. Ultrasensitive Virion Immunoassay Platform with Dual-Modality Based on a Multifunctional Aggregation-Induced Emission Luminogen [J]. *Acs Nano*, 2018, 12(9): 9549-9557
- [42] CHEN R, HUANG X, LI J, et al. A novel fluorescence immunoassay for the sensitive detection of Escherichia coli O157:H7 in milk based on catalase-mediated fluorescence quenching of CdTe quantum dots [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 947: 50-57
- [43] YAO J, XING G, HAN J, et al. Novel fluoroimmunoassays for detecting ochratoxin A using CdTe quantum dots[J]. *J Biophotonics*, 2017, 10(5): 657-663
- [44] ZHAN S N, HUANG X L, CHEN R, et al. Novel fluorescent ELISA for the sensitive detection of zearalenone based on H₂O₂-sensitive quantum dots for signal transduction[J]. *Talanta*, 2016, 158: 51-56
- [45] ZHANG F, LIU B, ZHANG Y, et al. Application of CdTe/CdS/ZnS quantum dot in immunoassay for aflatoxin B1 and molecular modeling of antibody recognition [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1047: 139-149
- [46] YU W B, LI Y, XIE B, et al. An Aggregation-Induced Emission-Based Indirect Competitive Immunoassay for Fluorescence "Turn-On" Detection of Drug Residues in Foodstuffs[J]. *Front Chem*, 2019, 7
- [47] HU G S, SHENG W, ZHANG Y, et al. A novel and sensitive fluorescence immunoassay for the detection of fluoroquinolones in animal-derived foods using upconversion nanoparticles as labels[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(28): 8487-8496

(上接第 2189 页)

- [38] Pramanik M, Ku G, Li C, et al. Design and evaluation of a novel breast cancer detection system combining both thermoacoustic (TA) and photoacoustic (PA) tomography [J]. *Medical physics*, 2008, 35 (6Part1): 2218-2223
- [39] Ke H, Liu C, Wang L V, et al. Performance characterization of an integrated ultrasound, photoacoustic, and thermoacoustic imaging system[J]. *Journal of biomedical optics*, 2012, 17(5): 056010
- [40] Huang L, Cai W, Zhao Y, et al. In vivo tumor detection with combined MR-Photoacoustic-Thermoacoustic imaging [J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2016, 9(05): 1650015