

# 纳米抗体在食品小分子污染物检测中的应用

## Progress in the application of nano-antibody in the detection of small molecular contaminants in food

金萍<sup>1</sup> 丁洪流<sup>1</sup> 金晓红<sup>1</sup> 沈麒亮<sup>2</sup> 范春燕<sup>2</sup>

JIN Ping<sup>1</sup> DING Hong-liu<sup>1</sup> JIN Xiao-hong<sup>1</sup> SHEN Qi-liang<sup>2</sup> FAN Chun-yan<sup>2</sup>

(1. 苏州市产品质量监督检验院, 江苏 苏州 215128; 2. 苏州市食品检验检测中心, 江苏 苏州 215128)

(1. Suzhou Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Suzhou, Jiangsu 215128, China;

2. Suzhou Food Inspection and Testing Center, Suzhou, Jiangsu 215128, China)

**摘要:** 主要阐述了纳米抗体的结构、特性及其在真菌毒素、农兽药残留、小分子有毒物质等小分子污染物检测方面的应用, 并对纳米抗体在生物检测技术及诊断研究中的发展方向进行了展望。

**关键词:** 纳米抗体; 检测; 真菌毒素; 农药残留; 兽药残留

**Abstract:** The structure and characteristics of nano-antibody and their applications in the detection of mycotoxins, pesticide and veterinary drug residues, small molecule toxic substances and other small molecule pollutants were introduced, and the development direction of nano-antibody in biological detection technology and diagnosis research was prospected.

**Keywords:** nano antibody; detection; mycotoxin; pesticide residues; veterinary drug residue

酶联免疫吸附法(ELISA)是中国食品安全快速检测中应用的主要方法, 对其研究主要集中于真菌毒素<sup>[1-2]</sup>、农兽药残留<sup>[3-6]</sup>、食品污染物等<sup>[7-10]</sup>方面。这类产品多数可以在 30 min 内完成定量或半定量检测。免疫检测研究主要是基于单克隆抗体, 但小分子的单克隆抗体制备难度大, 假阳性和假阴性率高, 价格昂贵, 不易保藏。因此, 各种类型小分子功能抗体的开发是目前免疫分析研究的重点, 其中纳米抗体(Nanobody, Nb)具有相对分子量低、对热以及化学试剂等有较高的耐受能力和易表达改造等优势<sup>[11]</sup>。研究拟对纳米抗体的特性及其在小分子污染物检测方面的应用进行综述, 展望纳米抗体在生物检测技术及诊断研究中的发展。

**基金项目:** 苏州市科技项目(编号: SNG201928); 江苏省市场监督管理局科技项目(编号: KJ21125075)

**作者简介:** 金萍(1986—), 女, 苏州市产品质量监督检验院高级工程师, 硕士。E-mail: 846493521@qq.com

**收稿日期:** 2022-07-05 **改回日期:** 2022-10-18

### 1 纳米抗体的结构及其特性

Nb 较传统抗体发现较晚, 感染或者免疫过的单峰骆驼的免疫反应会产生普通的抗体 IgG 及仅有重链的抗体(HcAb), 这两种类型的抗体均有与抗原结合的能力。HcAb 只包含一个重链可变区(VHH)以及 CH2、CH3 两个常规区, 其分子量约为 90 kDa, 比传统 IgG 的 150 kDa 小得多。VHH 的分子量只有 15 kDa, 因此也被称作 Nb。VHH 易于进行基因操作获得较多的单价、双价和多价 Nb, 比传统抗体具有更广泛的用途<sup>[12-15]</sup>。目前发现能产生 Nb 的免疫动物除单峰骆驼外, 还有羊驼及鲨鱼等。目前, 被用作 Nb 制备的最常用免疫动物为羊驼<sup>[16-17]</sup>。Nb 除具有与原 IgG 抗体相当的结构稳定性以及与抗原的结合活性外, 还具有多项更优良的特点, Nb 几乎完全克服了传统抗体研发周期长、稳定性差、保存条件严格等缺陷; 与人工改造的单链抗体片段(scFv)不同, Nb 不容易相互黏附聚合成块, 逐渐成为诊断试剂中的新兴力量<sup>[18-19]</sup>, 更具研究和应用价值。各抗体结构示意图如图 1 所示。

#### 1.1 分子小、亲和力强、水溶性好

Nb 分子较小, 其产生的空间位阻小, 有利于结合一些隐蔽位点<sup>[20]</sup>。

Nb 具有较强的亲和力与其结构域直接相关, 如图 2 所示, VHH 的空间结构与常规抗体重链可变区(VH)相

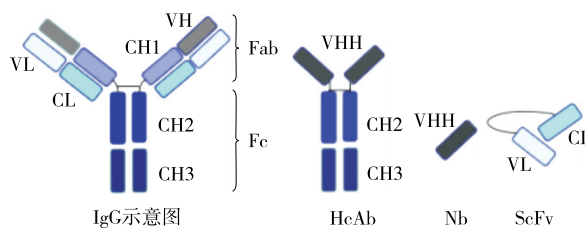


图 1 抗体结构示意图

Figure 1 Diagram antibody structure

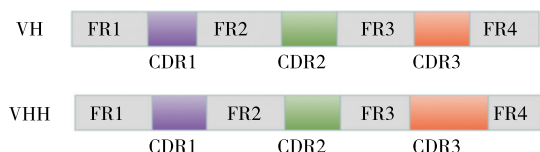


图2 VH和VHH多肽结构示意图

Figure 2 Schematic diagram of VH and VHH polypeptide structure

似,由9个反向平行的 $\beta$ 折叠片层通过链间氢键和二硫键连接在一起。Nb存在3个互补决定区(CDR),相较于VH较长,编号为CDR1、CDR2、CDR3,形成凸起结构,该结构为其抗原结合位点。这3个CDR区域被4个序列相对保守的骨架区(FR)分隔开,编号为FR1、FR2、FR3、FR4<sup>[21]</sup>。相比于人和小鼠VH中CDR3区9~12个氨基酸<sup>[22]</sup>,VHH的CDR3区明显更长,单峰骆驼VHH中CDR3的平均长度约为17个氨基酸,大羊驼为15个氨基酸,甚至有超过25个氨基酸长度的<sup>[23-24]</sup>。Nb较长的CDR3区域可以形成凸起的环形区域,潜在地增加了互补位构象的多样性,弥补了CDR区数量较少所引起的抗原结合力不足的缺陷<sup>[25]</sup>。

Nb的序列虽与常规抗体相似,但其具有更好的亲水性,原因在于个别位点的差异,VH中多为疏水的氨基酸,但在VHH中变成了亲水的氨基酸,使得纳米抗体拥有更好的可溶性<sup>[26]</sup>,具有更好的组织渗透力,能够进入肿瘤组织内发挥作用,甚至还可以有效地穿透血脑屏障。

## 1.2 高热抗性

常规IgG抗体对高温耐受性差,容易发生不可逆的热聚合而失活,对保存环境要求较高。相较于常规IgG抗体,Nb大多具有很强的热抗性,在加热后能够重新折叠,仍保存相当的抗体活性,利于长期保存<sup>[27]</sup>。Liu等<sup>[28]</sup>在开发赭曲霉毒素A(OTA)的Nb-ELISA方法时,对OTA的纳米抗体(Nb15、Nb28、Nb32、Nb36)与OTA的特异性单克隆抗体6H8进行了热稳定性比较,发现OTA的纳米抗体在95℃暴露5min或90℃暴露75min后仍能保持抗原结合活性。Bever等<sup>[29]</sup>在采用羊驼VHH抗体进行2,2',4,4'-四溴二苯醚检测的开发与利用中发现,高温条件(95℃,10min)下,羊驼VHH抗体仍保留了>50%的抗体结合活性,而相对应的多克隆抗体活性丧失。

Nb的稳定性与其内部存在的二硫键关系密切,FR1和FR3之间存在保守二硫键,部分在CDR3和CDR1、CDR3和CDR2之间还有额外二硫键<sup>[21]</sup>,保守二硫键以及额外二硫键的存在增加了CDR3区凸形结构的稳定性。Akazawa-Ogawa等<sup>[30]</sup>研究发现,Nb的耐热性随二硫键数量的增加而降低。Hagihara等<sup>[31]</sup>研究表明二硫键是一种稳定抗体片段的方法,可通过约束蛋白质的未折叠结构,从而提高折叠结构域的机械稳定性和构象稳

定性。

Linden等<sup>[32]</sup>将抗原特异性的羊驼VHH抗体片段与抗原特异性的小鼠单克隆抗体在特异性、亲和力和稳定性方面进行比较发现,相对于抗原特异性的小鼠单克隆抗体,抗原特异性的羊驼VHH片段具有极强的温度稳定性。1/3的大羊驼VHHs能够在高达90℃的温度下特异性结合抗原,而全部的小鼠单克隆抗体在该温度下不起作用。

## 1.3 化学耐受性

甲醇、丙酮、乙腈和二甲基亚砜等化学试剂是样品提取中的常用试剂,但常规IgG抗体化学耐受性较差,提取液中化学试剂的残留会影响后期抗体结合能力,因此,筛选出高化学耐受性的抗体可以简化前处理过程,减少目标物的损耗,增强检测灵敏度。

He等<sup>[33]</sup>对黄曲霉毒素B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)纳米抗体与特异性单克隆抗体在有机溶剂和高温下的稳定性进行比较,发现Nb对甲醇、丙酮、乙腈和二甲基亚砜等有机溶剂耐受性较好,并且基于Nb对甲醇的高耐受性,样品提取物采用不稀释的纳米ELISA分析,灵敏度得到了提高。Zhang等<sup>[34]</sup>在建立对硫磷VHH-碱性磷酸酶一步法dc-FEIA时发现,对硫磷Nb在40%的甲醇、乙腈以及二甲基亚砜中可保留50%的活性。Zhang等<sup>[35]</sup>研究发现克百威Nb对甲醇以及乙腈耐受性较好,可耐受50%的甲醇和30%的乙腈。

## 1.4 低免疫原性

在基因序列层面,骆驼的VHH序列与人VH3序列同源度高<sup>[36]</sup>,加之Nb的分子量较小,对人体造成的免疫原性较弱。另一方面,Nb没有传统IgG抗体的Fc段,可以避免Fc段引起的补体反应<sup>[37]</sup>。

## 2 Nb在小分子污染物检测中的应用

小分子化合物(<1 000 Da)免疫检测研究中,先需要与大分子蛋白等载体交联形成完全抗原,再免疫机体制备多克隆抗体和单克隆抗体。这类传统抗体分析性能虽然表现优异,但对温度或有机溶剂等稳定性欠佳,而Nb在温度耐受性以及化学耐受性方面都具有更明显的优势。因此,Nb在小分子免疫检测领域的应用研究虽起步较晚,但近些年报道逐渐增多,在真菌毒素、农兽药残留以及小分子有毒污染物等检测中多有研究。

### 2.1 真菌毒素的免疫检测

受真菌毒素污染的农产品和食品会对人类和动物健康造成严重危害,甚至导致死亡。黄曲霉毒素B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)、呕吐毒素(DON)等都属于真菌毒素。基于单克隆抗体或者多克隆抗体建立的免疫检测方法在真菌毒素检测中展现了优良的灵敏度、精确性,同时兼具使用方便的优势,但传统抗体的局限限制了其进一步的发展,因此,近些年,对Nb在真菌毒素检测领域进行了大量

研究<sup>[38-40]</sup>。

季艳伟<sup>[41]</sup>针对赭曲霉毒素 A(OTA),采用从羊驼天然纳米抗体文库中筛选获得的 OTA 抗独特型 Nb,以其作为 OTA 模拟抗原,建立了 ELISA 方法;与化学合成抗原所建立的方法进行比较,灵敏度较以往提高了 10 倍。吴慧<sup>[42]</sup>以玉米赤霉烯酮(ZEN)为研究对象,建立了基于噬菌体展示 Nb 的 ELISA 检测方法。通过对试验中各参数的优化,ZEN 的添加回收率可以达到 71.7%~102.2%。司睿等<sup>[43]</sup>从抗微囊藻毒素(MC-LR)噬菌体展示 Nb 文库中筛选,获得编号 M110 的 Nb,以其为基础构建了水体中 MC-LR 检测的间接竞争 ELISA,并进行了方法间验证,与超高效液相色谱—串联质谱(UPLC-MS/MS)方法的相关系数达 0.998。曹冬梅等<sup>[44]</sup>利用噬菌体展示技术筛选获得了编号 G8DE 抗 AFB1 纳米抗体,将 G8 的基因与碱性磷酸酶(AP)基因融合,基于 Nb-AP 融合蛋白构建了一步式 ELISA 方法,经测定检出限为 2.6 ng/mL。

## 2.2 农兽药残留的免疫检测

近年来,由于农兽药工业的快速发展和养殖过程中抗药性的产生,农兽药用量逐年攀升,农兽药残留超标成为食品安全的“顽疾”。Liu 等<sup>[45]</sup>基于羊驼免疫获得的 VHH C1 和包被抗原 CBR2-BSA,建立了酶联免疫吸附试验,用于谷物中西维因的检测。基于 VHH 的酶联免疫吸附试验对谷物样品中西维因进行了简单提取和稀释,具有良好的检测效果。Zhang 等<sup>[35]</sup>通过噬菌体展示技术分离并获得了抗呋喃丹纳米抗体,建立了一种间接竞争 ELISA,可用于检测果蔬样品中的呋喃丹残留。结果显示,采用简单的样品前处理程序,省去了有机溶剂的蒸发等环节,可以获得与超高效液相色谱—质谱/质谱法一致的结果。Zhang 等<sup>[34]</sup>构建了 VHH9-碱性磷酸酶融合物(VHH-AP),并用于建立 1/2 最大抑制浓度的一步一步直接竞争荧光酶免疫分析(dc-FEIA),通过对大白菜、黄瓜和生菜样品的加标验证以及 UPLC-MS/MS 的结果确认。结果表明,基于 VHH-AP 的 dc-FEIA 是可重复检测蔬菜样品中对硫磷残留的检测方法。高海岗等<sup>[46]</sup>从羊驼免疫库筛选、运用噬菌体展示技术获得抗孔雀石绿(MG)纳米抗体,基于该抗体建立了孔雀石绿胶体金免疫层析检测试纸条,检测结果与国标方法一致。

## 2.3 小分子有毒物质的免疫检测

Wang 等<sup>[47]</sup>利用驼峰单结构域抗体—碱性磷酸酶融合蛋白(T3-15-AP)一步免疫法测定四溴双酚 A(TBBPA),环境温度下,以 T3-15-AP 为基础的试验至少 70 d 内可观察到更高的结合稳定性。Fu 等<sup>[48]</sup>将骆驼脂提取的 TBBPA 特异性纳米体与碱性磷酸酶融合获得双功能融合蛋白,使 TBBPA 特异性结合的同时产生检测信号,建立了一种荧光酶联免疫吸附法(FELISA)。经验证,该方法与液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)结果具有良好的相关性,可作为监测 TBBPA 暴露量的有效

方法。姜忍忍<sup>[49]</sup>利用噬菌体—纳米抗体展示技术成功获得了针对重金属镉(Cd)的特异性纳米抗体,并初步建立了间接竞争性 ELISA 免疫检测法,成功用于水样重金属镉离子的检测。俞华齐<sup>[50]</sup>通过筛选纳米抗体库成功获得了噬菌体抗体 Cr-DTPA-VHH4-63,围绕该纳米抗体,建立了检测重金属铬(Cr)的间接竞争性 ELISA 检测方法。

## 3 结语

传统较成熟的食物小分子污染物检测产品主要有免疫胶体金试纸条以及免疫试剂盒等,产品多采用传统 IgG 抗体,此类抗体热稳定性较差,要求绝对的冷链运输和贮藏,同时使用周期较短,使用时友好度欠佳。纳米抗体作为新型抗体,与传统的 IgG 抗体相比,具有更好的特性:纳米抗体有更高的热稳定性,可以大大延长抗体的使用寿命;纳米抗体具有更高的化学耐受性,可以减少前处理中有机溶剂对其的限制;纳米抗体方便进行基因操作,或者加入各种标签以方便各种检测应用,这有望解决免疫检测中的一大瓶颈——多重检测。基于纳米抗体的诸多优点,在小分子物质免疫检测领域正慢慢替代传统抗体。

## 参考文献

- [1] 唐颂,李岩松,尚翠玲,等.玉米赤霉烯酮间接竞争 ELISA 方法的建立[J].食品工业科技,2022,43(4):300-304.  
TANG S, LI Y S, SHANG C L, et al. Establishment of indirect competitive ELISA method for zearalenone [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(4): 300-304.
- [2] SHIHWEI W, JIUNNLIANG K, BIINGHUI L, et al. Pilot production of a sensitive ELISA kit and immunochromatographic strip for rapid detecting citrinin in fermented rice[J]. RSC Adv, 2022, 12: 19 981-19 989.
- [3] 丁然,王元凤,桑丽雅,等.基于铂包金的啮虫脲间接竞争酶联免疫检测方法的构建[J].食品工业,2021,42(10):285-289.  
DING R, WANG Y F, SANG L Y, et al. Construction of indirect competitive enzyme-linked immunoassay of acetamiprid based on platinum-coated gold[J]. Food Industry, 2021, 42(10): 285-289.
- [4] 蒋文慧,吴小胜,崔娜,等.一种多菌灵酶联免疫快速检测方法的建立[J].食品与机械,2021,37(1):94-98.  
JIANG W H, WU X S, CUI N, et al. Development of an enzyme-linked immunoassay for rapid detection of carbendazim[J]. Food & Machinery, 2021, 37(1): 94-98.
- [5] 刘姚,韦倩妮,王弘,等.直接竞争 ELISA 法检测蜂蜜中氯霉素残留[J].食品科学,2018,39(16):336-342.  
LIU Y, WEI Q N, WANG H, et al. Determination of chloramphenicol residue in honey by direct competitive ELISA[J]. Food Science, 2018, 39(16): 336-342.
- [6] BUI Q A, VU T H H, NGO V K T, et al. Development of an ELISA to detect clenbuterol in swine products using a new approach for

- haptens design[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408: 6 045-6 052.
- [7] 尚淑娜, 生威, 王璐璐, 等. 间接竞争 ELISA 检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯[J]. *食品与机械*, 2019, 35(5): 67-71, 155.
- SHANG S N, SHENG W, WANG L L, et al. Determination of dibutyl phthalate in food by indirect competitive ELISA[J]. *Food & Machinery*, 2019, 35(5): 67-71, 155.
- [8] 张玉超, 刘旭东. 基于单克隆抗体的双酚 A 间接竞争酶联免疫分析法的建立[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(17): 172-177.
- ZHANG Y C, LIU X D. Establishment of indirect competitive enzyme linked immunoassay for bisphenol A based on monoclonal antibody[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(17): 172-177.
- [9] KRHLING V, HALWE S, ROHDE C, et al. Development and characterization of an indirect ELISA to detect SARS-CoV 2 spike protein-specific antibodies[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2021, 490: 112958.
- [10] RL A, MS B, SS C, et al. Evaluation of ELISA-based method for total anaerobiopeptides determination and comparative analysis with on-line SPE-UHPLC-HRMS in freshwater cyanobacterial blooms[J]. *Talanta*, 2020, 223: 121802.
- [11] MITCHELL L S, COLWELL L J. Analysis of nanobody paratopes reveals greater diversity than classical antibodies[J]. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2018, 31(7/8): 267-275.
- [12] 何晓婷, 董洁娟, 沈兴, 等. 纳米抗体的稳定性及其结构基础研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2022, 49(6): 1 004-1 017.
- HE X T, DONG J X, SHEN X, et al. Stability and structural basis of nano-antibody[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2022, 49(6): 1 004-1 017.
- [13] FERRARI D, GARRAPA V, LOCATELLI M, et al. A novel nanobody scaffold optimized for bacterial expression and suitable for the construction of ribosome display libraries[J]. *Molecular Biotechnology*, 2020, 62(1): 43-55.
- [14] ROBERT J H, HYEYOUNG E, JAMES R H. Structure and development of single domain antibodies as modules for therapeutics and diagnostics[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2019, 244(17): 1 568-1 576.
- [15] DIRK S. Isolation and optimization of camelid single-domain antibodies: Dirk Saerens' work on nanobodies[J]. *World Journal of Biological Chemistry*, 2010(7): 235-238.
- [16] 马兴元. 神奇的纳米抗体[J]. 十万个为什么(探索版), 2022(7): 6-7.
- MA X Y. Amazing nano-antibodies[J]. 100 000 Whys(Discovery), 2022(7): 6-7.
- [17] 李静颖, 李志伟, 肖书奇. 纳米抗体与疫病防治[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(8): 112-116.
- LI J Y, LI Z W, XIAO S Q. Nano-antibody and epidemic disease control[J]. *Advances in Animal Medicine*, 2021, 42(8): 112-116.
- [18] 陈波. 纳米抗体在小分子检测中的应用[EB/OL]. (2022-08-01) [2022-08-10]. <http://www.nanobody-biolab.com/blogsshow.aspx?mid=59&fl=12&id=15>.
- CHEN B. Application of nano antibody in small molecule detection [EB/OL]. (2022-08-01) [2022-08-10]. <http://www.nanobody-biolab.com/blogsshow.aspx?mid=59&fl=12&id=15>.
- [19] 何晓婷, 陈子键, 黄松, 等. 基于纳米抗体的胶体金免疫层析法快速检测蔬菜中的腐霉利[J/OL]. *食品科学*. (2022-04-25) [2022-08-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20220425.1439.014.html>.
- HE X T, CHEN Z J, HUANG S, et al. Rapid detection of procymidone in vegetables by colloidal gold immunochromatography based on nano-antibody[J/OL]. *Food Science*. (2022-04-25) [2022-08-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20220425.1439.014.html>.
- [20] LI B, QIN X, MI L Z. Nanobodies: From structure to applications in non-injectable and bispecific biotherapeutic development[J]. *Nanoscale*, 2022, 14: 7 110-7 122.
- [21] 孙山, 谭星, 庞晓燕, 等. 纳米抗体技术应用的最新进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(3): 855-867.
- SUN S, TAN X, PANG X Y, et al. Recent progress in the application of nano-antibody technology[J]. *Journal of Bioengineering*, 2022, 38(3): 855-867.
- [22] 于吉军, 杨光, 周婷婷, 等. 骆驼来源单域抗体的研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2017, 44(1): 18-23.
- YU J J, YANG G, ZHOU T T, et al. Research progress of camel-derived monoclonal antibodies[J]. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 2017, 44(1): 18-23.
- [23] CONRATH K E, WERNERY U, MUYLDERMANS S, et al. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae[J]. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27(2): 87-103.
- [24] CHAN P H, PARDON E, MENZER L, et al. Engineering a camelid antibody fragment that binds to the active site of human lysozyme and inhibits its conversion into amyloid fibrils[J]. *Bio-Chemistry*, 2008, 47(42): 11 041-11 054.
- [25] MARQUARDT A, MUYLDERMANS S, PRZYBYLSKI M. A synthetic camel anti-lysozyme peptide antibody (peptibody) with flexible loop structure identified by high-resolution affinity mass spectrometry[J]. *Chemistry*, 2006, 12(7): 1 915-1 923.
- [26] SALVATRICE C, PAMELA A B, ELENA C, et al. The camel adaptive immune receptors repertoire as a singular example of structural and functional genomics[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 997.
- [27] 邓文月, 张维达, 孙慧敏, 等. 纳米抗体特性及其在冠状病毒研究中的应用[J]. *生物技术*, 2022, 32(1): 126-133.
- DENG W Y, ZHANG W D, SUN H M, et al. Characterization of nano-antibody and its application in the study of coronavirus[J]. *Biotechnology*, 2022, 32(1): 126-133.
- [28] LIU X, XU Y, XIONG Y H, et al. Nb phage-based competitive real-time immuno-polymerase chain reaction for ultrasensitive detection of ochratoxin A in cereal[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(15): 7 471-7 477.
- [29] BEVER C R, MAJKOVA Z, RADHAKRISHNAN R, et al.

- Development and utilization of camelid Nb antibodies from alpaca for 2, 2', 4, 4'-tetrabrominated diphenyl ether detection [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(15): 7 875-7 882.
- [30] AKAZAWA-OGAWA Y, UEGAKI K, HAGIHARA Y. The role of intra-domain disulfide bonds in heat-induced irreversible denaturation of camelid single domain Nb antibodies [J]. *J Biochem*, 2016, 159(1): 111-121.
- [31] HAGIHARA Y, SAERENS D. Engineering disulfide bonds within an antibody[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1 844(11): 2 016-2 023.
- [32] LINDEN R, FRENKEN L, GEUS B D, et al. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1 431(1): 37-46.
- [33] HE T, WANG Y R, LI P W, et al. Nanobody-based enzyme immunoassay for aflatoxin in agro-products with high tolerance to cosolvent methanol[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(17): 8 873-8 880.
- [34] ZHANG Y Q, XU Z L, WANG F, et al. Isolation of bactrian camel single domain antibody for parathion and development of one-step dc-FeIA method using Nb-alkaline phosphatase fusion protein[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(21): 12 886-12 892.
- [35] ZHANG J R, WANG Y, DONG J X, et al. Development of a simple pretreatment immunoassay based on an organic solvent-tolerant nanobody for the detection of carbofuran in vegetable and fruit samples[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(10): 576.
- [36] 张长江, 张伟, 李新洋, 等. 双峰驼重链抗体组库的基本特征研究[J]. *现代生物医学进展*, 2016(22): 4 207-4 212.
- ZHANG C J, ZHANG W, LI X Y, et al. Study on the basic characteristics of bactrian camel heavy chain antibody library[J]. *Modern Biomedical Progress*, 2016(22): 4 207-4 212.
- [37] 孔庆明. 纳米抗体及其在诊断检测中的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2014, 30(9): 1 351-1 361.
- KONG Q M. Nano antibody and its research progress in diagnostic detection [J]. *Chinese Journal of Bioengineering*, 2014, 30(9): 1 351-1 361.
- [38] 蔡冲, 闫洪林, 唐晓倩, 等. 纳米抗体特性及其在农产品真菌毒素检测中的应用 [J]. *中国油料作物学报*, 2022, 44(2): 451-455.
- CAI C, YAN H L, TANG X Q, et al. Characterization of nano-antibody and its application in the detection of mycotoxin in agricultural products[J]. *Chinese Journal of Oil Crops*, 2022, 44(2): 451-455.
- [39] 陈瑞鹏, 高志贤, 梁俊. 农产品中真菌毒素检测方法研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(6): 2 283-2 291.
- CHEN R P, GAO Z X, LIANG J. Research progress of mycotoxin detection methods in agricultural products [J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2021, 12(6): 2 283-2 291.
- [40] XIE G F, LU Y, LI W K, et al. Simultaneous heptamerization of nanobody and alkaline phosphatase by self-assembly and its application for ultrasensitive immunodetection of small molecular contaminants in agro-products[J]. *Food Control*, 2022, 141: 109156.
- [41] 季艳伟. 花状纳米金及抗独特型纳米抗体在真菌毒素免疫学检测中的应用研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2017: 31-90.
- JI Y W. Application of gold nanoparticles in the detection of mycotoxins[D]. Nanchang: Nanchang University, 2017: 31-90.
- [42] 吴慧. 基于抗独特型纳米抗体的玉米赤霉烯酮绿色免疫分析研究[D]. 武汉: 湖北大学, 2016: 30-69.
- WU H. Green immunoassay of zearalenone based on anti-idiotypic nano-antibody[D]. Wuhan: Hubei University, 2016: 30-69.
- [43] 司睿, 吴广培, 王锋, 等. 微囊藻毒素纳米抗体的制备及其间接竞争酶联免疫分析方法的建立[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(5): 6-13.
- SI R, WU G P, WANG F, et al. Preparation of microcystis toxin nano antibody and establishment of indirect competitive enzyme-linked immunoassay[J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2022, 22(5): 6-13.
- [44] 曹冬梅, 许杨, 涂追, 等. 基于纳米抗体—碱性磷酸酶融合蛋白的一步酶联免疫吸附分析法检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> [J]. *分析化学*, 2016, 44(7): 1 085-1 091.
- CAO D M, XU Y, TU Z, et al. Detection of aflatoxin B<sub>1</sub> by one-step enzyme-linked immunosorbent assay based on nano-antibody and alkaline phosphatase fusion protein[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 44(7): 1 085-1 091.
- [45] LIU Z P, WANG K, WU S, et al. Development of an immunoassay for the detection of carbaryl in cereals based on a camelid variable heavy-chain antibody domain[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(9): 4 383-4 390.
- [46] 高海岗. 孔雀石绿纳米抗体的制备及其免疫层析检测方法的建立与应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2020: 35-100.
- GAO H G. The preparation of malachite green nano antibody and the establishment and application of immunochromatographic detection method [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2020: 35-100.
- [47] WANG J, MAJKOVA Z, BEVER C R S, et al. One-step immunoassay fortetrabromobisphenol a using a camelid single domain antibody: Alkaline phosphatase fusion protein [J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(9): 4 741-4 748.
- [48] FU H J, WANG Y, XIAO Z L, et al. A rapid and simple fluorescence enzyme-linked immunosorbent assay for tetrabromobisphenol A in soil samples based on a bifunctional fusion protein[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 188(1): 109904.
- [49] 姜忍忍. 重金属 Cd 纳米抗体的制备及其免疫学检测方法的建立与应用[D]. 上海: 上海师范大学, 2014: 28-70.
- JIANG R R. Preparation and immunological detection of heavy metal Cd nanoparticles[D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2014: 28-70.
- [50] 俞华齐. 基于纳米抗体的重金属 Cr 免疫学检测方法研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2016: 24-64.
- YU H Q. Study on the immunological detection of heavy metal Cr based on nano-antibody[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2016: 24-64.