

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20230929002

纳米抗体在生物毒素及农药残留检测中的应用研究进展

贺贞云^{1,2}, 石云娇¹, 刘 星^{2*}

(1. 海南经贸职业技术学院国际旅游学院, 海口 571127; 2. 海南大学食品科学与工程学院, 海口 570228)

摘 要: 骆驼科动物体内存在着天然缺失轻链的重链抗体, 而通过重组表达重链抗体的可变域可获得一种具有抗原结合活性的蛋白, 被称为单域抗体或纳米抗体。纳米抗体作为近些年来发现的一种新型抗体, 其具有结构简单、相对分子质量小、稳定性强、耐受性高、水溶性高、抗原结合性能强, 且易于表达纯化制备等特点, 较常规抗体用途更广。纳米抗体的这些特点使其成为常规抗体的理想替代物, 并且已被应用于检测食品中毒素、农药、兽药残留等小分子污染物。本文主要综述了纳米抗体的国内外研究进展, 旨在介绍其结构、特性, 以及这些特点在食品安全检测中的作用, 并着重介绍了纳米抗体在食品安全检测方面的应用实例和最新进展, 为纳米抗体在食品安全领域未来的研究方向提供参考依据。

关键词: 纳米抗体; 食品安全; 食品检测

Application research progress of nanobodies in the detection of biotoxins and pesticide residues

HE Zhen-Yun^{1,2}, SHI Yun-Jiao¹, LIU Xing^{2*}

(1. School of International Tourism, Hainan College of Economics and Business, Haikou 571127, China;
2. School of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China)

ABSTRACT: The heavy chain antibody naturally lacks light chain and exists in camelids. Recombinant expression of the variable region of heavy chain antibody can produce a protein with the antigen-binding activity, namely single domain antibody or nanobody. As a new type of antibody discovered in recent years, nanobody has the characteristics of simple structure, small molecular weight, strong stability, high tolerance, high water solubility, good antigen-binding performance, and ease of expression and purification. In comparison with the traditional antibody, nanobody has a wider range of application. These characteristics of nanobody make it an ideal alternative to traditional antibodies. Therefore, nanobody has become an ideal antibody for the detection of small molecule contaminants in food, such as mycotoxin, pesticide residues, and veterinary drug residues. This paper mainly reviewed the research progress of nanobody at home and abroad, aiming to introduce its structure, characteristics, and the role of these characteristics in food safety detection. Moreover, this review focused on the applications and latest

基金项目: 海南省自然科学基金项目(323QN251、824MS074)、国家自然科学基金项目(32102067)、海南省教育厅资助项目(Hnky2023-74)

Fund: Supported by the Hainan Provincial Natural Science Foundation of China (323QN251, 824MS074), the National Natural Science Foundation of China (32102067), and the Project Supported by the Education Department of Hainan Province (Hnky2023-74)

***通信作者:** 刘星, 博士, 教授, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: xliu@hainanu.edu.cn

***Corresponding author:** LIU Xing, Ph.D, Professor, Hainan University, No.58 Renmin Avenue, Haikou 570228, China. E-mail: xliu@hainanu.edu.cn

progress of nanobody in food safety detection, which provide reference for the future research direction of nanobody in the field of food safety.

KEY WORDS: nanobody; food safety; food detection

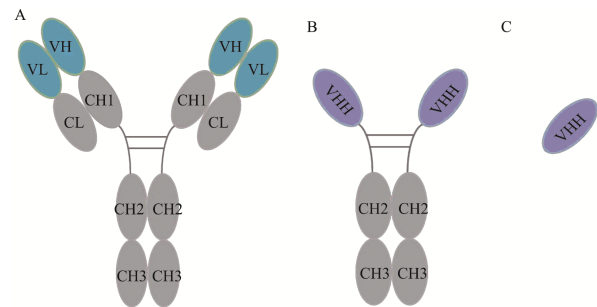
0 引言

21 世纪以来, 食品安全问题已经成为消费者面临的首要问题, 国内食品安全事件屡有发生, 这些问题严重地危害了人类健康。因此需要建立简便、灵敏、准确、快速的检测技术以保障食品安全。高效液相色谱法、液相色谱质谱法等技术因具有灵敏、准确的优势, 常用于食品中污染物的检测。然而, 上述方法依赖价格昂贵的精密设备、专业的技术操作人员, 且存在样品前处理复杂耗时、无法高通量检测等不足, 限制了其广泛应用。相比之下, 免疫分析法弥补了上述方法的不足, 其一般不需要贵重和复杂的仪器, 可很大程度上简化样品前处理过程, 同时也易普及和推广, 因此其以独特的优势在食品安全检测中占有重要地位。利用化学合成纳米荧光探针的优良光学特性, 可进一步增强免疫分析法的检测性能^[1-5]。抗体是免疫分析法必不可少的检测元件, 但传统抗体生产成本低, 制约了免疫分析法在食品安全检测等领域的广泛应用。基因工程抗体是按人类设计所重新组装的新型抗体分子, 可保留或增加天然抗体的特异性和主要生物学活性, 去除或减少无关结构, 具有广阔的应用前景。骆驼科动物体内存在一种天然缺失轻链的重链抗体, 通过克隆并表达重链抗体可变区可得到一个晶体结构为直径 2.5 nm、长 4 nm 的椭圆形单域抗体, 其分子量仅为免疫球蛋白的 1/10 (~15 kDa)却保留了全部的抗原结合能力, 因此也被称为纳米抗体^[6]。纳米抗体具有相对分子质量小、稳定性强、耐受性高、抗原结合性能好、表达水平高等特点, 能够替代传统抗体并应用于食品安全检测。本文详细综述了纳米抗体的结构及功能特性, 以及在食品安全检测中的应用, 并分析了纳米抗体的优缺点, 最后对其发展前景进行了展望, 为食品中有害小分子的纳米抗体开发和应用提供思路。

1 纳米抗体的简介

1993 年, 来自比利时的免疫学家 Hamers-Cazterman 在分离单峰驼以及双峰的亚洲驼和南美骆驼的血清中的抗体时发现一种天然缺失轻链的重链抗体, 该抗体只包含一个重链可变区(variable domain of heavy chain of heavy-chain, VHH)和两个常规的重链恒定区^[7]。克隆其可变区可得到只由 VHH 构成的单域抗体(single-domain antibody, sdAb), 称为 VHH 抗体, sdAb 直径只有约 2.5 nm, 高度约为 4 nm, 因为其结构简单和尺寸较小, 又被称为纳米抗体(nanobody, Nb)。纳米抗体具有与原重链抗体相当的结构稳

定性以及与抗原的结合活性, 其分子质量只有单克隆抗体的 1/10, 是迄今为止获得的结构稳定且具有抗原结合活性的最小抗体单位^[8](图 1)。



注: A: IgG; B: 重链抗体; C: 纳米抗体。

图1 抗体结构示意图

Fig.1 Structural schematic diagram of antibodies

2 纳米抗体的结构和特性

纳米抗体体积小且分子量小, 一般为椭圆形。纳米抗体主要由两个部分组成, 一个是骨架区(framework region, FR), 另一个是负责特定识别抗原的互补决定区(complementarity determining region, CDR)。研究发现, 骆驼重链抗体的 VHH 和人抗体重链的 VH 结构十分相似, 相比同源性超过 80%, 但是两者含有十分显著的差异。传统的 IgG 抗体是由两条重链(heavy chain, H)和两条轻链(light chain, L)组成的, 其依靠 6 个 CDR 才具备特异的抗原结合能力和高亲和性^[9]。而纳米抗体由于缺乏轻链, 只形成 3 个 CDRs, 却也能具备抗原结合能力和亲和性。研究 VHH 和 VH 的氨基酸排列顺序发现, VHH 的 CDR1 和 CDR3 比 VH 的更长, 在一定程度上弥补了缺失轻链导致的抗原结合力下降的不足之处(图 2)^[10]。由于纳米抗体是单结构域, 使得纳米抗体相较于传统抗体有一些独特的性质, 主要可以归纳为以下几点。

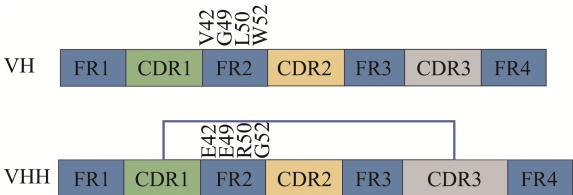


图2 VH与VHH结构对比示意图

Fig.2 Structural comparison diagram of VH and VHH

2.1 结构简单、分子量小

纳米抗体结构简单, 缺乏轻链, 仅由单个重链可变区组成; 同时其分子量小, 纳米抗体相对分子质量为 15 kDa, 比传统抗体(约 150 kDa)及其片段 Fab(约 50 kDa)和单链抗体(约 25 kDa)要小的多, 是已知的最小的抗原结合单位^[11]。

2.2 稳定性强、耐受性高

纳米抗体中的二硫键有助于维持其结构的稳定性, 并保障抗体的正常活性和抗原结合能力^[12]。因此相较于其他传统抗体, 在受到化学变性和热变变性的影响后, 纳米抗体能够重新折叠。MUYLDERMANS^[13]将不同的纳米抗体在 37℃下放置 1 周, 结果纳米抗体的抗原结合活性仍均在 80%以上, 表明纳米抗体在室温下保存相对稳定。ZHANG 等^[14]通过实验将纳米抗体与单克隆抗体进行热稳定性的比较, 研究结果表明, 单克隆抗体在 80℃加热 10 min 后与抗原的结合能力全部丧失, 而纳米抗体在 80℃加热 60 min 后仍保留有 30%的活性。此外, 在表面活性剂、有机溶剂、蛋白酶和极端 pH 等条件下, 纳米抗体能够保持其生物活性, 有利于检测各种复杂样品^[6,15]。

2.3 溶解性高

纳米抗体比其他传统抗体具有更好的溶解性。在 VH 结构中的 FR2 内, 高度保守的疏水性氨基酸(Trp47、Leu45、Gly44、Val37)都分别被更小的氨基酸或亲水性的氨基酸(Gly47、Arg45、Glu44、Phe37)取代, 这些氨基酸的取代也从结构上解释了纳米抗体的高溶解性的原因^[16-18], 而较高的溶解性使其有利于实现大规模生产。

2.4 抗原结合性强

纳米抗体的结构决定了其特异的功能性。纳米抗体较长的 CDR3 区域可形成一个稳定且暴露的大凸环结构, 此结构能够参与大部分抗原结合的反应, 因此纳米抗体能够深入抗原内部以更好地结合抗原从而提高其抗原特异性和亲和力。普通抗体只能识别抗原表面的位点, 而纳米抗体能够识别独特的构造表位, 因此纳米抗体比普通抗体的抗原结合能力更广泛, 不仅可结合小分子半抗原和肽, 还可结合大分子蛋白和病毒, 甚至当靶蛋白包裹隐藏普通抗体的识别位点时, 纳米抗体也可对其进行表位识别^[19]。

2.5 易表达、易于制备

单克隆抗体生产需要在动物体内完成, 通常需要大量的哺乳动物以及烦琐的纯化步骤, 从而导致昂贵的生产成本并限制其发展。而纳米抗体结构简单, 相对分子质量很小, 且其能由单一基因编码, 所以利用基因工程能在酵母菌、大肠杆菌等微生物中合成并表达, 能够有效地缩短研发周期, 降低其生产成本, 进而解决抗体规模化生产的问题^[7]。因其结构简单, 纳米抗体非常适合用来制备多价

抗体、多特异性抗体、多表位抗体等^[20-21]。

总之, 纳米抗体在食品检测中具有显著的应用优势, 如高稳定性、高溶解性、高亲和力、易于生产等。然而, 纳米抗体在食品检测中的应用也存在一些缺点。例如, 纳米抗体的筛选和制备过程相对复杂, 需要专业的技术支持。另外, 纳米抗体在食品检测中的应用还需要进一步的标准化和规范化。目前, 关于纳米抗体在食品检测中的使用方法和标准尚未完全统一, 这可能导致不同实验室或机构之间的检测结果存在差异。

3 纳米抗体在生物毒素及农药残留检测中的应用

纳米抗体技术最初应用于诊断和治疗领域, 但随着科技的发展和研究的深入, 不少科研工作者发现, 利用纳米抗体的分子小、易表达、抗体识别抗原结合能力强等特性, 可将其作为检测探针应用于食品中毒素、农药残留等免疫学检测中。近几年来国内外在纳米抗体检测技术上取得了一定的成就。

3.1 纳米抗体在生物毒素检测中的应用

食物中的天然毒素可引发严重的健康问题, 如癌症和畸形等, 一直以来都是全球公共卫生关注的焦点。目前针对不同毒素的纳米抗体有很多, 如真菌毒素、细菌毒素、藻类毒素纳米抗体等, 并且基于这些纳米抗体开发了多种食品检测方法(表 1)。

3.1.1 赭曲霉毒素

赭曲霉毒素是某些曲霉及青霉属的菌种在某些特定条件代谢产生的化合物, 其中以赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)分布最广, 其被发现是谷物、葡萄和豆类的污染物, 也广泛存在于大麦、小麦、玉米、啤酒、香料和中药等食物中。食品和饲料中的 OTA 污染非常令人担忧, OTA 具有肾毒性、致畸、致癌、遗传毒性和免疫毒性, 对人类的健康具有极大的威胁^[41]。

为了避免有毒的 OTA 标准品在检测过程中的污染问题, YANG 等^[22]联合使用纳米抗体和模拟肽用于检测谷物中的 OTA, 其噬菌体展示的模拟肽和纳米抗体联合建立酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)时, LOD 可以达到 0.014 ng/mL。该方法无毒、绿色, 且灵敏度高, 适合于低浓度 OTA 的检测。由于纳米抗体非常易于进行基因改造, CHENG 等^[23]通过优化 OTA 纳米抗体的密码子, 制备了一种可溶性的 Nb-GST 融合蛋白用于一步法检测谷物中的 OTA。该方法充分利用了纳米抗体的可操作性, 改造了抗体的性能, 有助于提高检测的稳定性和准确性。纳米抗体还可以与其他生物功能性材料配合使用。在一种生物发光检测法中, 一种荧光素酶的两个亚基之一与纳米抗体融合表达, 另一个亚基标记了抗原, 分别

与两个亚基相连的抗原抗体相互作用, 会引发荧光素酶的重组, 因而产生荧光信号(图 3)^[24]。这种纳米抗体介导的生物发光免疫传感器可以在 5 min 之内实现一步检测 OTA, 大大缩短了检测时间。此外, 纳米抗体还可以与其他纳米材料联用。在另一个一步法反应中, ZUO 等^[25]通过生物素、链霉亲和素将纳米抗体与磁珠结合起来检测谷物中的 OTA, 磁珠的引入使 OTA 与样品的分离更简便、高效。

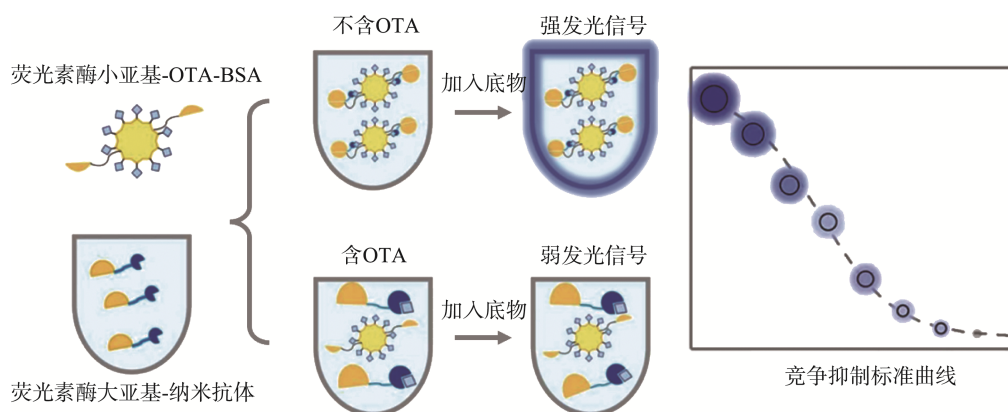
为有效地检测食品中的痕量 OTA, 研究人员一直致力于提高检测方法的灵敏度。ZHANG 等^[26]为克服传统 ELISA 灵敏度相对较低的问题, 采用了纳米酶来提高方法的灵敏度, 其建立了一种基于纳米抗体—碱性磷酸酶融合蛋白和 MnO₂ 纳米片的新型酶级联放大免疫测定法(enzyme

表 1 纳米抗体在农产品中毒素检测的应用

Table 1 Application of nanobodies for determination of toxins in agricultural products

毒素	检测方法	IC ₅₀ /(ng/mL)	LODs/(ng/mL)	线性范围/(ng/mL)	应用	参考文献
赭曲霉毒素	基于噬菌体展示模拟肽的酶联免疫分析	0.77	0.014	0.029~0.198	谷物	[22]
	基于纳米抗体-GST 融合蛋白的一步检测法	2.25±0.08	0.32±0.06	0.63±0.08~10.62±1.27	谷物	[23]
	纳米抗体/NanoBiT 介导的生物发光检测	0.31	0.01	0.04~2.23	谷物	[24]
	磁珠化学发光免疫分析	1.17	0.07	0.2488~5.28	谷物	[25]
	酶级联放大免疫分析	7.65	3.38	4.55~12.85	咖啡	[26]
	基于 FRET 的免疫分析	/	0.005	0.005~5	谷物	[27]
	基于 FRET 的免疫分析	/	0.005	/	谷物	[28]
	Au/CaCO ₃ 超灵敏电化学发光免疫分析	/	0.0057	0.01~100	咖啡	[29]
	非竞争性酶联免疫分析	0.089	0.006	/	玉米、大米、面粉、花生等	[30]
黄曲霉毒素	生物素—链霉亲和素信号放大酶联免疫分析	0.21	0.04	0.08~0.65	玉米、小麦	[31]
	电化学免疫传感器	/	68 fg/mL	0.5~10	农产品	[32]
	竞争性酶联免疫分析	0.25	0.05	0.10~0.60	牛奶和乳制品	[33]
	快速磁珠定向竞争酶联免疫分析	0.75	0.13	0.24~2.21	玉米、花生、饲料	[34]
微囊藻毒	间接竞争酶联免疫分析	0.87	0.06	0.17~4.8	水样	[35]
	噬菌体信号放大竞争酶联免疫分析	2.8	0.8	1.2~6.9	水样	[36]
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	荧光定量免疫 PCR	3.96±2.21	0.048	0.1~1000	农产品	[37]
金黄色葡萄球菌肠毒素	夹心酶联免疫分析	/	9.58±0.07	/	牛奶、奶粉、奶酪、牛肉	[38]
	夹心酶联免疫分析	/	2.47	4~250	牛奶	[39]
节球藻毒素	间接竞争酶联免疫分析	/	0.67	/	水样	[40]

注: /表示数据缺失, 下同; 半数抑制浓度(half-maximum inhibition concentration, IC₅₀); 检出限(limit of detection, LOD); 荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET); 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)。

图3 生物发光均相免疫分析法^[24]Fig.3 Bioluminescence homogeneous immunoassay^[24]

cascade-amplified immunoassay, ECAIA), 用于测定咖啡中的 OTA。将 FRET 与免疫分析结合起来也可以提高方法的灵敏度并简化分析步骤。在一个基于 FRET 的检测法中, OTA 纳米抗体与绿色荧光蛋白融合表达, 并以其作为供体, OTA 与量子点偶联并作为受体^[27]; 同样地, OTA 和纳米抗体也可以分别标记不同颜色的量子点, 这两种方法的检出限都可以达到 5 pg/mL^[28]。纳米抗体结合电化学传感器也是超灵敏检测 OTA 的一种有效手段。LI 等^[29]提出了一种基于纳米抗体和 Au/CaCO₃ 的电化学发光免疫传感器, 该方法 LOD 为 5.7 pg/mL, 在 10~100 ng/mL 范围内呈现良好的线性关系, 可用于咖啡样品中的 OTA 检测。这些方法通过采用纳米材料、FRET 技术或电化学传感器等方式有效地提高了检测方法的灵敏度, 可实现 OTA 的超灵敏检测。

3.1.2 黄曲霉毒素

黄曲霉毒素(aflatoxins, AFB)是对人体危害较大且常见的真菌毒素之一, 为黄曲霉和寄生曲霉中产毒菌株的次级代谢产物。AFB 主要分布在坚果类、谷物类等食品, 尤其以花生、玉米受污染的程度最重。此外, AFB 具有非常高的肝毒性、肾毒性、致畸和致突变性^[42]。因此, 建立检测食品中 AFB 的相关检测方法就尤为重要。

针对 AFB 这类小分子化合物, 通常采用竞争免疫分析法进行检测, 然而非竞争免疫法也被报道可以用于检测小分子化合物。在一个非竞争 ELISA 中, 研究人员采用偶联了纳米抗体的免疫磁珠用于捕获黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxins B₁, AFB₁), 噬菌体展示的抗 AFB₁ 免疫复合物多肽作为检测抗体, 抗 M13 二抗与辣根过氧化物酶偶联用于显色反应^[30], 构建了一种非竞争检测 AFB₁ 的均相免疫分析法, 相较于竞争检测法具有更高的灵敏度。而且均相免疫分析使所有反应步骤在同一液相体系中进行, 简化了操作步骤, 降低了操作误差, 提高了检测稳定性和可靠性。

为提高检测方法的灵敏度, YAN 等^[31]利用生物素化

纳米抗体 Nb26 和链霉亲和素偶联辣根过氧化物酶, 实现快速检测谷物中的 AFB₁。当纳米抗体与传感器相结合, 方法的灵敏度可以得到很大的提升。LIU 等^[32]开发了一种电化学免疫传感器, 该传感器使用了金纳米颗粒、纳米抗体等纳米材料, 利用了生物素、链霉亲和素的信号放大效应, 以及 DNA 的杂交链式反应, 在最优化的条件下, LOD 可达到 68 fg/mL, 实现了对 AFB₁ 的超灵敏、快速检测。

AFB 的无毒检测技术也是研究人员重点研究的方向之一。CAI 等^[33]从羊驼免疫噬菌体展示库中筛选出一种抗独特型抗体 VHH C4, 该抗体与黄曲霉毒素 M₁ 的单克隆抗体 2C9 结合, 开发了一种环境友好型的竞争 ELISA。除了抗独特型抗体之外, 模拟表位也可以结合纳米抗体用于分析检测。ZHAO 等^[34]基于噬菌体展示技术, 筛选出针对 AFB 纳米抗体 Nb28 的模拟表位 ME17, 将纳米抗体和模拟表位联用, 构建了一种快速的、磁珠定向竞争 ELISA 检测方法。这两种方法都是利用噬菌体展示技术筛选与纳米抗体相互作用的分子, 因此通过选用不同的噬菌体展示库, 理论上还可以筛选到与纳米抗体相互作用的适配体、抗免疫复合物等。

3.1.3 微囊藻毒素

微囊藻毒素 LR (microcystin LR, MC-LR) 是蓝藻在水体中产生的一种常见的高毒性生物毒素, 近些年来对全球范围内水资源、农产品和食品安全构成威胁^[43]。目前针对 MC-LR 纳米抗体的研究较少, 仅限于将纳米抗体应用于建立传统的 ELISA 以及噬菌体信号放大 ELISA 检测方法^[35-36]。因此, 微囊藻毒素纳米抗体在应用上还有很大的发展空间。

3.1.4 脱氧雪腐镰刀菌烯醇

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)是真菌产生的有毒次级代谢产物, 广泛存在于粮食及其制品中, 危害着人畜的健康^[44]。江东健等^[37]采用 DON 抗独特型纳米抗体作为酶标抗原的替代物, 并应用于荧光定量 PCR 体系,

实现了对 DON 的高灵敏、绿色免疫分析。采用抗独特型纳米抗体作为酶标抗原的替代物,减少了传统免疫分析中有害物质的使用,降低了对环境的污染。然而抗毒特性纳米抗体的制备难度较高,其技术复杂性和成本问题亟待解决。

3.1.5 金黄色葡萄球菌肠毒素

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种常见的食源性致病菌,由其引起的食物中毒在革兰氏阳性菌中高居首位。金黄色葡萄球菌的致病能力主要取决于该菌产生的肠毒素(staphylococcal enterotoxins, SEs),而 SEs 中金黄色葡萄球菌肠毒素 B (staphylococcal enterotoxins B, SEB)对免疫细胞有严重的毒性作用^[45]。因此,建立一种快速、准确且灵敏的 SEB 检测方法尤为重要。检测 SEB 最常见的免疫学方法是夹心 ELISA,而采用纳米抗体代替时则通常需要一对纳米抗体。郭鹏利等^[38]在前期获得的抗 SEB 纳米抗体的基础上,分别利用原核表达的纳米抗体作为捕获抗原,噬菌体展示的纳米抗体作为检测抗原,建立夹心 ELISA 用于检测食品中的 SEB。JI 等^[39]同样是用一对纳米抗体(其中一个展示于噬菌体表面)建立了夹心 ELISA,用于检测牛奶中的金黄色葡萄球菌肠毒素 C(图 4)。这些方法均采用夹心 ELISA 模式检测 SEs,操作步骤相对简单,适用范围广,不仅适用于食品中 SEs 的检测,还可应用于其他毒素或病原体的检测。

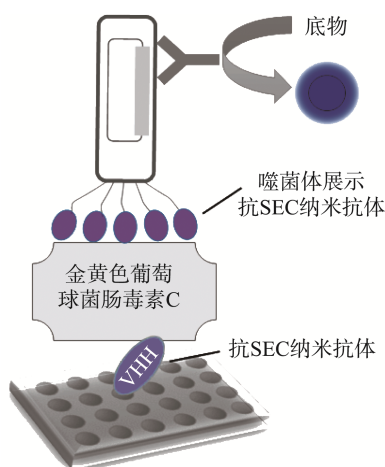


图4 纳米抗体夹心ELISA^[39]

Fig.4 Nanobody-based sandwich ELISA^[39]

3.1.6 节球藻毒素

节球藻毒素 R (nodularin-R, NOD-R)是蓝藻的一种次级代谢物,因其强烈的肝毒性可能对饮料和食品等造成安全风险, YANG 等^[40]从 VHH 噬菌体展示免疫库中筛选出 NOD-R 的纳米抗体,并且构建了间接竞争 ELISA,该方法经超高效液相色谱-串联质谱法验证,展现出良好的准确性和可靠性。鉴于该方法的准确性和可靠性,有望开发出

一种基于纳米抗体的快速检测试剂盒,用于食品、环境或生物样本中 NOD-R 的安全检测,具有广泛的应用前景。

3.1.7 多种毒素同时检测

农产品多种真菌毒素混合污染的情况时有发生,因此建立能同时检测两种及两种以上的毒素的检测手段非常必要,能为检测机构提供极大的便利。近年来随着学者研究的深入,逐渐开发出纳米抗体同时检测多种食品毒素的方法以解决混合毒素的污染问题(表 2)。TANG 等^[46]使用 AFB₁ 和玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)的抗独特型纳米抗体和 Eu/Tb(III)纳米球相偶联,构建了一种时间分辨荧光免疫纸层析同步检测方法。该研究发现相比于单克隆抗体,使用纳米抗体检测 AFB₁ 和 ZEN 的灵敏度分别提高了 18.3 和 20.3 倍。REN 等^[47]基于编码抗独特型纳米抗体的特定 DNA 序列设计了 PCR 的扩增引物,构建了一种抗独特型纳米抗体噬菌体展示介导的免疫 PCR 检测方法,该方法可用于同时测定谷物中的总黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮。针对结构类似物, TANG 等^[48]构建了一种非竞争性、均相荧光共振能量转移免疫分析方法,用于同时检测 OTA 和赭曲霉毒素 B。该方法基于纳米抗体中色氨酸残基的内源荧光激发 OTA 和 OTB 的荧光,这种利用抗原抗体自身的荧光属性来构建检测方法的构思非常巧妙,其他具有类似性质的分析物可以参考借鉴。

3.2 纳米抗体在农药残留安全检测中的应用

随着我国农业的不断发展,农产品中农药残留问题越来越严重。随着人们对食品安全的关注日益提高,如何构建快速、灵敏、便捷的快速检测农药残留的方法成了科研工作者们探讨的方向。表 3 列举了近年来纳米抗体在农药残留检测中的研究报道。

3.2.1 甲萘威

甲萘威(又称西维因)在我国被广泛使用,主要用于谷类、油类和蔬菜类作物的生产,其残留物会对食品安全和人类健康造成危害。为了检测水稻、玉米和小麦样品中的甲萘威, LIU 等^[49]开发了一种基于 VHH 的快速免疫检测方法。此外,还可以通过检测 1-萘酚(甲萘威的代谢产物)来评估甲萘威的暴露风险。CHEN 等^[56]采用纳米抗体—碱性磷酸酶融合蛋白建立了一种比率荧光免疫分析法用来检测尿样中的 1-萘酚。比率荧光分析能够减少实验过程中非特异性干扰的影响,提高检测结果的准确性。利用纳米抗体的可编辑性, LIU 等^[50]开发了一种可以识别甲萘威和 1-萘酚的双特异性纳米抗体,通过研究发现两个纳米抗体之间的连接片段长度和连接位点会影响抗体亲和力。双特异性纳米抗体能够同时识别甲萘威和 1-萘酚,增强了检测的特异性和靶向性,提高了检测的准确性。然而,由于双特异性纳米抗体结构更为复杂,其稳定性和溶解性也可能受到连接片段的影响。

表 2 纳米抗体在多种毒素同时检测中的应用
Table 2 Application of nanobodies in simultaneous detection of multiple toxins

毒素	检测方法	IC ₅₀ /(ng/mL)	LODs/(ng/mL)	回收率/%	应用	参考文献
AFB	时间分辨荧光免疫纸层析同步检测	0.46	0.05	72.6~106.6	玉米	[46]
ZEN		0.86	0.07			
AFB	噬菌体展示的抗独特型纳米抗体介导的实时免疫聚合酶链式反应	/	0.03	80~118	谷物	[47]
ZEN			0.09	76.7~111		
OTA	均相荧光共振能量转移免疫分析	/	0.06	/	谷物	[48]
赭曲霉毒素 B			0.12			

表 3 纳米抗体在农药残留检测中的应用
Table 3 Application of nanobodies in pesticide residue detection

农药种类	检测方法	IC ₅₀ /(ng/mL)	LODs/(ng/mL)	线性范围/(ng/mL)	应用	参考文献
甲萘威	酶联免疫分析	5.4	0.3	/	谷物	[49]
	双特异性酶联免疫分析	18.8	0.8	2.1~270.9	土壤、大米	[50]
呋喃丹	间接竞争性酶联免疫分析	7.27	0.65	/	农产品	[15]
对磷硫	直接竞争荧光酶免疫分析	1.6	0.2	/	蔬菜	[51]
溴氰虫酰胺	间接竞争性酶联免疫分析	1.2	/	/	蔬菜	[52]
氯虫苯甲酰胺		1.5				
百草枯	时间分辨荧光免疫层析法试纸条	0.0588	0.009	/	蔬菜、水果、谷物	[53]
杀螟硫磷	间接竞争酶联免疫分析	2.0	0.3	0.6~6.9	农产品	[54]
	间接竞争荧光免疫分析	1.4	0.03	/	蔬菜、水果	[55]

3.2.2 呋喃丹

呋喃丹是一种广泛应用于多种农产物中的杀虫剂，可提高作物产量，缩短作物生育期。然而呋喃丹具有剧毒，对人类健康和环境构成潜在危害。ZHANG 等^[15]从噬菌体展示库中筛选出一个热稳定性强、且耐受甲醇和乙腈的纳米抗体，同时构建了间接竞争性 ELISA 用于检测果蔬中的呋喃丹。该方法预处理步骤简单，无需蒸馏有机溶剂，不仅降低了操作难度，还提高了检测效率，是一种简单、快速、经济的检测方法。但是该研究仅对果蔬样品中的呋喃丹进行了测定，在实际应用中可能受到其他复杂样品中的基质干扰。

3.2.3 对磷硫

对磷硫是一种在农产品中广泛使用的具有高毒性和持久性的农药，对人类健康和环境构成一定威胁。ZHANG 等^[51]构建了噬菌体纳米抗体文库，通过竞争结合筛选纳米抗体，并构建了基于 VHH-AP 的间接竞争 ELISA，该方法的灵敏度比传统的直接 ELISA 和间接 ELISA 分别提高了 4 倍或 3 倍，操作时间减少了 50%，提高了检测效率。尽管 VHH-AP 抗体的制备在初始阶段需要投入较高的成本，但是从长期来看，纳米抗体可通过大规模生产而降低生产成本，另外该方法可因减少操作时间和提高检测效率而降低检测成本。

3.2.4 溴氰虫酰胺和氯虫苯甲酰胺

溴氰虫酰胺和氯虫苯甲酰胺是一类杀虫剂，其可以导致昆虫麻痹、死亡，对水生无脊椎动物有毒，当人们过度接触其时也会产生一定毒性。XU 等^[52]开发了可以识别溴氰虫酰胺和氯虫苯甲酰胺的特异性纳米抗体，以此构建的 ELISA 检测方法的 IC₅₀ 分别为 1.2 ng/mL 和 1.5 ng/mL。该方法与先前基于单克隆抗体的 ELISA 方法相比具有更低的检出限，在同时检测溴氰虫酰胺和氯虫苯甲酰胺杀虫剂的应用中显示出高灵敏性和特异性，具有广阔的应用前景。

3.2.5 百草枯

百草枯是最广泛使用的除草剂之一，能杀死大多数杂草，然而百草枯由于具有高毒性，对生态环境和人类具有很大的威胁性。因此，快速定量检测百草枯尤为重要。ZHANG 等^[53]利用免疫后的羊驼建立了噬菌体展示纳米抗体文库，筛选出相关的纳米抗体，同时基于合成的重链抗体可变域开发了一种时间分辨荧光免疫层析法试纸条。该方法利用纳米抗体的高亲和力，实现了对百草枯的超高灵敏检测，其 LOD 低至 0.0090 ng/mL。同时，通过试纸条可利用肉眼进行百草枯的定量及半定量分析，为现场快速检测提供了便利。

3.2.6 杀螟硫磷

杀螟硫磷是一种中等毒性的杀虫剂，用于多种农作

物的虫害防治, 但是不合理地施用有机磷农药会污染水质和土壤, 也会导致人体中毒。王宇等^[54]利用杀螟硫磷人工抗原免疫羊驼获得纳米抗体基因, 通过噬菌体展示技术获得了灵敏度最高的纳米抗体Nbsm6, 同时将Nbsm6克隆并表达制备了生物素化纳米抗体, 用于建立间接竞争ELISA。该方法在最佳条件下, IC_{50} 为 2.0 ng/mL。LOD 为 0.3 ng/mL。CHEN 等^[55]同样采用了生物素化的纳米抗体以及链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶作为检测元件, 用荧光检测代替了比色检测以提高方法的灵敏度。该方法的 IC_{50} 为 1.4 ng/mL, LOD 为 0.03 ng/mL, 可用于杀螟硫磷的快速筛选。采用荧光检测代替比色检测显著降低了方法的 LOD, 使该方法在极低浓度的杀螟硫磷检测中更具优势。然而荧光检测需要特定的荧光检测仪, 限制了该方法的便利性和可操作性。

纳米抗体在食品检测中的应用范围广泛。在农药残留检测方面, 纳米抗体已被用于检测果蔬中的甲萘威、呋喃丹、对磷硫等多种农药。同时, 纳米抗体还可用于检测食品中的生物毒素, 如真菌毒素、藻类毒素、金黄色葡萄球菌肠毒素等, 为保障食品安全提供了有力的技术支持。此外, 纳米抗体在食品检测中的灵敏度和特异性也得到了广泛认可。通过结合不同的检测技术, 如 ELISA、免疫层析试纸条等, 纳米抗体可实现对食品中微量有害物质的检测, 为食品安全监管提供了有效的手段。

4 结束语

纳米抗体作为近几年来研究的热点, 其在赭曲霉毒素、AFB 等生物毒素中的应用已十分广泛, 而在农兽药残留等其他食品污染物中的应用仍处于发展阶段。目前, 从制备纳米抗体到建立检测方法的技术已十分成熟, 而且检测方法涉及酶联免疫分析、生物传感检测、电化学传感器、荧光共振能量转移、聚合酶链式反应等。纳米抗体在免疫学检测方法中的应用倾向于与各种生物、化学材料相结合, 如核酸、小分子多肽、生物发光蛋白、量子点、纳米材料等。从相关的研究工作来看, 纳米抗体与传统抗体相比, 更适合用于食品安全检测。然而, 由于许多食品污染物为小分子物质, 从相关文库中淘选到合适的纳米抗体仍然存在一定阻碍和困难。因此, 在免疫学与生物学的基础上, 需要进一步探索和开发具有大容量和多样性的展示文库以供淘选。随着纳米抗体技术的不断发展和完善, 纳米抗体优越的特性将会在食品安全检测领域展现其更大的应用价值, 纳米抗体势必会在食品安全检测领域发挥越来越重要的作用。

参考文献

[1] ZHAO Y, LIU T, GAO J, *et al.* Nanoassemblies based on a cationic perylene diimide derivative and sodium dodecyl sulfate: A simple fluorescent platform for efficient analysis of aflatoxin B₁ [J]. *Anal Chem*,

2023, 95(21): 8250–8257.

- [2] ZHAO Y, LIU M, ZHOU S, *et al.* Smartphone-assisted ratiometric sensing platform for on-site tetracycline determination based on europium functionalized luminescent Zr-MOF [J]. *Food Chem*, 2023, 425: 136449.
- [3] ZHANG Q, SHEN Y, ZHUANG K, *et al.* A “turn-on” approach for rapid detection of tetracycline based on supramolecular aggregates of water soluble perylene diimide [J]. *J Photoch Photobio A*, 2023, 445: 115014.
- [4] ZHAO Y, ZHENG W, LIAO M, *et al.* Fluorescent detection of tartrazine based on the supramolecular self-assembly of cationic perylene diimide [J]. *Microchim Acta*, 2023, 190(8): 290.
- [5] 鄢之雨, 周帅, 姚志轶. 基于纳米荧光探针的四环素快速检测方法研究进展[J]. *肉类研究*, 2023, 37(7): 60–70.
- YAN ZY, ZHOU S, YAO ZY. Research progress in rapid detection of tetracycline using fluorescent nNanoprobes [J]. *Meat Res*, 2023, 37(7): 60–70.
- [6] 何晓婷, 董洁娴, 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): 1004–1017.
- HE XT, DONG JX, SHEN X, *et al.* Advances on the relationship between stability and structure of nanobody [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2022, 49(6): 1004–1017.
- [7] SALVADOR JP, VILAPLANA L, MARCO MP. Nanobody: Outstanding features for diagnostic and therapeutic applications [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(9): 1703–1713.
- [8] 何扩, 张秀媛, 杜欣军, 等. 基因工程抗体在食品安全检测中应用进展研究[J]. *中国粮油学报*, 2014, 29(8): 124–128.
- HE K, ZHANG XY, DU XJ, *et al.* Application progress of genetic engineering antibody in food safety testing [J]. *J Chin Cereal Oil Ass*, 2014, 29(8): 124–128.
- [9] SUN S, DING Z, YANG X, *et al.* Nanobody: A small antibody with big implications for tumor therapeutic strategy [J]. *Int J Nanomed*, 2021, 16: 2337–2356.
- [10] NGUYEN VK, HAMERS R, WYNS L, *et al.* Camel heavy-chain antibodies: Diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire [J]. *EMBO J*, 2000, 19(5): 921–930.
- [11] JIN BK, ODONGO S, RADWANSKA M, *et al.* Nanobodies: A review of generation, diagnostics and therapeutics [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5994.
- [12] MOHSENI A, MOLAKARIMI M, TAGHDIR M, *et al.* Exploring single-domain antibody thermostability by molecular dynamics simulation [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2019, 37(14): 3686–3696.
- [13] MUYLDERMANS S. Nanobodies: Natural single-domain antibodies [J]. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82(1): 775–797.
- [14] ZHANG C, ZHANG Q, TANG X, *et al.* Development of an anti-idiotypic VHH antibody and toxin-free enzyme immunoassay for ochratoxin A in cereals [J]. *Toxins*, 2019, 11(5): 280.
- [15] ZHANG JR, WANG Y, DONG JX, *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
- [16] 朱光, 王译晨, 宋莎莎, 等. 纳米抗体筛选和表达技术研究进展[J]. *中国动物检疫*, 2021, 38(7): 79–87.
- ZHU G, WANG YC, SONG SS, *et al.* Research progress on the screening and expression of nanobody [J]. *China Anim Health Inspect*, 2021, 38(7): 79–87.
- [17] LI C, TANG Z, HU Z, *et al.* Natural single-domain antibody-nanobody: a novel concept in the antibody field [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14(1): 1–19.
- [18] MITCHELL LS, COLWELL LJ. Analysis of nanobody paratopes reveals greater diversity than classical antibodies [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2018, 31(7-8): 267–275.
- [19] MAEDA R, FUJITA J, KONISHI Y, *et al.* A panel of nanobodies recognizing conserved hidden clefts of all SARS-CoV-2 spike variants including Omicron [J]. *Commun Biol*, 2022. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03630-3>
- [20] MA H, ZENG W, MENG X, *et al.* Potent neutralization of SARS-CoV-2 by Hetero-Bivalent alpaca nanobodies targeting the spike receptor-binding domain [J]. *J Virol*, 2021, 95(10): e02438-20.
- [21] ZHAO L, MENG F, LI Y, *et al.* Multivalent nanobody conjugate with rigid, reactive oxygen species scavenging scaffold for multi-target therapy of Alzheimer's disease [J]. *Adv Mater*, 2023, 35(17): 2210879.
- [22] YANG X, SUN Z, HE Z, *et al.* Combination of nanobody and peptidomimetic to develop novel immunoassay platforms for detecting ochratoxin A in cereals [J]. *Food Chem*, 2023, 429: 137018.
- [23] CHENG J, LIANG L, LIU Y, *et al.* Expression, purification of codon-optimized ochratoxin A nanobody-GST fusion protein and its one-step immunoassay for detection of OTA in cereal [J]. *J Food Compos Anal*, 2023, 123: 105530.
- [24] XIE X, HE Z, QU C, *et al.* Nanobody/NanoBiT system-mediated bioluminescence immunosensor for one-step homogeneous detection of trace ochratoxin A in food [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 437: 129435.
- [25] ZUO H, WANG X, LIU W, *et al.* Nanobody-based magnetic chemiluminescence immunoassay for one-pot detection of ochratoxin A [J]. *Talanta*, 2023, 258: 124388.
- [26] ZHANG Z, SU B, XU H, *et al.* Enzyme cascade-amplified immunoassay based on the nanobody-alkaline phosphatase fusion and MnO₂ nanosheets for the detection of ochratoxin A in coffee [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(35): 21760–21766.
- [27] SU B, ZHANG Z, SUN Z, *et al.* Fluonanobody-based nanosensor via fluorescence resonance energy transfer for ultrasensitive detection of ochratoxin A [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 422: 126838.
- [28] TANG Z, LIU X, SU B, *et al.* Ultrasensitive and rapid detection of ochratoxin A in agro-products by a nanobody-mediated FRET-based immunosensor [J]. *J Hazard Mater*, 2020, 387: 121678.
- [29] LI L, LIU X, HE S, *et al.* Electrochemiluminescence immunosensor based on nanobody and Au/CaCO₃ synthesized using waste eggshells for ultrasensitive detection of ochratoxin A [J]. *ACS Omega*, 2021, 6(44): 30148–30156.
- [30] ZOU W, SHI R, WANG G, *et al.* Rapid and sensitive noncompetitive immunoassay for detection of aflatoxin B₁ based on anti-immune complex peptide [J]. *Food Chem*, 2022, 393: 133317.
- [31] YAN T, ZHU J, LI Y, *et al.* Development of a biotinylated nanobody for sensitive detection of aflatoxin B₁ in cereal via ELISA [J]. *Talanta*, 2022, 239: 123125.
- [32] LIU X, WEN Y, WANG W, *et al.* Nanobody-based electrochemical competitive immunosensor for the detection of AFB₁ through AFB₁-HCR as signal amplifier [J]. *Microchim Acta*, 2020, 187(6): 1–10.
- [33] CAI C, ZHANG Q, NIDIAYE S, *et al.* Development of a specific anti-idiotypic nanobody for monitoring aflatoxin M₁ in milk and dairy products [J]. *Microchem J*, 2021, 167: 106326.
- [34] ZHAO F, TIAN Y, SHEN Q, *et al.* A novel nanobody and mimotope based immunoassay for rapid analysis of aflatoxin B₁ [J]. *Talanta*, 2019, 195: 55–61.
- [35] XU C, YANG Y, LIU L, *et al.* Microcystin-LR nanobody screening from an alpaca phage display nanobody library and its expression and application [J]. *Ecotox Environ Saf*, 2018, 151: 220–227.
- [36] LIU S, LIN M, HU X, *et al.* Improved sensitivity of the anti-microcystin-LR ELISA using phage-displayed alpha-type anti-idiotypic nanobody [J]. *Anal Biochem*, 2023, 664: 115030.
- [37] 江东健, 罗秀儿, 何庆华. 基于噬菌体展示纳米抗体的绿色免疫 PCR 检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇[J]. *食品科学*, 2019, 40(8): 256–261.
- JIANG DJ, LUO XER, HE QH. Phage displayed nanobody mediated green immuno-PCR detection of deoxynivalenol [J]. *Food Sci*, 2019, 40(8): 256–261.
- [38] 郭鹏利, 路云龙, 李想, 等. 基于纳米抗体的酶联免疫吸附法检测食品中金黄色葡萄球菌肠毒素 B[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(20): 250–255.
- GUO PL, LU YL, LI X, *et al.* Detection of *Staphylococcal* enterotoxin B in foodstuffs by nanobody-based ELISA [J]. *Food Ferment Ind*, 2019, 45(20): 250–255.
- [39] JI Y, CHEN L, WANG Y, *et al.* Development of a double nanobody-based sandwich immunoassay for the detecting *Staphylococcal* enterotoxin c in dairy products [J]. *Foods*, 2021, 10(10): 2426.
- [40] YANG J, SI R, WU G, *et al.* Preparation of specific nanobodies and their application in the rapid detection of nodularin-R in water samples [J]. *Foods*, 2021, 10(11): 2758.
- [41] GANESAN AR, MOHAN K, KARTHICK RAJAND, *et al.* Distribution, toxicity, interactive effects, and detection of ochratoxin and deoxynivalenol in food: A review [J]. *Food Chem*, 2022, 378: 131978.

- [42] JAČEVIĆ V, DUMANOVIĆ J, ALOMAR SY, *et al.* Research update on aflatoxins toxicity, metabolism, distribution, and detection: A concise overview [J]. *Toxicology*, 2023, 492: 153549.
- [43] ZHANG H, XIE P. The mechanisms of microcystin-LR-induced genotoxicity and neurotoxicity in fish and mammals: Bibliometric analysis and meta-analysis [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 905: 167018.
- [44] LU Q, LUO JY, RUAN HN, *et al.* Structure-toxicity relationships, toxicity mechanisms and health risk assessment of food-borne modified deoxynivalenol and zearalenone: A comprehensive review [J]. *Sci Total Environ*, 2022, 806: 151192.
- [45] LIU C, SHEN Y, YANG M, *et al.* Hazard of staphylococcal enterotoxins in food and promising strategies for natural products against virulence [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(8): 2450–2465.
- [46] TANG X, LI P, ZHANG Q, *et al.* Time-resolved fluorescence immunochromatographic assay developed using two idiotypic nanobodies for rapid, quantitative, and simultaneous detection of aflatoxin and zearalenone in maize and its products [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(21): 11520–11528.
- [47] REN X, ZHANG Q, WU W, *et al.* Anti-idiotypic nanobody-phage display-mediated real-time immuno-PCR for sensitive, simultaneous and quantitative detection of total aflatoxins and zearalenone in grains [J]. *Food Chem*, 2019, 297: 124912.
- [48] TANG Z, LIU X, WANG Y, *et al.* Nanobody-based fluorescence resonance energy transfer immunoassay for noncompetitive and simultaneous detection of ochratoxin A and ochratoxin B [J]. *Environ Pollut*, 2019, 251: 238–245.
- [49] LIU Z, 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]. *J Sci Food Agric*, 2019, 99(9): 4383–4390.
- [50] LIU ML, CHEN ZJ, HUANG XQ, *et al.* A bispecific nanobody with high sensitivity/efficiency for simultaneous determination of carbaryl and its metabolite 1-naphthol in the soil and rice samples [J]. *Environ Pollut*, 2023, 335: 122265.
- [51] ZHANG YQ, XU ZL, WANG F, *et al.* Isolation of bactrian camel single domain antibody for parathion and development of one-step dc-FEIA method using VHH-alkaline phosphatase fusion protein [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(21): 12886–12892.
- [52] XU B, WANG K, VASYLIEVA N, *et al.* Development of a nanobody-based ELISA for the detection of the insecticides cyantraniliprole and chlorantraniliprole in soil and the vegetable bok choy [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(9): 2503–2511.
- [53] ZHANG YY, LI LH, WANG Y, *et al.* Ultrasensitive and rapid colorimetric detection of paraquat via a high specific VHH nanobody [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 205: 114089.
- [54] 王宇, 张译丰, 沈玉栋, 等. 抗杀螟硫磷生物素化纳米抗体的制备及其在免疫检测方法中的应用[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(8): 286–294.
- WANG Y, ZHANG YF, SHEN YD, *et al.* Production of anti-fenitrothion biotinylated nanobody and the application in the development of immunosassay [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37(8): 286–294.
- [55] CHEN ZJ, ZHANG YF, CHEN JL, *et al.* Production and characterization of biotinylated anti-fenitrothionnanobodies and development of sensitive fluoroimmunoassay [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(13): 4102–4111.
- [56] CHEN ZJ, WU HL, SHEN YD, *et al.* Phosphate-triggered ratiometric fluoroimmunoassay based on nanobody-alkaline phosphatase fusion for sensitive detection of 1-naphthol for the exposure assessment of pesticide carbaryl [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 424: 127411.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

作者简介



贺贞云, 硕士, 讲师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: zhenyun89@foxmail.com



刘星, 博士, 教授, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: xliu@hainanu.edu.cn