

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20231128002

# 纳米抗体在食源性微生物污染检测中的应用

高家昊, 郇娟\*, 褚冲, 付诗慧, 辛博, 曾慧君

[武汉食品化妆品检验所, 国家市场监督管理总局重点实验室(食用油质量与安全), 武汉 430040]

**摘要:** 食源性微生物污染对人们的生命健康产生威胁, 检测技术大多为传统的培养方法, 结果准确但操作烦琐, 检测周期长。纳米抗体作为一种新的抗原识别和调控工具, 具备分子小、免疫原性弱、水溶性好、组织渗透性强、稳定性和亲和力强、易于表达和修饰的优势, 已广泛应用于食品安全快速检测领域。本文首先介绍了纳米抗体的结构特征, 作为检测工具的优势, 筛选与表达的基本情况。然后介绍了纳米抗体在沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌等食源性致病菌检测中的应用, 并补充了纳米抗体检测食品中诺如病毒和生物毒素的研究。最后对纳米抗体在食源性微生物污染检测中的应用进行了展望, 以期开发更加高效、准确、便捷的检测方法提供参考。

**关键词:** 纳米抗体; 食源性致病菌; 诺如病毒; 生物毒素; 检测

## Application of nanobodies in the detection of foodborne microbial contamination

GAO Jia-Hao, LI Juan\*, CHU Chong, FU Shi-Hui, XIN Bo, ZENG Hui-Jun

[Wuhan Institute of Food and Cosmetic Control, Key Laboratory of National Market Supervision (Edible Oil Quality and Safety), Wuhan 430040, China]

**ABSTRACT:** Foodborne microbial contamination pose a threat to people's life and health, and most of the detection techniques are based on traditional cultivation methods, which are accurate but cumbersome and have a long detection cycle. Nanobodies, as a new tool for antigen recognition and modulation, have the advantages of small molecules, weak immunogenicity, good water solubility, strong tissue permeability, high stability and affinity, and easy to be expressed and modified, and have been widely used in the field of food safety rapid detection. This paper firstly introduced the structural characteristics of nanobodies, their advantages as a detection tool, and the basic situation of screening and expression. Then it introduced the application of nanobodies in the detection of foodborne pathogenic bacteria such as *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, etc., and complemented the study on the detection of norovirus and mycotoxins in food using nanobodies. In the end, this paper provided an outlook on the application of nanobodies in the detection of foodborne pathogenic bacteria, with a view to providing a reference for the development of more efficient, accurate, and convenient detection methods.

**KEY WORDS:** nanobody; foodborne pathogens; norovirus; mycotoxins; detection

**基金项目:** 国家市场监督管理总局科技计划项目(2020MK131)、湖北省市场监督管理局技术保障和科技计划项目(Hbsejg-JS2021007)

**Fund:** Supported by the Technology Plan Project of State Administration for Market Regulation (2020MK131), and the Technical Support and Technology Plan Project of Hubei Provincial Market Supervision Administration (Hbsejg-JS2021007)

\*通信作者: 郇娟, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检验。E-mail: 1055245@qq.com

\*Corresponding author: LI Juan, Ph.D, Senior Engineer, Wuhan Institute of Food and Cosmetic Control, No.1137 Jinshan Avenue, Dongxihu District, Wuhan 430040, China. E-mail: 1055245@qq.com

## 0 引言

食源性微生物是指能引起食物中毒或以食物为传播媒介的致病菌、病毒或真菌。食源性微生物污染是造成食品安全问题的主要原因<sup>[1-2]</sup>。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)估计,全球每年约 6 亿人因食用受污染的食物而患病,其中多数是由食品中致病微生物污染引起<sup>[3]</sup>。2011—2020 年中国食源性疾病累计暴发事件 34558 起,发病人数 259481 人,事件年均发生率为 2.50 起/百万人,发病率 2 人/10 万人,平均每起事件发病人数 8 人<sup>[4]</sup>。沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌和单核增生李斯特菌是引起食源性感染的主要细菌。诸如病毒是最常见的食源性病毒,易在学龄儿童之间传播。被黄曲霉、赭曲霉等真菌污染的食品中会产生黄曲霉毒素、赭曲霉毒素等真菌毒素,这些是地区性肝癌、胃癌、食道癌的主要诱导物质。目前,检测食源性致病菌的常规方法大多是传统的培养方法,如食品安全国家标准 GB 4789 系列中与致病菌相关的检测方法,包括增菌、纯化、生化鉴定等步骤。诸如病毒的检测方法主要是荧光聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)法。真菌毒素的检测方法主要是色谱法。目前,许多新技术被应用于食源性微生物污染的快速检测,如分子生物学免疫学、传感器技术等的应用,与传统方法相比,其检测效率和准确性大大提高,减少了检测过程中产生的废液和残留物,有效缓解了环境污染的压力<sup>[5]</sup>。

纳米抗体是一种衍生于骆驼科动物仅由重链组成的单域抗体,具备小尺寸、易表达和筛选及改造、高亲和性和稳定性等优势,能够识别传统抗体难以识别的较为隐匿的抗原表位,作为一种可塑性强、较为新颖的抗原识别和调控的工具,纳米抗体在各种领域有着广阔的应用前景,包括食品安全检测、体内和体外疾病诊断、靶向治疗、靶向给药等<sup>[6]</sup>。本文就纳米抗体的生物学特征、优势、筛选与表达以及在食源性致病微生物污染检测中的应用进行阐述,以期开发更加高效、准确、便捷、更多种类的食源性致病微生物污染检测方法提供参考。

## 1 纳米抗体及其特点

### 1.1 纳米抗体的结构特征

1993 年纳米抗体首次被报道,科学家在骆驼科动物的血清中发现了天然缺乏轻链的重链抗体(heavy chain antibody, HcAb)<sup>[7-8]</sup>, HcAb 只包含一个重链可变区(variable domain of the heavy chain of heavy-chain antibody, VHH)以及 CH2、CH3 两个常规区,其抗原结合位点由 VHH 形成(图 1a)。这些独特的 VHH 结构域能够通过重组蛋白表达的方式获得,其直径 2.5 nm,高 4 nm,呈橄榄球形,也被

称为纳米抗体(nanobody, Nb)<sup>[9-10]</sup>。纳米抗体具备 CDR1, CDR2, CDR3 3 个高度可变区域和 FR1, FR2, FR3, FR4 4 个保守框架区域(图 1b)。与常规抗体相比,纳米抗体具有分子小、免疫原性弱、水溶性好、组织渗透性强、稳定性和亲和力高、生产成本低且易于修饰等优点,在生物学和医学领域有广泛的研究与应用。目前纳米抗体的免疫对象主要有细菌、病毒、真菌毒素和农兽药残留等小分子化合物。

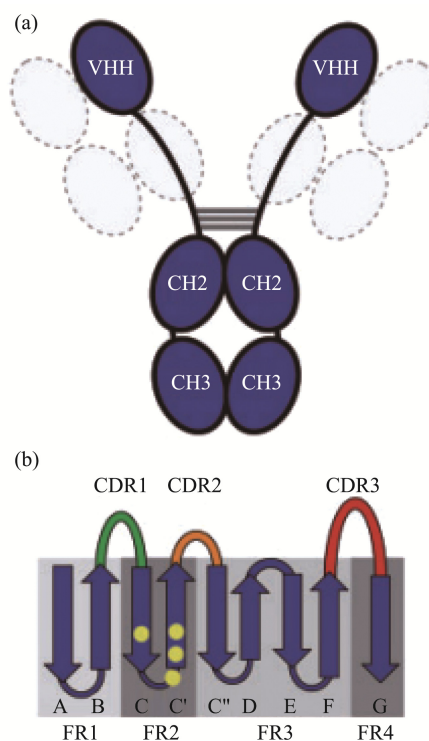


图 1 纳米抗体结构示意图<sup>[7]</sup>  
Fig.1 Diagram nanobody structure<sup>[7]</sup>

### 1.2 纳米抗体的优势

#### 1.2.1 分子小, 免疫原性弱

传统抗体分子量约 150 kDa。Nb 约是传统抗体分子量的十分之一,只包含一个结构域,因此刺激机体形成特异性抗体或是引起体液和细胞免疫应答机率大大降低。人类 VH 基因和骆驼科动物的 VHH 基因在结构上具有较高的同源性,且纳米抗体不含可结晶片段(fragment crystalline, Fc)段,避免了 Fc 段引起的免疫反应,因此更加降低其免疫原性<sup>[11-12]</sup>。

#### 1.2.2 水溶性好, 组织渗透性强

虽然 Nb 与传统抗体的序列相似,但 Nb 的 FR2 上的疏水性氨基酸 Val37、Gly44、Leu45、Trp47 突变为亲水性的 Phe/Tyr37、Glu/Gln44、Arg/Cys45、Gly/Phe/Ser/Leu47Nb,使得 Nb 的可溶性大大提升<sup>[13]</sup>。更小的尺寸和更好的可溶性为 Nb 提供了更强的组织渗透性,使 Nb 能够更加容易的渗透到肿瘤组织中<sup>[14]</sup>,也有研究表明 Nb 能够有效穿过血脑屏障<sup>[15]</sup>。

### 1.2.3 稳定性和亲和力强

Nb 的稳定性源自内部多个二硫键。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, 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<sup>[16]</sup>。Nb 可常温储存, 37°C 放置 1 周后, 仍可保持 80% 以上活性。此外, Nb 在强变性剂条件下也显示出较高的耐受性, 高于 90°C 可长期保存, 恢复室温后易复性并重获生物活性<sup>[17]</sup>。Nb 的 CDR3 区更长, 氨基酸残基数是传统 VH 的 2~3 倍, 这样的结构特性可以形成指状凸环并嵌入抗原分子沟槽或裂隙内, 进一步识别抗原表面的孔洞或隐藏的表位; Nb 的 CDR3 还可以和 CDR1 甚至 FR2 间多形成一条二硫键用于稳定结构, 可以最大程度优化结合位点的拓扑结构, 并且促进 CDR3 朝向抗原的方向。因此, 天然重链抗体及其进一步重组得到的纳米抗体具有更强的抗原结合能力<sup>[18]</sup>。

### 1.2.4 生产成本低, 易于修饰

Nb 结构简单, 具有单域构象的特点, 使其可以大规模地在多种系统中表达<sup>[19]</sup>。Nb 在大肠杆菌、酵母和哺乳动物细胞中均可高水平表达, 在植物表达系统中也已成功表达。Nb 制备过程简便, 研发周期短、生产成本低, 有效解决抗体规模化制备的难题<sup>[20]</sup>。此外, 由于是单域抗体, Nb 能够很容易与其他分子偶联从而实现多种功能, 比如与荧光蛋白融合表达有助于进行实时示踪<sup>[21]</sup>。与单价纳米抗体相比, 串联表达多特异性纳米抗体可以同时靶向多种类型靶标, 进一步提高 Nb 的特异性<sup>[22]</sup>。

## 1.3 纳米抗体的筛选与表达

### 1.3.1 纳米抗体库

纳米抗体库分为天然纳米抗体文库和免疫纳米抗体文库。天然纳米抗体文库通常通过提取非免疫羊驼外周血淋巴细胞中 mRNA, 克隆可变区基因库并通过噬菌体展示或其他技术获得纳米抗体。天然纳米抗体文库无抗原偏好性, 未经免疫刺激体细胞成熟的过程, 所以只有从库容大、多样性高的文库中筛选时才能筛选出高特异性和亲和力的抗体。免疫纳米抗体文库的构建通过免疫羊驼建立免疫抗体库。通过免疫抗原, 刺激特异性 HCAbs 在体内进行亲和力成熟, 往往更加容易获得特异性抗体<sup>[23]</sup>。

### 1.3.2 纳米抗体的筛选

食源性微生物污染检测中应用的纳米抗体筛选技术主要采用噬菌体展示技术和酵母双杂交技术。噬菌体展示的具体原理是将外源蛋白质的 DNA 序列插入到噬菌体外壳蛋白的一个基因上, 使外源基因随着外壳蛋白的表达而表达, 蛋白以与外壳蛋白融合的形式展示在噬菌体表面。被展示蛋白或者多肽可以保持相对的空间结构和生物活性<sup>[24]</sup>。酵母双杂交也是从免疫文库中筛选出高亲和 Nb 的有效手段。先构建带有抗原基因的诱饵质粒, 然后将诱饵菌与文库菌混合杂交。待杂交产物在显微镜下观察到三叶

草样杂合体时, 离心收集菌体涂布于选择性平板。如为蓝色菌落, 则初步鉴定为阳性克隆; 将文库质粒与诱饵质粒一同转化至感受态细胞中进行验证, 对共转验证阳性的质粒进行测序, 即可得到特异性纳米抗体的核苷酸序列<sup>[25]</sup>。

### 1.3.3 纳米抗体的表达

Nb 通过大量表达筛选获得的特异性纳米抗体序列而获得。目前常见的表达系统有大肠杆菌和酵母。大肠杆菌表达操作简便、生产成本低、产量大, 是非常成熟的表达系统。周质空间作为大肠杆菌中唯一具有氧化环境的隔间, 是含有特定二硫键的 Nb 最常用的表达体系。Nb 可以在大肠杆菌细胞周质中大量表达。通过标记 Nb 在细胞周质间形成的二硫键, 细胞周质提取物中的 Nb 就很容易被纯化<sup>[26]</sup>。毕赤酵母不会积累有毒乙醇, 只分泌很少内源性蛋白且其表达的蛋白糖基化程度与哺乳动物细胞糖基化程度相同, 免疫原性弱, 因此毕赤酵母表达系统是最常用的真核表达系统。此外, 还开发出了哺乳动物细胞表达系统、植物细胞表达系统和昆虫细胞表达系统。不同表达系统各具不同的特点, 其表达的 Nb 在商业领域的应用也各不相同。目前, 毕赤酵母表达的纳米抗体多用于临床治疗<sup>[27-28]</sup>。哺乳动物细胞可大量生产治疗性重组蛋白, 昆虫系统更多用于生产具有哺乳动物细胞末端唾液酸化修饰的 N 糖蛋白<sup>[29]</sup>。应用于食源性微生物污染检测中的 Nb 一般是通过大肠杆菌表达, 部分研究中也以酵母细胞进行表达。

## 2 纳米抗体在食源性致病菌检测中的应用

### 2.1 纳米抗体在沙门氏菌检测中的应用

沙门氏菌病是一种人畜共患疾病, 是全球食源性疾病的主要原因之一<sup>[30]</sup>。快速分离和鉴定食品中的沙门氏菌对预防食源性疾病的暴发具有重要意义。高杨<sup>[31]</sup>以沙门氏菌外膜蛋白基因 *PhoN* 为目的靶标, 通过大肠杆菌成功表达出 PhoN 重组蛋白。使用 PhoN 重组蛋白免疫羊驼, 通过构建噬菌体展示文库筛选得到针对 PhoN 的特异性 Nb 序列, 经大肠杆菌表达获得纳米抗体制备沙门氏菌免疫磁珠, 对沙门氏菌的富集效率可达 89%。BAI 等<sup>[32]</sup>以 O 和 H 抗原为靶点, 采用基于表位的生物筛选策略分离出针对肠炎沙门氏菌的特异性纳米抗体。同时建立了一种基于 Nb 的免疫磁珠分离技术和酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 结合的方法来检测肠炎沙门氏菌, 该方法的检出限为  $7.3 \times 10^3$  CFU/mL。经 4 h 的预富集, 可在食品样品中检出少于 10 CFU/mL 的肠炎沙门氏菌, 比未经磁珠富集的方法检测灵敏度提高了约 3 倍, 培养时间缩短了 2 h。此方法不仅快速、低成本、操作简单, 还能避免食品基质的干扰。ZHANG 等<sup>[33]</sup>成功构建了基于 KMO@Au 光热复合材料和 Nb9 标记的比色光热双信号免疫层析试纸条 KNb-DITS 用于定量检测食品中的鼠伤寒沙

门氏菌, 比色模式的检出限为  $10^4$  CFU/mL, 光热模式的检出限低至  $10^3$  CFU/mL。该方法成功用于果汁和蜂蜜样品中鼠伤寒沙门氏菌的检测, 回收率良好, 准确性高。该团队随后又报道了噬菌体介导的双纳米抗体夹心化学发光 ELISA (phage-mediated double-nanobody sandwich chemiluminescent enzyme immunoassay, P-CLISA) 对鼠伤寒沙门氏菌的测定<sup>[34]</sup>。首先对 Nb 进行表位定位, 然后分别用可溶性噬菌体展示的纳米抗体作为 Nb-ELISA 和 P-ELISA 的检测抗体。与 Nb-ELISA 相比, P-ELISA 对噬菌体介导的信号放大的敏感性提高了 100 倍。同时采用化学发光反应取代传统的显色反应检测鼠伤寒沙门氏菌, 检出限为  $3.63 \times 10^3$  CFU/mL, 线性范围为  $5.1 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^6$  CFU/mL。P-CLISA 应用于实际样本分析, 能够在孵育 6~8 h 内检测到少于 10 CFU/mL 的鼠伤寒沙门氏菌。HE 等<sup>[35]</sup>在对免疫骆驼纳米抗体库进行生物筛选后, 首次分离出了针对肠炎沙门氏菌的 Nb。用纳米抗体 Nb13 开发了一种夹心 ELISA 方法, 其检出限为  $1.4 \times 10^5$  CFU/mL。该方法在富集 10 h 后可检测出牛奶中 6 CFU/mL 的肠炎沙门氏菌。REN 等<sup>[36]</sup>利用链霉亲和素作为支架定向固定生物素化纳米抗体, 通过噬菌体展示纳米抗体检测沙门氏菌, 应用于各种食品样品中沙门氏菌的检测, 其回收率在 86.9%~106.6% 之间, 可靠精度在 6.3% 以内。GU 等<sup>[37]</sup>通过噬菌体展示技术筛选了 4 株肠炎沙门氏菌特异性纳米抗体, 并进一步与 HRP 融合表达。选择 SE-Nb1 和 SE-Nb9-vHRP 作为配对抗体建立了夹心 ELISA 方法检测肠炎沙门氏菌, 在牛奶中检出限低至  $5 \times 10^4$  CFU/mL。

## 2.2 纳米抗体在金黄色葡萄球菌检测中的应用

金黄色葡萄球菌也是一种常见的食源性致病菌, 污染食物后能产生多种毒素, 可通过直接与宿主相互作用对生物膜造成损害, 导致细胞死亡, 从而威胁人类健康<sup>[38]</sup>。金黄色葡萄球菌肠毒素 B (*Staphylococcal enterotoxin B*, SEB) 是金黄色葡萄球菌引起食物中毒的主要原因之一。由于其出色的特异性, 免疫测定已成为用于快速检测有害细菌和毒素的主要工具。然而对于 SEB, 由于金黄色葡萄球菌蛋白 A (*Staphylococcus aureus* protein A, SpA) 很可能与传统抗体的 Fc 末端结合并导致假阳性, 限制了该方法的实际应用。JI 等<sup>[39]</sup>用 SEB 免疫双峰驼, 获得具有良好亲和力的双峰驼抗 SEB 的配对纳米抗体, 构建纳米抗体文库。使用一种 Nb 作为捕获抗体, 一种具有信号放大特性的噬菌体展示的 Nb 作为检测抗体, 开发了夹心 ELISA 方法。在牛奶、奶粉、奶酪和牛肉基质的加标回收率在 87.66% 至 114.2% 之间。Nbs-ELISA 在金黄色葡萄球菌食物中毒中检测 SEB 时不受 SpA 的影响。郭鹏利等<sup>[40]</sup>通过大肠杆菌原核表达获得抗金黄色葡萄球菌肠毒素 B 的纳米抗体 B7, 以纳米抗体 B7 作为捕获抗体, 以噬菌体展示的抗金黄色葡萄球菌肠毒素 B 纳米抗体 B6 为检测识别元件, 建立夹心

ELISA 方法, 在牛奶、牛肉、西瓜汁等食品基质中进行加标回收试验, 均有良好的准确性和重现性。以纳米抗体作为识别原件, 能有效避免假阳性问题。WU 等<sup>[41]</sup>创新地报道了一种基于纳米抗体的光热侧流免疫法 [nanobodies (Nbs)-armed photothermal lateral flow immunoassay, NLFIA], 其中 Nb 作为“耐受性保护伞”, 大大提高了侧流免疫层析的稳定性。同时, 通过聚多巴胺辅助两步法合成的光热材料金核-花瓣纳米粒子来增强可读信号的灵敏度。该方法成功地应用于食品中金黄色葡萄球菌肠毒素 B 的检测, 具有较高的准确性。HUGHES 等<sup>[42]</sup>开发了 16 个能特异性识别 SEB 的纳米抗体, 应用于牛奶中进行检测时, 检出限低至 190 pg/mL。这些纳米抗体表现出广泛的耐热性和稳定性, 在实际应用中有不错的稳定性和经济性。除了检测食品中金黄色葡萄球菌肠毒素 B, 也有研究直接检测金黄色葡萄球菌。HU 等<sup>[43]</sup>用灭活的金黄色葡萄球菌免疫羊驼, 构建纳米抗体文库, 从中筛选到 4 个靶标特异性纳米抗体。随后, 建立了利用 Nb147 和生物素化-Nb147 分别捕获和检测金黄色葡萄球菌的夹心 ELISA, 其检出限为  $1.4 \times 10^5$  CFU/mL。经过 8 h 的富集, 在浓度为 10 CFU/mL 的人工污染牛奶样品中成功检出金黄色葡萄球菌。

## 2.3 纳米抗体在单核细胞增生李斯特氏菌检测中的应用

单核细胞增生李斯特氏菌是一种革兰氏阳性菌, 广泛存在于自然界中, 该菌在  $4^\circ\text{C}$  的环境中仍可生长繁殖, 是冷藏食品威胁人类健康的主要病原菌之一。感染后可导致李斯特菌病, 主要表现为败血症、脑膜炎和单核细胞增多, 是孕妇流产的主要元凶之一<sup>[44]</sup>。TU 等<sup>[45]</sup>从非免疫羊驼重链抗体可变结构域噬菌体展示抗体文库中分离出两个新的纳米抗体 L5-78 和 L5-79, 并进行了表达、纯化和鉴定。结果表明, 两种纳米抗体均可识别三种血清型 (1/2a、1/2b 和 4b) 的单核细胞增生李斯特氏菌, 这些血清型导致 95% 以上的人类李斯特菌病病例。以纳米抗体 L5-79 为基础, 建立 ELISA 方法检测巴氏奶中的单核细胞增生李斯特菌, 检出限为  $1 \times 10^4$  CFU/mL。此研究表明通过合理的筛选策略可以直接从非免疫文库中分离到特异性纳米抗体, 为纳米抗体的筛选节省了时间和成本。王妍入等<sup>[46]</sup>的发明公开了特异识别单增李斯特氏菌的纳米抗体, 此发明制备的单增李斯特氏菌纳米抗体表达产量高, 生产成本相对较低, 利于后续抗体的工业化生产且制备过程避免了传统抗体制备过程中动物的牺牲。建立的方法检测灵敏度为  $3.55 \times 10^5$  CFU/mL, 可用于即食蔬菜、乳制品等的检测中。

## 2.4 纳米抗体在其他食源性致病菌检测中的应用

纳米抗体还被应用于其他食源性致病菌检测。WANG 等<sup>[47]</sup>以副溶血性弧菌为检测目标, 开发了一个基于硫代噬菌体-Nb 介导的 AuNPs 聚集的一步无标记比色生物传感

器。首先使用免疫骆驼血清构建噬菌体-Nb 文库。通过三轮生物筛选, 获得了针对副溶血性弧菌特有的噬菌体-Nbs。硫化后, 噬菌体表面的巯基诱导了 AuNPs 的聚集, 而与细菌的相互作用于空间位阻而阻止了聚集, 导致溶液颜色和光强谱的变化。这一现象被用于比色生物传感器, 可以在 100 min 内灵敏、快速地测定副溶血性弧菌, 而对其他细菌没有交叉反应。DHEHIBI 等<sup>[48]</sup>报道了一种基于纳米抗体的磁荧光免疫分析法, 用于检测致病性大肠杆菌 F17 阳性菌株。用 F17 菌毛中的 F17A 蛋白免疫骆驼, 并通过噬菌体展示构建纳米抗体文库, 选择了两个 Nb 片段 (Nb1 和 Nb4), Nb1 用于偶联磁珠捕获, Nb4 用于偶联 HRP 检测。结果表明, 生物传感器能够高特异性和灵敏度得识别大肠杆菌 F17, 在 90 min 的检测中检出限为 1.8 CFU/mL。LU 等<sup>[49]</sup>将抗 Stx2 B 亚基纳米抗体 Nb113 和抗 Intimin 纳米抗体 IB10 融合表达, 发现其有良好的针对产志贺毒素大肠杆菌的中和能力, 且在不同温度和冻融保存条件及模拟肠道极端 pH 条件下, 都具有蛋白质稳定性并且维持了较高的产志贺毒素大肠杆菌 C 抗原中和活性, 具有口服和吸入式给药的潜力。ZHANG 等<sup>[50]</sup>首次从免疫噬菌体展示的纳米抗体文库中分离出阪崎肠杆菌特异性 Nbs, 并建立了噬菌体介导的夹心化学发光免疫分析法 (phage-mediated sandwich chemiluminescent immunoassay, Ph-ELCISA), 与噬菌体介导的夹心 ELISA (phage-mediated sandwich enzyme-linked immunoassay, Ph-ELISA) 相比表现出高灵敏度, 检出限提高了 10 倍, 纳米抗体检测用量减少了 200 倍, 与其他病原体均无交叉反应性。该方法能应用于乳制品样品中阪崎肠杆菌的精确检测。

### 3 纳米抗体在诺如病毒检测中的应用

诺如病毒为无包膜单股正链 RNA 病毒, 是一种常见的食源性病毒, 五岁以下儿童是易感人群, 常在学校内暴发, 对儿童造成严重危害<sup>[51]</sup>。诺如病毒通常通过实时荧光 PCR 的方法进行检测, 但研究显示, 诺如病毒不同基因组间的差别在 50% 以上, 而同一基因组的不同基因型间差异高达 40%, 现有检测技术往往只针对一种基因型的诺如病毒, 无法实现一种抗体识别多种基因型, 广谱性不够强。

史蕾等<sup>[52]</sup>的发明展示了一种单链纳米抗体 Nano-NoVVP1, 可以广泛的识别近年来亚洲流行诺如病毒, 且其他病毒无交叉反应, 特异性高, 并可应用在食品检测、水样检测、进出口产品安全监测、环境样本检测等方面。诺如病毒检测的另一个难点在于如何从食品中有效富集病毒。ZHAO 等<sup>[53]</sup>在酿酒酵母上用基因工程的方法展示了两种纳米抗体 Nano-26 和 Nano-85, 其捕获诺如病毒病毒样颗粒的能力分别为 91.3% 和 74.3%。检测菠菜叶中的诺如病毒时具有良好的重现性和高灵敏度, 其检测限较低, 为 0.071 pg/g。该方法提供了一种简单、经济、高效的策略来浓缩和检测复杂的食物基质中的人诺如病毒。此外, 纳米抗体在临床检测诺如病毒中也有应用。DOERFLINGER 等<sup>[54]</sup>开发了一种基于 Nb 的快速横向流动免疫分析法 (nano-immunochromatography, Nano-IC), 用于检测临床标本中的人诺如病毒。Nano-IC 法能检测到两种病毒粒子, 包括目前流行株和一个新的变异株, 检测的灵敏度为 80%, 特异度为 86%。

### 4 纳米抗体在食品中真菌毒素检测中的应用

真菌毒素是食品安全风险的常见因素, 常见的真菌毒素有黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮等。食用真菌毒素污染的食物会导致癌症、免疫缺陷等多种疾病, 危害人类生命健康<sup>[55]</sup>。目前, 已有许多与真菌毒素检测相关的纳米抗体被报道, 这些抗体被广泛应用于真菌毒素检测技术的开发。李志强等<sup>[56]</sup>建立了基于纳米抗体的可再生免疫亲和柱结合高效液相色谱-串联质谱法检测玉米中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>, 检出限为 0.014 μg/L, 定量限为 0.047 μg/L。在 3 个不同加标浓度下, 回收率在 92.0%~104.1%, 变异系数小于 3.9%。SU 等<sup>[57]</sup>开发了一种基于荧光纳米抗体的荧光共振能量转移纳米传感器, 成功应用于谷物中赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA) 的超灵敏快速检测。该纳米传感器的最低检出限为 5 pg/mL, 线性范围为 5~5000 pg/mL, 只需 5 min 即可完成检测。ZHANG 等<sup>[58]</sup>建立了酶级联放大免疫测定法用于检测咖啡中的 OTA, 这一方法检测的半抑制浓度值为 7.65 ng/mL、检出限为 3.38 ng/mL, 实现了对咖啡中 OTA 的高灵敏检测。

纳米抗体在食源性微生物污染检测中的应用研究现状如表 1。

表 1 纳米抗体在食源性微生物污染检测中的应用研究现状  
Table 1 Research status of application of nanobodies in the detection of foodborne microbial contamination

检测项目	检测方法	检出限	检测样本	参考文献
沙门氏菌	免疫磁珠	/	猪肉	[31]
沙门氏菌	免疫磁分离技术结合 ELISA (immunomagnetic separation-ELISA, IMS-ELISA)	7.3×10 <sup>3</sup> CFU/mL	鸡肉、卷心菜、西红柿、苹果汁	[32]
沙门氏菌	比色光热双信号免疫层析试纸条 (KNb-DITS)	10 <sup>4</sup> CFU/mL(比色模式)、10 <sup>3</sup> CFU/mL(光热模式)	果汁、蜂蜜	[33]
沙门氏菌	P-CLISA	3.63×10 <sup>3</sup> CFU/mL	果汁、蜂蜜、牛奶、猪肉	[34]
沙门氏菌	夹心 ELISA	1.4×10 <sup>5</sup> CFU/mL	牛奶	[35]

表 1(续)

检测项目	检测方法	检出限	检测样本	参考文献
沙门氏菌	链霉亲和素桥接夹心 ELISA (streptavidin-bridged sandwich ELISA, SAB-ELISA)	$4.23 \times 10^3 \sim 9.15 \times 10^3$ CFU/mL	牛奶、蜂蜜、生菜、猪肉	[36]
沙门氏菌	夹心 ELISA	$5 \times 10^4$ CFU/mL	牛奶	[37]
SEB	夹心 ELISA	0.3 ng/mL	牛奶、奶粉、奶酪、牛肉	[39]
SEB	夹心 ELISA	9.58 ng/mL	牛肉、牛奶、西瓜汁	[40]
SEB	NLFIA	1.68 ng/mL(比色模式)、 0.58 ng/mL(光热模式)	牛奶、奶粉、猪肉	[41]
SEB	ELISA	190 pg/mL	牛奶	[42]
金黄色葡萄球菌	夹心 ELISA	$1.4 \times 10^5$ CFU/mL	牛奶	[43]
单核细胞增生李斯特氏菌	夹心 ELISA	$1 \times 10^4$ CFU/mL	牛奶	[45]
单核细胞增生李斯特氏菌	夹心 ELISA	$3.55 \times 10^5$ CFU/mL	即食蔬菜、乳制品	[46]
副溶血性弧菌	比色免疫传感器	目视检出限 $10^4$ CFU/mL、 定量检测限 $10^3$ CFU/mL	虾	[47]
阪崎肠杆菌	Ph-ELCISA	$1.04 \times 10^4$ CFU/mL	牛奶	[50]
诺如病毒	间接 ELISA	/	白条肉预制菜	[52]
诺如病毒	夹心 ELISA	0.071 pg/g	菠菜叶	[53]
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	基于纳米抗体的可再生免疫亲和柱结合高效液相色谱-串联质谱法	0.014 μg/L	玉米	[56]
OTA	荧光纳米传感器(FN-nanosens)	5 pg/mL	谷物	[57]
OTA	酶级联放大免疫测定法	3.38 ng/mL	咖啡	[58]

## 5 结束语

食源性微生物污染是危害生命健康的重要因素。传统食源性致病菌检测操作复杂,时间长,难以进行快速检测。纳米抗体具有分子小、水溶性好、亲和力和稳定性高、特异性强、易于表达生产且能进一步修饰等优点,在食品安全快速检测方面具有较好的应用前景。目前纳米抗体在食品安全方面主要应用于农药兽药残留和真菌毒素的检测,在食源性致病菌检测方面的研究相对较少,还处于起步阶段,且主要集中在沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌这几种常见致病菌。值得注意的是诺如病毒也是引起食源性疾病的常见病原体,纳米抗体应用于诺如病毒检测和富集的研究也有所报道。

纳米抗体在食源性致病菌检测中主要是用于 ELISA 检测和制备免疫磁珠富集。ELISA 检测使用的大多数为夹心 ELISA,相较于传统 ELISA,能大大提高检测特异性。研究者们也在传统的 ELISA 基础上开发出了多种新方法:免疫磁分离技术与 ELISA 结合的 IMS-ELISA,该方法用免疫磁珠进行预处理,能提高检测的灵敏度;双纳米抗体夹心化学发光 ELISA (P-CLISA),采用化学发光替代传统的显色反应,使检测信号的敏感度提升 100 倍;基于鲁米诺

化学发光反应的 Ph-ELCISA,表现出高灵敏度,检出限提高了 10 倍,纳米抗体检测用量减少了 200 倍。将 ELISA 与其他技术相结合的方式已经越来越多的应用于免疫检测中,对与提高检测的特异性和灵敏度都有很大的帮助。

虽然纳米抗体在食源性微生物污染检测领域已有一定数量的研究,但目前的研究仍停留在实验室阶段,还没有转化为可以进行现场检测的有效手段,后续的研究应当聚焦于实际应用,充分发挥优势,让食品安全检测越来越快速、便携、准确。此外,若要大规模应用于现场检测还应考虑食品基质的复杂性,改进样品前处理方式以及提高纳米抗体的稳定性来应对室温环境的存放。本文列出了现有研究,以期开发更加高效、准确、便捷的检测方法和为更多种类的食源性微生物污染检测提供参考。

## 参考文献

- [1] 郭姜里,杜娟,李宗双,等. 免疫磁分离技术在食源性致病菌前处理中的应用进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(21): 97-106.  
GUO JL, DU J, LI ZS, et al. Application of immunomagnetic separation technology in pretreatment of foodborne pathogenic bacteria [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(21): 97-106.
- [2] WANG B, WANG H, LU XB, et al. Recent advances in electrochemical biosensors for the detection of foodborne pathogens: Current perspective

- and challenges [J]. *Foods*, 2023, 12(14): 2795.
- [3] 孙献周, 于琪, 张巧. 食品中食源性致病菌污染现状及危害[J]. 河南医学高等专科学校学报, 2021, 33(3): 335–339.  
SUN XZ, YU Q, ZHANG Q, *et al.* The current situation and harm of foodborne pathogenic contamination in food [J]. *J Henan Med Coll*, 2021, 33(3): 335–339.
- [4] 陈婷, 周庆琼, 戚平, 等. 2011—2020年中国食源性疾病流行病学分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(10): 1545–1550.  
CHEN T, ZHOU QQ, QI P, *et al.* Epidemiological analysis of foodborne diseases in China from 2011 to 2020 [J]. *J Hyg Res*, 2023, 35(10): 1545–1550.
- [5] 冯波, 谢文佳, 张晓光, 等. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 食品科技, 2022, 47(11): 290–296.  
FENG B, XIE WJ, ZHANG XG, *et al.* Research progress on rapid detection technology of foodborne pathogens [J]. *Food Sci Technol*, 2022, 47(11): 290–296.
- [6] LIU M, LI L, JIN D, *et al.* Nanobody-A versatile tool for cancer diagnosis and therapeutics [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2021, 13(4): e1697.
- [7] HOEY RJ, EOM H, HORN JR. Structure and development of single domain antibodies as modules for therapeutics and diagnostics [J]. *Exp Biol Med*, 2019, 244(17): 1015939753.
- [8] HAMERS-CASTERMAN C, ATARHOUCHE T, MUYLDERMANS S, *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains [J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 446–448.
- [9] 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]. *Mol Biotechnol*, 2020, 62(1): 43–55.
- [10] RAHBARIZADEH F, AHMADVAND D, SHARIFZADEH Z, *et al.* Nanobody: An old concept and new vehicle for immunotargeting [J]. *Immunol Invest*, 2011, 40(3): 299–338.
- [11] LIU WS, SONG HP, CHEN Q, *et al.* Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies [J]. *Mol Immunol*, 2018, 96: 37–47.
- [12] VINCKE C, LORIS R, SAERENS D, *et al.* General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(5): 3273.
- [13] JOVEVSKA I, MUYLDERMANS S. The therapeutic potential of nanobodies [J]. *Bio Drugs*, 2020, 34(1): 11–26.
- [14] DE-BRUIJN RCG, VELUCHAMY JP, LOUGHEED SM, *et al.* A bispecific nanobody approach to leverage the potent and widely applicable tumor cytolytic capacity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T cells [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 7(1): e1375641.
- [15] NAMBULLI S, XIANG Y, TILSTON-LUNEL NL, *et al.* Inhalable nanobody (PiN-21) prevents and treats SARS-CoV-2 infections in Syrian hamsters at ultra-low doses [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(22): eabh0319.
- [16] SAERENS D, CONRATH K, GOVAERT J, *et al.* Disulfide bond introduction for general stabilization of immunoglobulin heavy-chain variable domains [J]. *J Mol Biol*, 2008, 377(2): 478–488.
- [17] 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]. *Progress Biochem Biophys*, 2022, 49(6): 1004–1017.
- [18] CICCARESE S, BURGER P A, CIANI E, *et al.* The camel adaptive immune receptors repertoire as a singular example of structural and functional genomics [J]. *Front Genet*, 2019, 10: 997.
- [19] LIU YK, HUANG H. Expression of single-domain antibody in different systems [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 539–551.
- [20] SALVADOR JP, VILAPLANA L, MARCO MP. Nanobody: Outstanding features for diagnostic and therapeutic applications [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(9): 1703–1713.
- [21] LWIN TM, HERNOT S, HOLLANDSWORTH H, *et al.* Tumor-specific near-infrared nanobody probe rapidly labels tumors in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer [J]. *Surgery*, 2020, 168(1): 85–91.
- [22] SERGEY E, SEDYKH, VICTOR V, *et al.* Bispecific antibodies: Design, therapy, perspectives [J]. *Drug Design, Dev Therapy*, 2018, 12: 195–208.
- [23] 翟艳芳, 岳锋, 王选年. 纳米抗体技术及其在食品安全检测中的应用[J]. 广东农业科学, 2020, 47(5): 112–118.  
ZHAI YF, YUE F, WANG XN. Nanobody technology and its application in food safety detection [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2020, 47(5): 112–118.
- [24] XU CX, YANG Y, LIU LW, *et al.* Microcystin-LR nanobody screening from an alpaca phage display nanobody library and its expression and application [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 151: 220–227.
- [25] 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.
- [26] BILLEN B, VINCKE C, HANSEN R, *et al.* Cytoplasmic versus periplasmic expression of site-specifically and bioorthogonally functionalized nanobodies using expressed protein ligation [J]. *Protein Expr Purif*, 2017, 133: 25–34.
- [27] BAGHBAN R, GARGARI SLM, RAJABIBAZL M, *et al.* Camelid-derived heavy-chain nanobody against *Clostridium botulinum* neurotoxin E in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2016, 63(2): 200–205.
- [28] BAGHBAN R, FARAJNIA S, GHASEMI Y, *et al.* New developments in pichia pastoris expression system, review and update [J]. *Current Pharmaceut Biotechnol*, 2018, 19(6): 451–467.
- [29] 孙白荷, 吴悦, 赵芮, 等. 不同表达系统的治疗性纳米抗体研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2023, 43(11): 43–55.  
SUN BH, WU Y, ZHAO R, *et al.* Research progress of therapeutic nanobodies with different expression systems [J]. *China Biotechnol*, 2023, 43(11): 43–55.
- [30] MOGHADAM MN, RAHIMI E, SHAKERIAN A, *et al.* Prevalence of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* isolated from poultry meat: Virulence and antimicrobial-resistant genes [J]. *BMC Microbiol*, 2023, 23(1): 168.
- [31] 高杨. 沙门菌 PhoN 蛋白单克隆抗体和纳米抗体的制备及初步应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2022.  
GAO Y. Preparation and application of different types of antibodies against *Salmonella* PhoN protein [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2022.
- [32] BAI MF, WANG YQ, ZHANG C, *et al.* Nanobody-based immunomagnetic separation platform for rapid isolation and detection of *Salmonella enteritidis* in food samples [J]. *Food Chem*, 2023, 424: 136416.
- [33] ZHANG C, WANG YQ, LIU ZL, *et al.* Nanobody-based immunochromatographic biosensor for colorimetric and photothermal dual-mode detection of foodborne pathogens [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2022, 369: 132371.
- [34] ZHANG C, LIU Z, BAI M, *et al.* An ultrasensitive sandwich chemiluminescent enzyme immunoassay based on phage-mediated double-nanobody for detection of *Salmonella typhimurium* in food [J].

- Sens Actuators B Chem, 2022, (2): 352.
- [35] HE YX, REN YR, GUO B, *et al.* Development of a specific nanobody and its application in rapid and selective determination of *Salmonella enteritidis* in milk-ScienceDirect [J]. Food Chem, 2020, 25: 125942.
- [36] REN YR, WEI J, WANG Y, *et al.* Development of a streptavidin-bridged enhanced sandwich ELISA based on self-paired nanobodies for monitoring multiplex *Salmonella* serogroups [J]. Anal Chim Acta, 2022, (1203): 1203.
- [37] GU K, SONG ZX, ZHOU CY, *et al.* Development of nanobody-horseradish peroxidase-based sandwich ELISA to detect *Salmonella enteritidis* in milk and *in vivo* colonization in chicken [J]. J Nanobiotechnol, 2022, 20(1): 1–18.
- [38] SHIMAA E, MOHAMMED Z. Ultrasensitive peptide-based multiplexed electrochemical biosensor for the simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* [J]. Mikrochim Acta, 2020, 187(9): 486.
- [39] JI YW, LI X, LU YL, *et al.* Nanobodies based on a sandwich immunoassay for the detection of *Staphylococcal* enterotoxin B free from interference by protein A [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(21): 5959–5968.
- [40] 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.
- [41] WU HF, LI YH, LI YC, *et al.* The “umbrella of tolerance”: Nanobodies-armed photothermal lateral flow immunoassay for the detection of *staphylococcal* enterotoxin B [J]. Chem Eng J, 2023, 470: 144273.
- [42] HUGHES AC, KIRKLAND M, DU W, *et al.* Development of thermally stable nanobodies for detection and neutralization of *Staphylococcal* enterotoxin B [J]. Toxins, 2023, 15(6): 400.
- [43] HU YZ, SUN Y, GU JX, *et al.* Selection of specific nanobodies to develop an immuno-assay detecting *Staphylococcus aureus* in milk [J]. Food Chem, 2021, 353: 129481.
- [44] BARRETTA C, VERRUCK S, MARAN BM, *et al.* *Listeria monocytogenes* survival in raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillet under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions by culture, qPCR and PMA-qPCR detection methods [J]. LWT, 2019, 107: 132–137.
- [45] TU Z, CHEN Q, LI YP, *et al.* Identification and characterization of species-specific nanobodies for the detection of *Listeria monocytogenes* in milk [J]. Anal Biochem: Int J Anal Preparat Methods, 2016, 493: 1–7.
- [46] 王妍入, 魏娟, 王悦琦, 等. 特异识别单增李斯特菌的纳米抗体, 重组载体, 宿主细胞及其应用, 中国: CN202111407056.5 [P]. 2022-03-01. WANG YR, WEI J, WANG YQ, *et al.* Nanoantibodies that specifically recognize *Listeria monocytogenes*, recombinant vectors, host cells, and their applications, China: CN202111407056.5 [P]. 2022-03-01.
- [47] WANG P, YU GG, WEI J, *et al.* A single thiolated-phage displayed nanobody-based biosensor for label-free detection of foodborne pathogen [J]. J Hazard Mater, 2023, 443(Pt A): 130157.
- [48] Dhehibi A, Allaoui A, Raouafi A, *et al.* Nanobody-based sandwich immunoassay for pathogenic *Escherichia coli* F17 strain detection [J]. Biosensors 2023, 13, 299.
- [49] LU ZK, LIU ZC, LI X, *et al.* Nanobody-based bispecific neutralizer for *Shiga* toxin-producing *E. coli* [J]. ACS Infect Dis, 2022, 8(2): 321–329.
- [50] ZHANG Y, LIAO XR, YU GG, *et al.* Phage-displayed nanobody as a sensitive nanoprobe to enhance chemiluminescent immunoassay for *Cronobacter sakazakii* detection in dairy products [J]. Anal Chem, 2023, 95(36): 13698–13707.
- [51] LI JB, WANG BH, HE XY, *et al.* Epidemiological characteristics of norovirus infection in pediatric patients during the COVID-19 pandemic [J]. J Med Virol, 2023, 95(6): e28874.
- [52] 史蕾, 刘成阳, 逢明祝. 一种诺如病毒纳米抗体及其应用, 中国: 202210563888 [P]. 2022-11-18. SHI L, LIU CY, PANG MZ. A norovirus nanoantibody and its application, China: 202210563888 [P]. 2022-11-18.
- [53] ZHAO X, RAHMAN M, XU ZY, *et al.* Engineered yeast displaying specific norovirus-binding nanobodies for the concentration and detection of human norovirus in food matrix [J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(22): 8665–8672.
- [54] DOERFLINGER SY, TABATABAI J, SCHNITZLER P, *et al.* Development of a nanobody-based lateral flow immunoassay for detection of human norovirus [J]. Msphere, 2016, 1(5): e216–e219.
- [55] HE T, WANG YR, LI PW, *et al.* Nanobody-based enzyme immunoassay for aflatoxin in agro-products with high tolerance to cosolvent methanol [J]. Anal Chem, 2014, 86(17): 8873–80.
- [56] 李志强, 黄雅涓, 张文, 等. 基于纳米抗体的可再生免疫亲和柱结合高效液相色谱-串联质谱法测定玉米中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> [J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(3): 174–182. LI ZQ, HUANG YJ, ZHANG W, *et al.* Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a renewable immunoaffinity column based on nanobodies [J]. J Food Saf Qual, 2024, 15(3): 174–182.
- [57] SU BC, ZHANG Z, SUN ZC, *et al.* Fluonanobody-based nanosensor via fluorescence resonance energy transfer for ultrasensitive detection of ochratoxin A [J]. J Hazard Mater, 2021, 422: 126838.
- [58] ZHANG ZL, SU BC, XU H, *et al.* Enzyme cascade-amplified immunoassay based on the nanobody-alkaline phosphatase fusion and MnO<sub>2</sub> nanosheets for the detection of ochratoxin A in coffee [J]. RSC Adv, 2021, 11(35): 21760–21766.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

## 作者简介



高家昊, 硕士, 主要研究方向为食品微生物检验。

E-mail: 65688520@qq.com



郦娟, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检验。

E-mail: 10555245@qq.com