

DOI: 10.13376/j.cbls/2021051

文章编号: 1004-0374(2021)04-0472-07

纳米抗体的特性及其在免疫检测中的研究进展

赵欣悦¹, 杨晓梅², 孙树阳³, 李海霞¹, 卢小玲^{3*}

(1 广西医科大学, 基础医学院免疫学教研室, 广西纳米抗体国际联合研究中心, 南宁 530021;

2 广西医科大学, 基础医学院生理学教研室, 广西纳米抗体国际联合研究中心, 南宁 530021;

3 广西医科大学附属口腔医学院, 广西纳米抗体国际联合研究中心, 南宁 530021)

摘要: 纳米抗体 (nanobody, Nb) 作为抗体行业的新成员, 近年来在免疫检测领域的发展突飞猛进。Nb具有分子量小、稳定性好、亲和力和特异性高、易于在原核表达系统中高质量生产等特性。应用 Nb 的检测试剂改善了传统依赖单克隆抗体检测试剂存在的运输和保存困难、试剂研发成本高、抗体试剂批间差异大的问题, 并且提高了检测的灵敏度。Nb 在免疫检测中展现出广阔的应用前景。该文重点综述了 Nb 的结构、特性及其在免疫检测中的研究进展, 并对其在免疫检测方面的应用前景进行展望。

关键词: 纳米抗体; 检测工具; 免疫检测

中图分类号: R392.1 文献标志码: A

Characteristics of nanobody and its research advances in immunoassay

ZHAO Xin-Yue¹, YANG Xiao-Mei², SUN Shu-Yang³, LI Hai-Xia¹, LU Xiao-Ling^{3*}

(1 International Nanobody Research Center of Guangxi, Department of Immunology, Basic Medical College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2 International Nanobody Research Center of Guangxi, Department of Physiology, Basic Medical College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3 International Nanobody Research Center of Guangxi, Department of Stomatology, Stomatology College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: As a new member of antibody industry, nanobodies have been rapidly developing in the field of immunoassay in the recent years. Nanobodies have valuable properties such as small molecular weight, high stability, high affinity and specificity, and high-quality production by prokaryotic expression system, etc. The application of nanobody reagents have improved the issues of traditional monoclonal antibody-based detection reagents, such as difficulties of reagent transportation and storage, higher costs of research and development, or larger differences among product batches, and also increased the detection sensitivity. Therefore, nanobodies have shown a wide application prospect in immunoassay. This article reviews the structure, characteristics and the recent research progress in immunoassay of nanobody, and envisages a prospect for the future of nanobody-based immunoassay.

Key words: nanobody; detection tools; immunoassay

1975年, Köhler和Milstein创建了杂交瘤技术, 开启了单克隆抗体的新时代^[1]。单克隆抗体尽管被广泛应用于各种疾病的诊断和治疗中, 但在实际应用中仍存在着一些不足, 包括成本高昂、工艺复杂, 以及通过免疫原诱发实验动物腹水生产抗体所致的动物伦理问题等。基因工程技术可无需动物即可获得高稳定性、高特异性和低免疫原性的重组抗体^[2],

但基因工程技术生产的抗体依然存在蛋白片段折叠不正确、生产成本高等不足^[3]。因此, 开发分子量小、

收稿日期: 2020-12-14; 修回日期: 2021-01-01

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFE0117300); 广西科技基地和人才专项(桂科AD20238062)

*通信作者: E-mail: luxiaoling@gxmu.edu.cn, Tel: 0771-2387518

稳定性好、易量产的新型抗体成为目前的主要研究热点之一。

1993年, Hamers-Casterman 等^[4]在骆驼体内发现天然轻链缺失的仅含重链的抗体 (heavy chain only antibody, HcAbs), HcAbs 仅由两条重链组成, 其中具有抗原结合能力的单个可变域称为纳米抗体 (nanobody, Nb)。Nb 是目前可获得的具有稳定抗原结合性的最小抗体单位。Nb 具有相对分子质量小、组织穿透性强、稳定性高、易于生产、生产成本低等优点^[5]; 也易于在其特殊位点与放射性核素、光敏剂等物质进行偶联^[6]。Nb 凭借这些优势在免疫检测方面崭露头角, 本文将首先介绍 Nb 的结构和特性, 然后详细阐述 Nb 近年来在免疫检测中的研究进展, 最后对 Nb 的未来发展前景进行展望。

1 纳米抗体的结构

Nb 体积小, 一般呈椭圆形, 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)^[7], 如图 1 和图 2 所示。传统单克隆抗体是由两条重链 (heavy chain, H) 和两条轻链 (light chain, L) 组成的, 其重链可变区 (variable region of heavy chain, VH) 共含有 6 个 CDRs (图 3); 而 Nb 的重链可变区 (variable domain of heavy chain of heavy chain antibody, VHH) 只有 3 个 CDRs, 且 CDR3 形成的凸形结构有利于 Nb 与抗原更好的结合。因此, Nb 具备高特异性结合抗原的能力和高中亲和力。

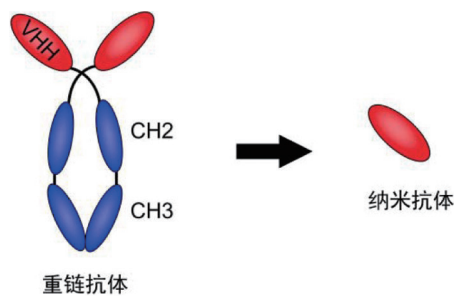


图1 骆驼血液中的重链抗体(左)和纳米抗体(右)结构示意图

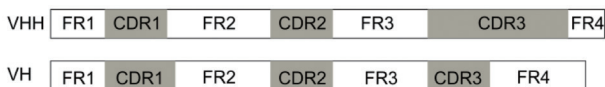


图2 VHH和VH结构示意图

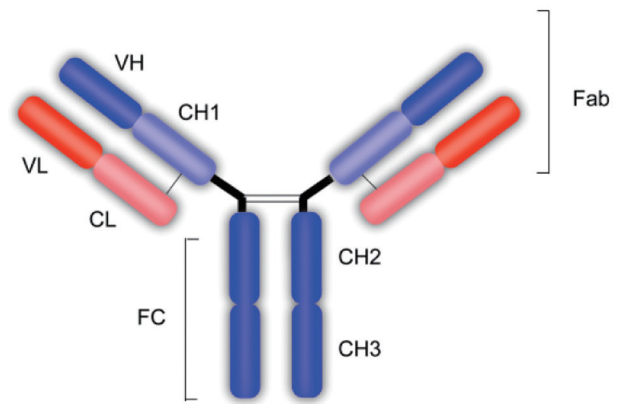


图3 传统单克隆抗体结构示意图

2 纳米抗体的特性

Nb 相对分子质量约 15 kDa, 外形上呈椭圆形, 较小的分子量和体积使得其具有较强的组织穿透能力^[7]。Nb 的稳定性好, 可以在 37℃ 保存一周, 在 -80℃ 长期保存, 甚至可以抵抗 90℃ 的高温、高压和极端的 pH 环境^[7-8]。简单的分子结构使得 Nb 更易于在酵母菌、大肠杆菌等微生物表达系统中大量表达, 并可以进行工业化大规模生产^[9]。Nb 无 Fc 段, 编码 VHH 的序列信息与人类 VH 家族 3 和 4 高度同源^[9-10], 还可以进行人源化, 故其免疫原性较低^[11]。Nb 部分疏水性氨基酸被亲水性氨基酸取代, 提高了 Nb 的溶解性^[12]。除此之外, Nb 的 CDR1 和 CDR3 比传统单克隆抗体 VH 稍长, 能够深入抗原的内部, 与传统的单克隆抗体较平或凹陷的抗原结合结构区域相比^[13], Nb 能更好地与抗原结合。目前, 大多数商业检测试剂盒依赖单克隆抗体作为检测抗体, 但由于试剂盒在反复使用过程中环境温度条件和理化性质的变换易使单克隆抗体的活性降低, 影响了试剂盒的检测效果和稳定性。Nb 基于上述诸多优良特性, 能有效地克服单克隆抗体为检测抗体的检测试剂盒的一些不足和缺陷; 并且作为一种新型的小型化抗体, Nb 能够在固相载体表面形成更高的结合密度, 可以实现对微量小分子抗原的检测, 在免疫检测应用方面显示出巨大的发展空间和潜力。

3 纳米抗体在免疫检测中的应用

近年来, Nb 在酶联免疫吸附检测、荧光免疫吸附检测、化学发光酶免疫分析检测、电化学发光免疫分析、时间分辨荧光免疫层析检测、胶体金免疫层析、免疫组化以及免疫 PCR 等免疫检测技术中得到了研发和应用。

3.1 纳米抗体在酶联免疫吸附检测技术中的应用

酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是一种简单、快速、高通量的检测技术, 在实验室研究以及临床疾病的辅助诊断中具有重要的价值。目前研发的 ELISA 试剂盒中的检测抗体主要采用单克隆抗体, 但单克隆抗体存在生产时间长、抗体纯化与标记操作困难、价格昂贵等不足, 导致了商业化 ELISA 试剂盒的研发周期长和研发成本高。相比较而言, Nb 具有体积小、生产成本低、产量高且易于在原核表达系统中表达等优势, 被广泛应用于 ELISA。比如, 有研究利用含有 $6 \times \text{His}$ 或 HA 标签蛋白的 Nb 作为检测抗体, Nb 的标签蛋白可以与相对应的酶标抗体结合, 加入底物后, 通过酶催化底物显色来对微量抗原以及小分子物质进行检测, 其检测的灵敏度与传统的 ELISA 检测结果相当^[14-16]。

为了进一步提高检测的灵敏度, Sun 等^[17] 开发了一种基于 Nb 和生物素链霉亲和素的 ELISA 检测法。生物素与链霉亲和素的结合是目前已知的最强的非共价相互作用之一^[18]。1 个生物素能结合 4 个链霉亲和素, 且亲合力高、结合牢固, 能够实现多级放大效应使检测更加灵敏。生物素链霉亲和素复合物也可以抵抗有机溶剂、蛋白水解酶、极端温度和 pH 等恶劣环境条件。利用基于 Nb 和生物素链霉亲和素的 ELISA 检测法检测谷物中的赭曲霉毒

素 A, 其检出限可达 0.011 ng/mL 。此外, Zhu 等^[19] 将 Nb 作为包被抗体对抗原进行双夹心 ELISA 检测, 通过链霉亲和素将生物素化的 Nb 包覆在酶联免疫吸附板上对 H5N1 抗原进行定向捕获, 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 偶联 Nb 用作检测抗体。相比传统的 ELISA 试剂盒, 这种检测方法成本更低且灵敏度更高。随后, 有研究用相似的检测模式实现了对人可溶性过氧化物水解酶、黄曲霉毒素、苏云金芽孢杆菌 Cry1B 毒素等物质的灵敏检测, 为这些抗原的检测提供新的策略^[20-22]。

尽管基于生物素与链霉亲和素标记 Nb 的 ELISA 方法改善了检测的成本、灵敏度等问题, 但其在抗体纯化和酶标记等方面仍有待改善。Nb 融合蛋白具有酶标记抗体操作简单、对酶标签的效果影响小、可以大量表达、纯化成本低、节省 ELISA 检测中酶标记二抗孵育时间等优势。HRP 是 ELISA 试剂盒中常用的标记酶, 因此, Sheng 等^[23] 首次将 Nb-HRP 融合蛋白作为检测探针, 建立了更灵敏、快速的竞争 ELISA 检测方法检测鸡血清中抗新城疫病毒抗体。除此之外, 还有报道用 Nb 与 AviTag 融合作为检测探针用于谷物中的赭曲霉毒素 A 的快速检测^[24]。Avi-tag 是由 15 个氨基酸残基组成的短肽标签, 可以使蛋白质生物素化。Avi-tag 和 Nb 融合蛋白的方法标记的专一性高, 对蛋白空间结构的影响

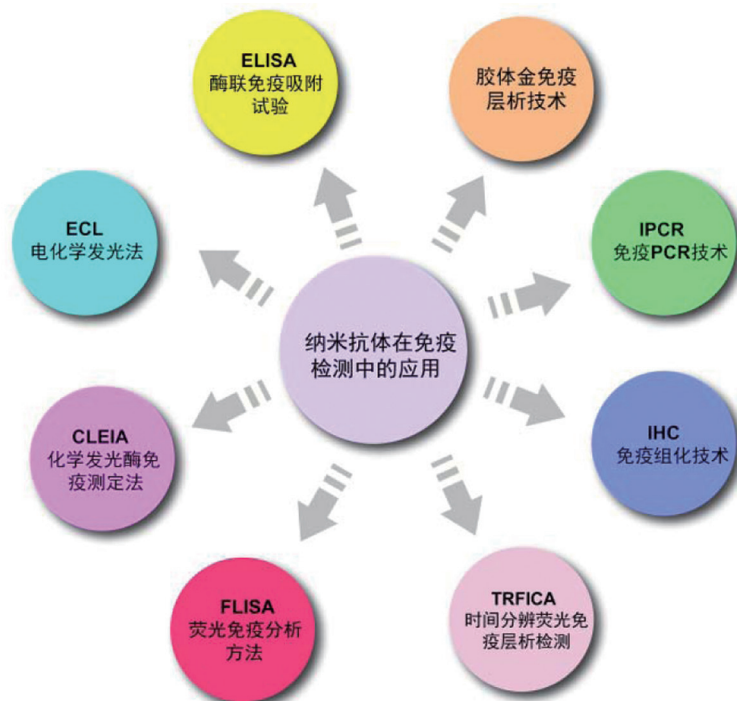


图4 纳米抗体在免疫检测中的应用

小。由此可见, 利用 Nb 的 ELISA 检测工具, 在农业毒素检测、环境分析以及病毒检测等领域具有广阔应用前景和利用价值。

3.2 纳米抗体在荧光免疫吸附检测技术中的应用

荧光免疫吸附检测技术 (fluorescence-linked immunosorbent assay, FLISA) 是通过荧光信号来检测物质, 目前常用的方法是构建碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 与 Nb 融合蛋白作为检测探针^[25-28]。与 AP 相比, 生物荧光酶不易淬灭且检测灵敏度较高, 在免疫检测方面更具优势。Li 等^[29] 将 Nb 与生物荧光酶融合, 并在 Nb 和生物荧光酶中间插入一个 C4 结合蛋白 (C4b-binding protein, C4BP) 形成 nanobody/C4BP/Nluc 七聚体来进一步提高检测的灵敏度, 从而实现了微量四溴双酚 A 的一步超灵敏生物荧光酶免疫测定。该检测方法弥补了以往样品稀释处理造成的灵敏度降低的缺陷, 相比传统两步检测法, 这种新型一步式生物荧光酶免疫测定灵敏度提高了约 20 倍。除了融合生物荧光酶, Nb 还可与荧光素酶融合来放大检测信号^[30-31]。Eom 等^[31] 利用融合荧光素酶与抗鼠 IgG1 Nb 基因构建了信号放大器, 这种信号放大器用 Nb 替代了传统单克隆抗体, 可以在原核表达系统中大量表达, 通过简单的一步纯化即可获得, 显著降低了检测试剂的生产时间和成本, 且信号放大能力增强。随着更灵敏的荧光标记物的出现以及 Nb 融合蛋白制备技术的成熟, 以 Nb 为基础的 FLISA 技术有望成为未来微量分子免疫检测的理想工具。

3.3 纳米抗体在化学发光酶免疫分析检测技术中的应用

化学发光酶免疫分析 (chemiluminescence enzyme immunoassay, CLEIA) 是将高特异性的免疫反应与高灵敏度的化学发光技术相结合来进行物质检测分析的技术。CLEIA 被广泛应用于临床常规分析以及临床和生物医学研究中^[32-33]。Lin 等^[34] 利用 Nb 和 AP 构建了热稳定性高的融合蛋白, 利用这种融合蛋白建立的 CLEIA 法可检测血清样本中人癌胚抗原相关的细胞黏附分子 5, 检测线性范围宽为 0.31~640 ng/mL, 检测灵敏度高, 为人癌胚抗原相关的细胞黏附分子 5 的检测提供了新方法。Sun 等^[35] 同样采用构建融合蛋白的方法, 实现了对葡萄球菌肠毒素 B 快速、灵敏的检测。

3.4 纳米抗体在电化学发光免疫分析技术中的应用

电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 主要是化学发光与电学发光相互作用的结果, 对化学

发光物质施加一定的电压, 通过电压与某种发光因子相互碰撞而产生的一种光化学现象。ECL 具有毒性低、检测仪器简单、检测灵敏度高、稳定性好、可以多电极同时测定一份样品中不同的分析物等优势^[36-37]。常见的 ECL 传感器包括联吡啶钉电化学发光免疫传感器、鲁米诺电化学发光免疫传感器、半导体纳米材料电化学发光免疫传感器等。近年来, 有研究人员尝试建立基于 Nb 的 ECL 检测方法。Oloketuyi 等^[37] 在玻碳电极上沉积金纳米粒子, 在 L-半胱氨酸以及 EDC/NHS 的修饰下, 通过 SpyTag-SpyCatcher 共价标签系统在修饰电极表面共价固定 Nb 来设计的一种针对有毒微藻进行检测的电化学免疫传感器。该方法利用了 Nb 在环境分析中体积小、热稳定性以及化学 (pH 值, 溶剂和洗涤剂) 稳定性高等优势, 可适用于任何水源的系统评估, 无需进行初步样品处理, 检测结果稳定可靠。El-Moghazy 等^[38] 也将 Nb 与 ECL 技术相结合, 通过将纳米纤维材料、Nb 和电化学检测技术整合, 建立了一种新型的超灵敏的基于 Nb 的电化学免疫分析法用于快速测定 3- 苯氧基苯甲酸, 该方法检测范围为 0.8~1000 pg/mL, 检测限为 0.64 pg/mL, 对真实样本检测发现该方法可以替代传统的 3- 苯氧基苯甲酸检测法, 并且操作简便、检测成本低、可重复使用、分析快速, 仅 45 min 即可得到检测结果。

3.5 纳米抗体在时间分辨荧光免疫层析检测技术中的应用

时间分辨荧光免疫层析检测 (time-resolved fluorescence immunochromatographic assay, TRFICA) 是一种用于微量物质检测的新技术, 检测灵敏度高^[39]。TRFICA 常采用镧系元素, 如 Eu(III)、Tb(III) 等作为示踪剂, 这些示踪剂具有较长的荧光寿命, 背景干扰低, 可以实现更加灵敏和特异性的检测。但由于镧系化合物荧光强度较低, 通常将镧系元素包裹在聚苯乙烯等材料中以增强其荧光强度^[40-41]。Tang 等^[42] 就利用一种增强荧光的 Eu/Tb (III) 纳米球作为标记并结合来自骆驼体内的独特型 Nb, 首次建立了基于 Nb 的快速、定量, 并可以同时检测玉米制品中的黄曲霉毒素 B1 和玉米烯酮两种毒素的 TRFICA 方法。该方法不仅实现了两种毒素的同时检测, 更重要的是该方法对黄曲霉毒素 B1 和玉米烯酮检测的敏感性分别比基于单克隆抗体的 TRFICA 法高 18.3 倍和 20.3 倍。

3.6 纳米抗体在胶体金免疫层析技术中的应用

胶体金免疫标记技术是 20 世纪 90 年代发展起

来的一种新型体外诊断技术^[43], 该技术利用胶体金作为显色剂, 在层析膜上通过抗原抗体反应对物质进行检测。丁豪杰等^[44]采用双抗体夹心的方法, 用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液标记 Nb, 制备金标垫, 用日本血吸虫可溶性虫卵抗原作为检测线, 羊抗鼠 IgG 作为质控线, 建立胶体金免疫层析试纸, 用于检测日本血吸虫感染。这种基于 Nb 的免疫层析试纸条对可溶性虫卵抗原的最低检测量为 3.4 ng/mL, 对血吸虫患者阳性血清的检出率为 2.27%, 显示出良好的特异性, 为血吸虫病快速诊断奠定了基础, 并有望在临床中实现床边快速检测。

3.7 纳米抗体在免疫组化检测技术中的应用

免疫组化 (immunohistochemistry, IHC) 是用酶或显色剂标记的特异性抗体对组织或细胞中的抗原进行检测的技术。Yamagata 和 Sanes^[45]建立了一种基于 Nb 的敏感的单分子免疫组化检测试剂 RANbodies, 具体方法是将 Nb 基因序列与酶或抗原的报告基因融合, 并附加一个蛋白标签, RANbodies 可用于检测细胞和组织中的抗原。RANbodies 由于融合了 Nb 与检测报告基因, 因此具有检测敏感性高、特异性好、易于生产、便于纯化、成本低、能以 DNA 或基因序列的形式永久储存等优越特性, 这些特性使其不仅能用于免疫组化检测, 还有望用于超分辨率显微镜和电子显微镜检测中。

3.8 纳米抗体在免疫 PCR 技术中的应用

免疫 PCR (immuno-polymerase chain reaction, IPCR) 是在 ELISA 检测基础上建立起来的新方法, 它用 PCR 扩增替代传统 ELISA 的酶催化底物显色过程, 从而实现微量抗原更灵敏的检测。在 IPCR 的发展和应用中, 抗体与 DNA 报告基因的结合是 IPCR 广泛应用的关键。目前已经报道多种方法来制备抗体与 DNA 的偶联物, 如利用生物素-链霉素亲和素系统或利用传统的化学交联剂-半胱氨酸/赖氨酸将抗体与 DNA 报告基因结合, 但通过这些方法产生的抗体与 DNA 偶联物存在偶联物不均匀、抗体亲和力较低, 并且抗体偶联 DNA 的数量难以控制等问题。为了改善这些问题, Lei 等^[46]将噬菌体展示技术与 Nb 应用于 IPCR, 建立了一种以抗独特型 Nb 噬菌体展示为基础的免疫 PCR, 可定量检测谷物中黄曲霉毒素和玉米烯酮, 检测结果与金标准高效液相色谱法的结果一致。Anzai 等^[47]进一步建立了一种新的 IPCR 方法, 利用 cDNA 展示技术结合 Nb 作为一个系统进行检测。与噬菌体展示相比, cDNA 展示技术在文库大小等方面更具优势,

且嘌呤霉素衍生物的偶联机制使得 DNA 总是以 1:1 的比例与 Nb 的 C 端偶联。此外, Nb 和 cDNA 展示文库还在有机溶剂、强酸强碱、高温等恶劣条件下具有高稳定性。

4 结语和展望

Nb 的高表达量、在极端理化条件下的高稳定性、易于基因工程改造等特殊的性质使其近年来成为传统单克隆抗体的有利补充, 在免疫检测中越来越受到重视, 并且也有 Nb 被抗体公司应用于诊断检测产品的开发。在此次新冠肺炎疫情 (COVID-19) 中, 已经有研究团队筛选出针对新冠病毒的 Nb^[48], 基于 Nb 的新冠病毒检测试剂盒也在研发中。基于 Nb 的免疫检测技术可以提高检测的灵敏度以及缩短检测分析时间, 可以实现床边随时检测, 有利于病情分析。此外, Nb 在农业食品中的毒素检测中的应用提高了农产品的质量安全水平。Nb 易于在原核表达系统中大规模生产, 这一特性提供了更加便捷、廉价的免疫检测技术, 降低了检测试剂盒研发成本。未来的研究将在提高亲和力、特异性、稳定性和产量, 降低生产成本等方面对 Nb 进行改进, 促进基于 Nb 免疫检测技术的发展, 使得 Nb 在基础研究、临床和食品等领域的检测中得到更广泛的推广和应用, 提供更灵敏、更廉价的免疫检测。

[参 考 文 献]

- [1] Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, et al. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 325-38
- [2] Sharma S, Byrne H, O'Kennedy RJ. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. *Essays Biochem*, 2016, 60: 9-18
- [3] 周陶然, 詹守斌, 翟飞, 等. 纳米抗体技术及其在疾病诊断和治疗中的应用. *生物化学与生物物理进展*, 2016, 43: 936-45
- [4] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, 363: 446-8
- [5] Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82: 775-97
- [6] Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. *Front Immunol*, 2017, 8: 1603
- [7] Hu Y, Liu C, Muyldermans S. Nanobody-based delivery systems for diagnosis and targeted tumor therapy. *Front Immunol*, 2017, 8: 1442
- [8] Salvador JP, Vilaplana L, Marco MP. Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411: 1703-13

- [9] Lafaye P, Li T. Use of camel single-domain antibodies for the diagnosis and treatment of zoonotic diseases. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2018, 60: 17-22
- [10] Ahmadvand D, Rahbarizadeh F, Vishteh VK. High-expression of monoclonal nanobodies used in the preparation of HRP-conjugated second antibody. *Hybridoma (Larchmt)*, 2008, 27: 269-76
- [11] 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 Biol Chem*, 2009, 284: 3273-84
- [12] Beghein E, Gettemans J. Nanobody technology: a versatile toolkit for microscopic imaging, protein-protein interaction analysis, and protein function exploration. *Front Immunol*, 2017, 8: 771
- [13] Padlan EA. X-ray crystallography of antibodies. *Adv Protein Chem*, 1996, 49: 57-133
- [14] Cui Y, Li D, Morisseau C, et al. Heavy chain single-domain antibodies to detect native human soluble epoxide hydrolase. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 7275-83
- [15] He Y, Ren Y, Guo B, et al. Development of a specific nanobody and its application in rapid and selective determination of *Salmonella enteritidis* in milk. *Food Chem*, 2020, 310: 125942
- [16] Liu X, Tang Z, Duan Z, et al. Nanobody-based enzyme immunoassay for ochratoxin A in cereal with high resistance to matrix interference. *Talanta*, 2017, 164: 154-8
- [17] Sun Z, Wang X, Tang Z, et al. Development of a biotin-streptavidin-amplified nanobody-based ELISA for ochratoxin A in cereal. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 171: 382-8
- [18] Green NM. Avidin. *Adv Protein Chem*, 1975, 29: 85-133
- [19] Zhu M, Gong X, Hu Y, et al. Streptavidin-biotin-based directional double nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1. *J Transl Med*, 2014, 12: 352
- [20] Li D, Morisseau C, McReynolds CB, et al. Development of improved double-nanobody sandwich ELISAs for human soluble epoxide hydrolase detection in peripheral blood mononuclear cells of diabetic patients and the prefrontal cortex of multiple sclerosis patients. *Anal Chem*, 2020, 92: 7334-42
- [21] Wang Y, Li P, Majkova Z, et al. Isolation of alpaca anti-idiotypic heavy-chain single-domain antibody for the aflatoxin immunoassay. *Anal Chem*, 2013, 85: 8298-303
- [22] Zhong W, Li G, Yu X, et al. Sensitive detection of *Bacillus thuringiensis* Cry1B toxin based on camel single-domain antibodies. *Microbiol Open*, 2018, 7: e00581
- [23] Sheng Y, Wang K, Lu Q, et al. Nanobody-horseradish peroxidase fusion protein as an ultrasensitive probe to detect antibodies against Newcastle disease virus in the immunoassay. *J Nanobiotechnology*, 2019, 17: 35
- [24] Sun Z, Lv J, Liu X, et al. Development of a nanobody-AviTag fusion protein and its application in a streptavidin-biotin-amplified enzyme-linked immunosorbent assay for ochratoxin A in cereal. *Anal Chem*, 2018, 90: 10628-34
- [25] Wang J, Majkova Z, Bever CR, et al. One-step immunoassay for tetrabromobisphenol a using a camelid single domain antibody-alkaline phosphatase fusion protein. *Anal Chem*, 2015, 87: 4741-8
- [26] Yang S, Shang Y, Yin S, et al. A phage-displayed single domain antibody fused to alkaline phosphatase for detection of porcine circovirus type 2. *J Virol Methods*, 2015, 213: 84-92
- [27] Sun Z, Wang X, Chen Q, et al. Nanobody-alkaline phosphatase fusion protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for one-step detection of ochratoxin a in rice. *Sensors (Basel)*, 2018, 18: 4044
- [28] Wang K, Liu Z, Ding G, et al. Development of a one-step immunoassay for triazophos using camel single-domain antibody-alkaline phosphatase fusion protein. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411: 1287-95
- [29] Li Z, Wang Y, Vasylijeva N, et al. An ultrasensitive bioluminescent enzyme immunoassay based on nanobody/nanoluciferase heptamer fusion for the detection of tetrabromobisphenol A in sediment. *Anal Chem*, 2020, 92: 10083-90
- [30] Goyard S, Balbino B, Chinthrajah RS, et al. A highly sensitive bioluminescent method for measuring allergen-specific IgE in microliter samples. *Allergy*, 2020, 75: 2952-6
- [31] Eom S, Bae Y, Kim S, et al. Development of recombinant immunoglobulin G-binding luciferase-based signal amplifiers in immunoassays. *Anal Chem*, 2020, 92: 5473-81
- [32] Lin J, Ju H. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20: 1461-70
- [33] Rongen HA, Hoetelmans RM, Bult A, et al. Chemiluminescence and immunoassays. *J Pharm Biomed Anal*, 1994, 12: 433-62
- [34] Lin J, Yu J, Wang H, et al. Development of a highly thermostable immunoassay based on a nanobody-alkaline phosphatase fusion protein for carcinoembryonic antigen detection. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412: 1723-8
- [35] Sun T, Zhao Z, Liu W, et al. Development of sandwich chemiluminescent immunoassay based on an anti-staphylococcal enterotoxin B nanobody-alkaline phosphatase fusion protein for detection of staphylococcal enterotoxin B. *Anal Chim Acta*, 2020, 1108: 28-36
- [36] Felix FS, Angnes L. Electrochemical immunosensors - a powerful tool for analytical applications. *Biosens Bioelectron*, 2018, 102: 470-8
- [37] Oloketuyi S, Mazzega E, Zavašnik J, et al. Electrochemical immunosensor functionalized with nanobodies for the detection of the toxic microalgae *Alexandrium minutum* using glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles. *Biosens Bioelectron*, 2020, 154: 112052
- [38] El-Moghazy AY, Huo J, Amaly N, et al. An innovative nanobody-based electrochemical immunosensor using decorated nylon nanofibers for point-of-care monitoring of human exposure to pyrethroid insecticides. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 6159-68
- [39] Rundström G, Jonsson A, Mårtensson O, et al. Lateral flow immunoassay using Europium (III) chelate

- microparticles and time-resolved fluorescence for eosinophils and neutrophils in whole blood. *Clin Chem*, 2007, 53: 342-8
- [40] Wang QX, Xue SF, Chen ZH, et al. Dual lanthanide-doped complexes: the development of a time-resolved ratiometric fluorescent probe for anthrax biomarker and a paper-based visual sensor. *Biosens Bioelectron*, 2017, 94: 388-93
- [41] Li H, Wang D, Tang X, et al. Time-resolved fluorescence immunochromatography assay (TRFICA) for aflatoxin: aiming at increasing strip method sensitivity. *Front Microbiol*, 2020, 11: 676
- [42] 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. *Anal Chem*, 2017, 89: 11520-8
- [43] Tanaka R, Yuhi T, Nagatani N, et al. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 385: 1414-20
- [44] 丁豪杰, 丁建祖, 孔庆明, 等. 基于日本血吸虫SEA纳米抗体的胶体金免疫层析技术的初步研究. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2017, 024: 205-11
- [45] Yamagata M, Sanes JR. Reporter-nanobody fusions (RANbodies) as versatile, small, sensitive immunohistochemical reagents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 2126-31
- [46] Lei J, Li P, Zhang Q, et al. Anti-idiotypic nanobody-phage based real-time immuno-PCR for detection of hepatocarcinogen aflatoxin in grains and feedstuffs. *Anal Chem*, 2014, 86: 10841-6
- [47] Anzai H, Terai T, Jayathilake C, et al. A novel immuno-PCR method using cDNA display. *Anal Biochem*, 2019, 578: 1-6
- [48] Hanke L, Vidakovics Perez L, Sheward DJ, et al. An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction. *Nat Commun*, 2020, 11: 4420