

基于纳米抗体的免疫分析方法在小分子农药残留检测方面应用进展

仲文慧, 高希宝*

山东大学齐鲁医学院公共卫生学院理化检验学系, 山东 济南

收稿日期: 2026年3月25日; 录用日期: 2026年4月23日; 发布日期: 2026年4月30日

摘要

小分子农药兽药(分子量 <1000 Da)的全球滥用引发严重农兽药残留污染与耐药性增强危机, 残留的农兽药通过食物、环境等途径进入人体对人体有急性慢性的伤害。而传统检测技术受限于灵敏度不足、操作复杂、成本高等问题, 难以满足对农兽药残留检测需求。免疫检测法是实现痕量分析物检测的灵敏和简便的方法。抗体是免疫检测的关键识别元件, 而传统抗体存在生产周期长、操作复杂及在复杂基质中不稳定等问题限制其在免疫检测方法中的应用。本文引入了源自骆驼科VHH结构域的纳米抗体(Nanobodies, Nbs), 其凭借15 kDa超小尺寸、极端环境耐受性及可编程CDR区, 成功替代传统抗体作为免疫检测识别元件。同时, 本文综述了目前筛选并用于建立农兽药残留免疫检测的纳米抗体, 制备该纳米抗体所使用的技术、同时论述通过基因工程技术获取具有更高亲和力的纳米抗体衍生物的策略, 以及基于此优质纳米抗体建立的免疫检测方法检测小分子农兽药残留的进展。

关键词

农药残留, 免疫传感器, 纳米抗体, 基因工程技术

The Application Progress of Immunoassays Based on Nanobodies in the Detection of Small Molecule Pesticide Residues

Wenhui Zhong, Xibao Gao*

Department of Physical and Chemical Inspection, School of Public Health, Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan Shandong

Received: March 25, 2026; accepted: April 23, 2026; published: April 30, 2026

*通讯作者。

文章引用: 仲文慧, 高希宝. 基于纳米抗体的免疫分析方法在小分子农药残留检测方面应用进展[J]. 农业科学, 2026, 16(4): 669-684. DOI: 10.12677/hjas.2026.164084

Abstract

The global abuse of small-molecule pesticides and veterinary drugs (with a molecular weight of less than 1000 Da) has led to a serious crisis of pesticide and veterinary drug residue pollution and increased drug resistance. The residues of pesticides and veterinary drugs enter the human body through food, the environment, etc., causing acute and chronic harm. Traditional detection technologies are limited by insufficient sensitivity, complex operation, and high costs, making it difficult to meet the detection requirements for pesticide and veterinary drug residues. Immuno-detection methods are sensitive and simple methods for trace analysis. Antibodies are the key recognition elements of immuno-detection, and traditional antibodies have problems such as long production cycles, complex operations, and instability in complex matrices, which limit their application in immuno-detection methods. This paper introduces nanobodies (Nanobodies, Nbs) derived from the VHH domain of the camel family. With their 15 kDa ultra-small size, extreme environmental tolerance, and programmable CDR regions, they successfully replace traditional antibodies as recognition elements in immuno-detection. At the same time, this paper reviews the currently screened and used nanobodies for the establishment of pesticide and veterinary drug residue immuno-detection, the technologies used in preparing these nanobodies, and the strategies for obtaining nanobody derivatives with higher affinity through genetic engineering techniques, as well as the progress of immuno-detection methods based on these high-quality nanobodies for the detection of small-molecule pesticide and veterinary drug residues.

Keywords

Pesticide Residues, Immune Sensors, Nanobodies, Genetic Engineering Technology

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

为保证植物的正常生长需要使用农药, 然而其不合理或过度的施用会在环境、食品中造成残留。有机磷类农药化学结构多样且复杂、水溶性高、植物组织渗透能力强, 能长期储存在环境中[1], 引发严重残留污染与耐药性危机, 研究表明残留的小分子农药可通过土壤-水体-食品链蓄积进入人体[2], 对人体的健康造成一系列的影响, 如呼吸系统毒性、神经系统毒性、致癌、致畸等[3]大多数国家和组织已经禁止或限制某些农药在生产工作中使用。但仍存在其非法使用造成食品安全事件发生。因此, 开发小分子农药残留的高效准确监测方法, 对保障人体健康和环境安全至关重要。

传统检测小分子农药残留的方法, 如高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC), 虽具备高灵敏度与高准确性的优势, 但需要昂贵且庞大的仪器设备, 难以在现场快速检测中应用[4]。相比较而言, 免疫分析法采用抗原与抗体特异性结合反应进行检测, 具有特异性好、耗时短、适用于现场快速检测等优点[5], 逐渐成为快速检测小分子农药残留的重要手段。然而, 免疫分析作为一种依赖于抗原与抗体特异性结合的分析技术, 对关键生物识别元件抗体有严格要求。目前大多数免疫分析法以传统的多克隆抗体(pAbs)、单克隆抗体(mAbs)作为识别元件[6], 而多克隆抗体(pAbs)作为免疫分析识别元件易导致非特异性结合, 单克隆抗体(mAbs)的持续生产需要依靠杂交瘤细胞系的传代和体内诱导。这可能导致抗体批次的特异性和亲和力存在显著差异[7], 从而限制免疫分析法的应用与发展。

随着基因工程技术的发展, 纳米抗体(Nbs)凭借其独特的分子特征, 为小分子农药领域的技术革新提供了新的工具。纳米抗体(Nbs)又称可变重链结构(VHH), 是骆驼科动物或鲨鱼体内存在的天然缺失轻链的重链抗体。纳米抗体(Nbs)由三个互补决定区组成(CDRs), 分子量仅为传统抗体的 1/10(约 15 kDa), 是已知的可结合目标抗原的最小单位[8]。与传统抗体相比, 纳米抗体(Nbs)拥有较小的体积和较长的互补决定区(CDRs), 可以精准识别小分子农药与载体蛋白结合而隐藏的抗原表位, 实现对结合态残留的精准捕获[9]。同时, Nbs 结构稳定, 对极端温度、pH 及有机溶剂耐受性强, 使其能够适应不同复杂环境基质。此外, Nbs 与指示蛋白融合推动功能性纳米抗体整合分子的构建, 能有效减少生产成本与时间[10]。Nbs 辅助免疫检测在高通量监测小分子农药残留应用广泛。

尽管现有综述提到抗体辅助免疫检测在小分子农药检测方面应用, 但多聚焦于单一免疫分析方法在不同农药残留检测应用[11]、纳米抗体结构优势与应用进展[12]。对于更具优势纳米抗体在构建农药残留免疫传感器的应用进展论述依然缺乏。本综述旨在填补这一空白, 一方面概述纳米抗体制备过程中用到的技术方法; 另一方面介绍目前利用基因工程技术获取更具优势纳米抗体衍生物的方法; 最后, 概述了纳米抗体辅助免疫检测在小分子农药方面的具体应用进展。为纳米抗体技术在农药残留现场检测提供理论支撑与技术路径。

2. 纳米抗体制备

2.1. 噬菌体展示技术获取纳米抗体

噬菌体展示是指将编码外源肽或蛋白质的 DNA 插入到包被蛋白基因组中, 通过基因工程共同表达以生成融合蛋白展示在噬菌体表面, 通过该技术筛选富集的纳米抗体既保证了亲和力又结合了噬菌体良好的特性。以下通过噬菌体展示技术在纳米抗体文库构建、筛选方面应用进展进行具体阐述。

噬菌体展示纳米抗体文库构建

噬菌体展示技术构建纳米抗体库主要包括免疫库、合成库和天然库三种类型, 其中免疫库是获取纳米抗体最重要的来源[13] (图 1A)。而农兽药均为分子量小于 1000 Da 的有机小分子, 缺少可被 T 细胞识别以引发免疫反应的表位, 难以刺激机体产生抗体[14]。现有研究通过将百草枯半抗原与 BSA 偶联作为抗原, 用此抗原免疫羊驼, 构建 1.6×10^{13} pfu mL⁻¹ 高效噬菌体展示 VHH 文库, 通过筛选获得纳米抗体 Nb2-12 不仅对百草枯抗原有很高的亲和力, 并且结合了噬菌体的坚固性[15]。同时, 有研究通过制备农药呋喃完全抗原 BFNB-KLH 免疫成年骆驼, 构建了一个含有 1.06×10^8 个驼源单克隆纳米抗体的噬菌体展示文库, 经测定文库多样性为 100% [16]。免疫库的核心优势在于“靶向性”, 其构建依赖特定的目标抗原, 因此筛选出的纳米抗体可直接作为识别元件应用于该抗原的免疫检测。同时, 免疫文库也存在明显的缺陷, 库中淘选出的纳米抗体仅对特定的抗原具有亲和力, 并且需要动物免疫实验周期长、成本高, 对小分子物质不友好[17]。

合成库与免疫库和天然库不同, 合成库的构建不需要动物参与, 并且其正在逐渐成为一种有吸引力的替代方案(图 1B)。合成库的多样性主要体现在 CDR 区域, 研究通过分析结构进行框架(FR)选择与互补决定区(CDR3)的设计, 通过噬菌体展示技术增强 Nbs 表达, 构建噬菌体表面展示文库。有研究针对苯氧苯甲酸(PBA)的抗体, 构建纳米抗体(DAB)合成库, 以实现农产品中拟除虫菊酯的检测。首先选择人类 VH 框架, 通过对互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3 进行随机突变, 将合成的序列展示在纤维状噬菌体上最终构建合成库(DAB), 该库包含了 3×10^9 个单克隆纳米抗体[18]。由于合成文库完全由模拟计算设计构建, 存在一定的缺陷。有研究发现, 在文库合成过程中引入过多的氨基酸会导致 CDR 氨基酸之间以及 CDR 和框架 FR 之间相互作用的巨大多样性, 导致某些位置出现不稳定性的氨基酸, 从而导致最终纳米抗体不稳定[17]。

Naive 库, 通常称为天然库, 是指从未经特定抗原免疫的动物或人体中直接获取抗体基因构建的文库(图 1C)。其核心优势在于无需预先免疫即可覆盖广泛的抗原识别能力, 非常适合筛选不同目标物质对应的抗体, 从而进行高通量免疫检测[19]。在天然库中发现的抗体片段主要来自健康供者的外周血单核细胞(PBMC), 从 PBMC 提取 mRNA 或 RNA, 然后进行逆转录以产生 cDNA 模板, 将模板通过 PCR 连接到噬菌体载体上。随后噬菌体载体转移到宿主细胞, 经过扩增来构建噬菌体天然文库[20]。由于缺乏体内免疫亲和力成熟步骤, 只有从库容大、多样性高的文库中筛选时才能获得较高亲和力的纳米抗体, 因此需要处理大量的血液样本来产生较大的文库大小[21]。且获得纳米抗体后要通过建模、分子对接等技术提升其亲和力, 后续操作复杂、对技术要求高。

2.2. 生物筛选策略

2.2.1. 固相生物淘选

生物淘选是从噬菌体展示库中分离、富集高亲和力纳米抗体的过程。它依赖于目标物质与大量噬菌体展示纳米抗体库之间的亲和相互作用[22]。固相生物淘选是一种传统的生物淘选方法, 噬菌体库与目标物的孵育, 不结合或非特异性结合的噬菌体通过洗涤步骤被去除, 通过酸洗脱来释放结合牢固的噬菌体。Zhang 将对硫磷半抗原 H1 与鸡卵清白蛋白(OVA)偶联物包被于板上重复进行了四轮筛选, 在筛选过程中通过优化包被浓度与洗涤液 PBST 的浓度提高筛选的效率, 最终输出噬菌体的滴度从 5×10^5 pfu/mL 增加到 1×10^7 pfu/mL, 显著富集了具有与 H₁-OVA 抗原结合能力的噬菌体单克隆[23]。该淘选方法易导致针对载体蛋白的纳米抗体展示在噬菌体的表面, 干扰特异性纳米抗体的富集。一个有效的策略是从噬菌体库中去除非特异性噬菌体单克隆来提高淘选的效率。利用一种分散颗粒 IMB-BSA, 可以高效地与 BSA 结合的噬菌体相互作用, 耗尽莠去津噬菌体展示文库中的 BSA, 从而分离高特异性纳米抗体。四轮淘选后阳性噬菌体克隆的比例从 25%增加到 78% [24]。固相生物筛选操作简单不需要复杂仪器, 从而被广泛使用。然而, 这种方法可能会遮蔽某些结合位点, 从而导致在洗涤过程中丢失本该结合的关键噬菌体[25]。

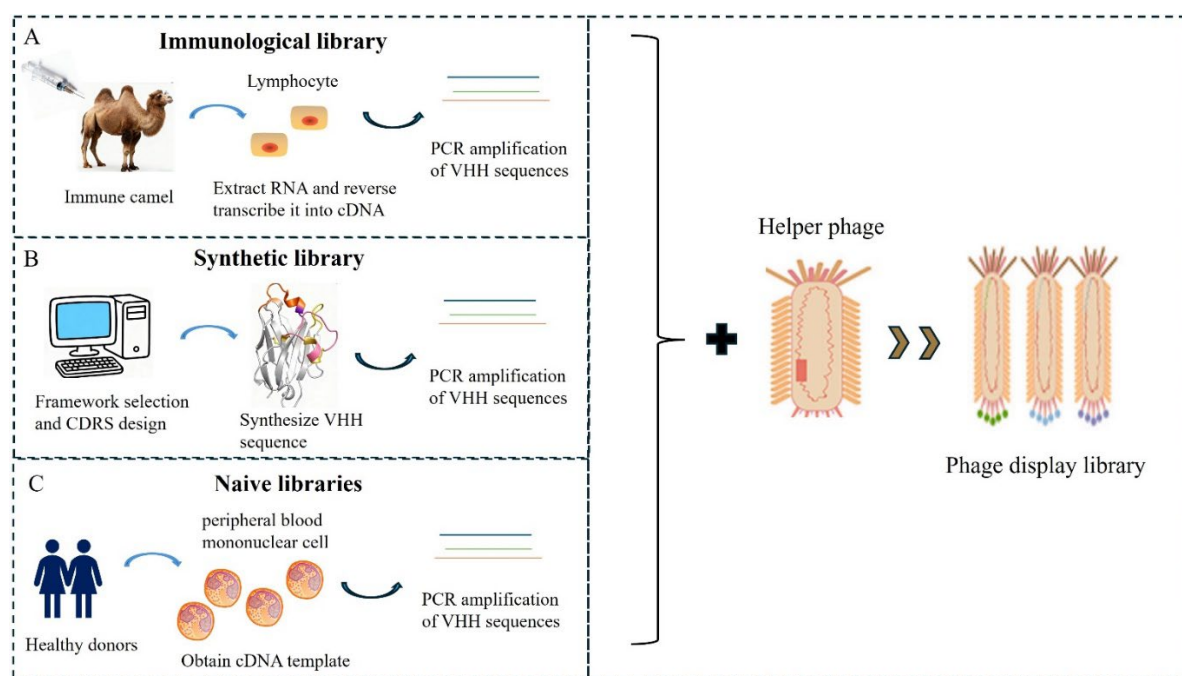
2.2.2. 液相生物筛选

优于固相生物淘选方法的是, 液相生物淘选目标物质不固定, 而是在液相中直接与噬菌体库孵育, 这可以全面暴露目标物质上的结合表位[26]。在这种筛选过程中, 复合物通过与目标物质的亲和标签进行亲和捕获, 例如, 有研究通过将噬菌体纳米抗体展示文库与链霉亲和素磁珠预孵育, 后加入生物素化抗原在文库中直接进行筛选, 经三轮重复筛选后用磁力架收集磁珠, 用酸洗脱结合在磁珠上的噬菌体。分析发现经过三轮筛选噬菌体的富集率达到 14.8 [20]。该方法中噬菌体-靶标复合物使用与生物素靶标特异性结合的链霉亲和素磁珠来捕获, 提升了筛选到的复合物的特异性。另一种常见的液相筛选法是将噬菌体-靶标复合物捕获在涂有链霉亲和素的聚苯乙烯板上, 利用生物素化蛋白质与涂在固相上的抗生物素分子之间的高亲和力相互作用来捕获目标分子。该方法更多用于后续提升纳米抗体灵敏度建立免疫检测方法[27]。液相生物淘选可通过减少目标物质因吸附在固态塑料表面而导致的部分变性, 增强对目标物质结合位点的可及性。但固相上的链霉亲和素可能会引起非特异吸附, 影响最终阳性噬菌体克隆确证的准确性[28]。

2.2.3. 竞争性生物筛选

竞争性生物筛选是通过在筛选体系中引入特异性抗原, 与固定化抗原竞争结合噬菌体表面的纳米抗体, 从而淘汰低亲和力、非特异性结合的噬菌体, 富集高特异的纳米抗体。Zhang 等人通过咪唑完全抗原免疫骆驼制备免疫文库, 将 BFNB-OVA 抗原包被在板上进行一轮固相生物筛选, 第二轮到第四轮筛

选,在噬菌体文库与固定化抗原孵育后,加入游离竞争抗原 BFNB-OVA (浓度逐步降低 1、0.5、0.25 ng/mL),让游离抗原竞争性洗脱结合的噬菌体。通过对第三轮、第四轮噬菌体结合活性分析,80%的噬菌体单克隆与 BFNB-OVA 结合,并且在与抗原的结合活性上存在差异,表明实现了高效筛选 32 [16]。竞争性生物淘选在洗脱过程中不使用酸洗脱,而是用目标抗原洗脱结合的噬菌体。洗脱出的是结合特定目标抗原表位的噬菌体[29]。竞争性生物淘选在获取高亲和力纳米抗体方面有很大优势,但其操作复杂,需优化竞争浓度。纳米抗体作为免疫分析方法捕获分析物的关键识别元件,其亲和力与功能性尤为重要,替代使用简单的 Nbs,经由基因工程改造获取灵敏度和特异性优良的纳米抗体衍生物,进而提升免疫传感器灵敏度。



注: (A) 免疫文库构建 [13]; (B) 合成文库构建[30]; (C) 天然文库构建。

Figure 1. Schematic illustration of the construction of nanobody phage display libraries

图 1. 纳米抗体噬菌体展示文库构建的示意图

3. 基因工程技术改造纳米抗体

3.1. 增加识别位点的纳米抗体多聚化

纳米抗体多聚化是通过基因融合或自组装技术将多个纳米抗体单体连接,形成二聚体、三聚体或更高价态的结构,显著提升纳米抗体与目标物质结合的亲和力与稳定性。目前,制备纳米抗体多聚体主要有三种方法:线性串联多聚方法将多个 Nbs 序列线性排列[31]、将 Nbs 基因融合到具有自组装特性的蛋白域中[32]、化学偶联法利用自组装肽实现 Nbs 多聚[33]。前两种分类采用体内生产,而后者采用体外组装。

线性串联多聚体方法主要通过柔性连接将 2~4 个相同或不同的纳米抗体(VHH)基因首尾串联,构建“VHH-连接子-VH”的融合基因。目前已成功生成二价、三价和四价多聚体结构[34]。但其串联数量有限(通常 ≤ 4 个),并且柔性连接体易导致表达量低或折叠错误。还可以通过抗体结构域介导,使用骆驼纳米抗体片段作为构建模块,将两个纳米抗体片段(Fc)通过天然抗体的结构上铰链连接生成双特异性分子纳

米抗体[35]。但其仅能生成二聚体存在明显局限性。化学偶联法利用化学交联剂或酶将纯化的单价纳米抗体在体外偶联, 形成多聚体。例如, 利用化学和酶将生物素连接在目标生物分子上, 随后与链霉亲和素蛋白相关的分子结合。但连接物容易受到立体障碍和构象畸形的影响, 导致随机取向, 从而损害所显示生物分子的功能[36]。由此, 线性串联法与化学偶联法对于获得纳米抗体多聚体效果不理想具有挑战性。

自组装结构域介导的基因融合法是目前构建纳米抗体多聚体最优选择, 有效避免了串联 Nbs 数量过多带来的空间位阻大的情况。其中, 铁蛋白作为辅助促进 Nbs 多聚化的自组装体系具有显著优势。铁蛋白是一种由 24 个亚基组成的铁储存蛋白铁蛋白, 是球形的, 外径为 12 nm, 内腔直径为 8 nm。该内腔被用作反应腔, 通过在蛋白质外壳内进行生物仿生矿化来合成纳米颗粒显著提升结合亲和力与靶向性[37]。目前, 已经成功开发了一个 Fenobody 的新型平台, 该平台能够以正确的方向展示聚合的纳米抗体, 以最大限度地暴露抗原结合位, 与目前使用的常规纳米抗体进行比较, 抗 H5N1 的多聚纳米抗体抗原结合表现亲和力显著增加约 360 倍[38]。通过与铁蛋白融合产生自组装的 24 价纳米笼状结构亲和力提升 36 倍[39]。至关重要的是, Fenobody 半衰期较常规纳米抗体延长 10 倍且稳定性更高。同时, 铁蛋白的优势使其在大肠杆菌表达系统中产量高, 且在反应体系中过量不造成非特异性的结合[37]。

Lumazine 合成酶(LS)自组装系统是一种与铁蛋白类似的天然蛋白质纳米平台, 由 60 个亚基自组装形成直径约 15.4 nm 的二十面体空心结构, 大小均匀, 具有高度对称性和优异的稳定性[40]。LS 已被用作 Nbs 展示和多体组装的结构框架, 使用 SpyCatcher 修饰的 *Aquifex aeolicus* LS (AaLS) 荧光酶与抗 omicron Nb 融合, 形成相应的抗 omicron 60-mer 多体, 与单体 Nb 相比, 在 90℃ 仍保持良好的热稳定性, 病毒中和实验中, 所有多价纳米抗体的中和能力均优于单价形式, Nb 多体在 0.653 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下对病毒表现出最高的中和能力(IC_{50}), 优于单体 $\text{IC}_{50} = 1.658 \mu\text{g}/\text{mL}$, 表明 LS 自组装系统很好地提升 Nbs 中和效力[41]。铁蛋白结构中含有盐桥, 盐桥的溶剂化(破坏)存在显著的能量障碍, 并且这种障碍的高度随着温度的升高而增加。因此, 较铁蛋白诱导的 Nb 多聚体其热稳定性显著提升, 且 LS 二十面体结构比铁蛋白的球形笼状更易形成高密度的多价展示阵列, 抗原展示效率极高[40]。纳米抗体多聚化不仅提高了 Nbs 多聚体的性能, 并显著提升其作为识别元件应用于免疫检测方法的灵敏度, 通过纳米抗体与铁蛋白融合构建沙门氏菌特异性非体(Fb), 从而产生自组装的 24 价纳米笼状结构(FbNb)。FbNb-ELISA 的检出限为 $3.56 \times 10^4 \text{CFU}/\text{mL}$, 比 Fb 单体-ELISA 低 16 倍, LOD 降低了 12 倍, 大大提升了检测的灵敏度[39]。

3.2. 生物素化纳米抗体用于信号放大

生物素化纳米抗体凭借纳米抗体自身的高特异性及与生物素-链霉亲和素系统的强结合性, 被广泛应用于农药及其代谢物残留检测中信号放大的核心元件, 有效提升检测方法的灵敏度。纳米抗体生物素化主要是通过化学修饰或基因工程融合将生物素分子定向偶联于纳米抗体来实现的, 最后借助生物素与链霉亲和素的超高亲和力结合, 实现信号的多价级联放大。化学修饰法是利用纳米抗体表面游离的氨基与生物素的活性基团发生亲和反应, 实现生物素与纳米抗体的共价偶联, 同时不影响纳米抗体的活性与物理性质[42]。该方法不需要基因改造适用于几乎所有的纳米抗体, 但研究表明, 在生物素与纳米抗体偶联过程中会出现偶联过度导致生物素阻塞了与抗原间的结合位点, 抑制纳米抗体的活性, 从而导致 ELISA 检测方法的半抑制浓度增加, 灵敏度下降[42]。仍有研究通过优化阻断剂浓度、链霉亲和素的浓度和生物素化 DNA (bio-DNA) 的浓度等反应比例, 从而调整生物素与纳米抗体的摩尔比, 减少对纳米抗体亲和力的影响[43]。

为了彻底避免阻塞纳米抗体的抗原结合位点, 可通过基因融合技术避开抗原结合区在纳米抗体的基因序列末端融合一段 Avi 标签(GLNDIFEAQKIEWHE), 在大肠杆菌中表达纯化后, 通过常用的生物素连接酶(BirA)催化[44], Avi 标签中的特定赖氨酸残基与生物素发生位点特异性偶联, 该过程具有高度定向

性可以形成单一特定生物素化位点的纳米抗体[45]。Chen 等人研究发现, 基因融合的 Avi 标签与淘选的性能最佳纳米抗体 VHHjd8 形成天然肽键连接, 仅获得一个生物素纳米抗体 VHHjd8-BT, 该生物素纳米抗体比通过化学修饰获得的生物素化纳米抗体更能耐受高温、pH 与有机溶剂环境[46]。更重要的是, 其批次间重复性好, 建立的间接竞争 ELISA 检测方法更适合实际样品中乐果残留的定量检测[47]。基因融合获得生物素化纳米抗体的方法较化学修饰法有着明显的优势, 但仍面临操作复杂、周期长、成本高等问题, 同时, 部分纳米抗体在融合 Avi 标签后可能出现折叠异常或表达量下降, 不适用于所有纳米抗体。

生物素化纳米抗体作为免疫检测识别元件应用非常广泛且较未作修饰的纳米抗体具有多种优势。典型的应用是在生物传感器中, 其对于特异性和灵敏度要求是非常高的。特异性取决于生物传感器表面固定的生物受体, 而灵敏度取决于固定化过程中的优化[48]。纳米抗体作为生物受体的一种, 由于其良好的选择性和灵敏度从而具有很大的优势[49]。生物素化纳米抗体通过生物素-链霉亲和素系统更好的锚定在生物传感器表面, 增加了有效表面面积, 更好的提升了其特异度[50]。更重要的是, 生物素化纳米抗体的高稳定性, 耐受极端 pH 值、温度和有机溶剂, 从而扩展了免疫检测可以进行的条件, 使其在复杂基质检测中的应用成为可能[47]。

3.3. 纳米抗体融合蛋白作为信号示踪剂

将信号蛋白, 如碱性磷酸酶(ALP)、荧光素酶、辣根过氧化物酶(HRP)等, 通过基因工程技术与纳米抗体融合得到一种重组探针, 通常称为 RANbody, 插入表达载体后在宿主细胞中表达为单一融合蛋白, 保留纳米抗体的抗原结合活性, 同时使纳米抗体带有额外的荧光、生物发光、催化功能。与传统的基于双抗体结合检测的三明治免疫检测不同的是, 纳米抗体融合蛋白操作简单, 节省时间, 且不需要多步洗涤不会造成信号损失[51]。

抗体固定对于在免疫检测中实现目标识别和信号转导是必不可少的, 传统的物理吸附或随机共价偶联方法可能会掩盖抗原结合位点, 从而降低检测的灵敏度[52]。纳米抗体与生物素-链霉亲和素系统结合, 以确保抗体均匀且稳定的附着在功能化表面上, 随后与信号蛋白融合建立免疫检测, 信号放大的同时减少了处理步骤[46]。Gong 等人, 对成对纳米抗体分别进行生物素化结合 Avi 标签, 融合碱性磷酸酶 ALP, 用 Nb6B-Avi 作为捕获抗体, ALP-Nb66 作为检测纳米抗体, 以及链霉抗生物素蛋白作为生物素化纳米抗体的靶向固定支架, 开发了一种配对夹心 ELISA 用于检测赤丹素, 该研究不仅制备了高亲和力、特异性的结合物, 同时, 基于生物素化纳米抗体融合的方法提高了固定效率和免疫检测灵敏度[53]。Zhang 等人, 通过生物素化纳米抗体(Biotin-Nb2-12)作为识别元件, 使用辣根过氧化物酶(HRP)标记链霉亲和素, 构建生物素-多聚辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(polyHRP-SA)识别信号系统, 建立了间接酶联免疫分析方法, 该方法的检出限达 0.58 pg/mL, 半数抑制浓度(IC50)为 14.1 pg/mL, 相比传统间接竞争酶联免疫分析方法(icELISA), 该方法的 IC50 提高了 85 倍, 适用于果蔬中百草枯残留的痕量检测[54]。

信号蛋白与纳米抗体的连接通常通过直接串联融合, 无需设计接头序列纳米抗体基因与信号蛋白基因首尾连接, 该方法操作简单, 但存在接入信号蛋白后遮蔽抗原结合区, 从而导致纳米抗体或报告蛋白失活的情况[23]。为了避免这种情况, 有研究通过在两组分之间插入柔性连接体(GGGGS)₂, 将纳米抗体与纳米荧光素酶(Nluc)介导融合, 减少了空间干扰, 同时很大程度保留两者活性, 将两者融合后加入底物, 反应迅速, 迅速生成了强烈的荧光, 用该融合蛋白建立的生物发光酶联免疫分析法与传统的 ic-ELISA 相比, 显著减少了检测氟丙氧的时间并提高了灵敏度[55]。与纳米抗体单体相比, 基于重组探针的 RANbody 在构建免疫检测方法中有显著的优势: 首先, 这种完全重组的方法消除了对二抗酶标记的要求, 从而简化了探针的生产和分析程序, 增强了批次间的一致性, 同时节约了生产成本[52]。其次, 通过与生物素-

链霉素和素系统连接, 定向固定抗体的同时完全暴露结合位点, 显著提升检测方法的灵敏度, 同时提升了对极端检测环境的耐受力[46]。

4. 基于纳米抗体的农药残留免疫分析方法

利用抗原与抗体特异性识别进行检测的方法称为免疫分析法, 通过结合抗原或抗体上标志物的信号放大, 以实现目标物质的定性和定量测定[56]。近年来, 免疫分析方法因其灵敏度高、重复性好而被广泛应用于农药小分子的检测。以下介绍了目前以纳米抗体作为识别元件, 根据不同的信号输出方式, 构建的检测小分子农药残留的免疫分析方法。

4.1. 基于微孔板的荧光免疫分析

传统免疫分析依赖于比色信号的输出, 这限制了分析的灵敏度[57]。作为一种替代方法, 荧光免疫分析(FIA)是一种有前途且强大的检测工具, FIA 在高特异性免疫学反应的基础上, 结合了荧光技术的灵敏性具有较高的灵敏度[58]。FIA 检测原理是当制备好的荧光探针在发生特异性的免疫反应后, 基于待测物质介导的荧光增强和荧光衰减[59]。常用的荧光物质包括有机染料、量子点、碳点(CDs)、荧光 MOFs, 其中, 碳点(CDs)作为一种新型的荧光纳米材料, 其具有来源广泛、成本效益高、易于合成等优势广泛应用于农兽药残留的 FIA [60]。

荧光猝灭法主要基于目标物对荧光物质的直接猝灭作用或目标物 - 识别元件 - 荧光体系的相互作用构建。Chen 等人, 以柠檬酸和尿素分别作为碳源和氮源, 通过一步水热法合成蓝色发光碳点(bCDs), 使用纳米抗体 - 碱性磷酸酶融合蛋白(VHHjd8-ALP)开发了基于 bCDs 的简单且灵敏的荧光免疫分析(FIA)。VHHjd8-ALP 在一步竞争免疫反应后与微板结合, 加入 bCDs 通过内滤效应导致荧光光谱淬灭, 从而产生荧光响应。该方法利用 bCDs 作为高响应信号探针, 较传统的基于 p-硝基苯基磷酸酯(pNPP)的一步 icELISA 相比不受 OD 值测量策略的限制, 从而表现出 11 倍的灵敏度。回收率测试显示, 用水果和蔬菜样品的回收率在 81.8 到 119% 之间, 这验证了所开发的 FIA 的可行性和准确性[61]。与上述方法相对的是, 也有研究通过增强荧光信号的方式检测分析物质。Luo 等人, 使用红色碳点(r-CDs)作为荧光信号源, 组装上钴氢氧化物纳米片(CoOOHNS), 形成 r-CDs@CoOOHNS 复合物, 通过荧光共振能量转移(FRET)效应淬灭 r-CDs。基于此开发了纳米抗体 - 碱性磷酸酶融合蛋白(Nb-ALP)的 FIA 用于检测芬丙硫磷(FN) [62]。在此研究中, Nb-ALP 中的 ALP 与抗原结合后, 可将 L-抗坏血酸-2-磷酸(AAP)脱磷酸成抗坏血酸(AA), 破坏了复合物间的连接使得 r-CDs 的荧光恢复, 因此该研究通过荧光增强的方式定量检测 FN。这种荧光酶联免疫检测对 FN 具有高灵敏度, 检测限为 0.14 ng mL^{-2+} , 比传统的比色 ELISAs 低 25 倍。同时, 该研究创新性的使用了红色碳点(r-CDs)作为荧光信号源, 排除复杂样品基质中的自发荧光干扰, 提高检测方法的准确性。有研究发现, 采用生物素化的 Nbs 替代纳米抗体融合蛋白作为识别元件, 可以有效的提升荧光免疫检测方法的灵敏度[46]。该研究利用基因工程使性能最佳的 VHH 与生物素连接酶和 Avi 标签融合, 以获得生物素化 VHH。为了进一步提高检测灵敏度, 使用红色碳点(rCDs)作为荧光信号源, 利用链霉素和素多聚过氧化物酶 HRP, 使 rCDs 的荧光信号定量猝灭, 从而对硫双威形成敏感的信号响应。基于此所开发的 FIA 检测限为 0.03 ng/mL , 显示出比传统酶联免疫吸附测定高 15 倍的灵敏度。通过该策略能够实现简便、省时提升检测的灵敏度。

荧光免疫分析较传统免疫分析其灵敏度更高、更适用于农药痕量残留检测[63]。同时为满足快速、简便的现场检测需求, 荧光免疫检测通常与免疫层析、生物传感器等技术融合构建便携式检测工具。在该项研究中将时间分辨荧光免疫分析与免疫层析法结合, 构建超灵敏时间分辨荧光免疫层析检测(TRFICA)条用于实际样品中百草枯残留检测。分子对接结果表明筛选获取的纳米抗体具有高亲和力与稳定性, 基于此开发的 TRFICA 可以识别百草枯, 通过条形码阅读器实现定量分析, 该方法具有高灵敏度(LOD 为

0.0090 ng mL⁻¹, IC₅₀ 为 0.0588 ng mL⁻¹), 且与其他除草剂无交叉反应。更重要的是, 通过在实际样本(蔬菜、水果和谷物产品)中定量检测百草枯残留, 结果显示回收率范围在 76.7%到 133.3%之间, 批内间变异系数低于 18.5%。与传统方法相比, 基于 VHH 的 TRFICA 条检测的准确性、灵敏度、抗复杂基质干扰能力等方面具有优势[15]。

4.2. 基于膜的侧向流免疫分析

侧向流免疫分析(LFIA)的本质是利用“抗原-抗体复合物”与“层析流动”的结合, 抗体作为核心识别元件, 通过标记物(如胶体金、荧光颗粒)实现信号转导与放大或定量, 从而实现对目标物质检测[64]。当目标物质是农药等小分子时, 这些物质只有一个抗原决定簇, 不能同时结合两种抗体, 因此只能采用竞争性 LFIA 对此类物质进行检测[65]。作为 LFIA 的有效组成部分, 检测生物材料需具备高稳定性及与目标物质间的较强亲和力, 纳米抗体因其优于传统抗体的优良特性, 被广泛应用于农药小分子 LFIA 的核心识别元件。

为了提高 LFIA 的检测性能, 研究使用不同类型的标记材料对纳米抗体进行标记, 其中金纳米颗粒(AuNPs)由于其制备简单、稳定性高、易于标记等特点成为 LFIA 常用标签[66]。Zhang 等人, 利用柠檬酸盐还原法制备了直径约为 20 nm 的金纳米颗粒(GNPs), 将其与抗拟除虫菊酯类农药的代谢物 3-苯氧苯甲酸(3-PBA)纳米抗体结合, 基于此构建了检测 3-PBA 的竞争性 GNP-Nb 侧向免疫分析法。由金纳米颗粒聚集引发的颜色变化定量检测样品中存在的 3-PBA。结果显示, 侧流免疫测定法检测 3-PBA 的检测限(LOD)为 0.01 ng/mL⁻¹, 较利用胶体金标记的纳米抗体检测果蔬样品中对硫磷其灵敏度更高、稳定性更强[67], 且 10 min 内即可完成实际样品中 3-PBA 的检测, 较仪器方法更快地进行高通量分析。在此项研究中, 物理吸附是实现纳米抗体偶联金纳米颗粒的最常用方法。然而, 该方法易受 pH 值、盐离子浓度等因素影响难以获得稳定的结合物[6]。受生物素-链霉亲和素系统的强结合作用启发, 有研究通过生物素化纳米抗体与抗生素涂层金纳米颗粒定向结合, 基于此制备的纳米金颗粒-Nb 探针(Au/SA@Bio-Nb), 较传统吸附方法获取的结合物表现出了更高的稳定性和亲和力[68], 该方法为 Nb 探针的设计和制备提供了新思路, 以更好的提高 LFIA 方法的检测性能。先前研究表明, 金纳米颗粒因其优势特征常被用作 LFIA 中的光学纳米材料, 但其也存在由于信号弱导致灵敏度不足的缺点。因此, 优化检测信号获取更稳定信号标签至关重要。其中, 电化学置换法因其操作简便成为创造复合纳米材料的有效方法之一。已有研究通过选择 CuS 纳米花(CuS NFs)作为新的比色标签, 为金纳米颗粒沉积提供了活性位点, 经由电化学置换反应合成 CuS NFs-Au, 成功富集金纳米颗粒实现信号放大, 最终获取高颜色强度、高稳定的纳米抗体结合物, 为建立 LFIA 提供新的生物检测材料[69]。

纳米酶代替生物酶的出现, 使得纳米抗体和纳米酶的结合在侧向流免疫分析中成为一种新的策略, 与传统的抗体-酶结合物相比, 提供了更高的灵敏度、稳定性。Li 等人, 通过整合硅纳米颗粒(SNPs)、聚多巴胺(PDA)和铂纳米颗粒(Pt NPs), 得到了具有强大纳米酶催化活性的 SNPs@PDA@Pt (SPP), 经由聚乙烯亚胺(PEI)进行了表面修饰生成 SNPs@PDA@Pt (PSPP), 这种修饰显著提高了与抗 3-苯氧基苯甲酸纳米抗体(3-PBA Nbs)的偶联效率, 同时, 该纳米复合材料还表现出优异的稳定性, 为该纳米复合材料整合到 LFIA 平台上, 实现环境中 3-PBA 超灵敏检测有很大前景[70]。侧向流免疫分析虽有灵敏度高、稳定性好的优点, 但易受复杂样品基质干扰。例如, NC 膜易被牛奶等杂质堵塞, 导致出现假性结果。有研究以磁性纳米珠(MNBs)作为磁性载体, 磁场富集可以很容易地将目标物与食物基质分离, 降低基质效应[71]。同时, 为满足现场检测农药残留技术需求, 基于横向流动免疫检测氯菊酯的测试条被开发出来, 该检测方法可以在 5 分钟内检测到浓度较低的氯菊酯水平, 检测结果通过智能手机读取, 较传统仪器分析方法此方法更为便携、省时[72]。

4.3. 基于传感界面的免疫分析

免疫传感器通过将生物识别反应在传感器表面引发的物理、化学微观变化, 转化为宏观可量化的信号(电信号、光信号、频率信号等)来实现目标物的快速测定, 该方法通常由于高信号放大而表现出高灵敏度[73]。

4.3.1. 光学免疫传感器

根据输出信号的不同免疫传感器有多种类型, 通过将结合反应引发的折射率变化、荧光强度变化、拉曼强度等转化为光信号, 根据信号强弱变化定量的检测目标物质构建光学免疫传感器。传统 ELISA 是构建免疫传感器的主要方法, 但是, 肉眼对 ELISA 表现出的单色强度变化不敏感[74], 基于此, 开发通过一系列颜色变化反映目标物质浓度的多色光学免疫传感器是更为必要的。目前, 基于贵金属的纳米材料是多色免疫检测较为常用的探针, 主要通过金属纳米材料的蚀刻或生长实现多色信号转换。有研究通过使用一种金纳米材料 - 金纳米双锥(AuNBPs)作为免疫传感器探针, 构建 HCl 还原烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 I(NADH) - 抗坏血酸(AA)介导的 AuNBP 生长系统, 该系统可以精确调节 AuNBPs 的生长速率, 使用抗磺胺类药物(SAs)的抗体作为生物受体, 实现 5 种 SAs 的快速检测, 所开发的免疫传感器具有更多的颜色变化和良好的稳定性[75]。然而贵金属材料面临成本高与制作程序复杂等问题, 迫切需要开发一种更便宜、更简单的多色视觉免疫传感器检测。Chen 等人, 使用抗乐果纳米抗体 - 碱性磷酸酶融合蛋白(VHHjd8-ALP)与苯磷酸二钠盐(ArP)结合产生苯酚, 根据在高碱性条件下(pH = 12), 苯酚能与高锰酸钾发生化学反应引发系列变化, 引入 CdTe 量子点和荧光素作为信号探针开发光学免疫传感器, 检测过程伴随着绿色 - 黄色 - 红色的荧光颜色变化, 最终, 通过测量荧光强度定性分析乐果存在[10]。该比率荧光免疫传感器, 通过将荧光强度转化为可视化的光信号。通过对一系列颜色变化判定目标物质浓度, 不仅具有更高的灵敏度、操作简便的优点, 更重要的是该方法较 ELISA 其反应更快速, 肉眼更好判定颜色变化。有研究基于生物素化纳米抗体, 构建检测水体中微囊藻毒素的比色 - 表面增强拉曼散射(SERS)双模式的免疫传感器, 该模式通过颜色变化和 SERS 强度反映目标物质浓度, 实现双信号检测的同时提高了检测灵敏度, 仅需 30 分钟即可实现残留检测, 这为构建灵敏度更高、更省时、更简便光学免疫传感器, 以实现农药残留检测提供新方法[76]。

4.3.2. 电化学免疫传感器

电化学免疫传感器是将抗体与目标物质结合引发的界面电荷、导电性变化, 转化为可测电信号的检测方法。最为常用的构建方法是将纳米抗体作为识别元件固定在电极表面, 有研究通过将 3-苯氧基苯甲酸(3-PBA)固定在柠檬酸(CA)和纳米抗体 - 碱性磷酸酶融合蛋白(Nb-ALP)修饰的表面, 然后将该膜组合到一个丝网印刷电极(SPE)上, 开发了一种新型高灵敏度电化学竞争免疫传感器。该尼龙纳米纤维膜作为支持基质具有超高的表面积和微孔面积, 能够提高活性位点对目标分析物的可及性[77], 基于此构建的电化学免疫传感器具有更高的灵敏度、选择性和更低的检测限(LOD = 0.64 pg/mL)。该方法结合了纳米抗体高稳定性与传感器快速检测优势, 可实现 45 分钟内检测样品中的目标物质。有研究使用 PVA-共-PE 纳米纤维膜代替尼龙纳米纤维膜, 构建了检测牛奶中氯霉素(CAP)残留的超灵敏的无标签安培免疫传感器, 该纳米纤维膜不需要进行交联处理, 更大的比表面积提供了更好的抗体载体, 从而具有更好的结合目标物质的能力。在最佳条件下, 该免疫传感器对 CAP 检测表现出很高的灵敏度, LOD 为 0.0047 ng/ml [78]。为了进一步提高电化学免疫传感器的灵敏度, 在以上方法的基础上采用酶标记纳米抗体的方法实现信号放大[79], 该研究采用辣根过氧化物酶(HRP)标记抗敌敌磷纳米抗体(VHH9)代替纳米抗体融合蛋白, 基于此建立了交联聚乙烯醇/柠檬酸纳米纤维膜(PVA/CANFM)和 VHH₉-HRP 的高灵敏电化学免疫传感器。交联的 PVA/CANFM 具有超高比表面积, 更好的实现生物分子的固定, 得益于酶标记实现信号放大, 所建

立的免疫传感器对敌敌畏表现出高灵敏度和特异性, 线性范围与检测线分别为 0.01 - 100 ng/mL 和 2.26 pg/mL。同时, 该方法有良好的储存稳定性(在 9 周的储存后保持 85%的活性), 适用于污染食品检测。也有研究通过构建偶联酶与纳米材料实现双信号放大[80], 本研究采用聚吡咯薄膜-Au 纳米簇矩阵作为传感器平台, 金纳米棒表面携带 HRP 偶联纳米抗体与作为电化学检测标签, 用于检测食品中残留的氧氟沙星(OFL)。该基于竞争免疫分析所制造的免疫传感器在 0.08 到 410 ng/mL 的范围内对 OFL 表现出敏感的反应, 检测限为 0.03 ng/mL, 同时, 该电化学免疫传感器具有良好的特异性、高稳定性和重复性。有研究使用磁珠(MBs)表面携带多克隆抗体建立农兽药残留检测免疫传感器的方法提升检测的灵敏度, 为纳米抗体作为识别元件构建更加灵敏、稳定的免疫传感器提供思路[81]。

5. 结论

作为免疫分析中的生物识别元件, 纳米抗体(Nbs)相较于传统抗体具有不可替代的优势, 纳米抗体凭借其分子量小、组织穿透性强、免疫原性低、易表达纯化且能识别传统抗体难以结合的抗原表位等独特优势, 有效克服了传统免疫分析中存在的检测灵敏度不足、检测时间过长、抗体制备复杂且成本高、在极端环境下稳定性差等局限性, 显著提升了免疫分析技术的检测性能、适用范围与实际应用价值, 为食品安全检测、临床诊断、环境监测等多个领域的精准检测提供了新的技术路径与解决方案。

尽管纳米抗体在免疫分析中展现出显著优势, 但结合本文正文研究及相关领域报道, 其发展仍面临诸多核心挑战: 部分纳米抗体针对目标抗原的亲和力不足, 难以满足低浓度目标物的精准检测需求; 纳米抗体在体外储存及应用过程中易发生多聚化, 导致其活性降低、稳定性下降, 影响检测结果的重复性; 此外, 纳米抗体的特异性优化及规模化低成本制备技术仍有待完善。针对以上挑战, 未来研究可聚焦以下具体方向: 一是将人工智能(AI)/机器学习技术引入纳米抗体的理性设计与亲和力优化中, 通过构建抗原-抗体相互作用模型, 精准预测纳米抗体的氨基酸序列与抗原结合能力, 定向改造纳米抗体的可变区, 从而高效提升其亲和力与特异性, 缩短研发周期; 二是深入研究纳米抗体多聚化的分子机制, 通过化学修饰、融合表达等技术手段, 调控纳米抗体的空间构象, 增强其体外稳定性与储存期; 三是优化纳米抗体的原核或真核表达系统, 探索低成本、高产量的规模化制备工艺, 推动纳米抗体的产业化应用。

尽管纳米抗体已被广泛应用于农药残留的快速现场检测方法开发, 但当前的研究仍主要集中在诊断应用方面。很少有研究探索将纳米抗体用作构建环境解毒和调控策略的平台。通过应用基因工程技术开发具有改进特性的纳米抗体, 未来有望取代传统的物理化学吸附方法, 用于去除环境中的有毒有害污染物残留。这种方法对于实现环境污染物的综合检测、解毒和调控具有重要的应用前景, 其实现原理主要基于纳米抗体对环境中有毒有害物质(如重金属离子、持久性有机污染物等)的高特异性识别能力, 通过将纳米抗体与解毒载体(如纳米颗粒、酶制剂等)结合, 构建靶向解毒体系, 可实现对环境中有毒物质的精准捕获、降解或转化, 降低其环境危害。该方向具有广阔的应用潜力, 不仅能弥补传统环境解毒技术针对性弱、二次污染风险高的不足, 还能与环境监测技术联动, 形成“检测-解毒”一体化解决方案, 未来可进一步开展纳米抗体靶向解毒体系的构建与体外、体内实验验证, 探索其在实际环境治理中的应用可行性。总体而言, 纳米抗体为免疫分析技术的革新与环境治理等领域的发展提供了新的突破口, 随着相关技术的不断完善与创新, 尤其是 AI 技术与纳米抗体研发的深度融合, 有望逐步解决当前面临的核心挑战, 推动纳米抗体在更多交叉领域实现更广泛、更深入的应用, 为相关领域的发展注入新的动力。

参考文献

- [1] Colopi, A., Guida, E., Cacciotti, S., Fuda, S., Lampitto, M., Onorato, A., *et al.* (2024) Dietary Exposure to Pesticide and

- Veterinary Drug Residues and Their Effects on Human Fertility and Embryo Development: A Global Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**, Article 9116. <https://doi.org/10.3390/ijms25169116>
- [2] Fu, H., Tan, P., Wang, R., Li, S., Liu, H., Yang, Y., *et al.* (2022) Advances in Organophosphorus Pesticides Pollution: Current Status and Challenges in Ecotoxicological, Sustainable Agriculture, and Degradation Strategies. *Journal of Hazardous Materials*, **424**, Article 127494. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127494>
- [3] Oirdi, M.E., Yaseen, M., Farwa, U., Raza, M.A., Farhan, M., Sandhu, Z.A., *et al.* (2024) Crops and People: The Dangers and Potential Benefits of Pesticides. *Cogent Food & Agriculture*, **10**, Article 2334096. <https://doi.org/10.1080/23311932.2024.2334096>
- [4] Huang, J., Lei, J.C., Zhao, S.X. and Li, Y. (2022) A Fast Detection Method for Pesticide Residues by Spectrometry Technique. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, **44**, 530-530. <https://doi.org/10.52568/001189/jcsp/44.06.2022>
- [5] Khan, N.S., Pradhan, D., Choudhary, S., Saxena, P., Poddar, N.K. and Jain, A.K. (2021) Immunoassay-Based Approaches for Development of Screening of Chlorpyrifos. *Journal of Analytical Science and Technology*, **12**, Article No. 32. <https://doi.org/10.1186/s40543-021-00282-6>
- [6] Guo, M., Pang, J., Wang, Y., Bi, C., Xu, Z., Shen, Y., *et al.* (2024) Nanobodies-Based Colloidal Gold Immunochromatographic Assay for Specific Detection of Parathion. *Analytica Chimica Acta*, **1310**, Article 342717. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.342717>
- [7] Zhao, J., Li, P., Abd El-Aty, A.M., Xu, L., Lei, X., Gao, S., *et al.* (2024) A Novel Sustainable Immunoassay for Sensitive Detection of Atrazine Based on the Anti-Idiotypic Nanobody and Recombinant Full-Length Antibody. *Chemical Engineering Journal*, **491**, Article 152039. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.152039>
- [8] Salvador, J.P., Vilaplana, L. and Marco, M.P. (2019) Nanobody: Outstanding Features for Diagnostic and Therapeutic Applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **411**, 1703-1713. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01633-4>
- [9] Pillay, T.S. and Muyldermans, S. (2021) Application of Single-Domain Antibodies (“Nanobodies”) to Laboratory Diagnosis. *Annals of Laboratory Medicine*, **41**, 549-558. <https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.6.549>
- [10] Chen, Z.J., Huang, A.J., Luo, L., Xu, Z.L. and Wang, H. (2024) Simple Dual-Readout Immunosensor Based on Phosphate-Triggered and Potassium Permanganate for Visual Detection of Fenitrothion. *Biosensors and Bioelectronics*, **246**, Article 115872. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115872>
- [11] He, Z., Shi, Y. and Liu, X. (2024) Application Research Progress of Nanobodies in the Detection of Biotoxins and Pesticide Residues. *Journal of Food Safety and Quality*, **15**, 122-131.
- [12] Hu, X., Cao, Y., LV, L., Liu, Z., Huang, F., Wu, Z. and Xiao, Z. (2023) Nanobodies and Their Research Status in Veterinary Field. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, **54**, 3164-3172.
- [13] Liu, M., Xi, L., Wang, Z., Wang, Y., Gao, X., Wei, H., *et al.* (2025) Recent Advances in M13 Phage Display: Novel Strategies of Construction and Biopanning Recognition Elements for Food Safety Detection. *Biosensors and Bioelectronics*, **289**, Article 117880. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2025.117880>
- [14] Song, J., Wang, R., Wang, Y., Tang, Y. and Deng, A. (2010) Design, Modification and Preparation of Artificial Antigens. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **38**, 1211-1218. [https://doi.org/10.1016/s1872-2040\(09\)60063-3](https://doi.org/10.1016/s1872-2040(09)60063-3)
- [15] Zhang, Y., Li, L., Wang, Y., Wang, H., Xu, Z., Tian, Y., *et al.* (2022) Ultrasensitive and Rapid Colorimetric Detection of Paraquat via a High Specific VHH Nanobody. *Biosensors and Bioelectronics*, **205**, Article 114089. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114089>
- [16] Zhang, J., Wang, Y., Dong, J., Yang, J., Zhang, Y., Wang, F., *et al.* (2019) Development of a Simple Pretreatment Immunoassay Based on an Organic Solvent-Tolerant Nanobody for the Detection of Carbofuran in Vegetable and Fruit Samples. *Biomolecules*, **9**, Article 576. <https://doi.org/10.3390/biom9100576>
- [17] Moreno, E., Valdés-Tresanco, M.S., Molina-Zapata, A. and Sánchez-Ramos, O. (2022) Structure-based Design and Construction of a Synthetic Phage Display Nanobody Library. *BMC Research Notes*, **15**, Article No. 124. <https://doi.org/10.1186/s13104-022-06001-7>
- [18] Zhao, Y., Liang, Y., Liu, Y., Zhang, X., Hu, X., Tu, S., *et al.* (2016) Isolation of Broad-Specificity Domain Antibody from Phage Library for Development of Pyrethroid Immunoassay. *Analytical Biochemistry*, **502**, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.02.020>
- [19] Roth, K.D.R., Wenzel, E.V., Ruschig, M., Steinke, S., Langreder, N., Heine, P.A., *et al.* (2021) Developing Recombinant Antibodies by Phage Display against Infectious Diseases and Toxins for Diagnostics and Therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **11**, Article 697876. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.697876>
- [20] He, W., Cui, K., Zhang, X., Jiang, D. and Xu, G. (2025) Construction of a Camel-Derived Natural Phage Nanobody Display Library and Screening of Anti-CD22 Nanobodies. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, **41**, 254-261.
- [21] Tang, X., Deng, A., Chen, W., Zhao, Y., Wang, M. and Li, C. (2024) Advances in Nanobody Screening Technology.

- Chinese Journal of Biotechnology*, **40**, 350-366.
- [22] Bakhshinejad, B. and Ghiasvand, S. (2025) A Beautiful Bind: Phage Display and the Search for Cell-Selective Peptides. *Viruses*, **17**, Article 975. <https://doi.org/10.3390/v17070975>
- [23] Zhang, Y., Xu, Z., Wang, F., Cai, J., Dong, J., Zhang, J., *et al.* (2018) Isolation of Bactrian Camel Single Domain Antibody for Parathion and Development of One-Step DC-FEIA Method Using VHH-Alkaline Phosphatase Fusion Protein. *Analytical Chemistry*, **90**, 12886-12892. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03509>
- [24] He, Q., Wang, M., Zhao, Y., Tan, G., Zhang, M., Feng, R., *et al.* (2023) Isolation of Atrazine Nanobodies Enhanced by Depletion of Anti-Carrier Protein Phages and Performance Comparison between the Nanobody and Monoclonal Antibody Derived from the Same Immunogen. *Analytica Chimica Acta*, **1244**, Article 340848. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.340848>
- [25] Alfaleh, M.A., Alsaab, H.O., Mahmoud, A.B., Alkayyal, A.A., Jones, M.L., Mahler, S.M., *et al.* (2020) Phage Display Derived Monoclonal Antibodies: From Bench to Bedside. *Frontiers in Immunology*, **11**, Article 1986. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01986>
- [26] Yang, X., Sun, Z., He, Z., Xie, X. and Liu, X. (2023) Combination of Nanobody and Peptidomimetic to Develop Novel Immunoassay Platforms for Detecting Ochratoxin a in Cereals. *Food Chemistry*, **429**, Article 137018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137018>
- [27] Tang, F., Chen, X., Zhao, L., Chang, J., Sun, H., Gu, S., *et al.* (2024) Determination of 3-Phenoxybenzoic Acid by an Improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) by the Immobilization of Nanobodies with Streptavidin and Biotin. *Analytical Letters*, **58**, 2264-2275. <https://doi.org/10.1080/00032719.2024.2405196>
- [28] Wang, M., Pang, S., Zhang, H., Yang, Z. and Liu, A. (2024) Phage Display Based Biosensing: Recent Advances and Challenges. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, **173**, Article 117629. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117629>
- [29] Qiu, Y., He, Q., Xu, Y., Bhunia, A.K., Tu, Z., Chen, B., *et al.* (2015) Deoxynivalenol-Mimic Nanobody Isolated from a Naïve Phage Display Nanobody Library and Its Application in Immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, **887**, 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.033>
- [30] Valdés-Tresanco, M.S., Molina-Zapata, A., Pose, A.G. and Moreno, E. (2022) Structural Insights into the Design of Synthetic Nanobody Libraries. *Molecules*, **27**, Article 2198. <https://doi.org/10.3390/molecules27072198>
- [31] Bernedo-Navarro, R., Romão, E., Yano, T., Pinto, J., De Greve, H., Sterckx, Y., *et al.* (2018) Structural Basis for the Specific Neutralization of Stx2a with a Camelid Single Domain Antibody Fragment. *Toxins*, **10**, Article 108. <https://doi.org/10.3390/toxins10030108>
- [32] Wang, L., Liu, X., Zhu, X., Wang, L., Wang, W., Liu, C., *et al.* (2013) Generation of Single-Domain Antibody Multimers with Three Different Self-Associating Peptides. *Protein Engineering Design and Selection*, **26**, 417-423. <https://doi.org/10.1093/protein/gzt011>
- [33] Ciulla, M.G., Pugliese, R. and Gelain, F. (2022) Boosted Cross-Linking and Characterization of High-Performing Self-Assembling Peptides. *Nanomaterials*, **12**, Article 320. <https://doi.org/10.3390/nano12030320>
- [34] Sadeghnezhad, G., Romão, E., Bernedo-Navarro, R., Massa, S., Khajeh, K., Muyldermans, S., *et al.* (2019) Identification of New DR5 Agonistic Nanobodies and Generation of Multivalent Nanobody Constructs for Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, Article 4818. <https://doi.org/10.3390/ijms20194818>
- [35] Els Conrath, K., Lauwereys, M., Wyns, L. and Muyldermans, S. (2001) Camel Single-Domain Antibodies as Modular Building Units in Bispecific and Bivalent Antibody Constructs. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 7346-7350. <https://doi.org/10.1074/jbc.m007734200>
- [36] Obeng, E.M., Steer, D.L., Fulcher, A.J. and Wagstaff, K.M. (2023) Sortase a Transpeptidation Produces Seamless, Unbranched Biotinylated Nanobodies for Multivalent and Multifunctional Applications. *Nanoscale Advances*, **5**, 2251-2260. <https://doi.org/10.1039/d3na00014a>
- [37] Fan, K., Cao, C., Pan, Y., Lu, D., Yang, D., Feng, J., *et al.* (2012) Magnetoferritin Nanoparticles for Targeting and Visualizing Tumour Tissues. *Nature Nanotechnology*, **7**, 459-464. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.90>
- [38] Fan, K., Jiang, B., Guan, Z., He, J., Yang, D., Xie, N., *et al.* (2018) Fenobody: A Ferritin-Displayed Nanobody with High Apparent Affinity and Half-Life Extension. *Analytical Chemistry*, **90**, 5671-5677. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05217>
- [39] Liao, X., Wang, J., Guo, B., Bai, M., Zhang, Y., Yu, G., *et al.* (2024) Enhancing Nanobody Immunoassays through Ferritin Fusion: Construction of a salmonella-Specific Fenobody for Improved Avidity and Sensitivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **72**, 14967-14974. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c03606>
- [40] Zhang, X., Meining, W., Fischer, M., Bacher, A. and Ladenstein, R. (2001) X-Ray Structure Analysis and Crystallographic Refinement of Lumazine Synthase from the Hyperthermophile Aquifex Aeolicus at 1.6 Å Resolution: Determinants of Thermostability Revealed from Structural Comparisons. *Journal of Molecular Biology*, **306**, 1099-1114. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4435>

- [41] Lu, Y., Li, Q., Fan, H., Liao, C., Zhang, J., Hu, H., *et al.* (2023) A Multivalent and Thermostable Nanobody Neutralizing SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529). *International Journal of Nanomedicine*, **18**, 353-367. <https://doi.org/10.2147/ijn.s387160>
- [42] Sun, Z., Wang, X., Tang, Z., Chen, Q. and Liu, X. (2019) Development of a Biotin-Streptavidin-Amplified Nanobody-Based ELISA for Ochratoxin a in Cereal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **171**, 382-388. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.103>
- [43] Ma, Z. and Zhuang, H. (2017) A Highly Sensitive Real-time Immuno-PCR Assay for Detecting Benzo[a]pyrene in Food Samples by Application of Biotin-Streptavidin System. *Food Analytical Methods*, **11**, 862-872.
- [44] He, T., Yan, T., Zhu, J., Li, Y., Zhou, X., Yang, Y., *et al.* (2024) AviTag-Nanobody Based Enzyme Immunoassays for Sensitive Determination of Aflatoxin B1 in Cereal. *LWT*, **195**, Article 115858. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115858>
- [45] Wang, Y., Zhang, Y., Shen, Y., Chen, Z., Liu, J., Cai, W., Zeng, X. and Xu, Z. (2021) Production of Anti-Fenitrothion Biotinylated Nanobody and the Application in the Development of Immunoassay. *Modern Food Science and Technology*, **37**, 286-294.
- [46] Chen, Z., Zhang, Y., Chen, J., Lin, Z., Wu, M., Shen, Y., *et al.* (2022) Production and Characterization of Biotinylated Anti-Fenitrothion Nanobodies and Development of Sensitive Fluoroimmunoassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **70**, 4102-4111. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00826>
- [47] Guo, P., Huang, K., Chen, Z., Xu, Z., Ou, A., Yin, Q., *et al.* (2023) A Chemiluminescence Enzyme Immunoassay Based on Biotinylated Nanobody and Streptavidin Amplification for Diazinon Sensitive Quantification. *Biosensors*, **13**, Article 577. <https://doi.org/10.3390/bios13060577>
- [48] Welch, N.G., Scoble, J.A., Muir, B.W. and Pigram, P.J. (2017) Orientation and Characterization of Immobilized Antibodies for Improved Immunoassays (Review). *Biointerphases*, **12**, 02D301. <https://doi.org/10.1116/1.4978435>
- [49] Van Dorst, B., Mehta, J., Bekaert, K., Rouah-Martin, E., De Coen, W., Dubruel, P., *et al.* (2010) Recent Advances in Recognition Elements of Food and Environmental Biosensors: A Review. *Biosensors and Bioelectronics*, **26**, 1178-1194. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.033>
- [50] Cho, I.H., Paek, E.H., Lee, H., Kang, J.Y., Kim, T.S. and Paek, S.H. (2007) Site-Directed Biotinylation of Antibodies for Controlled Immobilization on Solid Surfaces. *Analytical Biochemistry*, **365**, 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.02.028>
- [51] Xie, G., Lu, Y., Li, W., He, Z., Sun, Z., Xie, X., *et al.* (2022) Simultaneous Heptamerization of Nanobody and Alkaline Phosphatase by Self-Assembly and Its Application for Ultrasensitive Immunodetection of Small Molecular Contaminants in Agro-Products. *Food Control*, **141**, Article 109156. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109156>
- [52] He, Q., Pan, J., Zhang, Y., Xu, Z., Morisseau, C., Hammock, B.D., *et al.* (2025) Multifunctional Nanobody Fusion Proteins in Immunoassays: Diverse Strategies for Enhanced Analytical Performance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **192**, Article 118404. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2025.118404>
- [53] Gong, T., Liu, C., Chen, K., Bi, M., Zheng, H., Niu, W., *et al.* (2025) Development of Sandwich Chemiluminescent Immunoassay for Detection of Abrin Based on Paired Nanobody-Avi and Alkaline Phosphatase-Nanobody Fusion Protein. *Microchemical Journal*, **217**, Article 114946. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2025.114946>
- [54] Zhang, Y., Yang, J., Zeng, D., Xu, Z., Wang, H., Tian, Y., Sun, Y. and Shen, Y. (2024) Ultrasensitive Immunoassay for Paraquat Residues in Fruits and Vegetables Based on Biotinylated Nanobodies. *Journal of Instrumental Analysis*, **43**, 1959-1964.
- [55] Yang, L., Luo, L., Ou, A., Zheng, H., Li, Y., Aori, Q., *et al.* (2025) A Bioluminescent Enzyme Immunoassay Based on Nanobody-Nanoluciferase Fusion Protein for the Detection of Fenpropathrin. *Food Bioscience*, **71**, Article 107384. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107384>
- [56] Niu, X., Cheng, N., Ruan, X., Du, D. and Lin, Y. (2019) Review—Nanozyme-Based Immunosensors and Immunoassays: Recent Developments and Future Trends. *Journal of The Electrochemical Society*, **167**, Article 037508. <https://doi.org/10.1149/2.0082003jes>
- [57] Wang, Y., Liu, X., Chen, C., Chen, Y., Li, Y., Ye, H., *et al.* (2022) Magnetic Nanorobots as Maneuverable Immunoassay Probes for Automated and Efficient Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *ACS Nano*, **16**, 180-191. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c05267>
- [58] Xu, Z., Luo, L., Chen, Z., Wang, B., Yan, Y., Sun, Y. and Xu, Z. (2022) Progress on the Development of Immunoassays for Pyrethroids Insecticides and Their Metabolites. *Food and Fermentation Industries*, **48**, 320-328.
- [59] Barbieri, M.V., Rodrigues, A.C. and Febbraio, F. (2022) Monitoring of Pesticide Amount in Water and Drinkable Food by a Fluorescence-Based Biosensor. *EFSA Journal*, **20**, e200403. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.e200403>
- [60] Lin, X., Xiong, M., Zhang, J., He, C., Ma, X., Zhang, H., *et al.* (2021) Carbon Dots Based on Natural Resources: Synthesis and Applications in Sensors. *Microchemical Journal*, **160**, Article 105604. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105604>

- [61] Chen, Z., Huang, A., Dong, X., Zhang, Y., Zhu, L., Luo, L., *et al.* (2023) A Simple and Sensitive Fluoroimmunoassay Based on the Nanobody-Alkaline Phosphatase Fusion Protein for the Rapid Detection of Fenitrothion. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, **7**, Article 1320931. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1320931>
- [62] Luo, L., Lin, S., Wu, Z., Wang, H., Chen, Z., Deng, H., *et al.* (2022) Nanobody-Based Fluorescent Immunoassay Using Carbon Dots Anchored Cobalt Oxyhydroxide Composite for the Sensitive Detection of Fenitrothion. *Journal of Hazardous Materials*, **439**, Article 129701. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129701>
- [63] Feng, J., Shan, G., Hammock, B.D. and Kennedy, I.M. (2003) Fluorescence Quenching Competitive Immunoassay in Micro Droplets. *Biosensors and Bioelectronics*, **18**, 1055-1063. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(02\)00218-x](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(02)00218-x)
- [64] Liu, X., Kukkar, D., Deng, Z., Yang, D., Wang, J., Kim, K., *et al.* (2023) “Lock-and-Key” Recognizer-Encoded Lateral Flow Assays toward Foodborne Pathogen Detection: An Overview of Their Fundamentals and Recent Advances. *Biosensors and Bioelectronics*, **235**, Article 115317. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115317>
- [65] Wang, Z., Zhao, J., Xu, X., Guo, L., Xu, L., Sun, M., *et al.* (2021) An Overview for the Nanoparticles-Based Quantitative Lateral Flow Assay. *Small Methods*, **6**, 1-29. <https://doi.org/10.1002/smt.202101143>
- [66] Giljohann, D.A., Seferos, D.S., Daniel, W.L., Massich, M.D., Patel, P.C. and Mirkin, C.A. (2010) Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. *Angewandte Chemie International Edition*, **49**, 3280-3294. <https://doi.org/10.1002/anie.200904359>
- [67] Zhang, C., Wu, X., Li, D., Hu, J., Wan, D., Zhang, Z., *et al.* (2021) Development of Nanobody-Based Flow-Through Dot ELISA and Lateral-Flow Immunoassay for Rapid Detection of 3-Phenoxybenzoic Acid. *Analytical Methods*, **13**, 1757-1765. <https://doi.org/10.1039/d1ay00129a>
- [68] Wang, J., Shi, L., Jing, Y., Wang, X., Liu, X., Li, S., *et al.* (2025) “Molecular Velcro”: Design of Coupled AuNPs with Streptavidin-Biotin Immobilized Nanobody in Lateral Flow Immunoassay for Sensitive Salmonella Typhimurium Detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **435**, Article 137604. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2025.137604>
- [69] Zhao, Y., He, B., Li, D., Gao, L. and Ren, W. (2024) Nanobody and CuS Nanoflower-Au-Based Lateral Flow Immunoassay Strip to Enhance the Detection of Aflatoxin B1. *Foods*, **13**, Article 1845. <https://doi.org/10.3390/foods13121845>
- [70] Ming, L., Zhou, Y., Li, N., Zhou, X., Zhang, H., Zou, X., *et al.* (2025) Nanozyme-Amplified Lateral Flow Nanobody-Immunoassay via Pei-Mediated Coupling Strategy for Sensitive Detection of 3-Phenoxybenzoic Acid. *Food Bioscience*, **73**, Article 107611. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107611>
- [71] Fang, B., Hu, S., Wang, C., Yuan, M., Huang, Z., Xing, K., *et al.* (2019) Lateral Flow Immunoassays Combining Enrichment and Colorimetry-Fluorescence Quantitative Detection of Sulfamethazine in Milk Based on Trifunctional Magnetic Nanobeads. *Food Control*, **98**, 268-273. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.039>
- [72] Costa, E., Climent, E., Ast, S., Weller, M.G., Canning, J. and Rurack, K. (2020) Development of a Lateral Flow Test for Rapid Pyrethroid Detection Using Antibody-Gated Indicator-Releasing Hybrid Materials. *The Analyst*, **145**, 3490-3494. <https://doi.org/10.1039/d0an00319k>
- [73] Zhou, H., Qiu, H., Zhang, J., Fang, Y., Cui, B. and Shen, Y. (2024) Design, Preparation, and Application of Molecularly Imprinted Nanomaterials for Food Safety Analysis with Electrochemistry. *Coordination Chemistry Reviews*, **500**, Article 215523. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215523>
- [74] Tian, F., Fu, R., Zhou, J., Cui, Y., Zhang, Y., Jiao, B., *et al.* (2020) Manganese Dioxide Nanosheet-Mediated Etching of Gold Nanorods for a Multicolor Colorimetric Assay of Total Antioxidant Capacity. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **321**, Article 128604. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128604>
- [75] Wang, Z., Li, X., Zhang, F., Gao, Y., Cheng, J. and Fu, F. (2023) Regulating the Growth Rate of Gold Nanobipyramids via a HCL-NADH-Ascorbic Acid System toward a Dual-Channel Multicolor Colorimetric Immunoassay for Simultaneously Screening and Detecting Multiple Sulfonamides. *Analytical Chemistry*, **95**, 10438-10447. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c01928>
- [76] Wu, L., Jiao, L., Xue, D., Li, Y., Han, Y., Ouyang, W., *et al.* (2025) Nanozyme and Bifunctional Nanobody-Based Colorimetric-SERS Dual-Mode Immunosensor for Microcystin-LR Detection. *Food Chemistry*, **464**, Article 141574. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141574>
- [77] El-Moghazy, A.Y., Soliman, E.A., Ibrahim, H.Z., Marty, J.L., Istamboulie, G. and Noguer, T. (2016) Biosensor Based on Electrospun Blended Chitosan-Poly (Vinyl Alcohol) Nanofibrous Enzymatically Sensitized Membranes for Pirimiphos-Methyl Detection in Olive Oil. *Talanta*, **155**, 258-264. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.018>
- [78] El-Moghazy, A.Y., Zhao, C., Istamboulie, G., Amaly, N., Si, Y., Noguer, T., *et al.* (2018) Ultrasensitive Label-Free Electrochemical Immunosensor Based on PVA-Co-Pe Nanofibrous Membrane for the Detection of Chloramphenicol Residues in Milk. *Biosensors and Bioelectronics*, **117**, 838-844. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.025>
- [79] Yin, W., Zhang, J., Wang, H., Wang, Y., Zeng, X., Xu, Z., *et al.* (2023) A Highly Sensitive Electrochemical Immunosensor Based on Electrospun Nanocomposite for the Detection of Parathion. *Food Chemistry*, **404**, Article 134371. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134371>

- [80] Zang, S., Liu, Y., Lin, M., Kang, J., Sun, Y. and Lei, H. (2013) A Dual Amplified Electrochemical Immunosensor for Ofloxacin: Polypyrrole Film-Au Nanocluster as the Matrix and Multi-Enzyme-Antibody Functionalized Gold Nanorod as the Label. *Electrochimica Acta*, **90**, 246-253. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.12.021>
- [81] Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., Reviejo, A.J. and Pingarrón, J.M. (2012) Disposable Amperometric Magneto-Immunosensor for Direct Detection of Tetracyclines Antibiotics Residues in Milk. *Analytica Chimica Acta*, **737**, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.051>