中国科学: 化学 2026 年 第 56 卷 第 9 期: 2974 ~ 2988
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

评 述

纳米抗体用于疾病标志物检测的研究进展

苗大勇[1†], 刘美[1†], 严雨涵[1], 程云英[2*], 夏畅[1*]

1. 重庆师范大学化学与材料科学学院, 重庆 401331
2. 闽江大学地理与海洋学院, 福建省海洋生物多样性保护与永续利用重点实验室, 福州海洋研究院, 福州 350108
†同等贡献
*通讯作者, E-mail: chengyunying@mju.edu.cn; xiachang@cqnu.edu.cn

收稿日期: 2026-03-24; 接受日期: 2026-05-18; 网络版发表日期: 2026-08-31
重庆市自然科学基金面上项目(编号: CSTB2025NSCQ-GPX0988)、福州市科技计划项目(编号: 2024-R-002)、重庆师范大学博士启动项目(编号: 21XLB023)和闽江学院发树慈善基金会捐赠资金研究专项项目(编号: MFK25021)资助

摘要 疾病标志物的精准检测对疾病早期诊断、病情监测及治疗效果评估至关重要. 纳米抗体区别于传统抗体, 具有尺寸小、稳定性好、组织穿透力强等优势, 近年来广泛应用于生物医药与治疗、生物医学研究和体外检测与诊断等多个方面. 本文聚焦于纳米抗体在疾病标志物检测应用方面表现出高灵敏度、高特异性以及更短的响应时间等突出优势, 综述了纳米抗体在疾病标志物检测中的代表性研究进展, 分析总结了纳米抗体结构优势及其高效开发策略与技术, 列举了纳米抗体在传统检测、融合蛋白策略以及纳米材料偶联方面的应用, 分析了纳米抗体在疾病标志物检测应用中面临的挑战, 并对其未来的发展前景进行了展望.

关键词 纳米抗体, 疾病标志物, 检测应用

1 引言

纳米抗体(nanobody, Nb)是目前已知具备完整抗原结合能力的最小抗体单元, 主要来源于骆驼科动物(包括羊驼和骆驼)的重链抗体可变区片段. 因其具有分子量小、亲和力高、结构稳定性强、免疫原性低、特异性好以及易于工程化改造等优势[1], 纳米抗体已被广泛应用于生物医药、食品安全和环境监测等多个领域. 相较于传统抗体, 纳米抗体更易于通过定点突变[2]和融合表达[3]等蛋白质工程技术定向改造, 进一步增强其抗原亲和力与功能多样性. 同时, 随着噬菌体展示和酵母展示等高效筛选技术的发展, 以及大肠杆菌和酵母为代表的表达系统的优化[4~6], 不仅使纳米抗体的制备效率得到了显著提高, 其成本也得到了有效控制.

疾病标志物是反映疾病发生、发展与治疗结果的关键指标, 其精准检测对疾病早期诊断、病情监测及治疗效果评估至关重要[7,8]. 近年来, 纳米抗体凭借其独特的结构功能优势, 结合日益成熟的制备与改造技术, 为疾病标志物的检测提供了高效且创新的技术路径. 目前, 纳米抗体已成功应用于酶联免疫吸附测定、免疫传感器[9]、分子成像等多种检测平台[10], 广泛覆盖肿瘤[11]、感染性疾病[12]、心血管疾病及神经退行性疾病[13]等多个重要领域的标志物识别与定量

引用格式: Miao DY, Liu M, Yan YH, Cheng YY, Xia C. Research progress on the application of nanobodies in the detection of disease markers. *Sci Sin Chim*, 2026, 56: 2974–2988, doi: 10.1360/SSC-2026-0068

© 2026 《中国科学》杂志社

分析, 为规模化、精准化的临床应用奠定了坚实的技术基础, 展现出重要的应用价值与广阔的发展前景(图1)[14,15]. 本文首先介绍了纳米抗体的结构特点及其文库构建与高通量筛选技术, 继而综述了其在疾病标志物传统检测、融合蛋白策略以及纳米材料偶联方面的应用, 最后探讨了当前面临的主要挑战, 并对纳米抗体在疾病标志物检测领域的未来发展方向进行了展望.

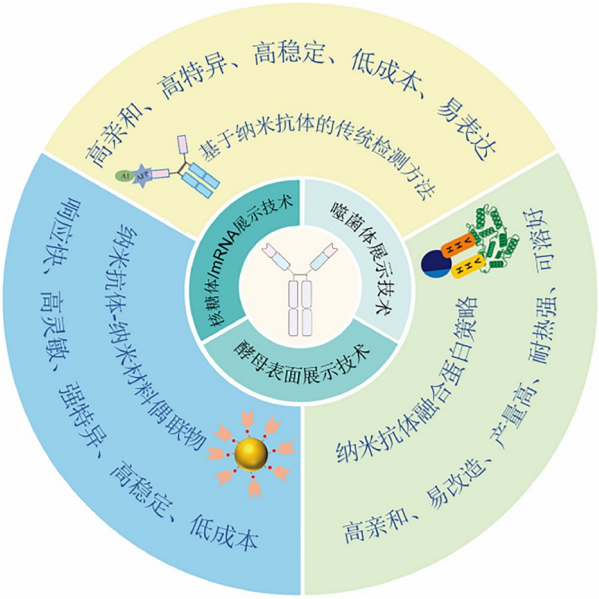


图 1　(网络版彩图)纳米抗体在疾病标志物检测中的应用示意图

Figure 1　(Color online) Schematic diagram of the application of nanobody in disease biomarker detection.

2　纳米抗体

2.1　纳米抗体的结构

纳米抗体在疾病标志物检测领域较传统单克隆抗体表现出显著优势, 这与其独特的结构属性密切相关(表1)[16~42]. 传统抗体, 如免疫球蛋白G (immunoglobulin G, IgG)分子量约为150 kDa, 其抗原结合依赖于重链可变区(variable region of heavy chain, VH)与轻链可变区(variable region of light chain, VL)两个结构域的协同作用[16]. 然而, 纳米抗体仅由单个可变域构成, 因此也被称为单域抗体(single-domain antibodies, sdAbs)[17]. 骆驼科来源的纳米抗体称为重链抗体可变区(variable domain of heavy-chain antibodies, VHH), 本质上是一种约15 kDa的单一免疫球蛋白结构域, 由四个保守框架区(framework region 1~4, FR1~FR4)形成稳定骨架, 三个互补决定区(complementarity-determining region 1~3, CDR1~CDR3)负责抗原识别[17]. 这一精简的分子

表 1　纳米抗体与单克隆抗体的比较

Table 1　Comparison of nanobody and conventional antibody

特征	纳米抗体	单克隆抗体
分子量	15 kDa [16]	150 kDa [16]
热稳定性	部分经工程优化的Nb热耐受极限可超85 °C [29]	热稳定性普遍低于90 °C, 多数在60 °C以上环境中易发生结构聚集[30]
稳定性/溶解性	多数具有良好的稳定性与溶解性, 但部分VHH结构域可能出现聚集现象[19]	常规条件下溶解性与稳定性良好, 但高浓度时易发生聚集[28]
抗原结合表位类型	对非平面表位具有偏好性, 还可特异性识别构象型表位[22]	多结合线性表位, 对构象依赖型表位的识别能力相对有限[31]
组织穿透性	具备穿透血脑屏障的能力, 还可深入细胞外基质、蛋白凹槽及组织缝隙[19]	组织穿透能力较弱[17], 难以渗透至实体瘤核心等致密组织区域[32]
半衰期	体内清除速度较快, 可通过聚乙二醇修饰、可结晶段结构域融合或白蛋白结合等策略延长半衰期[33]	通常拥有较长的体内半衰期[33]
免疫原性	整体免疫原性较低, 即便经过人源化改造, 仍无法彻底排除抗药物抗体生成的可能性[34]	通常优先选择低免疫原性序列, 但通过转基因技术制备的人源抗体, 仍存在引发机体免疫应答的潜在风险[35]
细胞内功能适用性	可作为胞内抗体, 参与胞内蛋白的降解调控或实时成像[36,37]	难以穿透细胞膜, 在细胞内环境中的功能应用受到显著限制[38]
化学修饰灵活性	修饰位点易于预测和控制[39], 可通过单一半胱氨酸残基实现位点特异性修饰, 干扰小[40]	重链和轻链相互作用复杂, 修饰易影响整体结构[39], 易出现异质性, 位点控制难度大[40]
表达系统	在大肠杆菌、毕赤酵母等微生物系统中易实现高效表达, 胞内可溶性表达产量最高可达2 g L^{-1} [41]	主要依赖中国仓鼠卵巢细胞等哺乳动物表达系统[42]

构成符合当前检测技术对高特异性、高灵敏度及微型化的要求[18], 为检测应用带来多方面优势: 首先, 纳米抗体组织穿透性突出, 能够穿越血脑屏障或浸润至实体瘤深部, 从而为检测中枢神经系统疾病标志物(如Aβ寡聚体)或深部肿瘤标志物(如人表皮生长因子受体2)开辟了新路径[19]. 从分子层面观察, 纳米抗体的重链抗体可变区结构域若干关键特征, 共同赋予其优异的检测性能[20]. 其一, FR2内的疏水残基被谷氨酸、精氨酸等亲水性氨基酸替代, 显著提升纳米抗体亲水性, 有助于降低其在复杂生物样本中发生聚集的可能性, 从而提升了检测抗干扰能力[21]. 其二, 其CDR3长度通常介于10~25个氨基酸残基之间, 较传统抗体更长, 能够形成凸环状结构, 从而深入抗原表面空间裂隙或隐蔽表位. 这一特性使其对构象敏感型标志物具备更高识别特异性. 例如, 在区分SARS-CoV-2不同变异株的受体结合域(receptor-binding domain, RBD)结构差异方面已显示出独特价值[22,23]. 此外, 纳米抗体分子骨架稳定、FR1与FR3之间存在保守二硫键, CDR亦可能含有额外二硫键, 这些结构特征共同赋予其较强稳定性. 研究表明, 在pH值3.0~9.0范围以及温度60~80 °C的条件下, 纳米抗体仍可维持结合活性; 部分经工程改造变体甚至能够耐受接近90 °C的短期高温处理. 因此, 单域精简的架构、亲水性的表面、更长的CDR3以及稳固的分子框架协同作用, 使纳米抗体能够满足现代检测技术对特异性、稳定性与灵敏度的综合需求, 并作为构建新一代检测技术的潜力平台受到关注[24~28].

2.2 文库构建与高通量筛选技术

纳米抗体主要涵盖天然纳米抗体、免疫纳米抗体以及合成纳米抗体等类型. 天然库与免疫库分别来源于未经免疫和已免疫动物的淋巴细胞, 合成库则通过体外CDR随机化技术构建[43,44]. 而纳米抗体的高效开发依赖于多元化文库构建策略与精准筛选技术的结合, 近年来, 这两大技术体系的协同发展为获得高亲和力纳米抗体提供了重要支撑. 随着技术不断创新, 纳米抗体文库构建体系日趋完善, 筛选技术也呈现出从传统展示方法向高通量方向发展的趋势, 显著提升了纳米抗体在疾病标志物检测等领域的应用价值[45].

天然文库直接从未经免疫的骆驼科动物的外周血淋巴细胞中提取mRNA, 通过逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)扩增VHH基因构建而成, 文库规模通常可达10^9~10^{11}个克隆[46,47]. 该方法省去了繁琐的动物免疫环节, 操作流程相对简便, 但其主要局限在于抗原特异性纳米抗体的丰度较低, 通常需要结合后续优化手段提高亲和力. Tsukahara等[48] 则采用CDR洗牌技术, 结合免疫人血清白蛋白的羊驼与非免疫羊驼的VHH基因构建文库, 成功筛选到针对心肌肌钙蛋白T的高亲和力VHH (部分克隆亲和力常数K_D达到10^{-9} M), 以及针对上皮糖蛋白1的VHH (最高亲和力K_D=5.19×10^{-8} M), 大大提升了这两种VHH的亲和力.

免疫文库是获取特异性纳米抗体的首选方案. 该技术通过对骆驼科动物进行抗原免疫, 诱导其产生特异性免疫应答后, 从外周血单核细胞中分离淋巴细胞, 提取总RNA并通过RT-PCR扩增VHH基因片段, 随后克隆至噬菌体或酵母展示载体中, 构建规模约10^6~10^7个克隆的文库[49]. 得益于体内的天然亲和力成熟过程, 该文库中靶抗原特异性克隆比例显著提高. Ye等[50]针对SARS-CoV-2刺突蛋白RBD构建的免疫文库, 成功筛选出了Nanosota-3纳米抗体, 该抗体对原型病毒及新型冠状病毒奥密克戎BA.1变异株, 均表现出优异的活性. 然而, 该文库的构建依赖于大型骆驼科动物免疫过程, 存在周期冗长、抗原适用范围受限等不足. 建立转基因动物模型, 使得文库构建策略由“大型动物免疫”模式转向“小鼠体内直接生成抗体基因来源”模式, 从而为高亲和力、人源化纳米抗体的快速获取开辟了一条崭新的技术路径. 其中, “LamaMouse”模型通过在羊驼免疫球蛋白重链(alpaca immunoglobulin heavy chain, IgH)基因缺陷小鼠中整合工程化的羊驼IgH基因座, 使其能够直接通过杂交瘤技术或噬菌体展示系统筛选靶标特异性纳米抗体, 有效克服了对骆驼科动物的依赖[51]. 类似的“Nanomice”模型通过引入羊驼VHH基因, 已成功应用于快速筛选针对SARS-CoV-2突变株的中和性纳米抗体, 为应对突发传染病提供了重要的技术储备[52].

合成与半合成文库完全通过体外理性设计构建, 不依赖动物免疫过程. 这类文库通常选用结构稳定的VHH骨架作为框架区, 目前已设计使用了一种合成纳米抗体库支架cAbBCII10, 并利用NNK简并密码子、易错PCR或DNA洗牌等技术在CDR引入多样性, 文库规模可高达10^{12}个变体[53,54]. 此类文库是动物免疫策

略的有效替代方案，在特异性纳米抗体筛选中具有应用潜力[55].

从文库构建到目标分子获得，关键在于筛选技术的选择，该技术旨在从庞大的文库中能高效识别出具有目标结合活性的阳性克隆. 目前最常用的展示技术主要包括：噬菌体展示、酵母表面展示、核糖体展示及mRNA展示. 各类技术在展示载体、筛选通量、表达系统及适用场景上各有优势.

噬菌体展示技术应用最为广泛[56]，该技术的核心机制在于“基因型-表型”偶联体系的建立. 具体而言，通过将VHH基因与M13噬菌体的pIII外壳蛋白基因融合, 使纳米抗体展示在噬菌体表面的同时, 其基因组中携带对应的编码序列，文库规模通常可达10^{11}个克隆. 筛选过程中，将靶抗原固定于酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)板或磁珠上，经过2~4轮“孵育-洗涤-洗脱-扩增”的循环，实现对特异性结合噬菌体的富集. 其应用领域呈现高度多元化特征. 在临床诊断方向，适用于传染性病毒(如新型冠状病毒、流感病毒)的快速检测; 在食品安全监测方面，适用于食源性致病菌的快速高灵敏检测[57]; 在环境分析领域, 可拓展至农药残留、生物毒素(黄曲霉毒素、赭曲霉毒素等)及重金属离子的检测[58]. 该技术的突出优势在于操作简单、筛选周期短、成本低且无需动物免疫即可获取针对隐蔽表位或小分子靶标的配体. 然而, 该技术依赖原核表达系统, 对需要真核翻译后修饰的膜蛋白等靶标的筛选存在一定局限性; 此外, 多价展示的方式也可能导致对抗体亲和力的评估产生偏差[59].

酵母表面展示技术是近年来最为广泛使用的真核蛋白表达系统, 以酿酒酵母为宿主细胞, 其分子层面的基础源于细胞壁锚定展示系统的构建. 通过将VHH基因与细胞壁蛋白Aga2p融合表达，并利用二硫键与锚定蛋白Aga1p结合，实现纳米抗体在酵母表面的展示. 筛选过程采用荧光标记的抗原与酶促共价标记(如酰基载体蛋白、S6标签)，结合荧光激活细胞分选术，可对高活性克隆进行高效分离[60]. 利用酵母表面展示技术，可以高效筛选肿瘤相关抗原的特异性纳米抗体, 并实现亲和力成熟与功能验证. 在肿瘤精准诊断、分子影像探针研制、靶向药物开发及蛋白质结构研究等应用场景中发挥重要作用. 酵母表面展示技术能够同步评估纳米抗体的表达水平和结合特异性，并凭借真核细胞的折叠环境，实现对构象复杂靶标的正确折叠与表面展示[61]. 然而，酵母系统的转化效率相对有限, 文库规模多局限于10^7~10^9个克隆. 当该方法应用于膜蛋白筛选时，会因膜蛋白固有的低稳定性及其较小的活性结合表面而面临更大的挑战[62].

核糖体/mRNA展示技术是一种不依赖细胞转化的体外筛选方法. 其原理建立于VHH保守框架区的序列分析基础之上，通过提取天然库中框架区的共有模式，经优化后获得通用支架；将随机化CDR区嵌入该支架，以重叠延伸PCR组装线性DNA文库. 文库经体外转录翻译后，因mRNA携带间隔序列阻碍核糖体解离，形成核糖体-mRNA-纳米抗体三元复合物. 该复合物与固相抗原孵育, 经洗涤去除非特异性结合, 目标分子通过乙二胺四乙酸介导的核糖体解离实现mRNA回收, 后续PCR扩增可完成筛选循环或亲和力成熟. 该技术适用于无需动物免疫的高亲和力纳米抗体开发. 应用场景涵盖蛋白结晶辅助、诊断探针构建、肿瘤及感染性疾病治疗性抗体研发，对毒性抗原、难免疫抗原的试剂制备具有特殊价值. 该技术可构建10^{12}量级的高多样性文库，筛选效率高，周期可压缩至2~3周[63]. 由于无细胞参与，缺乏蛋白质翻译后的加工与修饰, 需要进一步研究来完善mRNA展示的缺陷，同时操作流程的复杂性和高昂的成本，使其长期局限于基础研究领域，难以在常规实验室或高通量工业应用中推广[64].

针对上述局限，近年来涌现的新技术从不同维度推动了筛选效率与精准度的跃升. 其中, NestLink技术通过将纳米抗体与特异性条形码肽共价连接，结合深度测序与质谱分析，能够直接定量各克隆的解离速率, 避免了繁琐的逐克隆验证过程[65]. 这一策略不仅显著提升了筛选通量，还为抗体动力学参数的精准解析提供了技术支撑. 由此可见，纳米抗体筛选技术正经历从“功能实现”到“效能优化”的深刻变革. 随着多学科技术的交叉渗透，未来的筛选平台将更具智能化、集成化与普适化特征，为疾病标志物检测、靶向治疗及基础研究提供更高效、更精准的工具支撑.

3 纳米抗体的疾病检测应用

3.1 基于纳米抗体的传统检测方法

传统抗体在检测中常受限于灵敏度波动与保存稳

定性不足的问题, 相比之下, 纳米抗体因其结构紧凑、高亲和力、耐极端环境等特性, 构建了高灵敏度、高稳健性的新型检测体系. 本节聚焦传统检测方法, 主要对单克隆抗体体系进行优化, 采用VHH片段替代单克隆抗体, 在维持操作简便、成本较低等特点的基础上, 提升检测灵敏度与特异性[66].

在ELISA中, Barreto等[67]通过免疫羊驼构建VHH文库, 筛选获得针对肝片吸虫排泄分泌抗原(excreted-secreted antigen 1, ES1)的特异性纳米抗体VHH-ES1. 该纳米抗体分子量仅为15.3 kDa, 可经由大肠杆菌体系实现低成本、高效率的表达生产, 兼具优异的稳定性与环境耐受能力; 在检测性能方面, 纳米抗体对肝片吸虫ES1抗原的响应于50~5000 ng mL^{-1}浓度区间内呈现良好线性关系(R^2=0.99), 在磷酸盐缓冲液中的检测下限为31.11 ng mL^{-1}, 于人血清样本中则为171.92 ng mL^{-1}, 特异性表现优异且无交叉反应现象. 为该人兽共患病的筛查提供了一种经济可行的检测手段. 在单克隆抗体及市售胶体金试剂为技术基础的流感病毒检测体系中, 由于抗体本身广谱识别能力不足、检测灵敏度偏低、难以实现多亚型全覆盖等固有缺陷. 王飞等[68]通过筛选数据库获得甲型流感病毒核蛋白的纳米抗体基因, 经重组表达得到广谱性抗体KV108, 该抗体可特异性结合H1、H3、H5、H7及H9等多种亚型, 对核衣壳蛋白抗原的亲和力常数达5.94×10^{-9} M, 作为捕获抗体时空间位阻效应显著降低, 基于此构建的双抗体夹心ELISA检测体系灵敏度达110~403 PFU mL^{-1}. 相较于商品化胶体金试剂, 该检测技术在广谱识别能力、检测灵敏度及抗体配对适配性等方面均展现出独特优势, 为流感病毒早期监测提供了优化方案. 以肾脏疾病诊断标志物胱抑素C为例, Jiang等[69]通过将杂交瘤技术与噬菌体展示技术联用, 筛选获得3株高亲和力鼠源单克隆抗体与4株特异性纳米抗体, 利用最优配对组合5F2-P-3-2并采用双抗体夹心ELISA, 其检测下限低至0.5 ng mL^{-1}, 线性范围为0.5~31.3 ng mL^{-1} (图2a), 批内变异系数CV<15%, 回收率介于94.4%~107.2%之间, 建立了高性能的血清与尿液中人胱抑素C的检测方法, 可对血清及尿液样本中胱抑素C的实现精准定量. 纳米抗体联合单克隆抗体的检测技术在小分子标志物表位配对、检测灵敏度及方法稳定性等方面展现出显著优势, 为早期肾损伤筛查提供了关键的检测手段. 在针对微粒体环氧化物水解酶的纳米抗体检测体系中, 其性能也优于传统方法. 研究者通过免疫羊驼构建噬菌体展示库, 经亲和淘洗筛选获得靶向人微粒体环氧化物水解酶的纳米抗体, 基于此抗体建立的系列ELISA方案中(图2b), 生物偶联聚合辣根过氧化物酶催化放大系统的夹心法表现尤为突出, 其最低检出浓度达12 pg mL^{-1}, 较常规方法灵敏度提升了28倍, 对人微粒体环氧化物水解酶表现出高特异性, 交叉反应率<0.11%, 人血浆及组织样本加标回收率为73%~126%, 为肝功能评估提供了新选择[70]. 王新婷等[71]通过免疫双峰驼, 经由大肠杆菌体系实现可溶性表达, 产物纯度接近90%, 获得靶向癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)的3G2与3F4纳米抗体, 且经ELISA证实二者可高特异性结合于CEA的不同表位. 基于此, 以3F4为捕获抗体、3G2为检测抗体, 成功建立双纳米抗体夹心ELISA方法, 对溶液中CEA的检测限达1.8 ng mL^{-1}, 表现出与单克隆抗体ELISA相当的灵敏度, 且生产成本更低、化学修饰更为便捷, 更易于适配快速检测场景.

在其他免疫分析方法中, Fatima等[72]针对登革热病毒2型, 设计了基于纳米抗体P2的侧向流免疫层析法(lateral flow immunoassay, LFIA), 该试纸在抗原结合能力、诊断效能等层面实现了进一步的提升: VHH抗体因其较长的CDR3, 可深入结合抗原的隐蔽表位口袋, 其K_D值达2.79×10^{-8} M, 显著优于单抗3B3的5.74×10^{-6} M. 纳米抗体检测体系的检测下限低至4.5 ng mL^{-1}, 同时特异性高达99.50%, 明显优于单抗试纸及市售商品化试剂盒(9 ng mL^{-1}). 纳米抗体检测技术在抗原识别精准度、检测灵敏度、诊断特异性等关键方面展现出显著优势, 更契合登革病毒现场即时诊断与早期筛查的应用需求. 此外, 针对鼠疫耶尔森菌低钙应答V抗原的VHH也显示出良好应用潜力. Wang等[73]采用半合成策略, 构建了骆驼纳米抗体文库(图2c), 可快速筛选获得4株可特异性识别鼠疫V270抗原的纳米抗体. 选取VHH1与VHH4两株抗体作为识别元件, 并偶联至乳胶微球并集成于LFIA试纸条上, 可实现低浓度鼠疫V270抗原的稳定检测, 检测限低至0.05 ng mL^{-1}, 且试纸条成本低廉, 在室温储存6个月后性能仍保持稳定, 更适用于鼠疫疫情突发应急及现场快速检测的实际需求. 在多发性骨髓瘤检测方面, 分化簇38特异性纳米抗体JK36能够识别传统抗体无法触及的隐蔽表位, 采用流式细胞术, 在达雷妥尤单抗

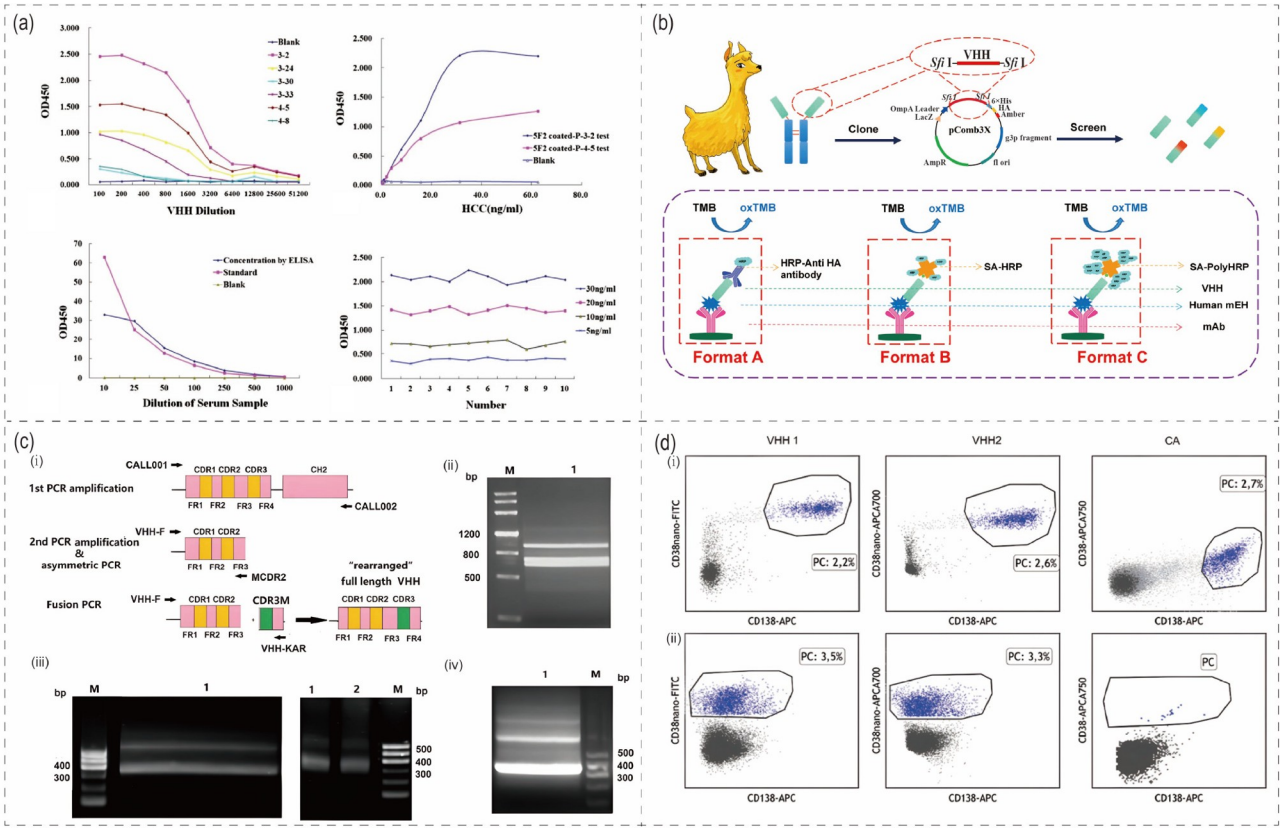


图 2　(网络版彩图)基于纳米抗体的传统检测方法示意图. (a) VHHs亲和力的测定、双抗体夹心酶联免疫吸附测定的建立及检测性能的确定[69]. (b) 人微粒体环氧化物水解酶免疫测定实验中作为免疫探针的纳米抗体的示意图[70]. (c) 半合成VHH库的构建[73]. (d) VHH克服达拉图单抗干扰检测多发性骨髓瘤患者CD38表达[74]

Figure 2　(Color online) Schematic diagram of traditional detection methods based on nanobodies. (a) Construction of the semi-synthetic VHH library [69]. (b) Determination of VHHs' Affinity, the establishment of double-antibody-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and determination of assay properties [70]. (c) A diagram of the nanobodies as immunoprobes in ELISAs for human microsomal epoxide hydrolase [73]. (d) VHH overcomes the interference of daratumumab on the detection of CD38 expression in patients with multiple myeloma [74].

治疗后的81例患者样本中实现了91%的分化簇38 (cluster of differentiation 38, CD38)检出率, 远高于常规抗体的8% (图2d), 为治疗后残留病灶的监测提供了关键技术支撑[74]. 针对高表达于肝癌、肺癌细胞表面的葡萄糖调节蛋白78, 纳米抗体V80通过免疫荧光检测, 可特异性结合肿瘤细胞表面C端结构域, 亲和力常数达2.1×10^{-7} M, 可清晰识别人肝癌细胞、人肺腺癌细胞等阳性肿瘤细胞, 无交叉反应且兼具分子量小、组织穿透性强、原核表达简便等, 为肿瘤的体外筛查提供了新的检测手段[75].

总结起来, 纳米抗体凭借其较高亲和力与稳定性, 基于ELISA、免疫层析试纸条等技术手段, 在维持操作简便、成本较低等特点的基础上, 在检出限、线性范围、特异性等方面表现更强, 假阳性率低于单克隆抗体体系, 且具备良好的耐基质干扰能力, 适用于血清、尿液及组织等复杂生物样本. 尽管如此, 纳米抗体也并非传统单克隆抗体的全面替代者, 两者优势互补、协同发展, 进一步推动构建更高灵敏度、更广适用性与更稳定可靠的新一代免疫检测体系, 为完善现有诊断体系提供持续助力.

3.2　纳米抗体融合蛋白策略

采用VHH片段替代单克隆抗体的传统检测方法往往存在信号放大能力弱以及在复杂样本中稳定性易受这些问题影响. 为克服这些局限, 通过基因工程手段将纳米抗体与报告酶、定向固定标签等蛋白进行重组融合, 发展了纳米抗体融合蛋白策略, 实现靶向识别与信号输出的一体化[76].

在各类融合策略中, 报告酶融合是目前较为成熟的方向. 例如, Liu等[77]利用柔性连接子将靶向SARS-CoV-2刺突蛋白RBD的纳米抗体Nb61与碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)融合, 构建出兼具抗原识别与催化活性的单一蛋白. 基于此建立的夹心型荧光酶免疫分析法实现了病毒蛋白快速、准确的检测, 为疫情防控提供了有效工具. Su等[78]针对肝癌标志物甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP), 将特异性纳米抗体A1与ALP融合, 借助酶促级联反应放大检测信号, 开发出高灵敏度的比色免疫分析方法(图3a). 在检测体系中, A1-ALP可催化抗坏血酸-2-磷酸水解生成抗坏血酸(ascorbic acid, AA), 后者能还原MnO_2纳米片, 抑制其氧化3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine, TMB)的能力, 从而导致体系在650 nm处吸光度下降, 且下降程度与AFP浓度相关, 显著改善了传统酶标抗体稳定性差、制备步骤复杂等问题. 此外, 酶级联放大免疫测定法检测限为0.148 ng mL^{-1}, 较传统对硝基苯磷酸酯法(检测限为2.776 ng mL^{-1})的灵敏度提升18.7倍. 在定向固定融合中, Sun等[79]将识别AFP的纳米抗体与链霉亲和素(streptavidin-binding peptide, SBP)融合, 获得具有双功能结构的A1-SBP融合蛋白, 该融合蛋白作为检测抗体, 其SBP标签可与后续加入的链霉亲和素-聚合辣根过氧化物酶结合(图3b). 由于每个聚合辣根过氧化物酶分子上偶联有多个辣根过氧化物酶单元, 可在单一免疫结合事件中引入更多酶分子, 从而实现信号的显著放大. 为解决纳米抗体在侧向流动免疫分析中因尺寸小、膜吸附效率低而导致的灵敏度受限问题, Xiao等[80]发展了一种基于正交共价结合系统的多价组装策略. 该策略以四聚化螺旋结构为中心支架, 利用SpyTag/SpyCatcher与Im7/CL7两套高效偶联系统, 实现纳米抗体的定向组装. 具体而言, 两种分别识别SARS-CoV-2核衣壳蛋白不同结构域的纳米抗体, 被分别融合SpyTag或Im7标签; 而对应的结合配偶体SpyCatcher与CL7则与四聚化螺旋融合, 通过简单的体外混合, 即可驱动纳米抗体共价且定向地组装到支架上, 形成结构明确的双Y型多聚体. 这一结构在增加抗原结合位点的同时有效降低了解离速率, 大幅提升了侧向流动免疫检测的灵敏度, 突破了传统方法中吸附效率低的技术瓶颈. Guo等[81]通过SpyTag/SpyCatcher自组装技术, 将抗SARS-CoV-2、抗中东呼吸综合征冠状病毒的纳米抗体与SpyCatcher融合, 以电化学器件将抗原与抗体的结合转为可测电信号. 相比传统方法, 此方法仅需5 μL样本, 无需预处理, 孵育时间仅为10 min, 可对SARS-CoV-2 S1蛋白实现低至1.8×10^{-20} M的检测限, 动态检测范围覆盖10个数量级, 在唾液、血清及鼻咽拭子等复杂基质中显示高特异性.

多聚化融合策略则通过引入自组装结构域为增强纳米抗体功能提供了有效途径. Su等[82]制备了七聚体纳米抗体-碱性磷酸酶融合蛋白. 该蛋白的核心为靶向AFP纳米抗体, 其与AP及补体成分4结合蛋白α链(complement component 4 binding protein alpha chain, C4bpα)结构域遗传融合. C4bpα结构域通过半胱氨酸及两亲性螺旋介导自组装, 形成七聚体结构(图3c), 实现了纳米抗体的多价化呈现, 大幅提升抗原结合力(约2.4倍). 同时, 纳米抗体和碱性磷酸酶通过融合蛋白共价连在一起, 可同步实现识别抗原和放大信号. 融合蛋白与AFP结合后, ALP催化底物水解生成AA. 随后, 锰-铁层状双金属氢氧化物(manganese-iron layered double hydroxide, Mn-Fe LDH)纳米片催化AA与邻苯二胺反应, 其产物最大荧光发射峰为425 nm, 同时, 该纳米片同步氧化邻苯二胺, 在565 nm处发出信号. 两波长荧光强度比值同AFP浓度呈正相关, 检测限0.013 ng mL^{-1}, 构建了具有内置校正能力的比率荧光体系, 有效抵消环境与仪器波动, 实现超灵敏检测, 灵敏度较传统纳米抗体-碱性磷酸酶比色法提升37~213倍, 可用于肝癌早期诊断. Gu等[83]则构建了五聚体纳米抗体免疫分析体系, 用于癌胚抗原相关细胞黏附分子5的检测. 研究者将纳米抗体Nb3与志贺毒素1的B亚单位(verotoxin 1 subunit B, VT1B)融合, 利用VT1B的自组装特性驱动多价结合界面形成, 使Nb3以五价形式展示在同一个支架上, 获得五聚体探针Nb3-VT1B, 结合亲和力较未修饰五聚体Nb3提升了超30倍, 达1.279×10^{-11} M, 还可以识别癌胚抗原相关细胞黏附分子5的不同结构域, 提高了对抗原的捕获效率. 通过分选酶将异硫氰酸荧光素标签精确链接到五聚体纳米抗体的C末端, 可有效避免因随机化学标记导致的活性损失. 同时五聚体结构本身增强蛋白的刚性, 提升了热稳定性和有机溶剂耐受性. 在检测体系中, 双特异性纳米抗体融合蛋白修饰微孔板以捕获抗原, 异硫氰酸荧光素标记五聚体纳米抗体作为信号探针, 产生级联荧光放大效应. 该方法线性范围为0.625~160 ng mL^{-1}, 检出限为

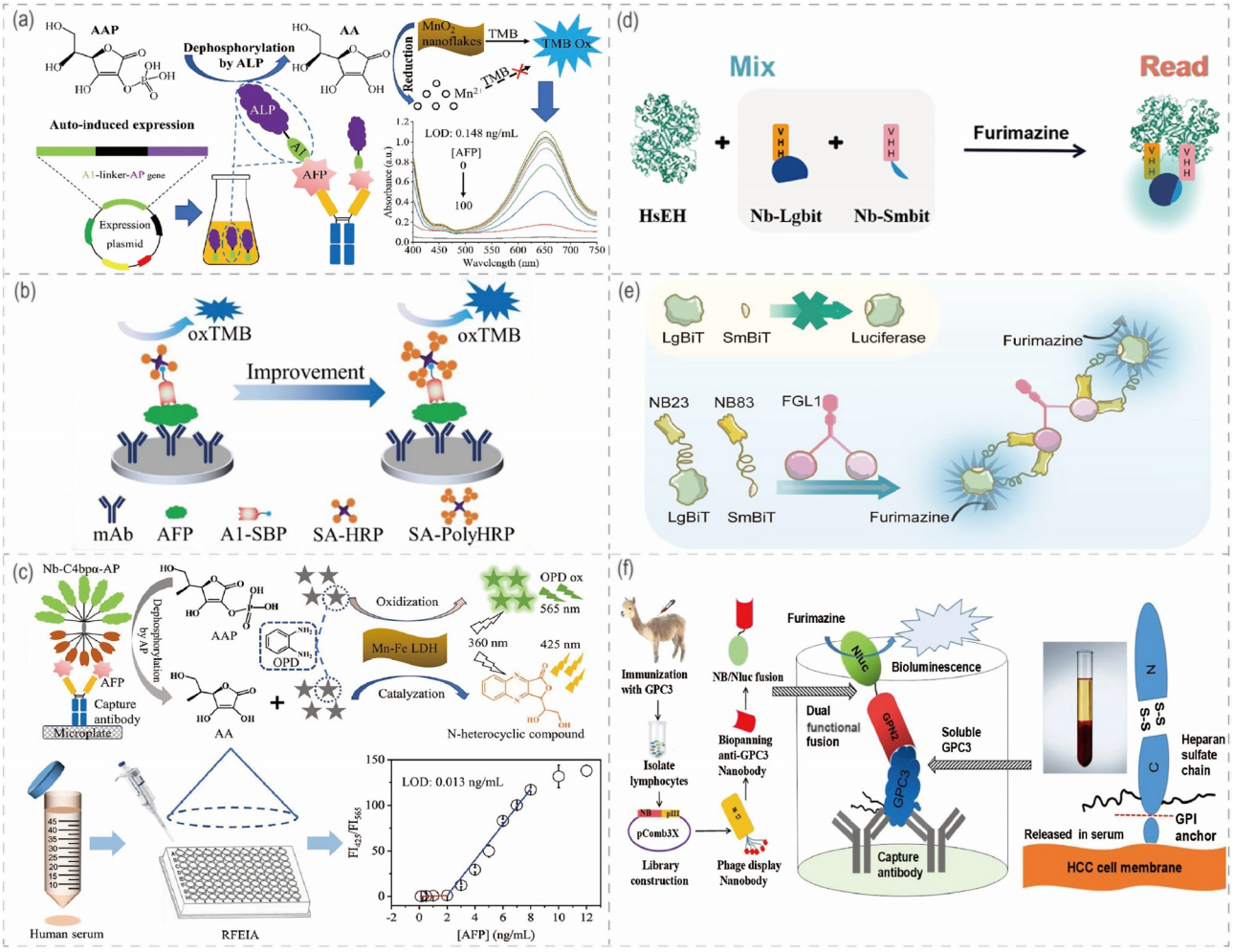


图 3　(网络版彩图)纳米抗体融合蛋白策略用于疾病检测示意图. (a) 基于Nb-ALP和MnO_2纳米片的酶级联放大免疫分析测定AFP示意图[78]. (b) SA-polyHRP作为示踪剂放大信号提高比色ELISA灵敏度示意图[79]. (c) 基于Mn-Fe LDH的比率荧光传感系统的构建用于检测A1-C4bpα-AP示意图[82]. (d) 基于纳米抗体的夹心均相裂解型萤光素酶检测法检测人可溶性环氧化物水解酶的方案[84]. (e) 开发用于快速定量检测FGL1的发光NBNB生物传感器[85]. (f) 抗GPC3纳米抗体与BLEIA的分离技术用于检测血清中的GPC3[86]

Figure 3　(Color online) Schematic diagram of the nanobody fusion protein strategy for disease detection. (a) Schematic diagram of enzyme cascade-amplified immunoassay based on Nb-ALP and MnO_2 nanoflakes for the determination of AFP [78]. (b) The schematic diagram of SA-polyHRP as tracer for signal amplification to improve the sensitivity of colorimetric ELISA [79]. (c) Schematic diagram of the construction of a ratio fluorescence sensing system based on Mn-Fe LDH for the detection of A1-C4bpα-AP [82]. (d) Scheme of the nanobody-based sandwich homogeneous split-luciferase assay for the rapid detection of human soluble epoxide hydrolase [84]. (e) Development of luminescent NBNB biosensors for rapid and quantitative detection of FGL1 [85]. (f) The isolation of anti-GPC3 nanobody and BLEIA for detection of GPC3 in serum [86].

0.52 ng mL^{-1}, 灵敏度较传统方法提升24倍.

此外, 纳米抗体与生物发光或荧光报告分子的融合也展示出良好的应用潜力. Yu等[84]将特异性识别磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (glypican-3, GPC3)的纳米抗体GPN2与小型纳米萤光素酶(nanoluciferase, NLuc)进行遗传融合, 构建得到既能特异性结合GPC3、又可催化底物产生生物发光信号的双功能融合蛋白GPN2-NLuc (图3d). 该融合蛋白可直接作为检测抗体, 与抗GPC3多克隆抗体捕获抗体配对, 建立一步式生物发光酶免疫测定法(bioluminescent enzyme immunoassay, BLEIA), 可有效区分肝癌患者与正常人. He等[85]构建了一种基于纳米抗体与分裂纳米萤光素酶(nanoluc binary technology, NanoBiT)融合的"混合即读"型均相免疫分析法. 选取了两株识别人可溶性环氧化物水解

酶(soluble epoxide hydrolase, sEH)不同表位的纳米抗体A1与A9, 分别与NanoBiT的大亚基(large binary technology, LgBiT)及小亚基(small binary technology, SmBiT)进行遗传融合, 并系统考察了融合方向(N端或C端连接)对检测性能的影响(图3e). 结果表明, 由SmBiT-A9与A9-LgBiT构成的配对在sEH存在时能高效重构荧光素酶活性, 产生强烈的生物发光信号, 且背景信号极低. 该方法操作简便, 无需洗涤步骤, 全程仅需约30 min, 适用于sEH的快速检测. 针对食管癌标志物纤维蛋白原样蛋白1 (fibrinogen-like protein 1, FGL1), 研究者开发了NanoBiT-双纳米抗体融合传感器(nanobit-conjugated dual nanobodies biosensors, NBNB). 该传感器热稳定性好、特异性强, 已成功用于临床血清样本分析, 与CEA联合检测可进一步提高早期诊断的准确性(图3f)[86]. 综上, 基于纳米抗体的融合策略兼具操作简便与特异性强的优势, 具有良好的临床转化前景.

纳米抗体融合蛋白技术克服了传统抗体-酶化学偶联中修饰异质性与生物活性衰减的技术痛点, 实现了从传统免疫分析向一体化、高灵敏、快检模式的转变.但该策略也存在一些缺陷, 如多价组装过程易诱发分子间聚集、结构域未正确折叠、背景泄漏等问题. 上述制约使该技术目前仍处于实验室向床旁即时检验、大规模人群筛查及液体活检标准化应用过渡的临界期.

3.3 纳米抗体-纳米材料偶联物

除了基因融合策略, 将纳米抗体与功能性纳米材料(如金纳米颗粒、量子点、磁性纳米颗粒等)进行偶联, 是提升检测性能的重要途径.

在贵金属材料偶联方面, Li等[87]报道了一种电化学免疫传感方法, 利用纳米抗体七聚体与金纳米颗粒负载的沸石咪唑酯骨架结构材料-8复合材料(gold nanoparticles@zeolitic imidazolate framework-8, Au NPs@ZIF-8)检测AFP. 研究者将AFP特异性纳米抗体(A1)同C4bpα融合, 通过二硫键介导的自组装形成七聚体探针, 提升AFP捕获能力(图4a). 多壁碳纳米管修饰玻碳电极后负载Au NPs@ZIF-8作为固相载体, 固定大量七聚体探针. 该传感器线性范围0.0001~100 ng mL^{-1}, 检出限0.033 pg mL^{-1}, 为肿瘤标志物检测提供可行路径. Tang等[88]通过在氨基化树枝状介孔二氧化硅表面原位生长Au NPs, 形成多孔金纳米簇以增加活性位点. 该体系结合靶向存活蛋白的纳米抗体, 实现对膀胱癌尿液标志物人胱抑素C的高灵敏、无创检测, 有效克服了传统试纸条灵敏度不足的问题. 链霉亲和素包被的Au NPs同样可作为高效载体[89]. 通过AviTag介导的定点生物素化, 将靶向埃博拉病毒与新型冠状病毒的共结合纳米抗体定向固定, 形成多价结合界面, 在保持抗体活性的同时增强了抗原富集能力(图4b). 该体系基于抗原介导的Au NPs交联聚集与沉降这一物理过程, 无需标记、洗涤或酶促放大, 即可将抗原结合信号转化为溶液消光变化, 进而实现光谱或便携电子学读出. Wang等[90]报道一种基于表面增强拉曼散射(surface-enhanced raman scattering, SERS)的检测策略, 采用4-巯基苯甲酸修饰金银合金纳米盒, 随后借助交联剂将靶向新型冠状病毒刺突蛋白RBD的多价纳米抗体mNb21进行偶联, 由此构建出多价探针MVP21. 该探针凭借金-银合金纳米盒SERS活性, 对新型冠状病毒刺突蛋白RBD的检测限可达2.23 ng mL^{-1}. 将此探针进一步集成至微流控芯片, 即可形成SERS-微流控检测平台. 在临床鼻咽拭子样本测试中, 该系统对SARS-CoV-2刺突蛋白及完整病毒的检测结果与实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应结果一致性为84.6%, 显示出良好的快速检测潜力. Ren等[91]构建了Au-TiO_2纳米复合材料负载葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD)与检测抗体Nb05的功能化标志物(Au-TiO_2@GOD@anti-ApoE Nb05), 用于阿尔茨海默病的早期诊断, 通过Ti–O键与GOD的黄素腺嘌呤二核苷酸协同作用实现酶的高效负载, 显著放大催化信号; 同时其大比表面积实现了多价抗体结合, 增强了识别效率. 线性范围1.0 pg mL^{-1}~10 ng mL^{-1}, 检测限低至0.42 pg mL^{-1}, 兼具裸眼可视化与软件定量能力, 与ELISA结果高度一致.

在其他纳米材料偶联方面, Chen等[92]构建了用于检测卵巢癌标志物人附睾蛋白4 (human epididymis protein 4, HE4)的光电化学免疫传感器. 该传感器以纳米抗体修饰的卟啉基金属有机框架纳米球为探针, 利用其光电特性放大信号, 形成“信号开启”检测模式(图4c). 该传感器在临床样本区分中表现出高特异性和稳定性, 检测结果与常规电化学发光方法具有良好的一致性. 在受体蛋白检测方面[93], 研究者利用量子点与带组氨酸标签纳米抗体之间的特异性相互作用, 基于荧光共振能量转移信号的变化, 实现对表皮生长因子受体的快速、灵敏检测, 满足临床监测需求. Giménez

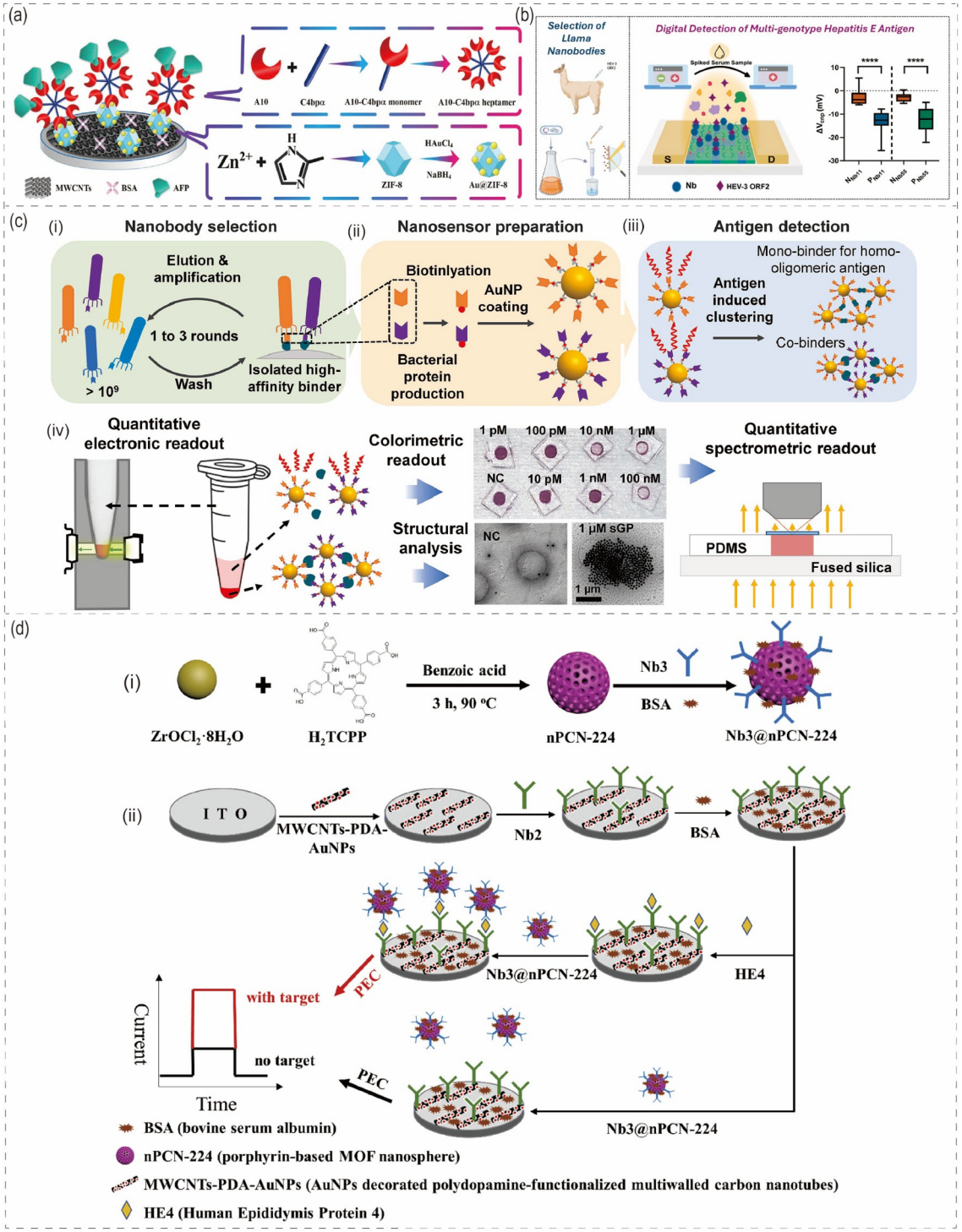


图 4　(网络版彩图)纳米抗体偶联纳米材料用于疾病检测示意图. (a) 基于AuNPs@ZIF-8纳米复合材料和A1-C4bp七聚体的免疫传感器制备过程示意图[87]. (b) Nano2RED检测开发和表征示意图[89]. (c) Nb3@nPCN-224的制备示意图[92]. (d) Nb11和Nb55功能化GFET生物传感器对HEV-3 ORF2加标血清样本的检测信号响应对比示意图[94]

Figure 4　(Color online) Schematic diagram of disease detection using nanobody-conjugated nanomaterials. (a) Schematic diagram of the fabrication process of immunosensor based on AuNPs@ZIF-8 nano-composite and A1-C4bp heptamer [87]. (b) Overview of Nano2RED assay development and characterizations [89]. (c) Scheme for the preparation of Nb3@nPCN-224 [92]. (d) Schematic diagram comparing the detection signal responses of Nb11 and Nb55 functionalized GFET biosensors to spiked serum samples of HEV-3 ORF2 [94].

等[94]选择石墨烯场效应晶体管(graphene field-effect transistor, GFET)作为平台, 通过非共价方式对靶向戊型肝炎病毒开放阅读框2蛋白(hepatitis E virus open reading frame 2 protein, HEV ORF2p)的纳米抗体加以固定, 并辅以聚乙二醇修饰抑制非特异性吸附, 由此实现对HEV抗原的高特异性数字化检测(图4d).

综上, 纳米材料不仅可作为高比表面积的载体, 富集纳米抗体以增强识别与捕获效率; 更能凭借其独特的光学、电学及催化等性质, 进行信号放大, 配合纳米抗体的高特异性识别能力, 突破了传统抗体在稳定性、灵敏度、适配性上的核心瓶颈, 在疾病早期诊断、动态监测、即时检测中展现出不可替代的优势. 但目前该策略多处于实验室研发阶段, 针对临床真实样本的大样本验证、长期稳定性测试及标准化检测流程尚未完善, 商业化转化仍需优化成本与工艺.

3.4 纳米抗体用于疾病标志物检测的研究热点与可视化分析

为了更加全面和直观地展示纳米抗体在疾病标志物检测中的研究进展, 对近10年该领域的文章进行了统计分析(图5a). 基于*Web of Science*核心馆藏的数据搜集, 发文量从2015年的约30篇稳步攀升至2025年的220篇以上, 年均增长率超过20%; 同期引用量更是从不足1000次跃升至6000余次, 反映出该领域不仅产出规模扩大, 其学术影响力与关注度亦同步激增, 标志着纳米抗体检测技术已从早期探索阶段进入成熟发展期. 为了直观呈现该研究领域的知识结构与发展脉络, 对该领域的文献关键词进行计量网络分析(图5b), 从聚类分布来看, 研究热点主要围绕五大方向展开: (1) 检测技术层面, 酶联免疫吸附测定、电化学免疫传感器、侧向层析免疫分析及免疫层析试纸条等方法占据主导地位, 信号放大策略与荧光、酶标记等标记技术被广泛采用以提升检测灵敏度; (2) 纳米抗体自身特性, 高亲和力、高特异性、单域结构带来的良好组织穿透性以及通过高通量筛选技术进行亲和力成熟和定向筛选的制备优势, 构成了其替代传统抗体的理论基础; (3) 疾病应用领域, 乳腺癌、前列腺癌、多发性骨髓瘤等实体肿瘤标志物的检测是研究重点, 同时新型冠状病毒感染等感染性疾病的诊断应用亦受到关注, 体现了纳米抗体在肿瘤学与感染病学中的价值; (4) 融合蛋白策略, 通过将纳米抗体与碱性磷酸酶、绿色荧光蛋白等报告分子构建为融合蛋白, 实现了检测信号的直接放大与一步法快速检测, 简化了传统标记流程并提高了检测效率; (5) 新型材料融合, 石墨烯氧化物、纳米粒子、量子点等纳米材料与纳米抗体的偶联显著拓展了生物传感器, 为新型体外诊断试剂的开发提供了重要的理论依据与技术参考.

4 总结与展望

本文系统梳理了纳米抗体在疾病标志物检测领域的研究进展, 重点围绕传统免疫检测方法、融合蛋白

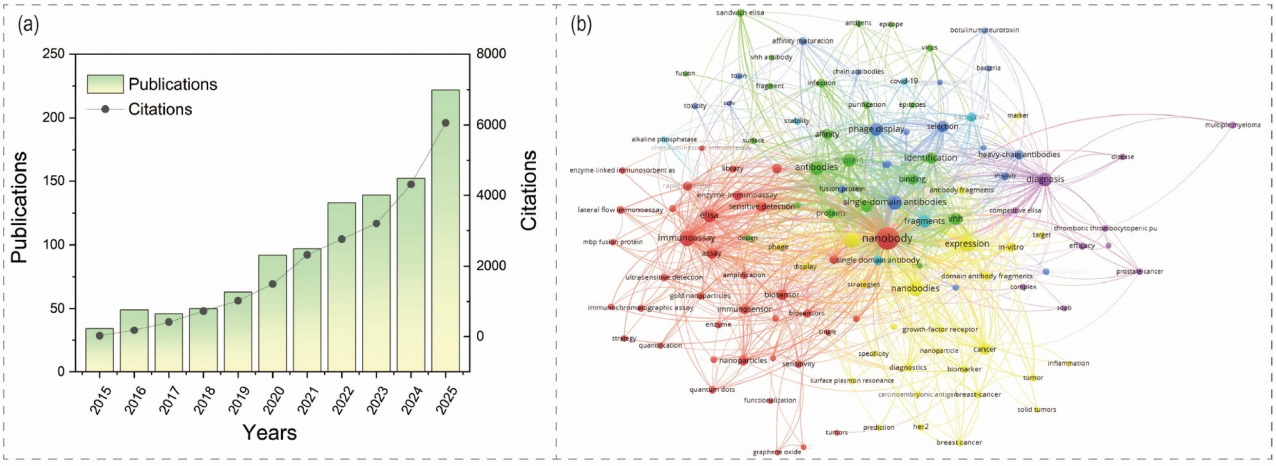


图 5 (网络版彩图) (a) 纳米抗体疾病检测技术的年度出版物和引文. (b) 基于1077篇文献的计量网络分析

Figure 5 (Color online) (a) Annual publications and citations of nanobody disease detection technology. (b) Bibliometric network analysis based on 1077 documents.

策略以及纳米材料偶联体系三个方面，详细阐述了相关技术的发展现状与应用优势，这些方法为未来发展高灵敏、高特异性、快速的检测方法提供了新思路. 尽管纳米抗体在疾病标志物检测技术中的应用已取得重要进展, 但仍面临诸多挑战. 从纳米抗体工程化角度来说, 现有纳米抗体的亲和力与稳定性仍需提升, 每一种常规文库的构建和筛选手段都具有不同的优势和不足，目前尚无高效、单一的技术可保证高产量的纳米抗体的生产和筛选. 从疾病标志物检测的角度分析, 目前单一检测模式对复杂样本基质效应的消除能力有限, 缺乏支持多靶标联合检测的完整技术平台, 同时依赖于大型复杂仪器的检测模式，难以满足临床多样本、多指标、快速分析的实际需求.

随着人工智能等新兴技术的迅猛发展，纳米抗体工程化未来的发展趋势迈向“去动物化、高通量、高通用性、精准化及与人工智能深度融合”的新阶段. 未来发展趋势主要体现在以下两个维度: (1) 发展多技术融合的混合筛选策略，通过整合噬菌体展示、酵母展示、核糖体/mRNA展示等平台，可突破单一筛选技术的固有局限，充分发挥不同展示系统在表达效率、折叠环境及翻译后修饰方面的差异化优势，有效提升纳米抗体的富集效率与筛选成功率; (2) 借助计算结构生物学与人工智能方法，理性设计与改造纳米抗体, 优化纳米抗体结构以增强与靶抗原的结合亲和力，推动序列设计、文库构建及筛选流程向一体化、自动化方向发展, 压缩构建周期、降低经济成本, 构建从自然筛选到理性设计的纳米抗体工程化新路径. 在疾病标志物检测方面，结合纳米抗体可推动多种新型检测方法的实际应用: (1) 构建多模态集成检测平台, 融合表面荧光、等离子体共振、电化学、光电化学、拉曼散射等信号机制，凭借纳米抗体尺寸紧凑、易于定点修饰及高稳定性等优势，充分利用不同信号模态的优势互补，实现对复杂生物样本中多个疾病标志物的同步、实时、高灵敏分析，应用于肿瘤多标志物联合检测、感染性疾病快速分型等复杂场景; (2) 搭建便携式即时检测系统. 发展纳米抗体修饰的试纸条、微流控芯片及可穿戴传感装置，与智能手机等便携式读值设备深度结合，以适配基层医疗、突发疫情现场及居家自我筛查等多元化即时检测需求.

通过上述两个层面的协同突破，纳米抗体有望在精准诊断、即时检测、活体监测等应用场景实现持续突破，进而引领疾病检测向灵敏度更高、速度更快、便携性更强、普及程度更广的方向演进，为疾病早期预警与精准医疗提供有力工具.

参考文献

1 Muyldermans S. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82: 775–797
2 Mirzaei M, Mirhoseini S, Heidari MM, Khatami M. *Mol Biotechnol*, 2025, 67: 1843–1851
3 Ji P, Wang K, Zhang L, Yan Z, Kong M, Sun X, Zhang Q, Zhou N, Liu B, Zhou EM, Sun Y, Wang X, Zhao Q. *J Biol Chem*, 2022, 298: 102709
4 Liu W, Song H, Chen Q, Yu J, Xian M, Nian R, Feng D. *Mol Immunol*, 2018, 96: 37–47
5 Jaroszewicz W, Morcinek-Orłowska J, Pierzynowska K, Gaffke L, Węgrzyn G. *FEMS Microbiol Rev*, 2022, 46: 1–25
6 McMahon C, Baier AS, Pascolutti R, Wegrecki M, Zheng S, Ong JX, Erlandson SC, Hilger D, Rasmussen SGF, Ring AM, Manglik A, Kruse AC. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25: 289–296
7 Prantner AM, Yin C, Kamat K, Sharma K, Lowenthal AC, Madrid PB, Scholler N. *Mol Pharm*, 2018, 15: 1403–1411
8 Su Q, Shi W, Huang X, Yin S, Yang X, Lu X. *MedComm–BioMater Appl*, 2023, 2: e54
9 Muyldermans S. *Annu Rev Anim Biosci*, 2021, 9: 401–421
10 Leow CH, Fischer K, Leow CY, Cheng Q, Chuah C, McCarthy J. *Diagnostics*, 2017, 7: 52
11 Marturano A, Hendrickx MLV, Falcinelli E, Sebastiano M, Guglielmini G, Hassanzadeh-Ghassabeh G, Muyldermans S, Declerck PJ, Gresele P. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2020, 24: 102103
12 Gransagne M, Aymé G, Brier S, Chauveau-Le Friec G, Meriaux V, Nowakowski M, Dejardin F, Levallois S, Dias de Melo G, Donati F, Prot M, Brûlé S, Raynal B, Bellalou J, Goncalves P, Montagutelli X, Di Santo JP, Lazarini F, England P, Petres S, Escriou N, Lafaye P. *J Biol Chem*, 2022, 298: 101290
13 Gerdes C, Waal N, Offner T, Fornasiero EF, Wender N, Verbarg H, Manzini I, Trenkwalder C, Mollenhauer B, Strohäker T, Zweckstetter M, Becker S, Rizzoli SO, Basmanav FB, Opazo F. *Nat Commun*, 2020, 11: 2729

14 Muyldermans S. *FEBS J*, 2021, 288: 2084–2102

15 Götzke H, Kilisch M, Martínez-Carranza M, Sograte-Idrissi S, Rajavel A, Schlichthaerle T, Engels N, Jungmann R, Stenmark P, Opazo F, Frey S. *Nat Commun*, 2019, 10: 4403

16 Kang W, Ding C, Zheng D, Ma X, Yi L, Tong X, Wu C, Xue C, Yu Y, Zhou Q. *Technol Cancer Res Treat*, 2021, 20: 15330338211010117

17 Xi X, Wang Y, An G, Feng S, Zhu Q, Wu Z, Chen J, Zuo Z, Wang Q, Wang MW, Gu Y. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14: 4806–4818

18 Marx V. *Nat Meth*, 2026, 23: 11–15

19 Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Songa EB, Bendahman N, Hammers R. *Nature*, 1993, 363: 446–448

20 Ruiz-López E, Schuhmacher AJ. *Biomolecules*, 2021, 11: 1131

21 Kulkarni SS, Falzarano D. *Mol Immunol*, 2021, 134: 102–108

22 Lou H, Cao X. *Cancer Commun*, 2022, 42: 804–827

23 De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, Muyldermans S, Wyns L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 4586–4591

24 Ye G, Bu F, Pan R, Mendoza A, Yang G, Spiller B, Wadzinski BE, Du L, Perlman S, Liu B, Li F, Lok SM. *PLoS Pathog*, 2024, 20: e1012600

25 Jovčevska I, Muyldermans S. *BioDrugs*, 2020, 34: 11–26

26 Lin J, Lee SL, Russell AM, Huang RF, Batt MA, Chang SS, Ferrante A, Verdino P, Henry KA. *PLoS ONE*, 2021, 16: e0254944

27 Kunz P, Zinner K, Mücke N, Bartoschik T, Muyldermans S, Hoheisel JD. *Sci Rep*, 2018, 8: 7934

28 Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, Wernery U, De Baetselier P, Muyldermans S, Revets H. *Cancer Res*, 2004, 64: 2853–2857

29 Pillay TS, Muyldermans S. *Ann Lab Med*, 2021, 41: 549–558

30 Vermeer AWP, Norde W. *Biophys J*, 2000, 78: 394–404

31 Zarzar J, Khan T, Bhagawati M, Weiche B, Sydow-Andersen J, Alavattam S. *mAbs*, 2023, 15: 2211185

32 Lauwereys M, Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Kinne J, Hölzer W, De Genst E, Wyns L, Muyldermans S. *EMBO J*, 1998, 17: 3512–3520

33 Bitsch P, Baum ES, Beltrán Hernández I, Bitsch S, Harwood J, Oliveira S, Kolmar H. *Pharmaceutics*, 2023, 15: 2374

34 Cong Y, Devoogdt N, Lambin P, Dubois LJ, Yaromina A. *Cancers*, 2024, 16: 371

35 Abdolvahab MH, Karimi P, Mohajeri N, Abedini M, Zare H. *Cancer Cell Int*, 2024, 24: 67

36 Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, Wu HC. *J Biomed Sci*, 2020, 27: 1

37 Tang JCY, Szikra T, Kozorovitskiy Y, Teixiera M, Sabatini BL, Roska B, Cepko CL. *Cell*, 2013, 154: 928–939

38 He H, Zhou C, Chen X. *J Am Chem Soc*, 2023, 145: 24785–24795

39 Jiang G, Huang Z, Yuan Y, Tao K, Feng W. *J Hematol Oncol*, 2021, 14: 139

40 El Salamouni NS, Cater JH, Spenkelink LM, Yu H. *FEBS Open Bio*, 2025, 15: 236–253

41 Loynachan CN, Thomas MR, Gray ER, Richards DA, Kim J, Miller BS, Brookes JC, Agarwal S, Chudasama V, McKendry RA, Stevens MM. *ACS Nano*, 2018, 12: 279–288

42 Hennigan JN, Menacho-Melgar R, Sarkar P, Golovsky M, Lynch MD. *Metab Eng*, 2024, 85: 116–130

43 Baker K, Eastwood TA, Garcia E, Lennon C, Mulvihill DP. *Open Biol*, 2025, 15: 240229

44 Wang Y, Fan Z, Shao L, Kong X, Hou X, Tian D, Sun Y, Xiao Y, Yu L. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 3287–3303

45 Wang Y, Zhang YF, Shen YD, Cheng ZJ, Liu J, Cai WY, Zeng X, Xu ZL. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37: 286–294 (in Chinese) [王宇, 张译丰, 沈玉栋, 陈子键, 刘佳, 蔡伟谊, 曾羲, 徐振林. 现代食品科技, 2021, 37: 286–294]

46 Jin BK, Odongo S, Radwanska M, Magez S. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 5994

47 Yan J, Wang P, Zhu M, Li G, Romão E, Xiong S, Wan Y. *J Nanobiotechnol*, 2015, 13: 33

48 Tsukahara N, Murakami A, Motohashi M, Nakayama H, Kondo Y, Ito Y, Azuma T, Kishimoto H. *Int Immunol*, 2022, 34: 421–434

49 Liu B, Yang D. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 1482

50 Ye G, Pan R, Bu F, Zheng J, Mendoza A, Wen W, Du L, Spiller B, Wadzinski B, Liu B, Perlman S, Li F, Subbarao K. *J Virol*, 2023, 97: e01448-23

51 Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. *FEBS Lett*, 1997, 414: 521–526

52 Contreras MA, Serrano-Rivero Y, González-Pose A, Salazar-Uribe J, Rubio-Carrasquilla M, Soares-Alves M, Parra NC, Camacho-Casanova F, Sánchez-Ramos O, Moreno E. *Molecules*, 2023, 28: 3708

53 Eden T, Schaffrath AZ, Wesolowski J, Stähler T, Tode N, Richter N, Schäfer W, Hambach J, Hermans-Borgmeyer I, Woens J, Le Gall CM,

Wendler S, Linke-Winnebeck C, Stobbe M, Budnicki I, Wanney A, Heitz Y, Schimmelpfennig L, Schweitzer L, Zimmer D, Stahl E, Seyfried F, Gebhardt AJ, Dieckow L, Riecken K, Fehse B, Bannas P, Magnus T, Verdoes M, Figdor CG, Hartlep KF, Schleer H, Füner J, Tomas NM, Haag F, Rissiek B, Mann AM, Menzel S, Koch-Nolte F. *Nat Commun*, 2024, 15: 4728

54 Valdés-Tresanco MS, Molina-Zapata A, Pose AG, Moreno E. *Molecules*, 2022, 27: 2198

55 Zupancic JM, Desai AA, Schardt JS, Pornnoppadol G, Makowski EK, Smith MD, Kennedy AA, Garcia de Mattos Barbosa M, Cascalho M, Lanigan TM, Tai AW, Tessier PM. *Cell Chem Biol*, 2021, 28: 1379–1388

56 Xu J, Xu K, Jung S, Conte A, Lieberman J, Muecksch F, Lorenzi JCC, Park S, Schmidt F, Wang Z, Huang Y, Luo Y, Nair MS, Wang P, Schulz JE, Tessarollo L, Bylund T, Chuang GY, Olia AS, Stephens T, Teng IT, Tsybovsky Y, Zhou T, Munster V, Ho DD, Hatziioannou T, Bieniasz PD, Nussenzweig MC, Kwong PD, Casellas R. *Nature*, 2021, 595: 278–282

57 Wang M, Pang S, Zhang H, Yang Z, Liu A. *TrAC Trends Anal Chem*, 2024, 173: 117629

58 Li Z, Zhang W, Zhang Q, Li P, Tang X. *ACS Nano*, 2023, 17: 19359–19371

59 Zeng Y, Hu Y, Chen G, Feng Q, Wang R, Zhang Z, Chen J, Liao J, Lin D, Zhu W. *CIMB*, 2025, 47: 157

60 Mahdavi SZB, Oroojalian F, Eyvazi S, Hejazi M, Baradaran B, Pouladi N, Tohidkia MR, Mokhtarzadeh A, Muyldermans S. *Int J Biol Macromol*, 2022, 208: 421–442

61 Uchański T, Zögg T, Yin J, Yuan D, Wohlkönig A, Fischer B, Rosenbaum DM, Kobilka BK, Pardon E, Steyaert J. *Sci Rep*, 2019, 9: 382

62 Sun Y, Martinez-Ramos C, Chen E, Osawa Y, Zhang H. *Biomedicines*, 2024, 12: 1863

63 Fridy PC, Rout MP, Ketaren NE. *Mol Cell Proteomics*, 2024, 23: 100865

64 Ferrari D, Garrapa V, Locatelli M, Bolchi A. *Mol Biotechnol*, 2020, 62: 43–55

65 Egloff P, Zimmermann I, Arnold FM, Hutter CAJ, Morger D, Opitz L, Poveda L, Keserue HA, Panse C, Roschitzki B, Seeger MA. *Nat Methods*, 2019, 16: 421–428

66 Pavan MF, Malnero CM, Mora Alvarado ME, Carzoglio MC, Rojas YP, Bruno A, Vidakovics LP, Hanke L, Castello A, McInerney G, García CC, Parreño V, Ibañez LI, Caljon G. *PLoS Negl Trop Dis*, 2025, 19: e0013168

67 Barreto T, Alfonso Y, Lafaye P, García Lazaro MDP, Agueda Perez L, Herrera-Velit P, Espinoza JR. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 2018, 35: 573–580

68 Wang F, Li YC, Zhang S, Chen YH, Jiang T, Mao SH, Kang XP. *Mil Med Sci*, 2025, 49: 161–170 (in Chinese) [王飞, 李裕昌, 张森, 陈月红, 姜涛, 毛淑红, 康晓平. 军事医学, 2025, 49: 161–170]

69 Jiang R, Xu C, Zhou X, Wang T, Yao G. *J Transl Med*, 2014, 12: 205

70 He Q, McCoy MR, Qi M, Morisseau C, Yang H, Xu C, Shey R, Goodman MC, Zhao S, Hammock BD. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 14698

71 Wang XT, Hu QQ, Lou C, Yang TN, Li JW. *China Biotechnol*, 2024, 44: 48–58 (in Chinese) [王新婷, 胡倩倩, 娄楚, 杨天宁, 李江伟. 中国生物工程杂志, 2024, 44: 48–58]

72 Fatima A, Wang H, Kang K, Xia L, Wang Y, Ye W, Wang J, Wang X, Jin X. *PLoS ONE*, 2014, 9: e95263

73 Wang B, Wang C, Li B, Yang J, Lin P, Jin X, Niu Y, Zhang W, Zhang X, Huang Y. *Vet Med Sci*, 2024, 10: e1532

74 Ecker V, Müller ML, Wobst J, Kern W. *Cytom B Clin Cytom*, 2026, 110: 29–38

75 Aghamollaei H, Ghanei M, Rasaee MJ, Latifi AM, Bakherad H, Fasihi-Ramandi M, Taheri RA, Gargari SLM. *Biotechnol Appl Biochem*, 2021, 68: 239–246

76 He Q, Pan J, Zhang Y, Xu Z, Morisseau C, Hammock BD, Li D. *TrAC Trends Anal Chem*, 2025, 192: 118404

77 Liu H, Su Q, Duan S, Huang X, Yang X, Liu A, Liu S, Xu C, Lu X. *Anal Chem*, 2024, 96: 20519–20525

78 Su B, Xu H, Xie G, Chen Q, Sun Z, Cao H, Liu X. *SpectroChim Acta Part A-Mol Biomol Spectr*, 2021, 262: 120088

79 Sun D, Liu X, Bao K, Wu L, Kuang H, Pei H, Chen Q. *ANAL SCI*, 2023, 39: 2059–2065

80 Xiao Y, Dong H, Wu C, Zhang K, Jiang X, Chen J, Wang H, Xu S, Zhang F, Gu L. *Anal Chem*, 2024, 96: 7130–7137

81 Guo K, Wustoni S, Koklu A, Díaz-Galicia E, Moser M, Hama A, Alqahtani AA, Ahmad AN, Alhamlan FS, Shuaib M, Pain A, McCulloch I, Arold ST, Grünberg R, Inal S. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5: 666–677

82 Su B, Bei Z, Pei H, Xie X, Sun Z, Chen Q, Cao H, Liu X. *Int J Biol Macromol*, 2022, 201: 507–515

83 Gu Y, Guo Y, Deng Y, Song H, Nian R, Liu W. *Anal Chim Acta*, 2023, 1279: 341840

84 Yu S, Li Z, Li J, Zhao S, Wu S, Liu H, Bi X, Li D, Dong J, Duan S, Hammock BD. *Sens Actuat B-Chem*, 2021, 336: 129717

85 He Q, McCoy MR, Yang H, Lin M, Cui X, Zhao S, Morisseau C, Li D, Hammock BD. *Anal Chem*, 2023, 95: 6038–6045

86 Li L, Lan Z, Qiao H, Meng X, Shi Z, Zhang W, Wang Y, Sun Z, Cui Q, Wang L, Zhou S, Hu F, Zhang D, Dai Y, Chen H, Geng Y. *Biomaterials*, 2025, 320: 123286
87 Li L, Liu X, Su B, Zhang H, Li R, Liu Z, Chen Q, Huang T, Cao H. *MicroChem J*, 2022, 179: 107463
88 Tang Y, Zhao X, Nie Z, He B, Deng D. *ACS Appl Bio Mater*, 2025, 8: 6252–6260
89 Chen X, Kang S, Ikbal MA, Zhao Z, Pan Y, Zuo J, Gu L, Wang C. *Biosens Bioelectron*, 2022, 202: 113971
90 Wang J, Zhou Q, Lowry K, Howard CB, Trau M. *Biosens Bioelectron*, 2025, 278: 117292
91 Ren X, Yan J, Wu D, Wei Q, Wan Y. *ACS Sens*, 2017, 2: 1267–1271
92 Chen K, Xue J, Zhou Q, Zhang Y, Zhang M, Zhang Y, Zhang H, Shen Y. *Anal Chim Acta*, 2020, 1107: 145–154
93 Su R, Wu YT, Doulkeridou S, Qiu X, Sørensen TJ, Susumu K, Medintz IL, van Bergen En Henegouwen PMP, Hildebrandt N. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61: e202207797
94 Giménez E, Arce LP, Piccinini E, Brancher JM, Piccinini JM, Marmisollé WA, Ibañez LI, Vizoso-Pinto MG, Azzaroni O. *Biosens Bioelectron*, 2026, 292: 118085

Research progress on the application of nanobodies in the detection of disease markers

Da-Yong Miao[1†], Mei Liu[1†], Yu-Han Yan[1], Yun-Ying Cheng[2*], Chang Xia[1*]

[1] *Chongqing Key Laboratory of Green Catalysis Materials and Technology, College of Chemistry and Materials Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China*
[2] *Fuzhou Institute of Oceanography, Fujian Key Laboratory of Conservation and Sustainable Utilization of Marine Biodiversity, College of Geography and Oceanography, Minjiang University, Fuzhou 350108, China*
†*Equally contributed to this work.*
**Corresponding authors (email: chengyunying@mju.edu.cn; xiachang@cqnu.edu.cn)*

Abstract: The precise detection of disease markers is crucial for the early diagnosis of diseases, disease monitoring, and the evaluation of treatment effects. Nanobodies, distinct from traditional antibodies, possess advantages such as small size, good stability, and strong tissue penetration. In recent years, they have been widely applied in biomedicine and therapy, biomedical research, and *in vitro* diagnosis and detection. This article focuses on the outstanding advantages of nanobodies in disease marker detection, such as high sensitivity, high specificity, and shorter response time. It reviews the representative research progress of nanobodies in disease marker detection, analyzes and summarizes the structural advantages of nanobodies and their efficient development strategies and techniques, lists the applications of nanobodies in traditional detection, fusion protein strategies, and nanomaterial coupling, analyzes the challenges faced by nanobodies in disease marker detection applications, and looks forward to their future development prospects.

Keywords: nanobodies, disease biomarkers, inspection applications

doi: 10.1360/SSC-2026-0068