DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251128003
引用格式: 李云祥, 李腾飞, 颜朦朦, 等. 金纳米颗粒-适配体阵列传感器检测复杂食品基质中溶菌酶[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(10): 155–164.
LI YX, LI TF, YAN MM, *et al*. Determinationof lysozyme in complex food matrices by gold nanoparticle-aptasensor array [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(10): 155–164. (in Chinese with English abstract).

金纳米颗粒-适配体阵列传感器检测复杂食品基质中溶菌酶

李云祥[1,2], 李腾飞[1*], 颜朦朦[2], 杜红霞[2], 朱 超[2*]

(1. 河北工程大学生命科学与食品工程学院, 邯郸 056038;
2. 山东省农业科学院农产品质量安全与标准研究所, 济南 250100)

摘 要: 目的 建立金纳米颗粒(AuNPs)-适配体阵列传感器, 用于检测与识别复杂食品基质中的溶菌酶。**方法** 选用 3 条靶向溶菌酶的适配体作为识别元件, 并以 AuNPs 的颜色变化作为响应信号构建传感器阵列。基于溶菌酶与 3 条适配体之间亲和力的差异, 结合在盐诱导条件下 AuNPs 聚集状态及颜色变化规律, 将样品的特征性颜色响应差异作为溶菌酶的“指纹图谱”, 同时, 采用线性判别分析对数据进行监督学习, 以增强模型正交性并实现对未知食品基质中溶菌酶的识别。**结果** 溶菌酶与 3 条适配体亲和力存在显著差异, Seq-1、Seq-2、Seq-3 的解离常数(K_D)分别为 141.528、67.671、38.404 nmol/L。Seq-1、Seq-2、Seq-3 3 条适配体单独检测溶菌酶的检出限分别为 14.450、15.739 和 1.950 nmol/L。亲和力的差异导致适配体对 AuNPs 的保护程度不同, 使其在盐诱导条件下 AuNPs 呈现不同聚集状态并表现为由红至蓝的梯度颜色变化, 根据添加与未添加溶菌酶的食品基质颜色差异形成特征性“指纹图谱”。基于“3 条核酸适配体×18 种食品基质×5 次平行”数据矩阵构建线性判别分析模型, 对 18 种添加 100 nmol/L 溶菌酶的食品基质实现 100%准确鉴定与分类, 3 个判别因子方差贡献率分别为 88.0%、7.6%和 4.4%, 此外, 该模型对 36 个盲样的识别准确率达到 100%, 表明该方法可以有效区分不同食品基质中的溶菌酶。**结论** 本研究构建了一种 AuNPs-适配体阵列传感器, 结合模式识别与机器学习策略, 实现复杂基质中溶菌酶的识别, 为实现抗基质效应的适配体检测方法提供新的研究思路。

关键词: 溶菌酶; 适配体; 适配体阵列传感器; 模式识别

Determination of lysozyme in complex food matrices by gold nanoparticle-aptasensor array

LI Yun-Xiang[1,2], LI Teng-Fei[1*], YAN Meng-Meng[2], DU Hong-Xia[2], ZHU Chao[2*]

收稿日期: 2025-11-28
基金项目: 国家自然科学基金项目(22304106); 山东省自然科学基金项目(ZR2022QB207); 泰山学者计划资助项目(tsqnz20221157); 山东省农业科学院农业科技创新工程项目(CXGC2025C06)
第一作者: 李云祥(2000—), 男, 硕士, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 1274547152@qq.com
***通信作者:** 李腾飞(1987—), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全检测与控制。E-mail: litengfei@hebeu.edu.cn
朱超(1990—), 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为核酸适配体筛选与食品质量安全。E-mail: zhuchao@saas.ac.cn

(1. *College of Life Sciences and Food Engineering*, *Hebei University of Engineering*, *Handan* 056038, *China*;
2. *Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products*, *Shandong Academy of Agricultural Sciences*, *Ji'nan* 250100, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the detection and identification of lysozyme in complex food matrices by gold nanoparticle (AuNP)-aptasensor array. **Methods** The 3 lysozyme-specific aptamers were selected as recognition elements, and a sensor array was constructed using AuNP color changes as the response signal. Based on the differences in binding affinity between lysozyme and the 3 aptamers, combined with the aggregation state and color change rules of AuNPs under salt-induced conditions, the characteristic color response differences of the samples were employed as lysozyme "fingerprints". Supervised machine learning via linear discriminant analysis was applied to enhance model orthogonality, enabling recognition and prediction of unknown samples. **Results** The 3 aptamers exhibited distinct binding affinities for lysozyme, with dissociation constants (K_D) of 141.528 nmol/L (Seq-1), 67.671 nmol/L (Seq-2) and 38.404 nmol/L (Seq-3). The limits of detection of lysozyme for the 3 aptamers Seq-1, Seq-2 and Seq-3 alone were 14.45, 15.739 and 1.95 nmol/L, respectively. The difference in binding affinity leaded to different degrees of protection for AuNPs by aptamers, causing AuNPs to present different aggregation states under salt-induced conditions and exhibit gradient color changes from red to blue. Characteristic "fingerprint spectra" were formed based on the color differences between food matrices with and without lysozyme added. A linear discriminant analysis model was constructed based on the data matrix of "3 nucleic acid aptamers ×18 kinds of food matrices ×5 parallel experiments", achieving 100% accurate identification and classification of 18 kinds of food matrices with 100 nmol/L lysozyme added. The variance contribution rates of the 3 discriminant factors were 88.0%, 7.6%, and 4.4% respectively. In addition, the recognition accuracy of this model for 36 blind samples reached 100%, indicating that this method could effectively distinguish lysozyme in different food matrices. **Conclusion** This study presents an AuNP-aptasensor array integrating pattern recognition and machine learning strategies, enabling reliable lysozyme detection in complex matrices. The approach provides a novel paradigm for the developing aptamer-based detection methods that mitigate matrix effects.

KEY WORDS: lysozyme; aptamer; aptasensor array; pattern recognition

0 引 言

溶菌酶, 又称胞壁质酶或 N-乙酰胞壁质聚糖水解酶, 是一种能够水解微生物细胞壁肽聚糖的碱性蛋白, 因其广谱抗菌的特性而被广泛应用于食品工业[1]。在奶酪、清酒等发酵食品的生产过程中, 溶菌酶可有效控制杂菌生长, 从而提升产品品质[2]; 在肉制品和海产品中, 溶菌酶作为一种天然、安全的生物防腐剂, 可有效延长货架期[3]。此外, 溶菌酶的含量变化还可作为评估食品原料新鲜度与加工工艺合理性的重要指标。例如, 鸡蛋液中溶菌酶含量若低于 0.5 mg/mL 时, 通常表明原料的新鲜度下降[4]。然而, 溶菌酶的过量使用或不当添加可能引发健康风险: 一方面, 溶菌酶作为一种蛋白质过敏原[5], 过量摄入可能导致婴幼儿及过敏体质人群出现皮肤瘙痒、呼吸困难、胃肠道不适等过敏反应[6–7]; 另一方面, 高浓度溶菌酶可能破坏人体肠道菌群平衡, 影响肠道屏障功能[8–9]。2022 年 9 月 30 日, 美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)发布召回公告, Whole Foods Market(全食超市)主动召回在纽约、康涅狄格和新泽西部分商店出售的"Zerto Fontal"干酪。该产品含有蛋源性溶菌酶, 但未在标签上声明。这对鸡蛋过敏或严重敏感的人群可能造成严重甚至危及生命的过敏反应。所有受影响的产品均已下架, 消费者可凭收据退货(Whole Foods "Zerto Fontal"奶酪——因未申报鸡蛋而召回)。基于上述生理功能与应用风险, 国内外均对溶菌酶的使用限量与检测要求作出了明确规定: 国际食品法典委员会在《食品添加剂通用标准》中明确了溶菌酶在各类食品中的最大使用量[10]; 我国 GB 1886.257—2016《食品安全国家标准 食品添加剂 溶菌酶》规定了食品中溶菌酶的检测方法与结果判定标准, 要求检测方法需具备良好的准确度、精密度与抗干扰能力, 尤其针对复杂食品基质中的微量溶菌酶, 需有效排除蛋白质、脂肪、碳水化合物、盐分等共存组分的干扰。因此, 建立有效的溶菌酶检测方法, 对食品安全监管、食品工业质量控制及临床疾病诊断均具有重要的应用意义。

目前对于溶菌酶的常用检测方法包括生物活性测定法(bioactivity assay method, BAM)[11]、高效液相色谱法

(high performance liquid chromatography, HPLC)[12]以及毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)[13]等。尽管这些方法具有高灵敏度和良好的重现性, 但由于设备成本高、前处理步骤烦琐、对操作人员专业性要求严格, 且易受温度、pH 等环境因素干扰, 从而限制了其在实际检测中的应用并影响检测结果的可靠性。因此, 针对上述局限性, 研究人员开发了多种新型检测方法[14]。以 MONTORO 等[15]的研究为例, 通过采用分子印迹聚合物构建特异性识别位点, 并整合荧光或磁性纳米颗粒以放大信号。该方法展现出高选择性, 检出限低至 0.009 pg/mL, 且可直接应用于食品或血清等复杂样本, 无需依赖抗体。然而, 分子印迹聚合物需优化模板去除过程、依赖校准曲线, 其检测精度易受样品基质影响。SCHNEIDER 等[16]基于抗体与溶菌酶的特异性识别, 结合酶促显色反应实现信号放大, 达到了较高灵敏度。但抗体生产周期长, 成本较高, 且批次间差异较大。

核酸适配体是通过指数富集的配体系统进化技术筛选获得的短链 DNA 或 RNA 分子, 能够以高亲和力和高选择性地结合特定靶标[17−18]。相较于抗体, 核酸适配体具备多种优势, 包括可体外化学合成、稳定性高、易于修饰[19]以及能够识别多种类型靶分子[20]。尽管核酸适配体传感器优势显著, 但在实际食品样品分析中, 其性能易受到复杂基质的干扰, 可能导致检测失效[21]。食品基质组成复杂, 包含蛋白质[22]、脂质[23]、多糖以及无机盐等多种组分[24]。上述组分可通过非特异性吸附、诱导核酸适配体构象变化、抑制或增强传感器信号, 最终引起分析结果的显著误差[25]。但是基质匹配校准或复杂的前处理步骤通常操作烦琐, 且难以彻底消除基质干扰。因此, 在实际样品检测中有效克服基质干扰, 对于提高分析方法的准确性和可靠性具有重要意义。

与传统“钥匙-锁”式传感器不同, 阵列传感器通过非特异性相互作用生成“指纹图谱”, 能够在复杂混合物中区分不同分析物, 从而显著提升检测通量和信息多样性。基于此, 本研究提出了一种金纳米颗粒(AuNPs)-适配体阵列传感器策略, 为突破基质干扰瓶颈提供了新思路。研究中选择 18 种食品基质样品作为识别对象, 以溶菌酶作为识别靶标, 并采用 3 条具有不同亲和力的适配体序列[26−28]作为识别元件。在响应信号构建方面, 选择 AuNPs 作为具有多种交叉反应能力的传感单元[29−30]。由于适配体与溶菌酶的特异性结合会使适配体从 AuNPs 表面脱离, 因此在高浓度盐的条件下, 添加溶菌酶的食品基质会使受适配体保护的 AuNPs 出现不同程度的聚集, 从而表现出由红至蓝的梯度颜色变化[31]。基于这一现象, 本研究通过比较添加与未添加溶菌酶的样品的颜色差异, 可以构建特征性“指纹图谱”, 该图谱不仅反映溶菌酶的浓度信息, 也包含样品基质的特征信息。最后, 利用线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)监督机器学习方法对未知样品进行预测[32], 为构建能够规避复杂基质效应干扰的高灵敏度传感阵列提供新的思路。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

食品基质(市售)。

溶菌酶(来自蛋清, 纯度≥90%)、酪蛋白(casein, CN, 来自牛奶, 纯度≥92%)(上海源叶生物科技有限公司); 乳铁蛋白(lactoferrin, Lf, 来自牛乳, 纯度≥85%)、α-乳球蛋白(α-lactalbumin, α-La, 来自牛乳, 纯度≥85%)、β-乳球蛋白(β-lactoglobulin, β-lg, 来自牛乳, 纯度≥90%)、乳桥蛋白(lactopontin, LPN, 来自牛乳, 纯度≥90%)(上海 Sigma-Aldrich 有限公司); 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 纯度≥98%)(北京索莱宝科技有限公司); 氯金酸($HAuCl_4\cdot 3H_2O$)(上海 Sigma-Aldrich 有限公司); 氯化钠(NaCl)(分析纯)、硫酸(H_2SO_4)(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司); Tris-HCl 缓冲液(2 mol/L, pH 7.5)、*L*-抗坏血酸(分析纯, 纯度≥99%)(上海麦克林生化科技股份有限公司); 96 孔微孔板(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 0.22 μm 醋酸纤维素膜(杭州新星特种纸业有限公司); 3 条 ssDNA 核酸适配体干粉均从生工生物工程(上海)有限公司购买, 分别是: Seq-1: 5’-ATCAGG GCTAAAGAGTGC-3’; Seq-2: 5’-ATCTACGAATTCATCAGGGCTAAAGAGTGCAGAGTTACTTAG-3’; Seq-3: 5’-AGCAGCACAGAGGTCAGA TGGCAGCTAAGCAGGCGGCTCACAAAACCATTCGCATGCGGCCCTATGCGTGCTACCGTGAA-3’。

1.2　仪器与设备

Millipore 超纯水系统(美国 Millipore 公司); IKAV2S025 漩涡混合器(德国 IKA 公司); Neofuge 15 高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司); CAP225D 分析天平(精度为 0.0001 g, 德国赛多利斯公司); Multiskan™FC 酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); KQ-400E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　金纳米颗粒的制备及比色法检测溶菌酶

原液为 10 mmol/L 的氯金酸($HAuCl\cdot 3H_2O$)储备液, 使用超纯水进行稀释, 反应体系中的 $HAuCl\cdot 3H_2O$ 浓度为 0.5 mmol/L, 未使用的 $HAuCl\cdot 3H_2O$ 溶液保存在 4 ℃的冰箱中。将适量超纯水加入到置于水浴锅的锥形瓶中, 加热至 40 ℃。将 20 mL 40 ℃的超纯水转移到 50 mL 离心管中, 打开搅拌器, 设置为 700 r/min, 然后依次加入 200 μL 10% *L*-抗坏血酸和 800 μL $HAuCl_4\cdot 3H_2O$ 混合; 再将搅拌器转速设置为 300 r/min, 持续搅拌 30~60 min, 使溶液自然冷却至室温。将得到的 AuNPs 溶液保存在 4 ℃的冰箱中。

将溶菌酶溶液(50 μL)与 3 条适配体序列(50 μL, 200 nmol/L)在室温下孵育 5 min, 加入到含有 AuNPs 溶液(100 μL)的微孔中混匀, 孵育约 10 min, 然后往微孔中加入 NaCl 溶液(10 μL, 700 nmol/L)。10 min 后, 记录 AuNPs 溶液在波长为 520 nm 和 620 nm 处的吸光度。K (OD_{620}/OD_{520})定义为在波长 520 nm 和 620 nm 下的吸光度比值。

1.3.2 食品基质的前处理

选取 18 种食品(涵盖面包类、饼干类、饮品类、蛋类)作为基质样品, 分别为婴享-婴幼儿米饼(基质 1)、高铁战士-山楂茯苓高铁多维饼干(基质 2)、婴享-无小麦椰子卷(基质 3)、小鹿蓝蓝-婴幼儿牛乳小饼干(基质 4)、宝贝易餐-无麸质黑米酥(基质 5)、鹰嘴豆饼-无小麦鹰嘴豆饼(基质 6)、每日盒子-经典原味燕麦奶(基质 7)、豆本豆-纯黑豆奶(基质 8)、六养-乌杞麻黑(基质 9)、味滋源-坚果乳(基质 10)、敏星-无麸质元气小馒头(基质 11)、伊威-原味珍珠面(基质 12)、白象-挂面(基质 13)、可可满分-无糖椰乳(基质 14)、露露-杏仁露(基质 15)、九阳豆浆-纯豆浆粉(基质 16)、鸡蛋(基质 17)、鸭蛋(基质 18)。取食品后进行粉碎, 称取(5.00±0.05) g 样品置于匀浆管中, 加入 20 mL 预冷的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)。使用组织匀浆机在 12000 r/min 条件下匀浆 60 s。匀浆液经涡旋振荡 10 min 后, 使用高速冷冻离心机于 10 ℃条件下 8000 r/min 离心 20 min。取上清液过 0.22 μm 尼龙滤膜, 所得滤液即为基质储备液。

1.3.3 实际样品中溶菌酶识别

分别用金纳米颗粒比色法来测定添加溶菌酶和未添加溶菌酶的食品基质。并将吸光度差(D=K_{add}-K_{no}, K_{add} 为添加溶菌酶的食品基质, K_{no} 未添加溶菌酶的食品基质)作为阵列传感实验的响应信号和比色响应的“指纹图谱”。LDA 是一种有监督的、广泛使用的机器学习技术。通过验证其对未知样本的分类能力, 对该阵列传感器的检测效率进行了严格评估。每个样品的适配体检测信号构成一个特征向量。LDA 会根据输入的 18 个样品的特征向量, 使用 SPSS 27 和 OriginPro 2024 软件进行分析, 生成 3 个判别函数, 使得类间差异最大化、类内差异最小化, 使用判别函数生成 LDA 图, 能够直观显示不同样品在低维空间中的聚类情况, 其中每个点都表示该阵列传感器对每种食品基质的响应模式。最后对训练样本进行模型构建, 将 36 个盲样代入判别函数来检验模型的准确性。

1.4 数据处理

采用 OriginPro 2024 和 SPSS 27 软件作图和实验数据分析, 每组实验均重复 5 次。

2 结果与分析

2.1 传感器原理及可行性分析

基于模式识别的金纳米颗粒-适配体比色阵列传感器的原理如图 1 所示, 体系由 AuNPs、溶菌酶、食品基质、核酸适配体和 NaCl 溶液组成。本研究从已报道的文献[26−28]中选择 3 条具有不同亲和力的核酸适配体序列作为溶菌酶的识别元件, 其中亲和力的差异更有助于增强模式识别能力, 形成独特且易于区分的响应矩阵。将添加溶菌酶的食品基质分别与 3 条适配体序列孵育, 期间可能同时发生两类反应: 一类是核酸适配体与溶菌酶之间的特异性结合; 另一类则是基质干扰, 例如基质成分对适配体性能的影响或适配体与非靶标成分的非特异性结合。随后, 将孵育后的混合物与 AuNPs 溶液混合, 未与溶菌酶结合的游离适配体会吸附在 AuNPs 表面, 抑制颗粒间的聚集。再加入 NaCl 溶液后, 由于表面柠檬酸根离子的作用, 会诱导 AuNPs 产生不同程度的聚集。根据食品基质中是否添加溶菌酶所引起的特征性颜色差异形成“指纹图谱”, 并利用 LDA 等监督式机器学习方法对数据进行判别分析。

实验可行性分析如图 2A 和 2B 所示。当仅有 AuNPs 或 AuNPs 与适配体共存时, 溶液保持红色, 在 520 nm 处呈现明显的特征吸收峰, K 较低。单独加入溶菌酶并不会引起 AuNPs 的明显聚集, 吸收峰基本无变化, 说明溶菌酶本身不具备直接诱导 AuNPs 聚集的能力, 从而排除了潜在的假阳性信号。单独加入 NaCl 溶液后, 其中的 Na^+会中和 AuNPs 表面的负电荷, 破坏其电荷稳定作用, 导致颗粒发生聚集, 溶液颜色变为蓝紫色。此时, 由于表面等离子体共振效应, 电子激发所需能量降低, 使 520 nm 处的吸收峰显著下降并发生红移, K 升高。当体系中加入适配体时, AuNPs 可被其吸附保护而保持分散状态, 不发生聚集。在 AuNPs、适配体、溶菌酶和 NaCl 共存的体系中, 溶液颜色则变为蓝色, K 值上升。这是由于适配体与溶菌酶结合后, 其对 AuNPs 的保护能力减弱, 在 NaCl 存在下 AuNPs 因此发生聚集。确认检测方法可行。

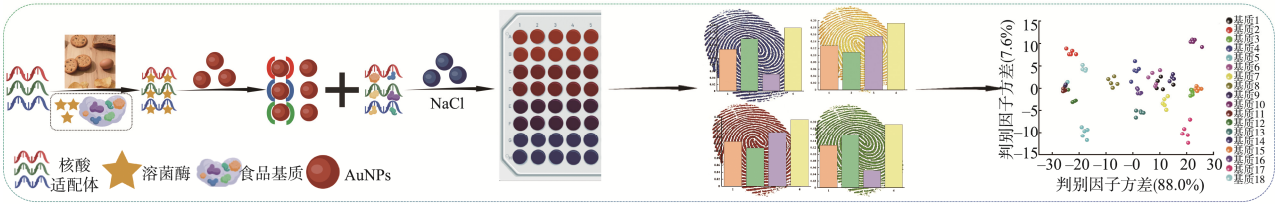
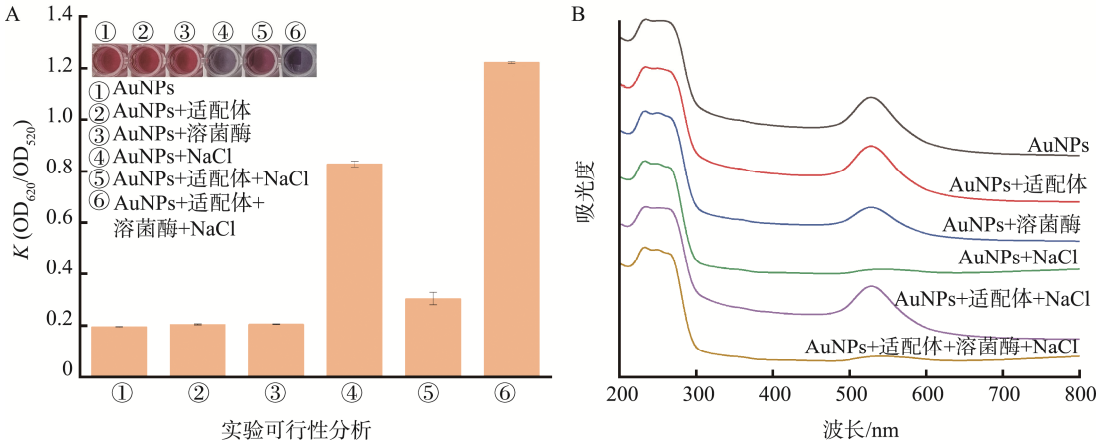


图 1 适配体-AuNPs 比色阵列传感器原理图

Fig.1 Schematic illustration of aptamer-AuNPs colorimetric array sensor



注：A. 不同体系中 AuNPs 溶液颜色变化及 *K* 变化柱状图；B. AuNPs 紫外-可见吸收光谱图。

图 2　实验可行性分析及光谱表征

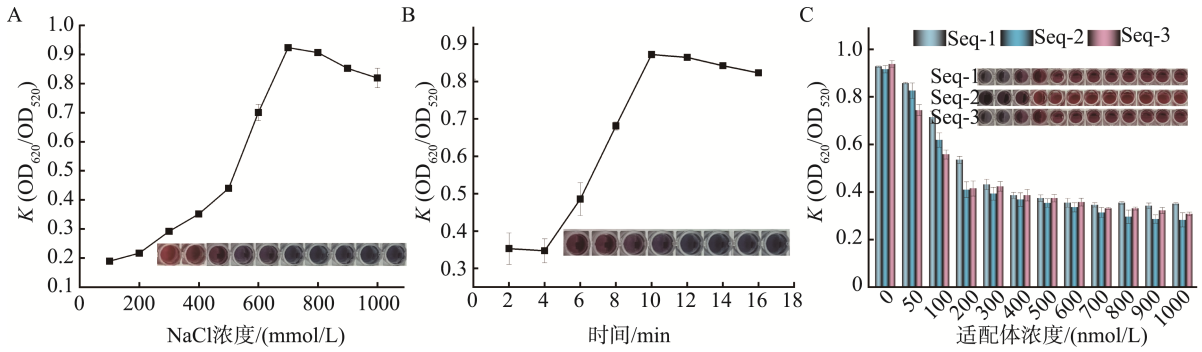
Fig.2　Experimental feasibility analysis and spectral characterization

2.2　实验条件的优化

在适配体-AuNPs 比色阵列传感器的构建过程中，优化了 NaCl 溶液浓度、NaCl 加入后时间以及 3 条适配体序列的浓度这 3 个关键因素，以确保对溶菌酶的快速、准确识别。首先，合成的 AuNPs 表面覆盖了一层柠檬酸根离子，当向溶液中加入高浓度的盐溶液时会导致 AuNPs 聚集，从而引起颜色变化。因此，NaCl 的浓度及其加入后的作用时间至关重要。如图 3A 和 3B 所示，随着 NaCl 浓度和作用时间的增加，AuNPs 溶液的颜色均会经历由红色向紫色或蓝色的转变。当 NaCl 溶液浓度达到 700 mmol/L 且作用时间达到 10 min 时，*K* 趋于稳定，此时的条件可确保产生显著的颜色差异，因此选定该浓度和作用时间用于后续实验。此外，适配体可吸附于 AuNPs 表面并形成保护作用，使其保持分散状态。然而，适配体浓度过低时，其保护作用不足，AuNPs 在盐溶液中仍会聚集；而适配体浓度过高时，过量适配体会游离于体系中，反而影响传感器的灵敏度。因此，需要确定一个最佳适配体浓度，使 AuNPs 在盐环境下刚好被保护而不发生聚集。在 NaCl 浓度为 700 mmol/L 且作用时间为 10 min 的条件下，考察不同适配体浓度对 AuNPs 聚集程度的影响。如图 3C 所示，当适配体浓度低于 200 nmol/L 时，AuNPs 未得到充分保护并迅速聚集，*K* 随之降低，溶液颜色由红色变为蓝紫色；当适配体浓度高于 200 nmol/L 时，体系 *K* 变化趋于稳定。而在 200 nmol/L 时，溶液呈红色，表明 AuNPs 得到保护而不聚集。这是由于随着适配体浓度增加，吸附于 AuNPs 表面的适配体数量趋于饱和，进一步提高浓度无法增强其保护作用。因此，最终选定 200 nmol/L 作为适配体的最终浓度。

2.3　溶菌酶的识别

在优化条件下，检测 3 条适配体对不同浓度溶菌酶的响应，以确定该方法的灵敏度。图 4 所示，3 条适配体对溶菌酶浓度变化的响应信号(*K*)呈现出相同的趋势。根据 *K* 结合非线性拟合方法得出，3 条适配体均表现出较强的结合能力，解离常数(K_D)处于纳摩尔浓度范围，分别是：Seq-1，141.528 nmol/L；Seq-2，67.671 nmol/L；Seq-3，38.404 nmol/L(图 4 A~C)。另外，在 10~60 nmol/L 的范围



注：A. NaCl 浓度；B. NaCl 加入时间；C. 3 条适配体的浓度。小图为各实验组反应的颜色变化，下同。

图 3　实验条件优化

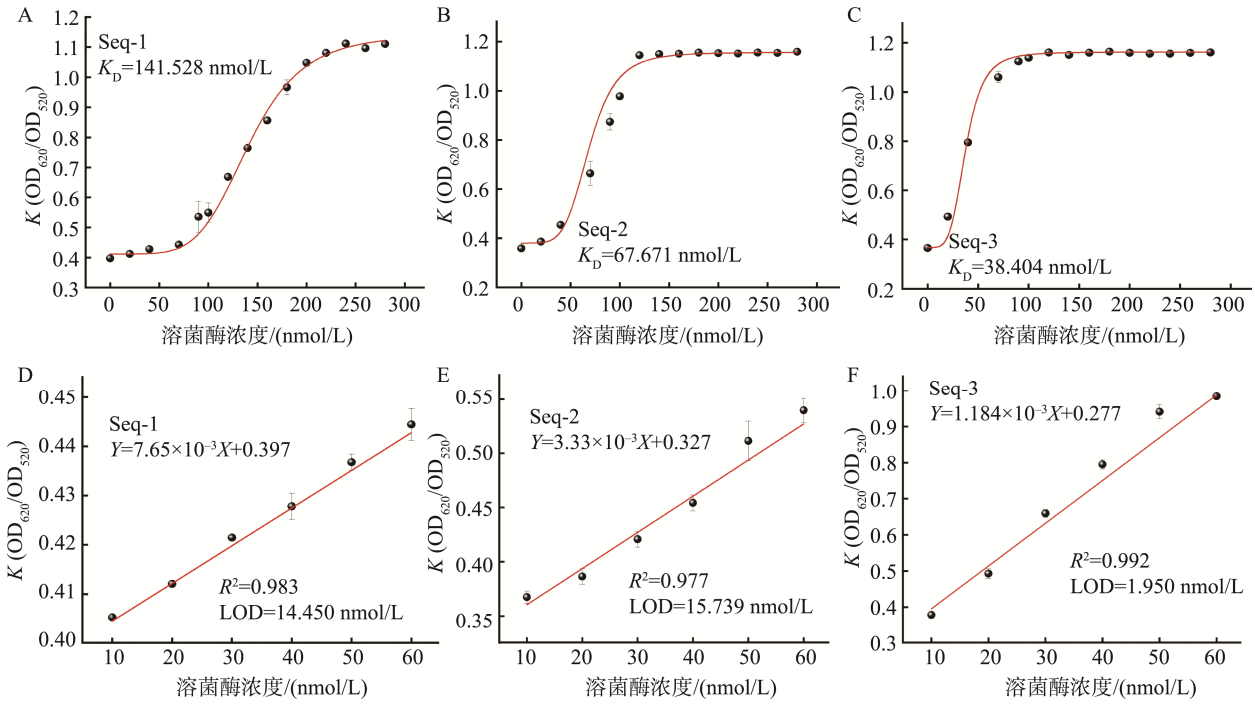
Fig.3　Optimization of experimental conditions

内根据 3σ (σ=α/k, α 是空白信号的标准偏差, k 是标准曲线的斜率)得出 LOD 分别为 14.450、15.739 和 1.950 nmol/L (图 4 D~F), 说明 3 条适配体均具有测定溶菌酶的能力。在特异性实验中, 选取浓度均为 200 nmol/L 的其他几种蛋白(CN、Lf、α-La、β-Lg、LPN、BSA)作为潜在干扰物进行验证。溶菌酶的 K 显著高于这些对照蛋白, 且其体系的颜色变化最为明显, 说明这些蛋白对溶菌酶检测的干扰较小。然而需要注意的是, 3 条适配体在不同蛋白存在时的信号相对于空白仍存在小幅波动。尽管这些蛋白在真实复杂基质中所占比例较低, 但它们已能引起一定程度的非特异性响应。因此可以推测, 当面临复杂样品中大量且多样的基质组分时, 这些基质无关信号的累积效应可能会显著影响适配体对溶菌酶的实际识别能力。此外, 随着溶菌酶浓度的增加, 响应信号呈逐渐增强的趋势。当溶菌酶浓度为 100 nmol/L 时, 3 条适配体分别表现出低、中、高不同水平的响应, K 分别为 0.5、0.9 和 1.1, 差异明显, 有利于构建有效的模式识别模型。因此, 本研究选定 100 nmol/L 作为样品基质中溶菌酶的添加浓度。

在实际样品中, 由于基质成分的复杂性和差异性, 不可能完全分离其中的每种成分进行特异性表征。因此, 复杂基质成分会影响核酸适配体的性能, 并进一步影响 AuNPs 的聚集行为。溶菌酶作为天然防腐剂, 主要应用于烘焙食品、乳制品及部分休闲食品。本研究根据溶菌酶的常见添加场景、典型的营养成分干扰类型以及实际监管需求选择检测基质, 从碳水化合物含量较高的面包, 到含有少量脂肪的苏打饼干, 再到高蛋白的乳制品, 旨在验证该方法在不同干扰强度条件下的检测稳定性。基于此, 需要评估在不同稀释倍数下, 且未添加溶菌酶时, 食品基质对传感器检测响应信号的影响。实验结果表明, 不同食品基质对 AuNPs 聚集的影响存在明显差异(图 5)。这是因为食品基质本身是高度复杂的混合体系, 包含蛋白质、脂肪、碳水化合物、盐离子和色素、等多类成分。而 AuNPs 的颜色取决于其分散与聚集状态, 因此不同基质成分的组合方式和相互作用会以不同方式干扰 AuNPs, 导致其产生不同程度的颜色变化。根据不同稀释倍数的食品基质对 AuNPs 聚集的影响规律, 将 18 种食品基质划分为 6 组, 其所需稀释倍数分别为 50、100、150、200、250 和 400 倍。

2.4 阵列传感器在实际样品中的研究

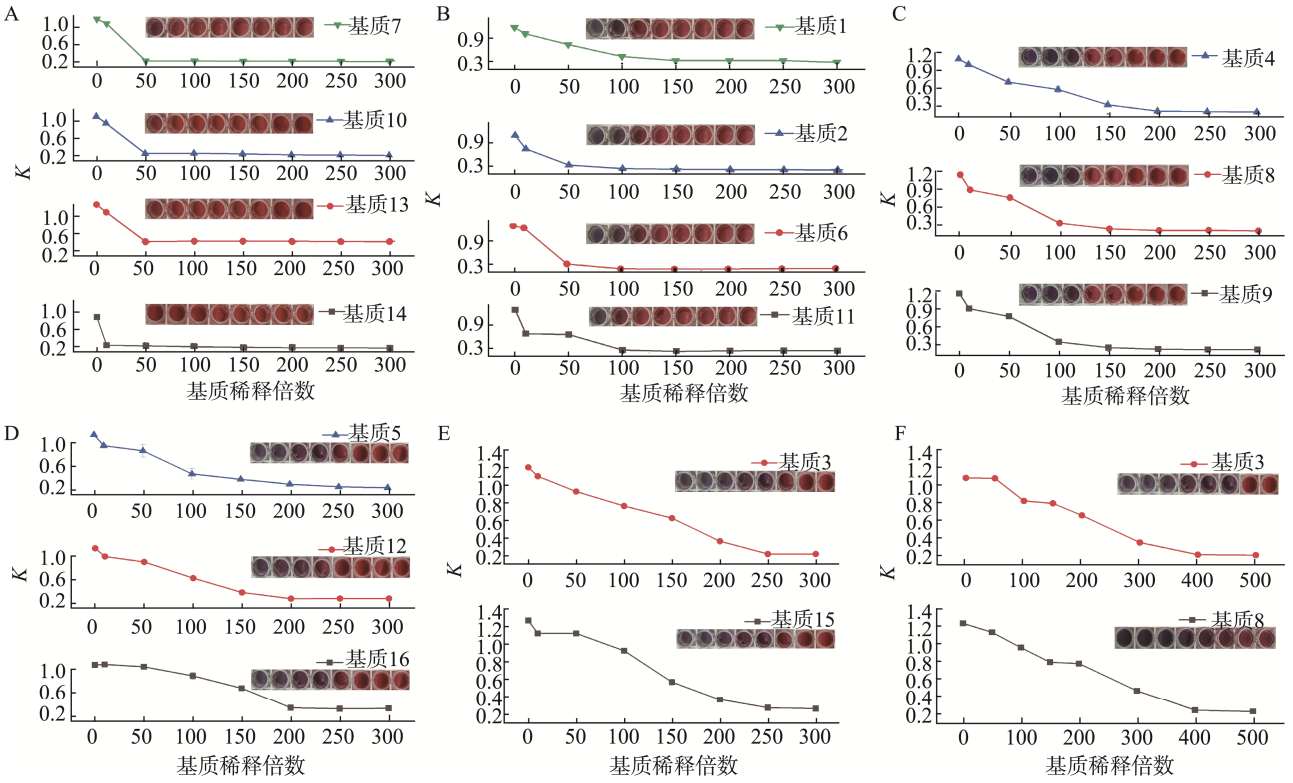
食品成分的巨大差异给溶菌酶的鉴定带来了相当的挑战, 导致许多文献报道中的核酸适配体传感器往往只能在加标回收实验中, 或仅在特定类型的食品基质中实现有效检测[21]。因此, 该基于模式识别的适配体阵列传感器如何克服基质干扰效应, 并实现对不同食品基质中溶菌酶的鉴别与区分, 是本研究的重要突破点。为构建该阵列, 将添加溶菌酶(100 nmol/L)或未添加溶菌酶的 18 种食品基质分别与 3 条核酸适配体序列以及 AuNPs 溶液孵育(图 6 A)。随后加入 NaCl 溶液并记录响应信号, 以及添加溶菌酶与未添加溶菌酶之间的差值 D 作为每种基质的特征“指纹图谱”(图 6 B)。随后利用多元统计分析中的 LDA 监督式机器学习方法对



注: A~C. 3 条适配体亲和力非线性拟合测定; D~F. 3 条适配体线性关系与灵敏度。检出限(limit of detection, LOD)。

图 4 3 条适配体性能评价

Fig.4 Performance evaluation of the 3 aptamers



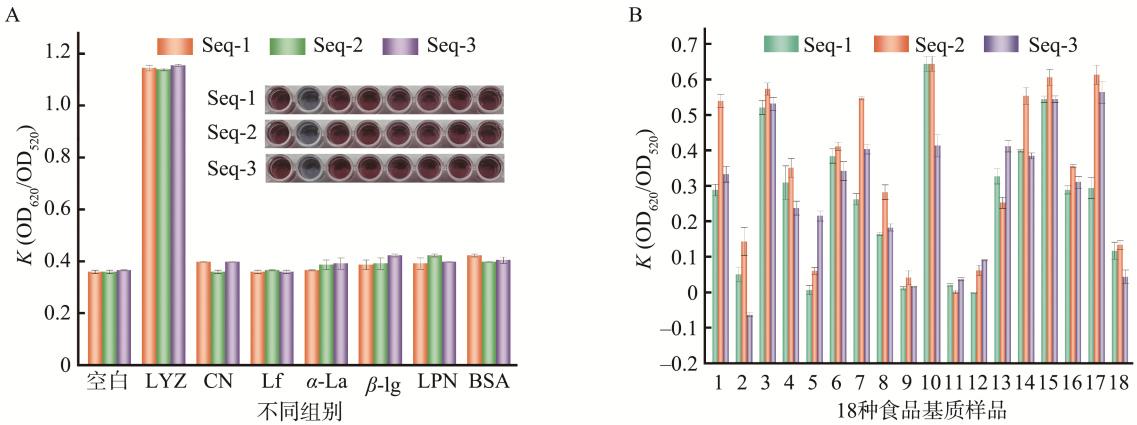
注：A. 50 倍；B. 100 倍；C. 150 倍；D. 200 倍；E. 250 倍；F. 400 倍。

图 5　18 种食品基质的稀释倍数

Fig.5　Dilution ratios of 18 kinds of food matrices

这些“指纹图谱”进行建模。通过对数据库进行“训练”，模型能够对已知样本完成判别与分类，使响应模式获得更好的正交性，从而实现不同食品基质之间的有效区分。通过 SPSS 27 与 OriginPro 2024 的分析，提取出 3 个典型因子(贡献率分别为 88.0%、7.6%和 4.4%)，代表了由响应模式(3 条核酸适配体×18 种食品基质×5 组平行)线性组合得到的基质响应特征。选取贡献度最高的两个典型因子的得分进行作图(图 6C)，每个点代表一种食品基质在 AuNPs-适配体阵列传感器中的独立响应模式。90 组训练数据被分为 18 个对应的小组，根据 Jackknifed 分类结果，所有食品基质的分类准确率均达到 100%(图 6D)。

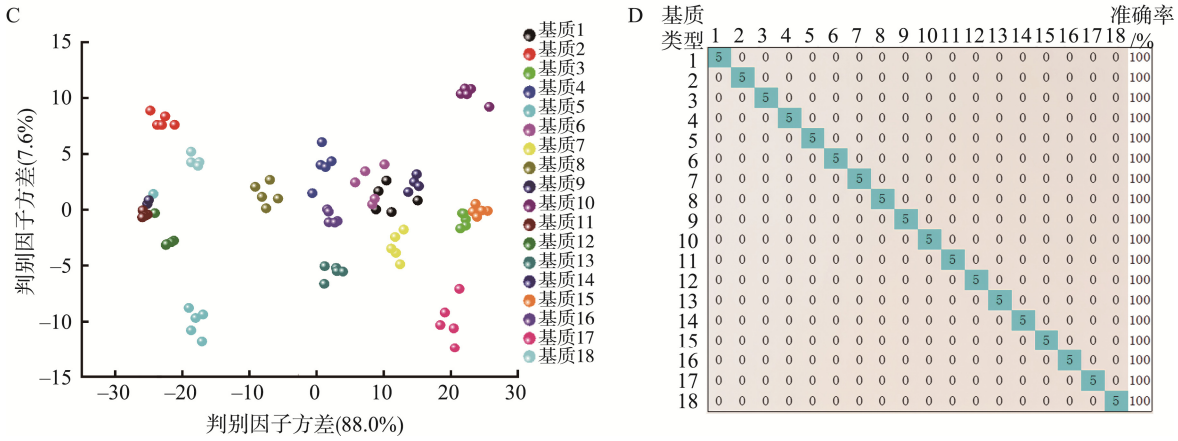
此外，随机制备 36 组基质样本，用作盲样实验中的未知样品，测试分析人员在测定过程并不知晓样本的具体归属。在添加 100 nmol/L 溶菌酶的食品基质条件下，LDA 对这 36 组未知样品的判别准确率达到 100%(表 1)，进一步证明了该方法的良好重复性和模型的泛化能力。结果表明，AuNPs-适配体阵列传感器能够准确实现不同类型食品基质中溶菌酶的识别。



注：A. 3 条适配体特异性评价；B. 18 种基质响应信号指纹图谱；C. 18 种基质 LDA 典型得分图；D. Jackknifed 分类结果。

图 6　阵列传感器在实际样品中识别溶菌酶评价

Fig.6　Evaluation of lysozyme identification by the array sensor in real samples



注: A. 3 条适配体特异性评价; B. 18 种基质响应信号指纹图谱; C. 18 种基质 LDA 典型得分图; D. Jackknifed 分类结果。

图 6(续) 阵列传感器在实际样品中识别溶菌酶评价

Fig.6 Evaluation of lysozyme recognition in actual samples using array sensors

表 1 阵列传感器对 36 组盲样的响应及识别结果

Table 1 Response and recognition results of the array sensor to 36 groups of blind samples

样品	响应信号			识别组	验证组
	Seq-1	Seq-2	Seq-3		
1	0.02174	0.06896	0.21897	基质 5	基质 5
2	0.16931	0.03312	0.18686	基质 8	基质 8
3	0.64374	0.64374	0.40055	基质 10	基质 10
4	0.34022	0.54272	0.32926	基质 1	基质 1
5	0.38725	0.56486	0.37512	基质 14	基质 14
6	0.01686	–0.00965	0.03902	基质 11	基质 11
7	0.30585	0.35648	0.30001	基质 16	基质 16
8	0.53793	0.57981	0.51072	基质 3	基质 3
9	–0.00674	0.07069	0.08872	基质 12	基质 12
10	0.08702	0.12983	0.02441	基质 18	基质 18
11	0.42019	0.39908	0.32991	基质 6	基质 6
12	0.37257	0.24671	0.42432	基质 13	基质 13
13	0.27522	0.61355	0.55195	基质 17	基质 17
14	0.03555	0.11866	–0.08298	基质 2	基质 2
15	0.54604	0.596257	0.54916	基质 15	基质 15
16	0.30218	0.345101	0.32622	基质 18	基质 18
17	0.38733	0.55162	0.25484	基质 7	基质 7
18	0.28276	0.61355	0.54115	基质 17	基质 17
19	0.33532	0.34646	0.26681	基质 4	基质 4
20	0.39731	0.56486	0.38615	基质 14	基质 14
21	0.27531	0.34510	0.34802	基质 16	基质 16
22	–0.00553	0.02608	0.01558	基质 9	基质 9
23	0.54842	0.58984	0.53231	基质 15	基质 15
24	–0.00329	0.05304	0.08682	基质 12	基质 12
25	0.27793	0.54272	0.30927	基质 1	基质 1
26	0.66389	0.63384	0.44782	基质 10	基质 10
27	0.35153	0.26329	0.42773	基质 13	基质 13

表 1(续)

样品	响应信号			识别组	验证组
	Seq-1	Seq-2	Seq-3		
28	–0.01121	0.06896	0.24845	基质 5	基质 5
29	0.15741	0.27726	0.14935	基质 8	基质 8
30	0.54185	0.16293	–0.11256	基质 3	基质 3
31	0.02419	–0.00965	0.03882	基质 11	基质 11
32	0.25107	0.53867	0.38733	基质 7	基质 7
33	0.33532	0.34646	0.26681	基质 4	基质 4
34	0.01913	0.01635	0.01687	基质 9	基质 9
35	0.03812	0.16248	–0.13918	基质 2	基质 2
36	0.42019	0.44368	0.36597	基质 6	基质 6

3　结　论

本研究开发了一种基于 AuNPs-适配体阵列传感器, 在复杂食品基质干扰条件下实现对目标物的稳定识别。通过选用 3 条与溶菌酶亲和力各不相同的核酸适配体作为识别元件, 并结合盐诱导 AuNPs 聚集及颜色变化规律, 将样品的特征性颜色响应差异构建为溶菌酶的“指纹图谱”。基于该“指纹图谱”并采用 LDA 监督式机器学习, 实现了对 18 种食品基质中添加溶菌酶(100 nmol/L)的准确识别(100%), 并在 36 个未知测试样品中同样达到 100%的判别准确率。在模式识别阵列中, 各传感单元的响应信号具有良好的正交性, 从而使目标呈现出类似“指纹”般的特征响应, 这对于提升分析性能具有重要意义。此外, 该策略能够有效规避适配体传感器在实际应用中常见的基质干扰问题。基于模式识别的适配体传感模式为传统单一适配体传感提供了有益补充, 有助于促进适配体在复杂样品检测中的实际应用。

参考文献

[1] NAWAZ N, WEN S, WANG F, *et al.* Lysozyme and its application as antibacterial agent in food industry [J]. Molecules, 2022, 27(19): 6305.

[2] ZHANG W, RHIM JW. Functional edible films/coatings integrated with lactoperoxidase and lysozyme and their application in food preservation [J]. Food Control, 2022, 133: 108670.

[3] NIE X, ZUO Z, ZHANG R, *et al.* New advances in biological preservation technology for aquatic products [J]. NPJ Science of Food, 2025, 9(1): 15.

[4] MUKHAMETOVA LI, ZHERDEV DO, EREMIN SA, *et al.* Application of the chitooligosaccharides and fluorescence polarization technique for the assay of active lysozyme in hen egg white [J]. Biomolecules, 2024, 14(12): 1589.

[5] TOMCZYK Ł, LEŚNIEROWSKI G, TOMCZAK A, *et al.* The influence of proteolytic enzymes on the change of lysozyme properties [J]. PLoS One, 2025, 20(6): e0326386.

[6] 宁亚维, 杨正, 马梦戈, 等. 食品中常见过敏原及检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(15): 319–328.
NING YW, YANG Z, MA MG, *et al*. Research progress on common allergens in food and detection technologies [J]. Food Science, 2021, 42(15): 319–328.

[7] ASHRAF H, UCZKOWSKI D, STUART M. Lysozyme-induced nephropathy due to systemic granulomatous disease [J]. Clinical Case Reports, 2023, 11(11): e8122.

[8] STOLFI C, MARESCA C, MONTELEONE G, *et al*. Implication of intestinal barrier dysfunction in gut dysbiosis and diseases [J]. Biomedicines, 2022, 10(2): 289.

[9] YANG W, YAO H, YUAN Q, *et al.* Oral administration of lysozyme protects against injury of ileum via modulating gut microbiota dysbiosis after severe traumatic brain injury [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2024, 14: 1304218.

[10] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO) [R]. 1995. CODEXSTAN 1921995: General Standard for Food Additives. Rome: Codex Alimentarius Commission. Preamble.

[11] TARAHI M, KALITA P, DEKA H, *et al.* A comprehensive review of lysozyme applications in food packaging: Current trends, developments, and challenges [J]. Trends in Food Science & Technology, 2025, 164: 105267.

[12] HU W, ZHANG X, SHEN Y, *et al.* Quantifying allergenic proteins using antibody-based methods or liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry: A review about the influence of food matrix, extraction, and sample preparation [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2024, 23(6): e70029.

[13] HAJBA L, GUTTMAN A. Ionic liquids in capillary electrophoresis analysis of proteins and carbohydrates [J]. Journal of Chromatography A, 2024, 1716: 464642.

[14] DARVISHI M, MOUSAVINIA SM, SOLEIMANY R, *et al.* Innovative nanosensing methods for lysozyme identification [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2025, 192: 110745.

[15] MONTORO LP, FRÍAS IAM, VEREDA ALONSO E, *et al*. A molecularly imprinted polypyrrole/GO@ Fe_3O_4 nanocomposite modified impedimetric sensor for the routine monitoring of lysozyme [J]. Biosensors, 2022, 12(9): 727.

[16] SCHNEIDER N, WEIGEL I, WERKMEISTER K, *et al.* Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for

quantification of lysozyme in cheese [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(1): 76–81.

[17] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. Science, 1990, 249(4968): 505–510.

[18] ELLINGTON AD, SZOSTAK JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. Nature, 1990, 346(6287): 818–822.

[19] 白天, 孙佳一, 贾瑞淑, 等. 基于 MXene 材料和 X 型 DNA 的荧光适配体传感器检测 Pb^{2+}和 Cd^{2+}[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(15): 101–109.
BAI T, SUN JY, JIA RS, *et al*. Fluorescent aptamer sensors based on MXene materials and X-type DNA for the detection of Pb^{2+} and Cd^{2+} [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(15): 101–109.

[20] ZHANG L, LI Y, SUN J, *et al.* Aptamers in bioanalytical chemistry: Current trends in development and application [J]. Science China Chemistry, 2025, 68: 5357–5428.

[21] ZHU C, FENG Z, QIN H, *et al.* Recent progress of SELEX methods for screening nucleic acid aptamers [J]. Talanta, 2024, 266: 124998.

[22] MARTÍNEZ-SÁNCHEZ V, CALVO MV, FONTECHA J, *et al.* The role of food matrices supplemented with milk fat globule membrane in the bioaccessibility of lipid components and adaptation of cellular lipid metabolism of Caco-2 cells [J]. Nutrients, 2024, 16(16): 2798.

[23] NIROULA A, GAMOT TD, OOI CW, *et al.* Biomolecule-based pickering food emulsions: Intrinsic components of food matrix, recent trends and prospects [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 112: 106303.

[24] WANG Y, ZHAI H, YIN J, *et al.* Recent advances and future prospects of aptamer-based biosensors in food safety analysis [J]. International Journal of Electrochemical Science, 2022, 17(1): 22019.

[25] KHANONKIN E, SCHECHTER I, DATTNER I. Compensation for matrix effects in high-dimensional spectral data using standard addition [J]. Sensors, 2025, 25(3): 612.

[26] COX JC, ELLINGTON AD. Automated selection of anti-protein aptamers [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2001, 9(10): 2525–2531.

[27] LIU DY, ZHAO Y, HE XW, *et al.* Electrochemical aptasensor using the tripropylamine oxidation to probe intramolecular displacement between target and complementary nucleotide for protein array [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(6): 2905–2910.

[28] WANG X, XU Y, CHEN Y, *et al.* The gold-nanoparticle-based surface plasmon resonance light scattering and visual DNA aptasensor for lysozyme [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 400(7): 2085–2091.

[29] MONTAÑO-PRIEDE JL, SANROMAN-IGLESIAS M, ZABALA N, *et al.* Robust rules for optimal colorimetric sensing based on gold nanoparticle aggregation [J]. ACS Sensors, 2023, 8(4): 1827–1834.

[30] ZHANG J, LUO L, JIA C, *et al.* AuNPs-mediated precision assays for pesticide residues based on aptamers: Methodological innovations toward food safety assurance [J]. Trends in Food Science & Technology, 2025, 165: 105279.

[31] MAO J, LU Y, CHANG N, *et al.* Multidimensional colorimetric sensor array for discrimination of proteins [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 86: 56–61.

[32] VENKATESAN C, KARTHIGAIKUMAR P, PAUL A, *et al.* ECG signal preprocessing and SVM classifier-based abnormality detection in remote healthcare applications [J]. IEEE Access, 2018, 6: 9767–9773.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)