

doi: 10. 20236/j. CJIAC. 2026. 03. 010

谢莹滢, 赵鑫悦, 方自扬, 等. 基于单颗粒电感耦合等离子体质谱(SP-ICP-MS)和泊松分布原理的DNA单分子计数[J]. 中国无机分析化学, 2026, 16(3): 453-460.

XIE Yingyan, ZHAO Xinyue, FANG Ziyang, et al. DNA Single-molecule Counting Based on SP-ICP-MS and the Poisson Distribution Principle [J]. Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry, 2026, 16(3): 453-460.

基于单颗粒电感耦合等离子体质谱 (SP-ICP-MS)和泊松分布原理的 DNA单分子计数

谢莹滢¹ 赵鑫悦¹ 方自扬¹ 魏奶杰¹ 彭欣冉¹ 严晓文^{1,2*} 王秋泉¹

(1. 厦门大学 化学化工学院 化学系, 谱学分析与仪器教育部重点实验室,
福建 厦门 361005;

2. 福建省能源材料科学与技术创新实验室(IKKEM), 福建 厦门 361005)

摘要 电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)具备检测限低、分析速度快等优点,但其固有的低传输效率限制了单分子计数的实现。单颗粒电感耦合等离子体质谱(SP-ICP-MS)通过信号放大策略为单颗粒分析提供了可能。然而,基于球形核酸(SNA)的常规纳米金标签表面修饰的识别分子数量难以控制,可能捕获多个靶标分子并形成聚集体,导致脉冲信号的个数无法与目标分子建立一一对应关系,从而难以实现单分子计数。为解决此问题,本研究旨在发展一种基于泊松分布原理的SP-ICP-MS单分子计数策略,通过在反应体系中加入数量远多于靶标DNA分子的纳米金报告探针,使得每个探针捕获的靶标DNA个数控制在“0或1”的水平;进一步结合DNA夹心法,将结合了靶标DNA的纳米金报告探针提取出来用于SP-ICP-MS检测,实现通过ICP-MS单颗粒脉冲信号对DNA单分子进行计数的目的。基于此策略,成功实现对病毒DNA的SP-ICP-MS单分子计数。实验结果表明,该方法具有灵敏度高、特异性好等优点。

关键词 单颗粒电感耦合等离子体质谱;单分子计数;泊松分布

要点

- 1) 建立一种基于SP-ICP-MS和泊松分布原理的DNA单分子计数方法。
- 2) 利用泊松分布原理建立单颗粒纳米金标签与单分子DNA之间的一一对应关系。
- 3) 该方法灵敏度高、准确性好,实现了对病毒DNA的SP-ICP-MS单分子计数。

中图分类号: O657. 63 文献标志码: A 文章编号: 2095-1035(2026)03-0453-08

收稿日期: 2025-11-06 修回日期: 2025-11-15

Received: 2025-11-06 Revised: 2025-11-15

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF0710200); 国家自然科学基金资助项目(22193053, 22074127); 福建省自然科学基金资助项目(2025J01017)

Fund: Supported by the National Key R & D Program of China (2022YFF0710200); National Natural Science Foundation of China (22193053, 22074127); Natural Science Foundation of Fujian Province (2025J01017)

作者简介: 谢莹滢, 女, 硕士研究生, 主要从事基于SP-ICP-MS的单分子计数方法研究。E-mail: yyxie@stu. xmu. edu. cn

Author: XIE Yingyan, female, master's student, mainly engaged in single-molecule counting methods based on SP-ICP-MS. E-mail: yyxie@stu. xmu. edu. cn

*通信作者: 严晓文, 男, 副教授, 主要从事基于元素质谱的生物分析研究。E-mail: xwyan@xmu. edu. cn

*Corresponding author: YAN Xiaowen, male, associate professor, mainly engaged in bioanalysis based on elemental mass spectrometry. E-mail: xwyan@xmu. edu. cn

©Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry Editorial Department 2026. This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4. 0 License.

随着科学技术的进步, 生物医学、环境监测、食品安全等领域对于目标分子的检测精度和灵敏度要求越来越高^[1-2]。传统的检测技术在面对复杂样品和极低浓度目标分子时, 往往存在信号不稳定、灵敏度不足、准确性差等问题, 难以满足现代科学研究和实际应用的需求。发展准确、可靠和有效的痕量物质检测技术一直是分析科学研究的热点。单分子检测技术能够在单个分子水平上进行分析 and 测量, 从而提供比传统技术更高的灵敏度和特异性。单分子检测的关键在于建立单个分子与检测信号之间的一一对应关系, 通过阈值设定, 将得到的信号区分为背景值“0”和单分子信号“1”, 对单分子信号“1”计数即可得到目标分子的定量信息。根据此基本原理, 目前已经发展了基于光学(荧光和拉曼散射)、纳米孔电化学和原子力显微镜等各类技术的单分子检测方法^[3-6]。但是一些单分子检测方法仍然面临信号不稳定、可重复性不足、容易受到干扰等因素的影响, 定量准确性和可靠性有待提高。

电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)具有抗干扰能力强、信号稳定可靠、定量准确等优势, 是一种强大的定量分析技术。与各种功能元素标签结合, ICP-MS已经被用于蛋白质^[7-16]、核酸^[17-20]、细胞^[21-22]的分析检测。但是, 受限于极低的离子传输效率, 单个分子产生的少量离子无法从ICP离子源传输到检测器, 使得ICP-MS无法直接检测单个分子。纳米粒子中含有成千上万个金属原子, 即使在质谱的离子传输过程中损失了大部分离子, 仍有小部分离子可以从ICP

离子源到达检测器, 进而被ICP-MS检测产生脉冲信号。因此纳米粒子可以作为一种有效的信号放大单元用于单分子计数。随着质谱技术的发展, 单颗粒电感耦合等离子体质谱(SP-ICP-MS)的灵敏度和扫描速度已经得到显著提高, 具备准确快速检测尺寸小至10 nm的金纳米粒子(AuNPs)的能力^[23]。与离子云拉伸技术结合, 传统的四极杆ICP-MS已经可以实现对单颗粒的四元素同时检测^[24]。通过在纳米粒子表面修饰能够与目标分子特异性结合的识别分子, 制备出的各类纳米元素标签被用于核酸^[25-28]、蛋白质^[29-31]和金属离子^[32]的SP-ICP-MS分析检测。这些基于SP-ICP-MS的生物分析方法的普遍特点是使用球形核酸作为信号放大单元。但是这些基于球形核酸的方法难以精确控制AuNPs表面修饰的DNA数量, 导致多价DNA-AuNP的形成^[33-34], 从而难以建立AuNPs和单分子之间的一一对应关系用于单分子计数。如何建立待测单分子和纳米粒子之间准确的1:1化学计量比关系是实现基于SP-ICP-MS的单分子计数的关键。泊松分布作为一种描述稀有事件在大量独立实验中发生次数的概率统计模型^[6, 35], 通过将待测分子高度分散至海量的识别单元(如纳米粒子)中, 确保每个纳米粒子在统计上仅结合零个或一个目标分子, 可以解决以上问题。

基于上述研究背景, 本研究发展了一种基于泊松分布原理的SP-ICP-MS单分子计数策略(图1)。首先, 将过量的报告探针修饰的金纳米粒子(AuNP@RP)与目标HPV-16 DNA片段混合, 利用其数量优势确

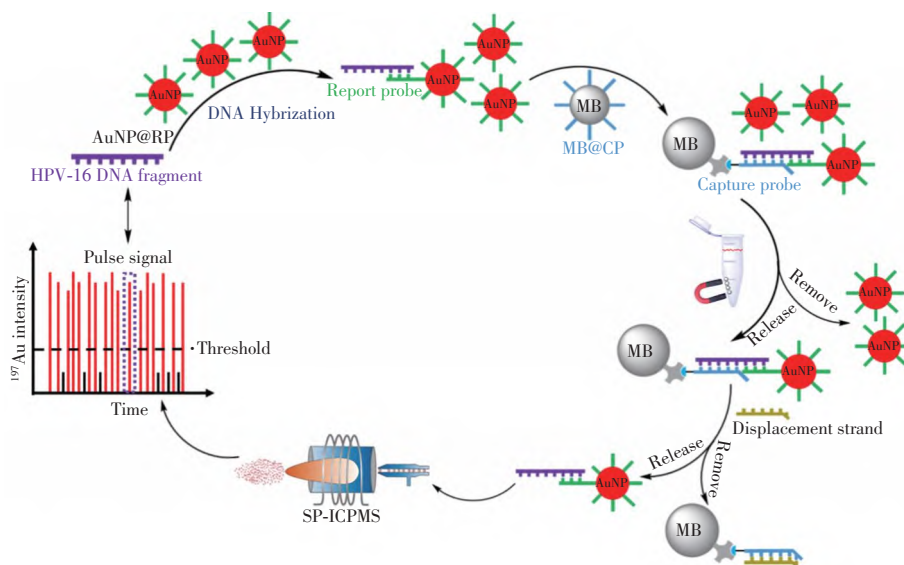


图1 基于SP-ICP-MS和泊松分布原理的DNA单分子计数原理示意图

Figure 1 Schematic diagram of the principle of DNA single-molecule counting based on SP-ICP-MS and Poisson distribution.

保每个 AuNP@RP 最多与一个 HPV-16 DNA 片段结合,形成 1:1 复合物,以此奠定准确定量的基础。随后,HPV-16 DNA 另一端与磁珠上的捕获探针进行特异性杂交,形成稳定的“捕获探针/HPV-16 DNA 片段/报告探针”三明治夹心结构,同时去除过量的纳米报告探针。进一步加入取代 DNA,将捕获的 AuNP@RP 从三明治结构中释放至溶液中,从而实现一个 HPV-16 DNA 片段释放出一个 AuNP 的对应关系。最后,并利用 SP-ICP-MS 定量检测释放的 AuNPs,最终实现对靶标分子的单分子计数。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

NexION 2000 电感耦合等离子体质谱仪(美国铂金埃尔默公司)、高速冷冻离心机(德国赫姆勒公司)、NanoBio 200 超微量分光光度计(奥谱天成科技有限公司)、台式恒温振荡器 HNY-200B(天津欧诺仪器股份有限公司)。

金纳米颗粒(50 nm)购自江苏先丰纳米材料有限公司,TCEP 购自上海皓鸿生物医药科技有限公司,Dynabeads MyOne Streptavidin C1 购自赛默飞世尔科技公司,Tween-20 购自安徽泽升科技股份有限公司,胎牛血清(FBS)、所设计的 DNA 序列 Nonspecific DNA、Report probe、Capture probe、HPV-16 DNA fragment、Displacement strand 均购于上海生工生物技术公司,DNA 序列如表 1 所示。

表 1 寡核苷酸序列

Table 1 List of oligonucleotide sequences

Oligonucleotide	Sequence(5'-3')
Nonspecific DNA (ND)	AAA AAA AAA A-(CH ₂) ₅ -SH
Report probe (RP)	SH-(CH ₂) ₆ -AAA AAA AAA ATA GTT TCT GAA GTA GAT AT
Capture probe (CP)	GAC ACG GGC AGC ACA TAA TGA AAA AAA-biotin
HPV-16 DNA fragment	TCA TTA TGT GCT GCC ATA TCT ACT TCA GAA ACTA
Displacement strand (DS)	TCA TTA TGT GCT GCC CGT GTC

1.2 仪器工作条件

NexION 2000 SP-ICP-MS 工作条件如表 2 所示。

1.3 溶液的配制

2×Buffer: 10 mmol/L Tris-HCl(pH=7.5)、1 mmol/L EDTA、2 mol/L NaCl、0.1% Tween-20。

1×Buffer: 由 2×Buffer 稀释而成。

PBS 溶液(pH=7.4): 136.7 mmol/L NaCl、

表 2 NexION 2000 SP-ICP-MS 工作条件

Table 2 NexION 2000 SP-ICP-MS operating conditions

Parameter	Values
Nebulizer	MEINHARD® plus Glass, Type C
Spray chamber	Glass cyclonic
Nebulizer flow/(L · min ⁻¹)	1.14
Plasma gas flow/(L · min ⁻¹)	18
RF Power/W	1 600
Dwell time/μs	50
Setting time/μs	0
Sample flow rate/(mL · min ⁻¹)	0.15

8.72 mmol/L KCl、8.72 mmol/L Na₂HPO₄、1.4 mmol/L KH₂PO₄。

PBST 溶液(pH=7.4): 136.7 mmol/L NaCl、8.72 mmol/L KCl、8.72 mmol/L Na₂HPO₄、1.4 mmol/L KH₂PO₄、0.05% Tween-20。

1.4 报告探针修饰金纳米颗粒的制备

本研究中报告探针修饰的金纳米颗粒通过“冷冻法”制备^[36]。首先,将报告探针(RP)和非特异 DNA(ND)分别溶解于 10 mmol/L TCEP 溶液中,使 RP 的终浓度达到 100 μmol/L,ND 的终浓度达到 2 μmol/L,并在室温下孵育 30 min;然后,取 3 μL 100 μmol/L ND 溶液和 3 μL 2 μmol/L RP 溶液,加入到 100 μL 直径为 50 nm 的 AuNPs 中,混合均匀后置于 PCR 管中。将混合溶液放入 -80 °C 冰箱中冷冻 2 h;之后,在室温下将溶液解冻。为了去除未结合的 DNA,将溶液以 2 000 g 离心 5 min,弃去上清液,然后用 1 mL 水洗涤 3 次;最后,将修饰后的 AuNP@RP 悬浮在 100 μL PBST 缓冲液中,并在 4 °C 下储存。合成后的 AuNP@RP 应在一周内使用。

1.5 捕获探针修饰磁珠的制备

首先,将磁珠在小瓶中重新悬浮,可以通过涡流振荡超过 30 s 或倾斜旋转 5 min 来实现。接着,吸取 10 μL 磁珠到 1.5 mL 离心管中。然后,向离心管中加入 1 mL 1×Buffer,并再次将磁珠分散均匀。将离心管放置在磁分离架上数分钟,使磁珠与上清液分离,随后弃去上清液。从磁分离架上取下离心管,将洗涤过的磁珠重新分散在 1 mL 1×Buffer 中,重复此过程三次以完成洗涤。然后,将磁珠分散于 20 μL 2×Buffer 中,接着加入 20 μL 浓度为 5 μmol/L 的捕获探针(CP),在室温下旋转混合 10 min。之后,加入 1 mL 1×Buffer,磁性分离 3 min,保留上清液并检测该溶液在 260 nm 处的吸光度值,计算得到 CP 结合率。用 1 mL 1×Buffer 洗涤磁珠三次并将

磁珠分散于0.1 mL PBST缓冲液中(捕获探针浓度为500 nmol/L), 4 °C保存。

1.6 基于DNA杂交的AuNP@RP捕获及释放

在杂交过程中, 首先将100 μ L AuNP@RP、100 μ L MB@CP与50 μ L HPV-16 DNA片段混合于离心管中, 并在37 °C下孵育3 h。随后, 使用0.4 mL PBST缓冲液对悬浮液进行三次洗涤, 再用0.4 mL水进行两次洗涤, 以去除多余的AuNP@RP。接着, 加入250 μ L取代DNA链(DS)与MB@CP杂交, 在37 °C下继续孵育2 h, 释放AuNP@RP。接着吸取上清液, 用超纯水稀释100倍, 使用SP-ICP-MS检测, 通过脉冲信号的个数来确定金纳米颗粒的数量, 进而计算出HPV-16 DNA片段的数量。

1.7 SP-ICP-MS测定

在每次测定前, 采用含有1 μ g/L Be、Ce、Fe、In、Li、Mg、Pb、U的调谐液对ICP-MS进行调谐, 使其获得最大灵敏度。在测试样品前, 使用2% HNO₃溶液冲洗ICP-MS的雾化室5 min, 样品超声3 min。

所有数据的采集与处理均借助Syngistix纳米应用模块完成。

2 结果与讨论

2.1 定量分析性能

进样前须对纳米颗粒的浓度进行控制, 通过考察¹⁹⁷Au⁺信号脉冲个数与不同颗粒浓度的50 nm AuNPs之间的线性关系, 以确定SP-ICP-MS单颗粒分析的动态范围。通过AuNPs在SP-ICP-MS中的脉冲信号确定阈值, 将高于该阈值的信号视为阳性脉冲信号, 其累计计数代表阳性单分子事件总数, 而低于该阈值的则被视为背景信号。如图2所示, 当颗粒浓度在 $3.95 \times 10^2 \sim 9.87 \times 10^4$ particles/mL时, 脉冲个数和颗粒浓度之间具有良好的线性关系($R^2=0.9960$)。因此, 在SP-ICP-MS进样前需要将样品稀释到此线性范围, 从而在得到脉冲信号个数后, 可以通过标准曲线公式计算得到准确的纳米颗粒数量。

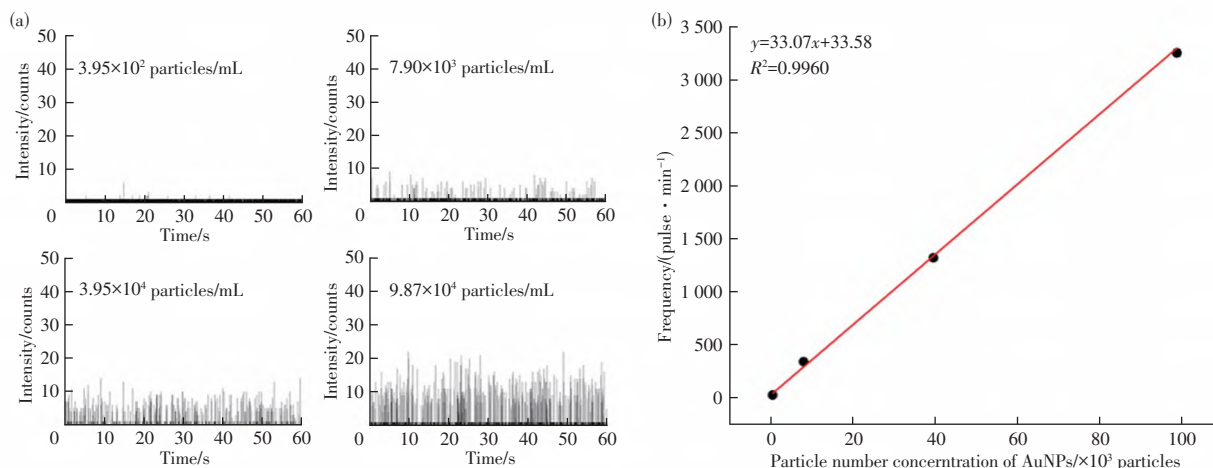


图2 (a)不同浓度的50 nm AuNPs的SP-ICP-MS谱图; (b)50 nm AuNPs的颗粒浓度与脉冲信号个数的线性关系($n=3$)

Figure 2 (a)SP-ICP-MS spectrum of 50 nm AuNPs at different concentrations; (b)Linear relationship between the particle concentration of 50 nm AuNPs and the number of pulse signals ($n=3$).

2.2 HPV-16 DNA片段的单分子计数与泊松分布统计分析

单分子的计数本质上是离散单分子事件的累积, 因此应遵循泊松分布。在泊松分布中, 均值和方差均等于 N (N 为每次测量中阳性单分子事件总数)。由此可得, 测量标准差(SD)应等于每个浓度下每次测量所得单分子事件总次数的平方根(\sqrt{N})^[6]。为了考察此方法是否遵循泊松分布, 我们在优化的实验条件下, 对多个浓度的HPV-16 DNA片段进行重复测量(图3a), 并计算了各浓度下的均值及测量误

差。如图3b所示, 各浓度下测得的单分子事件的相对标准偏差(RSD)遵循 $1/\sqrt{N}$ 的变化规律。因此可以推知: 对某一特定浓度的单次测量而言, 其精密度会随着采集点数(单次分析获得的总阳性脉冲信号数)增加而提高, 意味着通过延长测量时间以获取更多的采集点数可以实现检测精密度的提高。如图3c所示, 对于靶标分子在1 fmol/L的情况, 当累积的单分子事件从7增加到86, 采集的点数从 2×10^5 增加到 12×10^5 , RSD($n=3$)从37.75%降低到10.47%, 遵循泊松分布的理论预期趋势。如图3d所示,

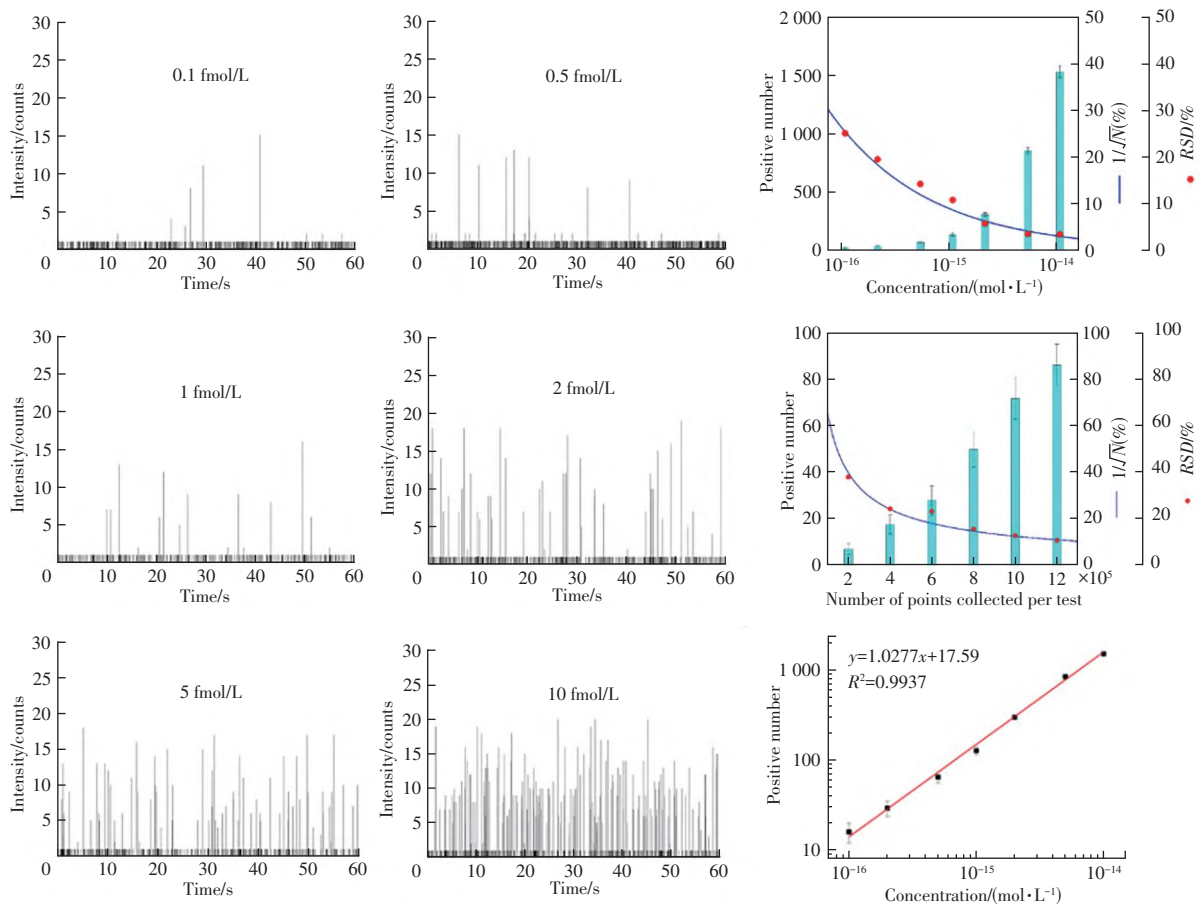


图 3 (a) 检测不同浓度 HPV-16 DNA 片段的 SP-ICP-MS 谱图; (b) 在固定 SP-ICP-MS 测试的采集点数为 12×10^5 个的条件下, 平均阳性脉冲信号(蓝色条)随 HPV-16 DNA 片段浓度的变化而变化。误差条表示标准偏差($n=3$), 同时展示了相对标准偏差(RSD, 红色点)和基于泊松统计的预期值(蓝色曲线); (c) 当 HPV-16 DNA 片段浓度为 10^{-15} mol/L 时, 平均阳性脉冲信号随采集点数的变化而变化($n=3$), 同样展示了 RSD 和基于泊松统计的预期值; (d) HPV-16 DNA 片段的标准工作曲线

Figure 3 (a) SP-ICP-MS spectra of HPV-16 DNA fragments at different concentrations; (b) Under the condition of a fixed number of acquisition points at 12×10^5 in SP-ICP-MS analysis, the average positive pulse signal (blue bars) varies with the concentration of HPV-16 DNA fragments. Error bars represent standard deviations ($n=3$), while the relative standard deviations (RSD, red dots) and the expected values based on Poisson statistics (blue curve) are also presented; (c) When the HPV-16 DNA fragment concentration was 10^{-15} mol/L, the average number of positive pulses varied with the number of acquisition points ($n=3$), the corresponding relative standard deviation (RSD) and the theoretical value predicted by Poisson statistics are also shown; (d) Standard calibration curve of the HPV-16 DNA fragment.

其线性范围为 0.1~10.0 fmol/L, 回归方程为 $y=1.0277x+17.59$, $R^2=0.9937$, 根据 $3\sigma/\text{slope}$ 计算出方法的检测限为 61.2 amol/L, 方法的精密为 10.7% (HPV-16 DNA 片段浓度为 1 fmol/L, $n=3$)。这些结果表明, 该方法在此浓度范围内遵循泊松分布, 灵敏度高、准确性好, 可用于病毒 DNA 的 SP-ICP-MS 单分子计数。

3 结论

本研究以 HPV-16 DNA 片段为模型, 成功构建了一种无需核酸扩增的单分子计数方法。该方法整

合了 DNA 夹心杂交与 toehold 介导的链置换反应, 并基于泊松分布原理, 确保了单个 AuNP 与单个靶标 DNA 分子之间的一一对应关系。在此基础上, 通过直接计量 SP-ICP-MS 中的脉冲信号数量, 即可实现对目标 DNA 的准确计数。实验结果表明, 本方法对 HPV-16 DNA 的检测灵敏度高, 线性范围为 0.1~10.0 fmol/L, 检出限低至 61.2 amol/L。尽管本方法展现出优异的分析性能, 但其检测流程涉及多步杂交、磁珠分离与链置换反应, 操作略显繁琐。为此, 我们将开发新型信号产生方式, 以简化操作步骤。同时, 为验证该策略的普适性, 我们计划将此原理进

一步扩展至其他生物标志物(如蛋白质或小分子)的检测。

参考文献

- [1] RISSIN D M, KAN C W, CAMPBELL T G, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(6): 595-599.
- [2] SU Z Q, LI T, WU D, et al. Recent progress on single-molecule detection technologies for food safety[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(2): 458-469.
- [3] GOODING J J, GAUS K. Single-molecule sensors: challenges and opportunities for quantitative analysis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(38): 11354-11366.
- [4] ZHAO D Y, LIU S Y, GAO Y. Single-molecule manipulation and detection[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2018, 50(3): 231-237.
- [5] CHAUHAN N, SAXENA K, JAIN U. Single molecule detection; from microscopy to sensors[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 209(Pt A): 1389-1401.
- [6] BI X Y, CZAJKOWSKY D M, SHAO Z F, et al. Digital colloid-enhanced Raman spectroscopy by single-molecule counting[J]. *Nature*, 2024, 628(8009): 771-775.
- [7] ZHANG C, WU F B, ZHANG Y Y, et al. A novel combination of immunoreaction and ICP-MS as a hyphenated technique for the determination of thyroid-stimulating hormone (TSH) in human serum[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001, 16: 1393-1396.
- [8] HU S H, ZHANG S C, HU Z C, et al. Detection of multiple proteins on one spot by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry and application to immuno-microarray with element-tagged antibodies[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(3): 923-929.
- [9] BANDURA D R, BARANOV V I, ORNATSKY O I, et al. Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(16): 6813-6822.
- [10] YAN X W, XU M, YANG L M, et al. Absolute quantification of intact proteins via 1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7-trisacetic acid-10-maleimidoethylacetamide-europium labeling and HPLC coupled with species-unspecific isotope dilution ICP-MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(4): 1261-1269.
- [11] YAN X W, YANG L M, WANG Q Q. Lanthanide-coded protease-specific peptide-nanoparticle probes for a label-free multiplex protease assay using element mass spectrometry: a proof-of-concept study[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2011, 50(22): 5130-5133.
- [12] YAN X W, LUO Y C, ZHANG Z B, et al. Europium-labeled activity-based probe through click chemistry: absolute serine protease quantification using ¹⁵³Eu isotope dilution ICP/MS[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(14): 3358-3363.
- [13] YIN X, YANG B, CHEN B B, et al. Multifunctional gold nanocluster decorated metal-organic framework for real-time monitoring of targeted drug delivery and quantitative evaluation of cellular therapeutic response[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(16): 10596-10603.
- [14] LIU X, CHENG Z H, ZHANG S Q, et al. Amplification strategy of silver nanoclusters with a satellite-nanostructure for substrate-free assay of alkaline phosphatase by ICP-MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(5): 3769-3774.
- [15] JIN X, YANG L M, YAN X W, et al. Screening platform based on inductively coupled plasma mass spectrometry for β -site amyloid protein cleaving enzyme 1 (BACE1) inhibitors[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2021, 12(7): 1093-1099.
- [16] YAN X W. Covalent targeting drug mediated specific lanthanide tagging towards in situ bruton's tyrosine kinase quantification using ICP-MS[J]. *Atomic Spectroscopy*, 2024, 45(2): 74-82.
- [17] HAN G J, ZHANG S C, XING Z, et al. Absolute and relative quantification of multiplex DNA assays based on an elemental labeling strategy[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(5): 1466-1471.
- [18] LUO Y C, YAN X W, HUANG Y S, et al. ICP-MS-based multiplex and ultrasensitive assay of viruses with lanthanide-coded biospecific tagging and amplification strategies[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(20): 9428-9432.
- [19] CHEN P P, WU P, ZHANG Y X, et al. Strand displacement-induced enzyme-free amplification for label-free and separation-free ultrasensitive atomic fluorescence spectrometric detection of nucleic acids and proteins[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(24): 12386-12392.
- [20] CHEN B B, XIAO G Y, HE M, et al. Elemental mass spectrometry and fluorescence dual-mode strategy for ultrasensitive label-free detection of HBV DNA[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(27): 9454-9461.
- [21] BENDALL S C, SIMONDS E F, QIU P, et al. Single-

- cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum[J]. *Science*, 2011, 332(6030): 687-696.
- [22] HAN G J, SPITZER M H, BENDALL S C, et al. Metal-isotope-tagged monoclonal antibodies for high-dimensional mass cytometry[J]. *Nature Protocols*, 2018, 13(10): 2121-2148.
- [23] WOODS G, WILBUR S. Analysis of 10 nm gold nanoparticles using the Agilent 7800 ICP-MS[EB/OL]. <http://www.agilent.com/chem>.
- [24] LV Z X, YAN X L, LIU Z, et al. A CH₄-driven ion cloud-stretched approach enables ICP-qMS for multiplex single-cell analysis[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2024, 30(71): e202402289. DOI: 10.1002/chem.202402289.
- [25] HAN G J, XING Z, DONG Y H, et al. One-step homogeneous DNA assay with single-nanoparticle detection[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2011, 50(15): 3462-3465.
- [26] ZHANG S X, HAN G J, XING Z, et al. Multiplex DNA assay based on nanoparticle probes by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(7): 3541-3547.
- [27] LI B R, TANG H, YU R Q, et al. Single-nanoparticle ICP-MS for sensitive detection of uracil-DNA glycosylase activity[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(24): 8381-8385.
- [28] JIANG M, ZHOU J, XIE X B, et al. Single nanoparticle counting-based liquid biopsy for cancer diagnosis[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(44): 15433-15439.
- [29] ZHOU Y, CHEN Z Q, ZENG J X, et al. Direct infusion ICP-qMS of lined-up single-cell using an oil-free passive microfluidic system[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(7): 5286-5293.
- [30] ARNETT L P, RANA R, CHUNG W W, et al. Reagents for mass cytometry[J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(3): 1166-1205.
- [31] HUANG Z L, XIE X B, WU Y, et al. Breaking barcode limits: metal nanoparticle lego brick self-assembly for high-throughput screening[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2025, 147(6): 4904-4914.
- [32] XING Y Q, HAN J, WU X, et al. Aggregation-based determination of mercury(II) using DNA-modified single gold nanoparticle, T-Hg(II)-T interaction, and single-particle ICP-MS[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 187(1): 56. DOI: 10.1007/s00604-019-4057-6.
- [33] MIRKIN C A, LETSINGER R L, MUCIC R C, et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials[J]. *Nature*, 1996, 382(6592): 607-609.
- [34] CUTLER J I, AUYEUNG E, MIRKIN C A. Spherical nucleic acids[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(3): 1376-1391.
- [35] RISSIN D M, WALT D R. Digital concentration readout of single enzyme molecules using femtoliter arrays and Poisson statistics[J]. *Nano Letters*, 2006, 6(3): 520-523.
- [36] LIU B W, LIU J W. Freezing directed construction of bio/nano interfaces: reagentless conjugation, denser spherical nucleic acids, and better nanoflares[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(28): 9471-9474.

DNA Single-molecule Counting Based on SP-ICP-MS and the Poisson Distribution Principle

XIE Yingyan¹, ZHAO Xinyue¹, FANG Ziyang¹, WEI Naijie¹, PENG Xinran¹, YAN Xiaowen^{1,2*}, WANG Qiuquan¹

(1. MOE Key Laboratory of Spectrochemical Analysis & Instrumentation, Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering,

Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China;

2. Innovation Laboratory for Sciences and Technologies of Energy Materials of Fujian Province (IKKEM), Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) provides advantages including low detection limits and rapid analysis, but its inherently low transmission efficiency restricts the realization of single-molecule counting. Single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) provides the possibility of single-particle analysis through signal amplification strategies. However, conventional methods based on spherical nucleic acids (SNA) have significant limitations; the number of recognition molecules modified on the surface of gold nanoparticle (AuNP) labels is difficult to control, and a single AuNP is often surface-modified with multiple DNA probes, potentially capturing multiple target molecules and forming aggregates. This results in an inability to

establish a one-to-one correspondence between the number of pulse signals and the target molecules, making single-molecule counting difficult. To address this issue, this study aims to develop an SP-ICP-MS single-molecule counting strategy based on the Poisson distribution principle. By adding a number of gold nanoparticle reporter probes far exceeding the number of target DNA molecules to the reaction system, the number of target DNA molecules captured by each probe is controlled at a '0 or 1' level. Furthermore, Further, combined with the DNA sandwich method and toehold mediated chain replacement reaction, the gold nano report probe combined with the target DNA was released from the sandwich structure to the solution, so as to realize the corresponding relationship between an HPV-16 DNA fragment and an AuNP. Finally, SP-ICP-MS was used to quantitatively detect the released AuNPs, and finally the purpose of counting single DNA molecules was achieved. Based on this strategy, we successfully achieved single-molecule counting of viral DNA using SP-ICP-MS. This method utilizes SP-ICP-MS to count the pulse signals of positive gold nanoparticles exceeding the background threshold, thereby directly converting the pulse frequency into the absolute molecular count of target HPV-16 DNA, without relying on nucleic acid amplification steps such as polymerase chain reaction (PCR), rolling circle amplification (RCA), or strand displacement amplification (SDA). The experimental results show that this method has high sensitivity for the detection of HPV-16 DNA, with a linear range of 0.1–10.0 fmol/L and a detection limit as low as 61.2 amol/L.

Keywords single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry; single-molecule counting; Poisson distribution

HIGHLIGHTS

- 1) A DNA single-molecule counting method based on SP-ICP-MS and the Poisson distribution principle was established.
- 2) A one-to-one correspondence between single-particle gold nanoparticle tags and single DNA molecules was established using the Poisson distribution principle.
- 3) This method has high sensitivity and accuracy, and realizes SP-ICP-MS single-molecule counting of viral DNA.