

基于探针技术的广义加标校正策略用于复杂体系中 ATP 的定量检测

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2021.04.002

李旻熹 陈增萍

湖南大学

化学化工学院

化学生物传感与计量学

国家重点实验室

湖南 长沙 410082

摘要: 以荧光标记的 ATP 适配体探针, 结合广义标准加入多元校正策略, 对复杂生物样本中 ATP 的含量进行准确检测。实验结果表明, ATP 浓度在 5~65 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 反应体系的荧光信号强度比值 (F/F_0) 与 ATP 的浓度具有良好的线性关系, 线性相关系数 R^2 为 0.987。选择细胞裂解液和血浆作为复杂样本模拟体系, 对其中的 ATP 进行检测, 与传统的单变量模型和 PLS 模型相比, 基于探针技术的广义标准加入多元校正模型 ($\text{GSAM}_{\text{probe}}$) 仅需要 1 个标准加入样本, 即可实现对实际待测样本中目标物的准确定量。该校正策略有望应用于其他微量复杂样本或珍惜样本中目标物的快速、准确的定量分析。

关键词: 荧光探针; 广义标准加入法; ATP; 复杂生物体系; 定量分析

中图分类号: O65

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2021)04-009-07

引文格式: 李旻熹, 陈增萍. 基于探针技术的广义加标校正策略用于复杂体系中 ATP 的定量检测 [J]. 包装学报, 2021, 13(4): 9-15.

1 研究背景

三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 是一种高能磷酸化合物, 作为生物体中化学能的主要载体, 在调节细胞代谢、细胞内信号的传递和各种生理生化过程中都具有至关重要的作用^[1-2]。已有报道表明, 许多人体疾病如低血糖、缺氧、贫血、神经再生紊乱、恶性肿瘤等与 ATP 的异常代谢有关^[3-4]。因此, 准确检测生物样本中 ATP 的含量在生化研究和临床诊断中具有重要意义。

核酸适配体 (aptamer) 是对目标物具有特异性

识别能力的单链 DNA 或 RNA。目标可以是小分子、蛋白质、病毒、细胞等^[5-7]。由于适配体具有良好的选择性和稳定性, 目前已经发展了多种基于适配体的 ATP 检测方法, 如: 化学比色法^[8]、电化学法^[9]、化学发光法^[10]、荧光光谱法^[11-13]等。其中, 利用荧光光谱法对生物体系中 ATP 进行定量检测, 充分结合了适配体特异性识别能力和荧光光谱灵敏度高、操作简单、快速的优点^[14]。

荧光光谱法, 通常是根据标准样本的光谱数据, 以特定波长下的光谱强度对目标物浓度建立单变量模型, 从而对待测样本中目标物浓度进行定量分析。

收稿日期: 2021-05-08

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2018JJ3114)

作者简介: 李旻熹 (1992-), 女, 湖南长沙人, 湖南大学博士生, 主要研究方向为光谱校正分析和生物小分子传感, E-mail: liminxi@hnu.edu.cn

通信作者: 陈增萍 (1972-), 男, 江西萍乡人, 湖南大学教授, 博士生导师, 主要从事化学计量学, 复杂体系的光谱定量分析研究, E-mail: zpchen@hnu.edu.cn

而在实际待测体系中（如细胞液、血浆等），由于组成成分较为复杂，普遍存在背景干扰和基质效应。背景干扰可以通过减去待测样本中空白溶液的光谱贡献^[15]或将标准样本和待测样本的光谱投影到与待测样本背景光谱所张成空间的正交补空间^[16]上进行消除。此外，对样本进行适当预处理，可以一定程度上缓解因基质不同导致的光谱强度与目标物浓度之间严重偏离单变量校正模型的问题；但繁琐耗时的处理过程，在一定程度上会抵消荧光检测分析快速的优势。分析化学领域通常采用经典标准加入法进行处理^[17]。广义标准加入法（generalized multivariate standard addition method, GSAM），在响应值和被分析物浓度间建立多项式关系模型：

$$R = CK = \Delta CK + C_0 K,$$

式中 R 、 K 、 C 、 ΔC 和 C_0 分别为响应值矩阵、系数矩阵、浓度矩阵、标准加入矩阵和未知浓度矩阵。

利用多次线性回归，可以同时进行多组分分析求解^[18-19]。标准加入法通常与单变量或多变量校正模型结合使用^[20-21]，其要求被测样本不包含具有光谱响应的背景干扰或具有和待测样本相同的基质成分但不含目标物的空白溶液。然而以上两点在实际检测过程中通常很难达到。因此采用经典标准加入法与单变量模型相结合的方法，对实际待测样本中目标物进行定量分析可能产生明显误差。此外，经典标准加入法通常需要4个以上加标样本，限制了对微量样本的定量分析。本文通过荧光标记的ATP适配体探针，结合基于探针技术的广义标准加入多元校正策略^[22]，解决复杂体系对荧光信号的干扰问题，从而实现复杂体系中ATP的快速准确定量分析。

2 检测原理与方法

2.1 检测原理

基于探针技术的ATP检测原理如图1所示。实验中使用的DNA序列分别为3末端标记6-羧基荧光素（6-carboxy-fluorescein, FAM）的探针序列ATP-F和5末端标记黑洞猝灭基团（black hole quencher 1, BHQ1）的ATP-Q。其中，ATP-F为ATP适配体，从3端开始与ATP-Q部分互补。

反应体系中未加入ATP时，两条DNA杂交形成双链结构，FAM的荧光信号被BHQ1猝灭。当加入ATP反应时，ATP与ATP-F结合，使双链结构发生解离，FAM的荧光信号得到恢复。

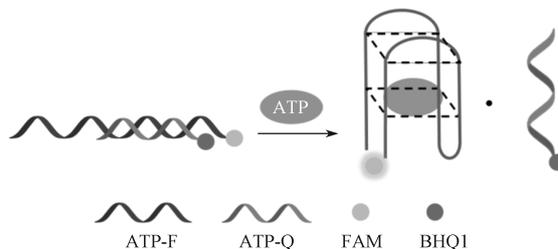


图1 基于探针技术的ATP检测原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram for the detection of ATP based on probe technique

2.2 数据分析方法

为了准确测定实际样本中ATP的含量，以标准样本的荧光光谱建立了GSAM_{probe}模型。通过加标样本的最小平均绝对百分比误差（mean absolute percentage error, MAPE）来优化并确定针对细胞裂解液和血清样本的GSAM_{probe}模型参数。GSAM_{probe}的详细说明如下。

假设 x_i ($i=1, 2, \dots, N$) 是第 i 个标准样本的荧光光谱响应，它可以表示为ATP探针序列（ATP-F）3末端标记的FAM荧光基团的信号与背景信号的线性组合，即

$$x_i = c_{FAM,i} \cdot r_{FAM} + b_i, \quad (1)$$

式中： $c_{FAM,i}$ 为第 i 个样本中FAM的浓度；

r_{FAM} 为单位浓度的FAM荧光响应；

b_i 为反应溶液中可能存在的背景干扰， b_i 对所有样本都是恒定的。

当目标物质ATP的浓度越高时，会与越多的探针序列形成复合物，破坏原本与互补序列（ATP-Q）形成的双链结构，使FAM荧光信号得到恢复。因此，第 i 个样本中FAM的浓度 $c_{FAM,i}$ 与ATP的浓度 $c_{ATP,i}$ 之间存在线性关系，可以表示为

$$c_{FAM,i} = k_1 \cdot c_{ATP,i}$$

因此，可以将式（1）改写为

$$x_i = k_1 \cdot c_{ATP,i} \cdot r_{FAM} + b_i \quad (2)$$

实际待测样本和它的加标样本可类似地表示为

$$x_{\text{test}} = g \cdot k_1 \cdot c_{ATP,\text{test}} \cdot r_{FAM} + b_t, \quad (3)$$

$$x_{\text{add}} = g \cdot k_1 \cdot (c_{ATP,\text{test}} + \Delta c) \cdot r_{FAM} + b_t \quad (4)$$

式（3）~（4）中： x_{test} 为实际待测样本荧光光谱响应；

x_{add} 为标准加入样本荧光光谱响应；

g 为由于基质效应引起的荧光信号差异的参数；

$c_{ATP,\text{test}}$ 为实际待测样本中ATP的浓度；

Δc 为添加到加标样本中的ATP标准溶液浓度；

b_t 为待测样本的背景干扰。

待测样本和标准样本背景干扰的差异, 可以通过将 \mathbf{x}_i 和 \mathbf{x}_{test} 投影到 \mathbf{b}_i 所张成空间的正交互补空间来缩小。

通过偏最小二乘法 (partial least-square method, PLS), 在变换后的 \mathbf{x}_i 上建立多元校正模型^[23]。待测样本的 PLS 模型对 ATP 浓度的预测结果可以表示为

$$\hat{c}_{\text{ATP, test}} = g \cdot c_{\text{ATP, test}} + e_0,$$

式中 e_0 为待测样本 PLS 模型的预测误差。

加标样本 PLS 模型的预测浓度为

$$\hat{c}_{\text{add}} = g \cdot (c_{\text{ATP, test}} + \Delta c) + e_i,$$

式中 e_i 为加标样本 PLS 模型的预测误差。

将 \hat{c}_{add} 与 $\hat{c}_{\text{ATP, test}}$ 相减得

$$\hat{c}_{\text{add}} - \hat{c}_{\text{ATP, test}} = g \cdot \Delta c + e_i - e_0. \quad (5)$$

g 值可以通过优化公式 (6) 来估算。

$$\begin{aligned} \min f(g) &= \min \sum_{i=1}^M (e_i - e_0)^2 = \\ &= \min_g \sum_{i=1}^M (\hat{c}_{\text{add}} - \hat{c}_{\text{cDNA, test}} - g \cdot \Delta c)^2, \quad (6) \end{aligned}$$

式中 M 为标准加入样本个数。

当 g 值为 $\sum_{i=1}^M [(\hat{c}_{\text{add}} - \hat{c}_{\text{cDNA, test}}) \cdot \Delta c] / \sum_{i=1}^M (\Delta c)^2$ 时,

式 (6) 取得最小值。因此实际待测样本中 ATP 的浓度可以表示为

$$c_{\text{ATP, test}} = \hat{c}_{\text{ATP, test}} / g.$$

GMSA_{probe} 的模型参数 (PLS 的最佳组分数) 可以通过加标样本的最小平均绝对百分比误差

$$MAPE = \sum_{i=1}^M \frac{|(\hat{c}_{\text{add}} - \hat{c}_{\text{cDNA, test}}) - \Delta c|}{\Delta c} / M$$

进行优化。

3 实验

3.1 实验试剂与药品

核酸探针由大连宝生物工程有限公司合成, 采用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 纯化方式, 具体序列为 (ATP-F: 5'-AACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT-FAM-3', ATP-Q: 5'-BHQ1-ACCTTCCTCCGCAA-3')。ATP 溶液、三磷酸鸟苷 (guanosine-5'-triphosphate, GTP) 溶液、三磷酸胞苷 (cytidine-5'-triphosphate, CTP) 溶液、三磷酸尿苷 (uridine-5'-triphosphate,

UTP) 溶液, 浓度均为 100 mmol/L, 购于上海生工生物工程股份有限公司。三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 纯度为 99.9%)、氯化钠 (NaCl)、氯化镁 (MgCl₂)、盐酸 (HCl), 均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。健康人血清购于长沙血站中心。肝癌细胞 (HepG2) 按常规方法培养。实验中未特别说明的试剂纯度均为分析纯。所有试剂无需进一步纯化, 实验用水均为灭菌水。

3.2 实验仪器及参数设置

pH 计, PHS-3C 型, 上海仪电科学仪器有限公司。

圆二色光谱仪, MOS-500 型, 法国 Bio-Logic 公司。圆二色测试条件设置: 光谱狭缝宽度为 5 nm, 扫描波长范围为 210~320 nm, 光谱扫描速度为 300 nm/min, 间隔 0.5 nm 记录一个数据点, 使用石英比色皿 (10 mm, 3.5 mL), 缓冲溶液的背景从圆二色光谱中扣除。

荧光分光光度计, F-7000 型, 日本 Hitachi 公司。荧光测试参数设置: 光电倍增管 (photomultiplier tube, PMT) 电压为 900 V, 激发和发射的狭缝宽度均为 5 nm, 激发波长为 480 nm, 发射波长范围为 500~650 nm, 光谱扫描速度为 240 nm/min, 间隔 1 nm 记录一个数据点。

3.3 实验过程

1) 细胞裂解液制备。选胰酶消化密度为 $10^5 \sim 10^6$ mL⁻¹ 的细胞, 加入 3 mL 的生理盐水, 移液器吹打混匀后 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞; 用 3 mL 的生理盐水漂洗一次, 再次 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞; 上清液弃去, 加入 200 μ L 超纯水裂解细胞, 冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。待完全解冻后, 细胞将全部裂解。

2) 模拟实际样本制备。将细胞裂解液和血清分别稀释 100 倍, 向其中添加 ATP 母液, 模拟样本中 ATP 最终浓度为 200 μ mol/L。

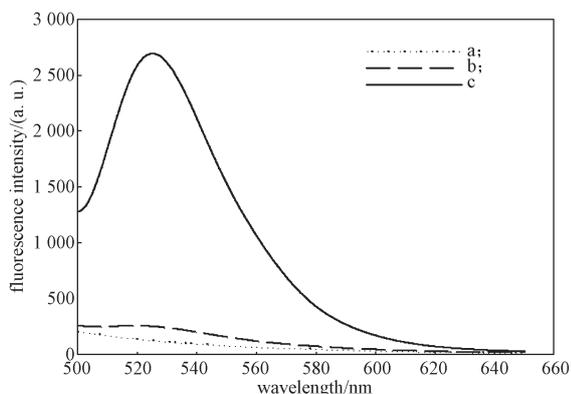
3) 标准样本制备。将 ATP-F 和 ATP-Q 分别加入适量灭菌水溶解, 配制成浓度为 1 μ mol/L 的工作液。将浓度为 100 mmol/L 的 ATP 母液加入适量灭菌水, 配制成 200 μ mol/L 的 ATP 工作液。将 10 μ L ATP-F 工作液、20 μ L ATP-Q 工作液、20 μ L Tris-HCl 缓冲液 (200 mmol/L Tris, 1.5 mol/L NaCl, 50 mmol/L MgCl₂, pH 值为 7.2)、不同体积 ATP 工作液充分混匀, 并加灭菌水定容至 200 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 2 h。最终标准样本浓度分别为 0, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 μ mol/L。

4) 实际样本配制。将 10 μL ATP-F 工作液、20 μL ATP-Q 工作液、20 μL Tris-HCl 缓冲液、不同体积 ATP 工作液、20 μL HepG2 细胞裂解液或血清模拟样本, 充分混匀并加灭菌水定容至 200 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 2 h。细胞样本和血清样本中添加的 ATP 最终浓度分别为 10, 30 $\mu\text{mol/L}$ 。

4 结果与讨论

4.1 实验可行性

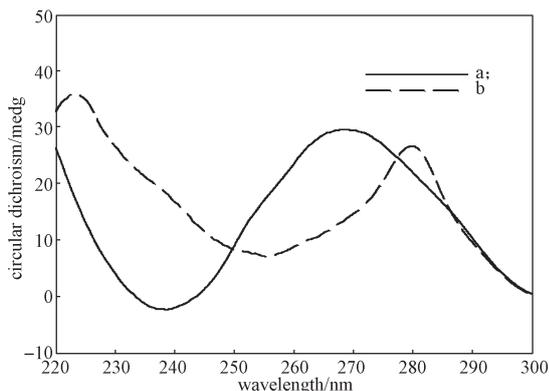
通过荧光光谱和圆二色光谱, 对实验的可行性分别进行了验证。不同溶液的荧光光谱和圆二色光谱分别如图 2 和图 3 所示。



注: a—缓冲液; b—ATP-F + ATP-Q 溶液; c—ATP-F + ATP-Q + ATP 溶液 ($c_{\text{ATP-F}}=50 \text{ nmol/L}$, $c_{\text{ATP-Q}}=100 \text{ nmol/L}$, $c_{\text{ATP}}=1 \text{ mmol/L}$)

图 2 不同溶液的荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of different mixtures



注: a—ATP-F + ATP-Q 溶液; b—ATP-F + ATP-Q + ATP 溶液 ($c_{\text{ATP-F}}=2 \mu\text{mol/L}$, $c_{\text{ATP-Q}}=4 \mu\text{mol/L}$, $c_{\text{ATP}}=2 \text{ mmol/L}$)

图 3 不同溶液的圆二色光谱

Fig. 3 Circular dichroism spectra of different mixtures

从图 2 的荧光光谱图中可以看出, 反应体系中未

加入 ATP 反应时, 520 nm 处未发现明显的荧光信号, 与缓冲溶液的背景信号基本一致, 说明 FAM 的荧光信号被 BHQ1 完全猝灭。当加入 ATP 反应时, 520 nm 处有明显的荧光信号, 说明 ATP 与适配体结合破坏了双链结构的稳定性, 使 FAM 的荧光信号得到恢复。图 3 中的圆二色光谱也进一步验证了上述结论。

从图 3 的圆二色光谱图可看出, 反应体系中未加入 ATP 反应时, 在 243 nm 和 276 nm 处获得很强的圆二色吸收峰, 这是 DNA 双链的特征峰。加入 ATP 反应后, 光谱形状发生了改变, 圆二色吸收峰迁移至 258 nm 和 281 nm 处。根据文献 [24] 报道, 这是由于 ATP 和适配体作用后, 导致适配体形成反平行 G-四联体结构的特征峰。这表明 ATP 可以与互补链 ATP-Q 竞争结合适配体 ATP-F 用于 ATP 浓度的检测。

4.2 DNA 杂交比例优化

ATP-F 和 ATP-Q 的杂交比例对 ATP 的检测性能有很大影响。ATP-Q 对 ATP-F 的杂交比值过小, 会导致 FAM 信号猝灭不完全, 使得背景信号增大; 反之比值过大, 会影响 ATP 与适配体的结合。实验中, 固定 ATP-F 浓度为 50 nmol/L 和不同浓度的 ATP-Q 杂交, 记录加入 ATP (1 mmol/L) 反应后, 荧光信号强度 (F) 与空白样本荧光信号强度 (F_0) 的比值, 结果如图 4 所示。

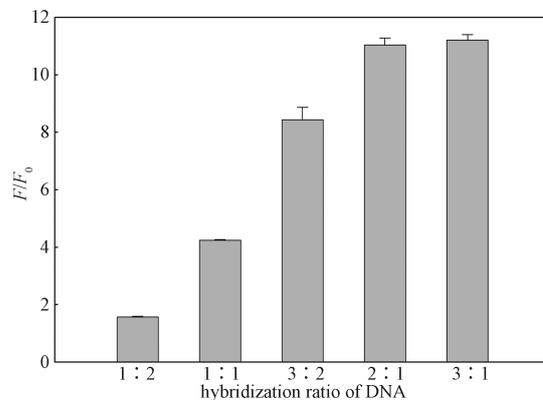


图 4 荧光强度比值与 DNA 杂交浓度比的关系

Fig. 4 Relationship between fluorescence intensity ratio and DNA hybridization ratio

由图 4 可知, 当 ATP-Q 和 ATP-F 杂交浓度比为 2:1 时, 荧光信号比值达到较大值, 且当杂交浓度比继续增大, 信号比变化趋于平衡。因此, 最终选择 ATP-Q 和 ATP-F 杂交浓度比为 2:1。

4.3 反应时间优化

在 ATP-F 浓度为 50 nmol/L 和 ATP-Q 浓度为 100

nmol/L 的 5 个平行样本中, 均加入浓度为 1 mmol/L 的 ATP 分别反应不同时间, 并记录反应后荧光信号强度 (F) 与空白样本荧光信号强度 (F_0) 的比值, 结果如图 5 所示。由图 5 可知, 当反应时间为 2 h 时, 荧光信号强度比值最大, 因此最终选择 2 h 作为与 ATP 的反应时间。

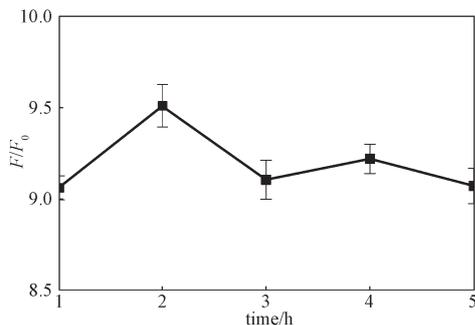


图 5 荧光强度比值与反应时间的关系

Fig. 5 The relationship between fluorescence intensity ratio and reaction time

4.4 反应体系对 ATP 的选择性

为了验证实验反应体系对 ATP 的选择性, 选择了 3 种常见的 ATP 类似物 (CTP、GTP、UTP) 以及类似物与 ATP 的混合物代替 ATP 加入到反应体系中。通过比较反应后荧光信号强度 (F) 与空白样本荧光信号强度 (F_0) 的比值变化, 判断反应体系对 ATP 的选择性, 结果如图 6 所示。

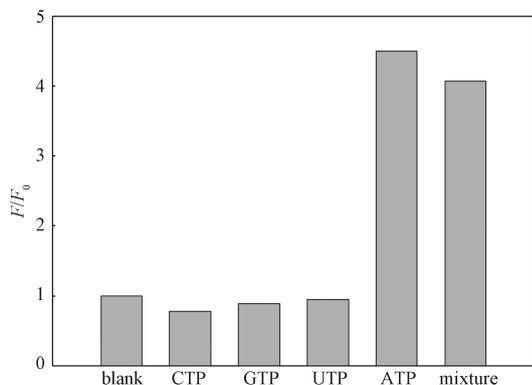


图 6 不同溶液反应前后荧光强度比值对比

Fig. 6 Comparison of fluorescence intensity ratio before and after the reaction of different solutions

由图 6 可知, 添加 ATP 类似物 (浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$) 不会引起明显的光谱强度变化, 和空白样本的荧光信号强度比值基本一致。添加 ATP (浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$) 能使反应前后的荧光比值发生明显变化, 类似物与 ATP 的混合物同样能引起荧光比的变化,

并且比值基本与 ATP 相同, 说明类似物对反应体系不会造成显著干扰。这说明该反应体系对 ATP 具有良好的选择能力。

4.5 F/F_0 随 ATP 浓度线性变化的范围

在反应体系中改变 ATP 的浓度, 考察加入 ATP 和未加入 ATP 反应时荧光信号强度的比值 (F/F_0) 与 ATP 浓度的关系, 结果如图 7 所示。由图 7 可知, 在 ATP 浓度为 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 的范围内, F/F_0 随 ATP 浓度的增大而逐渐增大; ATP 的浓度进一步增大至 100~200 $\mu\text{mol/L}$ 范围时, F/F_0 趋于平稳, 没有明显改变。如插图所示, 在 5~65 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内, F/F_0 与 ATP 的浓度具有良好的线性关系, 相关系数为 $R^2=0.987$ 。

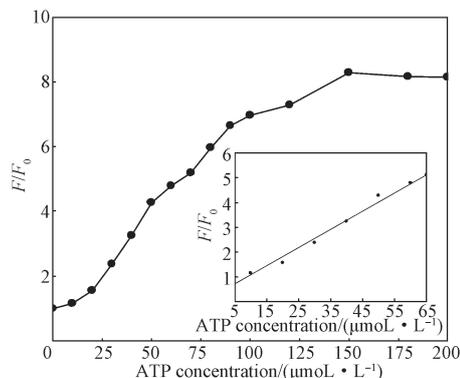


图 7 荧光信号强度比与 ATP 浓度的关系

Fig. 7 The relationship between fluorescence intensity ratio and ATP concentration

4.6 实际样本中 ATP 的定量分析

用传统单变量模型、偏最小二乘法 (PLS) 和 $\text{GSAM}_{\text{probe}}$ 模型, 对 HepG2 细胞裂解液和血浆样本进行检测, 结果如表 1~2 所示。

表 1 使用 1 个标准加入样本时 3 种方法的检测结果

Table 1 Quantitative results of 3 methods when using 1 standard addition sample

样本名称	检测出的 ATP 浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	PLS	单变量模型	$\text{GSAM}_{\text{probe}}$
肝癌细胞裂解液	12.76 (0.191)	11.22 (0.371)	9.24 (1.091)
血浆	13.05 (0.585)	11.64 (0.475)	10.27 (0.597)

注: 括号内数据为标准偏差, 下同。

表 2 使用 2 个标准加入样本时 3 种方法的检测结果

Table 2 Quantitative results of 3 methods when using 2 standard addition samples

样本名称	检测出的 ATP 浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	PLS	单变量模型	$\text{GSAM}_{\text{probe}}$
肝癌细胞裂解液	12.76 (0.191)	11.22 (0.371)	10.58 (1.229)
血浆	13.05 (0.585)	11.64 (0.475)	10.17 (0.464)

由表 1 可知, 由于细胞裂解液和血浆会对光谱信号强度产生干扰, PLS 和传统单变量模型的预测结果与实际含量存在明显偏差; 相比之下, 仅使用 1 个标准加入样本的 $GSAM_{probe}$ 模型, 能准确预测细胞液和血浆样本中 ATP 的浓度, 定量分析结果优于其他两种方法。

对比表 1 和表 2 的结果可知, 增加标准加入样本的数量, 能适当提高 $GSAM_{probe}$ 模型定量检测结果的准确性; 但 1 个标准加入样本足以使 $GSAM_{probe}$ 模型提供令人满意的定量分析结果, 这对于检测微小体积或珍惜样本很有意义。

5 结语

用光化学生物传感技术对复杂样本中目标物进行定量分析时, 由于样本组成成分通常较为复杂, 光谱信号容易受到样本中未知物质的干扰, 从而对定量检测结果的准确性造成影响。本文利用基于探针技术的广义标准加入多元校正策略, 结合荧光标记的 ATP 探针, 以细胞裂解液和血浆为复杂样本模拟体系, 对其中的 ATP 进行定量分析。实验结果表明, 1 个标准加入样本足以解决复杂实际样本对荧光信号造成干扰的问题, 且能对实际样本中 ATP 的浓度进行准确定量。同时, 相较于传统标准加入法, 该方法所需的待测样本体积更小。因此, 该校正策略有望应用于其他微量复杂样本或珍惜样本中目标物的快速、准确地定量分析。

参考文献:

- [1] ZHU X, ZHANG B, YE Z, et al. An ATP-Responsive Smart Gate Fabricated with a Graphene Oxide-Aptamer-Nanochannel Architecture[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(4): 640-643.
- [2] SONG Q W, PENG M S, WANG L, et al. A Fluorescent Aptasensor for Amplified Label-Free Detection of Adenosine Triphosphate Based on Core-Shell Ag@SiO₂ Nanoparticles[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 77: 237-241.
- [3] BUSH K T, KELLER S H, NIGAM S K. Genesis and Reversal of the Ischemic Phenotype in Epithelial Cells[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2000, 106(5): 621-626.
- [4] ZHOU Y F, TOZZI F, CHEN J Y, et al. Intracellular ATP Levels are a Pivotal Determinant of Chemoresistance in Colon Cancer Cells[J]. *Cancer Research*, 2012, 72(1): 304-314.
- [5] WEI Y L, CHEN Y X, LI H H, et al. An Exonuclease I-Based Label-Free Fluorometric Aptasensor for Adenosine Triphosphate (ATP) Detection with a Wide Concentration Range[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 63: 311-316.
- [6] YANG J M, DOU B T, YUAN R, et al. Aptamer/Protein Proximity Binding-Triggered Molecular Machine for Amplified Electrochemical Sensing of Thrombin[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(9): 5138-5143.
- [7] SONG P, YE D, ZUO X, et al. DNA Hydrogel with Aptamer-Toehold-Based Recognition, Cloaking, and Decloaking of Circulating Tumor Cells for Live Cell Analysis[J]. *Nano Letters*, 2017, 17(9): 5193-5198.
- [8] LI S, ZHAO X, YU X, et al. Fe₃O₄ Nanozymes with Aptamer-Tuned Catalysis for Selective Colorimetric Analysis of ATP in Blood[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(22): 14737-14742.
- [9] XIAO Q, FENG J, FENG M, et al. A Ratiometric Electrochemical Aptasensor for Ultrasensitive Determination of Adenosine Triphosphate via a Triple-Helix Molecular Switch[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186(7): 478.
- [10] LIU M J, REN X L, LIU X, et al. Luminescent Silver Nanoclusters for Efficient Detection of Adenosine Triphosphate in a Wide Range of pH Values[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2020, 31(12): 3117-3120.
- [11] WANG H H, PENG P, LIU S N, et al. Thioflavin T Behaves as an Efficient Fluorescent Ligand for Label-Free ATP Aptasensor[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(28): 7927-7934.
- [12] ZHANG T T, PENG Y, YUAN R, et al. Target-Catalyzed Assembly Formation of Metal-Ion Dependent DNazymes for Non-Enzymatic and Label-Free Amplified ATP Detection[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 273: 70-75.
- [13] PENG Y, LI D X, YUAN R, et al. A Catalytic and Dual Recycling Amplification ATP Sensor Based on Target-Driven Allosteric Structure Switching of Aptamer Beacons[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 105: 1-5.
- [14] ZHENG M Q, KANG Y F, LIU D, et al. Detection of ATP from "Fluorescence" to "Enhanced Fluorescence" Based on Metal-Enhanced Fluorescence Triggered by Aptamer Nanoswitch[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 319: 128263.

- [15] CAMMANN K. Sources of Systematic Errors in Chemical Sensor Chemometrics[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 1995, 25(1/2/3): 769–772.
- [16] ZUO Q, XIONG S, CHEN Z P, et al. A Novel Calibration Strategy Based on Background Correction for Quantitative Circular Dichroism Spectroscopy[J]. Talanta, 2017, 174: 320–324.
- [17] BADER M. A Systematic Approach to Standard Addition Methods in Instrumental Analysis[J]. Journal of Chemical Education, 1980, 57(10): 703.
- [18] SANCHEZ E, KOWALSKI B R. Generalized Rank Annihilation Factor Analysis[J]. Analytical Chemistry, 1986, 58(2): 496–499.
- [19] FRANK I E, KALIVAS J H, KOWALSKI B R. Partial Least Squares Solutions for Multicomponent Analysis[J]. Analytical Chemistry, 1983, 55(11): 1800–1804.
- [20] KALIVAS J H, KOWALSKI B R. Generalized Standard Addition Method for Multicomponent Instrument Characterization and Elimination of Interferences in Inductively Coupled Plasma Spectroscopy[J]. Analytical Chemistry, 1981, 53(14): 2207–2212.
- [21] MELUCCI D, LOCATELLI C. Multivariate Calibration in Differential Pulse Stripping Voltammetry Using a Home-Made Carbon-Nanotubes Paste Electrode[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2012, 675: 25–31.
- [22] MARTENS H, MARTENS M. Multivariate Analysis of Quality: An Introduction[J]. Measurement Science and Technology, 2001, 12(10): 1746.
- [23] LI S X, WANG Y Q, CHEN Z P, et al. Probe Technique-Based Generalized Multivariate Standard Addition Strategy for the Analysis of Fluorescence Signals with Matrix Effects[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2019, 190: 41–47.
- [24] ZHOU Z X, DU Y, DONG S J. Double-Strand DNA-Templated Formation of Copper Nanoparticles as Fluorescent Probe for Label-Free Aptamer Sensor[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(13): 5122–5127.

(责任编辑: 邓光辉)

Probe Technique-Based Generalized Multivariate Standard Addition Strategy for Quantitative Analysis of ATP in Complex Systems

LI Minxi, CHEN Zengping

(State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: A fluorophore labeled ATP aptamer probe was combined with probe technique-based generalized multivariate standard addition strategy (GSAM_{probe}) for accurately detecting the content of ATP in complex biological samples. The experimental results showed the ratio of fluorescence signal intensity (F/F_0) of the reaction system had a good linear relationship with the concentration of ATP ranged from 5–65 $\mu\text{mol/L}$, and the linear correlation coefficient R^2 was 0.987. Cell lysate and human plasma were selected as the complex sample simulated system to detect the concentration of ATP. Experimental results demonstrated that one standard addition sample was enough for the proposed strategy to provide satisfactory quantitative results compared with classical univariate method and PLS method. This strategy is expected to be applied to the rapid and accurate quantitative analysis of other small-volume biological samples or some precious samples.

Keywords: fluorescent probe; generalized standard addition method; ATP; complex biological system; quantitative analysis