

Application Note AN-RA-008

Einfacher Nachweis von Enzymen mit dem elektrochemischen SERS-Effekt

Die Aktivierung der verbesserten Eigenschaften von Silberelektroden hilft, charakteristische Raman-Banden von biologischen Molekülen zu erhalten

Die Raman-Spektroskopie ist eine der vielversprechendsten chemischen Analysetechniken. Dies ist auf deren inhärente Fingerabdruck-Eigenschaften zurückzuführen, welche die Identifizierung verschiedener in einem untersuchten System vorhandener Spezies ermöglichen.

Obwohl die geringe Empfindlichkeit ihre Verwendung als Nachweismethode eingeschränkt hat, konnte der Effekt der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS) ihre Wirksamkeit für analytische Anwendungen verbessern. Die Verstärkung des

Raman-Signals hat die Entwicklung zahlreicher Anwendungen im Bereich der Sensorik ermöglicht. Insbesondere die vom 638 nm-Laser bereitgestellte Energie sorgt für ein Gleichgewicht zwischen dem Risiko einer Beschädigung der Probe und der Erzeugung von Fluoreszenz, was diesen Laser für die meisten biologischen Anwendungen interessant macht.

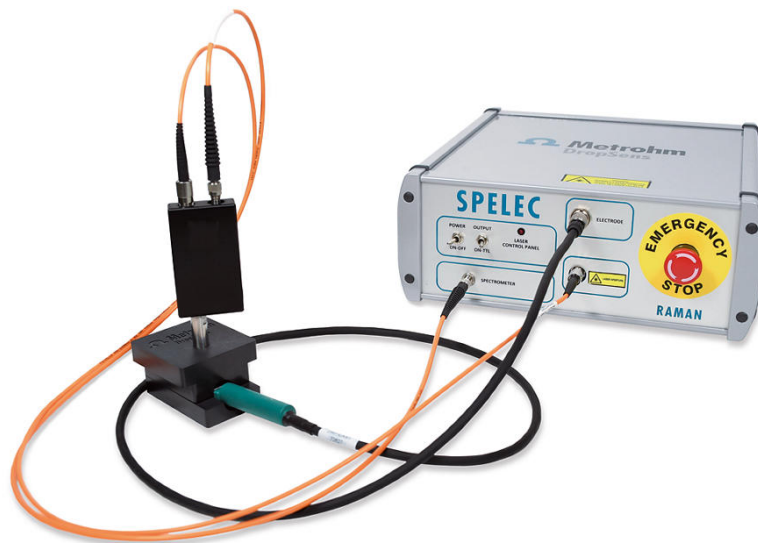
In dieser Application Note werden Aldehyddehydrogenase und Cytochrom c mittels Raman-Spektroelektrochemie analysiert, als Proof of Concept.

INSTRUMENTE UND SOFTWARE

Die Messungen wurden mit einem SPELEC RAMAN 638-Messinstrument (638 nm-Laser), einer der Laserwellenlänge entsprechenden Raman-Sonde und spektroelektrochemischen Zellen für

Siebdruckelektroden (Abbildung 1a) sowie für konventionelle Elektroden (Abbildung 1b) durchgeführt.

A)



B)

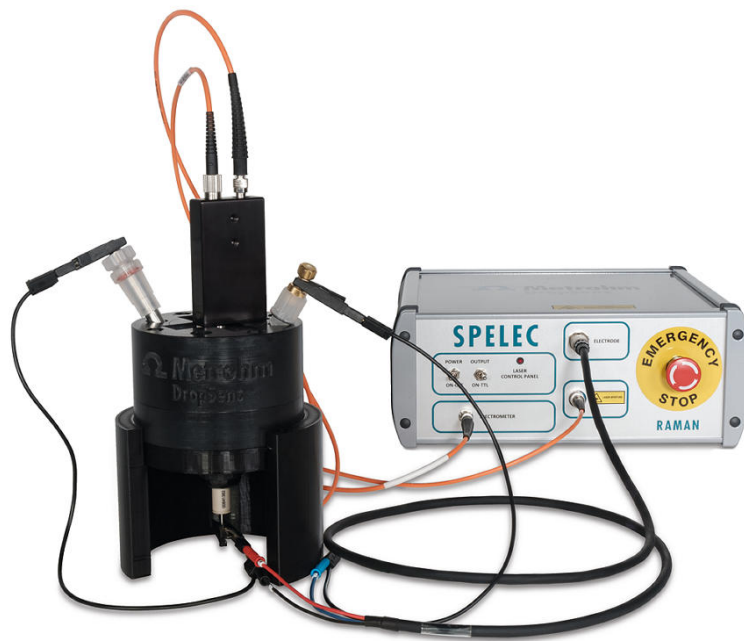


Abbildung 1. SPELEC RAMAN 638-Instrument und Raman-Sonde in Kombination mit einer spektroelektrochemischen Raman-Zelle für (a) Siebdruckelektroden (screen-printed electrodes bzw. SPEs) und (b) herkömmliche Elektroden.

Siebgedruckte Silberelektroden (Ag-SPEs, C013) wurden aufgrund ihrer elektrochemischen Aktivierungseigenschaften als SERS-Substrat verwendet. Darüber hinaus wurde auch eine herkömmliche Silber-Arbeits Elektrode (6.09395.044) als SERS-Substrat in Kombination mit einer Gegenelektrode aus Stahl (6.0343.110) und einer Ag/AgCl-Referenzelektrode (6.0728.120) verwendet.

Das SPELEC RAMAN 638 wurde mit DropView SPELEC gesteuert, einer speziellen Software, die spektroelektrochemische Informationen liefert und Tools zur geeigneten Verarbeitung und Analyse der gesammelten Daten enthält. Die gesamte für diese Studie verwendete Hardware und Software ist in **Tabelle 1** zusammengestellt.

Tabelle 1. Übersicht über die Hardware- und Softwareausstattung.

Messgerät	Artikelnummer
Instrument	SPELECRAMAN638
Sonde	RAMANPROBE638
Spektroelektrochemische Raman-Zelle für SPEs	RAMANCELL
Spektroelektrochemische Raman-Zelle für konventionelle Elektroden	RAMANCELL-C
Silber-SPE	C013
Verbindungskabel für SPEs	GIESSEN
Silberne Arbeitselektrode	6.09395.044
Gegenelektrode aus Stahl	6.0343.110
Ag/AgCl-Referenzelektrode	6.0728.120
Anschlusskabel für herkömmliche Elektroden	CABSTAT
Software	DropView SPELEC

EC-SERS-EFFEKT VON SIEBGEDRUCKTEN ELEKTRODEN: NACHWEIS VON ALDEHYD-DEHYDROGENASE

Die Raman-Spektroelektrochemie wurde für den Nachweis von Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) in wässriger Lösung eingesetzt. Das elektrochemische SERS-Protokoll (EC-SERS) erfordert zwei Schritte in einem einzigen Experiment: die elektrochemische Aktivierung der SERS-Eigenschaften von Ag-SPEs und anschließend die spektroskopische Detektion der Probe.

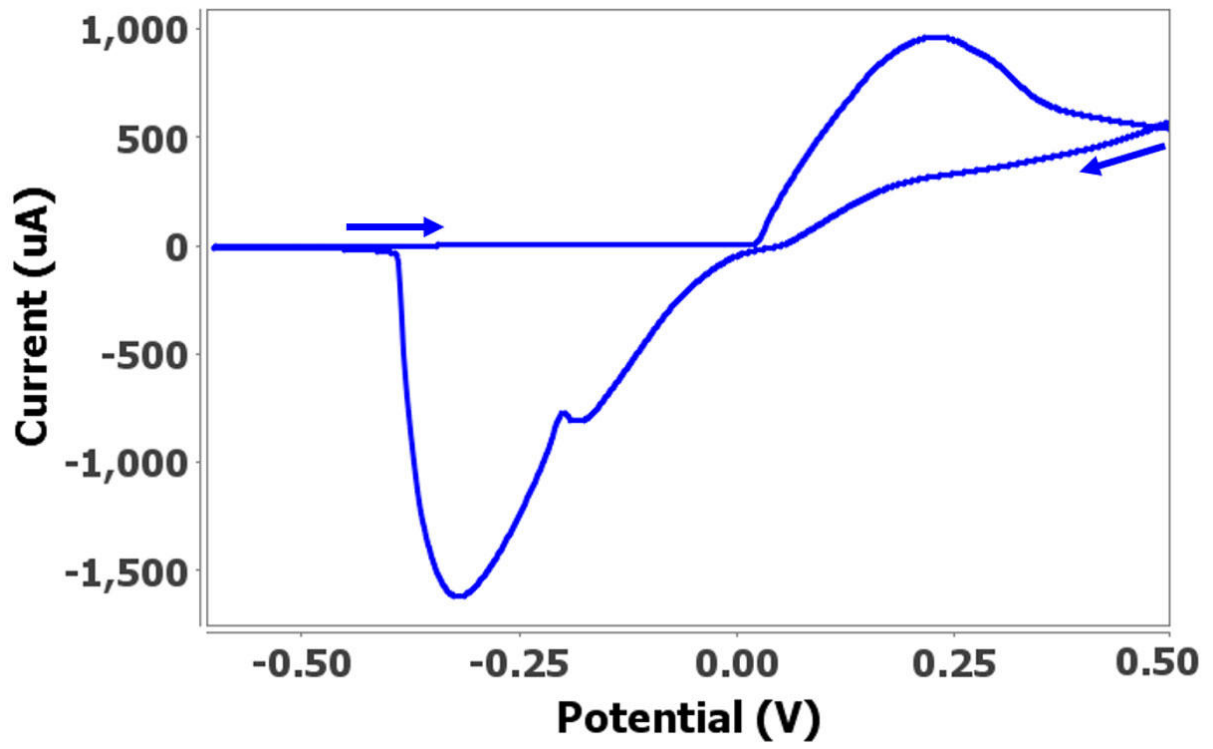
Bei der elektrochemischen Aktivierung erfolgt eine Potential-Scan von +0,50 V, um die anfängliche Oxidation der Silberoberfläche zu bewirken, gefolgt von einer Reduktion bis auf -0,60 V, um Nanostrukturen mit dem SERS-Effekt zu erzeugen. Das spektroelektrochemische Experiment wird in Gegenwart des nachzuweisenden Analyten (in diesem Fall ALDH) durchgeführt. In der Lösung sind auch Chloridionen vorhanden, um die Bildung eines

Silber-SERS-Substrats zu begünstigen [1].

Um die Entwicklung der Raman-Banden während des gesamten Experiments zu bewerten und damit die optische Detektion zu optimieren, führt SPELEC RAMAN 638 Messungen im Operando-Modus durch. Auf diese Weise werden die Spektren kontinuierlich während des gesamten Experiments und nicht nur bei bestimmten Potentialen aufgezeichnet.

Abbildung 2a zeigt das Cyclovoltammogramm von ALDH, während das charakteristische Raman-Spektrum von ALDH in **Abbildung 2b** dargestellt ist. Die Ergebnisse wurden für 1 mg/mL ALDH in 0,1 mol/L wässriger KCl-Lösung erzielt. Obwohl die Aufnahme der Spektren kontinuierlich erfolgte, wurde das Raman-Spektrum in **Abbildung 2b** bei -0,50 V aufgezeichnet, da dieses Potential die höchste Raman-Intensität liefert.

A)



B)

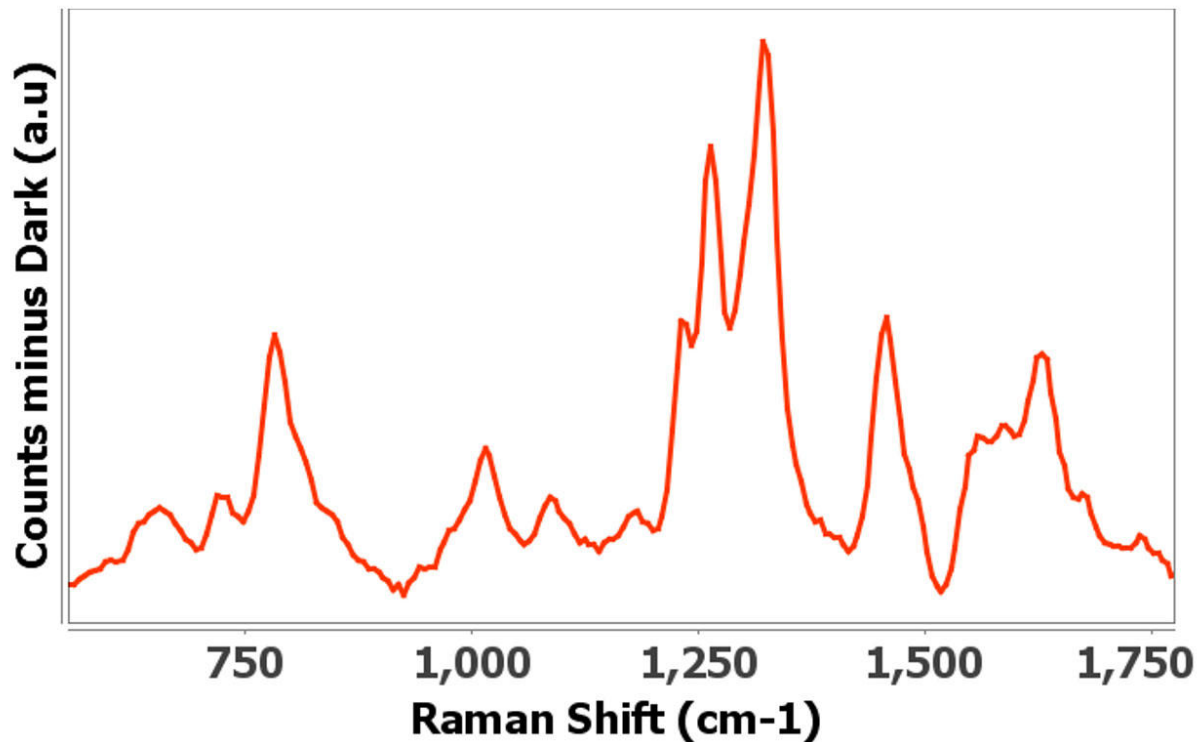


Abbildung 2. (a) Cyclovoltammogramm und (b) Raman-Spektrum von 1 mg/mL Aldehyd-Dehydrogenase in 0,1 mol/L wässriger Kaliumchloridlösung unter Verwendung von siebgedruckten C013-Elektroden. Die Integrationszeit betrug 2000 ms.

Die Kombination des vorgeschlagenen EC-SERS-Verfahrens zur einfachen Aktivierung von Ag-SPEs mit einem spektroelektrochemischen Raman-Instrument (638 nm-Laser) bietet eine schnelle und interessante

Alternative für die Charakterisierung von ALDH in Lösung, über die bisher in der Literatur nicht berichtet wurde.

EC-SERS-EFFEKT VON HERKÖMMLICHEN ELEKTRODEN: NACHWEIS VON CYTOCHROM C

Herkömmliche Elektroden wurden ebenso für den EC-SERS-Nachweis verschiedener Enzyme wie bspw. Cytochrom c verwendet. Das elektrochemische Protokoll für diesen Elektrodentyp folgt den gleichen Schritten wie für SPEs. Eine anfängliche Oxidation der Oberfläche ist erforderlich, gefolgt von der anschließenden Reduktion, um Silber-Nanostrukturen mit SERS-Effekt zu erzeugen. Das Potentialfenster wurde entsprechend den in diesem Experiment

verwendeten Elektroden angepasst. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, indem das Potential von 0,1 mg/mL Cytochrom c in einer wässrigen 0,1 mol/L KCl-Lösung von +0,80 V bis -0,80 V gescannt wurde. Das Raman-Spektrum mit der höchsten Intensität (**Abbildung 3**) wurde bei -0,70 V aufgezeichnet. Die Zuordnungen der Schwingungsmoden der einzelnen Raman-Bänder von Cytochrom c sind in **Tabelle 2** aufgeführt.

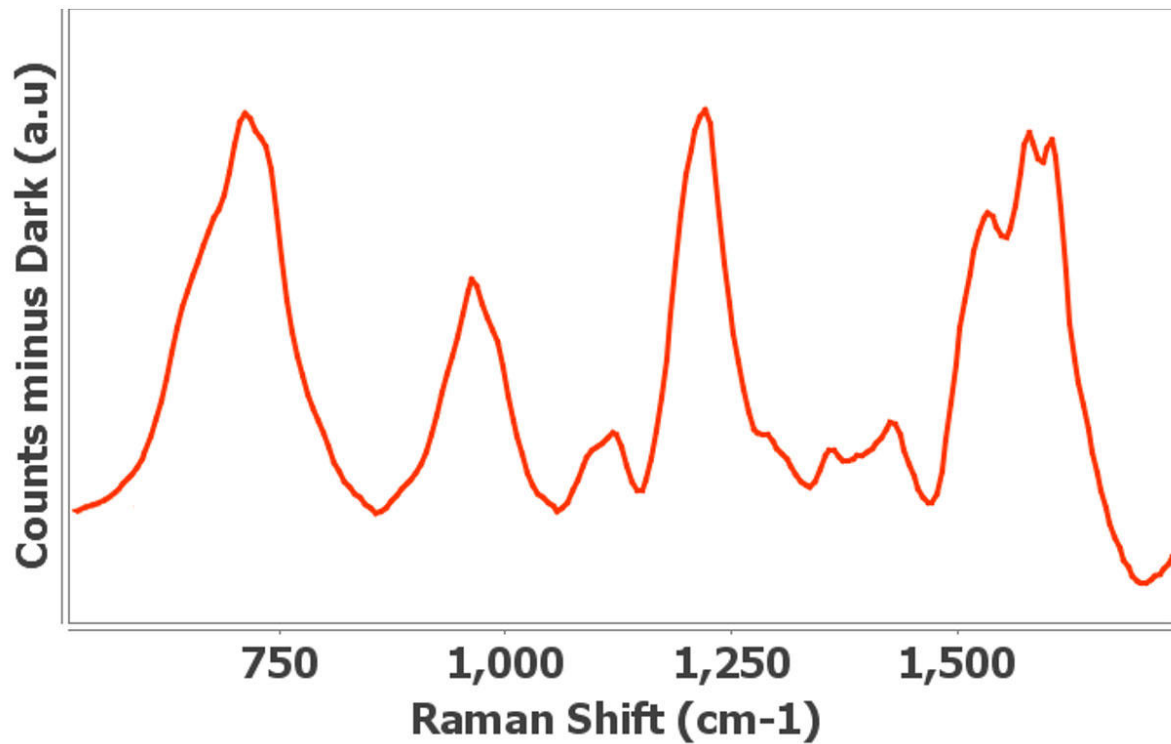


Abbildung 3. Raman-Spektrum von 0,1 mg/mL Cytochrom c in wässriger 0,1 mol/L Kaliumchloridlösung unter Verwendung einer herkömmlichen Silberelektrode. Die Integrationszeit betrug 2000 ms.

Tabelle 2. Schwingungszuordnung von Cytochrom c [2,3].

Cytochrom-c, SERS-Banden (cm ⁻¹)	Zuordnung
713	Häm-Atmungsschwingung
969	Asymmetrische Pyrrol-Deformation
1123	C _β -C ₁
1220	Asymmetrischer Pyrrol-Halbring
1358	Symmetrischer Pyrrol-Halbring
1426	Pyrrol-Viertelring
1528	C _α C _{m'} , C _α N
1578	C _β C _{β'} , C _α C _{m'}
1604	C _α C _{m'} , C _α C _β

Da Cytochrom c interkonvertiert, also in einer reduzierten und einer oxidierten Form vorliegt, kann der Oxidationszustand des Fe-Ions anhand der Position der charakteristischen Raman-Bande bestimmt werden. Reduziertes Cytochrom c zeigt eine Raman-Bande bei 1604 cm^{-1} , während die oxidierte Form eine nach oben verschobene Bande bei 1636

cm^{-1} aufweist. Gemäß dem Raman-Spektrum (**Abbildung 3**) und den Schwingungszuordnungen (**Tabelle 2**) wird die reduzierte Form des Analyten während des EC-SERS-Experiments nachgewiesen. Dieses Experiment zeigt die Möglichkeit, Cytochrom c nachzuweisen und seinen Oxidationszustand zu charakterisieren.

FAZIT

Die Raman-Spektroelektrochemie ist eine Multi-Response-Technik, die bei der Untersuchung einer Vielzahl von Systemen hervorragende Ergebnisse liefert. Im speziellen Fall des 638 nm -Lasers ist die bei dieser Wellenlänge bereitgestellte Energie für biologische Anwendungen geeignet.

Die in dieser Arbeit vorgeschlagenen elektrochemischen Protokolle für die Aktivierung der SERS-Eigenschaften verschiedener Silberelektroden (sowohl siebgedruckte als auch herkömmliche) bieten

ein einfaches und schnelles Verfahren zur Steigerung der Raman-Intensität. Diese Verstärkung der Raman-Intensität ermöglicht den Nachweis verschiedener in Lösung vorhandener Moleküle. In dieser Arbeit wurden Fingerprint-Raman-Banden von ALDH definiert, über die bisher nicht berichtet wurde. Bei der Untersuchung von Cytochrom c werden die charakteristischen Raman-Banden zusätzlich zur Charakterisierung des Redoxzustands des Fe-Ions definiert.

REFERENZEN

1. Martín-Yerga, D.; Pérez-Junquera, A.; González-García, M. B.; et al. Quantitative Raman-Spektroelektrochemie mit silbernen Siebdruckelektroden. *Electrochimica Acta* **2018**, *264*, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.01.060>.
2. Brazhe, N. A.; Evlyukhin, A. B.; Goodilin, E. A.; et al. Untersuchung von Cytochrom c in lebenden Mitochondrien mit oberflächenverstärkter Raman-Spektroskopie. *Sci-Repräsentant* **2015**, *5* (1), 13793. <https://doi.org/10.1038/srep13793>.
3. Hu, S.; Morris, K.; Singh, J. P.; Vollständige Zuordnung von Cytochrom-c-Resonanz-Raman-Spektren durch enzymatische Rekonstitution mit isotopenmarkierten Hämen. *J. Bin. Chem. Soc.* **1993**, *115* (26), 12446–12458. <https://doi.org/10.1021/ja00079a028>.

ZUGEHÖRIGE APPLICATION NOTES

[AN-RA-006 Neue Strategien für den SERS-Effekt in organischen Lösungsmitteln](#)

[AN-SEC-001 Spektroelektrochemie: eine automatisch validierte Analysetechnik – Bestätigen Sie Ergebnisse auf zwei verschiedenen Wegen in einem einzigen](#)

[Experiment](#)

[AN-SEC-002 Sammeln von Informationen aus spektroelektrochemischen Experimenten – Berechnung elektrochemischer Parameter aus Daten](#)

CONTACT

Metrohm Deutschland
In den Birken 3
70794 Filderstadt

info@metrohm.de

KONFIGURATION



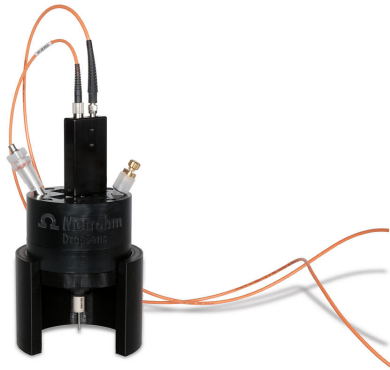
Spektroelektrochemisches Raman-Messgerät (638-nm-Laser)

SPELECRAMAN638 ist ein Gerät für spektroelektrochemische Raman-Messungen. Es kombiniert in nur einer Box einen Laser der Klasse 3B (638 nm \pm 0.5), einen Bipotentiostat/Galvanostat und ein Spektrometer (Wellenlängenbereich 640...885 nm und Raman-Shift 50...4370 cm^{-1}) mit einer dedizierten spektroelektrochemischen Software, die eine Synchronisation optischer und elektrochemischer Experimente ermöglicht.



Raman-Zelle für Dickfilmelektroden

Reflexionszelle aus schwarzem Polytetrafluorethylen zur Durchführung der Raman-Spektroelektrochemie mit Dickfilmelektroden in Kombination mit Ref. RAMANPROBE.



Spektroelektrochemische Raman-Zelle für konventionelle Elektroden

Zelle aus PEEK für spektroelektrochemische Raman-Messungen. Entwickelt für die Verwendung mit der ref. RAMANPROBE und konventionellen Elektroden von Metrohm.



Software DropView SPELEC

DropView SPELEC ist eine Software für die Spektroelektrochemie, die das SPELEC-Messgerät steuert. Sie bietet neben einer perfekten Synchronisation von optischen und elektrochemischen Messungen auch moderne Tools für die Datenverarbeitung.