

Application Note AN-RA-008

# Facile rilevamento degli enzimi con l'effetto elettrochimico SERS

L'attivazione delle caratteristiche avanzate degli elettrodi d'argento aiuta a ottenere le bande Raman caratteristiche delle molecole biologiche

La spettroscopia Raman è una delle tecniche di analisi chimica più promettenti. Ciò è dovuto alle sue proprietà intrinseche all'impronta digitale che consentono l'identificazione di diverse specie presenti in un sistema studiato.

Sebbene la bassa sensibilità ne abbia limitato l'uso come metodo di rilevamento, l'effetto SERS (surface-enhanced Raman Scattering) ne ha migliorato l'efficacia per l'uso analitico. Il miglioramento del

segnale Raman ha consentito lo sviluppo di molte applicazioni di rilevamento. In particolare, l'energia fornita dal laser da 638 nm garantisce un equilibrio tra il rischio di danni al campione e la generazione di fluorescenza, rendendo questo laser popolare per la maggior parte delle applicazioni biologiche.

In questa nota applicativa, l'aldeide deidrogenasi e il citocromo c vengono analizzati mediante spettroelettrochimica Raman come prova di concetto.

## STRUMENTAZIONE E SOFTWARE

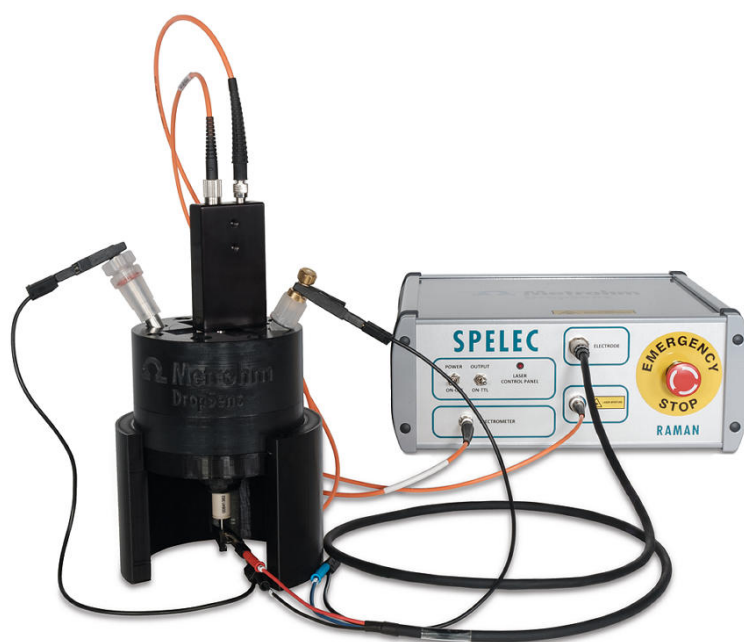
Le misurazioni sono state eseguite utilizzando uno strumento SPELEC RAMAN 638 (laser da 638 nm), una sonda Raman corrispondente alla lunghezza d'onda

del laser e celle spettroelettrochimiche per elettrodi serigrafati (Figura 1a) e per elettrodi convenzionali (Figura 1b)

a)



b)



**Figure 1.** SPELEC RAMAN 638 instrument and Raman probe used in combination with a Raman spectroelectrochemical cell for (a) screen-printed and (b) conventional electrodes.

Elettrodi serigrafati in argento (Ag SPE, C013) sono stati utilizzati come substrato SERS a causa delle loro proprietà di attivazione elettrochimica. Inoltre, come substrato SERS è stato utilizzato anche un elettrodo di lavoro in argento convenzionale (6.09395.044) in combinazione con elettrodi di riferimento e contatore in acciaio (6.0343.110) e Ag/AgCl (6.0728.120), rispettivamente.

Lo SPELEC RAMAN 638 è stato controllato con DropView SPELEC, un software dedicato che fornisce informazioni spettroelettrochimiche e include strumenti per eseguire un trattamento e un'analisi adeguati dei dati raccolti. Tutto l'hardware e il software utilizzati per questo studio sono riportati nella **Tabella 1**.

**Tabella 1.** Anteprima Hardware e software

Equipaggiamento	Codice
Strumento	SPELECRAMAN638
Probe	RAMANPROBE638
Cella Spettroelettrochimica Raman per SPEs	RAMANCELL
Cella Spettroelettrochimica Raman per elettrodi convenzionali	RAMANCELL-C
Silver SPE	C013
Cavo di collegamento per SPEs	CAST
Elettrodo di lavoro Ag	6.09395.044
Controelettrodo in acciaio	6.0343.110
Elettrodo di riferimento Ag/AgCl	6.0728.120
Cavo di collegamento per elettrodi convenzionali	CABSTAT
Software	DropView SPELEC

## EFFETTO EC-SERS DEGLI ELETTRODI SCREEN-PRINTED: RILEVAMENTO DELL'ALDEIDE DEIDROGENASI

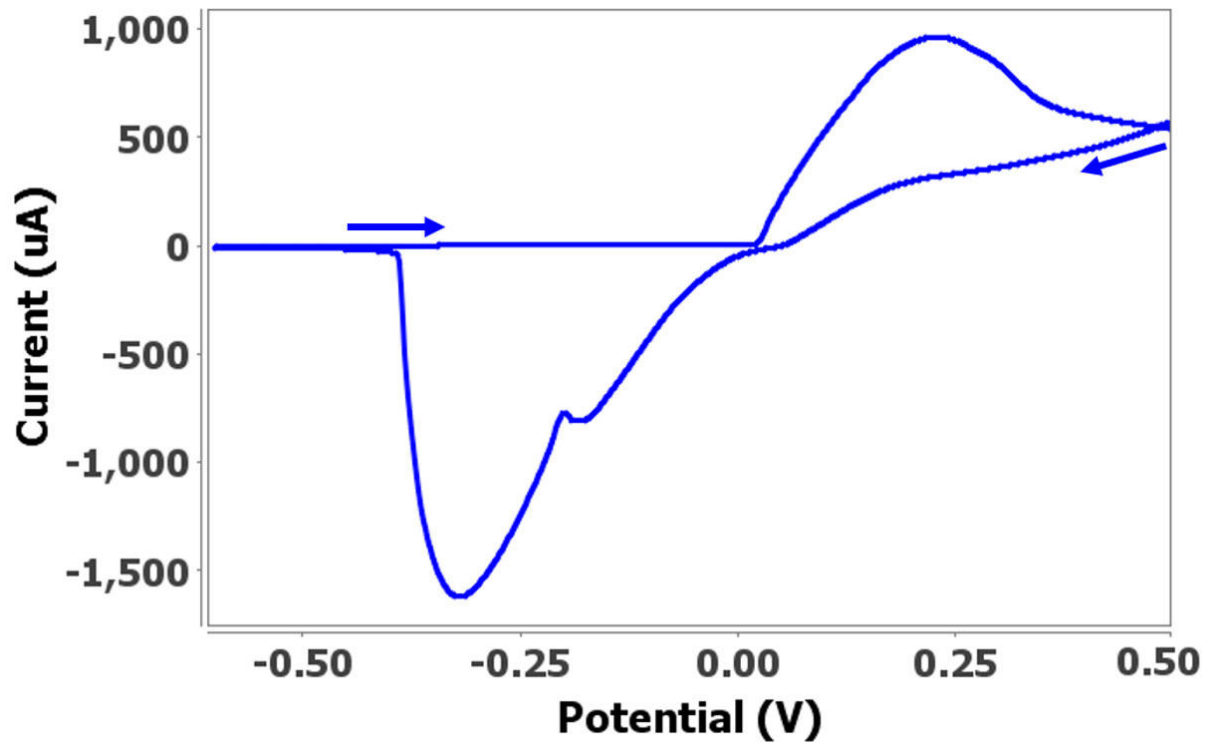
La spettroelettrochimica Raman è stata utilizzata per la rilevazione dell'aldeide deidrogenasi (ALDH) in soluzione acquosa. Il protocollo elettrochimico SERS (EC-SERS) richiede due passaggi in un singolo esperimento: l'attivazione elettrochimica delle caratteristiche SERS degli Ag SPE e quindi il rilevamento spettroscopico del campione.

L'attivazione elettrochimica consiste nella scansione del potenziale da +0,50 V per produrre l'ossidazione iniziale della superficie dell'argento, seguita dalla sua riduzione fino a -0,60 V per generare nanostrutture con effetto SERS. L'esperimento spettroelettrochimico viene eseguito in presenza dell'analita da rilevare (in questo caso ALDH), ma in soluzione sono presenti anche ioni cloruro per favorire la generazione del substrato SERS d'argento [1].

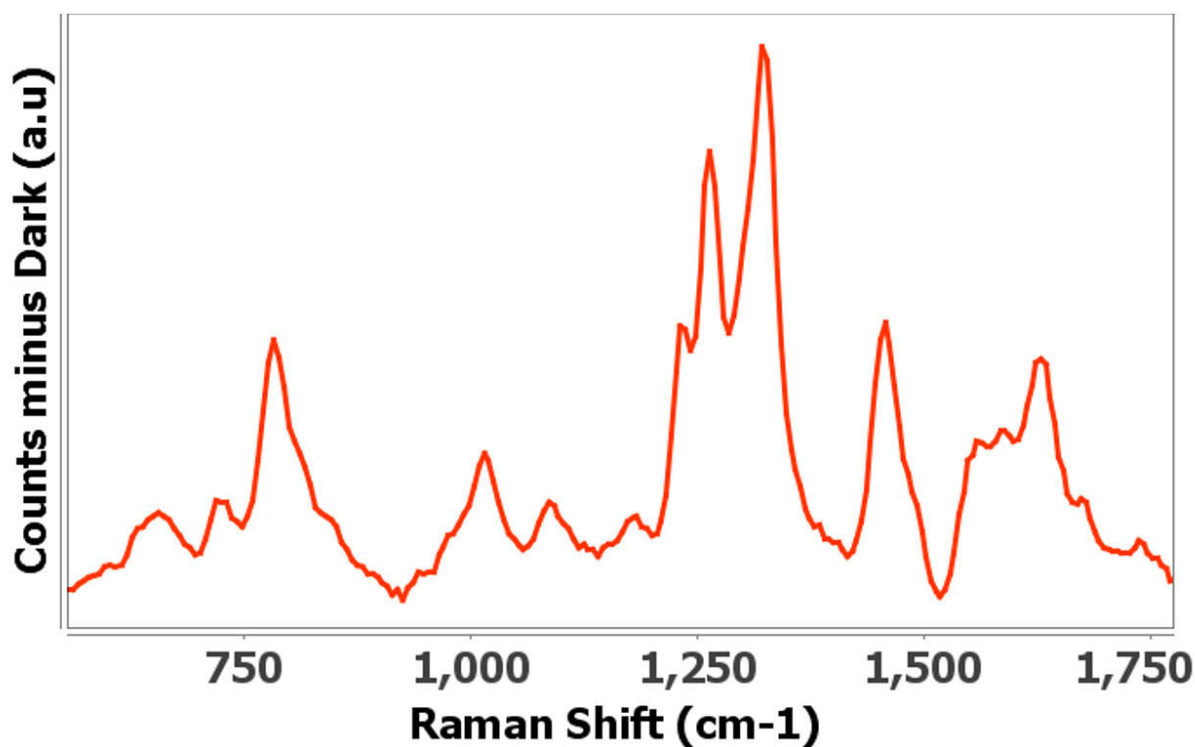
Per valutare l'evoluzione delle bande Raman durante l'intero esperimento, e quindi ottimizzare la rilevazione ottica, SPELEC RAMAN 638 esegue misurazioni in modalità operando. In questo modo, gli spettri vengono registrati continuamente durante l'intero esperimento e non solo a determinati potenziali.

La **Figura 2a** mostra il voltammogramma ciclico di ALDH e lo spettro Raman caratteristico di ALDH è mostrato nella **Figura 2b**. I risultati sono stati ottenuti per 1 mg/mL di ALDH in una soluzione acquosa di KCl da 0,1 mol/L. Sebbene l'acquisizione degli spettri sia stata eseguita in modo continuo, lo spettro Raman nella **Figura 2b** è stato registrato a -0,50 V poiché questo potenziale fornisce la massima intensità Raman.

a)



b)



**Figure 2.** (a) Cyclic voltammogram and (b) Raman spectrum of 1 mg/mL aldehyde dehydrogenase in 0.1 mol/L potassium chloride aqueous solution using C013 electrodes. Integration time was 2000 ms.

La combinazione della procedura EC-SERS proposta per la facile attivazione di Ag SPE con uno strumento spettroelettrochimico Raman (laser da 638 nm) offre

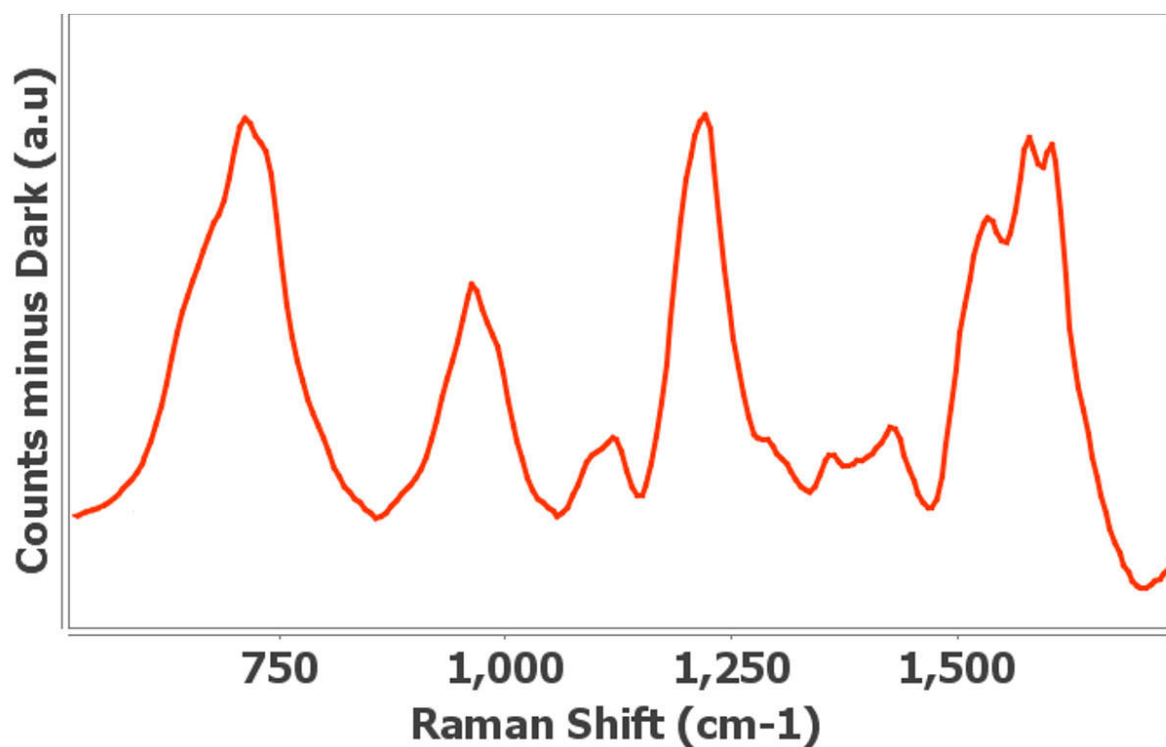
un'alternativa veloce e interessante per la caratterizzazione di ALDH in soluzione non precedentemente riportata in letteratura.

## EFFETTO EC-SERS DEGLI ELETTRODI CONVENZIONALI: RILEVAMENTO DEL CITOCROMO C

Conventional electrodes were also used for the EC-SERS detection of different enzymes such as cytochrome c. The protocol for this type of electrode follows the same steps as for SPEs. An initial oxidation of the surface is required followed by the subsequent reduction to generate silver nanostructures with SERS effect. The potential window was adjusted according to the electrodes used in this experiment. The best

results were obtained by scanning the potential of 0.1 mg/mL cytochrome c in 0.1 mol/L KCl aqueous solution from +0.80 V to -0.80 V. The Raman spectrum with the highest intensity (**Figure 3**) was recorded at -0.70 V.

Assignments of vibrational modes of each Raman band of cytochrome c are listed in **Table 2**.



**Figure 3.** Raman spectrum obtained of 0.1 mg/mL cytochrome c in 0.1 mol/L potassium chloride aqueous solution using a conventional silver electrode. Integration time was 2000 ms.

**Tabella 2.** Assegnazione vibrazionale del citocromo c[2,3].

Cytochrome c SERS bands (cm <sup>-1</sup> )	Assignment
713	Heme breathing
969	Asymmetric pyrrole deformation
1123	C <sub>β</sub> -C <sub>1</sub>
1220	Asymmetric pyrrole half-ring
1358	Symmetric pyrrole half-ring
1426	Pyrrole quarter-ring
1528	C <sub>α</sub> C <sub>m'</sub> , C <sub>α</sub> N
1578	C <sub>β</sub> C <sub>β'</sub> , C <sub>α</sub> C <sub>m'</sub>
1604	C <sub>α</sub> C <sub>m'</sub> , C <sub>α</sub> C <sub>β</sub>

Considerando che il citocromo c esiste come forma ridotta e ossidata interconvertibile, lo stato di ossidazione dello ione Fe può essere determinato in base alla posizione delle loro caratteristiche bande Raman. Il citocromo c ridotto mostra una banda Raman centrata a  $1604\text{ cm}^{-1}$ , mentre la forma ossidata mostra una banda spostata verso l'alto

## CONCLUSIONI

La spettroelettrochimica Raman è una tecnica a risposta multipla che fornisce risultati eccezionali nello studio di un'ampia varietà di sistemi. Nel caso particolare del laser da 638 nm, l'energia fornita a questa lunghezza d'onda è adatta per applicazioni biologiche.

In questo lavoro, i protocolli elettrochimici proposti per l'attivazione delle proprietà SERS di diversi elettrodi d'argento (serigrafati e convenzionali)

centrata a  $1636\text{ cm}^{-1}$ . Secondo lo spettro Raman (Figura 3) e le assegnazioni vibrazionali (Tabella 2), la forma ridotta dell'analita viene rilevata durante l'esperimento EC-SERS. Questo esperimento dimostra la possibilità di rilevare il citocromo c e di caratterizzarne lo stato di ossidazione.

offrono una procedura semplice e veloce per migliorare l'intensità Raman. Questo miglioramento dell'intensità Raman consente il rilevamento di diverse molecole presenti nella soluzione. In questo lavoro vengono definite le bande Raman di impronte digitali di ALDH, non riportate in precedenza. Nello studio del citocromo c vengono definite le caratteristiche bande Raman oltre alla caratterizzazione dello stato redox dello ione Fe.

## RIFERIMENTI

1. Martín-Yerga, D.; Pérez-Junquera, A.; González-García, M. B.; et al. Quantitative Raman Spectroelectrochemistry Using Silver Screen-Printed Electrodes. *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. Probing Cytochrome c in Living Mitochondria with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Sci Rep* **2015**, *5* (1), 13793.  
<https://doi.org/10.1038/srep13793>.
3. Hu, S.; Morris, I. K.; Singh, J. P.; Complete Assignment of Cytochrome c Resonance Raman Spectra via Enzymic Reconstitution with Isotopically Labeled Hemes. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (26), 12446–12458.  
<https://doi.org/10.1021/ja00079a028>.

## APPLICATION NOTES

[AN-RA-006](#) New strategies for obtaining the SERS effect in organic solvents

[AN-SEC-001](#) Spectroelectrochemistry: an autovalidated analytical technique – Confirm results

[via two different routes in a single experiment](#)

[AN-SEC-002](#) Gathering information from spectroelectrochemical experiments – Calculation of electrochemical parameters from data



## CONTACT

Metrohm Italiana Srl  
Via G. Di Vittorio, 5  
21040 Origgio (VA)

info@metrohm.it

## CONFIGURAZIONE



### Strumento spettroelettrochimico Raman (laser 638 nm)

SPELECRAMAN638 è uno strumento per l'esecuzione di misure spettroelettrochimiche Raman. In un'unica scatola combina un laser classe 3B ( $638 \text{ nm} \pm 0,5$ ), un bipotenziostrato/galvanostato e uno spettrometro (intervallo di lunghezza d'onda 640-885 nm e shift Raman  $50-4.370 \text{ cm}^{-1}$ ) e include un software spettroelettrochimico dedicato che permette la sincronizzazione degli esperimenti ottici ed elettrochimici.



### Cella Raman per elettrodi a membrana

Cella di riflessione in teflon nera per l'esecuzione della spettroelettrochimica Raman con elettrodi a membrana in combinazione con rif. SONDA RAMAN.



### Cella spettroelettrochimica Raman per elettrodi convenzionali

Cella in PEEK per misure spettroelettrochimiche Raman. Progettata per l'uso con rif. SONDA RAMAN e con gli elettrodi Metrohm convenzionali.



### Software DropView SPELEC

DropView SPELEC è un software spettroelettrochimico che controlla strumenti SPELEC, offrendo una perfetta sincronizzazione delle misure ottiche ed elettrochimiche, nonché strumenti avanzati per il trattamento dei dati.