

Application Note AN-RA-008

電気化学SERS効果による酵素の簡易検出法

銀電極の増強特性を活性化すること、生体分子の特徴的なラマンハントを取得することかてきます。

ラマン分光法は、最も有望な化学分析技術の一つです。これは、ラマン分光法が持つ固有の指紋特性により、研究対象系内に存在する様々な化学種の同定を可能にするためです。

感度の低さか検出手法としての利用を制限してきましたが、表面増強ラマン散乱(SERS)効果により、その分析用途における有効性は向上しています。ラマン信号の増強は、多くのセンシング応用の発展を可

能にしてきました。特に、638 nmレーザーが供給するエネルギーは、サンプル損傷のリスクと蛍光発生との間で適切なバランスを保つため、生物学的アプリケーションの多くで広く用いられています。

本アプリケーションノートでは、概念実証として、アルテヒト脱水素酵素およびシトクロムcをラマン分光電気化学法により解析しています。

装置およびソフトウェア

測定は、SPELEC RAMAN 638装置(638 nmレーザー)、レーザー波長に対応したラマンフローフ、スク

リーン印刷電極用の分光電気化学セル(図1a)および従来型電極用のセル(図1b)を用いて実施しました。

a)



b)

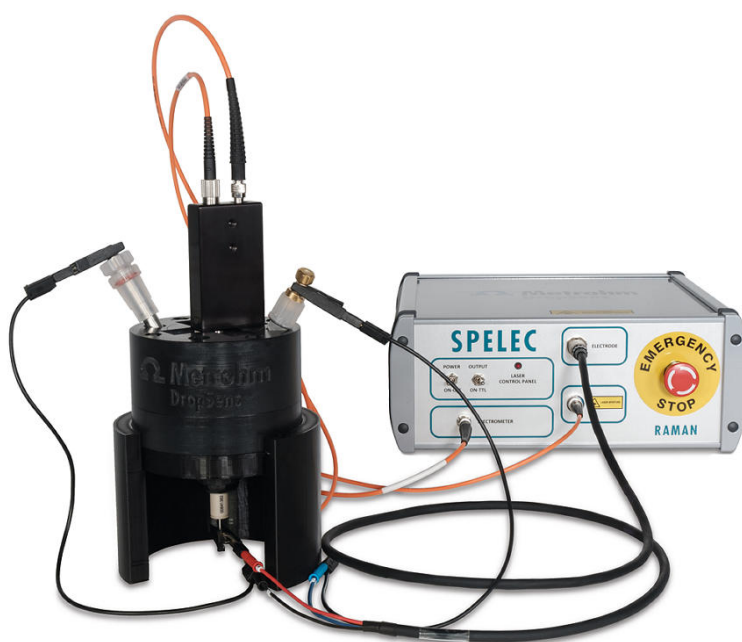


図 1. SPELEC RAMAN 638装置とラマンプローブは、(a) スクリーン印刷電極用、(b) 従来型電極用のラマン分光電気化学セルと組み合わせて用いられました。

銀スクリーン印刷電極(Ag SPE、C013)は、その電気化学的活性化特性からSERS基板として用いました。さらに、従来の銀作用電極(6.09395.044)も、銅(6.0343.110)およびAg/AgCl(6.0728.120)対電極および参照電極と組み合わせてSERS基板として用いました。

SPELEC RAMAN 638は、分光電気化学情報の取得が可能で、収集データの適切な処理や解析を行うためのツールを備えた専用ソフトウェア「DropView SPELEC」によりコントロールしました。本実験で用いたすべてのハードウェアおよびソフトウェアは、表1にまとめています。

表 1. ハードウェアおよびソフトウェアの概要

| 構成 | 部品番号等 |
|-------------------|-----------------|
| 装置 | SPELECRAMAN638 |
| フローフ | RAMANPROBE638 |
| SPE用ラマン分光電気化学セル | RAMANCELL |
| 従来型電極用ラマン分光電気化学セル | RAMANCELL-C |
| シルハーSPE | C013 |
| SPE用接続ケーブル | CAST |
| 銀作用電極 | 6.09395.044 |
| スチール対電極 | 6.0343.110 |
| Ag/AgCl参照電極 | 6.0728.120 |
| 従来型電極用接続ケーブル | CABSTAT |
| ソフトウェア | DropView SPELEC |

スクリーン印刷電極によるEC-SERS効果：アルデヒド脱水素酵素の検出

水溶液中のアルデヒド脱水素酵素(ALDH)の検出には、ラマン分光電気化学法が用いられました。電気化学的SERS(EC-SERS)プロトコルでは、1回の実験で2つのステップ、すなわちAg SPEのSERS特性の電気化学的活性化と、その後のサンプルの分光検出を行います。

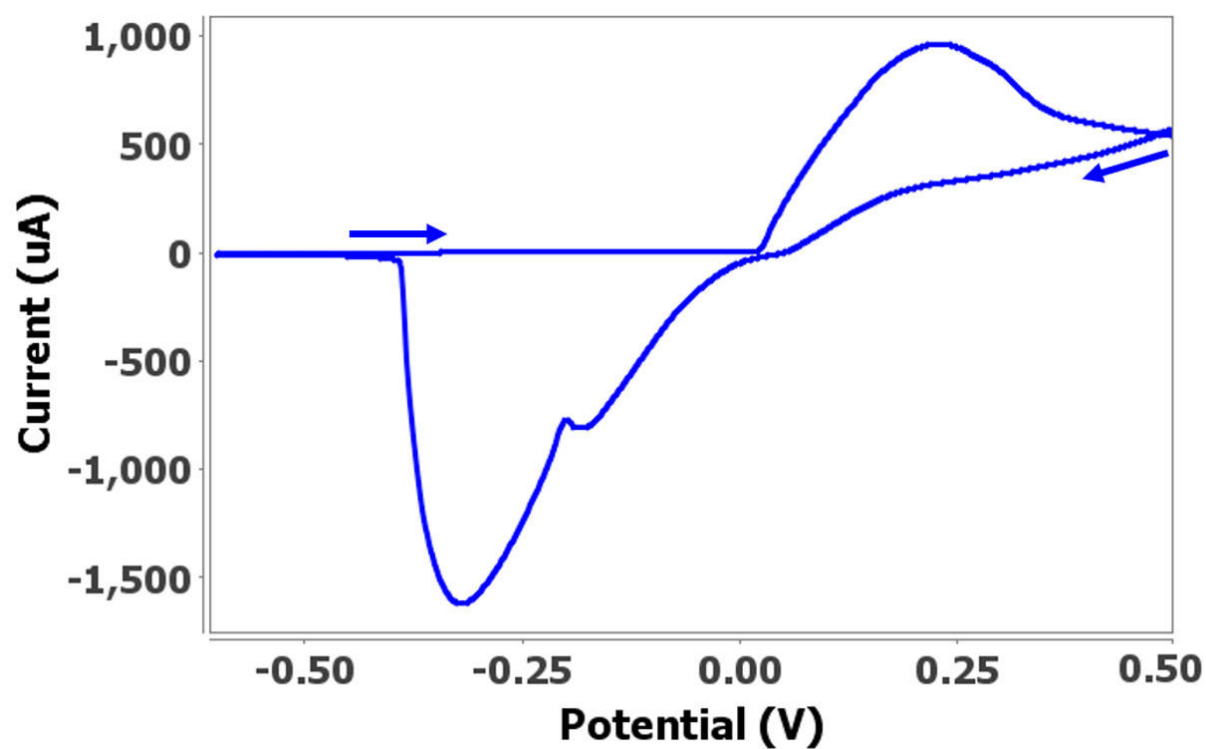
電気化学的活性化は、まず銀表面の初期酸化を生じさせるために電位を +0.50 V までスキャンし、その後 -0.60 V まで還元してSERS効果を示す銀ナノ構造体を生成するプロセスで構成されます。分光電気化学実験は、検出対象となる分析物(本例ではALDH)の存在下で行われますか、銀SERS基板の生成を促進するために、塩化物イオンも溶液中に存在させます

[1]。

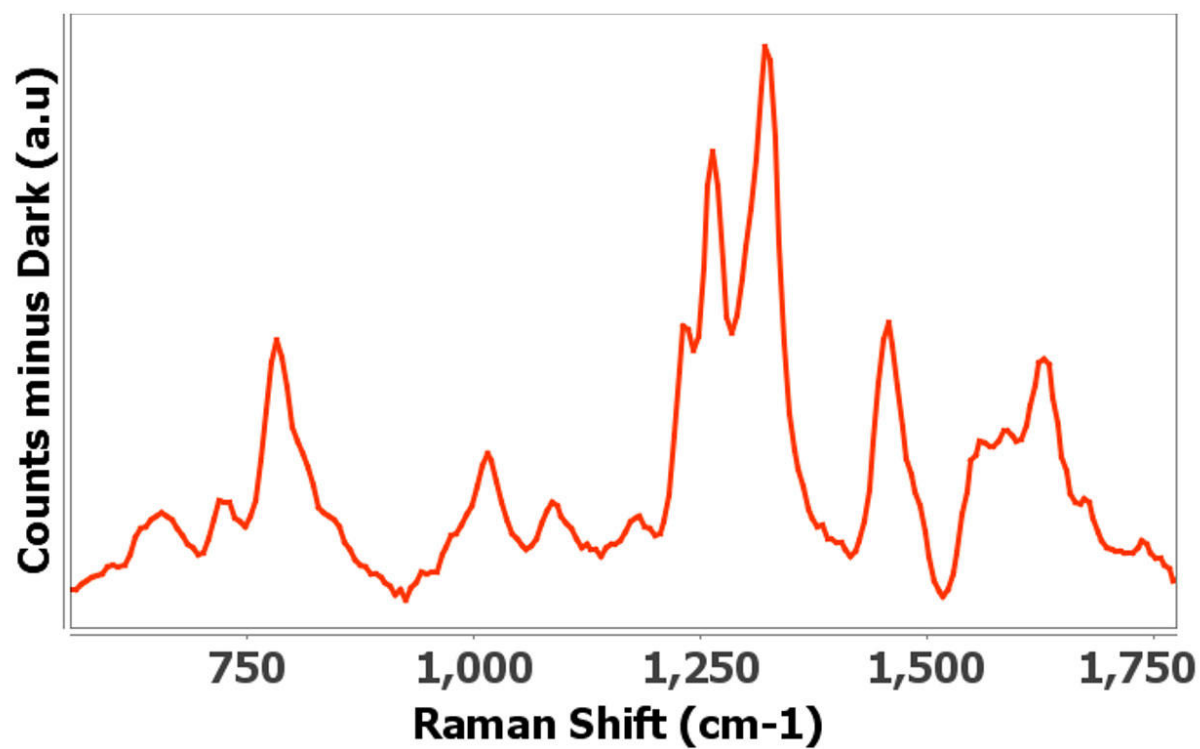
実験全体にわたるラマンハントの変化を評価し、光学的検出を最適化するために、SPELEC RAMAN 638はオヘラントモードで測定を行います。この方法により、スペクトルは特定の電位だけでなく、実験全体を通して連続的に記録されます。

図2aはALDHのサイクリックボルタモグラムの示し、図2bはALDHの特徴的なラマンスペクトルを示しています。この結果は、0.1 mol/L KCl水溶液中の1 mg/mL ALDHについて得られました。スペクトルの取得は連続的に行われましたか、図2bのラマンスペクトルは-0.50 Vで記録しました。この電位でラマン強度が最も高くなるためです。

a)



b)



2. (a) 0.1 mol/L 1 mg/mL (b) C013: 2000 ms

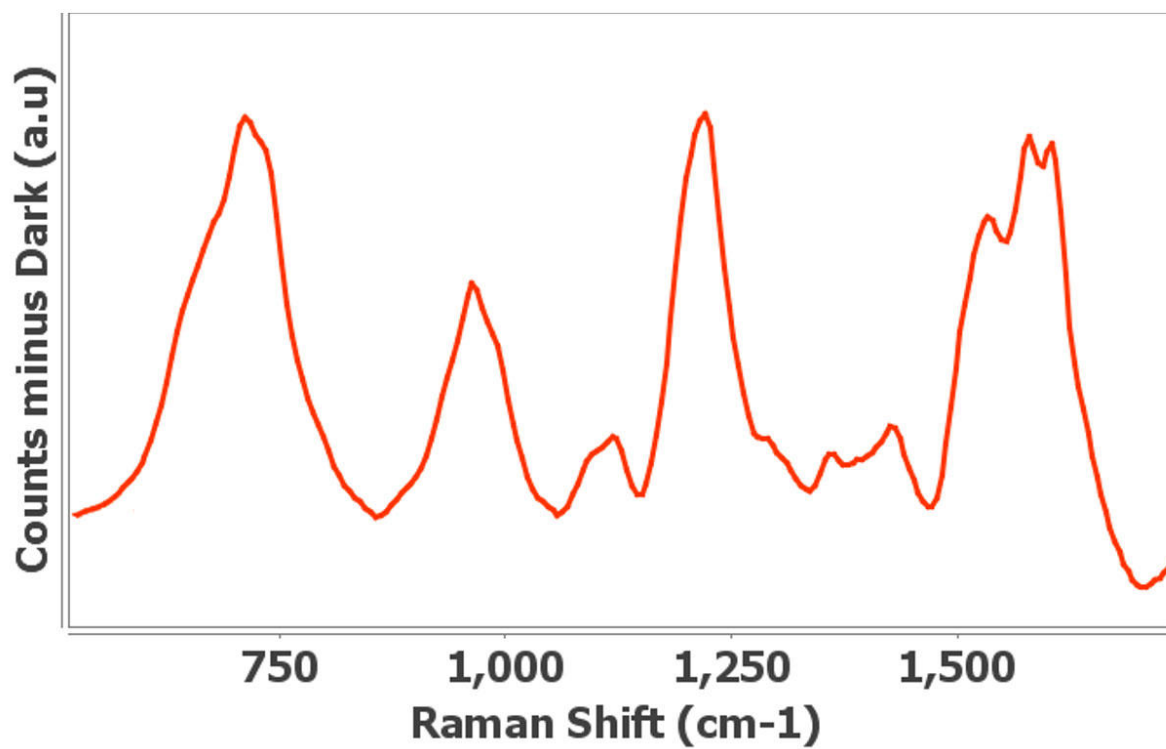
Ag SPE EC-SERS (638 nm) ALDH

EC-SERSC

cEC-SERSSPEsSERS0.1 mol/L KCl0.1 mg/mL c

c2

+0.80 V -0.80 V (3)-0.70 V



3. 0.1 mol/L 0.1 mg/mL c: 2000 ms

2. c [2,3].

| cSERS [cm ⁻¹] | |
|---------------------------|-----------------------|
| 713 | |
| 969 | |
| 1123 | C-C ₁ |
| 1220 | |
| 1358 | |
| 1426 | 1/4 |
| 1528 | CC _m , CN |
| 1578 | CC, CC _m , |
| 1604 | CC _m , CC |

cFec1604 cm111636 cm1(3)(2)EC-SERSc

638 nm

()SERSALDHcFe

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>.

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

143-0006 6-1-1
null 9

metrohm.jp@metrohm.jp

装置構成



DropView SPELEC Software

DropView SPELEC is a Spectroelectrochemical software that controls SPELEC instrument, offering a perfect synchronization of the optical and electrochemical measurements, as well as advanced tools for data treatment.