



Получено: 22.07.2024 г. | Принято: 26.07.2024 г. | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.5.302.310>

Научная статья

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ И ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

А.И.Ахметова¹, к.ф.-м.н., мл. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-5115-8030

Н.А.Никитин², д.б.н., проф., ORCID: 0000-0001-9626-2336

М.В.Архипенко², к.б.н., ст. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-5575-602X

О.В.Карпова², д.б.н., проф., зав. каф., ORCID: 0000-0002-0605-9033

И.В.Яминский¹, д.ф.-м.н., проф., ORCID: 0000-0001-8731-3947 / yaminsky@nanoscopy.ru

Аннотация. Вирусы обладают многими преимуществами перед другими типами биомолекул для синтеза наночастиц, поскольку они встречаются в широком диапазоне форм и размеров и обладают разнообразными химическими функциональными возможностями. Немаловажно, что вирусы растений безвредны для человека, в связи с чем широко используются в биотехнологиях. Вирус табачной мозаики становится интересным объектом для использования в качестве платформы и средства доставки, благодаря высокому аспектному соотношению, узкому распределению по размерам, разнообразным биохимическим функциональным группами на поверхности и совместимости путем химической конъюгации. К тому же его достаточно легко выделять, а морфологией можно манипулировать с помощью генетической модификации или термической обработки.

Ключевые слова: вирус табачной мозаики, вирион, физика живых систем, сканирующая зондовая микроскопия, бионаноскопия

Для цитирования: А.И. Ахметова, Н.А. Никитин, М.В. Архипенко, О.В. Карпова, И.В. Яминский. Визуализация вируса табачной мозаики методами атомно-силовой и электронной микроскопии. НАНОИНДУСТРИЯ. 2024. Т. 17. № 5. С. 302-310. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.5.302.310>.

Received: 22.07.2024 | Accepted: 26.07.2024 | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.5.302.310>

Original paper

VISUALIZATION OF TOBACCO MOSAIC VIRUS BY ATOMIC FORCE AND ELECTRON MICROSCOPY

A.I.Akhmetova¹, Cand. of Sci. (Physics and Mathematics), Junior Researcher, ORCID: 0000-0002-5115-8030

N.A.Nikitin², Doct. of Sci. (Biology), Professor, ORCID: 0000-0001-9626-2336

M.V.Arhipenko², Cand. of Sci. (Biology), Senior Researcher, ORCID: 0000-0002-5575-602X

O.V.Karpova², Doct. of Sci. (Biology), Head of Chair, ORCID: 0000-0002-0605-9033

I.V.Yaminsky¹, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), ORCID: 0000-0001-8731-3947 / yaminsky@nanoscopy.ru

Abstract. For nanoparticle synthesis, viruses have many advantages over other types of biomolecules, as they occur in a wide range of shapes and sizes and have diverse chemical functionalities. It is important that plant viruses are harmless to humans, and therefore are widely used in biotechnology. Tobacco mosaic virus is emerging as an interesting target for use as a nanotemplate and delivery vehicle due to its high aspect ratio, narrow

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Physical department, Moscow, Russia

² МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Biological department, Moscow, Russia



size distribution, diverse biochemical functionalities on the surface, and compatibility through chemical conjugation. In addition, it is quite easy to synthesize tobacco mosaic virus, and its properties can be manipulated through genetic modification or heat treatment.

Keywords: tobacco mosaic virus, virion, physics of living systems, scanning probe microscopy, bionanoscscopy

For citation: A.I. Akhmetova, N.A. Nikitin, M.V. Arkhipenko, O.V. Karpova, I.V. Yaminsky. Visualization of tobacco mosaic virus by atomic force and electron microscopy. NANOINDUSTRY. 2024. Vol. 17. No. 5. PP. 302-310. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.5.302.310>.

ВВЕДЕНИЕ

Растительные вирусы имеют различные формы: вирус хлоротичной крапчатости коровьего гороха, вирус мозаики коровьего гороха и вирус мозаики костра образуют икосаэдрические структуры размером от 18 до 30 нм, вирус табачной мозаики (ВТМ) и вирус штриховой мозаики ячменя имеют палочковидную форму размером до 300 нм [1]. Благодаря такому разнообразию форм растительные вирусы становятся интересным объектом в качестве платформы для разработки наноматериалов, которые можно использовать в биомедицине в качестве средства доставки, в электронике и энергетике для создания катализаторов, датчиков, анодов аккумуляторов и полупроводниковых цифровых устройств памяти.

Вирусные частицы состоят из самособирающихся капсидных белков и нуклеиновых кислот, которые кодируют вирусные белки. Капсидные белки обладают разнообразными биохимическими функциональными возможностями благодаря аминокислотным остаткам, которые могут взаимодействовать с металлами в растворе [2, 3]. Эти остатки можно конъюгировать с другими соединениями, чтобы синтезировать различные наноматериалы с новыми функциональными свойствами.

ВТМ был первым вирусом, визуализированным в электронном микроскопе. Микрофотографии ВТМ, опубликованные Густавом А. Кауше, Эдгаром Пфанкухом и Гельмутом Руской в 1939 году, продемонстрировали отдельные стержнеобразные частицы размером 330×15 нм [4]. Джеймс Уотсон начал изучать структуру ВТМ в 1952 году. Пока Френсис Крик заканчивал докторскую диссертацию по методам рентгеновской дифракции белков [5], Д. Уотсон пытался определить структуру ВТМ [6]. Д. Уотсон очень увлекательно описывает, как они разгадывали структуру ДНК. Он хотел заниматься исследованием ДНК, и изучение ВТМ было идеальным прикрытием, так

INTRODUCTION

Plant viruses have different shapes: cowpea chlorotic mottle virus, cowpea mosaic virus and bark mosaic virus form icosahedral structures ranging in size from 18 to 30 nm, while tobacco mosaic virus (TMV) and barley streak mosaic virus have stick-like shapes up to 300 nm [1]. This diversity of shapes makes plant viruses an interesting target as a platform for development of nanomaterials that can be used in biomedicine as a delivery vehicle, in electronics and energy to create catalysts, sensors, battery anodes, and semiconductor digital memory devices.

Viral particles consist of self-assembling capsid proteins and nucleic acids that encode viral proteins. Capsid proteins have diverse biochemical functionalities due to amino acid residues that can interact with metals in solution [2, 3]. These residues can be conjugated with other compounds to synthesise various nanomaterials with new functional properties.

TMV was the first virus visualised in an electron microscope. Microphotographs of TMV published by Gustav A. Kausche, Edgar Pfankuch, and Helmut Ruska in 1939 showed individual rod-shaped particles measuring 330×15 nanometres [4]. While Francis Crick was completing his doctoral thesis on X-ray diffraction methods for proteins [5], James Watson was trying to determine the TMV structure [6]. D. Watson describes in a very fascinating way how they unravelled the DNA structure. He wanted to do DNA research, and the study of TMV was the perfect cover, as the key component of the virus is nucleic acid. The fact that the virus contained RNA and not DNA was even better, since by unravelling the RNA, one could get a clue to the DNA structure. Watson did not fully understand crystallographic theory by his own admission, but guessed that some of the spots in the X-ray diffraction of the TMV that puzzled John Desmond Bernal and Isidor Funkyuchen could be explained by the fact that the TMV had a helical configuration.



как ключевой компонент вируса – нуклеиновая кислота. Тот факт, что в вирусе содержится РНК, а не ДНК, было даже лучше, так как разгадав РНК, можно было получить ключ к структуре ДНК. Уотсон не до конца понимал кристаллографическую теорию по собственному признанию, но догадался, что некоторые пятна дифракции рентгеновских лучей ВТМ, которые озадачивали Джона Десмонда Бернала и Исидора Фанкхюхена, можно объяснить тем фактом, что ВТМ имеет спиральную конфигурацию.

Получив собственные рентгенограммы паракристаллов ВТМ, Д. Уотсон подтвердил свою догадку. Основываясь на своих новых данных, он утверждал, что ВТМ представляет собой спираль, повторяющуюся каждые три витка с периодом 68 Å. Он также предположил, что вирусная РНК находится в центре этой спирали, аналогично ее расположению в сферических вирусах: вирусе желтой мозаики репы и бактериофаге Т2 [7]. Статья Уотсона о ВТМ была представлена в журнал *Biochimica et Biophysica Acta* за неделю до того, как его знаменитая заметка с Криком о двухцепочечной структуре ДНК появилась в журнале *Nature* [8]. Таким образом, знакомство Уотсона с теорией спиральной дифракции оказалось очень полезным для понимания всего значения "Фотографии 51" Розалинды Франклин.

В настоящее время вирус табачной мозаики является одним из самых хорошо изученных модельных объектов. С помощью атомно-силовой микроскопии удастся получать новые структурные данные о морфологии частиц при обычных условиях и при изменении температуры окружающей среды [9]. Форма и размеры частиц зависят от методов выделения, очистки, условий хранения образца, процедур нанесения образца на подложку и характера подложки. Ранее было показано, что подложка может влиять на вирус, вызывая частичное разрушение белковой оболочки [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус табачной мозаики (ВТМ), штамм U1 из коллекции кафедры вирусологии МГУ был накоплен в растениях табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Samsun. Растения *N. tabacum* выращивали до стадии формирования 5–6 больших листьев в теплице с дополнительным освещением (натриевые лампы высокого давления) при температуре 22–25 °С. Растения инфицировали методом механической инокуляции. В качестве инфекционного материала использовали суспензию ранее

After obtaining his own X-ray images of TMV paracrystals, Watson confirmed his conjecture. Based on his new data, he argued that the TMV is a helix repeating every three turns with a period of 68 Å. He also suggested that the viral RNA is located in the centre of this helix, similar to its location in spherical viruses: turnip yellow mosaic virus and bacteriophage T2 [7]. His paper on TMV was submitted to the journal *Biochimica et Biophysica Acta* a week before his famous note with Crick on the double-stranded structure of DNA appeared in *Nature* [8]. Thus, Watson's familiarity with the theory of helical diffraction was very helpful in understanding the full significance of Rosalind Franklin's "Photograph 51".

Currently, tobacco mosaic virus is one of the most well-studied model objects. Atomic force microscopy can be used to obtain new structural data on particles morphology under normal conditions and under changes in ambient temperature [9]. The shape and size of the particles depend on the methods of isolation, purification, sample storage conditions, procedures for depositing the sample on the substrate and substrate nature. It was previously shown that a substrate can affect the virus by causing partial destruction of the protein shell [10].

MATERIALS AND METHODS

Tobacco mosaic virus (TMV), strain U1 from the Department of Virology collection, Moscow State University, was accumulated in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) of the Samsun variety. *N. tabacum* plants were grown to the stage of 5–6 large leaves formation in a greenhouse with additional lighting (high-pressure sodium lamps) at 22–25 °C. Plants were infected by mechanical inoculation. A suspension of previously isolated and purified virus at a concentration of 50 µg/ml was used as infectious material. In 1–2 weeks after infection, symptoms of systemic plant damage develop: mosaic symptoms in the form of alternating light-green and dark-green areas, often accompanied by the appearance of abnormalities in the form of localised swellings, clearly observed when compared with a healthy control plant. Leaves of infected plants were collected three weeks after infection, packed and frozen (–18 °C). TMV was isolated and purified by differential centrifugation as described previously [11].

Viral precipitate was dissolved in 0.01 M Tris-HCl pH 7.8. The TMV solution was clarified by low-speed centrifugation at 10000g for 15 minutes. A 0.05 ml sample was taken to determine TMV concentration and preparation purity.



выделенного и очищенного вируса в концентрации 50 мкг/мл. Через 1-2 недели после заражения развиваются симптомы системного поражения растения: наблюдаются мозаичные симптомы в виде чередующихся светло-зеленых и темно-зеленых участков, часто сопровождаемые появлением аномалий в виде локальных вздутий, четко наблюдаемое при сравнении с контрольным здоровым растением. Листья зараженных растений собирали через три недели после заражения, фасовали и замораживали (-18°C). ВТМ был выделен и очищен с помощью метода дифференциального центрифугирования, как описано ранее [11].

Вирусный осадок растворяли в 0,01 М трис-НСl pH 7,8. Раствор ВТМ осветляли при помощи низкоскоростного центрифугирования при 10 000 g в течение 15 мин. Проводили отбор пробы объемом 0,05 мл для определения концентрации ВТМ и чистоты препарата.

Качество выделенного препарата ВТМ (наличие примесей, морфология и размеры частиц) контролировали методами спектрофотометрии, электрофоретического анализа и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Для ПЭМ препарат ВТМ сорбировали на медных сетках для электронной микроскопии, покрытых формваром, негативно контрастировали 1% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты и анализировали с помощью электронного микроскопа Leo 912 (Zeiss).

3D-морфология вирусных частиц исследовалась с помощью СЗМ "ФемтоСкан" на воздухе на подложках из графита и слюды в резонансном режиме, использовали кантилевер NSG10, обработка изображений осуществлялась в ПО "ФемтоСкан Онлайн" [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис.1 представлено изображение вируса, полученное с помощью ПЭМ. Характерные размеры вируса табачной мозаики – 300 нм в длину, 18 нм в высоту. На кадре присутствуют как одиночные частицы, так и частицы, выстроенные торцами друг к другу, образуя тем самым длинные вереницы частиц до 1 мкм. Отдельные частицы имеют стержневидную форму.

На рис.2. представлен образец вируса, полученный в резонансном режиме АСМ. Несколько мкл образца нанесли на поверхность свежесколотой слюды и высушили.

На кадре присутствуют как частицы длиной в 300 нм, так и другой длины, в том числе и совсем небольшие – менее 100 нм. Также в образце присутствуют длинные

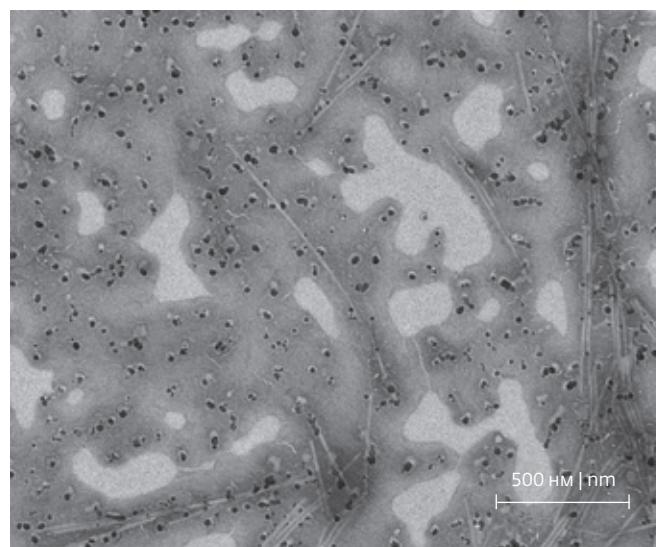
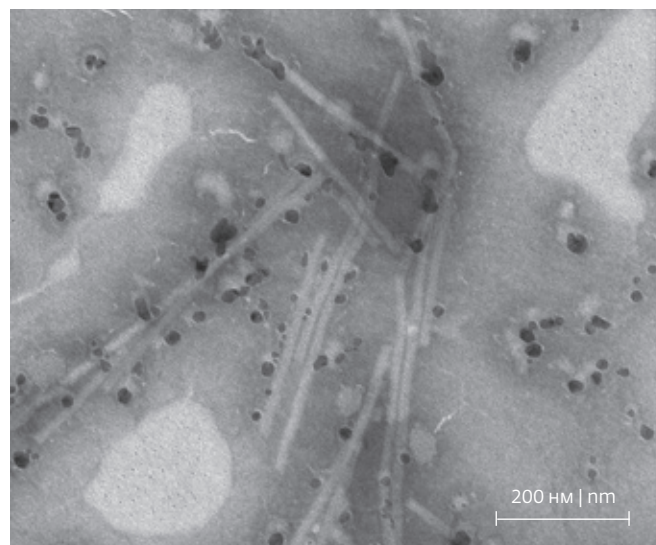


Рис.1. Изображение вируса табачной мозаики, полученное методом ПЭМ. В образце присутствуют как одиночные частицы по 300 нм, так и структуры длиной до 1 мкм. Темные точки на изображении – нанокристаллы фосфорно-вольфрамовой кислоты, используемой в качестве контрастирующего вещества

Fig.1. TEM image of the tobacco mosaic virus. The sample contains both single 300 nm particles and structures up to 1 μm in length. The dark dots in the image are nanocrystals of phosphotungstic acid used as a contrast agent

Quality of the isolated preparation of TMV (presence of impurities, morphology and particle size) was controlled by spectrophotometry, electrophoretic analysis and transmission electron microscopy (TEM). For TEM, the preparation of TMV was sorbed on copper grids for electron microscopy coated with formvar, negatively contrasted with 1% phosphotungstic acid solution

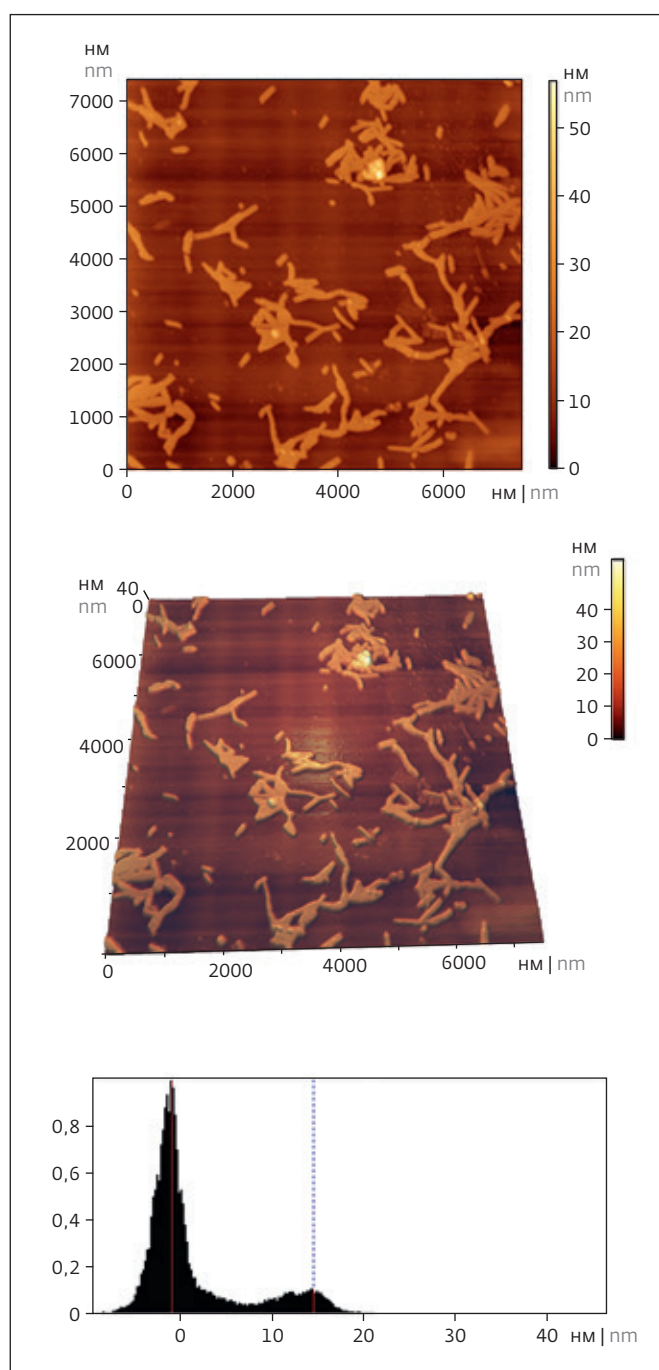


Рис.2. 2D- и 3D-изображения вируса табачной мозаики и гистограмма распределения по высоте отдельных точек изображения. Левый выступ на гистограмме соответствует точкам подложки, правый – частицам ВТМ. Расстояние между выступами указывает на наблюдаемую высоту частиц вируса около 15,5 нм

Fig.2. 2D- and 3D images of tobacco mosaic virus and a histogram of the height distribution of individual image points. The left protrusion on the histogram corresponds to the substrate points, the right one to the TMV particles. The distance between the protrusions indicates the observed height of the virus particles of about 15.5 nm

and analysed using a Leo 912 electron microscope (Zeiss).

3D morphology of viral particles was studied using FemtoScan SPM in air on graphite and mica substrates in resonance mode, NSG10 cantilever was used, image processing was performed in FemtoScan Online software [12].

RESULTS

Fig.1 shows the TEM image of the virus. The characteristic dimensions of the tobacco mosaic virus are 300 nm in length and 18 nm in height. Both single particles and particles lined up end-to-end with each other, thus forming long string of particles up to 1 μm , are present in the image. Individual particles are rod-shaped.

Figure 2 shows a sample of virus obtained in the resonance mode of AFM. A few microliters of the sample was applied to the surface of freshly pierced mica and dried.

Both 300 nm particles and other lengths, including very small particles of less than 100 nm, are present in the frame. Long particles are also present in the sample when viruses are lined up side by side. The variation in particle size can be explained by separation and purification methods, which results in virus fragments appearance and mica surface segments. By means of AFM it is also possible to determine the character of particle distribution on the surface – viruses do not gather in one place, but tend to spread on the surface. The underestimated height value in AFM is a consequence of interaction with the substrate.

Figure 3 shows a sample of tobacco mosaic virus, where almost all particles tend to line up end-to-end, giving the impression of branching particles. According to the histogram, the characteristic height is 14 nm. The image indicates degradation of the virus protein envelope, as a result, a variation in the cross section of the VTM particles is observed. Due to the loss of mechanical rigidity, the particles lose the rectilinear shape characteristic of intact particles. Partial destruction of the particles is also indicated by the observed underestimated height size of 14.5 nm.

With AFM, detailed characterisation of all objects in the frame can be obtained. FemtoScan Online software can automatically select objects and calculate geometric characteristics of each structure, as well as compare the particle size distribution of two samples:

- P – perimeter;
- S – square;

частицы, когда вирусы выстраиваются друг за другом торец к торцу. Разброс в размерах частиц можно объяснить методом выделения и очистки, что приводит к появлению на поверхности слюды фрагментов и сегментов вирусов. С помощью АСМ также можно определить характер распределения частиц по поверхности – вирусы не собираются в одном месте, а стремятся разместиться на поверхности. Заниженное значение высоты в АСМ является следствием взаимодействия с подложкой.

На рис.3 показан образец вируса табачной мозаики, где почти все частицы стремятся выстроиться торец к торцу, отчего создается впечатление ветвящихся частиц. По данным гистограммы характерная высота составляет 14 нм. Изображение указывает на деградацию белковой оболочки вируса, в результате наблюдается варьирование поперечного сечения частиц ВТМ. Вследствие потери механической жесткости частицы теряют прямолинейную форму, характерную для интактных частиц. На частичное разрушение частиц указывает и наблюдаемый заниженный размер высоты.

С помощью АСМ можно получить детальные характеристики по всем объектам на кадре. Программное обеспечение "ФемтоСкан Онлайн" может автоматически выделить объекты и посчитать геометрические характеристики каждой структуры, а также сравнить распределение частиц по размерам на двух образцах.

- Р – периметр;
- S – площадь;
- V – объем;
- RMS – среднеквадратичное значение высоты объекта (шероховатость);
- форм-фактор 1 – отношение радиуса окружности эквивалентной площади к радиусу окружности эквивалентного периметра. Для круглого объекта этот форм-фактор равен единице. Чем сильнее изрезан периметр объекта, тем ближе его значение к нулю;
- форм-фактор 2 – отношение удвоенной протяженности объекта к его периметру. Для тонкой нити это отношение равно единице, для окружности оно равно нулю;
- Н – максимальная высота объекта;
- <Н> – средняя высота объекта.

Приведенного выше набора из восьми параметров вполне достаточно для достоверной оценки различий в приготовленных образцах.

Из данных таблицы видно, что у второго образца значения периметра, площади и объема частиц гораздо выше, при этом высота

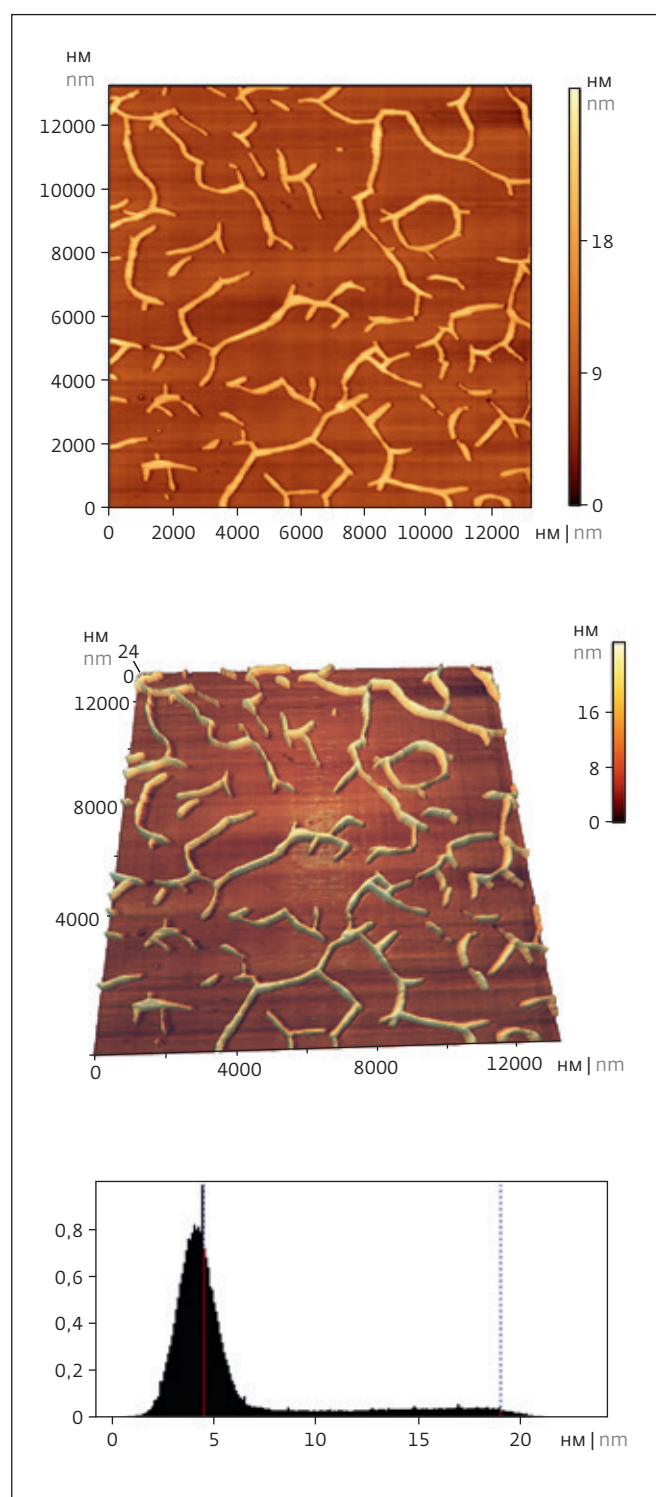


Рис.3. 2D- и 3D-изображения ВТМ. Левый выступ на гистограмме соответствует точкам подложки, правый частицам ВТМ. Расстояние между выступами указывает на наблюдаемую высоту частиц вируса около 14 нм

Fig.3. 2D- and 3D images of the TMV. The left protrusion in the histogram corresponds to the substrate dots, the right one to the TMV particles. The distance between the protrusions indicates the observed height of the virus particles of about 14 nm



Таблица 1. Сравнение геометрических характеристик вирусных частиц трех образцов

Table 1. Comparison of geometrical characteristics of viral particles of three samples

	P, nm	S, nm ²	V×10 ³ , nm ³	RMS, nm	Форм фактор 1, Rs/Rp Form factor	Форм фактор 2, 2Lskel/Lp Form factor	H, nm	<H>, nm
Образец №2 Sample 2	2177	156958	2708	2,08	0,05	0,62	20,84	16,36
Образец №2 Sample 2	6457	504267	5822	2,2	0,02	0,89	14,7	10,6
Образец №3 Sample 3	5053	557016	6035	1,5	0,02	0,89	14	9

объектов и среднеквадратичная шероховатость почти не отличаются.

Интересно оценить форм-фактор – частицы во втором образцы более склонны образовывать вытянутые нитевидные структуры в отличие от первого, что может быть следствием нанесения образца и его высыхания на подложке. Также, вероятно, в процессе хранения и подготовки образца для исследования на АСМ частицы могут ломаться и менее активно выстраиваются друг за другом на подложке.

В табл.1 приведены усредненные параметры частиц для двух случаев приготовления образцов (образец №1 и 2). Частицы образца 2 более склонны к упорядоченному построению торцев к торцу. На это указывают увеличенные значения параметров P, S и V для второго образца. Пропорциональное увеличение периметра и объема частиц в два раза второго образца указывает на характерную организацию друг за другом.

Образец вируса на рис.4 нагревали до 90 °С в концентрации 1 мг/мл в течение 1 мин. Существенно отличие в форме частиц от предыдущих двух образцов: все частицы как будто пытаются слиться воедино не только торцев к торцу, но и бок о бок, почти не встречаются одиночные. По данным геометрических размеров объектов образца №3 видно занижение общей высоты объектов, увеличение объема объектов, при этом значения форм-факторов не отличаются от образца №2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования ВТМ внесли существенный вклад в базовые представления о вирусах,

- V – volume;
- RMS – root mean square value of the object height (roughness);
- form factor 1 is the ratio of the radius of a circle of equivalent area to the radius of a circle of equivalent perimeter. For a circular object, this Form Factor 2 is equal to one. The more rugged the perimeter of the object, the closer its value is to zero;
- form Factor 2 is the ratio of the doubled length of the object to its perimeter. For a thin thread this ratio is equal to one, for a circle it is equal to zero,
- H – maximum object height;
- <H> – average height of the object.

The above set of 8 parameters is sufficient to reliably assess the differences in the prepared samples.

From the data in the table, it can be seen that the second sample has much higher values of perimeter, area and volume of particles, while the height of objects and RMS roughness are almost the same.

It is interesting to evaluate the form factor – the particles in the second sample are more prone to form elongated filamentous structures in contrast to the first, which may be a consequence of sample application and drying on the substrate. It is also likely that during storage and preparation of the sample for AFM examination, the particles may break and are less likely to line up one after another on the substrate.

Table 1 shows averaged particle parameters for two cases of sample preparation (sample 1 and 2). The particles of sample 2 are more inclined to an ordered face to face arrangement. This is indicated by the increased values of the parameters P, S and V for the second sample. The proportional increase

способствовали интенсивному развитию молекулярной генетики и пониманию характера протекания инфекционных заболеваний. ВТМ служил моделью для изучения таких человеческих патогенов, как грипп и полиомиелит [13, 14].

В рамках данной работы были получены данные об образцах ВТМ, частицы визуализированы с помощью АСМ и ПЭМ. Получены геометрические характеристики частиц по данным АСМ, показан разный характер адсорбции частиц на подложке из слюды в зависимости от образца, что может быть следствием пробоподготовки, условий нанесения и хранения образца ВТМ. Показано изменение формы частиц и характера расположения на слюде вследствие нагревания до 90 °С. На примере вируса табачной мозаики показаны возможности применения метода атомно-силовой микроскопии для определения морфологии и характера адсорбции вирусных частиц на подложке методом АСМ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Междисциплинарных научно-образовательных школ Московского университета, проект № 23-Ш04-04.

ИНФОРМАЦИЯ О РЕЦЕНЗИРОВАНИИ

Редакция благодарит анонимного рецензента (рецензентов) за их вклад в рецензирование этой работы, а также за размещение статей на сайте журнала и передачу их в электронном виде в НЭБ eLIBRARY.RU.

Декларация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Dubrovin E.V., Drygin Y., Novikov V.K., Yaminsky I.V. Atomic Force Microscopy as a Tool of Inspection of Viral Infection. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2007. No. 3. PP. 128-131. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.01.005>
2. Makarov V.V., Love A.J., Sinitsyna O.V., Makarova S.S., Yaminsky I.V., Taliansky M.E., Kalinina N.O. Green nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae* (на англ.). 2014. Vol. 6. No. 1. PP. 35-44.
3. Love A.J., Makarov V.V., Kalinina N.O., Yaminsky I.V., Taliansky M.E. The use of

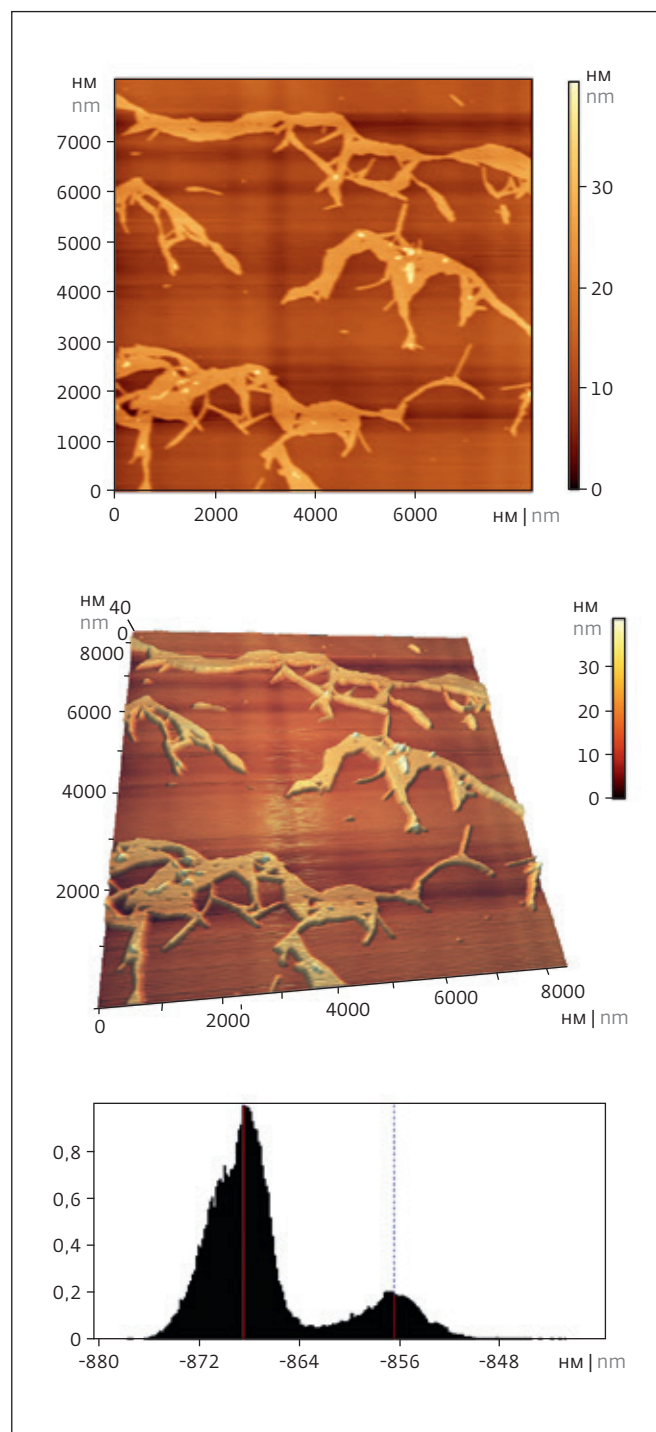


Рис.4. 2D- и 3D-изображения ВТМ после нагрева до 90 °С в течение 1 мин. Левый выступ на гистограмме соответствует точкам подложки, правый – частицам ВТМ. Расстояние между выступами указывает на наблюдаемую высоту частиц вируса около 12 нм

Fig.4. 2D- and 3D images of the TMV after heating to 90 °C for 1 min. The left protrusion in the histogram corresponds to the substrate dots, the right protrusion corresponds to the TMV particles. The distance between the protrusions indicates an observed virus particle height of about 12 nm



- tobacco mosaic virus and cowpea mosaic virus for the production of novel metal nanomaterials. *Virology*. 2014. Vol. 449. PP. 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.11.002>
4. **Kausche G.A., Pfannkuch E., Ruska H.** Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop. *Naturwissenschaften*. 1939. Vol. 27. PP. 292–98.
 5. **Olby R.C.** Francis Crick: Hunter of Life's Secrets Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harb. Lab. 2009.
 6. **Watson J.D.** The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA. 1968. New York: Atheneum.
 7. **Watson J.D.** 1954. The structure of tobacco mosaic virus: I. X-ray evidence of a helical arrangement of sub-units around the longitudinal axis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1954. Vol. 13. PP. 10–19. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(54\)90265-6](https://doi.org/10.1016/0006-3002(54)90265-6)
 8. **Watson J.D., Crick F.H.C.** A structure for deoxy-ribose nucleic acid. *Nature*. 1953. Vol. 171. PP. 737–38. <https://doi.org/10.1038/171737a0>
 9. **Akhmetova A.I., Nikitin N.A., Archipenko M.V., Karpova O.V., Yaminsky I.V.** 3. D visualization and characterization of plant viruses using bionanoscopia methods. *NANOINDUSTRY*. 2023. Vol. 16(6). PP. 338–344. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.6.338.344>
 10. **Dubrovina E.V., Kirikova M.N., Novikov V.K., Drygin Y.F., Yaminsky I.V.** Study of the peculiarities of adhesion of tobacco mosaic virus by atomic force microscopy. *Colloid J*. 2004. Vol. 66. PP. 673–678. <https://doi.org/10.1007/s10595-005-0048-x>
 11. **Trifonova E.A., Nikitin N.A., Kirpichnikov M.P., Karpova O.V., Atabekov I.G.** Method for obtaining and characterizing spherical particles – new biogenic platforms. *Bulletin of Moscow University. Series 16: Biology*. 2015. Vol. 4. PP. 46–50.
 12. **Akhmetova A.I., Yaminsky I.V.** Femto-Scan Online software in virus research. *NANOINDUSTRY*. 2021. Vol. 14. No. 1 (103). PP. 62–67. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2021.14.1.62.67>
 13. **Creager A.N.H.** The Life of a Virus: Tobacco Mosaic Virus as an Experimental Model, 1930–1965. Chicago: Univ. Chicago Press. 2002.
 14. **Creager A.N.H.** Paradigms and exemplars meet biomedicine. In *Kuhn's Structure of Scientific Revolutions at Fifty: Reflections on a Science Classic*. Ed. R.J. Richards L. Daston. 2016. Chicago: Univ. Chicago Press. PP. 151–66.

in the perimeter and volume of the particles by a factor of 2 of the second sample indicates a characteristic organisation one behind the other.

The virus sample in Fig.4 was heated to 90 °C at a concentration of 1 mg/ml for 1 min. There is a significant difference in the shape of particles from the previous two samples: all particles seem to try to merge together not only end-to-end but also side by side, almost no single particles are found. According to the data of geometrical sizes of objects in sample № 3 we can see underestimation of the total height of objects, increase in the volume of objects, while the values of form factors do not differ from sample No.2.

CONCLUSIONS

Studies of TMV have significantly contributed to the basic understanding of viruses, promoted intensive development of molecular genetics and understanding of the nature of infectious diseases. TMV served as a model for studying such human pathogens as influenza and poliomyelitis [13, 14].

Within the framework of this work, data on samples of TMV were obtained, the particles were visualised using AFM and TEM. The geometrical characteristics of particles were obtained from AFM data, and different adsorption patterns of PARTICLES on mica substrate were shown depending on the sample, which may be a consequence of sample preparation, application and storage conditions of the TMV sample. A change in particle shape and disposition on mica due to heating up to 90 °C was shown. Using the example of tobacco mosaic virus, the possibilities of using the atomic force microscopy method to determine the morphology and nature of adsorption of viral particles on the substrate by AFM are shown.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported within the framework of Interdisciplinary Scientific and Educational Schools of Moscow University, Project No. 23-Sh04-04.

PEER REVIEW INFO

Editorial board thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. It is also grateful for their consent to publish papers on the journal's website and SEL eLibrary eLIBRARY.RU.

Declaration of Competing Interest. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.