



# СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В РЕШЕНИИ ЗАДАЧ ВИРУСОЛОГИИ

## SCANNING PROBE MICROSCOPY IN SOLVING VIROLOGY PROBLEMS

И.В.Яминский<sup>1,2,3,4</sup>, д.ф.-м.н., проф. МГУ имени М.В.Ломоносова, физический и химический факультеты, генеральный директор Центра перспективных технологий, директор Энергоэффективных технологий, вед. науч. сотр. ИНЭОС РАН, (ORCID: 0000-0001-8731-3947), А.И.Ахметова<sup>1,2,3</sup>, инженер НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ, ведущий специалист Центра перспективных технологий и Энергоэффективных технологий, (ORCID: 0000-0002-5115-8030) / yaminskiy@nanoscopy.ru

I.V.Yaminskiy<sup>1,2,3,4</sup>, *Doct. of Sc. (Physics and Mathematics)*, Prof. of Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, Director of Advanced Technologies Center, Director of Energy Efficient Technologies, Leading Sci. of INEOS RAS, A.I.Akhmetova<sup>1,2,3</sup>, Engineer of A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leading Specialist of Advanced Technologies Center and of Energy Efficient Technologies

DOI: 10.22184/1993-8578.2020.13.6.340.344

Получено: 29.09.2020 г.

Сканирующая зондовая микроскопия позволяет получать трехмерную визуализацию вирусов в различных средах: в жидкости и на воздухе. Помимо трехмерной топографии, можно измерять такие свойства, как механическая жесткость, адгезия, склонность к кристаллизации, агрегация частиц на подложке и т. д. Характеристика вирусов животных и человека является предметом многочисленных исследований из-за их потенциального вреда для высших организмов.

Scanning probe microscopy provides three-dimensional visualization of viruses in various media, for example, liquid and air. In addition to three-dimensional topography, it is possible to measure such properties as mechanical rigidity, adhesion, crystallization tendency, aggregation of particles on a substrate, etc. Characterization of animal and human viruses is the subject of numerous studies due to their potential harm to higher organisms.

Методы сканирующей зондовой микроскопии были применены для визуализации вирусов растений, животных и человека [1] вскоре после изобретения сканирующей туннельной микроскопии в 1982 году [2, 3] и атомно-силовой микроскопии [4] в 1986 году. С первых же попыток визуализации вирусов стало очевидно, что появился новый высокоинформативный инструмент, который можно использовать в фундаментальных и практических науках, включая вирусологию и медицину. До сих пор определенную уникальную информацию можно получить только

с помощью методов сканирующей зондовой микроскопии. Эта информация включает экспериментальные данные о механических свойствах вируса: механической жесткости и стабильности, адгезионных свойствах, силе связывания.

Стоит отметить, что другие мощные методы, основанные на просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), не следует рассматривать как конкурирующие со сканирующей зондовой микроскопией в исследованиях окружающей среды. Методы просвечивающей микроскопии позволяют получать изображения вирусных частиц

<sup>1</sup> МГУ имени М.В.Ломоносова / Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments.

<sup>2</sup> ООО НПП "Центр перспективных технологий" / Advanced Technologies Center.

<sup>3</sup> ООО "Энергоэффективные технологии" / Energy Efficient Technologies.

<sup>4</sup> ИНЭОС РАН, Москва, Россия / INEOS RAS, Russia.



в вакууме, что прекрасно дополняет данные, полученные с помощью зондовой микроскопии.

Отличительной особенностью зондовой микроскопии от других методов является пробоподготовка. Она не требует специальных навыков. В зондовой микроскопии используются три вида подложек: слюда, графит и стекло. Слюда гидрофильна, что облегчает нанесение образцов с вирусом. Свежесколотый графит является гидрофобным. И у графита, и у слюды можно снять верхний слой, получив идеальную подложку для зондовой микроскопии. У графита высшего качества расстояние между террасами может достигать 10 мкм. Стекло используется гораздо реже, оно не такое равномерно плоское, как графит и слюда. Стекло обычно имеет волнообразный

рельеф с амплитудой нанометрового размера. Наблюдаемая топография стекла может затруднить точное измерение размера вируса.

Адгезионную способность слюды и графита можно проиллюстрировать, исследуя вирус табачной мозаики. В зависимости от подложки одна и та же концентрация частиц в образце может различаться для графита и слюды [5].

Функционализированные подложки используются в сенсорных приложениях. В этом случае подложки могут быть покрыты антителами [6], аптамерами [7], синтетическими рецепторами [8, 9].

При подготовке образца с вирусными частицами желательно исключить попадание посторонних объектов, особенно затрудняют визуализацию осевшие частицы из буфера.

The scanning probe microscopy techniques were applied to imaging viruses in plants, animals and humans [1] shortly after the invention of scanning tunneling microscopy in 1982 [2, 3] and atomic force microscopy [4] in 1986. From the very first attempts to visualize viruses, it became obvious that a new highly informative tool appeared that can be used in basic and practical sciences, including virology and medicine. Until now, certain unique information can only be obtained using the scanning probe microscopy methods. This information includes experimental data on the mechanical properties of the virus (mechanical rigidity and stability), adhesive properties, and binding strength.

It is worth noting that other powerful methods based on transmission electron microscopy (TEM) should not be viewed as competing with scanning probe microscopy in the environmental studies. Transmission microscopy techniques provide the images of viral particles in

a vacuum, which perfectly complements the data obtained with probe microscopy.

A feature of the probe microscopy as distinct from other methods is sample preparation. It does not require any special skills. Three types of substrates are used in probe microscopy: mica, graphite, and glass. Mica is hydrophilic, making it easier to coat samples with the virus. Freshly split graphite is hydrophobic. For both graphite and mica, the top layer can be removed to create an ideal substrate for probe microscopy. For graphite of the highest quality, the distance between the terraces can be up to 10 microns. Glass is used much less frequently and is not as uniformly flat as graphite and mica. Glass usually has a wavy relief with nanometer-sized amplitude. The observed glass topography can make it difficult to accurately measure the virus size.

Adhesion of mica and graphite can be illustrated by examining the tobacco mosaic virus. Depending on the substrate,

the same concentration of particles in the sample can differ for graphite and mica [5].

Functionalized substrates are used in sensory applications. In this case, the substrates can be coated with antibodies [6], aptamers [7] and synthetic receptors [8, 9].

When preparing a sample with viral particles, it is desirable to exclude the ingress of foreign objects, which especially impede visualization of settled particles from the buffer. Distilled water can be used to dilute the sample: after applying the suspension to the substrate and prolongation phase, the sample can be washed. The prolongation duration depends on the sample and can range from a few seconds to 30 minutes.

During scanning, the actual sizes of the virus particles may differ. Sometimes, due to interaction of the virus with the substrate, the height may be less than the real one. Also, the particle height depends on the substrate: the virus can be higher on graphite than on mica (the

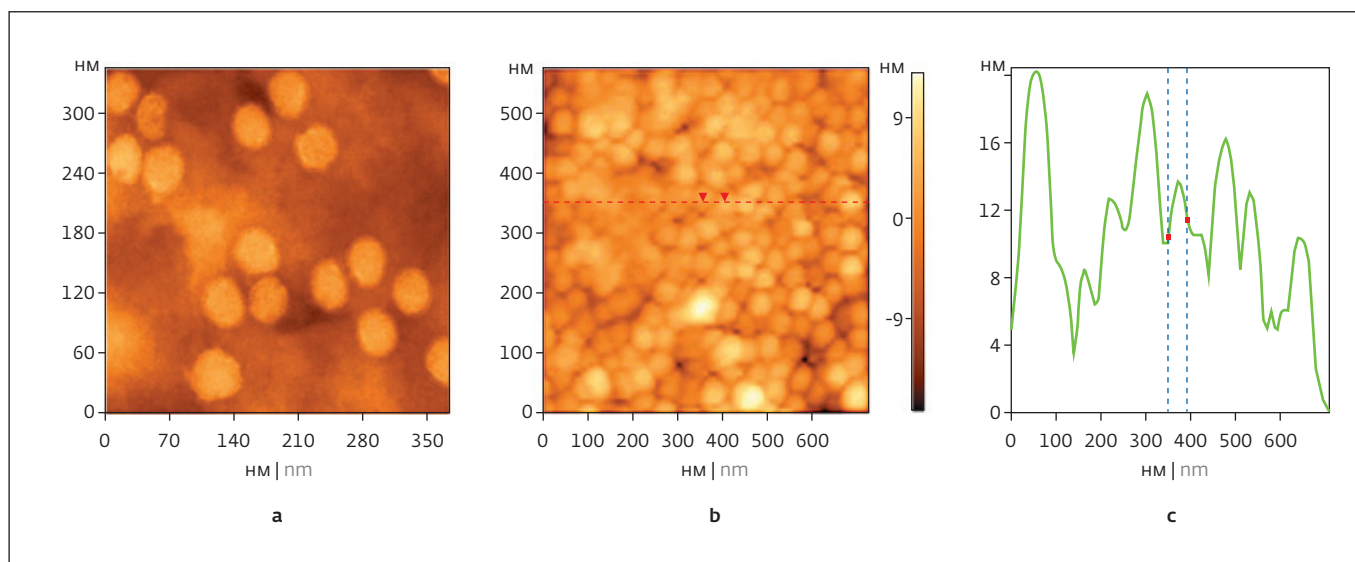


Рис.1. *a* – просвечивающая электронная микроскопия, *b* – зондовая микроскопия, *c* – сечение образца (по данным сечения диаметр одной вирусной частицы составляет 43 нм)

Fig.1. *a* – transmission electron microscopy, *b* – probe microscopy, *c* – sample cross-section (according to the cross-section data, the diameter of one viral particle is 43 nm)

Для разбавления образца возможно использование дистиллированной воды: после нанесения суспензии на подложку и пролонгации образец можно промыть. Длительность пролонгации зависит от образца и может составлять от нескольких секунд до 30 мин.

Во время сканирования реальные размеры вирусных частиц могут отличаться. Иногда из-за взаимодействия вируса

с подложкой высота может быть меньше реальной. Также высота частицы зависит от подложки: на графите вирус может быть выше, чем на слюде (разница наблюдаемых высот вируса табачной мозаики составляет около 1 нм). Из-за формы кончика кантилевера частицы могут выглядеть шире, чем они есть на самом деле. Это так называемый эффект уширения кантилевера [10]. Точный

difference in the observed heights of the tobacco mosaic virus is about 1 nm). Due to the shape of the cantilever tip, the particles may appear wider than they actually are. This is the so-called cantilever broadening effect [10]. The exact diameter of the virus can be observed in the crystalline form [11].

#### SOFTWARE FOR PROCESSING THE OBTAINED RESULTS

After scanning, you need to process the results. Image processing is another highly artistic task. Interpretation of the results is highly dependent

on how the image has been processed.

Most software packages have a built-in geometric measurement and transformation service, which includes [12]:

- construction of cross-sections and histograms,
- measurement of distances, angles, lengths of broken lines,
- determination of surface roughness,
- measurement of the perimeter of the selected area,
- automatic determination of the length of the isoline, and its limited area and surface volume,

- removal of the middle slope,
- construction of three-dimensional images,
- selection of the most suitable color palette.

Recognition of the same shape objects is one of the important tasks in probe microscopy. The human eye quickly finds a particular shape of interest in an image. However, clear mathematical criteria are needed to automate this process. When analyzing a sample with a smooth surface, the image has a uniform background against which automatic search is easily accomplished using



диаметр вируса можно наблюдать в кристаллической форме [11].

### ПО ДЛЯ ОБРАБОТКИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

После сканирования необходимо обработать полученные результаты. Обработка изображений – еще одна высокохудожественная задача. От того, как обрабатывается изображение, сильно зависит интерпретация полученных результатов.

Большинство программных пакетов имеет встроенную службу геометрических измерений и преобразований, которая включает [12]:

- построение сечений и гистограмм,
- измерение расстояний, углов, длин ломаных линий,
- определение шероховатости поверхности,
- измерение периметра выбранной площади,
- автоматическое определение длины изолинии и ее ограниченной площади и объема поверхности,
- удаление среднего склона,
- построение трехмерных изображений,
- выбор наиболее подходящей цветовой палитры.

Распознавание объектов одинаковой формы – одна из важных задач в зондовой микроскопии. Человеческий глаз быстро находит интересующую частицу определенной формы на изображении. Однако для автоматизации этого процесса необходимы четкие математические критерии. При анализе образца с гладкой поверхностью изображение имеет однородный фон, на котором легко реализуется автоматический поиск с помощью математических алгоритмов, встроенных в большинство программ обработки изображений для оптической, электронной и зондовой микроскопии.

FemtoScan Online – удобная программа для обработки изображений, она принимает более 100 различных форматов данных, разработанных существующими и уже исчезнувшими компаниями, микроскопы которых используются в лабораториях по всему миру. Программа удобна для анализа больших изображений, так как одновременно могут отображаться два изображения: обзорное изображение со "скользящей" областью и детальное изображение "скользящей" области. При перемещении выделенной области детальное изображение, участок сечения и изображение Фурье изменяются синхронно. Эта функция

используется при поиске интересующих объектов. Также в FemtoScan Online 3D-изображения можно просматривать на стереомониторе. Программа осуществляет допечатную подготовку и подготовку презентаций удобным и простым способом: подсветка, настройка цветов и шрифтов, создание 3D-изображений и видео с полетом над поверхностью, стереоржим для 3D-изображений [13, 14].

Несмотря на видимый прогресс в визуализации вирусов с помощью зондовой микроскопии, остается еще много нерешенных проблем. В настоящее время данные зондовой микроскопии вирусов не систематизированы, не создан описательный атлас изображений и морфологии, обнаруженных с помощью микроскопии высокого разрешения. Это одна из задач лаборатории зондовой микроскопии физического и химического факультетов МГУ имени М.В. Ломоносова.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-12-00389) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-32-90036).*

## ПРОЕКТНО-КОНСТРУКТОРСКОЕ БЮРО АСЕПТИКА



МЕБЕЛЬ  
ИЗ НЕРЖАВЕЮЩЕЙ СТАЛИ

[www.aseptica.biz](http://www.aseptica.biz)

Тел.: (495) 585-88-15, (495) 640-23-49 E-mail: [asep5858815@gmail.com](mailto:asep5858815@gmail.com)



## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kuznetsov Yu.G., McPherson A. Atomic Force Microscopy in Imaging of Viruses and Virus-Infected Cells. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (2011), 75 (2) 268-285. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00041-10>.
2. Binnig G., Rohrer H. Scanning Tunneling Microscopy, *Hely. Phys. Aria* 55, (1982), 726.
3. Binnig G., Rohrer H. Scanning tunneling microscopy, *IBM Journal of Research and Development*. 30 (4) (1986) 355-69.
4. Binnig G., Quate C.F., Gerber Ch. Atomic Force Microscope, *Physical Review Letters*. 56 (9) (1986) 930-933.
5. Dubrovin 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 Journal*, 66(6) (2004) 673-678. <http://dx.doi.org/10.1007/s10595-005-0048-x>.
6. Ierardi V., Ferrera F., Millo E., Damonte G., Filaci G., Valbusa U. Bioactive surfaces for antibody-antigen complex detection by Atomic Force Microscopy *J. Phys. Conf. Ser.*, 439, (2013) 012001.
7. Pleshakova T.O., Kaysheva A.L., Shumov I.D., Ziborov V.S., Bayzyanova J.M., Konev V.A., Uchaikin V.F., Archakov A.I., Ivanov Y.D. Detection of Hepatitis C Virus Core Protein in Serum Using Aptamer-Functionalized AFM Chips, *Micromachines*, 10, (2019) 129.
8. Gorelkin P.V., Erofeev A.S., Kiselev G.A., Kolesov D.V., Dubrovin E.V., Yaminsky I.V. Synthetic sialylglycopolymer receptor for virus detection using cantilever-based sensors. *The Analyst*, (2015) 140(17):6131-6137. <http://dx.doi.org/10.1039/C5AN 01102G>.
9. Gorelkin P.V. et al. Cantilever sensors based on sialylglycopolymer virus receptor with different readout systems, 2015 IEEE SENSORS, Busan, (2015), pp. 1-4.
10. Gallyamov M.O., Yaminskii I.V. Quantitative methods for restoration of true topographical properties of objects using the measured afm-images. The effect of broadening of the afm-profile, *Surface Investigation X-Ray, Synchrotron and Neutron Techniques*, 16(7) (2001) 1135-1141.
11. Malkin A.J., Land T.A., Kuznetsov Y.G., McPherson A., DeYoreo J.J. Investigation of virus crystal growth mechanisms by in situ atomic force microscopy. *Phys. Rev. Lett.* (1995). 75:2778-2781.
12. Электронный ресурс: [http://en.nanoscopy.ru/software/femtoscan\\_online/](http://en.nanoscopy.ru/software/femtoscan_online/)
13. Yaminsky I.V., Filonov A.S., Sinitsyna O.V., Meshkov G.B. Software FemtoScan Online. *Nanoindustry*, 2 (64) (2016) 42-46.
14. Filonov A.S., Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Meshkov G.B. FemtoScan Online! Why? *Nanoindustry*, 84 (5) (2018) 339-342. <http://dx.doi.org/10.22184/1993-8578.2018.84.5.336.342>.

mathematical algorithms built into most image processing programs for optical, electron and probe microscopy.

FemtoScan Online is a user-friendly image processing software that accepts over 100 different data formats developed by the existing and now extinct companies which microscopes are used in laboratories around the world. The program is convenient for analyzing large images, since two images can be displayed simultaneously: an overview image with a "sliding" area and a detailed image of a "sliding" area. When you

move the selected area, the detail image, the sectional area and the Fourier image change synchronously. This function is used when searching for objects of interest. Also in FemtoScan Online, 3D images can be viewed on a stereo monitor. The program carries out prepress preparation and preparation of presentations in a convenient and simple way: lighting, setting colors and fonts, creating 3D images and video with flying over the surface, stereo mode for 3D images [13, 14].

Despite a visible progress in visualization of viruses using

probe microscopy, there are still many unresolved problems. Currently, the data of probe microscopy of viruses is not systematized, a descriptive atlas of images and morphology detected using high-resolution microscopy has not been created. This is one of the tasks of the probe microscopy laboratory of the physics and chemistry faculties of the Lomonosov Moscow State University. ■

*This work was supported by the Russian Science Foundation, project No. 20-12-00389, and the Russian Foundation for Basic Research, project No. 20-32-90036.*



**ИЗДАТЕЛЬСТВО «ТЕХНОСФЕРА»  
ПРЕДСТАВЛЯЕТ КНИГУ:**



## **Проектирование цифрового будущего. Научные подходы**

*Коллективная монография*

Под ред. Г.Г. Малинецкого, В.В. Иванова, П.А. Верника  
М.: ТЕХНОСФЕРА, 2020. – 356 с.  
(Серия «Библиотека Института стратегий развития», 06)  
ISBN 978-5-94836-575-6

*Издание осуществлено при поддержке  
АНО «Институт стратегий развития»*



**ИНСТИТУТ  
СТРАТЕГИЙ  
РАЗВИТИЯ**

**Цена 636 руб.**

С междисциплинарных позиций рассматриваются вопросы формирования цифрового будущего в различных сферах – от философии, культуры, образования и конкретных технических проектов, возможность воплощения которых дают компьютерные технологии, до новых математических моделей и прогнозов.

Выделен ряд ключевых направлений, развитие которых может существенно повысить социально-экономическую эффективность программы цифровой экономики.

ИНФОРМАЦИЯ О НОВИНКАХ  
[www.technosphere.ru](http://www.technosphere.ru)

Как заказать наши книги?  
По почте: 125319, Москва, а/я 91  
По факсу: +7 (495) 956-33-46

E-mail: [knigi@technosphere.ru](mailto:knigi@technosphere.ru)  
[sales@technosphere.ru](mailto:sales@technosphere.ru)