



УДК 53.088; 57.081; 53.084.2; 53.086

ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ В ЖИДКИХ СРЕДАХ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

М.В. Жуков^{a,b}, И.В. Кухтевич^b

^a Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация

^b Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, 198095, Российская Федерация

Автор для переписки: cloudjyk@yandex.ru

Информация о статье

Поступила в редакцию 20.09.16, принята к печати 28.10.16

doi: 10.17586/2226-1494-2016-16-6-1056-1062

Язык статьи – русский

Ссылка для цитирования: Жуков М.В., Кухтевич И.В. Особенности проведения измерений в жидких средах методом атомно-силовой микроскопии // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2016. Т. 16. № 6. С. 1056–1062. doi: 10.17586/2226-1494-2016-16-6-1056-1062

Аннотация

Предмет исследования. Приведены результаты экспериментального исследования особенностей проведения измерений в жидких средах на атомно-силовом микроскопе с выявлением лучших режимов, буферных сред, обнаружением артефактов изображения и их возможным устранением. **Метод.** Исследования проведены на атомно-силовом микроскопе Ntegra Aura (NT-MDT, Россия) с использованием штатной призмы держателя зондов и жидкостной ячейки для проведения измерений в жидкости. В качестве рабочей подложки выбрана калибровочная решетка TGQ1 (NT-MDT, Россия) со структурами фиксированной формы и высоты. **Основные результаты.** Проведены исследования работы зондов в жидких средах с разным pH (дистиллированная вода, PBS – натрий-фосфатный буфер, Na₂HPO₄ – боратный буфер, NaOH 0,1 М, NaOH 0,5 М) в контактном и полуконтактном режимах работы. Выявлены оптимальные режимы работы и лучшие среды для проведения измерений. Приведено сравнение данных атомно-силовой микроскопии с результатами сканирующей электронной микроскопии. Рассмотрены особенности реагирования системы обратной связи на процесс взаимодействия системы «зонд–поверхность» на кривых отвода/подвода в различных средах. Изучен артефакт инверсии изображения и приведены рекомендации по его устранению. **Практическая значимость.** Результаты исследования открывают возможность точной настройки метода для проведения исследований объектов живой и неживой природы методами атомно-силовой микроскопии в жидких средах.

Ключевые слова

атомно-силовая микроскопия, зонд, буферные среды, калибровочная решетка, артефакт изображения

Благодарности

Работа выполнена при государственной финансовой поддержке ведущих университетов Российской Федерации (субсидия 074-U01), Российского фонда фундаментальных исследований (16-32-00806).

FEATURES OF MEASURING IN LIQUID MEDIA BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

M.V. Zhukov^{a,b}, I.V. Kukhtevich

^a ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation

^b Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint Petersburg, 198095, Russian Federation

Corresponding author: cloudjyk@yandex.ru

Article info

Received 11.09.16, accepted 20.10.16

doi: 10.17586/2226-1494-2016-16-6-1056-1062

Article in Russian

For citation: Zhukov M.V., Kukhtevich I.V. Features of measuring in liquid media by atomic force microscopy. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2016, vol. 16, no. 6, pp. 1056–1062. doi: 10.17586/2226-1494-2016-16-6-1056-1062

Abstract

Subject of Research. The paper presents results of experimental study of measurement features in liquids by atomic force microscope to identify the best modes and buffered media as well as to find possible image artifacts and ways of their elimination. **Method.** The atomic force microscope Ntegra Aura (NT-MDT, Russia) with standard prism probe holder and liquid cell was used to carry out measurements in liquids. The calibration lattice TGQ1 (NT-MDT, Russia) was chosen as

investigated structure with a fixed shape and height. **Main Results.** The research of probe functioning in specific pH liquids (distilled water, PBS - sodium phosphate buffer, Na_2HPO_4 - borate buffer, NaOH 0.1 M, NaOH 0.5 M) was carried out in contact and semi-contact modes. The optimal operating conditions and the best media for the liquid measurements were found. Comparison of atomic force microscopy data with the results of lattice study by scanning electron microscopy was performed. The features of the feedback system response in the «probe-surface» interaction were considered by the approach/retraction curves in the different environments. An artifact of image inversion was analyzed and recommendation for its elimination was provided. **Practical Relevance.** These studies reveal the possibility of fine alignment of research method for objects of organic and inorganic nature by atomic force microscopy in liquid media.

Keywords

atomic force microscopy, probe, buffered media, calibration lattice, image artifact

Acknowledgements

The work was partially financially supported by the Government of the Russian Federation (grant 074-U01), the Russian Foundation for Basic Research (16-32-00806).

Введение

Перспективным направлением исследований топологии и локальных свойств биологических объектов (клеток, бактерий, вирусов, белков, ДНК и т.д.) со сверхвысоким разрешением является применение метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) [1–7] в жидких средах. Данные разработки крайне востребованы, так как позволяют проводить прецизионные высокоточные *in situ* исследования биологических объектов в нативном состоянии [8–13].

Тем не менее, применение метода АСМ связано с рядом трудностей, которые возникают при проведении измерений. К таким трудностям следует отнести сложность закрепления биологических объектов на подложке в нативном состоянии, ухудшение разрешения и возможность появления паразитных шумов при работе с жидкостными средами [14, 15], обусловленных капиллярными силами, поверхностным натяжением, микротечениями и свойствами жидкости (вязкость, плотность и др.). На текущий момент данная область еще мало изучена и требует детального рассмотрения в связи с возможными несоответствиями размеров и формы изучаемых объектов, получаемых в процессе сканирования.

Решение перечисленных проблем может быть связано с применением специализированных зондов, выявлением оптимальных параметров следящей системы микроскопа, лучших буферных сред для исследований, а также калибровкой микроскопа при использовании специальных калибровочных тестовых структур [16–19].

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей работы атомно-силового микроскопа на тестовых структурах в различных буферных средах с выявлением оптимальных режимов работы, а также выявление артефактов изображения и их возможное устранение.

Экспериментальная установка

С целью изучения особенностей проведения измерений методом АСМ в жидких средах с различным рН в качестве тестового объекта была выбрана калибровочная решетка TGQ1 (НТ-МДТ, Россия)¹. Средние значения геометрических размеров калибровочной решетки TGQ1, которые являются существенными при проведении исследований, были взяты за эталонные. Среда были выбраны таким образом, чтобы обеспечить возможность изучения особенностей измерений при переходе от кислотных свойств к щелочным с увеличением щелочных свойств (рис. 1).

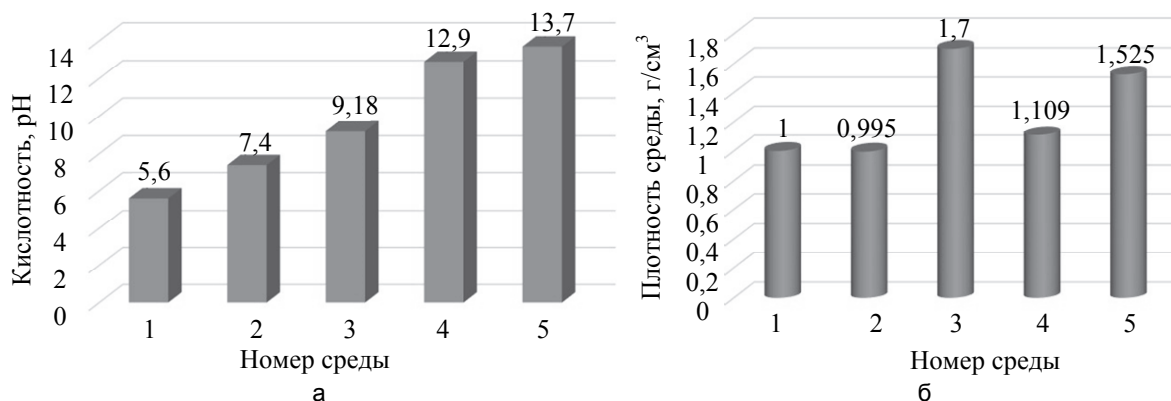


Рис. 1. Свойства применяемых жидких сред: кислотность (а), плотность (б). Номера сред, соответственно: дистиллированная вода (1), PBS – натрий-фосфатный буфер (2), Na_2HPO_4 – боратный буфер (3), NaOH 0,1 М (4), NaOH 0,5 М (5)

¹ Сайт фирмы НТ-МДТ/TGQ1 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.ntmdt-tips.com/products/view/tgq1>, свободный. Загл. с экрана.

Для экспериментальных исследований в контактном и полуконтактном режимах были выбраны кремний-нитридные зонды SNL-10 (Bruker, США) с кантилеверами треугольной формы. Исследования проводились на сканирующем зондовом микроскопе Ntegra Aura (НТ-МДТ, Россия) и электронном микроскопе Inspect (FEI, США). Для работы в жидких средах использовалась штатная жидкостная ячейка и держатель зонда с призмой.

Результаты и обсуждение

Из экспериментальных данных получено, что кантилеверы с малой жесткостью (0,06–0,12 Н/м) при проведении измерений в контактном режиме на воздухе дают наиболее близкие к эталонным значениям оценки геометрических размеров тестовой решетки и лучшее качество изображений. При этом значения размеров калибровочной решетки для контактного режима имеют погрешность 1,2–5,6%, а в случае полуконтактного режима погрешность составляет 0,6–19,4%.

Наилучшее соответствие значений геометрических размеров калибровочной решетки, полученных в ходе исследований, эталонным значениям достигается при работе в жидких средах с использованием длинных кантилеверов в полуконтактном режиме. Отклонения значений размеров калибровочной решетки от эталонных составили: 3–12,3% в дистиллированной воде; 3–14,2% в PBS; 1,3–13,4% в боратном буфере; 3,2–20,2% в NaOH 0,1 М; 5,7–16,2% в NaOH 0,5 М.

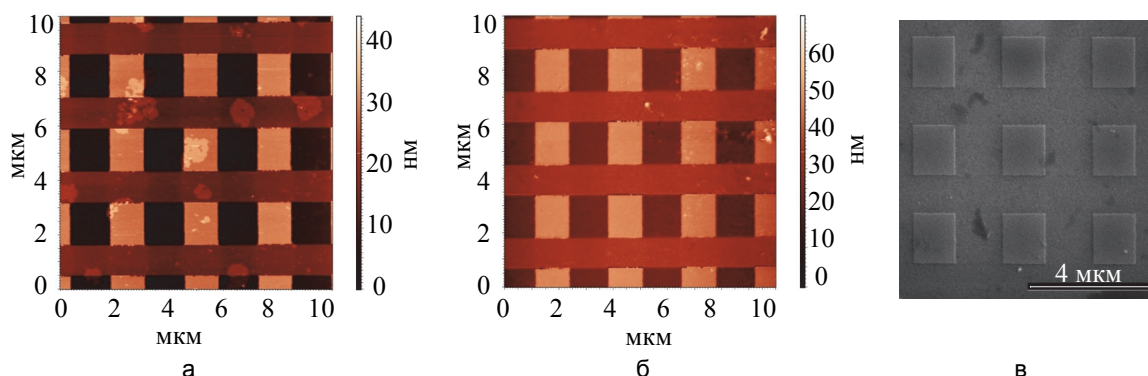


Рис. 2. АСМ-изображения калибровочной решетки TGQ1 в PBS (наибольшая точность и качество изображения по итогам измерений), полученные с использованием длинного кантилевера АСМ-зонда в контактном режиме (а) и с использованием короткого кантилевера АСМ-зонда в полуконтактном режиме (б). Проверочное изображение калибровочной решетки TGQ1, полученное методом сканирующей электронной микроскопии (в)

При работе короткими кантилеверами с высокой жесткостью (0,24–0,35 Н/м) на воздухе лучший результат получается в полуконтактном режиме. Отклонения значений геометрических размеров калибровочной решетки от эталонных значений составили для контактного режима до 34,3%, а для полуконтактного – 0,2–19,1%. При сканировании калибровочной решетки в жидких средах наблюдается уменьшение линейных размеров по оси X и Y примерно на 8,3%. Значения высоты варьируются в достаточно широких пределах и составляют для полуконтактного режима 18–28 нм, а для контактного режима 13–22 нм, что может объясняться наличием шумов в системе. Самый быстрый подвод в жидкости наблюдался при работе в PBS, а лучшее качество изображений – при использовании натриевых гидроксидов и PBS (рис. 2, а, б). На полученных АСМ-изображениях светлые области представленной справа цветовой шкалы соответствуют более высоким, а темные, соответственно, более низким точкам относительно среднего уровня, равного половине максимального перепада высот исследуемой области.

Для сравнения полученным методом АСМ результатов были проведены дополнительные измерения калибровочной решетки TGQ1 методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рис. 2, в). Как видно на рис. 2, в, тестовые площадки калибровочной решетки TGQ1 имеют форму прямоугольника, а не квадрата, как указано на схеме, заявленной производителем, что, тем не менее, удовлетворяет параметрам погрешности латеральных размеров $\pm 0,35$ мкм, указанных в спецификации. Изначально все расчеты выполнялись для эталонных параметров: размер калибровочной площадки по X и Y равен 1,5 мкм; период между калибровочными площадками по X и Y равен 3 мкм. Однако оценки значений параметров, полученные по СЭМ-изображениям, отличаются от эталонных: размер калибровочной площадки по $X = 1,71$ мкм и $Y = 1,44$ мкм; период между калибровочными площадками по $X = 2,99$ мкм и $Y = 3,04$ мкм. Учитывая, что при оценке использовались параметры периода калибровочной решетки, очевидно, что коррекция оценок на поправочные коэффициенты не окажет существенного влияния на сделанные на основе экспериментальных данных выводы.

Для изучения природы взаимодействия зонда с поверхностью в полуконтактном режиме в жидкости были исследованы кривые отвода/подвода, измеренные в жидкости и в воздушной среде (рис. 3). Из-

вестно, что в полуконтактной моде зонд колеблется на своей резонансной частоте, и измеряется амплитуда его колебаний, которая падает (затухает) при подводе к поверхности (сигнал снимается с фотодиода в наноамперах). Как видно из кривых, при работе в жидкости можно выделить некоторые особенности (рефлексы), представляющие собой области резкого повышения амплитуды раскачивания зонда (рис. 3, а), отсутствующие при работе в воздушной среде (рис. 3, б).

Можно предположить, что первый и последний рефлексы связаны с наличием микротечений, возникающих при подводе зонда к поверхности при первом контакте и прижме к подложке соответственно. При этом последний (третий) рефлекс происходит после установления контакта с подложкой, что может объясняться остаточным воздействием микротечений, а также последующим изгибанием балки кантилевера при нарастании прижима и увеличением давления жидкости под балкой (пик-эффект).

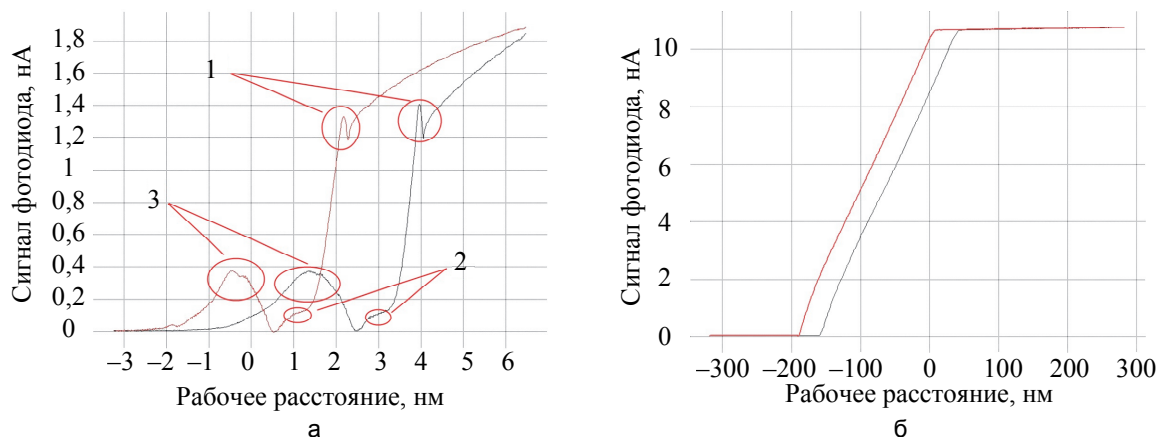


Рис. 3. Характерные изображения кривых отвода/подвода в полуконтактном режиме, взятые в жидкости (а) и в воздушной среде (б), где 1 – первый рефлекс, 2 – второй рефлекс (полурефлекс), 3 – третий рефлекс (пик-эффект) при поверхностном контакте в жидкости. Красная кривая отвечает за подвод, черная – отвод зонда от поверхности

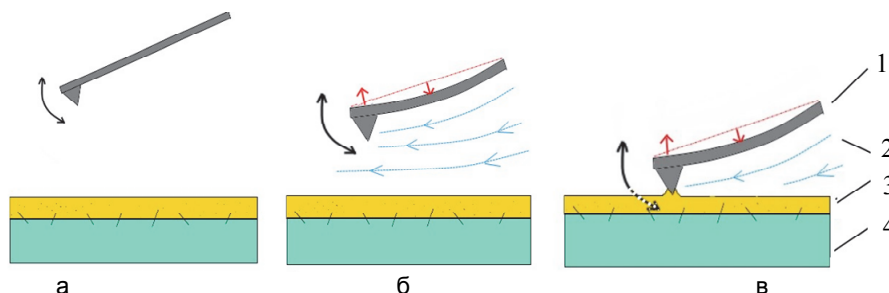


Рис. 4. Схематическое отображение взаимодействия зонда с подложкой в процессе подвода в жидкости: свободное колебание зонда в жидкости (а); усиление колебаний зонда за счет изгиба балки кантилевера и возникновения микротечений (б); залипание зонда в приповерхностном слое, где 1 – зонд, 2 – микротечения, 3 – приповерхностный слой, 4 – подложка (в)

Данное явление можно объяснить созданием избыточного давления в жидкости, создаваемого балкой (кантилевером) зонда между зондом и образцом, приводящим к возникновению микротечений между зондом и образцом. Тогда второй рефлекс, представляющий собой полупик, или скачок кривой своеобразной формы (полурефлекс), можно объяснить залипанием зонда в момент его прижима к подложке, в результате которого зонд колеблется вместе с приповерхностным слоем жидкости. Данный факт подтверждает гистерезис кривых подвода и отвода, возникающих из-за высокой адгезии зонда к подложке в момент отвода. Происходит задержка в отводе, что объясняется смещением кривой отвода в правую сторону.

Проведено сравнение кривых подвода в различных средах с выявлением характерных особенностей процесса подвода (рис. 5). Так, у натриевых гидроксидов заметен резкий скачок сигнала фотодиода в начале понижения амплитуды колебаний кантилевера зонда, подобные скачки заметны и в нижней точке оси ординат, что свидетельствует о резком повышении амплитуды колебаний. В первом случае это может быть связано с эффектом влияния микротечений жидкости, возникающих под зондом в процессе его колебания в полуконтактном режиме, что приводит к кратковременному раскачиванию зонда и повышению его амплитуды.

Во втором случае (нижняя точка, полурефлекс) повышение амплитуды колебаний может быть связано с залипанием зонда при близком контакте с поверхностью. Данный полурефлекс особенно заметен в средах NaOH и боратного буфера. Следует отметить, что третий пик колебаний (пик-эффект) при даль-

нейшем подводе к поверхности (зонд находится в контакте) наблюдается при всех случаях и может быть связан с остаточными микротечениями, вызванными воздействием зонда на подложку при подводе.

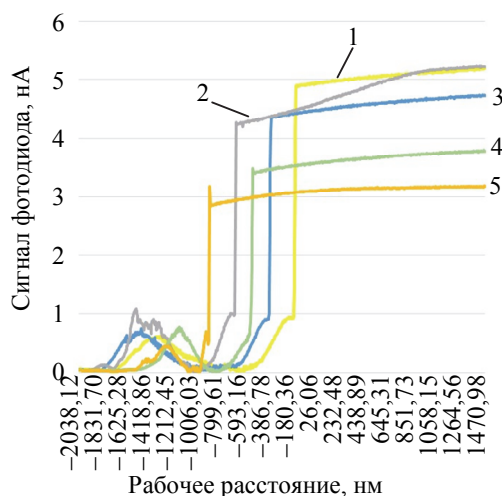


Рис. 5. Сравнительная характеристика кривых подвода на стандартных зондах в различных средах
1 – H_2O , 2 – Боратный буфер, 3 – PBS, 4 – NaOH 0,5 М, 5 – NaOH 0,15 М

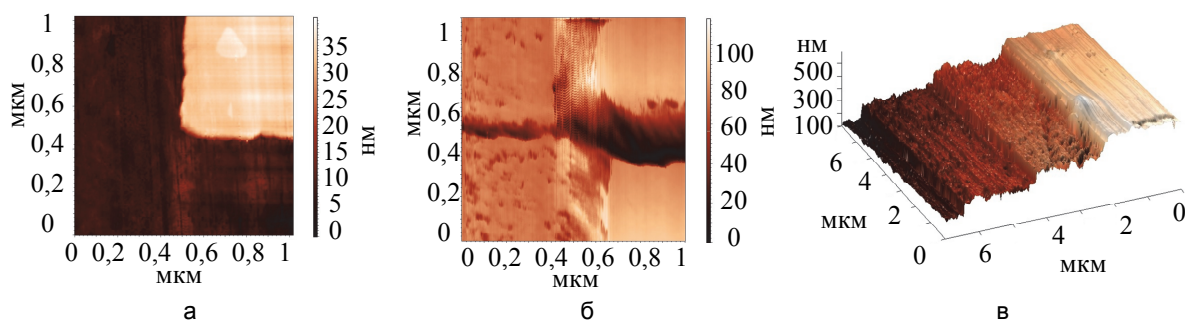


Рис. 6. Характерные АСМ-изображения края ячейки калибровочной решетки TGQ1 в среде PBS без артефакта (а) и в среде NaOH 0,5 М с артефактом инверсии (б). 3D-изображение гладкой области решетки в среде NaOH 0,5 М при постепенном варьировании силы прижима и исчезновении артефакта инверсии (переход от светлой области высот к темной области – поверхности подложки)

При использовании зондов в средах с высоким значением плотности, таких как боратный буфер и натриевые гидроксиды, были замечены шумы, которые могут быть связаны со свойствами используемых сред (высокая вязкость, плотность и т.д.). Кроме того, в данных средах был замечен артефакт инверсии изображения в областях перепадов высот, связанный с «выпиранием» нижней (темной) части подложки, в результате чего она отображается как выпуклость (светлая область).

Данное явление может быть связано с повышенным сопротивлением приповерхностного слоя жидкости на зонд в средах с высокой плотностью. Для подтверждения данной гипотезы были проведены изменения прижима зонда к подложке, при постепенном увеличении которых данный артефакт был устранен (рис. б, в). Кроме того, следует отметить, что буферные растворы NaOH обладают щелочными свойствами, довольно «агрессивны» и могут разъедать верхние слои образцов во время сканирования, поэтому в качестве среды для проведения измерений биологических объектов рекомендуется использовать буфер PBS.

Заключение

Таким образом, результаты исследования показали, что лучшими при работе в жидких средах следует признать длинные кантилеверы с малой жесткостью (0,06–0,12 Н/м), причем для достижения наибольшего соответствия между экспериментальными и эталонными значениями размеров калибровочной решетки необходимо использовать полуконтактный режим сканирования, а для получения наилучшего качества изображения – контактный режим сканирования.

Исследована зависимость амплитуды колебаний зондов от рабочего расстояния на кривых отвода–подвода в различных средах, в результате чего были обнаружены области локального повышения амплитуды, предположительно связанные с влиянием микротечений, создаваемых кантилевером зонда за счет разности давлений при подводе к поверхности. Кроме того, изучен и устранен эффект инверсии изображения, проявляющийся из-за недостаточного прижима зонда в буферах с высокой плотностью.

Литература

1. Touhami A., Jericho M.H., Beveridge T.J. Atomic force microscopy of cell growth and division in staphylococcus aureus // *Journal of Bacteriology*. 2004. V. 186. N 11. P. 3286–3295. doi: 10.1128/JB.186.11.3286-3295.2004
2. Lyubchenko Y.L. Preparation of DNA and nucleoprotein samples for AFM imaging // *Micron*. 2011. V. 42. N 2. P. 196–206. doi: 10.1016/j.micron.2010.08.011
3. Webb H.K., Truong V.K., Hasan J., Crawford R.J., Ivanova E.P. Physico-mechanical characterisation of cells using atomic force microscopy – current research and methodologies // *Journal of Microbiological Methods*. 2011. V. 86. N 2. P. 131–139. doi: 10.1016/j.mimet.2011.05.021
4. Dulebo A., Preiner J., Kienberger F., Kada G., Rankl C., Chtcheglova L., Lamprecht C., Kaftan D., Hinterdorfer P. Second harmonic atomic force microscopy imaging of live and fixed mammalian cells // *Ultramicroscopy*. 2009. V. 109. N 8. P. 1056–1060. doi: 10.1016/j.ultramic.2009.03.020
5. Gladnikoff M., Rouso I. Directly monitoring individual retrovirus budding events using atomic force microscopy // *Biophysical Journal*. 2008. V. 94. N 1. P. 320–326. doi: 10.1529/biophysj.107.114579
6. Mateu M.G. Mechanical properties of viruses analyzed by atomic force microscopy: a virological perspective // *Virus Research*. 2012. V. 168. N 1-2. P. 1–22. doi: 10.1016/j.virusres.2012.06.008
7. Kuznetsov Y.G., Xiao C., Sun S., Raoult D., Rossmann M., McPherson A. Atomic force microscopy investigation of the giant mimivirus // *Virology*. 2010. V. 404. N 1. P. 127–137. doi: 10.1016/j.virol.2010.05.007
8. Kailas L., Ratcliffe E.C., Hayhurst E.J., Walker M.G., Foster S.J., Hobbs J.K. Immobilizing live bacteria for AFM imaging of cellular processes // *Ultramicroscopy*. 2009. V. 109. N 7. P. 775–780. doi: 10.1016/j.ultramic.2009.01.012
9. Tian Y., Li J., Cai M., Zhao W., Xu H., Liu Y., Wang H. High-resolution imaging of mitochondrial membranes by in situ atomic force microscopy // *RSC Advances*. 2013. V. 3. N 3. P. 708–712. doi: 10.1039/c2ra22166g
10. Tian Y., Cai M., Xu H., Wang H. Studying the membrane structure of chicken erythrocytes by in situ atomic force microscopy // *Analytical Methods*. 2014. V. 6. N 20. P. 8115–8119. doi: 10.1039/c4ay01260g
11. Cai M., Zhao W., Shang X., Jiang J., Ji H., Tang Z., Wang H. Direct evidence of lipid rafts by in situ atomic force microscopy // *Small*. 2012. V. 8. N 8. P. 1243–1250. doi: 10.1002/sml.201102183
12. Lyubchenko Y.L., Shlyakhtenko L.S. Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997. V. 94. N 2. P. 496–501. doi: 10.1073/pnas.94.2.496
13. Graham H.K., Hodson N.W., Hoyland J.A., Millward-Sadler S.J., Garrod D., Scothern A., Griffiths C.E.M., Watson R.E.B., Cox T.R., Erler J.T., Trafford A.W., Sherratt M.J. Tissue section AFM: in situ ultrastructural imaging of native biomolecules // *Matrix Biology*. 2010. V. 29. N 4. P. 254–260. doi: 10.1016/j.matbio.2010.01.008
14. Кухтевич И.В., Жуков М.В., Чубинский-Надеждин В.И., Букатин А.С., Евстапов А.А. Фиксация бактерий E.Coli на подложке для измерений в жидкости методом атомно-силовой микроскопии // *Научное приборостроение*. 2012. Т. 22. № 4. С. 56–61.
15. Solares S.D. Challenges and complexities of multifrequency atomic force microscopy in liquid environments // *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2014. V. 5. P. 298–307. doi: 10.3762/bjnano.5.33
16. Kado H., Yokoyama K., Tohda T. A novel ZnO whisker tip for atomic force microscopy // *Ultramicroscopy*. 1992. V. 42. P. 1659–1663. doi: 10.1016/0304-3991(92)90501-A
17. Левичев В.В., Жуков М.В., Мухин И.С., Денисюк А.И., Голубок А.О. Об устойчивости работы сканирующего силового микроскопа с нановискером на вершине зонда // *ЖТФ*. 2013. Т. 83. № 7. С. 115–120.
18. Chang K.-C., Chiang Y.-W., Yang C.-H., Liou J.-W. Atomic force microscopy in biology and biomedicine // *Tzu Chi*

References

1. Touhami A., Jericho M.H., Beveridge T.J. Atomic force microscopy of cell growth and division in staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology*, 2004, vol. 186, no. 11, pp. 3286–3295. doi: 10.1128/JB.186.11.3286-3295.2004
2. Lyubchenko Y.L. Preparation of DNA and nucleoprotein samples for AFM imaging. *Micron*, 2011, vol. 42, no. 2, pp. 196–206. doi: 10.1016/j.micron.2010.08.011
3. Webb H.K., Truong V.K., Hasan J., Crawford R.J., Ivanova E.P. Physico-mechanical characterisation of cells using atomic force microscopy – current research and methodologies. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, vol. 86, no. 2, pp. 131–139. doi: 10.1016/j.mimet.2011.05.021
4. Dulebo A., Preiner J., Kienberger F., Kada G., Rankl C., Chtcheglova L., Lamprecht C., Kaftan D., Hinterdorfer P. Second harmonic atomic force microscopy imaging of live and fixed mammalian cells. *Ultramicroscopy*, 2009, vol. 109, no. 8, pp. 1056–1060. doi: 10.1016/j.ultramic.2009.03.020
5. Gladnikoff M., Rouso I. Directly monitoring individual retrovirus budding events using atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 2008, vol. 94, no. 1, pp. 320–326. doi: 10.1529/biophysj.107.114579
6. Mateu M.G. Mechanical properties of viruses analyzed by atomic force microscopy: a virological perspective. *Virus Research*, 2012, vol. 168, no. 1-2, pp. 1–22. doi: 10.1016/j.virusres.2012.06.008
7. Kuznetsov Y.G., Xiao C., Sun S., Raoult D., Rossmann M., McPherson A. Atomic force microscopy investigation of the giant mimivirus. *Virology*, 2010, vol. 404, no. 1, pp. 127–137. doi: 10.1016/j.virol.2010.05.007
8. Kailas L., Ratcliffe E.C., Hayhurst E.J., Walker M.G., Foster S.J., Hobbs J.K. Immobilizing live bacteria for AFM imaging of cellular processes. *Ultramicroscopy*, 2009, vol. 109, no. 7, pp. 775–780. doi: 10.1016/j.ultramic.2009.01.012
9. Tian Y., Li J., Cai M., Zhao W., Xu H., Liu Y., Wang H. High-resolution imaging of mitochondrial membranes by in situ atomic force microscopy. *RSC Advances*, 2013, vol. 3, no. 3, pp. 708–712. doi: 10.1039/c2ra22166g
10. Tian Y., Cai M., Xu H., Wang H. Studying the membrane structure of chicken erythrocytes by in situ atomic force microscopy. *Analytical Methods*, 2014, vol. 6, no. 20, pp. 8115–8119. doi: 10.1039/c4ay01260g
11. Cai M., Zhao W., Shang X., Jiang J., Ji H., Tang Z., Wang H. Direct evidence of lipid rafts by in situ atomic force microscopy. *Small*, 2012, vol. 8, no. 8, pp. 1243–1250. doi: 10.1002/sml.201102183
12. Lyubchenko Y.L., Shlyakhtenko L.S. Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, vol. 94, no. 2, pp. 496–501. doi: 10.1073/pnas.94.2.496
13. Graham H.K., Hodson N.W., Hoyland J.A., Millward-Sadler S.J., Garrod D., Scothern A., Griffiths C.E.M., Watson R.E.B., Cox T.R., Erler J.T., Trafford A.W., Sherratt M.J. Tissue section AFM: in situ ultrastructural imaging of native biomolecules. *Matrix Biology*, 2010, vol. 29, no. 4, pp. 254–260. doi: 10.1016/j.matbio.2010.01.008
14. Kukhtevich I.V., Zhukov M.V., Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Bukatin A.S., Evstrapov A.A. E. Coli bacteria fixing on a substrate for measurements in liquid by the method of atomic-force microscopy. *Scientific Instrumentation*, 2012, vol. 22, no. 4, pp. 56–61.
15. Solares S.D. Challenges and complexities of multifrequency atomic force microscopy in liquid environments. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2014, vol. 5, pp. 298–307. doi: 10.3762/bjnano.5.33
16. Kado H., Yokoyama K., Tohda T. A novel ZnO whisker tip for atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 1992, vol. 42, pp. 1659–1663. doi: 10.1016/0304-3991(92)90501-A
17. Levichev V.V., Zhukov M.V., Mukhin I.S., Denisjuk A.I., Golubok A.O. On the operating stability of a scanning force microscope with a nanowisker at the top of the probe. *Technical Physics*, 2013, vol. 58, no. 7, pp. 1043–1047. doi: 10.1134/S1063784213070128
18. Chang K.-C., Chiang Y.-W., Yang C.-H., Liou J.-W. Atomic

- Medical Journal. 2012. V. 24. N 4. P. 162–169. doi: 10.1016/j.tcmj.2012.08.002
19. Muller D.J., Engel A. Atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins // *Nature Protocols*. 2007. V. 2. N 9. P. 2191–2197. doi: 10.1038/nprot.2007.309
- force microscopy in biology and biomedicine. *Tzu Chi Medical Journal*, 2012, vol. 24, no. 4, pp. 162–169. doi: 10.1016/j.tcmj.2012.08.002
19. Muller D.J., Engel A. Atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins. *Nature Protocols*, 2007, vol. 2, no. 9, pp. 2191–2197. doi: 10.1038/nprot.2007.309

Авторы

Жуков Михаил Валерьевич – инженер, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация; младший научный сотрудник, Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, 198095, Российская Федерация, cloudjyk@yandex.ru

Кухтевич Игорь Владимирович – кандидат технических наук, научный сотрудник, Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, 198095, Российская Федерация, ba@inbox.ru

Authors

Mikhail V. Zhukov – engineer, ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation; junior researcher, Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint Petersburg, 198095, Russian Federation, cloudjyk@yandex.ru

Igor V. Kukhtevich – PhD, researcher, Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint Petersburg, 198095, Russian Federation, ba@inbox.ru