

АТОМНО-СИЛОВАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ОДИНОЧНЫХ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ

© 2016 г. Д.В. Корнеев*, А.В. Попова** ***, В.М. Генералов*, Б.Н. Зайцев*

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»,
630559, пос. Кольцово Новосибирской области;

**Московский физико-технический институт (государственный университет),
141700, Долгопрудный Московской области;

***Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии,
142279, Оболенск Московской области

E-mail: korneev_dv@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 12.11.15 г.

После доработки 25.11.15 г.

Разработана методика атомно-силовой спектроскопии одиночных вирусных частиц с использованием диэлектрофореза для фиксации вирионов на острие зонда атомно-силового микроскопа. Показана необходимость подтверждения наличия целевых частиц на острие зонда методом электронно-микроскопической визуализации и невозможность фиксации одиночных вирионов на острие зонда методом простой инкубации в вирусной суспензии. Проведены силовые измерения для вирионов осповакцины, вируса гриппа и частиц бактериофага AP22. Разработан программный пакет ForceReader для поточной обработки силовых кривых.

Ключевые слова: силовая спектроскопия, вирус, атомно-силовая микроскопия, диэлектрофорез.

Атомно-силовой микроскоп (АСМ), созданный в 1986 г. Г. Биннигом и его сотрудниками [1], позволяет осуществлять визуализацию рельефа поверхности с атомарным разрешением, измерять величины сил в диапазоне от 10^{-12} Н до 10^{-6} Н и выполнять прямую механическую манипуляцию наноразмерными объектами [2]. Техника измерения сил при помощи данного прибора была названа атомно-силовой спектроскопией (АСС) и нашла широкое применение в исследованиях биологических объектов. Первичным результатом измерения является так называемая «силовая кривая» – зависимость амплитуды деформации кантилевера от расстояния между зондом и объектом [3,4]. Значения локальных механических параметров получают в результате математической обработки данных кривых.

Опубликовано большое количество работ, посвященных исследованию методом АСС механических свойств биологических макромолекул [5,6], различных полимеров, наночастиц, вирусов [7,8] и живых клеток [9,10]. В данной области можно выделить два основных направ-

ления: измерение величины сил, возникающих при разрыве механического контакта между объектами, и определение локальных механических характеристик (модуль Юнга и др.) при вдавлении зонда в поверхность объекта – наноиндентация. В биофизике вирусов нашли применение оба подхода: измерение амплитуд сил отрыва вирусных частиц и их субъединиц от различных поверхностей, включая мембрану живой клетки [10], и изучение механических свойств самих вирусных частиц методом наноиндентации [7]. Отдельного упоминания заслуживает применение АСС для изучения механических характеристик разворачивания белков – механический анфолдинг [11].

Основной проблемой интерпретации данных АСС является вопрос о том, для каких именно объектов были измерены силовые характеристики взаимодействия: геометрические параметры зонда, какие частицы находились на его поверхности в момент измерения, изменялись ли свойства объектов во время эксперимента и т.д. Ответы на данные вопросы могут быть получены при помощи визуализации острия зонда методом просвечивающей или сканирующей электронной микроскопии. В том случае, когда электронная микроскопия недоступна, геометрические параметры острия зонда

Сокращения: АСМ – атомно-силовой микроскоп, АСС – атомно-силовая спектроскопия, АРТЕS – (3-аминопропил)-триэтоксисилан, FITC – флуоресцеин изотиоцианат.

могут быть оценены методом сканирования эталонных решеток с остроконечными выступами [12]. При невозможности визуализации острия зонда результаты химической модификации его поверхности и сорбции целевых объектов могут быть качественно оценены по изменению собственной частоты механических колебаний кантилевера [13]. Часто исследователи пренебрегают характеристикой зонда, что значительно снижает ценность результатов силовых измерений. Особенно актуальна данная проблема для атомно-силовой спектроскопии вирусных частиц. Вирусосодержащая суспензия всегда гетерогенна: кроме вирионов в растворе присутствуют фрагменты клеток, биологические макромолекулы, субъединицы вирусных частиц и другие включения, полностью удалить которые невозможно даже при самой высокой степени очистки. Для проведения измерений контактных сил методом АСС вирусная частица должна быть ковалентно «пришита» к острию зонда АСМ. Зонды, как правило, изготавливают из кремния или нитрида кремния, для ковалентной «пришивки» биологических частиц поверхность зонда обычно активируют последовательной обработкой АРТЕS (3-аминопропилтриэтоксисиланом) и глутаровым альдегидом, либо покрывают тонким слоем золота, которое образует ковалентные связи с атомами серы, содержащимися в аминокислотных остатках белков [14], другие методы активации поверхности зонда могут быть «пришиты» антитела [15], используемые как для самостоятельных измерений, так и для фиксации на зонде вирусной частицы. Во всех случаях подготовка зонда сводится к активации его поверхности с последующей инкубацией в растворе, содержащем целевые частицы. Для гомогенных суспензий относительно малых частиц данный подход дает удовлетворительные и хорошо воспроизводимые результаты – поверхность зонда покрывается монослоем частиц и за счет малости радиуса кривизны острия (< 10 нм) обеспечивается наличие не более нескольких частиц в области контакта [16]. В случае гетерогенной суспензии, содержащей частицы различного размера и состава, ситуация значительно усложняется: активированная поверхность зонда в суспензии быстро покрывается малыми частицами, имеющими большую подвижность, а более крупные частицы, которые обычно и являются целевыми, уже не могут быть ковалентно «пришиты» к поверхности зонда.

Авторами данной работы было проведено более 100 экспериментов с инкубацией АСМ-зондов, активированных в соответствии с различными стандартными протоколами, в концентрированных (не менее 10^{10} вирионов на



Рис. 1. Ячейка для диэлектрофореза с зондами АСМ в качестве электродов. Сканирующая электронная микроскопия.

1 мл) вирусосодержащих суспензиях высокой степени очистки с последующей визуализацией методом просвечивающей электронной микроскопии. Во всех случаях наблюдался лишь тонкий (10–15 нм) сплошной слой биомолекул, покрывавших всю поверхность зонда, вирусных частиц на поверхности не наблюдалось. На основании результатов данных экспериментов было выдвинуто предположение о необходимости обеспечения селективного движения целевых частиц по направлению к острию зонда. В качестве физического эффекта, лежащего в основе такого движения, был выбран диэлектрофорез – движение диэлектрических частиц под действием неоднородного электрического поля [17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Во всех экспериментах использовали зонды CSG01 (НТ-МДТ, Россия). Для модификации поверхности зондов использовали АРТЕS и глутаровый альдегид (Sigma, США). Силовые измерения, визуализацию поверхностей и механическую модификацию зондов методом длительного сканирования осуществляли на атомно-силовом микроскопе Solver P47Bio (НТ-МДТ, Россия). Визуализацию зондов методом просвечивающей электронной микроскопии осуществляли на микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония). Для визуализации измерительной ячейки (рис. 1) использовали сканирующий электронный микроскоп EVO MA 15 (Carl Zeiss, Германия). Диэлектрофорез проводили в 0,3 М растворе сахарозы (Sigma, США) в деионизованной воде (Millipore, США). Клетки сорбировали на предметные стекла, покрытые полилизинном (Thermo Scientific, США). Для очистки поверхности зондов использовали свежеприготовленную смесь в соотношении 3:1 концентрированной серной кислоты (ООО «Компонент-Реактив», Россия) и перекиси водорода (ОАО «Химреактив», Россия). Защитный слой хрома на поверхность зондов наносили при



Рис. 2. Зонд АСМ, на острие которого подготовлена площадка для «пришивки» крупной (осповакцина) вирусной частицы. Просвечивающая электронная микроскопия.

помощи установки для напыления проводящих покрытий Q150T (Quorum Technologies, Великобритания). Для флуорохромирования вирусных частиц использовали флуоресцеин изотиоцианат (Sigma, США). Движение вирусных частиц под действием диэлектрофореза наблюдали при помощи флуоресцентного микроскопа ImageA1 (Carl Zeiss, Германия).

Использовали препараты высокой степени очистки следующих вирусов: осповакцина, вирус гриппа (H3N2), бактериофаг AP22 [18,19] (депонирован под номером Ph-42 в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур, Оболенск, Московская область).

Модификация зондов атомно-силового микроскопа. Для кремниевых зондов CSG01 номинальный радиус кривизны острия составляет около 10 нм. Характерный размер частиц вируса осповакцины – около 350 нм, вируса гриппа – около 100 нм, икосаэдрическая головка бактериофага AP22 имеет диаметр около 60 нм. Перед фиксацией вириона на острие зонда формировали площадку подходящего размера (рис. 2) методом длительного сканирования кремниевого образца с высокой скоростью и деформацией кантилевера в контактном режиме [20]. После формирования площадки данным зондом в контактном режиме сканировали решетку с остроконечными выступами для механической очистки острия зонда [21] и отмывали зонд в смеси концентрированной серной кислоты и перекиси водорода в соотношении 3:1 для удаления органических загрязнений. После данных операций зонд визуализировали методом просвечивающей электронной микроскопии и в том случае, если его геометрические характеристики признавались удовлетворитель-

ными, использовали его в последующих экспериментах. Для достижения селективной фиксации целевой частицы на острие зонда был использован подход, состоящий в покрытии поверхности зонда защитным слоем и формировании активированной площадки на острие [22]. В качестве защитного слоя использовали напыление хрома толщиной около 10 нм. Свободную от слоя хрома область на острие зонда формировали длительным сканированием кремниевой подложки с последующим сканированием решетки и отмывкой зонда для очистки от загрязнений. Модифицированный зонд визуализировали методом просвечивающей электронной микроскопии и в том случае, если он имел удовлетворительные геометрические параметры, использовали его в дальнейшем. Зонд выдерживали 10 мин в 1% растворе APTES в толуоле, отмывали толуолом и помещали в каплю 1% водного раствора глутарового альдегида на 20 мин, отмывали деионизованной водой и помещали в ячейку для диэлектрофореза.

После силовых измерений зонд отмывали фосфатно-солевым буферным раствором и визуализировали методом просвечивающей электронной микроскопии для подтверждения наличия на его острие вирусной частицы или ее фрагментов. В том случае, когда таких объектов на острие не наблюдалось, результаты силовых измерений отбраковывались.

После визуализации зонд отмывали в смеси концентрированной серной кислоты и раствора перекиси водорода в соотношении 3:1, визуализировали методом просвечивающей электронной микроскопии и, убедившись в его пригодности для дальнейшего использования, повторяли эксперименты.

В результате многократного использования зонда с промежуточной отмывкой в агрессивных средах наблюдалась деградация отражающего покрытия кантилевера. Данное покрытие удавалось восстановить с использованием стандартного протокола напыления тонкого (около 10 нм) слоя золота, который используется при пробоподготовке для сканирующей электронной микроскопии.

Диэлектрофорез вирусных частиц. Суть явления диэлектрофореза состоит в пространственном разделении положительных и отрицательных зарядов в диэлектрической частице под действием неоднородного переменного электрического поля, что приводит к образованию индуцированного дипольного момента [17]. Степень поляризуемости частицы зависит от ее размера, формы, структуры и состава. Для оценки величины силы диэлектрофореза, действу-

шей на частицу, обычно используют следующие устоявшиеся выражения [23]:

$$F = 2\pi\epsilon_0\epsilon_e r^3 \text{Re}(K)\nabla E^2, \quad (1)$$

где ϵ_0 , ϵ_e – диэлектрические проницаемости вакуума и суспензии, E – напряженность электрического поля, r – характерный радиус частицы, K – индуцированный дипольный момент, величина которого зависит от коэффициента поляризуемости частицы.

Благодаря зависимости диэлектрорефрактивной силы от размеров, формы, структуры и состава частиц, диэлектрорефракция может использоваться для их сепарации [24,25]. Описаны примеры успешного применения диэлектрорефракции для манипуляции одиночными субмикронными частицами [26,27] и фиксации одиночных неорганических наночастиц на острие зонда АСМ [28].

Диэлектрорефракция наблюдается в широком диапазоне частот – от 10 Гц до 1 ГГц [29], но чаще всего исследования проводят в полосе частот от 100 КГц до 100 МГц [17,23]. Диэлектрорефракция может быть использована для манипуляции вирусными частицами и характеристики их диэлектрических параметров [29–33].

Движение вирионов под действием диэлектрорефракции наблюдали при помощи флуоресцентного микроскопа, предварительно флуорохромировав вирусные частицы красителем FITC. Диэлектрорефракцию проводили в 0,3 М растворе сахарозы на измерительной ячейке собственной конструкции с использованием в качестве электродов двух зондов АСМ, имеющих проводящее покрытие (рис. 1). Целью экспериментов с использованием ячейки было определение пороговой частоты начала положительного диэлектрорефракции (движения вирионов к электродам) для вирусных частиц. Определенная таким образом частота в дальнейшем использовалась при осаждении вирусных частиц на зонд АСМ для силовых измерений. При этом предполагали, что флуорохромирование вирионов не оказывает значимого влияния на их диэлектрические свойства и использовали для диэлектрорефракции нативных вирусных частиц значение частоты начала положительного диэлектрорефракции, определенное для вирионов, меченных FITC.

Силовые измерения. Зонд, содержащий вирусную частицу, устанавливали в АСМ и проводили измерения с использованием головки, предназначенной для работы в жидкой среде, погруженной в фосфатно-солевой буферный раствор (рН 7,2). В качестве субстрата для измерения контактных сил использовали монослой эритроцитов человека, сорбированный на стекло, покрытое слоем полилизина (для вирусов осповак-

цины и гриппа). Для измерений с бактериофагом AP22 использовали микробную пленку чувствительного к фагу штамма *Acinetobacter baumannii*, сформированную на предметном стекле, покрытом слоем полилизина. Кантилевер наводили на клетки при помощи инвертированного светового микроскопа, совмещенного с АСМ. Измерения осуществляли в режиме сеток: 10 × 10 силовых кривых на квадрат со стороной 5 мкм.

Анализ силовых кривых. Обработка силовых кривых состоит из следующих этапов:

- отбраковка кривых, не содержащих участка, соответствующего специфическому взаимодействию;

- преобразование кривых из исходной зависимости сигнала детектора от вертикальной координаты сканера в зависимость величины силы, действующей на зонд от расстояния между зондом и поверхностью, от времени, или от вертикальной координаты сканера;

- измерение целевых параметров кривых.

Существует ряд коммерческих (JPK/SPMdataanalysis, SPIP, WSxM, и др.) и свободно распространяемых с открытым исходным кодом (Hook [34], AtomicJ) пакетов программного обеспечения для анализа силовых кривых. Кроме того, для этих целей может быть использовано программное обеспечение, поставляемое производителем вместе с микроскопом.

Авторами данной работы для обработки силовых кривых была разработана собственная программа ForceReader (рис. 3), распространяемая свободно с открытым исходным кодом (<http://sourceforge.net/projects/forcereader>). Данная программа использовалась при обработке результатов измерений, представленных в данной работе.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На примерах вируса осповакцины, вируса гриппа и бактериофага AP22 была разработана и протестирована методика атомно-силовой спектроскопии одиночных вирусных частиц. Показана невозможность фиксации одиночных вирусных частиц на острие зонда АСМ методом простой инкубации активированного зонда в вирусной суспензии. Получены удовлетворительные результаты применения диэлектрорефракции для фиксации вирионов на поверхности зонда АСМ. Измерены амплитуды сил, возникающих при отрыве вирусных частиц от поверхности клеток, в скобках приведены значения для тех случаев, когда при визуализации зондов не были обнаружены вирионы или их фрагменты:

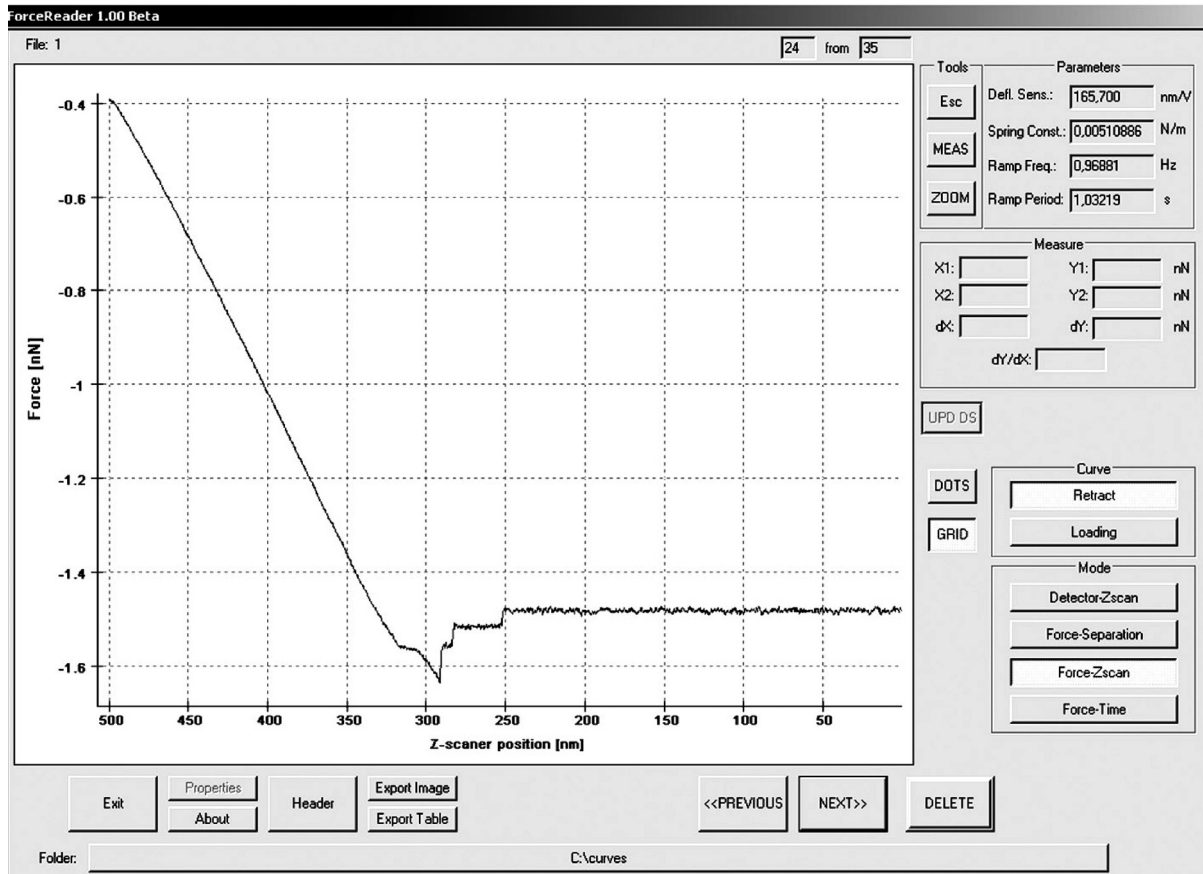


Рис. 3. Интерфейс программы ForceReader.



Рис. 4. Фрагмент бактериофага AP22 на острие зонда АСМ. Просвечивающая электронная микроскопия.

После каждого измерения наличие на острие зонда вириона или его фрагмента было подтверждено визуализацией зонда методом просвечивающей электронной микроскопии (рис. 4).

Перед проведением экспериментов вируссо-держачие суспензии были охарактеризованы методом просвечивающей электронной микро-

скопии с пробоподготовкой по классической методике негативного контрастирования для выявления имеющихся примесей, что позволяет минимизировать вероятность ошибки при идентификации объекта на острие зонда, визуализированного после измерений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наши результаты показывают необходимость подтверждения наличия на острие вирусных частиц методом электронно-микроскопической визуализации зонда после выполнения силовых измерений и применимость диэлектрофореза для достижения селективного осаждения вирионов на острие зонда АСМ. В результате более чем сотни экспериментов показана невозможность фиксации одиночных вирусных частиц на острие зонда АСМ методом простой инкубации активированного зонда в вирусной суспензии.

Различие величин сил для случаев, когда вирион или его фрагменты были обнаружены при визуализации зонда и когда они отсутствовали, вероятно, объясняется разницей в ко-

Амплитудные значения силы, соответствующие отрыву вириона от поверхности клетки

Зонд	Подложка	Сила, нН
Осповакцина	Эритроцит	11,2 ± 4,9 (7,1 ± 3,3)
Вирус гриппа	Эритроцит	5,5 ± 3,1 (8,1 ± 4,5)
Бактериофаг AP22	<i>A. baumannii</i>	2,2 ± 1,4 (1,2 ± 0,7)

Примечание. В скобках приводятся значения для тех случаев, когда при электронно-микроскопической визуализации после измерений на зонде не были обнаружены вирионы или их фрагменты.

личестве и природе молекул, вступающих в контакт при силовых измерениях (таблица). В зависимости от того, какие объекты (свободный белок, фрагменты клеток и т.д.) оказались «пришиты» к зонду вместо вирионов, сила отрыва зонда от поверхности может быть как меньше, так и больше, чем при измерении с вирионом. В частности, для измерений с вирусом гриппа большая сила отрыва зондов без вирионов может объясняться покрытием их поверхности молекулами свободного гемагглютинина, присутствующими в вирусной суспензии.

Типичные пиковые величины силы, наблюдаемые при разрыве пары белковых молекул

(при наличии специфического взаимодействия), лежат в диапазоне от 50 до 300 пН [35,36]. Соответствующие значения, полученные для вирусных частиц, соответствуют взаимодействию ≈ 10 ÷ 30 (бактериофаг AP22), ≈ 20 ÷ 80 (вирус гриппа), ≈ 60 ÷ 150 (вирус осповакцины) молекулярных пар, что согласуется с морфологическими параметрами вирионов при допущении о деформации поверхности клетки в момент контакта.

Разработанная методика (рис. 5) может использоваться для исследования механических характеристик взаимодействия вирионов с поверхностью живой клетки для любых других

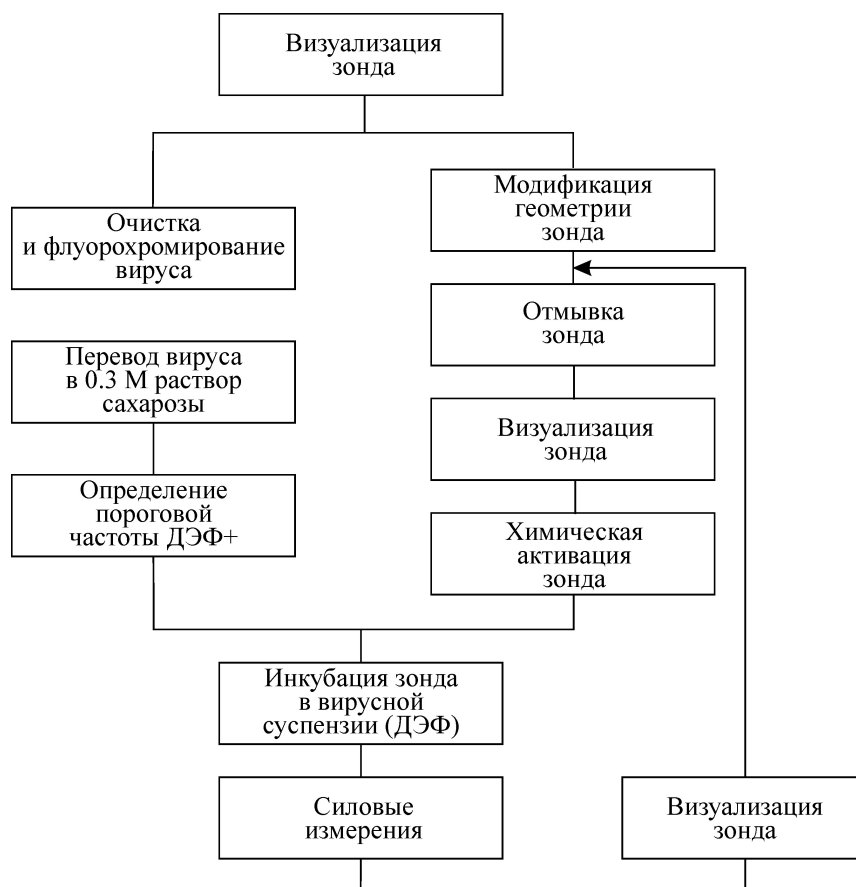


Рис. 5. Алгоритм исследования механических свойств контакта вириона и поверхности клетки методом атомно-силовой спектроскопии.

вирусов, не разрушающихся в растворах слабой ионной силы.

ВЫВОДЫ

Для подтверждения достоверности результатов атомно-силовой спектроскопии одиночных вирусных частиц необходима электронно-микроскопическая визуализация острия зонда АСМ, выполняемая после измерений. В противном случае результаты нельзя считать достоверными, так как велика вероятность отсутствия на зонде вирусных частиц во время измерений.

Диэлектрофорез может использоваться для сепарации частиц в гетерогенной суспензии и достижения селективного движения вирионов по направлению к зонду в растворах с низкой концентрацией ионов. Низкая концентрация ионов необходима для предотвращения возникновения электрических токов в растворе при проведении диэлектрофореза. Данное требование накладывает ограничение на спектр вирусов, доступных для проведения таких экспериментов, так как многие вирусы разрушаются в среде, не содержащей определенного количества ионов.

Авторы выражают благодарность А.В. Бардашевой, м.н.с. ГНЦ ВБ «Вектор», за помощь в подготовке препаратов вирусов; С.К. Секацкому, н.с. Федеральной политехнической школы Лозанны (EPFL), Швейцария, за организацию работ, выполнявшихся с бактериофагами летом 2013 года во время визита Д.В. Корнеева в EPFL; П.Г. Лейману, профессору Федеральной политехнической школы Лозанны (EPFL), Швейцария, за организацию работ, выполнявшихся с бактериофагами летом 2013 года во время визита Корнеева Д.В. в EPFL; О.С. Таранову, зав. отделом микроскопических исследований, ГНЦ ВБ «Вектор», за помощь в проведении экспериментов с использованием световой микроскопии. Работа по наработке и очистке бактериофага AP22, выполненная А.В. Поповой, была поддержана Российским научным фондом, грант № 15-15-10017.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **56** (9), 930 (1986).
- A. Takaaki, M. Hiroshima, K. Kitamura, et al., *Ultramicroscopy* **70**, 45 (1997).
- B. Cappella and G. Dietler, *Surf. Sci. Rep.* **34**, 1 (1999).
- J.-B. D. Green, A. Novoradovsky, and G. U. Lee, *Langmuir* **15**, pp. 238 (1999).
- J. R. Forman and J. Clarke, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 58 (2007).
- M. G. Mateu, *Virus Res.* **168**, 1 (2012).
- A. Herrmann and C. Sieben, *Integrat. Biol.* **7**, 620 (2015).
- V. Vadillo-Rodriguez, T. J. Beveridge, and J. R. Dutcher, *Bacteriol. J.* **190** (12), 4225 (2008).
- C. Roduit, S. Sekatski, G. Dietler, et al., *Biophys. J.* **97**, 674 (2009).
- M. R. Falvo, S. Washburn, R. Superfine, et al., *Biophys. J.* **72**, 1396 (1997).
- A. В. Глякина, Н. К. Балабаев и О. В. Галзитская, *Биохимия* **78** (11), 1550 (2013).
- J. Liu, J. K. Notbohm, R. W. Carpick, et al., *ACS Nano* **4** (7), 3763 (2010).
- H. J. Butt, B. Cappella, and M. Kappl, *Surf. Sci. Rep.* **59**, 1 (2005).
- S. O. Vansteenkiste, M. C. Davies, C. J. Roberts, et al., *Progr. Surf. Sci.* **S7** (2), 95 (1998).
- A. Ebner, P. Hinterdorfer, and H. J. Gruber, *Ultramicroscopy* **107**, 922 (2007).
- C. K. Riener, C. M. Stroh, A. Ebner, et al., *Anal. Chim. Acta* **479**, 59 (2003).
- H. A. Pohl, *Dielectrophoresis* (Cambridge University Press, Cambridge, 1978).
- A. V. Popova, E. L. Zhilenkov, V. P. Myakinina, et al., *FEMS Microbiol. Lett.* **332**, 40 (2012).
- A. В. Попова, дис. ... к-та биол. наук (Оболенск, 2012).
- C. L. Cheung, J. H. Hafner, and C. M. Lieber, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** (8), 3809 (2000).
- G. Yang and G. V. Franks, *Ultramicroscopy* **109**, 1061 (2009).
- I. U. Vakarelski and K. Higashitani, *Langmuir* **22**, 2931 (2006).
- J. Gimsa, P. Marszalek, U. Lowe, et al., *Biophys. J.* **60**, 749 (1991).
- Y. Huang, X.-B. Wang, F. F. Becker, and P. R. C. Gascoyne, *Biophys. J.* **73**, 1118 (1997).
- R. Holzel, *J. Electrostatics* **56**, 435 (2002).
- H. Morgan, M. P. Hughes, and N. G. Green, *Biophys. J.* **77**, 516 (1999).
- N. G. Green, H. Morgan, and J. J. Milner, *J. Biochem. Biophys. Methods* **35**, 89 (1997).
- C. Leiterer, T. Deckert-Gaudig, P. Singh, et al., *Electrophoresis* **36**, 1142 (2015).
- I. Ermolina, J. J. Milner, and H. Morgan, *Electrophoresis* **27**, 3939 (2006).
- H. Morgan and N. G. Green, *J. Electrostatics* **42**, 279 (1997).
- M. P. Hughes, H. Morgan, and F. J. Rixon, *Biochim. Biophys. Acta* **1571**, 1 (2002).
- I. Ermolina, H. Morgan, N. G. Green, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1622**, 57 (2003).
- F. R. Madiyar, L. U. Syed, C. Culbertson, et al., *Electrophoresis* **34** (7), 1123 (2013).
- M. Sandal, F. Benedetti, M. Brucale, et al., *Bioinformatics* **25** (11), 1428 (2009).

35. R. Levy and M. Maaloum, *Biophys. Chem.* **117**, 233 (2005). 36. H. Handa, S. Gurczynski, M. P. Jackson, and G. Mao, *Langmuir* **26** (14), 12095 (2010).

Atomic Force Microscopy-Based Single Virus Particle Spectroscopy

D.V. Korneev*, **A.V. Popova** *****, **V.M. Generalov***, and **B.N. Zaitsev***

**State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia*

***Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia*

****State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, 142279 Russia*

The technique of atomic force microscopy-based single virus particle force spectroscopy using dielectrophoresis for fixation of virions to the tip of atomic force microscope probe was developed. The necessity of using electron microscopy visualization to prove the virus deposition on AFM probe's tip and impossibility of fixation of single virions to the tip of the probe after incubation with viral suspension were demonstrated. The force spectroscopy measurements were performed for vaccinia virus, influenza virus and bacteriophages AP22. The special software "ForceReader" was developed for force-distance curves analysis.

Key words: force spectroscopy, virus, atomic force microscopy, dielectrophoresis