

## Магнетронное напыление металлов на биологические объекты нанометрового размера на примере вируса табачной мозаики

И. Д. Шумов, С. Л. Канащенко, А. И. Арчаков, Ю. Д. Иванов, Т. О. Плешакова

*В работе предложен способ металлизации частиц вируса табачной мозаики (ВТМ) с целью повышения четкости изображений, получаемых при их исследовании методом электронной микроскопии. Металлизация проводилась методом магнетронного напыления вольфрама с использованием аргоновой плазмы в разряде постоянного тока. Полученные с помощью электронной и атомно-силовой микроскопии значения диаметра частиц ВТМ хорошо согласуются с литературными данными. Предложенный способ может быть использован при исследовании других типов вирусных частиц методом электронной микроскопии.*

*Ключевые слова:* электронная микроскопия, сверхтонкие пленки, магнетронное распыление, вирус табачной мозаики, атомно-силовая микроскопия.

### Введение

Электронная микроскопия (ЭМ) находит широкое применение в медицинских и вирусологических исследованиях [1]. ЭМ как метод изучения вирусных частиц обеспечивает получение изображений единичных вирусных частиц с нанометровым разрешением [2]. Одной из характеристик, определяющих качество получаемого изображения, является его четкость, определяющаяся его разрешением и, в том числе, относительным количеством различных на этом изображении мелких деталей [3]. При использовании ЭМ для исследования биологических объектов (в частности, вирусных частиц) на качестве получаемых изображений во многих случаях отрицательно сказывается эффект повреждения изучаемых объектов электронным пучком [4, 5]. В литературе предложены методики с использованием замора-

живания образца [5, 6] либо защиты его специальным экраном [4, 7]. Использование таких методик в большинстве случаев требует проведения дополнительной обработки массива из большого количества (до нескольких тысяч) изображений с использованием математических методов [6, 8, 9]. В свою очередь, ЭМ-изображения вирусных частиц, полученные без дополнительной обработки образца, часто получаются менее четкими [10].

В связи с этим при изучении биологических объектов, как правило, используются методики, предусматривающие предварительную обработку исследуемого образца с использованием тяжелых металлов или их солей для контрастирования (повышения четкости) получаемых ЭМ-изображений. Среди методов контрастирования необходимо выделить два типа: химические и физические. Химические методы предусматривают обработку исследуемого образца соединениями тяжелых металлов, такими как тетраоксид осмия [1], фосфовольфрамовая кислота [2], ацетат уранила [11] и т. п. Недостатками использования химических методов является воздействие используемых химических агентов (зачастую проявляющих сильные окислительные свойства) на исследуемый образец и влияние кристаллизации используемых солей на качество получаемых изображений [1].

Физические методы контрастирования предусматривают создание на поверхности исследуемого образца тонкой пленки вещества, хорошо рассеивающего электроны. При этом используемые материалы должны образовывать пленки, удовлетворяющие следующим требованиям [1, 12]: химическая и термическая инертность, сплошность, устойчивость к рекристаллизации при из-

Шумов Иван Дмитриевич, младший научный сотрудник, к.б.н.

Канащенко Сергей Леонидович, ведущий инженер.

Арчаков Александр Иванович, научный руководитель ИБМХ,

академик РАН, д.б.н., профессор.

Иванов Юрий Дмитриевич, зав. лабораторией, профессор, д.б.н.

Плешакова Татьяна Олеговна, старший научный сотрудник, к.х.н.

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича (ИБМХ).

Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10 стр. 8.

Тел. (499) 246-37-61. E-mail: shum230988@mail.ru

Статья поступила в редакцию 22 июня 2017 г.

менении температуры, высокая плотность для обеспечения максимального рассеяния электронного пучка при минимальной толщине пленки. В связи с этим для контрастирования биологических образцов физическими методами чаще всего используются тяжелые металлы и их сплавы (Cr, Ta, Au, W, Pt, Pd) либо углерод [1, 10, 13–16].

К физическим методам контрастирования биологических объектов относится метод термического напыления. Для формирования сверхтонких пленок на поверхности биологических объектов в этом методе используется процесс испарения напыляемого металла с поверхности нагретой спирали в высоком вакууме ( $10^{-5}$ – $10^{-7}$  Торр) и его осаждение на поверхность обрабатываемого образца. При этом часто используется так называемое «оттенение» (англ. «shadowing»), когда подложка с исследуемым образцом располагается под углом к потоку напыляемого металла [10]. Такой подход в ЭМ (позволяющий определить не только линейные размеры, но и высоту исследуемых частиц) рассмотрен, в частности, в [17] и предложен для контрастирования вирусных частиц (на примере вируса табачной мозаики (ВТМ) и вируса гриппа PR-8) в работе [10]. В этой работе в качестве контрастирующего металла использован хром. Представленные авторами данные показывают, что четкость ЭМ-изображений частиц ВТМ, не подвергавшихся напылению, намного слабее, чем в случае предварительного создания на поверхности исследуемого образца тонкой (7 нм) пленки хрома. Развивая далее предложенный подход, эти же авторы в следующей работе [13] предложили использовать для контрастирования ЭМ-изображений вирусных частиц золото вместо хрома, что позволило использовать более тонкие (0,8 нм) пленки для получения необходимого контраста изображения. Кроме того, сверхтонкие пленки хрома очень быстро (в течение порядка нескольких минут) окисляются на воздухе [1], что приводит к формированию грубо структурированной пленки, не позволяющей получать корректные ЭМ-данные в случае, если металлизированный хромом образец не помещен в камеру электронного микроскопа немедленно после напыления [1]. Напыление сверхтонких пленок вольфрама методом термического испарения для контрастирования частиц ВТМ в электронной микроскопии впервые предложено в [16]. Этим автором продемонстрированы преимущества использования вольфрама для контрастирования вирусных частиц в ЭМ [18].

В нашей работе для контрастирования биологических объектов предлагается использовать метод магнетронного напыления, который также относится к группе физических методов. Этот ме-

тод позволяет получать на обрабатываемой поверхности пленки высокой чистоты с хорошей адгезией к подложке и низкой пористостью даже при малых толщинах (<10 нм [19]). Преимущество предлагаемого метода перед методом термического напыления заключается в возможности варьирования параметров (мощность и тип разряда напыления, давление плазмообразующего газа) в широком диапазоне, что обеспечивает гибкость метода и возможность получения пленок с различными характеристиками, в том числе сверхтонких с толщиной менее 10 нм [19, 20]. В нашей работе магнетронное напыление тонких пленок вольфрама использовано для контрастирования частиц ВТМ для ЭМ.

Цель данного исследования – демонстрация использования магнетронного напыления вольфрама для контрастирования вирусных частиц.

### Постановка работы

В качестве объекта в данной работе использован ВТМ, который детально изучен и охарактеризован в литературе, в том числе с использованием электронной [2, 10, 13–16, 21, 22] и атомно-силовой микроскопии [23, 24]. В нашем исследовании метод магнетронного напыления был использован для создания сверхтонких пленок вольфрама на поверхности частиц ВТМ, адсорбированных на подложках из аморфного углерода. Для определения толщины полученных пленок вольфрама использовали метод пьезокварцевого микровзвешивания (QCM). Согласно полученным данным, толщина полученных пленок вольфрама составляла менее 1,5 нм. Для определения влияния металлизации исследуемого образца на четкость ЭМ-изображений вирусных частиц были проведены контрольные эксперименты с использованием вирусных частиц, не подвергавшихся металлизации. Для определения степени влияния процесса магнетронного напыления вольфрама на размеры частиц ВТМ в работе было проведено сравнение данных, полученных независимо с помощью двух методов: ЭМ и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Метод АСМ позволяет определять высоту объектов, адсорбированных на поверхности исследуемой подложки, с субнанометровым разрешением [25, 26].

Сравнение данных о размерах частиц ВТМ, полученных методами АСМ и ЭМ, а также сопоставление полученных результатов с литературными данными, позволяют сделать вывод о том, что метод магнетронного напыления может быть использован для контрастирования ЭМ-изображений вирусных частиц.

Необходимо отметить, что магнетронное напыление вольфрама ранее не использовалось для контрастирования ЭМ-изображений применительно к ВТМ.

### Образцы и методика эксперимента

*Использованные материалы.* Фосфатно-солевой буферный раствор в модификации Дульбекко (PBS-D; 11 mM фосфат, 150 mM NaCl) был приготовлен из сухой смеси солей согласно инструкции производителя (Pierce, США). Деионизованная ультрачистая вода была получена при помощи установки Milli-Q (Millipore, США). Вольфрамовая мишень для магнетронного распыления (чистота 99,95 %, диаметр 2'', толщина 0,25'') была получена от ООО «Гирмет», Россия.

*Образец вируса табачной мозаики* (в виде 21,1 мг/мл суспензии в PBS-D) был любезно предоставлен В. Макаровым (Институт им. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова).

*Подготовка образцов.* Аликвоту исходной суспензии ВТМ разбавляли буфером PBS-D в соотношении 1:99 и затем инкубировали во встряхивателе (Eppendorf Thermomixer Comfort (ФРГ), 600 об/мин, 20°C) в течение 30 мин. После этого 5 мкл полученной разбавленной суспензии ВТМ наносили на пленку из аморфного углерода, адгезированную к медной сетке (Ted Pella, Inc., США; Prod # 010843-F), и инкубировали в течение 6 мин, а затем смывали 1 мл ультрачистой воды. Полученные таким образом образцы высушивали на воздухе. Для исследования использовали как неметаллизированные, так и металлизированные (путем предварительного нанесения на поверхность подготовленного образца сверхтонкой 1,5 нм пленки вольфрама) образцы.

*Металлизация образцов для ЭМ.* Для формирования на поверхности исследуемого образца сверхтонкой пленки вольфрама образец помещали в камеру установки магнетронного напыления Orion-3 (AJA Inc., США) так, что расстояние от мишени до обрабатываемого образца составляло 15 см. Начальный вакуум в системе перед напуском рабочего газа составлял не менее  $6 \times 10^{-7}$  Торр. Распыление вольфрама проводили с использованием аргоновой плазмы при давлении аргона в рабочей камере  $4,5 \times 10^{-3}$  Торр с использованием разряда постоянного тока при мощности разряда 70 Вт в течение 10 с с предварительным отжигом вольфрамовой мишени в течение 6 мин. В процес-

се распыления обеспечивалось вращение диска с закрепленным образцом в горизонтальной плоскости с постоянной угловой скоростью 40 об/мин; при этом наклон плоскости образца по отношению к плоскости диска составлял  $45^\circ$  (аналогично [16]). Толщину формируемых пленок вольфрама определяли методом QCM (по массе вольфрама, осаждающегося на поверхность кварцевого кристалла в единицу времени) с использованием контроллера толщины MCM-160 (McVac Manufacturing, США), входящего в комплект распылительной системы. В указанных условиях скорость напыления вольфрама составляла 1,3 Å/с.

*Получение АСМ-изображений.* Для получения АСМ-изображений частиц ВТМ, адсорбированных на поверхности аморфных пленок углерода, был использован атомно-силовой микроскоп NTEGRA (NT-MDT, Зеленоград, Россия). Сканирование проводилось на воздухе в режиме прерывистого контакта с разрешением  $256 \times 256$  с использованием стандартных кантилеверов (радиус иглы 10 нм).

*Получение ЭМ-изображений.* ЭМ-изображения частиц ВТМ были получены с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S5500 в режимах «на просвет» (СЭМ) и «на отражение» (ПЭМ) при ускоряющем напряжении от 20 до 30 кВ.

### Экспериментальные результаты и их обсуждение

Иммобилизованные металлизированные и неметаллизированные частицы ВТМ были визуализированы методами АСМ и электронной микроскопии в СЭМ и ПЭМ режимах. Полученные изображения представлены на рисунке.

Из представленных изображений видно, что на поверхности пленки после иммобилизации частиц ВТМ наблюдаются палочковидные объекты, длина изображений которых составляет от 270–300 нм до 600 нм и более, что соответствует длине единичных вирионов ВТМ [14, 21] и их агрегатам «торец в торце» [14]. Небольшое уменьшение длины изображений некоторых частиц ВТМ (до ~270 нм) по сравнению с полученным в работе [24] значением 300 нм, может быть обусловлено влиянием гидрофобного характера используемой подложки: показано, что вирионы ВТМ могут несколько сжиматься либо претерпевать частичное разрушение на гидрофобных поверхностях [23, 27].

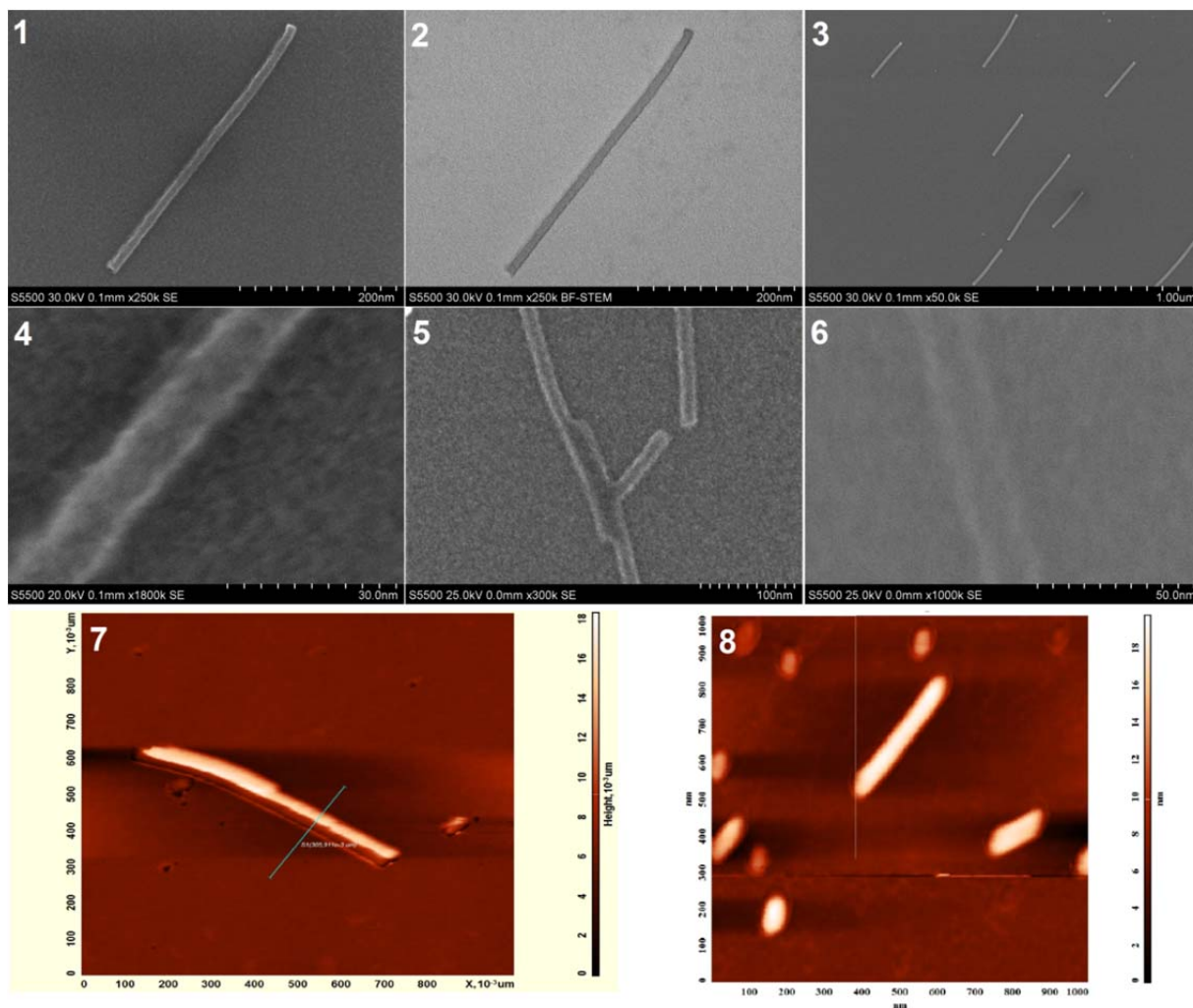


Рис. ЭМ-изображения в СЭМ (1, 3-6) и ПЭМ (2) режимах и АСМ-изображения (7-8) частиц ВТМ, нековалентно иммобилизованных на поверхности пленки аморфного графита, металлизированных 1,5 нм вольфрама (1-4, 7) и не подвергавшихся металлизации (5-6, 8). Увеличение 250 000 (1,2), 50 000 (3), 1 800 000 (4), 300 000 (5), 1 000 000 (6). Размер АСМ-скана 1 мкм×1 мкм, шкала высот 0–19 нм (7, 8).

Максимум распределения высот АСМ-изображений визуализированных объектов составляет  $18 \pm 0,2$  нм как для металлизированных, так и для неметаллизированных частиц ВТМ. Полученные значения высоты АСМ-изображений неметаллизированных частиц ВТМ соответствуют данным, полученным в работе [23] (18,8 нм в случае использования подложки из высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ)). Тот факт, что максимум распределения высот АСМ-изображений металлизированных частиц ВТМ также составил  $18 \pm 0,2$  нм (а не  $18 + 1,3 = 19,3$  нм), может быть связан с влиянием высокого (порядка  $10^{-7}$  Торр) вакуума в камере распылительной системы на белковую оболочку вируса в процессе выдержки в камере распылительной системы. Действительно, в литературе отмечено, что незначительное изменение размеров частиц ВТМ может возникать, в частности, вследствие воздействия вакуума (названное «подсыханием») [28]. Этим же может объясняться тот факт, что полученные на

основании данных ЭМ значения диаметра частиц ВТМ (12,5 нм [13]; 15 нм [21]; 15,2 нм [22]; наши данные: 14,5 нм) меньше значений высот, полученных методом АСМ (18 нм [23] и наши данные; 18–20 нм [24]). Таким образом, полученные в настоящей работе данные о размерах частиц ВТМ согласуются с литературными данными.

Из сравнения представленных на рисунке СЭМ-изображений металлизированных и неметаллизированных частиц ВТМ видно, что изображения металлизированных методом магнетронного напыления вирусных частиц имеют более четко очерченные контуры, чем неметаллизированные частицы ВТМ, что заметно уже на увеличениях порядка  $300\,000\times$  (см. рисунок). При использовании еще больших увеличений эффект повышения четкости изображений вирусных частиц сверхтонкими пленками вольфрама становится еще более выраженным. Действительно, СЭМ-изображение металлизированной частицы ВТМ имеет четко очерченные границы даже при увеличении

1 800 000<sup>X</sup>. В то же время СЭМ-изображение частиц ВТМ, не подвергавшейся металлизации, получается размытым уже при увеличении 1 000 000<sup>X</sup> (см рисунок).

Важной характеристикой предложенного подхода являются пределы его применимости. В настоящей работе, при диаметре исследуемых вирусных частиц ~18 нм, толщина формируемых нанопленок вольфрама была менее 1,5 нм (то есть менее 10 % ширины исследуемых частиц), что позволяет использовать полученные данные для оценки размера этих частиц. При меньших (порядка 5 нм, что соответствует размеру молекулы белка [26]) размерах исследуемых частиц использование предложенного подхода позволит качественно определять наличие исследуемых объектов на поверхности. Также возможна оценка степени олигомеризации биомолекул. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что предварительная металлизация исследуемых образцов путем магнетронного напыления сверхтонких (толщиной менее 1,5 нм) пленок вольфрама может быть использована для повышения качества ЭМ-изображений наноразмерных белковых биологических объектов за счет повышения их четкости и снижения разрушающего влияния электронного пучка на исследуемые объекты. Сверхтонкие пленки вольфрама, сформированные на поверхности вирусных частиц методом магнетронного напыления, могут быть использованы с целью дальнейшего исследования этих объектов с использованием как сканирующей, так и просвечивающей электронной микроскопии.

### Заключение

Экспериментально продемонстрировано использование магнетронного напыления сверхтонких пленок вольфрама на поверхность частиц ВТМ для контрастирования изображений этих частиц в ЭМ. Толщина полученных пленок вольфрама составляла, по данным QCM, менее 1,5 нм.

Магнетронное напыление вольфрама ранее не использовалось для контрастирования ЭМ-изображений применительно к ВТМ. Сравнение данных о размерах частиц ВТМ, полученных методами АСМ и ЭМ, а также сопоставление полученных результатов с литературными данными, позволяют сделать вывод о том, что предложенный способ позволяет получить корректные данные о размерах этих частиц методом ЭМ. При этом контуры полученных изображений имеют существенно более четкие очертания, чем при исследовании методом ЭМ образцов ВТМ без напыления.

Магнетронное напыление сверхтонких пленок вольфрама может быть использовано при изу-

чении других типов вирусных частиц (в том числе вирусов, патогенных для человека) методом ЭМ.

*АСМ-измерения выполнены в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы. Шумов И. Д. является получателем Стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2016–2018 годы (СП-4280.2016.4). Измерения на электронном микроскопе выполнены с использованием оборудования ЦКП в рамках выполнения Соглашения № 14.621.21.0017, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор работ RFMEFI62117X0017).*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Kuo J. *Methods in Molecular Biology. Electron microscopy*. – New York: Humana Press, 2014.
2. Brenner S., Horne R. W. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1959. Vol. 34. P. 103.
3. Саї С. В., Сорокин Н. Ю. // *Докл. ТУСУР*. 2012. № 2 (26). Ч. 1. С. 78.
4. Ogura T. // *PLOS ONE*. 2012. Vol. 7. No. 10. P. e46904.
5. Adrian M., Dubochet J., Lepault J., McDowell A. W. // *Nature*. 1984. Vol. 308. P. 32.
6. Yu G., Vago F., Zhang D., Snyder J. E., Yan R., Zhang C., Benjamin C., Jiang X., Kuhn R. J., Server P., Thompson D., Jiang W. // *J. Struct. Biol.* 2014. Vol. 187. P. 1.
7. Mirsaidov U. M., Zheng H., Casana Y., Matsudaira P. // *Biophys. J.* 2012. Vol. 102. P. L15.
8. Thompson R. F., Walker M., Siebert C. A., Muench S. P., Ranson N. A. // *Methods*. 2016. Vol. 100. P. 3.
9. Cheng Y., Grigorieff N., Penczek P. A., Walz T. // *Cell*. 2015. Vol. 161. P. 438.
10. Williams R. C., Wyckoff R. W. G. // *Proc. Exp. Biol. Med.* 1945. Vol. 58. P. 265.
11. Antzutkin O. N. // *Magn. Reson. Chem.* 2004. Vol. 42. P. 231.
12. Wischnitzer S. *Introduction to electron microscopy*. 2<sup>nd</sup> ed. – New York: Pergamon Press, 1970.
13. Williams R. C., Wyckoff R. W. G. // *Science*. 1945. Vol. 101. P. 594.
14. Williams R. C., Steere R. L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1951. Vol. 73. P. 2057.
15. Hart R. G. // *Virology*. 1963. Vol. 20. P. 636.
16. Hart R. G. // *J. Mol. Biol.* 1961. Vol. 3. P. 701.
17. Williams R. C., Wyckoff R. W. G. // *J. Appl. Phys.* 1944. Vol. 15. P. 712.
18. Hart R. G. // *J. Appl. Phys.* 1963. Vol. 34. No. 2. P. 434.
19. Petroff P., Sheng T. T., Sinha A. K., Rozgonyi G. A., Alexander F. B. // *J. Appl. Phys.* 1973. Vol. 44. P. 2545.
20. Salamon K., Milat O., Radic N., Dubcek P., Jercinovic M., Bernstorff S. // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2013. Vol. 46. P. 095304.
21. Stanley W. M., Anderson T. F. // *J. Biol. Chem.* 1941. Vol. 139. P. 325.
22. Lauffer M. A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1944. Vol. 66. P. 1188.

23. Дубровин Е. В., Кирикова М. Н., Новиков В. К., Дрыгин Ю. Ф., Яминский И. В. // Колл. Журн. 2004. Т. 66. Вып. 6. С. 750.
24. Bushell G. R., Watson G. S., Holt S. A., Myhra S. // J. Microsc. 1995. Vol. 180. Pt. 2. P. 174.
25. Ricci D., Braga P. C. *Methods in Molecular Biology. Atomic force microscopy* — New York: Humana Press, 2003.
26. Плешакова Т. О., Шумов И. Д., Иванов Ю. Д., Мальсагова К. А., Кайшева А. Л., Арчаков А. И. // Биомедицинская химия. 2014. Т. 61. Вып. 2. С. 239.
27. Britt D. W., Buijs J., Hlady V. // Thin Solid Films. 1998. Vol. 327-329. P. 824.
28. Hall C. E. // J. Am. Chem. Soc. 1958. Vol. 80. P. 2556.

PACS: 87.64.Ee

## Magnetron sputtering of metals on biological objects of nanometer size using the example of tobacco mosaic virus

I. D. Shumov, S. L. Kanashenko, A. I. Archakov, Yu. D. Ivanov, and T. O. Pleshakova

Institute of Biomedical Chemistry (IBMC)  
Bld. 10, 8, Pogodinskaya str., Moscow, 119121, Russia  
E-mail: shum230988@mail.ru

Received June 22, 2017

*A method for metallization of tobacco mosaic virus particles (TMV) in order to improve the clarity of images obtained by electron microscopy is proposed. The metallization was carried out by magnetron sputtering of tungsten using argon plasma in DC mode. The values of diameter of TMV particles obtained by electron and atomic force microscopy are in good agreement with literature data. The proposed approach can be used in studies of other types of viral particles by electron microscopy.*

**Keywords:** electron microscopy, ultra-thin films, magnetron sputtering, tobacco mosaic virus, atomic force microscopy.

### REFERENCES

1. *Methods in Molecular Biology. Electron microscopy*. Ed. by J. Kuo (Humana Press, New York, 2014).
2. S. Brenner and R. W. Horne, *Biochim. Biophys. Acta.* **34**, 103 (1959).
3. S. V. Sai and N. Yu. Sorokin, *Dokl. TUSUR*. No. 2 (26), Part 1. 78 (2012).
4. T. Ogura, *PLOS ONE*. **7**, e46904 (2012).
5. M. Adrian, J. Dubochet, J. Lepault, and A. W. McDowell, *Nature*. **308**, 32 (1984).
6. G. Yu, F. Vago, D. Zhang, J. E. Snyder, R. Yan, C. Zhang, C. Benjamin, X. Jiang, R. J. Kuhn, P. Server, D. Thompson, W. Jiang, and J. Struct. Biol. **187**, 1 (2014).
7. U. M. Mirsaidov, H. Zheng, Y. Casana, and P. Matsudaira, *Biophys. J.* **102**, L15 (2012).
8. R. F. Thompson, M. Walker, C. A. Siebert, S. P. Muench, and N. A. Ranson, *Methods*. **100**, 3 (2016).
9. Y. Cheng, N. Grigorieff, P. A. Penczek, and T. Walz, *Cell*. **161**, 438 (2015).
10. R. C. Williams and R. W. G. Wyckoff, *Proc. Exp. Biol. Med.* **58**, 265 (1945).
11. O. N. Antzutkin, *Magn. Reson. Chem.* **42**, 231 (2004).
12. S. Wischnitzer, *Introduction to electron microscopy*. 2<sup>nd</sup> ed. (Pergamon Press, New York, 1970).
13. R. C. Williams and R. W. G. Wyckoff, *Science*. **101**, 594 (1945).
14. R. C. Williams and R. L. Steere, *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 2057 (1951).
15. R. G. Hart, *Virology*, **20**, 636 (1963).
16. R. G. Hart, *J. Mol. Biol.* **3**, 701 (1961).
17. R. C. Williams and R. W. G. Wyckoff, *J. Appl. Phys.* **15**, 712 (1944).
18. R. G. Hart, *J. Appl. Phys.* **34**, 434 (1963).
19. P. Petroff, T. T. Sheng, A. K. Sinha, G. A. Rozgonyi, and F. B. Alexander, *J. Appl. Phys.* **44**, 2545 (1973).
20. K. Salamon, O. Milat, N. Radic, P. Dubcek, M. Jercinovic, and S. Bernstorff, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46**, 095304 (2013).
21. W. M. Stanley and T. F. Anderson, *J. Biol. Chem.* **139**, 325 (1941).
22. M. A. Lauffer, *J. Am. Chem. Soc.* **66**, 1188 (1944).
23. E. V. Dubrovina, I. V. Yaminsky, M. N. Kirikova, V. K. Novikov, and Y. F. Drygin, *Colloid Journal*. **66**, 673 (2004).
24. G. R. Bushell, G. S. Watson, S. A. Holt, and S. Myhra, *J. Microsc.* **180** (Part 2) 174 (1995).
25. D. Ricci and P. C. Braga, *Methods in Molecular Biology. Atomic force microscopy*. (Humana Press, New York, 2003).
26. T. O. Pleshakova, I. D. Shumov, Yu. D. Ivanov, K. A. Malsagova, A. L. Kaysheva, and A. I. Archakov, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B: Biomedical Chemistry*. **9**, 244 (2014).
27. D. W. Britt, J. Buijs, and V. Hlady, *Thin Solid Films*. **327–329**, 824 (1998).
28. C. E. Hall, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 2556 (1958).