

ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДЛЯ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

стр. 5 – 8

И.В. Яминский^{1,2}, А.И. Ахметова^{1,2}, Н.Е. Максимова^{1,2}

¹МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, 119991, ГСП-1, Москва. Ленинские горы, дом 1

²ООО НПП «Центр перспективных технологий», Россия, 119311, Москва, ул. Строителей, 4-5-47

Контактные данные: Яминский И.В., e-mail: yaminsky@nanoscopy.ru

Резюме: В статье рассматривается быстросканирующая зондовая микроскопия биологических объектов и программное обеспечение для обработки полученных результатов. Исследование биологических объектов с помощью зондовой микроскопии не требует сложной пробоподготовки, но для непосредственно подбора оптимального режима сканирования требуются опыт и практические навыки.

Ключевые слова: быстросканирующая зондовая микроскопия, программное обеспечение, силовая кривая, *Neisseria flavescens*.

SOFTWARE FOR BACTERIAL CELLS SCANNING PROBE MICROSCOPY

page 5 – 8

I.V. Yaminsky^{1,2}, A.I. Akhmetova^{1,2}, N.E. Maximova¹

¹Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

²Advanced Technologies Center, 4-5-47, Stroiteley str., Moscow, 119311, Russia

Summary: The article discusses high-speed probe microscopy of biological objects and software for processing the results. The study of biological objects using probe microscopy does not require complex sample preparation, but direct selection of the optimal scanning mode requires experience and practical skills.

Keywords: high-speed probe microscopy, software, force curve, *Neisseria flavescens*.

DOI: 10.34219/2306-3645-2022-12-4-5-8

Быстросканирующая зондовая микроскопия приобретает актуальность в последнее время для визуализации биологических процессов в жидкости и на воздухе. Уникальность метода – в доступности, простой пробоподготовке, в возможности получать большой пласт данных об исследуемых объектах. ФемтоСкан X – это быстросканирующий зондовый микроскоп (СЗМ) для широкого применения. В основе блока управления микроскопом лежит программируемая логическая интегральная схема Xilinx Spartan 6 (ПЛИС), которая позволяет управлять несколькими устройствами (АЦП, ЦАП, шаговый двигатель) параллельно и осуществляет быстрый сбор и передачу данных

на компьютер [1, 2]. По этой причине увеличивается скорость работы всего микроскопа.

ПЛИС логически поделена на три части: блок управления периферийными устройствами, 32-битный RISC процессор Microblaze и контроллеры Ethernet и USB. Такая архитектура необходима ввиду сложности алгоритмов управления микроскопом.

Блок управления периферией контролирует работу АЦП, ЦАП и других устройств, а также записывает и читает данные с них. Логика его работы описана на языке VHDL. В системе используются четыре 18-ти разрядных АЦП и четыре 20- разрядных ЦАП с временем преобразования 1 мкс, 3 контроллера шагового двигателя, 2 циф-

ровых петли обратной связи и другие компоненты. Для улучшения качества изображения и удаления выбросов применяется усреднение сигнала с АЦП по 16-ти значениям. Такая сборка позволяет записывать каждый пиксель с частотой до 60 кГц, а минимальное время, за которое может быть снят один кадр, достигает 30 секунд. Размеры кадра варьируются от $5 \times 5 \text{ нм}^2$ до $16 \times 16 \text{ мкм}^2$, при этом есть возможность программно разворачивать кадр на произвольный угол в горизонтальной плоскости.

На процессоре Microblaze запускается программа на языке C, которая выполняет предварительную обработку данных и передает их в блок управления Ethernet-соединением с сетью. Для обеспечения передачи данных между блоками используется шина AXI4. Это также позволяет ускорить работу микроскопа, а благодаря поддержке протокола Ethernet микроскопом можно управлять удаленно.

При проектировании ПО и материнской платы ФемтоСкан X учитываются несколько основных факторов: аппаратная и алгоритмическая расширяемость, быстродействие, удобство и надежность канала передачи данных между управляющим компьютером и блоком СЗМ. Именно поэтому в качестве управляющего элемента был выбран ПЛИС, а не микроконтроллер. Благодаря применению ПЛИС стало возможным реализовывать сложные алгоритмы обработки данных, а также обновлять их без изменения платы.

Сбор данных о положении кантилевера осуществляется с помощью оптической схемы. Луч лазера, направленный на кантилевер, отражается от него и попадает на фотодиод. Чтобы не нарушать ее тонкую настройку, при сканировании образца передвигается сам столик с образцом, а кантилевер остается на месте. Движение столика по вертикали осуществляется с помощью пьезокерамики (для точных шагов по вертикали при перемещении на расстояние до 4 мкм) и шагового двигателя (для перемещений свыше 4 мкм). По горизонтали столик приводится в движение только с помощью пьезокерамики. В дальнейшем при описании работы микроскопа говорится о перемещениях в системе отсчета образца, как если бы образец стоял на месте, а кантилевер двигался.

На данный момент ФемтоСкан X поддерживает 3 режима работы: контактный, резонансный и флирт-моду [3]. В контактном режиме кантилевер находится в постоянном контакте с поверхностью. При перемещении кантилевера на один шаг с помощью оптической схемы измеряется его отклонение от исходного положения. Затем с помощью звеньев обратной связи кантилевер поднимается или опускается так, чтобы снова прийти в начальное положение, и делается новый шаг. При этом с помощью лазерного луча, отраженного от кантилевера, измеряется не только его отклонение, но и трение кантилевера о поверхность. При идеально настроенной обратной связи отклонение кантилевера от исходного положения на каждом шаге должно быть равным нулю.

В резонансном режиме кантилевер постоянно осциллирует и находится на одном расстоянии от поверхности. При приближении к поверхности амплитуда колебаний меняется, что регистрируется оптической схемой, и на основе этих данных строится изображение.

Существующие режимы – контактный и резонансный – могут не учитывать специфики отдельно взятого образца, особенно когда речь идет о мягких биологических объектах. Тогда необходимо ювелирно подбирать настройки, либо использовать флирт-моду. Флирт-мода – это специальный режим работы ФемтоСкан X, который позволяет проводить деликатное сканирование мягких поверхностей: полимеров, бактерий на питательной среде и т.п. Его принцип работы состоит в том, что кончик кантилевера не находится в постоянном контакте с поверхностью: он движется на некотором расстоянии от нее и опускается только в определенных точках. Расстояние между этими точками или шаг по осям X и Y можно регулировать вручную, как и силу взаимодействия кантилевера с поверхностью, время ожидания в верхней точке движения кантилевера и другие параметры.

Расчет силы взаимодействия с образцом производится по измерению силовой кривой (рис. 1). В этом режиме кантилевер шаг за шагом опускается к поверхности (участок АВ), взаимодействует с ней (участок ВС) и затем возвращается в исходную точку (участок CD). При подводе на некотором расстоянии от поверхности (точка В) за счет сил притяжения кантилевер может притянуться к образцу. При отводе же адгезионные силы удерживают кантилевер в контакте с образцом до тех пор, пока не произойдет отрыв (точка D). При этом измеряется отклонение кантилевера в зависимости от расстояния до образца. По виду силовой кривой можно судить о твердости поверхности, ее адгезионных свойствах и взаимодействии с кантилевером.

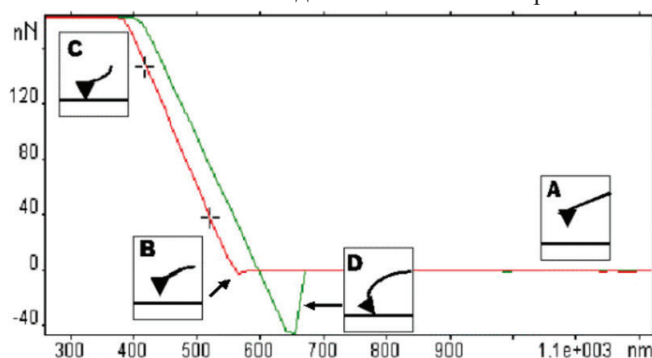


Рис.1: Пример силовой кривой

Управление микроскопом осуществляется через ПК с помощью клиентского Qt-приложения. Приложение передает в ПЛИС задаваемые вручную параметры, где с учетом вводимых и текущих значений параметров состояния формируются значения параметров процессов. Все приложение занимает на диске 64 Мб. Передача данных осуществляется по протоколу Ethernet, для которого програм-

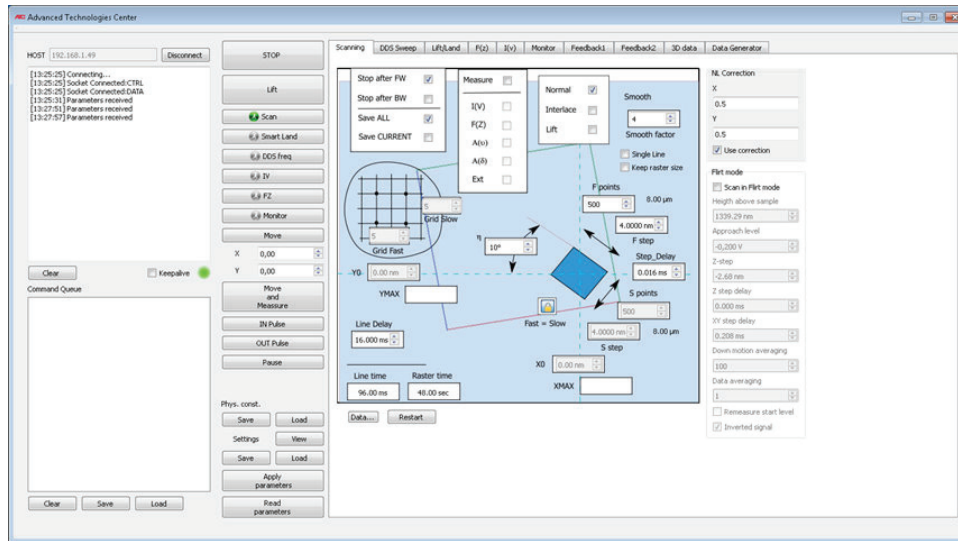


Рис. 2: Окно Scanning клиентского Qt-приложения. Можно изменять размер поля сканирования, скорость, размер шага, длительность задержки между шагами, угол поворота кадра

ма, исполняемая на ПЛИС, является серверной частью. Данные передаются через несколько потоков: команды с клиентской программы и сообщения с микроскопа разделены по уровню приоритетности на высокий и низкий. Процедуры высокого уровня приоритетности исполняются “поверх” процедур низкого уровня приоритетности. Это позволяет параллельно передавать и выполнять разные команды, что делает работу микроскопа более точной и быстрой.

Рассмотрим работу Qt-приложения. Окно программы визуально поделено на две части (рис. 2). Слева выводится информация о подключении программы к микроскопу через Ethernet и о выполняемых процедурах. Также тут находится набор кнопок с основными командами. Правая часть содержит в себе несколько вкладок с различным

функционалом. Наиболее часто используемая из них – это окно Scanning, где производится управление процессом сканирования.

В окне Scanning можно регулировать параметры контактного режима сканирования: число точек в строке кадра, размер шага, длительность задержки между шагами, угол поворота кадра и многие другие. При этом автоматически вычисляется длина кадра в мкм, а квадрат на заднем фоне отражает положение и размер сканируемой области. Также здесь можно регулировать параметры режима флирт-моды (справа). Остальные вкладки позволяют осуществлять настройку микроскопа: измерять силовую кривую, управлять звеньями обратной связи, настраивать оптическую схему и др. Настройка резонансного режима сканирования производится в отдельной вкладке.

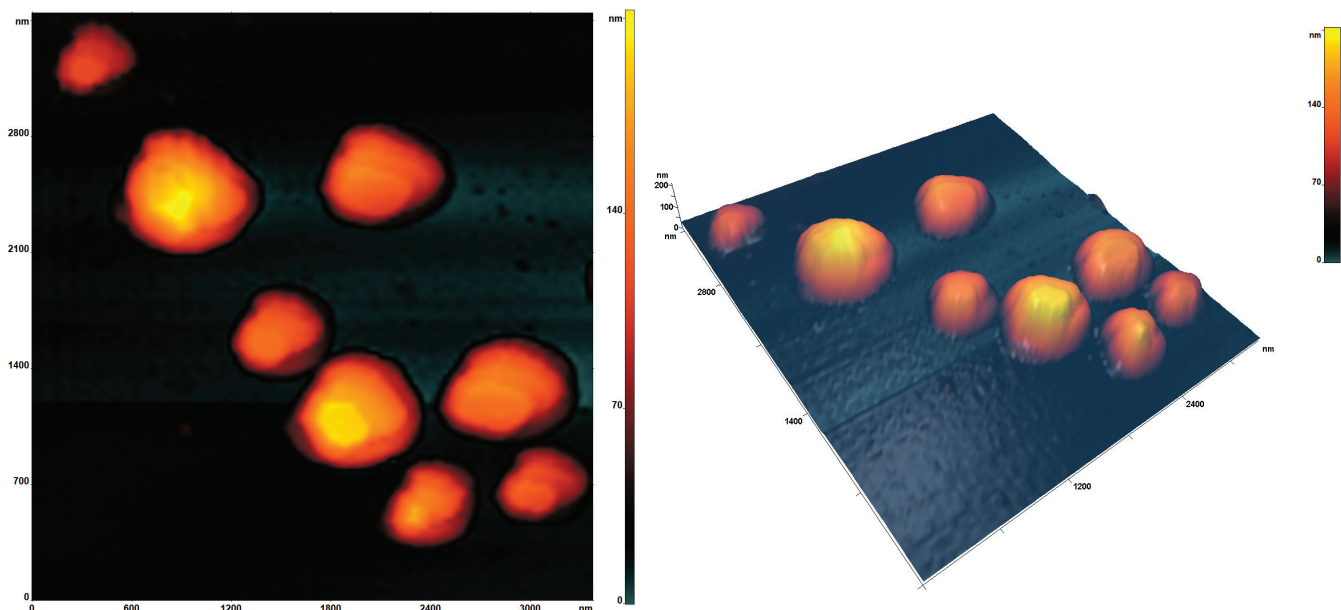


Рис. 3: 2D и 3D-визуализация бактерии *Neisseria flavescens*. Обработка в ПО ФемтоСкан Онлайн

Все полученные изображения могут быть открыты в ПО ФемтоСкан Онлайн (Рис. 3), где реализован широкий набор инструментов для математической обработки изображений: вычитание наклона, сглаживание, увеличение резкости, усреднение по строкам и многие другие.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям, проект №71108. Работа выполнена при содействии компании ООО «Эндор», Москва.

Конфликт интересов отсутствует.

There is no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Савинов И., Яминский И. В.** От скана до ФемтоСкана: итоги 25 лет. *Наноиндустрия*, 2013, №1, 39, 54-59
2. **Филонов, А., Савинов, С., Синицына, О., Мешков, Г., Яминский, И.** Фемто Скан X – новый сканирующий зондовый микроскоп. *Наноиндустрия*, 3 (2012), 48–49.
3. **Яминский, И. В., Ахметова, А. И., Корнилов, Д. В.** Мода на флирт моды. *Наноиндустрия* 15, 3-4 (2022). DOI /10.22184/1993-8578.2022.15.3-4.178.185

Поступила 26.09.2022

УДК 57.03

REFERENCES

1. **Savinov I., Yaminsky I. V.** From Scan to FemtoScan: results of 25 years. *Nanoindustry*, 2013, №1, 39, 54-59
2. **Filonov, A., Savinov, S., Sinitsyna, O., Meshkov, G., Yaminsky, I.** FemtoScan X is a new scanning probe microscope. *Nanoindustry*, 3 (2012), 48–49.
3. **Yaminsky I. V., Akhmetova A. I., Kornilov D. V.** Fashion for flirting mode. *Nanoindustry*. 15, № 3-4. (2022), 178-185 DOI /10.22184/1993-8578.2022.15.3-4.178.185

Received 26.09.2022

UDK 57.03

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

1. **Яминский Игорь Владимирович** – Профессор, д.ф.-м.н., физический и химический факультеты МГУ, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, генеральный директор ООО НПП «Центр перспективных технологий», e-mail: yaminsky@nanoscopy.net
2. **Ахметова Ассель Иосифовна** – инженер Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, ведущий специалист ООО НПП «Центр перспективных технологий», e-mail: pr@atcindustry.ru
3. **Максимова Надежда**, студентка физического факультета, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, программист ООО НПП «Центр перспективных технологий», e-mail: maksimova.ne17@physics.msu.ru

AUTHORS' INFORMATION

1. **Yaminsky Igor Vladimirovich** – Prof., Doctor of science in Physics, Faculty of Physics and Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Advanced Technologies Center; e-mail: yaminsky@nanoscopy.net
2. **Akhmetova Assel Iosifovna** – engineer of the A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology of the Lomonosov Moscow State University, leading specialist of Advanced Technologies Center, e-mail: pr@atcindustry.ru
3. **Maximova Nadezhda** student of Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, programmer of Advanced Technologies Center. e-mail: maksimova.ne17@physics.msu.ru