

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 1144/2009**

(51) Int. Cl.<sup>8</sup>: **G01N 1/42 (2006.01)**

(22) Anmeldetag: **22.07.2009**

(43) Veröffentlicht am: **15.10.2010**

(73) Patentinhaber:

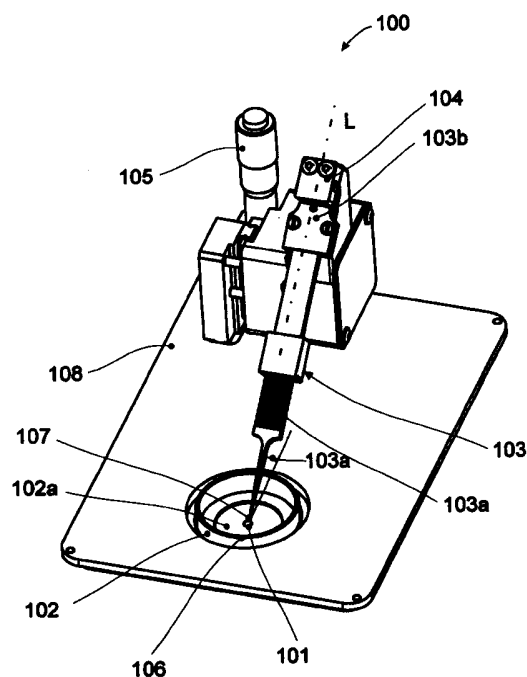
LEICA MIKROSYSTEME GMBH  
A-1170 WIEN (AT)

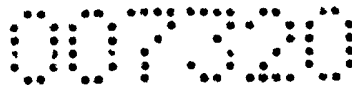
(72) Erfinder:

LIHL REINHARD DR.  
WIEN (AT)  
RESCH GÜNTER DR.  
WIEN (AT)

(54) **TRANSFER EINES PROBENTRÄGERS IN DER KORRELATIVEN ELEKTRONENMIKROSKOPIE**

(57) Die Erfindung betrifft eine Halteeinrichtung (103) zum Halten eines elektronenmikroskopischen Probenträgers (101) und zum Transfer des Probenträgers (101) von einem Lichtmikroskop in eine Kryopräparationsvorrichtung (200) zum Kryo-Präparieren von Proben für ein Elektronenmikroskop, wobei die Halteeinrichtung (103) ein Rastelement (103b) aufweist, wobei das Rastelement (103b) in eine jeweils am Lichtmikroskop und an der Kryopräparationsvorrichtung (200) angeordnete Rasteinrichtung (104,204) lösbar einrastbar ist. Die Erfindung betrifft weiters ein Verfahren zum Transfer eines elektronenmikroskopischen Probenträgers (101) von einem Lichtmikroskop in eine Kryopräparationsvorrichtung (200) zum Kryo-Präparieren von Proben für ein Elektronenmikroskop.





### ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft eine Halteeinrichtung (103) zum Halten eines elektronenmikroskopischen Probenträgers (101) und zum Transfer des Probenträgers (101) von einem Lichtmikroskop in eine Kryopräparationsvorrichtung (200) zum Kryo-Präparieren von Proben für ein Elektronenmikroskop, wobei die Halteeinrichtung (103) ein Rastelement (103b) aufweist, wobei das Rastelement (103b) in eine jeweils am Lichtmikroskop und an der Kryopräparationsvorrichtung (200) angeordnete Rasteinrichtung (104,204) lösbar einrastbar ist. Die Erfindung betrifft weiters ein Verfahren zum Transfer eines elektronenmikroskopischen Probenträgers (101) von einem Lichtmikroskop in eine Kryopräparationsvorrichtung (200) zum Kryo-Präparieren von Proben für ein Elektronenmikroskop.

Fig. 1



## TRANSFER EINES PROBENTRÄGERS IN DER KORRELATIVEN ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die Erfindung bezieht sich auf eine Halteinrichtung zum Halten eines elektronenmikroskopischen Probenträgers und zum Transfer des Probenträgers von einem Lichtmikroskop in eine Kryopräparationsvorrichtung zum Kryo-Präparieren von Proben für ein Elektronenmikroskop.

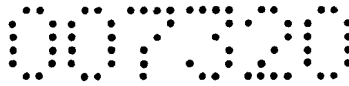
Ferner bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zum Transfer eines elektronenmikroskopischen Probenträgers von einem Lichtmikroskop in eine Kryopräparationsvorrichtung zum Kryo-Präparieren von Proben für ein Elektronenmikroskop.

Die Kryo-Elektronenmikroskopie hat sich als besonders geeignet für strukturblogische Untersuchungen erwiesen. Bei dieser Technologie wird eine wasserhaltige Probe kryofixiert, d.h. sie wird sehr schnell und unter Vermeidung der Bildung von Eiskristallen abgekühlt. Die zu untersuchenden Objekte, beispielsweise Zellen, Enzyme, Viren oder Lipidschichten, werden dadurch in einer dünnen vitrifizierten Eisschicht eingebettet. Der große Vorteil der Kryo-Fixierung liegt darin, dass die biologischen Strukturen in ihrem nativen Zustand erhalten und in ihrer physiologischen Umgebung untersucht werden können. Unter anderem kann ein biologischer Vorgang zu jedem beliebigen Zeitpunkt durch Kryofixierung angehalten und in diesem vitrifizierten Zustand im Elektronenmikroskop untersucht werden.

Um den richtigen Zeitpunkt der Kryo-Fixierung genau festzulegen, ist die korrelative Methode zwischen Lichtmikroskop und Elektronenmikroskop, auch als CLEM ("correlative light-electron microscopy") bezeichnet, von großem Vorteil. Die korrelative Methode zwischen Lichtmikroskop und Elektronenmikroskop gestattet die biologische Probe zuerst im Lichtmikroskop so lange zu beobachten, bis der gewünschte Zustand erreicht wird. Sodann wird die Probe in eine Kryopräparationsvorrichtung transferiert und für die elektronenmikroskopische Beobachtung kryofixiert.

Als Proben werden häufig Zellkulturen verwendet. Häufig wachsen diese direkt auf dem Probenträger. CLEM ermöglicht es, die Zellen im lebenden Zustand zuerst im Lichtmikroskop zu untersuchen, bestimmte Zellen auszuwählen bzw. einen Zustand einer Zelle abzuwarten und diesen Zustand durch rasches Einfrieren festzuhalten.

Bei einer anderen korrelativen Methode erfolgt die lichtmikroskopische Untersuchung an der bereits kryofixierten Probe. Diese Methode hat im Vergleich zur zuvor beschriebenen



CLEM-Methode jedoch den Nachteil, dass die biologische Probe bzw. die Zellen nicht im lebenden Zustand untersucht werden können.

Unabhängig von der Art der Probenpräparation ist es für eine hochauflösende transmissionselektronenmikroskopische Abbildung zwingend notwendig, dass die Probe ausreichend dünn ist. Proben für das Transmissionselektronenmikroskop sind üblicherweise 30-100 nm, vorzugsweise 50-80 nm, dick. Bei anderen transmissionselektronenmikroskopischen Methoden (z.B. Intermediate Voltage Transmission Electron Microscopy (IVEM)) können die Proben aber auch deutlich dicker sein. Proben mit definierter Dicke können durch Schneiden mittels Ultramikrotom erhalten werden, wobei eine kryofixierte Probe (Kryoschnitt) in sehr dünne Scheiben geschnitten wird. Eine andere Präparationsmethode bezieht sich auf das Aufbringen von dünnen Flüssigkeitsfilmen auf einen elektronenmikroskopischen Träger. Hier wird ein dünner Flüssigkeitsfilm sehr schnell, unter Vermeidung von Eiskristallbildung eingefroren. Dafür wird ein elektronenmikroskopischer Träger ("Netzchen", "Grid") in eine die Probe enthaltende Flüssigkeit getaucht bzw. die Probenflüssigkeit wird mittels einer Pipette auf dem Träger appliziert, die überschüssige Flüssigkeit beispielsweise mittels eines Filterpapiers entfernt, und der auf dem Träger zurückbleibende Flüssigkeitsfilm durch Eintauchen in ein Bad aus beispielsweise flüssigem Ethan kryofixiert. Kryofixierte Proben können direkt im gefrorenen Zustand in einem Kryoelektronenmikroskop untersucht werden, da sie dem im Elektronenmikroskop herrschenden Hochvakuum standhalten. Bei der Gefriersubstitution, die z.B. in der EP 1 267 164 B1 beschrieben ist, wird das Wasser in einer kryofixierten Probe gegen ein Polymer ausgetauscht und die Probe nach dem Aushärten des Polymers am Ultramikrotom bei Raumtemperatur in Scheiben geschnitten; die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgt ebenfalls bei Raumtemperatur.

Automatisierte und semi-automatisierte Kryopräparationsvorrichtungen zum Kryofixieren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die WO 02/077612 A1 (siehe auch EP 1 370 846 B1 und US 020040157284) offenbart eine solche Vorrichtung, mit welcher die Kryopräparation nahezu automatisiert durchgeführt werden kann. Diese Vorrichtung ist unter der Handelsbezeichnung Vitrobot™ auf dem Markt. Bei diesem Gerät wird der Probenträger in einer Halteeinrichtung fixiert. Überschüssige Probenflüssigkeit auf dem Träger wird gegebenenfalls mit Hilfe von Filterpapier abgeleitet ("Blotting"-Vorgang). Anschließend wird die Probe durch rasches Eintauchen des Trägers in ein Kühlmittel (Ethan) vitrifiziert. Ein weiteres Gerät von der Firma Gatan ([www.gatan.at](http://www.gatan.at)) mit der Handelsbezeichnung Cryoplunge™ ist einfacher gebaut und nicht voll automatisiert.

Com



Da biologische Vorgänge oft sehr schnell ablaufen, ist bei der oben genannten korrelativen Methode zwischen Lichtmikroskop und Elektronenmikroskop (CLEM) ein rascher Transfer des Probenträgers vom Lichtmikroskop in eine Kryopräparationsvorrichtung anzustreben.

Der Transfer eines Probenträgers von einem Lichtmikroskop in eine der oben genannten Kryopräparationsvorrichtungen ist jedoch mit erheblichem Zeitaufwand verbunden. Zu diesen Geräten gibt es auch keinen speziellen Transfer des Probenträgers vom Lichtmikroskop zur Kryopräparationsvorrichtung. Deshalb ist die Transferzeit bedingt durch das manuelle Aufnehmen des Probenträgers vom Lichtmikroskop, z.B. mittels einer Pinzette, für viele Untersuchungen zu lang.

Es ist daher eine Aufgabe der Erfindung, die Nachteile aus dem Stand der Technik zu beseitigen und einen schnellen Transfer des Probenträgers vom Lichtmikroskop zur Kryopräparationsvorrichtung einschließlich des Einfrierens der Probe zu ermöglichen.

Diese Aufgabe wird mit einer Halteeinrichtung wie eingangs genannt gelöst, welche erfindungsgemäß ein Rastelement aufweist, wobei das Rastelement in eine jeweils am Lichtmikroskop und an der Kryopräparationsvorrichtung angeordnete Rasteinrichtung lösbar einrastbar ist.

Weiters wird diese Aufgabe durch ein Verfahren wie eingangs genannt gelöst, welches erfindungsgemäß die folgenden Schritte umfasst:

- Befestigen des Probenträgers in einer Halteeinrichtung,
- lösbares Einrasten der Halteeinrichtung mit dem darin gehaltenen Probenträger mittels eines auf der Halteeinrichtung angeordneten Rastelements in einer ersten Rasteinrichtung des Lichtmikroskops und lichtmikroskopische Untersuchung einer auf dem Probenträger befindlichen Probe,
- Lösen der Halteeinrichtung mit dem darin gehaltenen Probenträger von der Rasteinrichtung des Lichtmikroskops und Transfer der Halteeinrichtung in die Kryopräparationsvorrichtung,
- lösbares Einrasten der Halteeinrichtung mit dem darin gehaltenen Probenträger mittels des auf der Halteeinrichtung angeordneten Rastelements in einer zweiten Rasteinrichtung der Kryopräparationsvorrichtung und Kryopräparieren der Probe.



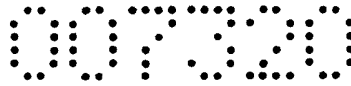
Dadurch, dass der Probenträger bereits während der lichtmikroskopischen Untersuchung in der Halteeinrichtung befestigt ist und damit das Aufnehmen des Probenträgers zwischen den beiden Beobachtungsmethoden entfällt, kann die Transferzeit dank der Erfindung deutlich verkürzt werden. Nach der lichtmikroskopischen Untersuchung kann der in der Halteeinrichtung befestigte Probenträger mit der Probe durch Lösen der Rastverbindung zwischen dem Rastelement und der Rasteinrichtung des Lichtmikroskops rasch entnommen, zügig transferiert, in der Rasteinrichtung der Kryopräparationsvorrichtung durch Einrasten der Halteeinrichtung fixiert und schließlich kryofixiert werden. Der Probenträger mit der Probe bleibt also die ganze Zeit in der Halteeinrichtung befestigt, beginnend mit der lichtmikroskopischen Untersuchung, während des Transfers vom Lichtmikroskop in die Kryopräparationsvorrichtung, bis hin zum Einfrieren im Kryogen. Dank der Erfindung ist es möglich, reproduzierbar im Lichtmikroskop und in der Kryopräparationsvorrichtung zu positionieren.

Die Transferzeit selbst kann sehr kurz gehalten werden und kann - in Abhängigkeit der Distanz des Lichtmikroskops von der Kryopräparationsvorrichtung - lediglich ein paar Sekunden betragen.

Der Begriff "Probenträger" bezieht sich auf alle für die Elektronenmikroskopie und für die elektronenmikroskopische Probenpräparation geeigneten Träger. Insbesondere bezieht sich der Begriff "Probenträger" auf die bereits oben erwähnten Grids ("Netzträger", "Netzchen", "Netz"), wobei die Grids verschiedenartig geformte Löcher (Waben, Schlitz etc.) oder ein Gitter definierter mesh-Zahl aufweisen und/oder mit einem Film beschichtet (z.B. beschichtete Grids der Firma Quantifoil) und/oder kohlebedampft sein können. Andere Träger, die ebenfalls bei der Kryo-Präparation elektronenmikroskopischer Proben eingesetzt werden, sind z.B. Saphirscheiben wie in der EP 1 267 164 B1 beschrieben.

Die Halteeinrichtung ist so ausgebildet, dass der üblicherweise sehr filigrane und kleine Probenträger, insbesondere ein Grid (Durchmesser 2-3 mm), sicher fixiert wird. Üblicherweise wird ein Grid in seinem Randbereich durch einen Pinzettengriff fixiert. Sehr vorteilhaft sind auch Grids mit Lasche. Diese spezielle Art von Probenträgern (auch als "Grid with Tab", "Tabbed Grid" oder "Handle Grid" bezeichnet) hat zusätzlich am äußeren Rand außerhalb des standardmäßigen Gridradius eine Lasche, an der man beispielsweise mit einer Pinzette angreifen kann.

Für eine leichte Handhabung der Halteeinrichtung, insbesondere während des Transfers, der üblicherweise manuell erfolgt, ist es von Vorteil, wenn die Halteeinrichtung im Wesentlichen



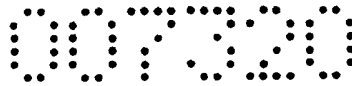
länglich ausgebildet ist. Zweckmäßigerweise ist die Halteeinrichtung pinzettenförmig ausgebildet.

Bei einer bevorzugten Variante hat das Rastelement einen ersten Bereich zum Fixieren der Halteeinrichtung in der jeweiligen Rasteinrichtung des Lichtmikroskops bzw. der Kryopräparationsvorrichtung und einen zweiten Bereich zum Einspannen z.B. einer Pinzette mit einer sehr feinen Spitze. Der Probenträger wird mittels der Pinzette gehalten. Die Pinzette kann bei Bedarf, z.B. bei Abnutzung der Pinzettenspitze, einfach getauscht werden. Obwohl die zuvor genannte Variante bevorzugt wird, kann die Halteeinrichtung auch einstückig ausgeführt sein.

Die Erfindung ist besonders zum Transfer und zur Kryopräparation von Proben mit Zellen, insbesondere einer Zellkultur, geeignet.

Für Proben, welche Zellkulturen umfassen, werden meist inverse Mikroskope verwendet. Der Probenträger befindet sich üblicherweise in einem durchsichtigen Kulturgefäß, z.B. einer Zellkulturschale oder Petrischale, mit einem Deckglas als Boden. Das Objektiv ist unterhalb des Deckglases bzw. des Kulturgefäßes angeordnet. Bedingt durch den Rand des Kulturgefäßes ragt die Halteeinrichtung nicht horizontal, sondern in einem Winkel in das Kulturgefäß hinein. Dies verursacht bei einem herkömmlichen Probenträger Probleme, da die Oberfläche des Probenträgers parallel und in Berührung zum Deckglas angeordnet sein soll. Es ist daher von besonderem Vorteil, wenn die Oberfläche des Probenträgers in einem Winkel zur im Wesentlich länglichen Halteeinrichtung ausrichtbar ist. Als besonders zweckmäßig für diese Ausführungsform hat sich die Verwendung eines Probenträgers mit Lasche, insbesondere eines Grids mit Lasche wie oben beschrieben, erwiesen. Diese Lasche kann entweder elastisch oder plastisch gebogen werden, so dass eine parallele Position nahezu der gesamten Gridoberfläche zum Deckglas erreicht werden kann. Nach der lichtmikroskopischen Untersuchung kann die Halteeinrichtung rasch vom Lichtmikroskop entfernt und in die Kryopräparationsvorrichtung transferiert werden. Nach dem Einfrieren kann die Lasche z.B. mittels Skalpell, Rasierklinge oder Mikroschere vom Grid entfernt und das Grid im gefrorenen Zustand in einem Probenhalter für die Elektronenmikroskopie montiert werden.

Um den Probenträger im Lichtmikroskop gezielt und kontrolliert an das Deckglas anzunähern, ist es von Vorteil, wenn die Halteeinrichtung zum Positionieren des Probenträgers mittels einer an der Rasteinrichtung des Lichtmikroskops angeordneten Justiereinrichtung in die gewünschte Position bewegt wird.



Wenn die Halteeinrichtung in der Kryopräparationsvorrichtung fixiert ist, dann ist es günstig, wenn die Halteeinrichtung drehbar um ihre Längsachse gelagert ist, um das Blotten von der gewünschten Seite des Netzes zu gestatten.

Damit die Halteeinrichtung rasch und mit wiederholbarer Genauigkeit mittels des Rastelements in der jeweiligen Rasteinrichtung befestigt und wieder entfernt werden kann, haben sich folgende Verschlussmechanismen in der Praxis als günstig erwiesen:

Bei einer ersten bevorzugten Variante wird das Rastelement mittels eines Kugelrast-Verschlusses in der Rasteinrichtung eingerastet. Bei einer Untervariante weist das Rastelement eine Rastnut auf, in welche ein in der jeweiligen Rasteinrichtung des Lichtmikroskops bzw. der Kryopräparationsvorrichtung angeordnetes, gefedertes Verschlussstück (Kugelrast) einrasten kann. Für die Ausgestaltung der Aufnahme gibt es viele Möglichkeiten, wie beispielsweise Schwalbenschwanz- oder T-Form. Als besonders vorteilhaft hat sich eine L-Form erwiesen, weil damit eine Montage in zwei Positionen ( $180^\circ$ -Symmetrie) vermieden werden kann und eine eindeutige Positionierung des Probenträgers ermöglicht wird. Die L-Form gestattet die Montage nur in einer Position. Dies hat den Vorteil, dass immer die richtige Position des Probenträgers eingehalten werden kann, da der Probenträger sowohl bei der lichtmikroskopischen Untersuchung als auch beim Blotten eine bestimmte Position einnehmen muss und nicht um  $180^\circ$  verdreht werden soll. Fehler können auf diesem Weg vermieden werden.

Bei einer weiteren vorteilhaften Variante kann das Rastelement mittels eines magnetischen Verschlusses in der Rasteinrichtung befestigt sein. Die Variante mit dem Kugelrast-Verschluss wird jedoch aufgrund der noch höheren Genauigkeit bevorzugt.

Im Folgenden wird die Erfindung samt weiteren Vorzügen anhand eines nicht einschränkenden Ausführungsbeispiels erläutert, das in den beigefügten Zeichnungen dargestellt ist. Die Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 eine perspektivische Ansicht einer Halteeinrichtung für einen elektronenmikroskopischen Probenträger, welche am Tisch eines Lichtmikroskops fixiert ist,

Fig. 2 eine Kryopräparationsvorrichtung in perspektivischer Ansicht mit in der Kryopräparationsvorrichtung fixierten Halteeinrichtung der Fig. 1,

Fig. 3A eine perspektivische Ansicht einer Halteeinrichtung gemäß der Erfindung,



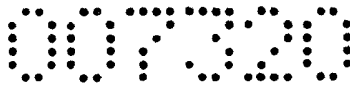
Fig. 3B eine perspektivische Ansicht der Rasteinrichtung, in welche die Halteeinrichtung der Fig. 3A nach dem Kugelrast-Prinzip einrastbar ist, und

Fig. 4 einen Schnitt durch die Halteeinrichtung der Fig. 3A und die Rasteinrichtung der Fig. 3B im eingerasteten Zustand.

Die Fig. 1 zeigt eine perspektivische Ansicht einer Halteanordnung 100 zum Halten und Untersuchen von für die Kryoelektronenmikroskopie bestimmten Proben in einem Lichtmikroskop. Im gezeigten Beispiel handelt es sich um eine Zellkulturprobe. Hierfür werden die Zellen in Gewebekulturbedingungen auf elektronenmikroskopischen Probenträgern unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wachsen als Monolayer auf den Probenträgern. Für die lichtmikroskopische Untersuchung wird ein Probenträger, im gezeigten Beispiel ein Grid 101, entnommen und in einer am Lichtmikroskop befestigbaren Halteeinrichtung 103 fixiert. Mit Hilfe der Halteeinrichtung 103 wird ein schneller Transfer des Grids 101 von dem Lichtmikroskop in eine Kryopräparationsvorrichtung (siehe Fig. 2) ermöglicht. Beim gezeigten Beispiel handelt es sich um ein inverses Lichtmikroskop.

Zur leichteren Handhabung ist die Halteeinrichtung 103 im Wesentlichen länglich ausgebildet. Die Halteeinrichtung 103 in diesem Ausführungsbeispiel ist zweiteilig ausgeführt und umfasst eine Pinzette 103a zum Fixieren des Grids 101 sowie ein Rastelement 103b, das einerseits die Pinzette 103a aufnimmt und andererseits die Halteeinrichtung 103 an einer Rasteinrichtung 104, welche am Tisch 108 des Lichtmikroskops angeordnet ist, fixiert. Ein Verschlussmechanismus zwischen dem Rastelement 103 und der Rasteinrichtung 104 nach dem Kugelrast-Prinzip ist weiter unten in den Fig. 3A, 3B und 4 näher dargestellt.

Wie in der Fig. 1 gezeigt, weist das Grid 101 auf seinem äußeren Rand außerhalb des standardmäßigen Gridradius eine Lasche 107 auf, an der die Pinzette 103a angreifen kann. Die Halteeinrichtung 103 wird nun so im Lichtmikroskop befestigt, dass die Pinzette 103a mit dem Grid 101 in eine auf dem Tisch 108 befindliche Zellkulturschale 102 hineinragt. Bedingt durch den Rand 106 der Zellkulturschale 102 ragt die Halteeinrichtung 103 nicht horizontal, sondern in einem Winkel  $\alpha$  (griechischer Buchstabe alpha) in die Zellkulturschale 102 hinein. Das Grid 101 liegt für die Untersuchung auf einem Deckglas 102a auf. Das Deckglas 102a bildet den Boden der Zellkulturschale 102. Zellkulturschalen dieser Art sind im Handel erhältlich (z.B. Fluorodish Cell Culture Dish 35 mm, Glas 23 mm Durchmesser, 0.17 mm Dicke von der Firma World Precision Instruments Inc.). Die Zellen auf dem Grid 101 sind dabei dem Deckglas zugewandt. Das Objektiv (nicht gezeigt) ist unterhalb des Deckglases 102a bzw. der Zellkulturschale 102 angeordnet. Um die für die lichtmikroskopische Untersuchung erforderliche parallele Position nahezu der gesamten Gridoberfläche zum Deckglas



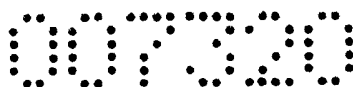
102a zu erreichen, wird die von der Pinzette 103a gehaltene Lasche 107 vorzugsweise elastisch in Bezug auf die Gridoberfläche verbogen. Für die lichtmikroskopische Untersuchung ist die Gridoberfläche folglich in einem Winkel zur Längsachse (L) der Halteeinrichtung 103 orientiert. Ein plastisches Verbiegen der Lasche 107 ist ebenso denkbar, allerdings wird ein elastisches Verbiegen bevorzugt, da die Oberfläche des Grids 101 für die anschließende Kryopräparation wieder im Wesentlichen parallel zur Längsachse (L) der Halteeinrichtung 103 orientiert sein sollte.

Um das Grid 101 im Lichtmikroskop gezielt und kontrolliert an das Deckglas 102a anzunähern und zu positionieren, können die Halteeinrichtung 103 und das darin befestigte Grid 101 mittels einer an der Rasteinrichtung 104 des Lichtmikroskops angeordneten Justiereinrichtung 105 bewegt und in die gewünschte Position gebracht werden.

Nach der lichtmikroskopischen Untersuchung, z.B. wenn ein gewünschter biologischer Zustand der Probe erreicht ist, kann die Halteeinrichtung rasch durch Lösen des Rastelements 103 von der Rasteinrichtung 104 vom Lichtmikroskop entfernt und in die Kryopräparationsvorrichtung transferiert und kryofixiert werden (detaillierte Beschreibung siehe Fig. 2). Nach dem Einfrieren wird die Lasche 107 mittels Skalpell, Rasierklinge oder Mikroschere vom Grid 101 entfernt und das Grid 101 samt der darauf befindlichen Probe im gefrorenen Zustand in einem Probenhalter für die Elektronenmikroskopie montiert.

Damit der Bediener das Grid 101 bequem außerhalb der Präparationskammer mit der Pinzette 103a erfassen kann, kann die Halteeinrichtung 103 manuell rasch und mit wiederholbarer Genauigkeit sowohl am Tisch 108 des Lichtmikroskops als auch in der Kryopräparationsvorrichtung befestigt und wieder entfernt werden. Ein geeigneter Verschlussmechanismus nach dem Kugelrast-Prinzip ist weiter unten in den Fig. 3A, 3B und 4 näher dargestellt. Die Pinzette 103a kann bei Bedarf ebenfalls einfach getauscht werden.

Die Fig. 2 zeigt eine perspektivische Ansicht einer automatisierten Kryopräparationsvorrichtung 200 zum Präparieren von Proben für ein Elektronenmikroskop. Die Vorrichtung 200 weist als wesentliche Komponenten eine klimatisierbare Präparationskammer 201 und eine Kühleinrichtung 202, in welcher sich ein Behältnis mit einem Kryogen befindet, auf. Im verschalteten Rückenteil 203 der Vorrichtung 200 sind diverse Schrittmotoren sowie eine Steuerung untergebracht, die hier nicht näher dargestellt sind. In der Fig. 2 befindet sich die Präparationskammer 201 in ihrer oberen Position, in welcher die Halteeinrichtung 103 mit dem darin befestigten Grid 101 mittels des Rastelements 103b in einer Rasteinrichtung 204 in der Kryopräparationsvorrichtung 200 fixiert werden kann. Der Mechanismus des Einrastens des Rastelements 103 in die Rasteinrichtung 204 ist derselbe wie jener für das Lichtmikro-



skop (siehe Fig. 1). Nach dem Fixieren des Halteelements 103 wird die Präparationskammer 201 mit Hilfe eines Schrittmotors nach unten zur Kühleinrichtung 202 bewegt. Die Halteeinrichtung 103 mit der Probe befindet sich nunmehr in der Präparationskammer 201. Überschüssige Probenflüssigkeit kann – wie zuvor bereits beschrieben – durch Blotten mit Filterpapier von der Gridoberfläche entfernt werden. Die Halteeinrichtung 103 ist um  $180^\circ$  in beide Richtungen um ihre Längsachse  $L'$  drehbar, um das Blotten von beiden Seiten zu gestatten. Nach dem Blotting-Vorgang wird das Grid 101 sehr schnell durch vertikales Bewegen der Halteeinrichtung 103 nach unten in den unter der Präparationskammer 201 befindlichen Kryogenbehälter (nicht dargestellt) der Kühleinrichtung 202 abgesenkt, wodurch die auf dem Grid 101 befindliche biologische Probe (Zellen) vitrifiziert wird.

Nach dem Einfrieren wird das Grid mit der gefrorenen Probe zum Mikroskopieren im Elektronenmikroskop aus der Halteeinrichtung 103 gelöst. Das Behältnis mit dem Kryogen ist aus der Vorrichtung 200 entfernbar, um die vitrifizierte Probe in eine Probenhalterung für ein Kryo-Elektronenmikroskop einsetzen zu können. Nach dem Einfrieren wird die Halteeinrichtung bis knapp oberhalb des Kryogenbehälters angehoben. In diesem Bereich beträgt die Gastemperatur etwa  $-160^\circ\text{C}$ . Manuell wird die Haltevorrichtung 103 aus dem Rastmechanismus entfernt und das Grid 101 in einen Transferbehälter, der sich, mittels flüssigem Stickstoff gekühlt, vorzugsweise neben dem Kryogenbehälter befindet, abgelegt. Dieser Transferbehälter wiederum wird zu einer Ladestation für Kryoelektronenmikroskophalter (Firma Gatan: [www.gatan.com](http://www.gatan.com)) transportiert.

Die Fig. 3A zeigt eine perspektivische Ansicht der Halteeinrichtung 103. Die Halteeinrichtung 103 ist, wie oben bereits ausgeführt, zweiteilig aufgebaut und umfasst eine Pinzette 103a zum Fixieren des Grids 101 (mit Lasche 107) sowie ein Rastelement 103b, das einerseits die Pinzette 103a aufnimmt und andererseits in einer Rasteinrichtung 104 des Lichtmikroskops sowie in einer Rasteinrichtung 204 der Kryopräparationsvorrichtung 200 einrastbar ist. Die Rasteinrichtung 104 ist in der Fig. 3B dargestellt; die Rasteinrichtung 204 der Kryopräparationseinrichtung ist gleichartig gestaltet.

Die Montage der Halteeinrichtung 103 in die Rasteinrichtung erfolgt durch horizontales Einschieben des Rastelements 103b der Halteeinrichtung 103 in die Rasteinrichtung 104 (Montagerichtung durch den Pfeil 109 dargestellt). In der Fig. 3A ist an der Oberseite des Rastelements 103b eine geneigte Ebene 110 (z.B. um  $45^\circ$  abgeschrägt) zu sehen, welche eine V-förmige Rastnut 111 aufweist. Die Rastnut 111 dient als Rastung für ein in der Rasteinrichtung 104 angeordnetes, gefedertes Verschlussstück 112 (Kugelrast 112). Dies ist in der Fig. 4 veranschaulicht, welche die Halteeinrichtung 103 der Fig. 3A und die Rasteinrichtung 104 im eingerasteten Zustand zeigt. Die Kugelrast 112 befindet sich in der Rastnut 111.



Für die Ausgestaltung der Aufnahme 113 gibt es viele Möglichkeiten, wie beispielsweise Schwalbenschwanz- oder T-Form. Im gezeigten Beispiel wurde eine L-Form 114 gewählt, um eine Montage in zwei Positionen ( $180^\circ$ -Symmetrie) zu vermeiden und eine eindeutige Positionierung des Grids 101 zu ermöglichen. Die L-Form 114 gestattet die Montage nur in einer Position. Die L-Form 114 hat den Vorteil, dass immer die richtige Position des Grids 101 eingehalten werden kann, da das Grid 101 sowohl bei der lichtmikroskopischen Untersuchung als auch beim Blotten eine bestimmte Position einnehmen muss und nicht um  $180^\circ$  verdreht werden soll. Fehler können auf diesem Weg vermieden werden.

Anstelle der gefederten Kugelrast kann als Verschlussstück 112 auch ein magnetischer Verschluss verwendet werden.

Die oben beschriebene Verwirklichung ist nur ein Beispiel unter vielen und folglich nicht als einschränkend zu betrachten.

Wien, den **22. Juli 2009**



### ANSPRÜCHE

1. Halteeinrichtung (103) zum Halten eines elektronenmikroskopischen Probenträgers (101) und zum Transfer des Probenträgers (101) von einem Lichtmikroskop in eine Kryopräparationsvorrichtung (200) zum Kryo-Präparieren von Proben für ein Elektronenmikroskop,

**dadurch gekennzeichnet, dass**

die Halteeinrichtung (103) ein Rastelement (103b) aufweist, wobei das Rastelement (103b) in eine jeweils am Lichtmikroskop und an der Kryopräparationsvorrichtung (200) angeordnete Rasteinrichtung (104,204) lösbar einrastbar ist.

2. Halteeinrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Halteeinrichtung (103) im Wesentlichen länglich ausgebildet ist.

3. Halteeinrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche des Probenträgers (101) in einem Winkel zur im Wesentlich länglichen Halteeinrichtung (103) ausrichtbar ist.

4. Halteeinrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Halteeinrichtung (103) zum Halten eines Probenträgers mit Lasche (107) eingerichtet ist.

5. Halteeinrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Halteeinrichtung (103) in der Kryopräparationsvorrichtung (200) drehbar um eine Längsachse (L') gelagert ist.

6. Halteeinrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Rastelement (103b) mittels eines Kugelrast-Verschlusses (111,112) in der Rasteinrichtung (104,204) einrastbar ist.

7. Halteeinrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Rastelement mittels eines magnetischen Verschlusses in der Rasteinrichtung einrastbar ist.

8. Verfahren zum Transfer eines elektronenmikroskopischen Probenträgers (101) von einem Lichtmikroskop in eine Kryopräparationsvorrichtung (200) zum Kryo-Präparieren von Proben für ein Elektronenmikroskop, **gekennzeichnet durch die Schritte:**

- Befestigen des Probenträgers (101) in einer Halteeinrichtung (103),
- lösbares Einrasten der Halteeinrichtung (103) mit dem darin gehaltenen Probenträger (101) mittels eines auf der Halteeinrichtung (103) angeordneten Rastelements (103b) in einer ersten Rasteinrichtung (104) des Lichtmikroskops und lichtmikroskopische Untersuchung einer auf dem Probenträger (101) befindlichen Probe,
- Lösen der Halteeinrichtung (103) mit dem darin gehaltenen Probenträger (101) von der Rasteinrichtung (104) des Lichtmikroskops und Transfer der Halteeinrichtung (103) in die Kryopräparationsvorrichtung (200),
- lösbares Einrasten der Halteeinrichtung (103) mit dem darin gehaltenen Probenträger (101) mittels des auf der Halteeinrichtung (103) angeordneten Rastelements (103b) in einer zweiten Rasteinrichtung (204) der Kryopräparationsvorrichtung (200) und Kryopräparieren der Probe.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass als Probenträger (101) ein Probenträger mit Lasche (107) verwendet wird.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Halteeinrichtung (103) zum Positionieren des Probenträgers (101) mittels einer an der Rasteinrichtung (104) des Lichtmikroskops angeordneten Justiereinrichtung (105) bewegt wird.

11. Verwendung einer Halteeinrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zum Transfer und zur Kryopräparation von Proben mit Zellen, insbesondere einer Zellkultur.

Wien, den **22 Juli 2009**

007320

(A)

1/3

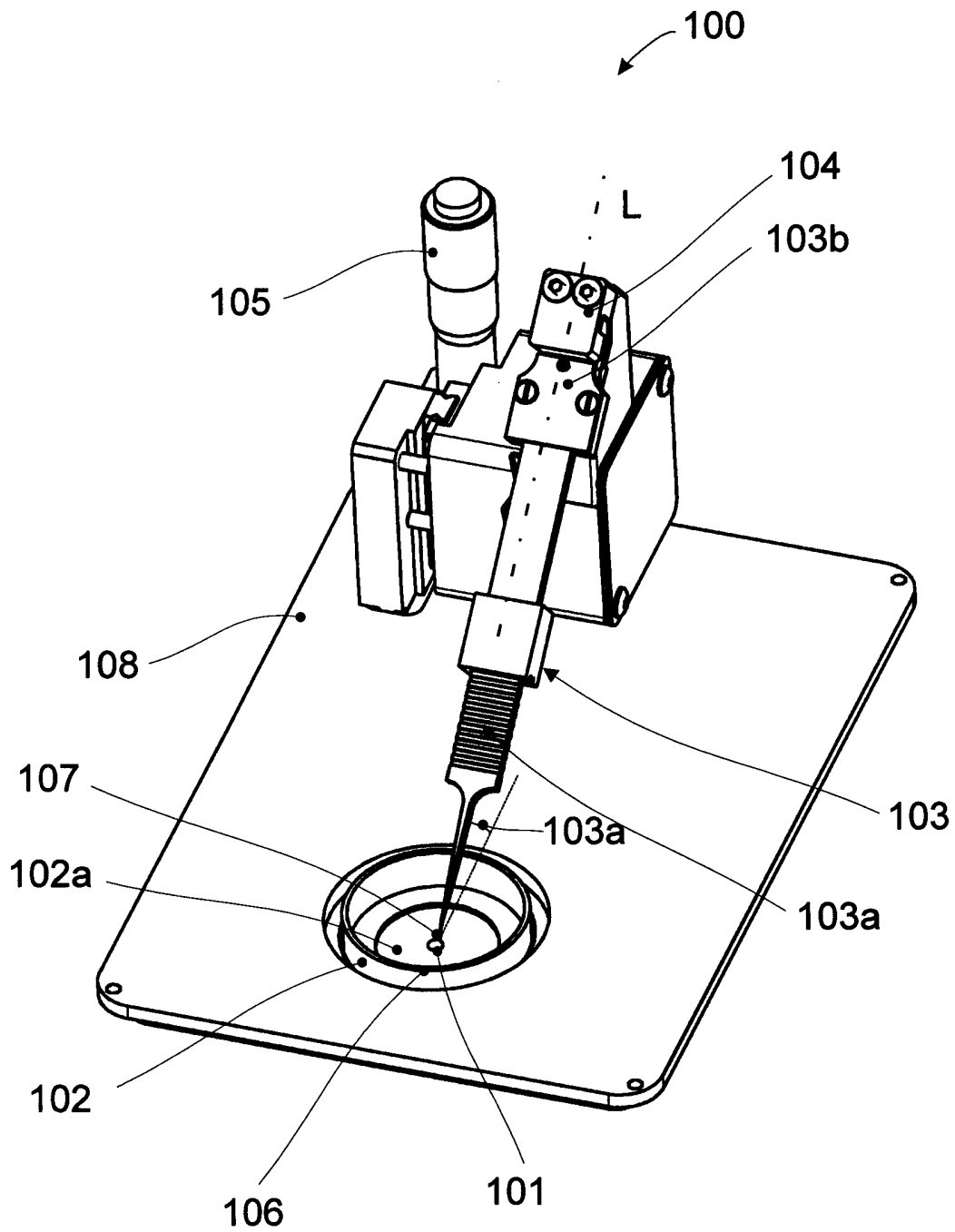


Fig. 1

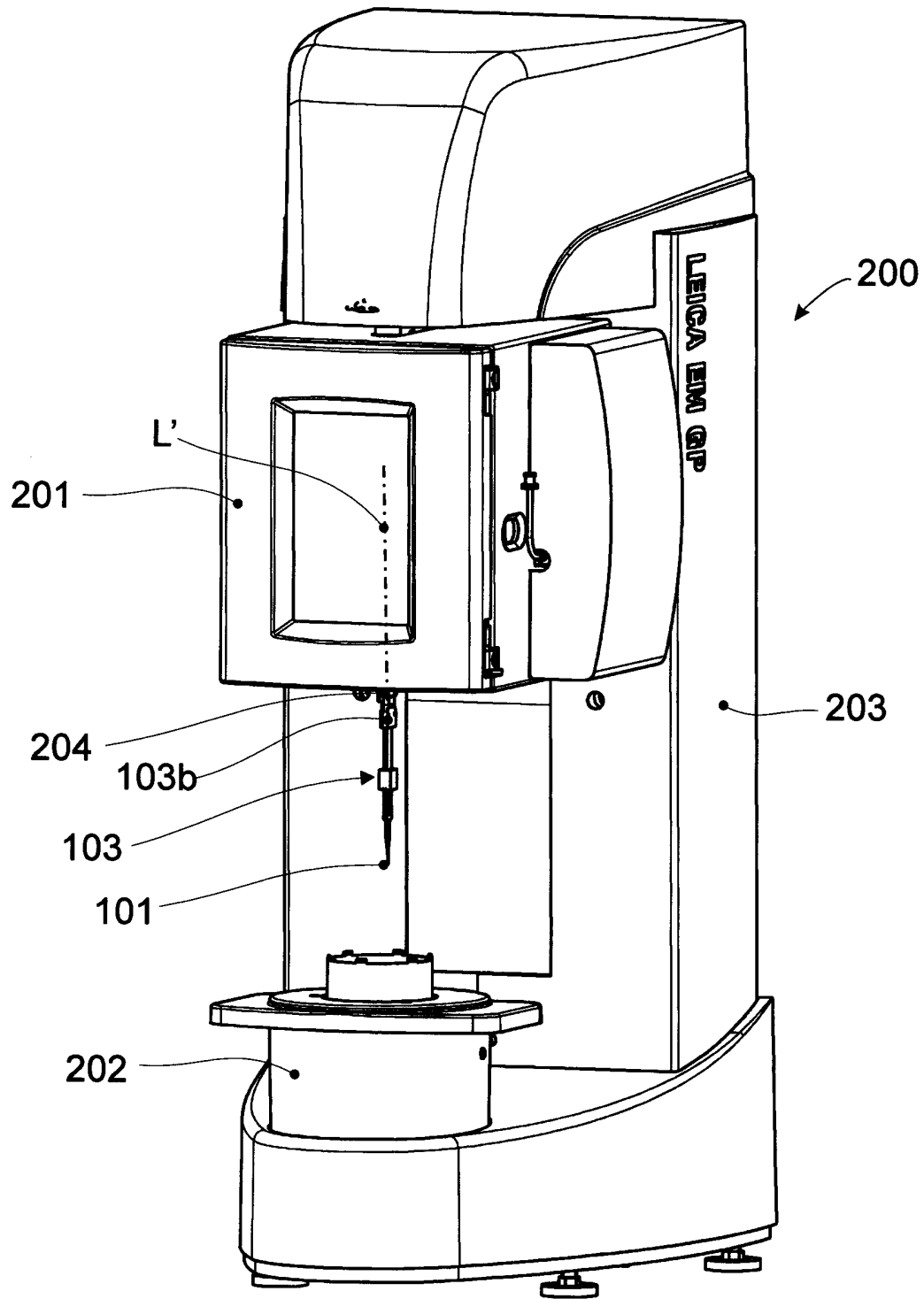
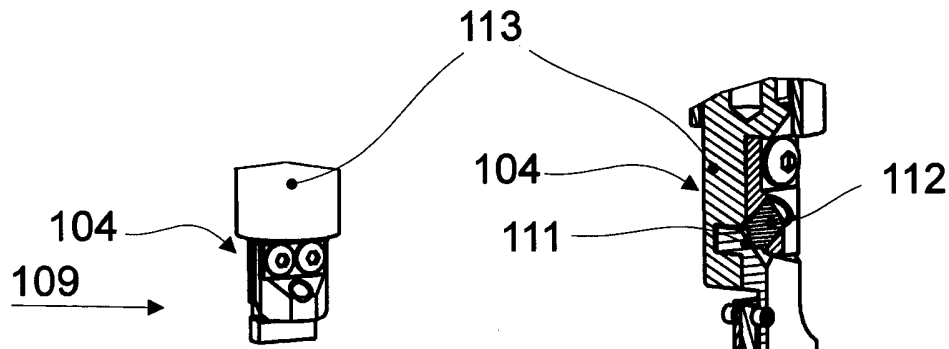
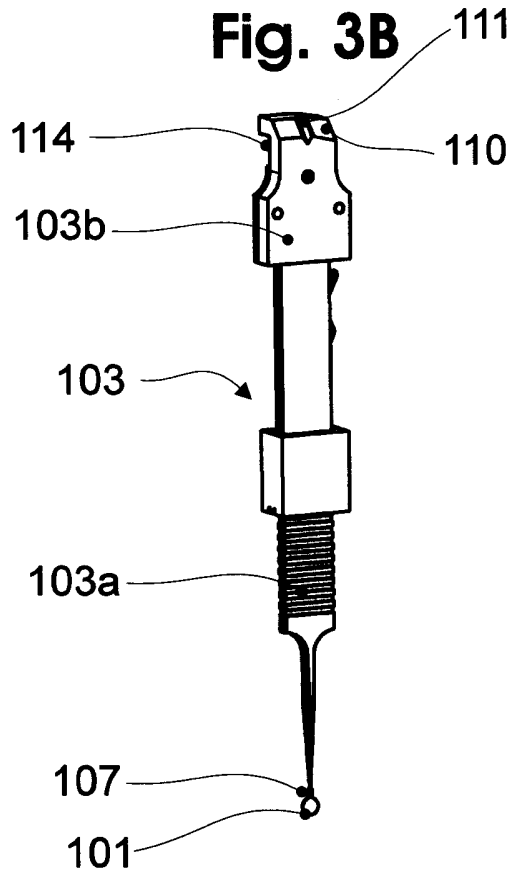


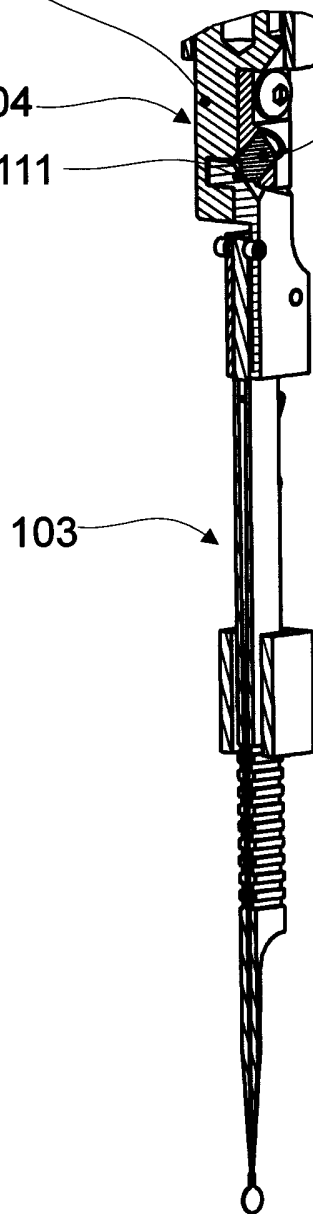
Fig. 2



**Fig. 3B**



**Fig. 3A**



**Fig. 4**

## ANSPRÜCHE

1. Halteeinrichtung (103) zum Halten eines elektronenmikroskopischen Probenträgers (101) und zum Transfer des Probenträgers (101) von einem Lichtmikroskop in eine Kryopräparationsvorrichtung (200) zum Kryo-Präparieren von Proben für ein Elektronenmikroskop,

**dadurch gekennzeichnet, dass**

die Halteeinrichtung (103) ein Rastelement (103b) aufweist, wobei das Rastelement (103b) in eine jeweils am Lichtmikroskop und an der Kryopräparationsvorrichtung (200) angeordnete Rasteinrichtung (104,204) lösbar einrastbar ist.

2. Halteeinrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Halteeinrichtung (103) im Wesentlichen länglich ausgebildet ist.

3. Halteeinrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche des Probenträgers (101) in einem Winkel zu einer Längsachse (L) der im Wesentlichen länglichen Halteeinrichtung (103) ausrichtbar ist.

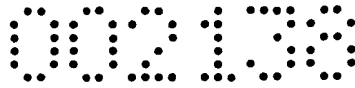
4. Halteeinrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Halteeinrichtung (103) in der Kryopräparationsvorrichtung (200) drehbar um eine Längsachse (L') gelagert ist.

5. Halteeinrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Rastelement (103b) mittels eines Kugelrast-Verschlusses (111,112) in der Rasteinrichtung (104,204) einrastbar ist.

6. Halteeinrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Rastelement mittels eines magnetischen Verschlusses in der Rasteinrichtung einrastbar ist.

7. Verfahren zum Transfer eines elektronenmikroskopischen Probenträgers (101) von einem Lichtmikroskop in eine Kryopräparationsvorrichtung (200) zum Kryo-Präparieren von Proben für ein Elektronenmikroskop mittels einer Halteeinrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **gekennzeichnet durch die Schritte:**

- Befestigen des Probenträgers (101) in einer Halteeinrichtung (103),



- 2 -

- lösbares Einrasten der Halteeinrichtung (103) mit dem darin gehaltenen Probenträger (101) mittels eines auf der Halteeinrichtung (103) angeordneten Rastelements (103b) in einer ersten Rasteinrichtung (104) des Lichtmikroskops und lichtmikroskopische Untersuchung einer auf dem Probenträger (101) befindlichen Probe,
  - Lösen der Halteeinrichtung (103) mit dem darin gehaltenen Probenträger (101) von der Rasteinrichtung (104) des Lichtmikroskops und Transfer der Halteeinrichtung (103) in die Kryopräparationsvorrichtung (200),
  - lösbares Einrasten der Halteeinrichtung (103) mit dem darin gehaltenen Probenträger (101) mittels des auf der Halteeinrichtung (103) angeordneten Rastelements (103b) in einer zweiten Rasteinrichtung (204) der Kryopräparationsvorrichtung (200) und Kryopräparieren der Probe.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Probenträger (101) ein Probenträger mit Lasche (107) verwendet wird.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Halteeinrichtung (103) zum Positionieren des Probenträgers (101) mittels einer an der Rasteinrichtung (104) des Lichtmikroskops angeordneten Justiereinrichtung (105) bewegt wird.
10. Verwendung einer Halteeinrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zum Transfer und zur Kryopräparation von Proben mit Zellen, insbesondere einer Zellkultur.