

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 026 360**

(51) Int. Cl.:
G01N 1/28
(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2017 PCT/EP2017/069240**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.02.2018 WO18020036**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2017 E 17745722 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2025 EP 3491360**

(54) Título: **Microscopía electrónica**

(30) Prioridad:

29.07.2016 GB 201613173

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.06.2025

(73) Titular/es:

**UNITED KINGDOM RESEARCH AND INNOVATION (100.00%)
Polaris House North Star Avenue
Swindon SN2 1FL, GB**

(72) Inventor/es:

**LAMERS, MEINDERT, HUGO;
FERNANDEZ-LEIRO, RAFAEL y
FIRMAN, JOSHUA**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 3 026 360 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Microscopía electrónica

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un aparato de preparación de muestras para microscopía electrónica; y a un procedimiento para la preparación de una muestra para microscopía electrónica.

10 Antecedentes

Las técnicas de microscopía pueden usarse para obtener una imagen de un espécimen. Las técnicas de microscopía incluyen la microscopía electrónica. Según estas técnicas, un haz de electrones es usado para "iluminar" un espécimen. La presencia del espécimen en el haz de electrones conduce a cambios en este haz. Los cambios del haz generados por la muestra pueden ser examinados para crear una imagen ampliada del espécimen.

Para obtener con éxito una imagen, un espécimen tiene que ser preparado adecuadamente para obtener la imagen. Una preparación exitosa y reproducible de una muestra o de un espécimen puede ser la llave para obtener resultados útiles a partir de técnicas de microscopía. Hay que tener en cuenta que una preparación incorrecta o no exitosa de un espécimen para el examen puede conducir a un deterioro del espécimen, o a resultados malos y/o no reproducibles.

Se pretende proporcionar un aparato y procedimiento para el uso en la preparación de muestras para microscopía, que pueden referirse a algunas técnicas conocidas de preparación.

25 El documento EP 3 260 839 A1 divulga un procedimiento y un aparato para la preparación de una muestra para experimentos para la obtención de imágenes o de difracción en condiciones criogénicas, comprendiendo las etapas de la aplicación de una muestra en una película en un soporte, en particular una rejilla que comprende una película de este tipo en un soporte, o eliminándose un medio residual, normalmente un líquido, de una muestra incubada en una película en un soporte y vitrificándose la muestra.

30 El documento US 2015/090878 A1 divulga un procedimiento para la preparación de una muestra para un microscopio para partículas cargadas.

35 El documento US 2015/221470 A1 divulga un aparato de haz de partículas cargadas con la función de permitir la observación de una muestra en una atmósfera de gas o en un estado líquido.

40 El documento GB 2 461 708 A divulga un portamuestras para el uso en un procedimiento de análisis que usa radiación de alta energía, como radiación de rayos X o radiación de electrones, que incluye un marco 4 con una ventana 6 y una membrana que se extiende en la ventana y tiene una superficie para portar una muestra.

45 El documento US 2007/145268 A1 divulga una placa de control de líquido ultrafina y una combinación de un elemento en forma de caja, incluyendo la placa de control un elemento en forma de placa con al menos un agujero para ver.

Resumen

45 Un primer aspecto de la invención proporciona un aparato de preparación de muestras para microscopía electrónica como se indica en la reivindicación 1.

50 El aparato y el procedimiento descritos pueden ser útiles en relación con varios procedimientos para la preparación de muestras para microscopía, aunque pueden ser especialmente relevantes en relación con la microscopía electrónica, en particular la criomicroscopía electrónica o crio-EM, en la que se usa la microscopía electrónica de transmisión para estudiar espécímenes a temperaturas criogénicas. Las técnicas de criomicroscopía electrónica puede ser especialmente útil al estudiar espécímenes biológicos vitrificados, hidratados. La importancia de técnicas de preparación reproducibles y fiables puede ser especialmente importante para los usuarios de la criomicroscopía electrónica, ya que una muestra puede ser preparada semanas antes de un horario programado para usar un microscopio electrónico y, si las muestras preparadas no pueden ser utilizadas, puede haberse perdido tiempo para la preparación de otras muestras (que posiblemente tampoco pueden usarse) y esperar otro horario programado para usar el microscopio electrónico.

60 El primer aspecto puede proporcionar un aparato de preparación de muestras para microscopía electrónica. El aparato de preparación de muestras para microscopía electrónica puede comprender un aparato de preparación de muestras para la criomicroscopía electrónica. Dicho aparato puede comprender un aparato independiente o puede formar parte de una máquina de preparación más grande.

65 El aparato del primer aspecto puede comprender: un portasorte configurado para recibir un soporte de muestra para

microscopía electrónica. El soporte de muestra para microscopía electrónica puede estar configurado para recibir una muestra de fluido. La muestra de fluido puede comprender una solución que contiene un espécimen biológico. El soporte de muestra puede comprender una rejilla de soporte de muestra para microscopía electrónica.

5 El aparato puede comprender una salida de gas configurada para dirigir un flujo de gas hacia una superficie del soporte de muestra para microscopía electrónica para ajustar el fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica. El gas puede comprender aire comprimido, nitrógeno u otro gas inerte similar, que no interactúa negativamente con el espécimen en el fluido. En algunas realizaciones, la configuración de la salida de gas puede elegirse en función de las propiedades deseadas del flujo de gas dirigible resultante. En algunas realizaciones, el caudal de gas puede ser ajustable, pudiendo iniciarse y detenerse el flujo de gas de forma apropiada. En algunas realizaciones, el caudal de gas puede ser ajustado durante el flujo de gas, es decir, mientras el gas fluye desde la salida. El flujo de gas puede ser esencialmente laminar. La salida puede estar dispuesta o configurada de tal modo que el flujo de gas resultante es esencialmente uniforme a lo largo de la anchura del soporte de muestra, cuando el soporte de muestra está en su lugar dentro del portasorte de muestra.

10 15 El primer aspecto reconoce que el uso de un flujo de gas para ajustar una muestra de fluido colocada en un soporte de muestra puede permitir una preparación de muestra reproducible. Además, el uso de un flujo de gas para ajustar una muestra de fluido colocada en un soporte de muestra puede permitir un ajuste fino de los parámetros del flujo de gas y, por lo tanto, un ajuste fino de varias propiedades de una muestra proporcionada en el soporte de muestra.

20 25 30 Un flujo de gas que es esencialmente paralelo a la superficie de soporte puede actuar para crear un gradiente dentro del fluido en la superficie de soporte. En algunas realizaciones, la salida de gas está configurada de tal manera que el flujo de gas puede dirigirse hacia la superficie en un ángulo de incidencia elegido de tal manera que el flujo de gas puede crear un gradiente dentro del fluido en la superficie de soporte. La creación de un gradiente puede permitir un espesor óptimo de fluido para la obtención de una imagen mediante microscopía electrónica en algún punto en la superficie de soporte. Este espesor óptimo puede presentarse en una pluralidad de posiciones en la superficie de soporte. Si el soporte es, por ejemplo, una rejilla, este espesor óptimo puede presentarse en una pluralidad de cuadrículas de la rejilla que se presentan en la superficie de soporte de la muestra. El espesor óptimo puede depender del espécimen del que hay que obtener una imagen mediante microscopía electrónica y que está suspendida dentro del fluido colocado en el soporte de muestra.

35 40 45 En algunas realizaciones, la salida de gas está configurada de tal manera que el flujo de gas puede dirigirse hacia la superficie, por lo que resulta un flujo de gas que es esencialmente perpendicular a la superficie. En algunas realizaciones, la salida de gas está configurada de tal manera que el flujo de gas resultante va dirigido hacia la superficie en un ángulo de incidencia elegido de tal manera que una sección transversal del flujo de gas está configurada para pasar de manera esencialmente uniforme en el área superficial de la superficie del soporte de muestra para microscopía electrónica. Estos flujos de gas pueden provocar una evaporación homogénea en el área superficial del soporte de muestra. Algunas realizaciones reconocen que, si la dirección del flujo de gas es esencialmente perpendicular a la superficie del soporte de muestra, puede ser posible evitar la creación de un gradiente de fluido en el soporte de muestra y conseguir una muestra más uniforme para la obtención posterior de la imagen.

50 55 60 Un flujo de gas esencialmente perpendicular también puede usarse, por ejemplo, en algunas realizaciones para esparcir una "gota" del fluido de muestra en un soporte de muestra. En algunas realizaciones, la salida de gas está configurada de tal manera que el flujo de gas puede dirigirse hacia la superficie en un ángulo de incidencia elegido de tal manera que el flujo de gas puede esparcir una "gota" del fluido de muestra en un soporte de muestra.

65 Se apreciará que puede utilizarse un flujo de gas perpendicular, paralelo y/o transversal elegido adecuadamente con un ángulo de incidencia, área de sección transversal y/o caudal elegidos adecuadamente, con un gas apropiado, para implementar varias acciones en relación con la preparación de una muestra. En particular, puede utilizarse un flujo de gas para ajustar el fluido proporcionado en el soporte de muestra. Este ajuste puede comprender uno o más de los siguientes procesos: eliminar el exceso de fluido, esparcir el fluido, evaporar fluido del soporte de muestra, enfriar un fluido de muestra y/o vitrificar un fluido de muestra. En algunas realizaciones, el mismo flujo de gas puede utilizarse para realizar más de una acción o ajuste. En algunas realizaciones, pueden cambiarse una o más propiedades físicas del flujo de gas para las diversas acciones. Pueden cambiarse apropiadamente, por ejemplo, el caudal del gas, la humedad, la temperatura, el ángulo de incidencia y/o propiedades similares del flujo de gas.

65 En algunas realizaciones, un flujo de gas puede utilizarse para enfriar, enfriar criogénicamente o vitrificar una muestra de fluido en soporte de muestra. En algunas realizaciones, el enfriamiento criogénico puede comprender enfriar la muestra de fluido y el soporte de muestra a aproximadamente -175 grados centígrados. Si el "frente de flujo" de un flujo de gas está configurado para impactar en una superficie del soporte de muestra de manera homogénea y uniforme y pareja, este enfriamiento o esta vitrificación, puede estar configurada de tal manera que se consigue un enfriamiento homogéneo, un enfriamiento criogénico o una vitrificación en el soporte de muestra. "Enfriamiento uniforme" significa en este contexto que el proceso de enfriamiento puede ser tal que no se induzcan diferencias de temperatura significativas por la aplicación del flujo de gas entre áreas de fluido en el soporte. Las diferencias de temperatura

pueden perjudicar físicamente la muestra de fluido en el soporte y causar problemas en la obtención posterior de la imagen.

- Por consiguiente, algunas disposiciones de aparatos pueden comprender una salida de gas en una posición fija, mientras que otras disposiciones pueden prever una salida de gas móvil. En algunas realizaciones, el ángulo de incidencia del flujo de gas puede ser ajustable durante la aplicación de un flujo de gas a un soporte de muestra. En algunas realizaciones, un ángulo de incidencia puede utilizarse para realizar la eliminación del exceso de fluido y la evaporación del fluido de muestra del soporte de muestra. En otras palabras, puede utilizarse el mismo ángulo de incidencia del flujo de gas para realizar ambas acciones. Otras propiedades físicas del flujo de gas pueden ser ajustadas o permanecer iguales. En algunas realizaciones, un ángulo de incidencia puede utilizarse para realizar la eliminación del exceso de fluido y otro ángulo de incidencia puede utilizarse para la evaporación del fluido de muestra del soporte de muestra. En algunas realizaciones, el ángulo de incidencia del flujo de gas puede ser ajustable entre aplicaciones de un flujo de gas a un soporte de muestra.
- Como se ha descrito anteriormente, el flujo de gas puede utilizarse según varias realizaciones para conseguir una serie de ajustes en el fluido colocado en un soporte de muestra. En algunas realizaciones, el ajuste conseguido puede depender de la naturaleza del flujo de gas. Por ejemplo, la dirección de aplicación del flujo de gas, el área de la sección transversal del flujo de gas, el gas utilizado para el flujo de gas, la humedad del flujo de gas, la temperatura del flujo de gas y otras propiedades físicas y características similares del flujo de gas. Las propiedades del flujo de gas pueden depender de la configuración de la salida de gas. La salida de gas puede comprender una boquilla adaptada para crear un flujo de gas con unas características físicas particulares. En algunas realizaciones, ajustar la muestra de fluido portada por el soporte de muestra para microscopía electrónica comprende eliminar el exceso de fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica. En algunas realizaciones, ajustar la muestra de fluido portada por el soporte de muestra para microscopía electrónica comprende enfriar la muestra de fluido portada por el soporte de muestra para microscopía electrónica. En algunas realizaciones, ajustar la muestra de fluido portada por el soporte de muestra para microscopía electrónica comprende provocar el enfriamiento criogénico de la muestra de fluido portada por el soporte de muestra para microscopía electrónica. En algunas realizaciones, ajustar la muestra de fluido portada por el soporte de muestra para microscopía electrónica comprende vitrificar la muestra de fluido portada por el soporte de muestra para microscopía electrónica.
- En algunas realizaciones, el aparato comprende: una salida de gas configurada para dirigir un flujo de gas de forma esencialmente simétrica hacia una superficie del soporte de muestra para microscopía electrónica para ajustar el fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica. Una disposición de este tipo puede garantizar que un soporte de muestra no se deforme ni se deteriore físicamente de otro modo al ser aplicado el flujo de gas al soporte de muestra. En algunas realizaciones, una única salida de gas puede ser utilizada para crear un flujo de gas dirigido hacia solo una superficie del soporte de muestra y ajustar el fluido en el soporte de muestra desde solo un lado o superficie del mismo.
- En algunas realizaciones, el aparato comprende: al menos una salida de gas configurada para dirigir el flujo de gas de forma esencialmente simétrica hacia superficies opuestas del soporte de muestra para microscopía electrónica para ajustar la muestra de fluido portada por el soporte de muestra para microscopía electrónica. En algunas realizaciones, el aparato comprende: al menos dos salidas de gas configuradas para dirigir el flujo de gas de forma esencialmente simétrica y simultánea hacia superficies opuestas del soporte de muestra para microscopía electrónica para ajustar el fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica. En algunas realizaciones, el aparato comprende: dos salidas de gas configuradas para dirigir un flujo de gas de forma esencialmente simétrica y simultánea hacia superficies opuestas del soporte de muestra para microscopía electrónica para ajustar el fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica.
- Varias disposiciones simétricas como las anteriormente descritas pueden ayudar a garantizar que un soporte de muestra no se deforme ni se deteriore físicamente de otro modo al ser aplicado el flujo de gas al soporte de muestra.
- En algunas realizaciones, el aparato comprende: un humidificador de gas configurado para ajustar la humedad del flujo de gas. Por consiguiente, la humedad del flujo de gas puede tener un impacto en la tasa de evaporación inducida por un flujo de gas en un fluido portado por un soporte de muestra. En algunas realizaciones, el aparato puede comprender un dispositivo regulador de temperatura configurado para controlar o ajustar la temperatura del flujo de gas. En algunas realizaciones, el aparato puede comprender además una carcasa. La temperatura dentro de dicha carcasa puede ser monitoreada y controlable para controlar la evaporación de un fluido desde un soporte de muestra.
- En algunas realizaciones, el aparato comprende: una fuente de fluido configurada para introducir la muestra de fluido en el soporte de muestra. En algunas realizaciones, puede introducirse manualmente un fluido en un soporte de muestra sujetado en el portasoporte de muestra. En otras realizaciones, puede estar previsto un dispensador, por ejemplo un brazo dispensador robótico, configurado de tal manera que puede introducir un fluido en un soporte de muestra sujetado en el portasoporte de muestra. El hecho de prever un dispensador de fluido puede permitir una automatización más completa de la preparación de muestras para microscopía electrónica y puede resultar en muestras para microscopía electrónica más reproducibles y/o en el uso de menos fluido de muestra. Cuando un

especímen puede ser limitado, puede ser ventajoso utilizar menos líquido de muestra al preparar muestras para microscopía electrónica.

- 5 En algunas realizaciones, el aparato comprende: un dispositivo de enfriamiento, enfriamiento criogénico y/o vitrificación. Este dispositivo puede estar configurado para enfriar, enfriar criogénicamente y/o vitrificar un fluido de muestra en el soporte de muestra. El dispositivo puede estar configurado para recibir el soporte de muestra y el fluido de muestra y enfriar, enfriar criogénicamente y/o vitrificar el fluido en el soporte de muestra. Por consiguiente, el aparato puede incluir un medio para vitrificar el fluido de muestra antes de almacenarse los soportes de muestra antes de la obtención final de la imagen. En algunas realizaciones, el dispositivo de enfriamiento comprende: un baño de etano líquido configurado para recibir el soporte de muestra. En algunas realizaciones, el aparato comprende: una salida de gas configurada para dirigir un flujo de gas de enfriamiento, enfriamiento criogénico o vitrificación hacia una superficie del soporte de muestra para microscopía electrónica para enfriar, enfriar criogénicamente y/o vitrificar el fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica. Por consiguiente, puede utilizarse nitrógeno líquido o similar para crear un flujo de gas nitrógeno para enfriar. En algunas realizaciones, la salida de gas y la salida de gas de enfriamiento comprenden la misma salida de gas. Por consiguiente, la fuente de gas puede cambiar entre la creación de un flujo de gas para ajustar la posición de un fluido en el soporte de muestra y la creación de un flujo de gas para enfriar o vitrificar un fluido en el soporte de muestra.
- 10
- 15
- 20 En algunas realizaciones, el aparato comprende: un aparato para la obtención de imágenes configurado para obtener imágenes del soporte de muestra para microscopía electrónica en el portamuestras. Este aparato para la obtención de imágenes puede comprender un aparato para la obtención de imágenes visuales en tiempo real. El hecho de prever un aparato para la obtención de imágenes de este tipo puede permitir monitorizar y ajustar en tiempo real el proceso de preparación de muestras.
- 25 En una realización, la muestra de fluido comprende una pluralidad de especímenes suspendidos en un fluido. Por consiguiente, la muestra de fluido puede presentar uno o más especímenes o muestras individuales como, por ejemplo, una o más macromoléculas suspendidas o contenidas en un fluido.
- 30 En una realización, la pluralidad de especímenes presenta una concentración de especímenes por unidad de volumen dentro del fluido. Por consiguiente, los especímenes pueden proporcionarse con una concentración o densidad determinada en el fluido. Por ejemplo, puede proporcionarse un número determinado de especímenes por unidad de volumen del fluido.
- 35 En una realización, la concentración de especímenes proporciona un número determinado de especímenes en cada apertura para obtener una imagen del soporte de muestra. Por consiguiente, la densidad o concentración de los especímenes en el fluido puede seleccionarse para obtener un número de especímenes en cada apertura en el soporte de muestra. La densidad puede seleccionarse por ejemplo para que haya menos de cinco especímenes en cada apertura para obtener una imagen.
- 40 En una realización, la salida de gas está configurada para dirigir el flujo de gas para dividir la muestra de fluido recibida en el soporte de muestra con la porción retenida con la concentración de especímenes. Por consiguiente, la porción retenida puede mantener la misma concentración o densidad de especímenes. Es decir, la concentración o densidad de especímenes no puede aumentar durante la eliminación de la porción retirada.
- 45 En una realización, la porción retirada comprende especímenes. Por consiguiente, la porción retirada puede contener tanto especímenes como fluido.
- 50 En una realización, la porción retirada tiene la concentración de especímenes. Por consiguiente, la porción retirada también puede mantener la misma concentración de especímenes que la muestra de fluido original.
- 55 En una realización, el período de tiempo minimiza la evaporación del fluido. Por consiguiente, el período de tiempo puede elegirse de tal modo que la evaporación del fluido se minimice o se elimine esencialmente.
- 60 En una realización, el período de tiempo es inferior a aproximadamente 1 s.
- 65 En una realización, el período de tiempo es inferior a aproximadamente 100 ms.
- En una realización, el período de tiempo comprende un período de depósito de muestra, un período de división y un período de vitrificación.
- En una realización, el período de depósito de muestra está situado entre aproximadamente 10 ms y 30 ms.
- En una realización, el período de división está situado entre aproximadamente 10 ms y 20 ms.
- En una realización, el período de vitrificación es inferior a aproximadamente 50 ms.

Un segundo aspecto de la invención proporciona un procedimiento para la preparación de muestras para microscopía electrónica como se indica en la reivindicación 4.

5 Además, en las reivindicaciones 5-13 están definidas características opcionales.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: dirigir el flujo de gas hacia la superficie de tal modo que es flujo de gas es esencialmente paralelo a la superficie.

10 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: dirigir el flujo de gas hacia la superficie en un ángulo de incidencia elegido de tal manera que el flujo de gas puede eliminar un exceso de la muestra de fluido recibido en el soporte de muestra para microscopía electrónica.

15 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: dirigir el flujo de gas hacia la superficie de tal modo que un flujo de gas es esencialmente perpendicular a la superficie.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: dirigir el flujo de gas hacia la superficie en un ángulo de incidencia elegido de tal manera que el flujo de gas está configurado para impactar uniformemente en la superficie de soporte de muestra para microscopía electrónica.

20 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: ajustar la salida de gas para ajustar el ángulo de incidencia con respecto al flujo de gas hacia la superficie.

25 En algunas realizaciones, ajustar el fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica comprende eliminar el exceso de fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica.

En algunas realizaciones, ajustar el fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica comprende provocar una evaporación no uniforme del fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica para obtener un gradiente de espesor de fluido en el soporte de muestra.

30 En algunas realizaciones, ajustar el fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica comprende provocar una evaporación uniforme del fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica para obtener un gradiente de espesor de fluido uniforme en el soporte de muestra.

35 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: configurar una única salida de gas para dirigir el flujo de gas de forma esencialmente simétrica hacia superficies opuestas del soporte de muestra para microscopía electrónica para ajustar el fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica.

40 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: configurar al menos una salida de gas para dirigir el flujo de gas de forma esencialmente simétrica hacia superficies opuestas del soporte de muestra para microscopía electrónica para ajustar el fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: configurar un humidificador de gas para ajustar la humedad del flujo de gas.

45 En algunas realizaciones, proporcionar el fluido comprende configurar una fuente de fluido para introducir la muestra de fluido en el soporte de muestra.

50 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: configurar un dispositivo de enfriamiento para recibir el soporte de muestra y el fluido y enfriar, enfriar criogénicamente y/o vitrificar el fluido en el soporte de muestra.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: configurar un baño de etano líquido para recibir el soporte de muestra y enfriar, enfriar criogénicamente y/o vitrificar el fluido en el soporte de muestra.

55 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: prever una salida de gas de enfriamiento y configurar la salida de gas de enfriamiento para dirigir un flujo de gas de enfriamiento hacia una superficie del soporte de muestra para microscopía electrónica para enfriar, enfriar criogénicamente y/o vitrificar el fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica.

60 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: implementar un período de espera entre la introducción del fluido en el soporte de muestra y la activación del flujo de gas desde la salida de gas.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: implementar un período activo entre la activación y el cese del flujo de gas desde la salida.

65 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: implementar un período de relajación entre la detención del

flujo de gas desde la salida y una acción adicional, que se toma en relación con un soporte de muestra sujetado en el portamuestras.

- 5 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: ajustar una o varias del período de espera, período activo o período de relajación.
- 10 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: la obtención de imágenes del soporte de muestra para microscopía electrónica en el portamuestras.
- 15 En una realización, el procedimiento comprende proporcionar la muestra de fluido con una pluralidad de especímenes suspendidos en un fluido.
- 20 En una realización, el procedimiento comprende proporcionar la pluralidad de especímenes con una concentración de especímenes por unidad de volumen dentro del fluido.
- 25 En una realización, el procedimiento comprende elegir la concentración de especímenes para proporcionar un número determinado de especímenes en cada apertura para obtener una imagen del soporte de muestra.
- 30 En una realización, el procedimiento comprende dividir la muestra de fluido recibida en el soporte de muestra con el flujo de gas proporcionado por la salida de gas.
- 35 En una realización, el procedimiento comprende dividir la muestra de fluido recibida en el soporte de muestra en una porción retenida de la muestra de fluido retenida en el soporte de muestra y una porción retirada de la muestra de fluido retirada del soporte de muestra.
- 40 En una realización, el procedimiento comprende dividir la muestra de fluido recibida en el soporte de muestra con la porción retenida con la concentración de especímenes.
- 45 En una realización, la porción retirada comprende especímenes.
- 50 En una realización, la porción retirada tiene la concentración de especímenes.
- 55 En una realización, el procedimiento comprende depositar la muestra de fluido en el soporte de muestra con un depositador de muestra de fluido.
- 60 En una realización, el procedimiento comprende controlar el depositador de muestra de fluido para depositar la muestra de fluido, la salida de gas para dividir la muestra de fluido y el dispositivo de enfriamiento para vitrificar la porción retenida; todo ello en un período de procesamiento seleccionado.
- 65 En una realización, el período de procesamiento comprende un período de tiempo seleccionado durante el cual se impide a menos de una proporción seleccionada de los especímenes en la porción retenida al menos uno de los procesos siguientes, que son disociarse y reorientarse en una orientación alineada.
- 70 En una realización, el período de tiempo se selecciona para minimizar la evaporación del fluido.
- 75 En una realización, el período de tiempo es inferior a aproximadamente 1 s.
- 80 En una realización, el período de tiempo es inferior a aproximadamente 100 ms.
- 85 En una realización, el período de tiempo comprende un período de depósito de muestra, un período de división y un período de vitrificación.
- 90 En una realización, el período de depósito de muestra está situado entre aproximadamente 10 ms y 30 ms.
- 95 En una realización, el período de división está situado entre aproximadamente 10 ms y 20 ms.
- 100 En una realización, el período de vitrificación es inferior a aproximadamente 50 ms.
- 105 Otros aspectos particulares y preferidos se describen en las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas. Las características de las reivindicaciones dependientes pueden combinarse con características de las reivindicaciones independientes según sea conveniente y en combinaciones distintas de las explícitamente descritas en las reivindicaciones.
- 110 Cuando una característica del aparato se describe como puede funcionar para proporcionar una función, se apreciará que esto incluye una característica del aparato que proporciona esta función o que está adaptada o configurada para proporcionar esa función.

Descripción breve de los dibujos

- Las realizaciones de la presenten invención se describirán a continuación haciéndose referencia a los dibujos adjuntos, en los que:
- 5 la figura 1a y la figure 1b ilustran esquemáticamente un soporte de muestra para microscopía;
 las figuras 2a a 2e ilustran la obtención de imágenes de un espécimen preparado en un soporte de muestra como se muestra en la figura 1 con varios niveles de ampliación;
- 10 la figura 3 ilustra componentes principales de un dispositivo según una disposición;
 las figuras 4a a 4c ilustran esquemáticamente el funcionamiento de los componentes principales del dispositivo de la figura 3 durante la preparación de una muestra para microscopía;
- 15 la figura 5 ilustra la introducción de una muestra o fluido de especímenes en un soporte de muestra recibido por un dispositivo como el que se muestra en la figura 3;
 la figura 6 es una vista de un soporte de muestra como ha sido grabado por el aparato para la obtención de imágenes incluido en un dispositivo como el que se muestra en la figura 3;
- 20 las figuras 7a 7c muestran el comportamiento de una muestra en un soporte de muestra utilizado en un dispositivo como el que se muestra en la figura 3;
 las figuras 8a y 8b ilustran esquemáticamente el comportamiento de una muestra de fluido en un soporte de rejilla;
 la figura 9 ilustra un componente de un dispositivo como el que se muestra en la figura 3; y
 la figura 10 es un diagrama de tiempos según una realización.

Descripción de las realizaciones

- 25 Antes de describir una posible disposición en detalle, se ofrece una visión general.
- 30 Las técnicas de microscopía pueden usarse para obtener una imagen de un espécimen. Las técnicas de microscopía incluyen la microscopía electrónica. Según estas técnicas, un haz de electrones es usado para "iluminar" un espécimen. La presencia del espécimen en el haz de electrones conduce a cambios en este haz. Los cambios del haz generados por la muestra pueden ser examinados para crear una imagen ampliada del espécimen.
- 35 Los recientes avances en detectores de electrones directos utilizados para la criomicroscopía electrónica (crio-EM) han provocado un aumento en el número de estructuras determinadas por este procedimiento en los últimos 5 años: de 130 en 2009 a 521 en 2014, y más aún para estructuras de alta resolución (mejor que una resolución de 9 Å): 40 en 2009, 229 en 2015 (enero-octubre). A medida que la técnica avanza con mejores microscopios, detectores y software, se reconoce que la preparación de la muestra puede ser el factor limitante en el proceso de determinación de la estructura. Además, se reconoce que se están obteniendo imágenes de muestras más complejas, las cuales requieren una optimización de las condiciones que requiere cada vez más tiempo. Sin embargo, las metodologías actuales para preparar muestras son poco reproducibles y perjudican en muchos casos los complejos macromoleculares. Por lo tanto, se cree que existe una necesidad urgente de mejores procedimientos para preparar muestras para la crio-EM.
- 40 Los aspectos y realizaciones reconocen que, para obtener con éxito una imagen, un espécimen tiene que ser preparado adecuadamente para obtener la imagen. Una preparación exitosa y reproducible de una muestra o de un espécimen puede ser la llave para obtener resultados útiles a partir de técnicas de microscopía. Hay que tener en cuenta que una preparación incorrecta o no exitosa de un espécimen para el examen puede conducir a un deterioro del espécimen, o a resultados malos y/o no reproducibles.
- 45 50 La figura 1a y la figure 1b ilustran esquemáticamente un soporte de muestra para microscopía habitual. Como se ilustra, se entenderá que, para aplicaciones de crio-EM, un soporte de muestra puede comprender normalmente una rejilla metálica que tiene un espaciado de rejilla de, por ejemplo, decenas de micrómetros. La rejilla puede constar de una rejilla con agujeros cuadrados. El soporte puede comprender además una película porosa, por ejemplo, una película de carbono perforada, con poros de un diámetro entre 0,5 y 10 micrómetros, suspendida cubriendo los agujeros cuadrados de la rejilla. Un fluido con proteínas de las que han de obtenerse imágenes puede colocarse en la película porosa y la rejilla (que juntas forman el soporte de la muestra). El fluido con las especímenes de proteína penetra en los poros del carbono perforado. La figura 1b muestra de manera más detallada la estructura de un soporte de muestra habitual. Pueden verse varios elementos de rejilla, sobre los que se dispone una película de carbono perforado.
- 55 60 Las figuras 2a a 2e ilustran la obtención de imágenes de un espécimen preparado en un soporte de muestra como se muestra en la figura 1, con diferentes niveles de ampliación. La figura 2a muestra la estructura macroscópica de una rejilla que forma parte de un soporte de muestra. En la figura 2a puede verse que puede haber algún daño o inconsistencia en la rejilla. Como puede verse, hay algunas cuadriculas de rejilla oscurecidas. La figura 2b muestra una imagen de algunas de las cuadriculas de la rejilla del soporte de muestra de la figura 2a, en la que puede verse la estructura de la película porosa. La figura 2c muestra la estructura del carbono perforado dentro de una única

cuadrícula de la rejilla La figura 2d muestra varios poros del carbono perforado. La Figura 2e muestra una imagen de proteínas dentro de un único poro del carbono perforado.

5 Según las técnicas tradicionales de la preparación de muestras, una muestra o espécimen para microscopía electrónica para la obtención de imágenes se prepara de la siguiente manera: un fluido, que incluye la muestra o el espécimen de los que han de obtenerse imágenes, se coloca en un soporte de muestra en forma de una rejilla metálica, por ejemplo, mediante una pipeta. El fluido humedece y satura la rejilla, llenando las cuadrículas de la rejilla y, en particular, los poros en el carbono perforado dentro de los agujeros de la rejilla. Se elimina el exceso de fluido y se enfriá el soporte de muestra, de modo que el fluido que contiene la muestra se vitrifica. El soporte de muestra, incluyendo el fluido de muestra, se almacena hasta que se disponga de un espacio de tiempo para la obtención de imágenes en un microscopio electrónico.

10 Actualmente, todas las metodologías para preparar muestras, por ejemplo, para crio-EM, utilizan papel de filtro para eliminar "secando" el exceso de líquido de la rejilla para crio-EM que sujeta la muestra. Este proceso de secado se consigue presionando papel secante adecuado contra una o las dos superficies de la rejilla del soporte de muestra. Este proceso de secado puede causar daños físicos en la rejilla de la muestra o en la muestra portada en la rejilla. El proceso de secado produce resultados variables en función del fluido de muestra que queda en el soporte de muestra. Algunas cuadrículas de la rejilla pueden estar completamente vacías, mientras que otras pueden contener mucho fluido. Las cuadrículas adyacentes de la rejilla pueden presentar espesores de fluido muy diferentes en los poros. Esta variación en la rejilla del soporte de muestra puede dar lugar a una calidad de imagen variable. La tasa de éxito normal para una rejilla "buena" (es decir, una en la que se pueden obtener imágenes claras de la muestra), preparada según un procedimiento de secado es de 1 a 2 por cada 10 rejillas preparadas. Además, cabe destacar que los resultados finales de la preparación de la muestra mediante la técnica de secado para la eliminación del exceso de líquido de muestra solo pueden evaluarse en el microscopio electrónico, un instrumento no apto para análisis de alto rendimiento.

15 20 25 En otras palabras, no se realiza ningún control de calidad de las rejillas preparadas hasta que lleguen al microscopio electrónico para la obtención de imágenes. En consecuencia, la preparación de la rejilla de muestra es actualmente uno de los obstáculos más importantes en la determinación de la estructura en la crio-EM.

30 Las disposiciones reconocen que se necesita urgentemente un procedimiento para la preparación de rejillas de muestra que permitan obtener rejillas de muestra más consistentes y reproducibles. También se reconoce que puede ser deseable proporcionar un procedimiento que permita determinar una indicación de la calidad de una rejilla de muestra, antes de que la muestra llegue a la obtención de imágenes completa, es decir, sin la necesidad de un criomicroscopio electrónico.

35 **Descripción general**

40 Gracias a las disposiciones se reconoce la posibilidad de crear un dispositivo que pueda implementar un procedimiento más reproducible para preparar muestras. Estas muestras pueden comprender, por ejemplo, muestras para crio-EM de una sola partícula o de una sola proteína. Los dispositivos pueden implementar procedimientos que utilizan un flujo controlado de gas, quizás en una ráfaga corta o un "soplo", para eliminar, por ejemplo, el exceso de líquido de una rejilla de muestra. El uso de un flujo de gas puede ofrecer varias ventajas en comparación con un procedimiento que utiliza papel de filtro para secar. En particular, ya que es posible definir con precisión las características físicas del flujo de gas, por ejemplo, la presión y el tiempo del soplo de gas, es posible obtener resultados más reproducibles en la preparación de la muestra. Además, se ha descubierto que la direccionalidad del flujo de gas puede generar un gradiente fino en el espesor de la capa de muestra que es creada a lo largo de toda la anchura de la rejilla, por lo que aumenta la probabilidad de obtener el espesor correcto del fluido que porta la muestra en algún punto de cada rejilla que se prepara. Puesto que los procedimientos que utilizan un flujo de gas controlado no utilizan papel de filtro que oscurece la rejilla de la muestra, en algunas disposiciones es posible utilizar una cámara de alta resolución para monitorizar y grabar una rejilla y una muestra durante el proceso de preparación. Esta monitorización puede permitir a los usuarios vincular las propiedades visibles de una rejilla durante la preparación con la calidad final de la rejilla, como puede verse en el criomicroscopio electrónico. De esta manera, si se detecta que se utilizan condiciones subóptimas durante la preparación de una rejilla de muestra, puede resultar más claro qué parámetros de preparación han de ser modificados. Una opción así puede hacer que los procedimientos de preparación de rejillas tengan menos de un procedimiento de "prueba y error" y proporcionar, en cambio, una técnica definida con precisión que elimina la incertidumbre en la preparación de muestras para técnicas de microscopía, incluidas las técnicas de crio-EM.

45 50 55

60 La técnica de preparación de muestras con flujo de gas también presenta varias ventajas adicionales, incluyendo la posibilidad de requerir un volumen de muestra pequeño, en algunas realizaciones, la posibilidad de utilizar una técnica alternativa de congelación/vitrificación (que no depende de la inmersión en etano líquido) y la incorporación del dispositivo de preparación en el microscopio, de modo que la preparación de la muestra y la obtención de imágenes de la muestra se convierten en un solo proceso. Finalmente, cabe la posibilidad que el usuario solo tenga que proporcionar una muestra, tras lo cual las etapas posteriores pueden realizarse sin la intervención del usuario.

65 Adoptando un enfoque holístico para la preparación de muestras, la técnica de preparación de muestras con flujo de gas puede comprender, en una implementación, parte de un dispositivo de preparación de muestras que utiliza un sistema de congelación/vitrificación por inmersión para vitrificar una rejilla de muestra para crio-EM.

El dispositivo de preparación de muestras puede estar configurado para usar una ráfaga corta o un "soplo" de gas comprimido para eliminar el exceso de fluido de muestra de una rejilla de muestra, dejando solo una capa fina adecuada para la obtención de imágenes mediante crio-EM.

Los dispositivos tradicionales de preparación de muestras utilizan papel de filtro para eliminar el exceso de muestra mediante un procedimiento de transferencia y son notoriamente irreproducibles. Se ha reconocido que el uso de una corriente de gas en relación con la preparación de muestras puede proporcionar un mejor control de diversos factores que pueden afectar la calidad de la muestra, lo que, a su vez, puede ofrecer resultados de microscopía más fiables.

Algunas implementaciones de un dispositivo pueden incluir aparatos de obtención de imágenes, como una videocámara, configurados para monitorizar y grabar la rejilla de muestra durante el proceso de preparación. Una grabación de este tipo puede proporcionar información inmediata al usuario sobre la probable calidad de la muestra. Los procedimientos tradicionales que utilizan papel de filtro para la transferencia no pueden ser monitorizados directamente de una forma similar, ya que el papel de filtro impide ver la rejilla de muestra, por lo que la calidad de la rejilla de muestra obtenida no puede ser monitorizada adecuadamente hasta que esté montada en un criomicroscopio electrónico, horas o incluso días después de la preparación de la rejilla de muestra.

Ejemplo de un dispositivo

La figura 3 ilustra componentes principales de un dispositivo según una disposición. El dispositivo mostrado comprende un aparato de preparación de muestras para microscopía electrónica 1. El aparato comprende un portasoporte configurado para recibir un soporte de muestra para microscopía electrónica 80. El soporte de muestra para microscopía electrónica (no mostrado en la Figura 3) puede comprender un soporte de muestra como los que se muestran en las figuras 1 y 2. El soporte de muestra está configurado para recibir una muestra de fluido. La muestra de fluido puede comprender, por ejemplo, una proteína suspendida en el fluido que ha de ser estudiada. El aparato comprende además una salida de gas 20 configurada para dirigir un flujo de gas hacia la superficie de dicho soporte de muestra para microscopía electrónica. La salida de gas 20 puede comprender una boquilla configurada para producir un flujo de gas que ajusta la muestra de fluido portada por el soporte de muestra para microscopía electrónica. En la disposición a modo de ejemplo mostrada en la figura 3, el aparato comprende dos salidas de gas 20, dispuestas de forma esencialmente simétrica con respecto al portasoporte 10.

El aparato mostrado en la figura 3 comprende un dispositivo de congelación por inmersión para la vitrificación de un soporte de muestra que incluye una muestra de fluido después de su preparación según las disposiciones de flujo de gas descritas en este documento. Por consiguiente, la disposición mostrada es tal que el aparato comprende además un protector 30 dispuesto para recibir cualquier fluido retirado del soporte de muestra por una breve ráfaga de gas desde la boquilla 20. En la disposición mostrada, el protector es móvil de tal modo que, cuando la muestra (no mostrada) se sumerge en etano líquido (tampoco mostrado) para vitrificar el fluido que contiene un espécimen del que han de obtenerse imágenes in situ en el soporte de muestra, el protector no impide el movimiento del soporte de muestra desde la zona de las salidas de gas hasta el etano líquido.

El aparato mostrado en la figura 3 comprende además una cámara 40 configurada para grabar una o más imágenes de un soporte ubicado en el portasoporte de muestra 10.

El funcionamiento de una disposición como la que se muestra en la figura 3 es tal que se coloca una rejilla de muestra en el portasoporte de muestra 10. Un usuario puede usar una pipeta para transferir o dispensar una muestra de fluido en el soporte de muestra. Dos corrientes de gas comprimido son expulsadas desde las salidas de gas 20, situadas, en el aparato de ejemplo mostrado, de manera ligeramente inclinada (aproximadamente 20 grados) con respecto a la superficie de la rejilla de muestra portada por el soporte. Las corrientes de gas incidentes se utilizan para eliminar el exceso de muestra de fluido del soporte de muestra. La eliminación del exceso de fluido puede ayudar a crear una fina capa de fluido de muestra portada por rejilla de soporte. En el ejemplo mostrado en la figura 3, las salidas 20 están configuradas para dispensar un flujo de gas nitrógeno comprimido, aunque cabe señalar que pueden utilizarse otros gases generalmente inertes de manera adecuada. Además, como se explica en detalle más adelante, algunas disposiciones e implementaciones pueden permitir el control de la humedad de una corriente de gas para controlar la tasa de evaporación del fluido del soporte de muestra durante la exposición continua al flujo de gas después de haberse eliminado el exceso de fluido.

En la disposición mostrada, dos boquillas de gas suministran simultáneamente un flujo de gas (una a cada lado) a las superficies de la rejilla, para garantizar que el soporte de muestra permanezca en la posición deseada y que el ajuste del fluido de muestra por los flujos de gas sea sustancialmente simétrico. Después de la exposición al flujo de gas, la rejilla de muestra puede ser liberada o ser introducida en etano líquido. En la disposición mostrada en la figura 3, al liberar o transferir la rejilla de muestra, las dos boquillas de gas 20 están conectadas con el disparador de inmersión y están configuradas de modo que ellas mismas y el protector 30 se apartan cuando la muestra se introduce en etano líquido (no mostrado).

El dispositivo de obtención de imágenes 40 en la disposición mostrada en la figura 3, comprende un aparato para

grabar vídeos. La grabación de un vídeo de la rejilla de muestra para EM permite la monitorización continua en tiempo real de la muestra, proporcionando información directa sobre la probable calidad resultante de la muestra de fluido portada por la rejilla.

- 5 Las figuras 4a a 4c ilustran esquemáticamente el funcionamiento de los componentes principales del dispositivo de la figura 3 durante la preparación de una muestra para microscopía. Como se muestra en la figura 4a, dos boquillas de gas 20 están situadas cerca de la punta de las pinzas que forman el portamuestras 10 en el aparato de ejemplo ilustrado en la figura 3. Cuando el aparato está en uso, el portamuestras sujeta una rejilla de muestra (no mostrada, pero que se encuentra en la región designada con una A en la figura 4. Está previsto un protector 30 debajo de la rejilla que evita que el fluido de muestra retirado termine en un baño de etano líquido (no mostrado), que está dispuesto normalmente debajo del portasoporte de muestra. En la disposición de las figuras 3 y 4, está previsto un mecanismo 50 para mover las salidas de gas 20 y el protector 30 con respecto al portamuestras 10, asegurando así que las boquillas de gas y el protector se muevan de su lugar y que las pinzas puedan sumergirse en el etano líquido (no mostrado) sin impedimentos. La figura 4a muestra el dispositivo en un estado cerrado, como estaría durante el ajuste de la muestra de fluido, como la eliminación del exceso de muestra y el posterior ajuste del fluido en el soporte de muestra mediante un flujo controlado de gas. La figura 4b muestra el dispositivo en un estado abierto, en el que las boquillas de gas 20 y el protector 30 son desplazados por el mecanismo 50, de modo que las pinzas 10 que sujetan la rejilla de muestra pueden moverse libremente en una dirección vertical u horizontal. La figura 4c muestra el dispositivo en un estado abierto, en el que las pinzas 10 se han movido hacia abajo mediante el mecanismo 50, de modo que un soporte de muestra puede moverse hacia y dentro de un baño de etano líquido para conseguir una rápida vitrificación del soporte de muestra (no mostrado).

20 La figura 5 ilustra la introducción de una muestra o fluido de especímenes en un soporte de muestra recibido por un dispositivo como el que se muestra en la figura 3. En el ejemplo mostrado en la figura 5, se utiliza una pipeta 60 para colocar un fluido de muestra 70 en la rejilla de soporte 80. Se apreciará que algunas disposiciones pueden permitir la dispensación automática de una muestra en una rejilla.

25 La figura 6 es una vista de un soporte de muestra como ha sido grabado por el aparato para la obtención de imágenes incluido en un dispositivo como el que se muestra en la figura 3. El soporte de muestra 80 comprende una rejilla en la que se ha dispensado el fluido de muestra 70. El hecho de prever un dispositivo de obtención de imágenes 40 permite analizar el comportamiento del fluido de muestra 70 después de que haya sido dispensado en la rejilla 80 a lo largo de un período de espera, durante el cual puede verse que la muestra de fluido "humedece" la rejilla, a lo largo de un período activo, durante el cual se aplica un flujo de gas a la superficie del soporte de muestra y se elimina el exceso de fluido, y puede tener lugar una evaporación, hasta el cese de un flujo de gas aplicado y a lo largo de un período de relajación, entre el cese del flujo de gas y la vitrificación de una muestra de fluido en un soporte de muestra, durante el cual el fluido puede "relajarse" y redistribuirse en el soporte de muestra.

30 Por ejemplo, las figuras 7a a 7c muestran el comportamiento de una muestra en un soporte de muestra utilizado en un dispositivo como el que se muestra en la figura 3; basándose en imágenes capturadas con el aparato de obtención de imágenes 40 de un fluido de muestra 70 después de haberse dispensado en la rejilla 80 y haberse expuesto a un flujo de gas procedente de las boquillas 20. En particular, las figuras 7a a 7c ofrecen un ejemplo de imágenes capturadas mediante vídeo que muestran el movimiento de un frente de onda en la rejilla cuando el fluido colocado en la rejilla está sometido a un flujo de gas.

45 **Interacción fluido-rejilla-gas: Descripción general**

50 El análisis basada en video del funcionamiento de un aparato similar al que se muestra en la figura 3 indica que se producen varias fases en relación con la interacción entre el fluido colocado en un soporte y un flujo de gas dirigido hacia el soporte de muestra.

55 En particular, se han observado los siguientes fenómenos:

55 Se procede a la introducción de la muestra de fluido en la rejilla. La tensión superficial tiende inicialmente a mantener la muestra de fluido con forma general de una gota. Dejar pasar un tiempo (un período de "espera") puede permitir que la muestra de fluido se relaje entrando en los agujeros de la rejilla. Es decir, puede observarse que la muestra de fluido "humedece" la rejilla tras su introducción inicial.

60 Durante un período "activo", en el que puede aplicarse un flujo laminar de gas esencialmente paralelo a la superficie del soporte, el flujo de gas actúa inicialmente para eliminar el exceso de fluido de muestra. Es decir, se elimina cualquier gota residual de la muestra de fluido presente en la superficie del soporte. La muestra de fluido que ha humedecido o entrado en los espacios de la rejilla normalmente no se retira, siempre que la dirección del flujo de gas se seleccione adecuadamente.

65 La aplicación continua de un flujo laminar de gas esencialmente paralelo a la superficie del soporte puede generar un "gradiente" de la muestra de fluido en las cuadrículas de soporte de la rejilla debido a una mayor tasa de evaporación cerca de la salida del flujo de gas. Es decir, las cuadrículas de la rejilla más alejadas de la salida o fuente de flujo de

gas tienden a contener más fluido. La figura 8a ilustra esquemáticamente, en sección transversal, el comportamiento normal de una muestra de fluido 70 entre las barras de soporte 90 de la rejilla. Este gradiente conseguido en el soporte de muestra puede ser beneficioso, ya que puede garantizar que probablemente en algún punto del soporte se alcance un espesor de fluido óptimo para la obtención de imágenes del espécimen en el fluido.

Al dejarse de aplicar flujo laminar de gas y esperarse un llamado período de "relajación", la muestra de fluido entre las barras de soporte de la rejilla se "relaja" antes de que se realice cualquier otra acción (por ejemplo, vitrificación) en relación con el soporte de muestra. El tiempo de relajación permite que el fluido dentro de una cuadrícula de la rejilla se asiente y contrarreste cualquier tensión superficial asimétrica causada por la aplicación del flujo de gas. Como resultado, es probable que el fluido dentro de cada rejilla o poro sea más uniforme. La Figura 8b ilustra esquemáticamente, en sección transversal, el comportamiento normal de una muestra de fluido 70 entre las barras de soporte de la rejilla 90 tras la eliminación de un flujo de gas.

Finalmente, puede vitrificarse un soporte de muestra con una muestra de fluido. Normalmente, la vitrificación se consigue sumergiendo el soporte de muestra en un baño de etano líquido. Se reconoce que, en algunas disposiciones, es posible utilizar un flujo de gas adicional adecuadamente seleccionado para conseguir la vitrificación.

La Figura 9 ilustra un componente de un dispositivo como el que se muestra en la Figura 3. Sobre la base de las observaciones anteriores con respecto a la interacción del fluido con un soporte de muestra, el aparato puede estar provisto de un medio para implementar diferentes ajustes de tiempo variables en relación con las distintas etapas que se presentan durante el proceso de preparación de la muestra. La Figura 9 muestra un interruptor electrónico que permite ajustar diferentes tiempos para: i) un tiempo de espera ("periodo de espera") entre la aplicación de una muestra de fluido en un soporte y el inicio de un flujo de gas, de modo que la muestra de fluido puede interactuar, por ejemplo, con una rejilla; ii) la duración de un flujo de gas aplicado ("periodo activo"); y iii) un tiempo de espera de "relajación" ("periodo de relajación") entre el cese del flujo de gas y el momento en que el soporte de muestra se vitrifica, por ejemplo, sumergiendo la rejilla en etano líquido.

Implementaciones alternativas

Se apreciará que el funcionamiento general del dispositivo de la figura 3 ilustra únicamente una implementación particular del principio general del uso de un flujo de gas en la preparación de una muestra para microscopía electrónica.

En particular, algunas alternativas y complementos a la disposición descrita pueden resultar evidentes para el experto en la materia.

En relación con el flujo de gas aplicado a un soporte de muestra, se apreciará que la dirección del flujo puede ser significativa. Un flujo de gas esencialmente paralelo a la superficie del soporte de muestra puede conseguir una eliminación eficiente del exceso de muestra de fluido. La aplicación de un flujo de gas esencialmente perpendicular a la superficie del soporte de la muestra puede permitir que una gota de muestra se distribuya uniformemente en la muestra y/o permitir una evaporación o un enfriamiento más uniforme, según se deseé. El ángulo de incidencia de un flujo de gas en la superficie del soporte de muestra puede ser fijo o ajustable. La dirección del flujo de gas aplicado a una muestra puede ajustarse durante las diferentes fases de preparación.

Cabe destacar además que la velocidad, el caudal y la naturaleza del flujo de gas (por ejemplo, laminar o de otro tipo) pueden influir en el funcionamiento de un dispositivo. La velocidad del flujo de gas puede ser ajustable. En algunas disposiciones, la boquilla o salida puede tener una forma para garantizar que un flujo de gas laminar uniforme incida en la superficie del soporte de muestra.

Puede controlarse el tipo de gas utilizado. En particular, puede ser deseable utilizar un gas para ajustar una muestra de fluido en un soporte y otro gas, que puede ser diferente del primero, en relación con el flujo de gas para conseguir el enfriamiento o la vitrificación de una muestra de fluido en un soporte de muestra. De forma similar, la humedad del flujo de gas puede ajustarse para controlar, por ejemplo, la evaporación del fluido de muestra.

En algunas disposiciones, puede controlarse la temperatura del dispositivo y del entorno ambiental para garantizar la reproducibilidad de la preparación de muestras para microscopía electrónica.

En algunas disposiciones, pueden aplicarse flujos de gas simétricos a superficies opuestas de un soporte de muestra (como en la disposición de la figura 3). En algunas disposiciones, puede estar prevista una única salida de gas. Esta única salida de gas también puede estar dispuesta, por ejemplo, para aplicar un flujo de gas simétricamente a superficies opuestas de un soporte de muestra. En algunas disposiciones, una única salida de flujo de gas puede estar configurada para suministrar un flujo de gas a una sola superficie del soporte de muestra y ajustar la muestra de fluido. En algunas disposiciones, una única salida de flujo de gas puede estar configurada para suministrar un flujo de gas a una sola superficie del soporte de muestra y enfriar la muestra de fluido.

Varias disposiciones alternativas pueden proporcionar mayor funcionalidad al dispositivo de preparación de muestras

para microscopía electrónica. En algunas disposiciones, puede aplicarse una corriente de gas nitrógeno frío a 100 Kelvin a la superficie del soporte de la muestra para vitrificar la rejilla de muestra y el fluido portado por la rejilla. Algunas disposiciones permiten la aplicación automática de muestra de fluido a un soporte de muestra, en lugar de requerir que el usuario coloque manualmente con pipeta el fluido de la muestra en su posición en el soporte de muestra. La automatización de la aplicación del fluido puede permitir el uso de volúmenes de muestra más pequeños. La aplicación manual de la muestra requiere depositar un volumen de ~3 microlitros en la rejilla. La mayor parte de esta muestra será eliminada normalmente durante la ráfaga de gas. El uso de técnicas de deposición de nanolitros, como las que se utilizan en la robótica de cristalización de proteínas, puede permitir una reducción del volumen de muestra requerido de aproximadamente 10 veces, ahorrando así la muestra valiosa.

En algunas realizaciones, la muestra de fluido comprende los especímenes anteriormente mencionados y, en particular, subunidades pequeñas de ribosomas, complejos de ADN polimerasa, complejos de factor de transcripción de ADN, muestras de proteínas, especímenes biológicos, macromoléculas, etc. Los especímenes se presentan dentro de un fluido de suspensión, normalmente con una concentración de aproximadamente 3 a 10 micromolar. La concentración de especímenes se selecciona para proporcionar normalmente unos pocos especímenes (como macromoléculas) presentes en cada apertura del soporte de muestra.

Las realizaciones reconocen que, para poder construir una imagen precisa de un espécimen (como una macromolécula), estos especímenes deben suspenderse criogénicamente en una forma casi natural y en múltiples orientaciones para poder construir una imagen tridimensional a partir de la obtención de imágenes de múltiples especímenes. En particular, las realizaciones reconocen que puede producirse la disociación de complejos, subcomplejos, ligandos, cofactores, etc., macromoleculares una vez que el fluido de muestra esté colocado en el soporte de muestra. Asimismo, la evaporación del fluido, una vez que el portasoporte haya recibido la muestra de fluido, puede modificar las condiciones tampón, lo cual puede ser perjudicial para la macromolécula (como el aumento de la concentración de sal, cambios de pH, etc.). Asimismo, una vez que el soporte de muestra haya recibido la muestra de fluido, las macromoléculas pueden interactuar con la interfaz aire-líquido y unirse en una orientación preferida. Por lo tanto, las realizaciones pretenden completar todos los procesos desde el depósito de la muestra de fluido en el soporte de muestra hasta su vitrificación dentro de un tiempo de procesamiento que elimina o minimiza el grado de disociación y/o la evaporación del fluido o su reorientación a la orientación preferida. Además, el procesamiento de la muestra de fluido en el soporte de muestra pretende minimizar los cambios en la concentración de especímenes en la muestra. La concentración de especímenes dentro del fluido se selecciona para que haya un número adecuado de especímenes en cada apertura del soporte de muestra. Al tener un número suficiente de especímenes suspendidos aleatoriamente de forma casi natural y en múltiples orientaciones, pueden tomarse imágenes de diferentes especímenes y combinarse para obtener una vista tridimensional de los especímenes.

En algunas realizaciones, se proporciona una disposición automatizada para depositar, dividir y vitrificar rápidamente la muestra de fluido. Para un espécimen normal, el tiempo desde el depósito en la rejilla hasta la vitrificación debe ser inferior a un segundo, normalmente inferior a unos 100 ms. La disposición automatizada es similar a la que se ha descrito anteriormente; sin embargo, se utiliza un inyector electromecánico (como una jeringa de pequeño volumen (25-100 microlitros)) en lugar de la pipeta 60, a unos 10 mm de la rejilla de soporte, para inyectar el fluido de muestra 70 en la rejilla de soporte 80.

La figura 10 es un diagrama de tiempos que muestra los tiempos de la disposición automatizada. En una realización, el inyector electromecánico deposita 3 microlitros de fluido de muestra durante un periodo de depósito de entre 20 y 30 ms, y más habitualmente, de entre 10 y 15 ms. Puede haber un retardo opcional de hasta 10 ms después de depositarlo. Una vez transcurrido dicho retardo, se aplica el flujo de gas desde las boquillas de gas 20, normalmente con una presión de entre 2 y 4 bar, durante un periodo de división de entre 10 y 20 ms. Esto divide el fluido de muestra, siendo separado o dividido el exceso del fluido de muestra que ha quedado en la rejilla de soporte 80. Después de haber finalizado la división, la rejilla de soporte 80 se traslada y es recibida en el baño de enfriamiento durante un periodo de vitrificación inferior a unos 50 ms, durante el cual se produce la vitrificación.

Por lo tanto, puede verse que las realizaciones acortan el tiempo entre la aplicación de la muestra (inyección), la división de la muestra (el soplo) y la vitrificación de la muestra (inmersión) a la escala de tiempo de milisegundos. De esta manera, el tiempo total de manipulación se aproxima a la frecuencia con la que las macromoléculas que se están estudiando interactúan con la interfaz aire-líquido y permanecen unidas en una orientación preferida. Al acortar el tiempo, se minimiza el número de interacciones en la interfaz aire-agua, lo que minimiza el número de moléculas unidas en esta orientación preferida. Además, al trabajar con la escala de tiempo de milisegundos, la contribución de la evaporación de la muestra se reduce considerablemente. Esto impide cambios en las condiciones tampón que podrían ser perjudiciales para la macromolécula (como el aumento de la concentración de sal o cambios del pH). Este enfoque también permite utilizar concentraciones iniciales más altas de la muestra (puesto que ya no se producen concentraciones durante el proceso de preparación de la rejilla), lo que beneficia los complejos de unión débil que se desintegran a concentraciones más bajas.

Cabe destacar que puede ser necesario variar los tiempos en función de la viscosidad de la muestra de fluido; muestras con una mayor viscosidad pueden requerir un soplo más prolongado de las boquillas de gas 20. Alternativamente, la rejilla de soporte 80 puede ser menos hidrófila si se acorta el tiempo de tratamiento en la cámara de plasma (es decir,

descarga luminiscente). En particular, las características del flujo de gas para conseguir la división pueden ajustarse en función de la disposición física del aparato y de las propiedades de la muestra de fluido.

Se apreciará que, en algunas realizaciones, los parámetros anteriormente mencionados pueden variar 2 a 3 veces.

5 En una realización, la rejilla de soporte 80 es monitorizada por cámaras de alta resolución / alta velocidad que siguen como se deposita y divide la muestra. La calidad final de la rejilla de muestra 80 es monitorizada por criomicroscopía electrónica.

10 En una realización, las válvulas de gas están dispuestas directamente delante de las boquillas de gas 20.

En una realización, se utiliza un chorro potente (soplo) de gas (2-4 Mbar) para eliminar el exceso de muestra por la fuerza (no por evaporación) de una rejilla para crio-EM. La corriente de gas puede ser paralela, en ángulo o perpendicular a la superficie de la rejilla para crio-EM. Puede haber una o dos corrientes de gas que están funcionando a los dos lados de la rejilla. Los procesos de depositar la muestra, eliminar el exceso de muestra y vitrificar la muestra se realizan de tal manera que todo el procedimiento se lleva a cabo en un intervalo de tiempo inferior a un segundo para: 1) evitar/reducir la orientación preferente de la muestra/macromolécula a investigada y/o 2) evitar/reducir la disociación de complejos, subcomplejos, ligandos, cofactores, etc. macromoleculares y/o 3) evitar/reducir la evaporación de la muestra.

15 20 Aunque se han descrito en detalle realizaciones ilustrativas de la invención en el presente documento haciéndose referencia a los dibujos adjuntos, se entiende que la invención no queda limitada a la realización exacta y que un experto en la materia puede realizar diversos cambios y modificaciones en la misma sin apartarse del alcance de la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

25

REIVINDICACIONES

1. Aparato de preparación de muestras para microscopía electrónica (1); comprendiendo el aparato:
 5 un portasohorte (10) configurado para recibir un soporte de muestra para microscopía electrónica (80), estando configurado dicho soporte de muestra para microscopía electrónica (80) para recibir una muestra de fluido (70); y
 10 una salida de gas (20) configurada para dirigir un flujo de gas hacia una superficie del soporte de muestra para microscopía electrónica (80) en un ángulo de incidencia elegido de tal manera que el flujo de gas puede ajustar la muestra de fluido (70) eliminando el exceso de muestra de fluido (70) portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica (80), estando configurada la salida de gas (20) para ser móvil, de modo que el flujo de gas presenta un ángulo de incidencia ajustable con respecto al flujo de gas hacia la superficie; caracterizado porque: dicha salida de gas (20) está configurada de tal modo que el flujo de gas puede ser dirigido de tal modo hacia la superficie que el flujo de gas es esencialmente paralelo a la superficie.
- 15 2. Aparato (1) según la reivindicación 1, comprendiendo el aparato: al menos una salida de gas (20) configurada para dirigir el flujo de gas de forma esencialmente simétrica hacia superficies opuestas del soporte de muestra para microscopía electrónica (80) para ajustar la muestra de fluido (70) portada por el soporte de muestra para microscopía electrónica (80).
- 20 3. Aparato (1) según la reivindicación 1 o 2, comprendiendo el aparato: una fuente de fluido configurada para introducir la muestra de fluido (70) en el soporte de muestra (80).
- 25 4. Procedimiento de preparación de muestras para microscopía electrónica, comprendiendo el procedimiento: insertar un soporte de muestra para microscopía electrónica (80) en un portasohorte (10); proporcionar una muestra de fluido (70) para el soporte de muestra para microscopía electrónica (80); y dirigir un flujo de gas hacia una superficie del soporte de muestra para microscopía electrónica (80) en un ángulo de incidencia elegido de tal manera que el flujo de gas de una salida de gas (20) puede ajustar la muestra de fluido eliminando el exceso de muestra de fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica (80), caracterizado porque:
 30 el procedimiento comprende dirigir el flujo de gas hacia la superficie de tal modo que el flujo de gas es esencialmente paralelo a la superficie.
- 35 5. Procedimiento según la reivindicación 4, comprendiendo el ajuste de fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica además uno o varios de los procesos siguientes: provocar una evaporación no uniforme de fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica para obtener un gradiente de espesor de fluido en el soporte de muestra;
 40 provocar una evaporación uniforme del fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica para obtener un espesor de fluido uniforme en el soporte de muestra; y provocar un enfriamiento del fluido portado por el soporte de muestra para microscopía electrónica para vitrificar el fluido en el soporte de muestra.
- 45 6. Procedimiento según la reivindicación 4 o 5, comprendiendo: implementar un período de espera entre la introducción del fluido en el soporte de muestra y activación del flujo de gas desde la salida de gas.
- 50 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-6, comprendiendo: implementar un período activo entre la activación y el cese del flujo de gas desde la salida.
- 55 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-7, comprendiendo: implementar un período de relajación entre el cese del flujo de gas desde la salida y una acción adicional, que se realiza en relación con un soporte de muestra sujetado en el portamuestras, comprendiendo la otra acción al menos uno de los siguientes procesos, que son enfriamiento, enfriamiento criogénico o vitrificación.
- 60 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 6 a 8, comprendiendo: ajustar uno o varios del período de espera, período activo o período de relajación.
- 65 10. Procedimiento según las reivindicaciones 4-9, comprendiendo: dividir la muestra de fluido recibida en el soporte de muestra con el flujo de gas proporcionado por la salida de gas.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-10, comprendiendo dividir la muestra de fluido recibida en el soporte de muestra en una porción retenida de la muestra de fluido retenida en el soporte de muestra y una porción retirada de la muestra de fluido retirada del soporte de muestra.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-11, comprendiendo depositar la muestra de fluido en el soporte de muestra con un depositador de muestra de fluido y comprendiendo además controlar el depositador de muestra de fluido para depositar la muestra de fluido, la salida de gas para dividir la muestra de fluido y el dispositivo de enfriamiento para vitrificar la porción retenida, realizándose todo ello en un período de procesamiento.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, comprendiendo el período de procesamiento un período de tiempo durante el cual se impide a más de una parte seleccionada de los especímenes en la porción retenida al menos uno de los procesos siguientes, que son disociarse y reorientarse en una orientación alineada.

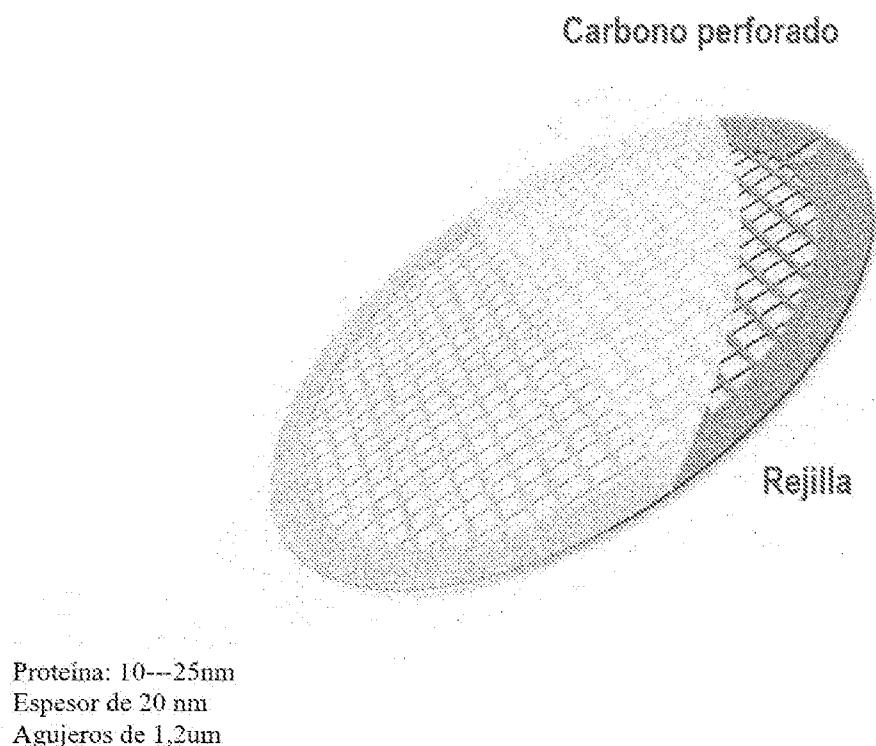


Figura 1a

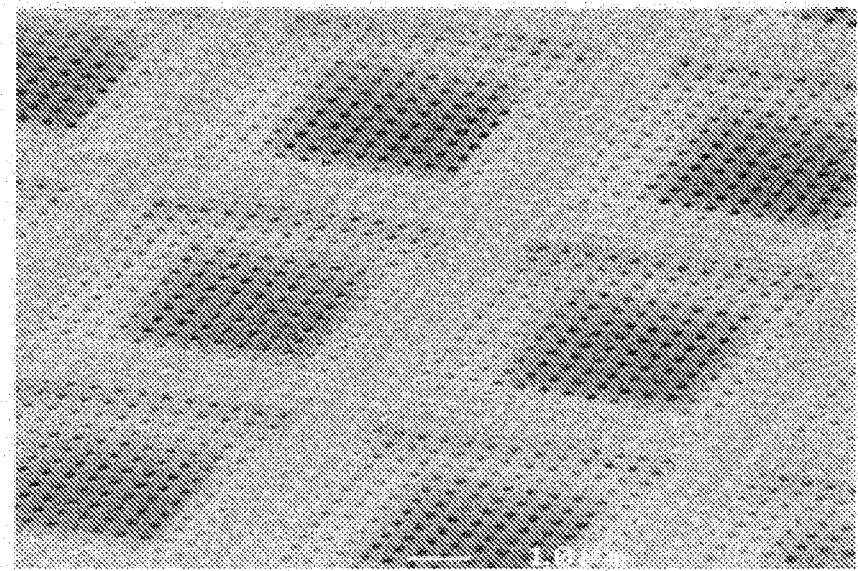


Figura 1b

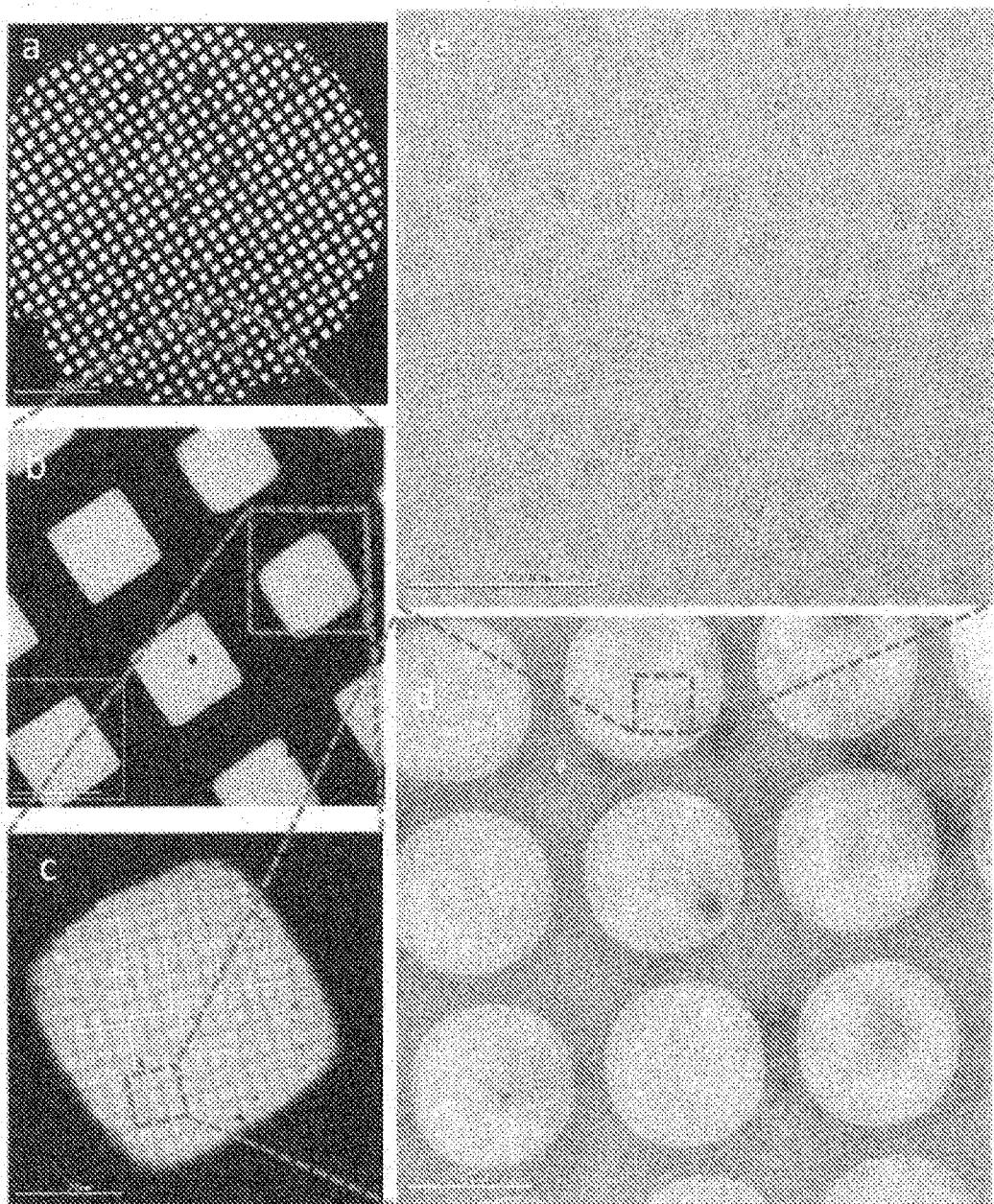


Figura 2a a 2e

ES 3 026 360 T3

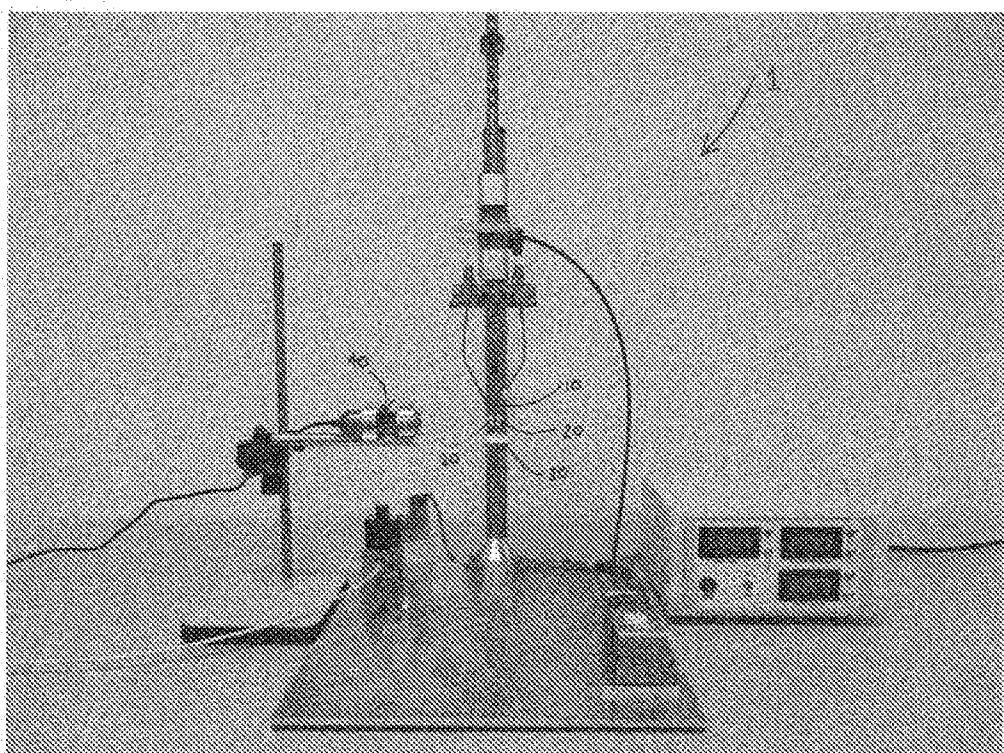


Figura 3

ES 3 026 360 T3

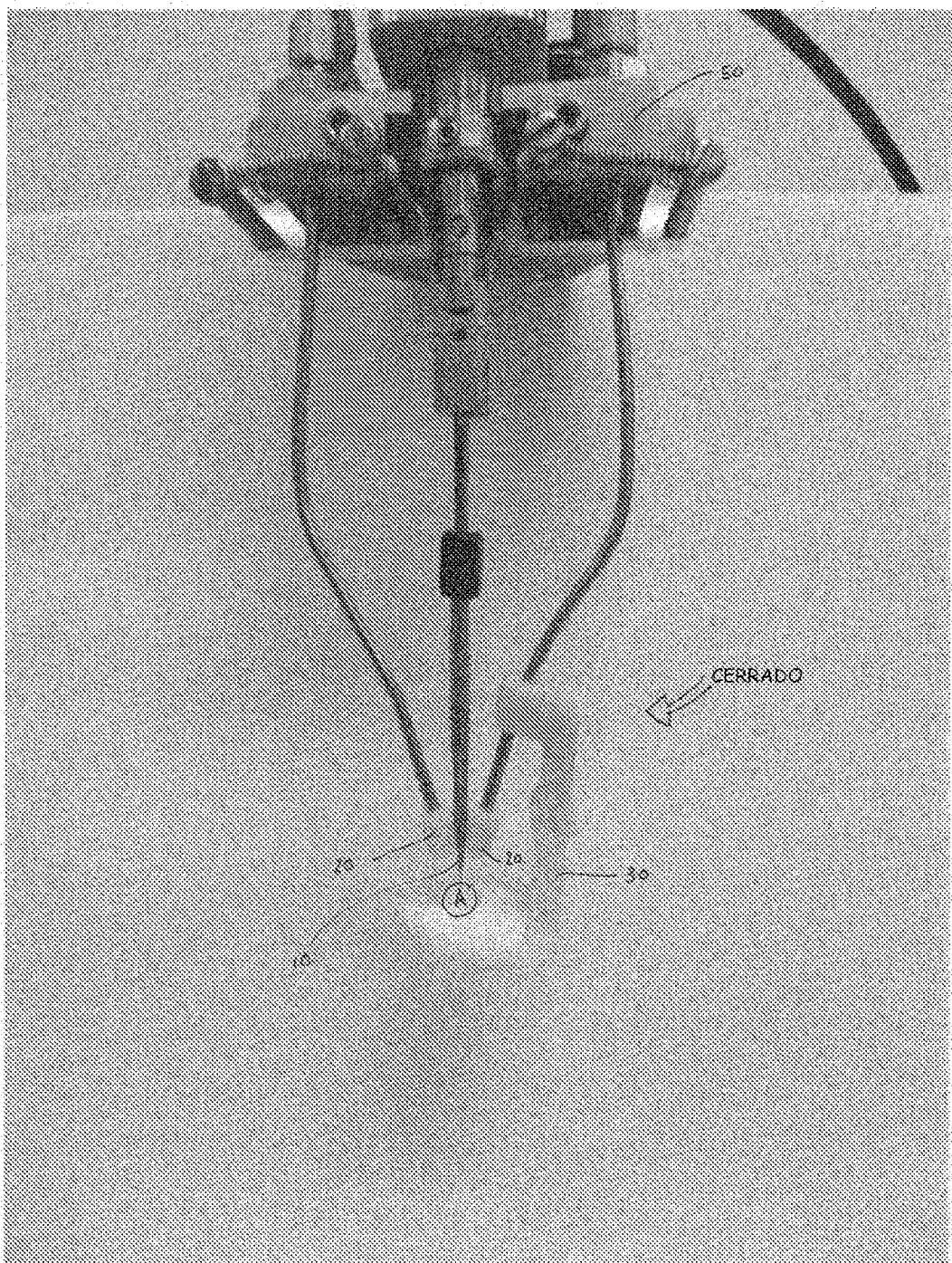


Figura 4a

ES 3 026 360 T3

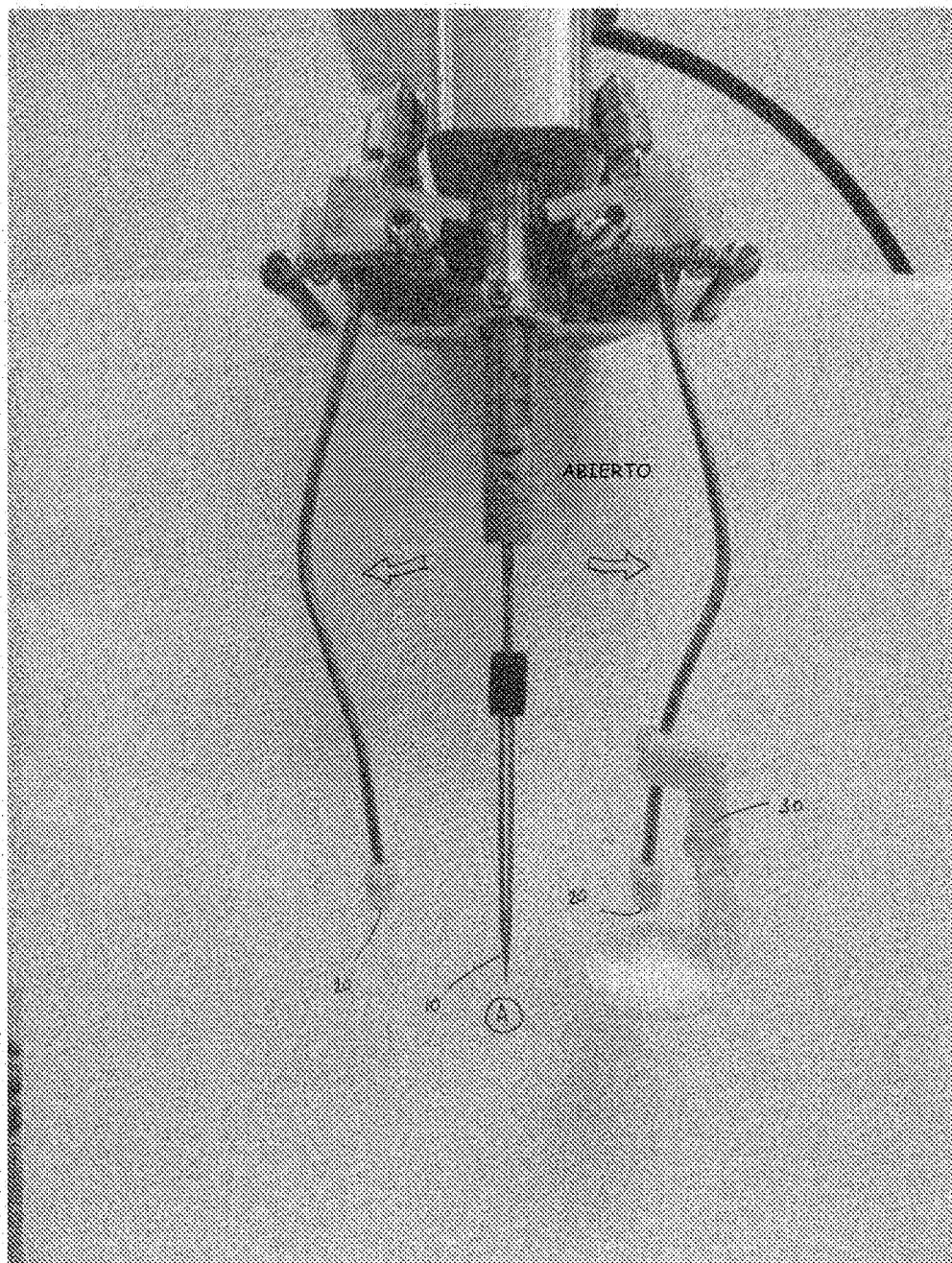


Figura 4b

ES 3 026 360 T3

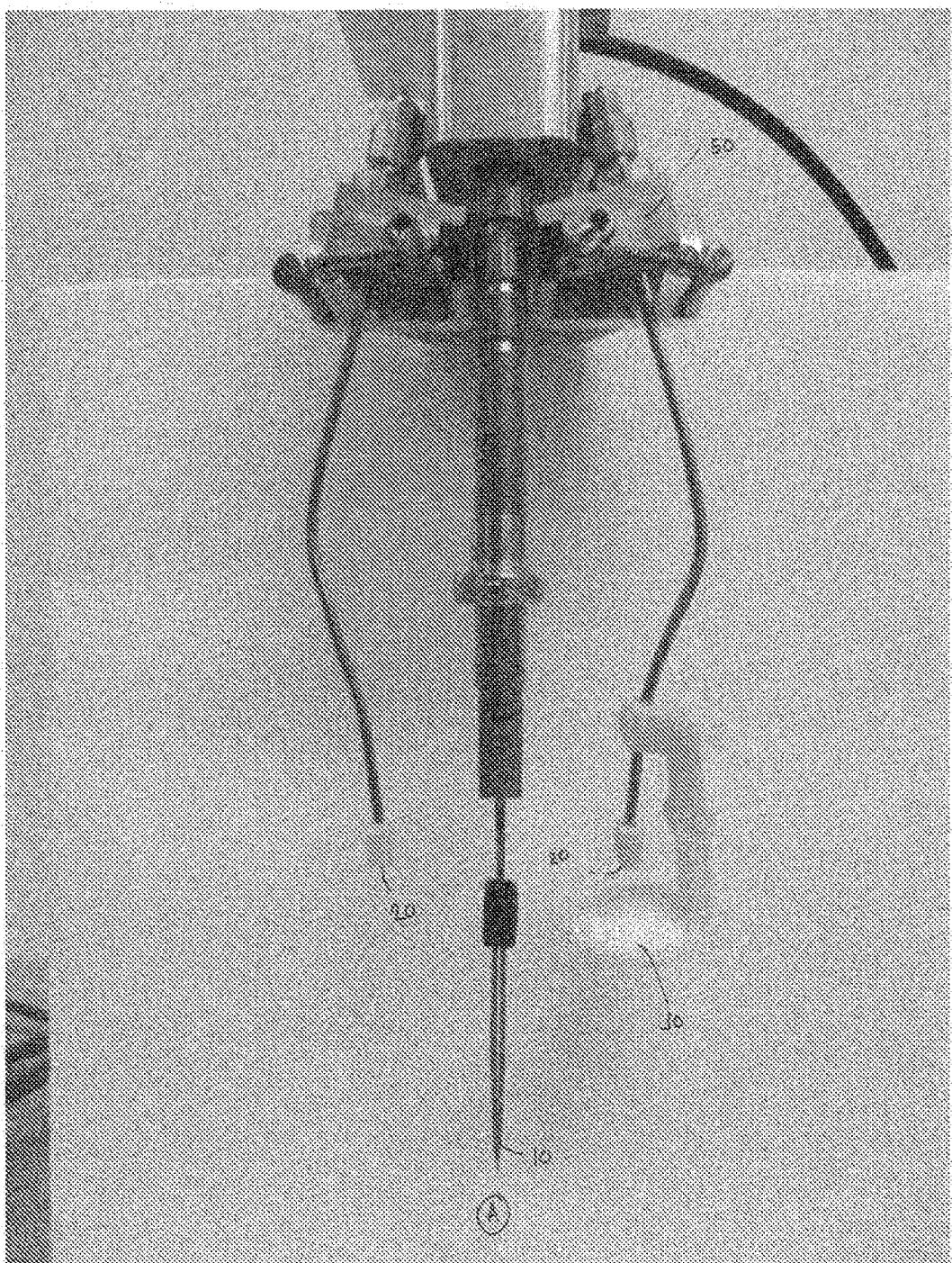


Figura 4c

ES 3 026 360 T3

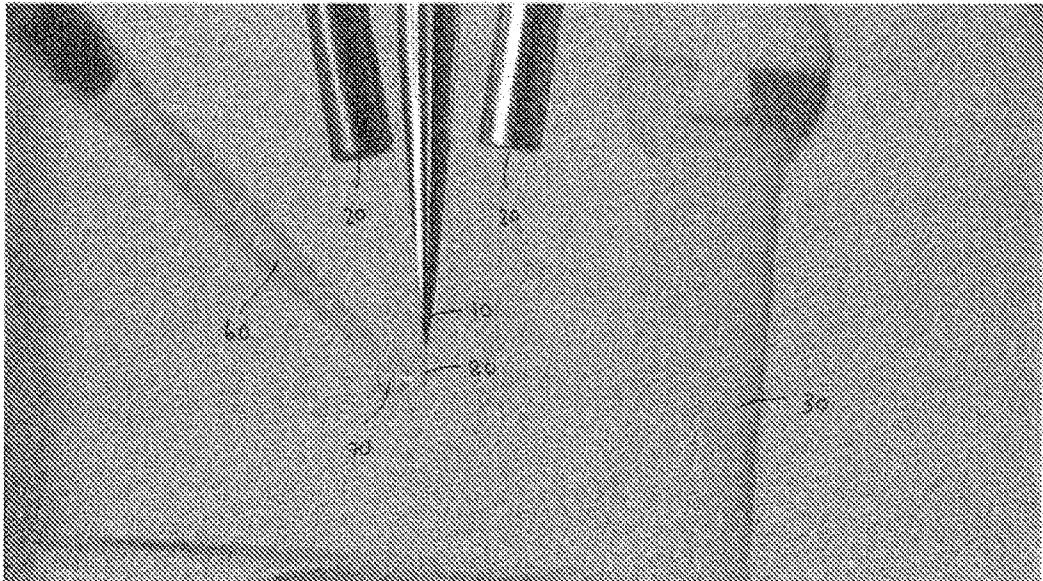


Figura 5

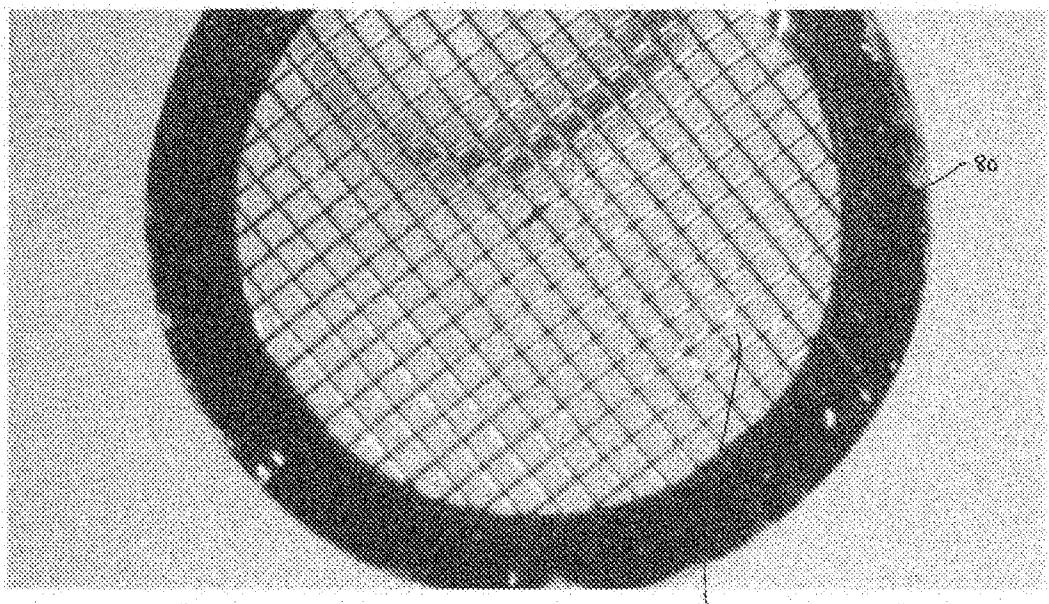


Figura 6

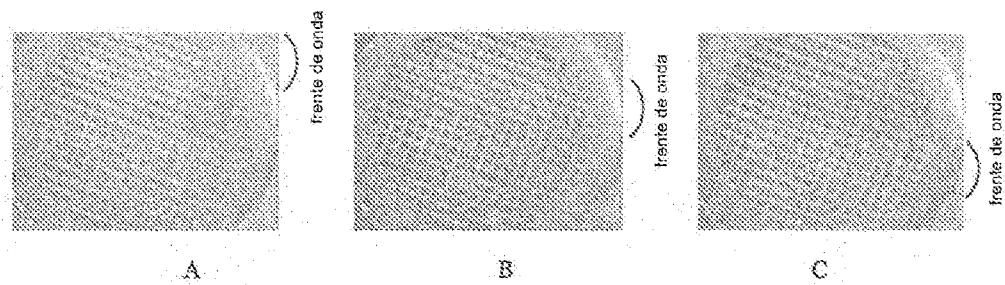


Figura 7

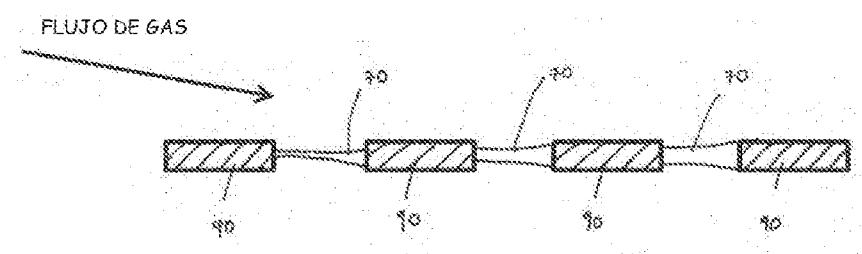


Figura 8a



Figura 8b

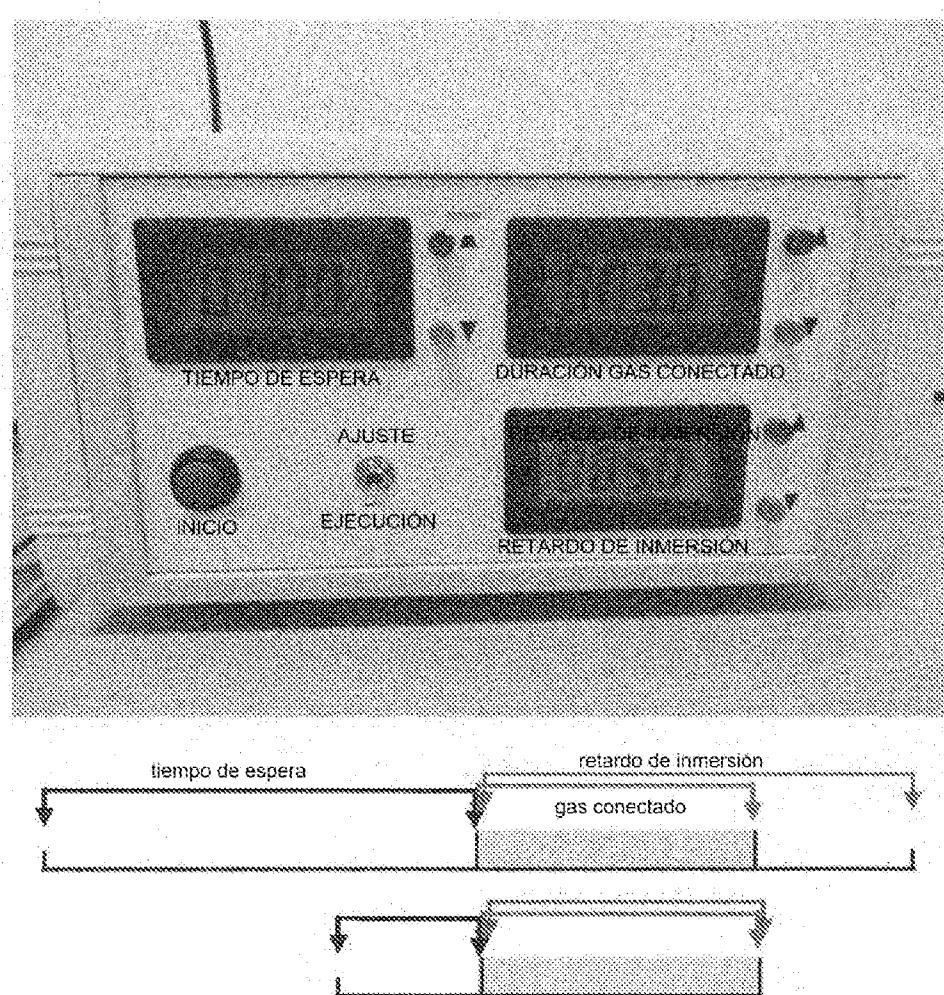


Figura 9

