

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7017565号
(P7017565)

(45)発行日 令和4年2月8日(2022.2.8)

(24)登録日 令和4年1月31日(2022.1.31)

| | |
|-------------------------|-----------------|
| (51)国際特許分類 | F I |
| G 0 1 N 1/42 (2006.01) | G 0 1 N 1/42 |
| G 0 1 N 1/28 (2006.01) | G 0 1 N 1/28 N |
| G 0 1 B 11/06 (2006.01) | G 0 1 B 11/06 G |
| | G 0 1 N 1/28 J |

請求項の数 14 (全35頁)

| | | | |
|-------------------|----------------------------------|----------|---|
| (21)出願番号 | 特願2019-520381(P2019-520381) | (73)特許権者 | 518004543 ユニヴェアズイテート バーゼル スイス国 ツェーハー - 4 0 0 3 パー ゼル、ペータースグラーベン 3 5、フ ィツェレクトラット フォルシュンク |
| (86)(22)出願日 | 平成29年10月17日(2017.10.17) | (74)代理人 | 110000855 特許業務法人浅村特許事務所 |
| (65)公表番号 | 特表2019-537709(P2019-537709 A) | (72)発明者 | ブラウン、トマス スイス国、ミュンヒェンシュタイン、バ ウムガルテンヴェク 2 6 |
| (43)公表日 | 令和1年12月26日(2019.12.26) | (72)発明者 | アーノルト、シュテファン スイス国、ウエリコン、イム グシュタ イク 2 9 |
| (86)国際出願番号 | PCT/EP2017/076467 | (72)発明者 | シュタールベルク、ヘニンク スイス国、ピニンゲン、ロットマンスポ 最終頁に続く |
| (87)国際公開番号 | WO2018/073242 | | |
| (87)国際公開日 | 平成30年4月26日(2018.4.26) | | |
| 審査請求日 | 令和2年10月13日(2020.10.13) | | |
| (31)優先権主張番号 | 16194230.5 | | |
| (32)優先日 | 平成28年10月17日(2016.10.17) | | |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 欧州特許庁(EP) | | |

(54)【発明の名称】 制御試料蒸発による無損失クライオ・グリッド調製

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

支持構造体(20)上の試料を調製するための方法であって、
前記試料が、膜厚を有する薄い薄膜として支持構造体(20)上に提供され、
前記支持構造体(20)の温度が、環境の露点温度よりも上の値に調整され、したがって、
前記膜厚が減少し、
光が前記支持構造体(20)に向けられ、
前記支持構造体(20)によって透過された前記光の少なくとも1つの強度値が測定され、
前記支持構造体(20)が、前記少なくとも1つの測定強度値に応じて液体寒剤(80)
中に自動的に挿入され、したがって、前記試料が、無定形固体まで冷却され、
前記光が、第1の波長の光及び前記第1の波長とは異なる波長の少なくとも1つの追加の
光を含み、前記第1の波長の光及び前記追加の光が、2つの干渉ピークの時間間隔から前
記試料の蒸発率を校正するために、前記試料を同時に照射する、方法。

【請求項 2】

前記支持構造体(20)が、前記少なくとも1つの測定強度値が所定の閾値を超えたとき
、前記液体寒剤(80)中に自動的に挿入される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記支持構造体(20)の温度が、環境の露点温度よりも2°から8°上の値に調整され
る、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

前記膜厚が、温度を環境の露点温度よりも上の値に調整する前にプロットング又は再吸引によって減少する、請求項 1 から 3 までの一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 の波長が、近赤外範囲にあり、詳細には 780 nm 以上である、請求項 1 から 4 までの一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記光が、前記支持構造体 (20) の表面に垂直である光経路 (L) に沿って前記支持構造体 (20) に向けられる、請求項 1 から 5 までの一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記試料が、事前に定義された量の前記試料を毛細管内に吸引することによって、及び前記試料を前記毛細管を用いて前記支持構造体 (20) 上に分配することによって前記支持構造体 (20) 上に提供される、請求項 1 から 6 までの一項に記載の方法。

10

【請求項 8】

追加の較正ステップが実施され、前記光が、前記試料から自由になっている基準支持構造体 (20) に向けられ、前記基準支持構造体 (20) によって透過された前記光の少なくとも 1 つの基準強度値が、測定され、前記試料を支える前記支持構造体 (20) が、前記少なくとも 1 つの測定強度値と前記少なくとも 1 つの基準強度値との比率に応じて前記液体寒剤 (80) 中に自動的に挿入される、請求項 1 から 7 までの一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記第 1 の波長が、 780 nm から 880 nm の間の範囲であり、前記追加の光の波長が、 350 nm から 500 nm の間の範囲である、請求項 1 から 8 までの一項に記載の方法。

20

【請求項 10】

支持構造体 (20) 上の試料を調製するためのシステム (100) であって、試料を収容するように構成される支持構造体 (20) と、前記支持構造体 (20) が温度制御ステージ (1) 上に配置されたとき、前記支持構造体 (20) を事前に定義された温度に維持するように構成される温度制御ステージ (1) と、前記支持構造体 (80) 上の前記試料が液体寒剤 (80) に接触するように、前記支持構造体 (20) を前記温度制御ステージ (1) から前記寒剤 (80) を含む容器 (12) 内に移動させるように構成される移送機構 (60) と

を備え、前記システム (100) は、

30

前記支持構造体 (20) に向ける光を提供するように構成される光源 (13) と、前記支持構造体 (20) によって透過された前記光の少なくとも 1 つの強度値を測定するように構成される光検出器 (14) と、

前記測定強度値を前記光検出器 (14) から受け取り、前記液体寒剤 (80) を含む前記容器 (12) 中に前記支持構造体 (20) が挿入されるように前記移送機構 (60) を前記少なくとも 1 つの測定強度値に応じて作動させるように構成される制御デバイス (30) と

を備え、

前記システム (100) が、調整可能なやり方で前記温度制御ステージ (1) に対して前記支持構造体 (20) を保持するように構成された第 1 のアダプタ (3) を保持するように構成された調整手段 (5) を備え、前記調整手段 (5) が保持手段 (50) を、詳細には電磁石 (50) の形態で備え、前記保持手段 (50) が、前記第 1 のアダプタ (3) を解放可能に保持し、前記試料が前記支持構造体 (20) 上に位置決めされたとき前記第 1 のアダプタ (3) を自動的に解放するように構成され、

40

前記光が、第 1 の波長の光及び前記第 1 の波長とは異なる波長の少なくとも 1 つの追加の光を含み、前記第 1 の波長の光及び前記追加の光が、2 つの干渉ピークの時間間隔から前記試料の蒸発率を較正するために、前記試料を同時に照射することを特徴とする、システム (100)。

【請求項 11】

前記光源 (13) が、光経路 (L) に沿って前記光を放射するように適合され、前記支持

50

構造体（２０）及び前記光検出器（１４）が、前記光経路（Ｌ）に沿って配置され、したがって、少なくとも前記光の一部が、前記支持構造体（２０）を介して前記光源（１３）から前記光経路（Ｌ）に沿って前記光検出器（１４）に進み、詳細には、前記支持構造体（２０）が、前記光経路（Ｌ）に対して垂直に配置されることを特徴とする、請求項１０に記載のシステム（１００）。

【請求項１２】

前記移送機構（６０）が、前記支持構造体（２０）を保持する前記第１のアダプタ（３）に接続されるよう構成され、前記移送機構（６０）が、前記支持構造体（２０）上の前記試料が前記容器（８）内の前記寒剤（８０）に接触するように、前記支持構造体（２０）とともに前記第１のアダプタ（３）を回転させて、前記容器（１２）よりも上の垂直位置に入れ、前記第１のアダプタ（３）及び前記支持構造体（２０）を前記回転後、下方に移動させるように構成されることを特徴とする、請求項１０又は１１に記載のシステム（１００）。

10

【請求項１３】

前記移送機構（６０）が、第２のアダプタ（７）を備え、前記第１のアダプタ（３）と前記第２のアダプタ（７）とが、前記保持手段（５０）が前記第１のアダプタ（３）を解放したとき、互いに係合するように設計され、前記移送機構（６０）が、前記第１のアダプタ（３）が前記第２のアダプタ（７）と係合され前記保持手段（５０）から解放されたとき、前記第２のアダプタ（７）を前記容器（１２）よりも上に回転させるように設計されることを特徴とする、請求項１０から１２までの一項に記載のシステム（１００）。

20

【請求項１４】

前記システム（１００）が、分配ヘッド（１１）を備える液体処理システムを備え、前記液体処理システムが、前記分配ヘッド（１１）を介してある容量の試料を吸引し、分配するように構成され、前記システム（１００）が、第１のタンクをさらに備え、前記第１のタンク内に、ナノリットル容量の試料を含む前記分配ヘッド（１１）が、例えば、前記支持構造体（２０）上の堆積の前の緩衝液の脱塩又は交換のための拡散制御試料調整を可能にするように浸漬することができることを特徴とする、請求項１０から１３までの一項に記載のシステム（１００）。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【０００１】

本発明は、電子顕微鏡法の試料を調製するための調製方法、及び対応するシステムに関する。

【背景技術】

【０００２】

近年、ガラス化標本の透過型電子顕微鏡法（TEM）（cryo-EM；非特許文献１）が、生体物質の高分解能構造解析の強力な技法となっており（非特許文献２）、今や生物学において主流のツールとして次第に認識されている（非特許文献３；非特許文献４；非特許文献５）。いくつかの技術成果により、この進展が可能となっており、最も顕著なのは最近の電子直接検出（DED）カメラの導入と改善されたデータ処理アルゴリズムの利用可能性である（非特許文献６；非特許文献７；非特許文献８）。

40

【０００３】

超低温試料グリッド（クライオEMグリッド）調製及び撮像方法により、生体標本が、電子顕微鏡内の超高真空中に耐え、放射線障害の影響を低減し、生体分子の構造配列を保存する生理学的状態に捕捉されながらそれらの調査をすることを可能にすることが確実になる（非特許文献９；非特許文献１；非特許文献１０）。

【０００４】

しかし、これらの調製方法は、ここ２０年にわたって顕著に改善されておらず、いくつかの大きな欠陥を有する。具体的には、２～４μlの試料容量が必要であるが、ろ紙を用いて行われる幅広いプロットティング・ステップによりグリッド調製中に試料容量の９９．９

50

%が失われる（非特許文献 1 1）。

【 0 0 0 5 】

さらに、ろ紙を用いるプロットイングは、タンパク質の凝集又は変性をもたらすことがある。技術試料調製方法の現状は、クライオEMにおける最も顕著な限界のうちの1つと認識されている（Glaeser, R.M., 2016. How good can cryo-EM become? Nat Methods 13, 28-32）。

【 0 0 0 6 】

試料消費を低減する、改善されたクライオEMグリッド調製戦略は、今や必須条件である。インクジェット・ピコリットル分配をプランジ凍結装置と組み合わせるデバイスが2012年に提示され（非特許文献 1 2）、インクジェット・スポッティングと組み合わせたクライオ・グリッド調製を可能とする自己プロットイング・グリッドの使用によって最近改良された（非特許文献 1 3）。

10

【 0 0 0 7 】

具体的には、先行技術のクライオ・グリッド試料調製方法は、しばしば、結果として様々な厚さ及び品質のガラス化試料薄膜となり、それにより、非制御水分蒸発による画質の低下又は塩アーチファクトがもたらされる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【 0 0 0 8 】

【文献】Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.J., Homo, J.C., Lepault, J., McDowell, A.W., Schultz, P., 1988. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. Q. Rev. Biophys. 21, 129-228

20

Liao, M., Cao, E., Julius, D., Cheng, Y., 2013. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. Nature 504, 107-112

Callaway, E., 2015. The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology. Nature 525, 172-174

Kuhlbrandt, W., 2014. Biochemistry. The resolution revolution. Science 343, 1443-1444

Nogales, E., 2015. The development of cryo-EM into a mainstream structural biology technique. Nat. Methods 13, 24-27

30

Grigorieff, N., 2007. FREALIGN: high-resolution refinement of single particle structures. J. Struct. Biol. 157, 117-125

Lyumkis, D., Brilot, A.F., Theobald, D.L., Grigorieff, N., 2013. Likelihood-based classification of cryo-EM images using FREALIGN. J. Struct. Biol. 183, 377-388

Scheres, S.H.W., Chen, S., 2012. Prevention of overfitting in cryo-EM structure determination. Nat. Methods 9, 853-854

Baker, L.A., Rubinstein, J.L., 2010. Chapter Fifteen-Radiation Damage in Electron Cryomicroscopy. Methods Enzymol

Lepault, J., Booy, F.P., Dubochet, J., 1983. Electron microscopy of frozen biological suspensions. J. Microsc. 129, 89-102

40

Kemmerling, S., Ziegler, J., Schweighauser, G., Arnold, S.A., Giss, D., Muller, S.A., Ringler, P., Goldie, K.N., Goedecke, N., Hierlemann, A., Stahlberg, H., Engel, A., Braun, T., 2012. Connecting μ -fluidics to electron microscopy. J. Struct. Biol. 177, 128-134

Jain, T., Sheehan, P., Crum, J., Carragher, B., Potter, C.S., 2012. Spotiton: a prototype for an integrated inkjet dispense and vitrification system for cryo-TEM. J. Struct. Biol. 179, 68-75)

Razinkov, I., Dandey, V.P., Wei, H., Zhang, Z., Melnekoff, D., Rice, W.J., Wiggle, C., Potter, C.S., Carragher, B., 2016. A new method for vitrifying samples for cryoEM. J. Struct. Biol. 195, 190-198

50

- Arnold, S.A., Albiez, S., Opara, N., Chami, M., Schmidli, C., Bieri, A., Padeste, C., Stahlberg, H., Braun, T., 2016. Total Sample Conditioning and Preparation of Nanoliter Volumes for Electron Microscopy. *ACS nano* 10, 4981-4988
- Kemmerling, S., Arnold, S.A., Bircher, B.A., Sauter, N., Escobedo, C., Dernick, G., Hierlemann, A., Stahlberg, H., Braun, T., 2013. Single-cell lysis for visual analysis by electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 183, 467-473
- (Rohou, A., Grigorieff, N., 2015. CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *J. Struct. Biol.* 192, 216-221
- McLeod, R.A., Kowal, J., Ringler, P., Stahlberg, H. submitted 2016. Robust image alignment for cryogenic transmission electron microscopy 10
- Tang, G., Peng, L., Baldwin, P.R., Mann, D.S., Jiang, W., Rees, I., Ludtke, S.J., 2007. EMAN2: An extensible image processing suite for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 157, 38-46
- Scheres, S.H., 2012. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* 180, 519-530
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605-1612
- Elliott, C., Vijayakumar, V., Zink, W., Hansen, R., 2007. National Instruments LabVIEW: A Programming Environment for Laboratory Automation and Measurement. *JALA* 12, 17-24 20
- Tivol, W.F., Briegel, A., Jensen, G.J., 2008. An improved cryogen for plunge freezing. *Microsc. Microanal.* 14, 375-379
- Engel, A., 2010. Assessing Biological Samples with Scanning Probes, p. 417-431, Springer Berlin Heidelberg
- Bircher, B.A., Lang, H.-P., Duempelmann, L., Gerber, C., Braun, T., 2013. Photothermal excitation of microcantilevers in liquid: effect of the excitation laser position on temperature and vibrational amplitude. *Micro Nano Lett.* 8, 770-774)
- Hale, G.M., Query, M.R., 1973. Optical Constants of Water in the 200-nm to 200- μ m Wavelength Region. *Appl. Opt.* 12, 555-563 30
- Henderson, R., Sali, A., Baker, M.L., Carragher, B., Devkota, B., Downing, K.H., Egelman, E.H., Feng, Z., Frank, J., Grigorieff, N., Jiang, W., Ludtke, S.J., Medalia, O., Penczek, P.A., Rosenthal, P.B., Rossmann, M.G., Schmid, M.F., Schroder, G.F., Steven, A.C., Stokes, D.L., Westbrook, J.D., Wriggers, W., Yang, H., Young, J., Berman, H.M., Chiu, W., Kleywegt, G.J., Lawson, C.L. 2012. Outcome of the first electron microscopy validation task force meeting., pp. 205-214 *Structure* (London, England : 1993), Vol. 20
- Lee, J., Saha, A., Pancera, S.M., Kempter, A., Rieger, J., Bose, A., Tripathi, A., 2012. Shear free and blotless cryo-TEM imaging: a new method for probing early evolution of nanostructures. *Langmuir* 28, 4043-4046 40
- Giss, D., Kemmerling, S., Dandey, V., Stahlberg, H., Braun, T., 2014. Exploring the interactome: Microfluidic isolation of proteins and interacting partners for quantitative analysis by electron microscopy. *Anal. Chem.* 86, 4680-4687
- Elliott, C., Vijayakumar, V., Zink, W., Hansen, R., 2007. National Instruments LabVIEW: A Programming Environment for Laboratory Automation and Measurement. *JALA* 12, 17-24
- Ramakrishnan, C., Bieri, A., Sauter, N., Roizard, S., Ringler, P., Muller, S.A., Goldie, K.N., Enimanev, K., Stahlberg, H., Rinn, B., Braun, T., 2014. openBEB: open biological experiment browser for correlative measurements. *BMC Bioinf.* 50

15, 84

Alduchov, O.A., Eskridge, R.E., 1996. Improved magnus form approximation of saturation vapor pressure. *Journal of Applied Meteorology* 35, 601-609

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、本発明の目的は、上述の先行技術の不利点に対して改善されている試料を調製するための方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

この目的は、独立方法請求項1及び独立システム請求項10の主題によって達成される。従属請求項2から9までは、方法の実施例を表し、従属請求項11から15までは、システムの実施例を表す。本発明を以下に詳細に説明する。

【0011】

本発明の第1の態様は、支持構造体上の試料を調製するための方法に関し、

- 試料が、支持構造体上の膜厚を有する薄膜として提供され、
- 支持構造体の温度が、環境の露点温度よりも上の値に調整され、したがって、膜厚が減少し、
- 光が支持構造体に向けられ、
- 支持構造体によって透過された光の少なくとも1つの強度値が測定され、
- 支持構造体が、少なくとも1つの測定強度値に応じて液体寒剤中に自動的に挿入され、したがって、試料が無定形固体まで冷却される。

【0012】

これは、グリッド上の試料薄膜の薄化が、紙プロットング及びスポットングなしで実現することができ、特に、たった数ナノリットル（例えば、3～20nL）の総試料容量しか必要としないという利点を有する。具体的には、それは、例えば、穴あきカーボンEMグリッド上に微小毛细管によって試料を直接「書き込み」、その後、堆積した液体をガラス化し、ガラス化した標本の薄層をカーボン薄膜の穴部に生成する方法を用いることによって可能である。

【0013】

有利には、制御温度における試料の蒸発と膜厚測定による蒸発監視との組合せにより、定義された及び再現可能な膜厚を用いて自動的に試料を調製することが可能になり、それにより、電子顕微鏡写真の画質が改善され、非制御水分蒸発による塩アーチファクトが回避される。

【0014】

支持構造体は、穴あきカーボン薄膜又は任意の他の適切な構造を有する、周知の電子顕微鏡法（EM: electron microscopy）グリッドでもよく、又はそれを備えることができる。

【0015】

支持構造体上への試料移送は、試料の物理的及び化学的特性により多くのやり方で実施することができる。（i）表面張力効果による支持面上へのナノリットル容量の液滴の直接堆積及びその後の拡散、（ii）支持面上へのナノリットル容量の液滴の堆積、それに続く最初に堆積した容量よりも小さい容量を有する試料の再吸引、（iii）支持構造体表面へのナノリットル容量の液滴の堆積、それに続く支持構造体と液体処理システムとの間の相対運動、その間支持構造体上の堆積した試料を拡散させるために2つの間に液体架橋が依然として確立されている。（iv）支持構造体上の堆積した試料を拡散させるために堆積中に支持構造体と液体処理システムとの相対運動を組み合わせた支持構造体表面へのナノリットル容量の液滴の堆積。

【0016】

本明細書において、nL（ナノリットル）量又は容量とは、詳細には1nLから100n

10

20

30

40

50

1 の範囲の容量、より詳細には 1 n l から 2 0 n l である。

【 0 0 1 7 】

ある実施例において、支持構造体は、温度制御ステージ上に提供される。

【 0 0 1 8 】

ある実施例において、支持構造体の温度は、第 1 のステップにおいて環境の露点温度に調整され、支持構造体の温度は、第 1 のステップに続く第 2 のステップにおいて環境の露点温度よりも上の温度に調整される。

【 0 0 1 9 】

ある実施例において、支持構造体は、少なくとも 1 つの測定強度値が所定の閾値を超えたとき、液体寒剤中に自動的に挿入される。

【 0 0 2 0 】

ある実施例において、支持構造体の温度は、環境の露点温度よりも 2 ° から 8 ° 上の値に調整される。

【 0 0 2 1 】

具体的には、支持構造体の温度を増加させることは、目標温度を露点温度よりも上に、詳細には露点温度よりも 2 ° から 8 ° 上に設定することを表し、支持構造体の温度が、遅延時間の間、初期温度から目標温度に増加する。

【 0 0 2 2 】

ある実施例において、膜厚は、温度を環境の露点温度よりも上の値に調整する前にプロットティング又は再吸引によって減少する。

【 0 0 2 3 】

そのような事前薄化ステップは、試料薄膜が制御蒸発の前にすでに薄い場合、試料の制御蒸発中に、試料がわずかに濃縮されるだけであるという利点を有する。

【 0 0 2 4 】

ある実施例において、光の波長は近赤外範囲にあり、詳細には、波長は 7 8 0 n m 以上である。

【 0 0 2 5 】

試料薄膜の厚さ決定に 7 8 0 n m の赤外光を使用することは、光が水又は生物材料によって顕著に吸収されないという利点を有する。

【 0 0 2 6 】

代替案として、例えば、4 0 5 n m の波長を使用することもできる。

【 0 0 2 7 】

ある実施例において、試料に向けた光は、少なくとも、第 1 の波長の、詳細には 6 0 0 n m から 9 0 0 n m の間の範囲の、より詳細には 7 8 0 n m から 8 8 0 n m の間の範囲の、又は 6 3 0 n m から 6 7 0 の間の範囲の光と、第 2 の波長の、詳細には 3 5 0 n m から 5 0 0 n m の間の範囲の、より詳細には 4 0 5 n m から 4 5 0 n m の間の範囲の光とを含む。

【 0 0 2 8 】

言い換えれば、2 つの波長の組合せ（例えば、4 0 5 n m と 7 8 0 n m ）を使用して、試料を同時に照射することができる。2 つの干渉ピークの時間間隔から、特定の試料蒸発率を校正することができる。

【 0 0 2 9 】

例えば、第 1 の波長は 7 8 0 n m でもよい。例えば、第 2 の波長は 4 0 5 n m 、 4 4 5 n m 、又は 4 5 0 n m でもよい。

【 0 0 3 0 】

ある実施例において、第 1 の波長から第 2 の波長の間の距離は、3 0 0 n m から 4 0 0 n m である。

【 0 0 3 1 】

ある実施例において、第 1 の波長を含む第 1 の光ビーム及び第 2 の波長を含む第 2 の光ビームが、試料に向けられ、試料によって透過された第 1 の光ビームの強度及び試料によって透過された第 2 の光ビームの強度が、別々に検出される。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 2 】

ある実施例において、第 1 の光ビームと第 2 の光ビームは統合され、統合された光ビームが、支持構造体に向けられる。

【 0 0 3 3 】

ある実施例において、試料によって透過された光は、光強度の検出の前に第 1 の透過光ビームと第 2 の透過光ビームとに分割される。

【 0 0 3 4 】

ある実施例において、光は、支持構造体の表面に対して垂直である光経路 (L) に沿って支持構造体に向けられる。

【 0 0 3 5 】

具体的には、そのような垂直設定は、光が、その後の電子顕微鏡写真に撮像される支持構造体 (例えば、EMグリッド) の位置を照射するという利点を有する。

10

【 0 0 3 6 】

さらに、測定された光強度信号の一部を構成する干渉パターンの明瞭度は、垂直設定を使用したときが最高である。

【 0 0 3 7 】

ある実施例において、事前に定義された量の試料を毛細管内に吸引し、毛細管を用いて支持構造体上に試料を分配することによって、試料は支持構造体上に提供される。

【 0 0 3 8 】

ある実施例において、支持構造体は、液体寒剤中への挿入の前に、詳細には旋回運動によって垂直位置にされる。

20

【 0 0 3 9 】

ある実施例において、追加の較正ステップが実施され、光が、試料から自由になっている基準支持構造体に向けられ、基準支持構造体によって透過された光の少なくとも 1 つの基準強度値が、測定され、試料を支える支持構造体が、少なくとも 1 つの測定強度値及び少なくとも 1 つの基準強度値、詳細には少なくとも 1 つの測定強度値と少なくとも 1 つの基準強度値との比率に応じて、液体寒剤中に自動的に挿入される。さらに、2 つの波長を混合するシステムにより、層厚さの絶対較正が可能になる。

【 0 0 4 0 】

「ドライ信号」とも称するそのような基準信号は (したがって、グリッド上の試料薄膜による信号も)、グリッド・タイプ及びメッシュ・サイズに左右される。したがって、説明する実施例の利点は、基準信号を用いて、試料薄膜の厚さ測定をグリッド・タイプ及びメッシュ・サイズから独立して実施できることである。

30

【 0 0 4 1 】

ある実施例において、支持構造体は、ガラス化試料とともに液体寒剤から取り除かれる。

【 0 0 4 2 】

ある実施例において、試料は、支持構造体上に試料を提供する前に調整緩衝液に浸漬される。これにより、例えば、支持構造体上の堆積の前の緩衝液の脱塩又は交換のための拡散制御試料調整が可能になる。

【 0 0 4 3 】

試料調製の前の拡散制御試料調整は、試料の塩濃度が蒸発中に増加するので、制御試料蒸発との組合せにおいて特に有利である。

40

【 0 0 4 4 】

本発明の第 2 の態様は、支持構造体上の試料を調製するための、詳細には本発明の第 1 の態様による方法を適用するためのシステムであって、

- 試料を収容するように構成される支持構造体と、
- 支持構造体が温度制御ステージ上に配置されるとき、支持構造体を事前に定義された温度に維持するように構成される温度制御ステージと、
- 支持構造体上の試料が寒剤に接触するように、支持構造体を温度制御ステージから液体寒剤を含む容器内に移動させるように構成される移送機構とを備え、

50

システムが、

- 支持構造体に向ける光を提供するように構成される光源と、
- 支持構造体によって透過された光の少なくとも1つの強度値を測定するように構成される光検出器と、
- 測定強度値を光検出器から受け取り、液体寒剤を含む容器内に支持構造体が挿入されるように少なくとも1つの測定強度値に応じて移送機構を作動させるように構成される、制御デバイスとを備える、システムに関する。

【0045】

温度制御ステージと、光源及び光検出器からなる光学測定デバイスとの組合せにより、有利には、定義された及び再現可能な膜厚におけるクライオ・グリッドの制御試料蒸発及び調製が可能になる。これにより、電子顕微鏡写真の画質が改善され、非制御水分蒸発による塩アーチファクトが回避される。

10

【0046】

ある実施例において、光源は、光経路に沿って光を放射するように適合され、支持構造体及び光検出器が光経路に沿って配置され、したがって、少なくとも光の一部が支持構造体を介して光源から光経路に沿って光検出器まで進み、詳細には、支持構造体が、光経路に対して垂直に配置される。

【0047】

ある実施例において、システムは、支持構造体を保持するように構成された第1のアダプタを備え、支持構造体上の試料が寒剤に接触するように、移送機構が、支持構造体を保持する第1のアダプタに接続されるように、及び液体寒剤を含む容器内に支持構造体を移動させるように構成される。

20

【0048】

ある実施例において、第1のアダプタは、支持構造体を保持するためのピンセットを備える。

【0049】

ある実施例において、移送機構は、支持構造体上の試料が容器内の寒剤に接触するように、支持構造体とともに第1のアダプタを容器よりも上の垂直位置に旋回させるように、及び第1のアダプタ及び支持構造体を旋回運動後に下方に移動させるように構成される。

【0050】

ある実施例において、システムは、支持構造体を保持するように構成された第1のアダプタを備え、移送機構が、支持構造体を保持する第1のアダプタに接続されるように構成され、移送機構が、支持構造体上の試料が容器内の寒剤に接触するように、支持構造体とともに第1のアダプタを容器よりも上の垂直位置に旋回させるように、及び第1のアダプタ及び支持構造体を旋回運動後に下方に移動させるように構成される。

30

【0051】

ある実施例において、システムは、分配ヘッドを備える液体処理システムを備え、液体処理システムが、分配ヘッドを介して、ある容量の試料を吸引し、分配するように構成される。

【0052】

ある実施例において、システムは、液体処理システムに対して温度制御ステージを移動させ、したがって、分配ヘッドと支持構造体とが、試料を液体処理システムから支持構造体に移送させるために互いに近接することができるように構成される並進ステージ組立品を備える。

40

【0053】

ある実施例において、並進ステージ組立品は、2つの別々の並進ステージを備えることができ、一方は、温度制御ステージ又は支持構造体をX及びY方向（例えば、水平面）に移動させるように構成されるが、他方は、分配ヘッド（例えば、毛細管又は微小毛細管）をZ方向（垂直方向）に位置決めするように構成される。

【0054】

50

代替案として、実施例において、並進ステージ組立品は、すべての次元（X、Y及びZ）において分配ヘッド（例えば、毛細管又は微小毛細管）に対して温度制御ステージ及び支持構造体を位置決めするように構成される、XYZステージ組立品でもよい。

【0055】

ある実施例において、システムは、温度制御ステージに対して第1のアダプタを調整可能なやり方で保持するように構成された調整手段を備える。

【0056】

ある実施例において、調整手段は、第1のアダプタを解放可能に保持するように、及び試料が支持構造体上に位置決めされ、及び詳細には事前に定義された温度を有するとき、詳細には第1のアダプタを自動的に解放するように構成される詳細には保持手段を電磁石の形態で備える。

10

【0057】

ある実施例において、システムは、温度制御ステージに対して第1のアダプタを調整可能なやり方で保持するように構成された調整手段を備え、調整手段が、第1のアダプタを解放可能に保持し、試料が支持構造体上に位置決めされたとき第1のアダプタを自動的に解放するように構成される詳細には保持手段を電磁石の形態で備える。

【0058】

ある実施例において、移送機構は、第2のアダプタを備え、第1のアダプタと第2のアダプタは、保持手段が第1のアダプタを解放したとき互いに係合するように設計される。

【0059】

ある実施例において、移送機構は、第1のアダプタが第2のアダプタと係合し、保持手段から解放されたとき、第2のアダプタを容器よりも上に回転させるように設計される。

20

【0060】

ある実施例において、移送機構は、第2のアダプタを備え、第1のアダプタと第2のアダプタが、保持手段が第1のアダプタを解放したとき、互いに係合するように設計され、移送機構が、第1のアダプタが第2のアダプタと係合し、保持手段から解放されたとき、第2のアダプタを容器よりも上に回転させるように設計される。

【0061】

ある実施例において、移送機構は、運動発生手段を備え、詳細には、第1のアダプタ及び支持構造体が、垂直位置において容器よりも上に位置決めされたとき、第2のアダプタを下方に移動させ、したがって、支持構造体上の試料が容器内の寒剤に接触するように構成される、ソレノイドを備える。

30

【0062】

ある実施例において、分配ヘッドは、液体処理システムの端部における毛細管、詳細には微小毛細管によって形成され、その毛細管は、吸引試料を収容するための先端を備える。

【0063】

具体的には、微小毛細管の内径は、1マイクロメートルから900マイクロメートルの範囲内、より詳細には、1マイクロメートルから100マイクロメートルの範囲内でもよい。

【0064】

ある実施例において、システムは、拡散制御試料調整が可能になるようにナノリットル容量の試料を含む分配ヘッドを浸漬することができる第1のタンクを備える。

40

【0065】

ある実施例において、システムは、分配ヘッドを備える液体処理システムを備え、液体処理システムが、分配ヘッドを介してある容量の試料を吸引し、分配し、システムが、例えば、支持構造体上の堆積の前の緩衝液の脱塩又は交換のための拡散制御試料調整が可能になるようにナノリットル容量の試料を含む分配ヘッドを浸漬することができる第1のタンクをさらに備える。

【0066】

試料調製の前の拡散制御試料調整は、試料の塩濃度が蒸発中に増加するので、制御試料蒸発との組合せにおいて特に有利である。

50

【 0 0 6 7 】

ある実施例において、システムは、第2のタンクを備え、第2のタンクから、ナノリットル容量の試料を含む分配ヘッドが、認知分子を含む少量を吸引することができる。

【 0 0 6 8 】

ある実施例において、光源は、少なくとも、第1の波長の、詳細には600 nmから900 nmの間の範囲の、より詳細には780 nmから880 nmの間の範囲の、又は630 nmから670 nmの間の範囲の光と、第2の波長の、詳細には350 nmから500 nmの間の範囲の、より詳細には405 nmから450 nmの間の範囲の光とを含む光を生成するように適合される。

【 0 0 6 9 】

例えば、第1の波長は780 nmでもよい。例えば、第2の波長は405 nm、445 nm、又は450 nmでもよい。

【 0 0 7 0 】

ある実施例において、第1の波長から第2の波長の間の距離は、300 nmから400 nmである。

【 0 0 7 1 】

ある実施例において、システムは、第1の波長の、詳細には600 nmから900 nmの間の範囲の、より詳細には780 nmから880 nmの間の範囲の、又は630 nmから670 nmの間の範囲の光を生成するように適合された第1の光源と、第2の波長の、詳細には350 nmから500 nmの間の範囲の、より詳細には405 nmから450 nmの間の範囲の光を生成するように適合された第2の光源とを備える。

【 0 0 7 2 】

ある実施例において、システムは、第1の光源から放射され、支持構造体によって（詳細には支持構造体上の試料によって）透過された光を第1の光検出器によって検出できるように位置決めされる第1の光検出器と、第2の光源から放射され、支持構造体によって透過された光を第2の光検出器によって検出できるように位置決めされる第2の光検出器とを備える。

【 0 0 7 3 】

ある実施例において、システムは、第1の波長の光を通過させ、第2の波長の光を反射するように適合される第1のダイクロイック・ミラーを備え、第1のダイクロイック・ミラーが、第1の光源によって放射された光と第2の光源によって放射された光が第1のダイクロイック・ミラーによって統合され、支持構造体に、詳細には支持構造体の表面に対して垂直に向けられるように、位置決めされる。

【 0 0 7 4 】

ある実施例において、システムは、第1の波長の光を通過させ、第2の波長の光を反射するように適合される第2のダイクロイック・ミラーを備え、第2のダイクロイック・ミラーが、支持構造体によって（詳細には支持構造体上の試料によって）透過された光が第1の透過光ビームと第2の透過光ビームとに分割されるように位置決めされ、第1の透過光ビームが、第1の光検出器に向けられ、第2の光ビームが、第2の光検出器に向けられる。

【 0 0 7 5 】

ある実施例において、システムは、第1の波長の、詳細には600 nmから900 nmの間の範囲の、より詳細には780 nmから880 nmの間の範囲の、又は630 nmから670 nmの間の範囲の光を生成するように適合された第1の光源と、第2の波長の、詳細には350 nmから500 nmの間の範囲の、より詳細には405 nmから450 nmの間の範囲の光を生成するように適合された第2の光源と、第1の光検出器と、第2の光検出器と、第1のダイクロイック・ミラーと、第2のダイクロイック・ミラーとを備え、第1及び第2のダイクロイック・ミラーが、第1の波長の光を通過させ、第2の波長の光を反射するように適合され、第1のダイクロイック・ミラーが、第1の光源によって放射された光と第2の光源によって放射された光が第1のダイクロイック・ミラーによって統合され、支持構造体に向けられるように位置決めされ、第2のダイクロイック・ミラーが

10

20

30

40

50

、支持構造体によって（詳細には支持構造体上の試料によって）透過された光が第1の透過光ビームと第2の透過光ビームとに分割されるように位置決めされ、第1の透過光ビームが、第1の光検出器に向けられ、第2の光ビームが、第2の光検出器に向けられる。

【0076】

本発明の他の特徴及び利点を、図を参照して、実施例の詳細な説明を用いて説明する。

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1】本発明によるクライオ・グリッド調製システムの斜視図である。

【図2】本発明によるシステム及び方法の動作原理を示す図である。

【図3】ガラス質氷層の厚さを制御するために試料からの水分蒸発の実時間監視データを示すグラフである。 10

【図4】本発明によるシステム及び方法を使用するクライオ・グリッド調製の概念実証データを示す図である（堆積プロトコル1）。

【図5】本発明によるシステムを使用するクライオ・グリッド調製の概念実証データを示す図である（堆積プロトコル2）。

【図6】高分解能構造分析のために試料を調製するための本発明によるシステムの使用を示す図である。

【図7】制御ソフトウェアのスクリーンショットである。

【図8】温度制御ステージ（露点ステージ）の温度/湿度データを示すグラフである。

【図9】塩効果を示す電子顕微鏡写真である。 20

【図10】アンフィポールで再構成された200kDa膜たんぱく質の電子顕微鏡写真である。

【図11】堆積プロトコル2を用いて堆積させた単一細胞溶解物の電子顕微鏡写真である。

【図12】補正されたフーリエ・シェル相関(FSC: Fourier Shell Correlation)曲線を示すグラフである。

【図13】試料膜厚を測定するための設定の概略を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0078】

図1は、本発明によるシステム100の実施例を示す。システム100は、例えば、微小毛細管11aによって形成された分配ヘッド11とは別に、温度制御ステージ1と、支持構造体20（例えば、EMグリッド）を保持するピンセット2と、ピンセット2を保持する電磁石4と、例えば、温度制御ステージ1上の支持構造体20の平らな位置決めを確実にするための、xyz手動アラインメント5（「運動ステージ」とも称する）の形態の調整手段5であって、温度制御ステージ1上に装着される調整手段5と、ギャップGによって移送機構60（インジェクタ組立品としても示す）上の第2のアダプタ7から分離された、第1のアダプタ3のピンセット2を開閉するためにねじをもってピンセット2上に装着された第1のアダプタ3とを備える。具体的には、2つの引き合う永久磁石、詳細にはNd磁石が、アダプタ3、7の端部に挿入され、第3の永久磁石9、詳細にはNd磁石が、第2のアダプタ7を水平位置に保持している。 30

【0079】

システム100は、温度制御ステージ1よりも上に位置決めされる、光源13、詳細にはレーザ・ダイオード、より詳細には780nm赤外レーザ・ダイオードをさらに備える。光源13は、光経路Lに沿って光ビームを放射するように構成され、支持構造体20の表面が、光経路Lと交差し、したがって、光源13からの光が支持構造体に向けられる。具体的には、光源13及び温度制御ステージ1は、支持構造体20の表面が光経路Lに対して垂直となるように位置決めされる。 40

【0080】

さらに、システム100は、光経路Lにおいて温度制御ステージ1よりも下に位置決めされ、したがって、温度制御ステージ1上の支持構造体20を通して進む、すなわち、支持構造体20によって透過される光が光検出器14に向けられる光検出器14を備え、電気 50

信号が、光検出器 14 によって検出された光の強度により、光検出器 14 によって発生される。光検出器 14 によって発生された信号は、システム 100 の制御デバイス 30 に伝送される。制御デバイス 30 は、試料とともに支持構造体 20 を液体寒剤 80 中に移動させるために指定の光強度値で移送機構 60 を作動させ、それによりガラス化試料を発生させるように適合される。具体的には、移送機構 60 は、以下に指定したように、電磁石 50 を非活性化することによって制御デバイス 30 によって間接的に作動させることができる。

【0081】

支持構造体 20 が穴あきカーボン薄膜を有する EM グリッドであるとき、光源 13 によって放射された光ビームは、薄い試料薄膜も収容する EM グリッドのギャップを通して部分的に透過される。具体的には、透過光の光強度は、液体試料による吸収、並びに詳細には空気 / 液体界面における反射から生じる光散乱及び干渉現象に依存する。したがって、具体的には、光検出器 14 において発生される信号は、支持構造体 20 の試料薄膜の膜厚に左右される。

10

【0082】

具体的には、信号は、個々の支持構造体 20 の異なる特性を補正するために、試料堆積の前に、乾性支持構造体 20 上で測定された基準信号を用いて正規化することができる。

【0083】

一般に、すべての実施例において、温度制御ステージ 1 は、ペルチェ・コントローラによって制御される水冷式ペルチェ素子を備えることができる。ペルチェ・コントローラは、ステージ 1 上に装着された温度センサからのステージ温度を得る。実際の露点温度は、実験室の内側の周囲温度及び相対湿度の両方を測定し、露点温度を連続的に計算する露点センサによって提供することができ、それは制御ソフトウェアを介してペルチェ・コントローラにフィードバックされる。

20

【0084】

本発明による方法において、支持構造体 20 の温度は、制御されたやり方で試料薄膜を部分的に蒸発させるために温度制御ステージ 1 を用いて露点温度よりも上に設定される。蒸発中、試料層の膜厚は、光源 13 及び光検出器 14 を用いて監視することができ、したがって、試料ガラス化を指定の膜厚において作動させることができる。

【0085】

以下において、移送機構 60 の機能を詳細に記述する。

30

【0086】

システム / 移送機構 60 は、例えば、30 mm ハブを有するソレノイド 8 と、ピンセット 2 がスイッチに当たっているとき閉じており、それにより、ソレノイド 8 が作動し、支持構造体 20 が容器 12 に含まれる寒剤 80 中に下方移動する、二次電気回路 10 とをさらに備える。

【0087】

支持構造体 20 は、アダプタ 3 の小さなピンセット 2 によって保持される。ピンセット 2 は、例えば、2 つのねじによって前記第 1 のアダプタ 3 にしっかりと装着される。例えば、第 3 のねじにより、ピンセット 2 の開閉が、それらに圧力を印加することによって可能になる。この第 1 のアダプタ 3 の後端は、永久磁石、詳細には挿入されたネオジウム磁石を有する。

40

【0088】

支持構造体 20、ピンセット 2、及び第 1 のアダプタ 3 は、組立品を形成する。この組立品は、例えば、ピンセット 2 に接触している前記電磁石 50 の形態の保持手段 50 によって水平位置に保持される。電磁石 50 自体は、支持構造体 / グリッド 20 を温度制御ステージ 1 と位置合せするために、すべての次元において手動位置合せを可能にする前記調整手段 5 に装着され、その場合、グリッド 20 は、良好な熱的接触及び効果的な試料堆積のために平らにならなければならない。

【0089】

50

例えば、複数の電動リニア・ステージの組合せを備える並進ステージ組立品 6 は、温度制御ステージ 1 上の支持構造体 20 の表面よりも上の微小毛細管先端 11 の精密な位置決めを可能にする。分配ヘッド 11 及びグリッド 20 の表面は、試料を分配ヘッド 11 から支持構造体（例えば、グリッド）20 に移送するために近接される。

【0090】

詳細には、調整手段 5 は、温度制御ステージ 1 上に装着されるが、分配ヘッド 11 は、図 1 に示さない適切な保持手段によって保持することができる分配ヘッド 11 に対して温度制御ステージ 1 がステージ組立品 6 によって移動させることができるように、温度制御ステージ 1 に接続されない。詳細には、前記微小毛細管先端（分配ヘッド）11 は、支持構造体 20 に対して微小毛細管の垂直位置の調整を可能にする、別個の Z 軸ステージ上に装着される。詳細には、ステージ組立品 6 は、温度制御ステージを X Y 平面において自動的に移動させることを可能にし、X Y 平面に沿ってステージ 6 が延びる。

10

【0091】

前記試料移送は、試料の物理的及び化学的特性により多くのやり方で実施することができる。（i）表面張力効果による支持構造体 20（例えば、EMグリッド）上へのナノリットル容量の液滴の直接堆積及びその後の拡散、（ii）支持構造体 20（例えば、EMグリッド）上へのナノリットル容量の液滴の堆積、それに続く最初に堆積した容量よりも小さい容量を有する試料の再吸引、（iii）支持構造体 20（例えば、EMグリッド）上へのナノリットル容量の液滴の堆積、それに続く EMグリッドと微小毛細管先端 11 との間の相対運動、その間支持構造体 20（例えば、EMグリッド）上の堆積した試料を拡散させるために 2 つの間に液体架橋が依然として確立されている。（iv）支持構造体 20 上の堆積した試料を拡散させるために堆積中に支持構造体 20（例えば、EMグリッド）及び微小毛細管先端 11 の相対運動と組み合わせた支持構造体 20（例えば、EMグリッド）上へのナノリットル容量の液滴の堆積。

20

【0092】

移送機構（受け渡し機構）60 は、一方の端部において挿入された永久磁石、詳細にはネオジウム磁石も有し、他方の端部において回転ヒンジ 61 を介して大きなソレノイド 6 と接続される第 2 のアダプタ 7 を備える。この第 2 のアダプタ 7 を水平位置に維持するために、第 3 の永久磁石、詳細にはネオジウム磁石が、それに応じて配置される。第 1 及び第 2 のアダプタ 3、7 は、小さなギャップ G によって分離される。2 つの挿入磁石は、互いに引き合うが、しかし、2 つの結合は、組立品 20、2、3（例えば、ピンセット 2）をしっかりと保持する電磁石 50 によって妨げられる。

30

【0093】

試料堆積後、超低温液体 80、通常、エタン又はエタン/プロパン（40/60）の混合物中への支持構造体（例えば、EMグリッド）20 の急速注入が、支持構造体 20 上の試料薄膜の所望の厚さにおいて行われなければならない。これは、光検出器 14 によって測定された、支持構造体 20 によって透過された光の指定の光強度値における制御デバイス 30 からの制御信号を用いて電磁石 50 をオフにすることによって実施される。

【0094】

電磁石 50 をオフにすることにより、2 つのアダプタ 3、7 が、互いにかみ合い、新たな、より重い組立品を形成することが可能になる。この新たな組立品は、あまりに重すぎて、第 3 の永久（例えば、ネオジウム）磁石によって元の位置に保持されない。組立品は垂直位置（第 2 のアダプタ 7 の反対側のヒンジ 61）に素早くはまる。組立品が垂直位置に達した場合、それは、前後に跳ねるのを防止するために別の磁石によって所定位置に保持される。同時に、電気回路が、落下する組立品（例えば、スイッチ）の金属部分を通して閉じる。これにより、ソレノイド・コントローラを制御する二次電気回路 10 が作動する。結果として、ソレノイド 8 が始動され、30 mm ハブが下方に発射され、最後に支持構造体（例えば、EMグリッド）20 を容器 12 内の寒剤 80 中に注入する。ソレノイド 8 をオンにすることから支持構造体 20 が寒剤 80 中に発射されるまでのプロセス全体は、第 2 の時間の 3 分の 1 以内に行われ、堆積した液体薄膜のガラス化が可能になる。

40

50

【 0 0 9 5 】

図 2 は、本発明によるシステム及び方法の動作原理を示す。図 2 A に示すように、標準穴あきカーボン薄膜 EM グリッド（支持構造体）20 が、ピンセット 2 の先端の間に装着され、温度制御ステージ 1（露点ステージとも称する）におけるスロットに平ら（水平）に位置決めされる。ステージ温度は、露点温度に近接して設定され、PID ベルチェ・コントローラを使用して調節することができる。EM グリッド 20 は、ステージ 1 と良好な熱的接触をしている。露点ステージ 1 は、電動 x y 軸に装着されて、微小毛細管（分配ヘッド）11 に対してグリッド 20 を移動させ、それは、グリッド 20 よりも数マイクロメートル上まで下げることができる。この微小毛細管 11 は、数ナノリットルの試料を堆積させるが、ステージ 1 は、波状パターンで移動しており、約 0.5 mm^2 の面積に及ぶ。

10

【 0 0 9 6 】

図 2 B に示すように、試料堆積後、微小毛細管 11 は引き込まれ、ステージ 1 は、IR レーザ（光源）13（ $\lambda = 780 \text{ nm}$ ）とフォトダイオード（光検出器）14 との間でグリッド 20 を位置決めするように移動する。グリッド上の薄い水性試料薄膜からの光散乱及び干渉効果は、水分が蒸発するにつれて変化する（図 3 及び 8 参照）。

【 0 0 9 7 】

図 2 C に示すように、フォトダイオード 14 の信号が定義された閾値レベルに達したとき、作動により、プランジ凍結が自動的に開始する。ピンセット 2 及びグリッド 20 は、90 度だけ垂直位置にはじかれ、寒剤 8 中に突入されて、ステージ 1 から急速に引き込まれる。このピック・アンド・プランジ・プロセス全体は数百ミリ秒かかる。

20

【 0 0 9 8 】

図 3 は、ガラス質氷層の厚さを制御するための試料からの水分蒸発の実時間監視データを示す。 780 nm レーザの透過光は、水 - 層の厚さの変化を登録するのに使用される（図 2 B 参照）。紫色（静止）線は、乾性グリッド（ドライ信号）を用いて得た信号である。赤色線は、水分蒸発中の試料堆積後に記録されたセンサ信号である（ステージ温度は露点よりも 2°C 高い）。経験的に、センサ信号がドライ信号の約 95%（青色線）であるとき、有効なグリッドが得られることが分かった。ピック・アンド・プランジ機構は、この閾値に達したとき（矢印で示す）作動され、クライオ・グリッドの急速なガラス化（数百ミリ秒以内）及び光レーザ経路からグリッドが取り除かれたときの信号の急増をもたらす。図表は試料が蒸発するのに伴う時間に対する信号の特徴的な進展を示していることに留意されたい。このグラフは、露点からの小さなオフセット（ 2°C ）において長時間にわたって蒸発する大きな容量（ 20 nL ）を示すので、明確にするために選択された。実際には、より少ない試料が堆積し（又はあらかじめ再吸引され）、最後の数秒の図表しか記録することができない。

30

【 0 0 9 9 】

図 4 は、本発明によるシステム及び方法を使用するクライオ・グリッド調製の概念実証データを示す（堆積プロトコル 1、以下の実例参照）。 20 nL の全試料容量が Quantifoil Cu 200 メッシュ R2 / 1 グリッドに適用された。過剰液体は、可能な限り多くの試料を回収するために再吸引された。露点ステージ温度は、常に露点よりも 8°C 上であり、それは結果として急速な試料薄化となった。グリッド・ピック・アンド・プランジ機構は、過剰試料の再吸引直後に自動的に作動された。

40

【 0 1 0 0 】

図 4 A は、ガラス質の氷の薄い薄膜を示す調製グリッドの典型的な概観を示す。黄色の矢印は、試料の境界を示す。差し込み図：可視性を改善するための、コントラスト調整後の境界領域の 4 倍拡大。ガラス質試料の均質層に留意されたい。スケール・バー： $100 \mu \text{m}$ 。

【 0 1 0 1 】

図 4 B は、穴部における均質試料層を示すより高倍率の概観画像を示す。スケール・バー： $2 \mu \text{m}$ 。

【 0 1 0 2 】

50

図 4 C は、この方法によって調製され、高倍率で、及びコントラストを上げるために焦点をぼかして撮像された、T r i s - H C l 緩衝液中のアポフェリチン粒子及びバクテリオファージを示す。差し込み図：バクテリオファージ・テール及び少数の環形状アポフェリチン複合体を示す指示領域の 2 倍拡大。スケール・バー：8 0 n m。

【 0 1 0 3 】

図 5 は、本発明によるシステムを使用するクライオ・グリッド調製の概念実証データ及び堆積プロトコル 2 を示す（以下の実例参照）。それぞれの場合において、3 n L 試料容量がグリッドに直接適用された。試料は再吸引されなかった。グリッドは、制御水分蒸発による試料薄化後にガラス化された。

【 0 1 0 4 】

図 5 A は、Q u a n t i f o i l C u 4 0 0 メッシュ R 2 / 2 グリッドの中央の 3 n L 試料容量（P B S 緩衝液中のウレアーゼ）の概観画像を示す。図 4 に関しては、層厚さは、ある領域において勾配を有することに留意されたい。ガラス質の氷の周辺は黄色の矢印で示す。スケール・バー：1 0 0 μ m。

【 0 1 0 5 】

図 5 B は、アンフィポールで再構成された繊細な 2 0 0 k D a 膜たんぱく質の画像を示す。差し込み図：たんぱく粒子を明確に示す指示領域の 2 倍拡大。スケール・バー：8 0 n m。

【 0 1 0 6 】

図 5 C は、単一付着真核細胞からの溶解物の無損失クライオ・グリッド調製の実例を示す。機能性 I T O 光学顕微鏡スライド上で成長する個々の H E K 細胞がエレクトロポレーションによって溶解され、3 n L の全容量が迅速に吸引された。その後、溶解物は、プロトコル 2 を使用してグリッド上で分配され、ガラス化された。スケール・バー：8 0 n m。

【 0 1 0 7 】

図 6 は、高分解能構造分析の試料を調製するための本発明によるシステムの使用を示す。P B S 緩衝液中の 2 0 n L 容量のウレアーゼが、堆積プロトコル 1 を使用して Q u a n t i f o i l C u 2 0 0 メッシュ R 1 . 2 / 1 . 3 グリッド上に堆積された（以下の実例参照）。

【 0 1 0 8 】

図 6 A は、ガラス質の氷に埋め込まれたウレアーゼ粒子の、ドリフト補正されたクライオ E M 画像を示す。差し込み図：高コントラストによる粒子。スケール・バー、5 0 n m。

【 0 1 0 9 】

図 6 B は、最初に選択された 1 0 , 0 0 0 粒子のうちの ~ 3 , 4 0 0 を含む 2 D クラス平均を示す。スケール・バー、5 n m。

【 0 1 1 0 】

図 6 C は、さらに処理するために識別された 8 7 0 0 粒子のうちの ~ 5 , 3 7 0 を含む 3 D クラス平均を示す。スケール・バー、5 n m。

【 0 1 1 1 】

図 6 D は、3 回軸に対して垂直に見た、5 . 0 3 分解能におけるウレアーゼ密度地図を示す。組み込まれた X 線モデルのバックボーンを示す（D O I : 1 0 . 2 2 1 0 / p d b 4 z 4 2 / p d b ）。

【 0 1 1 2 】

図 7 は、液体処理制御プラグイン（右上）、試料堆積中の微小毛細管及び E M グリッドの監視カメラ写真（右下）、及び自動化のためのマクロパネル（左）を示す制御ソフトウェアのスクリーンショットを示す。

【 0 1 1 3 】

図 8 A は、2 3 ° C の室温における 8 つの異なる部屋の r H に対して作図された、露点ステージ（D P ステージ：d e w p o i n t s t a g e ）温度対ステージ / グリッド微環境の相対湿度（r H : r e l a t i v e h u m i d i t y ）のデータを示す。露点温度からの小さな正のオフセット（例えば、+ 2 ° C ）に対して、図表は、ほぼ直線であり、

10

20

30

40

50

すべての8つのシナリオに対して同様の傾きを有する。

【0114】

図8Bは、23°Cにおける部屋のrHに対する、3つの異なるrH微環境をDPステージ上に作り出す必要がある露点温度からのオフセットの依存関係を示す。90%rH微環境をDPステージ上に作り出す必要があるオフセットは、部屋のrHが20%~90%変化したとき、0.3度未満だけ変動する。

【0115】

図8Cは、水の層に対して垂直に入射する理想的なコヒーレント青色(405nm)又は赤外(780nm)レーザー光の透過率の簡単なシミュレーションを示す。透過率は、水層の厚さに対して作図される(Concise Macleodソフトウェア、Thin Film Center Inc.、USA)。

10

【0116】

図8Dは、赤外(赤色線、 $\lambda = 780\text{nm}$)又は青色レーザー(青色線、 $\lambda = 405\text{nm}$)を用いて測定された、グロー放電されたEMグリッド(Quantifoil Cu 200メッシュ、R2/1)上に堆積した20nlのウォーター・スポットの完全蒸発に対する正規化振幅対時間データを示す。グリッドは、露点よりも3°C上に維持された。いくつかの独立した実験が、両方の波長に対して異なるグリッド上で実行され($n = 5$ 、点線)、平均結果が計算された(実線)。干渉パターンの明瞭度は、(i)使用されたレーザー・ダイオードの好ましくないコヒーレンス長、(ii)グリッドに対するレーザーの不正確な傾斜配置、及び(iii)照射領域上の不均一な膜厚により、悪化することに留意されたい。

20

【0117】

図9は、過剰な水が試料薄化中に蒸発したときに起こる塩効果の実演を示す。0.1%のデシル-3-D-マルトピラノシド(DM)を含むPBS中のタバコ・モザイク・ウイルス(TMV: Tobacco mosaic virus)試料が、本発明によるシステム及び堆積プロトコル2を使用してクライオEM用に調製された(以下の実例参照)。

【0118】

図9Aは間違った試料薄化を示し、過剰な試料がグリッド上に残され、及び/又は薄化の前に十分に広く拡散しなかった。結果として、小さな塩結晶(高コントラスト)が背景に見え、TMVの反復構造の分解能が減少している。

30

【0119】

図9Bは、正しい試料薄化を示す。TMVの23反復が、生の画像に明確に見え、ガラス化した氷の背景は、低コントラストを有する。図9A及び図9Bの差し込み図: 指示領域の2倍拡大。スケール・バー: 80nm。

【0120】

図10は、アンフィポールで再構成された200kDa膜たんぱく質の電子顕微鏡写真を示す。試料は、異なるやり方で顕微鏡使用のために調製された。クライオEMグリッドは、同じ日に調製された。5 μM のアジ化ナトリウムを用いて補完されたHEPES緩衝液中の再構成たんぱく質の同じ試料ストックが全体を通して使用された。

【0121】

図10Aは、ネガティブ染色されたグリッド(2%酢酸ウラニル)の電子顕微鏡写真を示す。

40

【0122】

図10Bは、代表的なVitrobot plunge-freezerを使用して調製されたクライオEMグリッドからの電子顕微鏡写真を示す。Vitrobotに使用されたプロトコルは以下の通りであった: 300メッシュのレース状銅製グリッドが60秒間グロー放電され、液体エタンにおけるプランジ凍結のためにVitrobotに供給された。装荷されたたんぱく質試料の量、2.5 μL ; 待機時間、5秒; プロットティング力、1; プロットティング時間、3秒; プロットティング・ペーパー、Whatman #1 qualitative; 湿度100%、チャンバは10°Cで平衡化。

50

【 0 1 2 3 】

図 1 0 C は、本発明によるデバイスを使用して調製されたクライオ・グリッド (Q u a n t i f o i l 2 0 0 メッシュ、R 2 / 2) からの電子顕微鏡写真を示す (プロトコル 2 、以下の実例参照) 。 3 n L 試料容量。差し込み図：指示領域の 2 倍拡大。スケール・バー：8 0 n m 。

【 0 1 2 4 】

図 1 1 は、プロトコル 2 を用いて堆積させた単一細胞溶解物の電子顕微鏡写真を示す (以下の実例参照) 。

【 0 1 2 5 】

図 1 1 A は、連続カーボンの追加の層を有する穴あきカーボン・グリッド (Q u a n t i f o i l 2 0 0 メッシュ R 2 / 2) からの電子顕微鏡写真を示す。連続カーボン層のわずかなしわ及びそれ以外の場合の均質氷層に留意されたい。

10

【 0 1 2 6 】

図 1 1 B は、連続カーボン薄膜なしの穴あきカーボン・グリッド (Q u a n t i f o i l 2 0 0 メッシュ R 2 / 1) からの電子顕微鏡写真を示す。穴部内の勾配に留意されたい。差し込み図は、単一細胞試料に見出される典型的な膜パッチを示す。スケール・バーは、概観には 2 μ m 及び差し込み図には 8 0 n m を表す。

【 0 1 2 7 】

図 1 2 は、ウレアーゼ地図の最終仕上げ後の補正されたフーリエ・シェル相関 (F S C) 曲線を示す。「至適基準」によれば、F S C = 0 . 1 4 3 である周波数は、3 D 再構成の分解能を示す。ここで、対応する空間周波数は、0 . 1 9 9 A ⁻¹ であり、5 . 0 3 A の予測分解能を得る。

20

【 0 1 2 8 】

図 1 3 は、試料膜厚を測定するための設定の概略を示し、それは、本発明による、支持構造体 2 0 上の試料を調製するためのシステム 1 0 0 の一部である。設定は、第 1 の波長の第 1 の光ビーム L 1 を光経路 L に沿って支持構造体 2 0 上に放射するように構成される第 1 の光源 1 3 a と、光経路 L に対して垂直の第 2 の波長の第 2 の光ビーム L 2 を放射するように構成される第 2 の光源 1 3 b とを備える。

【 0 1 2 9 】

具体的には、第 1 の波長及び第 2 の波長は、3 0 0 n m から 4 0 0 n m の距離を有する。例えば、第 1 の光ビーム L 1 は、7 8 0 n m の波長の光を含むことができ、第 2 の光ビームは、4 0 5 n m の波長の光を含むことができる。

30

【 0 1 3 0 】

第 1 の光ビーム L 1 及び第 2 の光ビーム L 2 は、第 1 の光ビーム L 1 が第 1 のダイクロイック・ミラー 1 5 a を通過するように構成される第 1 のダイクロイック・ミラー 1 5 a に向けられ、第 2 の光ビーム L 2 は、第 1 のダイクロイック・ミラー 1 5 a によって反射される。第 1 の光ビーム L 1 及び第 2 の光ビーム L 2 は、第 1 のダイクロイック・ミラー 1 5 a を用いて統合され、詳細には支持構造体 2 0 の表面に対して垂直である光経路 L に沿って、支持構造体 2 0 に向けられる。少なくとも統合された光ビームの一部は、試料を含む支持構造体 2 0 によって透過され、透過光ビーム T が、発生される。

40

【 0 1 3 1 】

例えば、第 1 の光ビーム L 1 は、第 2 の光ビーム L 2 よりも長い波長の光を含むことができ、第 1 のダイクロイック・ミラー 1 5 a は、第 1 の光ビーム L 1 の光を通過させるように適合されたロング・パス・ダイクロイック・ミラー (ロング・パス・フィルタとして働く) でもよく、第 2 の光ビーム L 2 の光は、通過することが可能ではないが、第 1 のダイクロイック・ミラー 1 5 a によって反射される。代替案として、第 1 の光ビーム L 1 が、第 2 の光ビーム L 2 よりも短い波長の光を含む場合、第 1 のダイクロイック・ミラー 1 5 a は、ショート・パス・ダイクロイック・ミラー (ショート・パス・フィルタとして働く) でもよい。

【 0 1 3 2 】

50

設定は、透過光ビームTを第1の透過光ビームT1と第2の透過光ビームT2とに分割するように適合される第2のダイクロイック・ミラー15bをさらに備える。第2のダイクロイック・ミラー15bは、第1の透過光ビームT1の光を通過させ、第2の透過光ビームT2を反射し、したがって、第1の透過光ビームT1が第1の光検出器14aに向けられ、第2の透過光ビームT2が第2の光検出器14bに向けられるように構成される。第1の光検出器14aは、第1の開口部16aを用いて入射光から保護され、第2の光検出器14bは、第2の開口部16bを用いて入射光から保護される。

【0133】

第1のダイクロイック・ミラー15aと同様に、第2のダイクロイック・ミラー15bは、ロング・パス・ダイクロイック・ミラー又はショート・パス・ダイクロイック・ミラーでもよい。

10

【0134】

第1及び第2の光検出器14a、14bは、検出された光(それぞれ、第1又は第2の透過光ビームT1、T2)の強度による信号を発生するように適合される。第1及び第2の光ビームL1、L2が別々の波長の光を含むとき、支持構造体20上の試料薄膜の厚さは、第1及び第2の光検出器14a、14bによって発生された2つの信号を用いて決定することができる。

【0135】

本発明は、以下の実例によってさらに説明する。

【0136】

実例 - ナノリットル・サイズのたんぱく質試料及び単一細胞抽出液からのプロットィング・フリー及び無損失クライオ電子顕微鏡法グリッド調製

20

材料及び方法

ここに提示する器具は、本明細書において説明されているか、又は前に公表されたものである(非特許文献14;非特許文献15)。図1は、パーツ・リスト及び方法の詳細を含めて、設定の詳細な説明を提供する。図7は、制御ソフトウェアを示す。

【0137】

化学薬品及び緩衝液

すべての化学薬品は、特に他の指示がない限り、Sigma-Aldrich、Switzerlandに発注された。以下の緩衝液が使用された。PBS、Dulbeccoのリン酸緩衝生理食塩水、2.7mM KCl、1.5mM KH₂PO₄、136.9mM NaCl、8.9mM Na₂HPO₄・7H₂O、pH 7.4; Tris-HCl緩衝液、20mM Tris-HCl、50mM NaCl(pH 7.4); HEPES緩衝液、10mM HEPES pH 8.0、50mM KCl。

30

【0138】

試験試料

試験試料は、(i)0.1%デシル-D-マルチピラノシド(DM、Anatrace)を含むPBS中のタバコ・モザイク・ウイルス(TMV)、(ii)Tris-HCl緩衝液中の大腸菌(vB_EcoM_CBA120)に対してアポフェリチン及びファージを含む混合物、及び(iii)アンフィポールで再構成された、精製200kDa膜たんぱく質(名称開示せず)であった。この場合、バルク膜たんぱく質試料が、5µMアジ化ナトリウムで補完されたHEPES緩衝液により平衡化されたS200 10/300GLサイズ排除クロマトグラフィ・カラムに適用された。大きなA280ピークに対応する単一300µl部分が、cryowriterを使用することによって、及びVitrobot plunge-freezer(FEI)を使用することによってクライオ・グリッドを調製するのに使用された。この部分のたんぱく濃度は、UV-Vis Spectrophotometer(Nanodrop 2000、Thermo Fisher Scientific Inc.)を使用して、及びAbs(0.1%)=1と仮定して吸光測定によって決定されたとき、0.35mg/mLであった。(iv)PBS緩衝液中の0.35mg/mlの濃度におけるエルシニア・エンテロコリチカ・バク

40

50

テリアからのウレアーゼ。

【0139】

EMグリッド

穴あきカーボン薄膜を有する200メッシュ銅製グリッド(R2/2、R2/1、及びR1.2/1.3、Quantifoil、Germany)、並びに連続カーボンの追加の層を有する穴あきカーボン・グリッド、及びレース状カーボン・グリッドなどの様々なEMグリッドが、CryoWriterを用いて使用された。EMグリッドは、使用直前に空気プラズマにおいて30秒間グロー放電された。グリッドの平坦性は、グリッドが温度制御された露点ステージ(DPステージ)上にあるとき、機械的書込みステップ及び効率的な熱伝達の両方にとって重要な態様であることに留意されたい。

10

【0140】

クライオ・グリッド調製

cryoWriterの設定に使用された2つの堆積プロトコルは、以下の節及び図1に詳述する。

【0141】

電子顕微鏡法及び単一粒子分析

特に指定しない限り、試験試料を有するEMグリッドが、Gatan-626クライオ・ホルダに配置され、200kVで動作させた、TVIPS F416 4k CMOSカメラ(TVIPS、Germany)を装備するPhilips CM200(FEG)TEMで撮像された。

20

【0142】

単一粒子分析用のウレアーゼの画像が、300kVで動作させた、Gatan Quantum-LS(20eVのゼロ損失スリット幅)及びGatan K2 Summit DEDを装備する、FEI Titan Kriosを使用して取得された。低線量条件が、動画モードで得た大量40の画像に対して5-6 e7 physical-pixel/secの線量率において-50 e-/A²総電子線量を用いて適用された。ドリフト及びコントラスト伝達関数(CTF)補正が、CTFFIND4を使用して(非特許文献16)、Zorroソフトウェアを用いてウレアーゼ・データに適用された(非特許文献17)。ほぼ10,000の粒子が、EMAN2を使用して記録された51の顕微鏡写真から手動で選択され(非特許文献18)、その後、RELION-1.4において処理された(非特許文献19)。粒子配列後、およそ8700の粒子が、その後3D分類に使用された、良好な2Dクラス平均を生じた。2つの最良3Dクラス(~7,800の粒子を含む)が選択され、反復して改善された。次いで、地図の最終仕上げが、実施され、ウレアーゼ複合体の最終3D再構成を生じた。原子モデル(PDB:10.2210/pdb4z42/pdb)が、UCSFキメラ・ソフトウェアを使用して3D地図に組み込まれた(非特許文献20)。

30

【0143】

結果

原理及び設定

cryoWriter(本発明によるシステム)の設定及び方法の原理を図2に示す。さらなる詳細は、図1及び7に見出すことができる。cryoWriterは、ネガティブ染色及びトレハロース包埋用のナノリットル容量の試料調整及びEMグリッド調製のために前に開発された液体処理及び移送システムに統合される(非特許文献14)。方法は、微小毛細管による液体吸収及び分配を制御する高精度ピペット操作システム、EMグリッドの環境を制御する温度制御された露点ステージ(DPステージ)、試料層の厚さを制御する実時間監視システム、及び試料ガラス化用のピック・アンド・ブランチ機構を使用する。設定自体は、湿度制御環境に含まれない。プロセス全体は、LabVIEW(非特許文献21)において開発されたopenBEB(Ramakrishnan, C., Bieri, A., Sauter, N., Roizard, S., Ringler, P., Muller, S.a., Goldie, K.N., Enimanev, K., Stahlberg, H., Rinn, B., Braun, T., 2014. openBEB: open)プラグインによって制御され、マク

40

50

口を使用して自動化することができる（図7参照）。

【0144】

クライオ・グリッド調製の設定及び基本手順（図2）は、以下の通りである。（i）グリッド冷却：ピンセットによって保持された、グロー放電された標準穴あきカーボン薄膜TEMグリッドが、低温DPステージ上に位置決めされる。（ii）試料吸収；微小毛細管及び高精度ポンプ・システムが、前に説明したように、電解直後に単一細胞の試料ストック又は溶解物から液体プラグを吸引するのに使用される（非特許文献14；非特許文献15）。

【0145】

（iii）試料堆積（図2A）、微小毛細管先端が、グリッド表面に近接される。次いで、試料が、微小毛細管から分配されて、微小毛細管先端とEMグリッドの親水性（グロー放電された）穴あきカーボン表面との間のギャップにわたる小さな液滴を形成する。同時に、グリッドは、正弦波又は円形パターンにおけるノズルに対して移動される。液体試料は、カーボン薄膜の穴部を埋める表面上に拡散される。（iv）制御水分蒸発による試料安定化及び薄化（図2B及び以下の専用の節）；DPステージの温度は、全体を通して、EMグリッド及び懸濁した試料の両方を部屋の露点温度に近接した指定の温度に維持するように設定される。グリッドは、直ちにはガラス化されないが、短時間（選択されたオフセット温度により、<1から10秒の間）ステージ上に維持することができ、したがって、ある量の試料水は蒸発できることに留意されたい。グリッド及び適用された水性試料と780nmレーザ・ビームとの相互作用による干渉/散乱効果は、蒸発を監視するのに使用することができる（図3）。いくらかの水の制御損失は、薄い水薄膜がカーボン層の穴部にわたることを確実にするために重要である。（v）クライオ・グリッド・ピック・アンド・プランジ凍結（図2C）；機構は、ガラス化のために、監視システムによって作動され、又はあらかじめ設定された時間の後に、グリッド（及びピンセット先端）を液体エタン/プロパン（40：60）槽内に急速に突入させる（非特許文献22）（図1も参照）。

【0146】

2つの堆積プロトコルは、実験及び試料により、この基本手順に使用することができる。プロトコル1において、相対的に大きな容量（20nL）が、グリッド上に堆積し、過剰試料が、取り除かれ、分配微小毛細管を用いて再吸引によって回収される。このプロトコルは、単一粒子分析及び高分解能構造決定に対する精製たんぱく質複合体の大きなEM撮像領域の調製に理想的である。プロトコル2において、~3nLの容量の試料が、直接グリッド上に堆積し、再吸引ステップの必要を回避する。このプロトコルは、微量、例えば、単一細胞視覚プロテオミクスに制限される適用例により適切である（非特許文献14；非特許文献23；非特許文献11）。

【0147】

これらのプロトコルを以下に詳細に説明する。

【0148】

プロトコル1：過剰試料の回収を有する堆積

微小毛細管及び高精度ポンプ・システムは、数十ナノリットルを試料ストックから吸引するのに使用される。次いで、微小毛細管先端が、グロー放電されたグリッド表面まで下げられ（分離-10μm）、試料の20nL滴下がそれから分配される。滴下は、微小毛細管先端とEMグリッドとの間のギャップにわたり、微小毛細管に対してグリッドを移動させることによって-0.5mm²の面積を覆うようにさらに拡散させることができる（図2A）。その後、微小毛細管先端は、この面積内のグリッド表面に接触するまで下げられ、可能な限り多くの過剰試料を再吸引し、これを今後の使用のために再回収する。DPステージ（及びグリッド）の温度は、これらのステップのすべてに対して部屋の露点温度よりも上に維持されて、最小量の水分が蒸発することを可能にする。過剰試料の再吸引直後のプランジ凍結と組み合わせられた露点から+8°Cだけの温度オフセットは、典型的には、結果として高分解能構造分析のための良好な試料厚さとなる。より精度が必要な場合、

10

20

30

40

50

試料薄膜の厚さは、以下に説明する実時間監視システムを使用して、制御水分蒸発によって最適化することができる。試料薄化プロセスのより広範な説明は、専用の節に見出すことができる。

【0149】

プロトコル2：再吸引なしの直接試料堆積

このプロトコルにより、 $\sim 3 \text{ nL}$ の試料が、グリッド上に直接堆積し、試料の再吸引を回避する。グリッド温度は、水分蒸発を回避するために露点に維持され、わずかな試料液滴が、ほぼ 0.5 mm^2 の面積を覆う正弦波又は円形パターンで微小毛細管先端の下のEMグリッドを移動させることによって拡散される。その後、試料薄化ステップは、プランジ凍結の前に、制御水分蒸発によって実施されなければならない。蒸発は、DPステージ温度を部屋の露点よりもわずかに上の値（例えば、 $+2^\circ\text{C}$ ）まで増加させることによって誘導される。これらの小さな容量を用いて再現可能な結果を得るために、試料薄化プロセスは、監視システムによって監視されなければならない（専用の節参照）。

10

【0150】

制御水分蒸発による試料安定化及び薄化

表面張力効果により、極めて小さな試料アリコートでも、グリッドをクライオEMに使用可能にするために薄化しなければならない。最近、インクジェット・スポットティングと組み合わせた「自己プロットティング」グリッドを使用する興味ある方法が示された（非特許文献13）。

【0151】

ここで、薄い試料層を作り出すための試料水の制御蒸発に基づく方法を提案する。試料膜厚は、DPステージの温度を調整することによって調節することができ、ピック・アンド・プランジ凍結前の時間帯が開始される。試料は水分蒸発によってわずかに濃縮される。これは、たんぱく質には望ましい可能性があるが、塩濃度も増加し、それにより、たんぱく質複合体が潜在的に害を受けることがある。したがって、このような薄化は、すでに薄い試料薄膜に限定され、堆積プロトコル1によって調製された試料の再吸引を絶対不可欠にする。必要に応じ、cryoWriterを支持する液体処理及び移送システムにより、クライオ・グリッド調製前に、試料調整、例えば、拡散駆動プロセスによる塩交換が可能となることに留意されたい（非特許文献14）。

20

【0152】

cryoWriter設定は、実時間におけるグリッドからの試料液体の蒸発を追跡するためにレーザ・ダイオード（ 780 nm 、図2B）と光検出器とを含む。 780 nm の波長において、光は、水又は生物材料によって顕著に吸収されず、試料中への伝熱の量を無視できるほどにする（非特許文献24）。それにもかかわらず、蒸発による水の膜厚の変化は、光検出器によって記録された信号の振幅に対する検出可能な効果を有する。光散乱の変化の他に、透過光信号は、薄い薄膜の表面において反射された光波の間の干渉によっても影響される（図3）。水分が蒸発するにつれて、信号はほぼ直線的に増加し、ついには特定の層厚さに達し、そこで信号は急激に増加し始める。この正のピークを波長 $= 780 \text{ nm}$ 及び $n_{780} = 1 - 329$ に対する層厚さ $d = A / (2n)$ におけるほとんど垂直のビームの建設的干渉に起因すると考える（非特許文献25）。相殺的干渉から予測されるように、負のピークが正のピークにすぐ続く。放射ピークが 780 nm における代わりに 405 nm あたりにおけるレーザ・ダイオードが、観察された信号挙動（図3）が主に干渉効果によることを確認するのに使用された。乾性グリッドを用いて得た絶対信号に対する特定のユーザ定義された信号の閾値（説明については図3参照）に達すると、ピック・アンド・プランジ機構が監視システムによって作動され、それにより、クライオ・グリッドが急速にガラス化される。

30

40

【0153】

「ドライ信号」はグリッド・タイプ及びメッシュ・サイズに依存することに留意されたい。差が顕著であるとき、常に「空」測定を試料堆積前に行う必要がある（図3）。対照的に、信号は、特定のグリッド・タイプ/メッシュ上に堆積した試料のタイプに依存せず、

50

緩衝液だけ（試料なし）を使用してスクリーニング・ランを実施して、実験にとって理想的な凍結状態を決定することを可能にする。

【0154】

異なる試料からの概念実証クライオ・グリッド調製

この及び以下の節における実例は、単一粒子分析（以下に示す）又はヘリカル分析による構造決定、及び単一細胞視覚プロテオミクスなどの様々な目的にcryoWriter設定を使用して、異なる生体試料（例えば、可溶性又は膜たんぱく質粒子、糸状体、ウイルス、細胞溶解物）の高品質クライオ・グリッドを調製することができることを示す（非特許文献23）。実際には、特定の試料に使用される堆積プロトコルの選択は、その特性及び実験の目的による。方法は、採用される緩衝液システムに対して感受性がない。

10

【0155】

グロー放電された穴あきカーボン薄膜上に20nLの試料容量を拡散させるためのcryoWriter及び堆積プロトコル1の使用は、図4に示す。すべての調製ステップに対して、DPステージ温度は、露点よりも8°C上に維持された。その後、過剰試料が再吸引され、試料薄化がブランジ凍結前1秒の間実施された。図4Aによって文書化されているように、再吸引後に残った試料は、クライオ・グリッドの一部を覆う均質ガラス質氷層を形成した。領域の周辺は見ることができ、矢印で示す。層の均質性は図4Bによって確認され、それは、試料層がカーボン支持体の穴部にわたることを示す、より高倍率における穴あきカーボン薄膜を示す。図4Cは、この方法によって調製されたアポフェリチン粒子（環状外観）及びバクテリオファージの高品質を示す。バクテリオファージ・テールの構造を示す（差し込み図）。結晶性氷構造の不在は、グリッドが実際にガラス化したことを示すことに留意されたい。他の実例は単一粒子処理節に示す。

20

【0156】

3nLの試料をグロー放電された穴あきカーボン薄膜上に配分するためのcryoWriter及び堆積プロトコル2の使用を図5に示す。試料薄化が、上記の専用の節に詳述したように、監視された水分蒸発によって実施された。図5Aは、典型的なグリッドの概観を示す。ガラス質試料によって覆われた面積は、一般に、堆積プロトコル1が使用されたときに覆われた面積よりも小さい。さらに、ガラス化試料層の厚さは、（図5Aと図4A及びBとを比較して）それほど均質ではない。プロトコル2によって堆積したパターン化液体領域が親水性グリッド上に拡散したが、厚さ勾配は、表面張力により、及びぬれ面積の周辺において水分がより早く蒸発するので、依然としてそのままである。試料領域の中心における、より低い蒸発率は、恐らく、液滴周辺における、より大きな表面/容量比の結果、蒸発した水分によりグリッドよりも上の一時的により高い湿度、及び液滴中心におけるグリッドからの熱流によってあまり効率的に補償されない蒸発プロセスの冷却効果である。

30

【0157】

プロトコル2が穴あきカーボン薄膜に適用されたときに観察された厚さ勾配は欠点である。それらは、ある試料には、少量の界面活性剤を使用することによって、又は、比較的程度の低い、薄い連続カーボン薄膜で覆われたEMグリッドを使用することによって最小限に抑えることができる。それにもかかわらず、クライオEMは、図5B及びCで示すように、わずかに一様でない氷厚さを有する試料に対して実施することができる。cryoWriter及びプロトコル2を使用して調製された穴あきカーボン・クライオ・グリッドから記録されたアンフィポールを用いて安定化された200kDa膜たんぱく質の画像を図5Bに示す。ネガティブ染色TEMには薄いカーボン薄膜上で、及びクライオEMにはレース状及び穴あきカーボン上で、Vitrobot plunge-freezer又はcryoWriterのいずれかを使用して調製された同じたんぱく質の画像を図10に示す。ネガティブ染色画像は無傷単一粒子を示すが、劣化粒子が、潜在的にプロットイング・ステップにより、代表的なブランジ凍結方式によってクライオEMに対して調製されたグリッド上に通常は見出される。対照的に、cryoWriterを用いて調製されたクライオEMグリッドは、代表的なブランジ凍結方式を使用して調製されたときより

40

50

も高い濃度でより多くの均質たんぱく粒子を有するように思われる。

【0158】

堆積プロトコル2が使用されたとき消費される微小容量は、それ以外の場合到達できない試料からのクライオ・グリッド調製を可能にする。例えば、単一真核細胞の溶解物を試験することができる。これを示すために、付着HEK293細胞が導電ガラス・スライド上で培養され、個々の標的細胞が、前に説明したように、光学顕微鏡で識別され、電気穿孔され、微小毛細管を使用して吸引された（非特許文献14；非特許文献15）。同じプラチナ被覆微小毛細管が、エレクトロポレーション、細胞溶解物吸引及び分配に使用され、したがって、微量の生物材料の表面への露出及び結果として生じる細胞成分の損失を最小限に抑えた。プロトコル2を使用する溶解物堆積により、図5Cで示したように、高品質クライオ・グリッドが得られ、付随たんぱく質を有する典型的な膜構造が見える。試料堆積プロトコル2を使用して調製された単一細胞溶解物のより多くの実例を図11に示す。

10

【0159】

単一粒子分析

高分解能構造分析のためのcryoWriter方法の有用性を示すために、エルシニア・エンテロコリチカ・バクテリアからのウレアーゼが、堆積プロトコル1を使用してクライオEMのために調製され、直接電子検出器を装備したTitan Krios顕微鏡を用いて撮像された（材料及び方法参照）。図6Aは、試料グリッドの高品質を文書化している。初期2D分類から選択されたクラス平均を図6Bに示す。粒子のサブセットが、生成されたクラスから選択され、最終処理ステップに使用された（図6C）。「至適基準」による改良により（非特許文献26；非特許文献8）、フーリエ・シェル相関による5.03Åの分解能における四量体錯体の3D再構成が生じた（FSC = 0.143、図12）。

20

【0160】

考察

本発明は、クライオEMのための試料グリッド調製方法を改善し、最小量の試料（ナノリットル）を使用してそのようなグリッドを調製する問題を解決する。本明細書に説明したクライオEM試料堆積及びガラス化ツールは、1つのグリッド当たり3から20nLの試料しか消費せず、異なるタイプの試料、例えば、可溶性及び膜たんぱく質、ウイルス及びバクテリオファージの単一粒子調製又は細胞溶解物全体と一緒に使用することができる。設定は、定義された閾値に達すると、試料薄膜の制御された薄化及びピック・アンド・プレンジ機構の自動始動を可能にするための監視システムを含む。重要なことには、凍結条件及びこの閾値は、実際の試料の代わりに緩衝液だけを用いて調製されたグリッドを使用して決定することができる。

30

【0161】

他の重要な態様は、cryoWriter方法が最小の試料損失で動作し、任意の紙プロットティング・ステップが関与しないことである。クライオ・グリッド調製を頼りにする多くの実験室の経験により、代表的な調製方法が繊細なたんぱく質複合体の保存に害を及ぼすことがあることが分かっている。これは、しばしば、試料の緩衝液特性を急速に変化させることがあり（塩、pH変化、ろ紙から浸出したイオン）、長いたんぱく質集合を阻害するせん断力をもたらすことがある紙プロットティング・ステップ（非特許文献27）、又はより多くのたんぱく質をプロットティング中及びその後の苛酷な空気-水界面に露出させる、プロットティング後の試料薄膜の大きな表面对容量比率のいずれかに帰される。本明細書に提示した試料堆積プロトコルは、紙プロットティングを完全に回避する。堆積プロトコル1は、試料再吸引後にグリッド上に残るたんぱく質の空気-水界面への露出時間も最小限に抑える。DPステージ・オフセットが+8°Cである場合、堆積直後に試料をガラス化することができる。空気-水界面への露出は、堆積プロトコル2が使用されるとき、より長い。試料堆積、拡散、及び薄化は、グリッドが寒剤で終了するまでに、最大10秒までかかることがある。両方の堆積プロトコルは、空気-水界面において濃縮する微量の洗剤などの添加物の使用も可能にし、それにより、たんぱく質は表面効果から保護される可

40

50

能性がある。拡散駆動プロセスによる試料調整（非特許文献14）は、cryoWriter設定に含めることができ、洗剤が小さな試料容量（ $< 5 \text{ nL}$ ）に急速に導入されること及びプロトコル2による均質グリッドの調製を可能にする（非特許文献14）。

【0162】

方法は、適切な凍結条件を決定するのに必要な時間及び労力を大幅に短縮する見込みがある。達成されたほとんど無損失の調製及び低試料消費により、クライオEMは、わずかに利用可能なたんぱく質/たんぱく質複合体及び単一細胞の内容の構造分析に適用可能となる。これは、クライオEMの技術の進歩が今やわずか数千から数百万のたんぱく質複合体の単一粒子の撮像及び分析によって3から6Åの間の分解能に到達することを可能にし（非特許文献2）、構造分析のためのマイクロ流体試料調製方法を実現可能にするので、特に興味深い（非特許文献28）。

10

【0163】

CryoWriter：詳細な設定の説明及び試料のガラス化

CryoWriter設定を図1に示す。CryoWriter設定は、露点（DPステージ）に近接して維持される温度制御ステージ1を有する。温度センサと湿度センサとの組合せ（UFT75-AT, Sensor-Tec, Germany）が、部屋の露点を連続して決定し、ペルチェ・コントローラによって調節される水冷式ペルチェ素子（Coltronic GmbH, Switzerland）が、それに応じてDPステージ1の温度を調整するのに使用される。電子顕微鏡法（EM）グリッド20（前に空気プラズマにおいて30秒間グロー放電された）が、第1のアダプタ3に固定されるピンセット2によって保持される。第1のアダプタ3上のつまみねじの回転により、ピンセット2が開閉し、グリッド20を把持し、保持することが可能になる。電磁石（MMT Magnettechnik GmbH & Co., Germany）4がピンセット2を水平位置に保持し、ピンセット2が、その上に装着された2つの小さなペルチェ素子を介して冷却される。電磁石は、精密キネマティック・マウント5（KS05K/M, Thorlabs GmbH, Germany）に固定され、精密キネマティック・マウント5自体は、手動z軸ステージ上に装着される。したがって、ピンセット2によって保持されたグリッド20は、穴あきカーボン面を上にして、DPステージ1におけるスロットに位置合せされ、平らに（水平に）配置することができる。スロットは、その中央にレーザ・ビームの通過を可能にするための小さな穴部（直径2mm）を有する（以下を参照）。この領域を除いて、グリッド20の外縁及び下面は、ステージ材料と直接接触している。DPステージ1自体は、電動ステージ（Prior Scientific, UK）6上に装着され、位置決めされたグリッド及びピンセットは水平面上を移動することが可能になる。別の永久磁石が挿入された第2のアダプタ7は、旋回軸を介して大きなソレノイド8（HD8286-R-F, Kuhnke, Germany）に接続される。この第2のアダプタ7は、その旋回軸を中心にして自由に回転することができるが、小さな永久磁石9によって水平の向きに保持される。大きなソレノイド8は、30mmのハブ長さを有し、二次回路10が閉じたときにソレノイドが始動するようにソレノイド・コントローラ（MST-1630.001/002, Tremba GmbH, Germany）によって制御される。

20

30

40

【0164】

リニア・ステージの組立品（M-404.2PD及びM-414.3PD, Physik Instrumente, Germany）上に装着された溶融石英微小毛細管（New Objective, USA）11が、高精度注射器ポンプ（Cetoni GmbH, Germany）に接続される（図示せず）。微小毛細管は、試料を貯蔵容器、例えば、PCRチューブ、ウエル・プレートなどから、又は溶解単一細胞から吸引するのに使用され（非特許文献14）、それをDPステージ1上のグリッド上に分配する。DPステージ1は電動ステージ上に装着されるので、試料を分配しながらグリッド20を移動させることができ、必要に応じ、グリッド20のより広い面積にわたってそれを配分することが可能になる。2つのCCDカメラ（図示せず）により、試料堆積及び拡散の直接観察が可能

50

になる（側面図及び傾斜上面図、図7参照）。微小毛細管はこれが完了すると引き込まれる。

【0165】

試料堆積後、液体の蒸発は、DPステージ1の温度によって制御され、レーザ・ダイオード（ $\lambda = 780 \text{ nm}$ 、CPS192、Thorlabs GmbH、Germany）13及び光検出器（フォトダイオードPDA100A、Thorlabs GmbH、Germany）14を手動開口部（SM1D12SZ、Thorlabs、Germany）に使用して監視することができる。レーザ・ダイオード13は、DPステージ1よりも上に装着され、試料が堆積したグリッド20の面積を照射する。光検出器14は、レーザ・ダイオード13の光学経路におけるDPステージ1の下に位置決めされる。

10

【0166】

試料ガラス化は、監視システムによって登録されたレーザ信号が定義された閾値に達したとき、又はユーザによって定義された、あらかじめ設定された時間の後、自動的に進む。グリッドの寒剤中への注入は、電磁石4がオフにされ、アダプタ3及び7内の2つの磁石がかみ合い、ピンセット2及びグリッド20をDPステージ1から引き抜いたとき、作動される。新たに形成された組立品は、その増加した重量により垂直位置にはまる。組立品が垂直位置に達したとき、それは自動的に二次回路10を閉じ、それにより、大きなソレノイドが作動する。30mmソレノイド・ハブは、EMグリッド及びピンセット2の先端を寒剤12（プランジ凍結中の氷汚染を最小限に抑えるために特注の発泡スチロールのふたを用いてVitrobot、FEI、USAからの標準寒剤容器内に液化されたエタンとプロパンとの混合物（40：60））中に発射する。電磁石4がオフにされた瞬間からグリッドが寒剤中に浸漬されるまでわずか数百ミリ秒しか経過しない。ピンセット2は、ここで容易に組立品から手で取り除くことができ（磁石接続）、グリッド20は、液体窒素中に浸漬されたグリッド貯蔵箱内に配置することができ、その後、貯蔵デュワに又は観察のために直接クライオ装備の電子顕微鏡に移送される。

20

【0167】

cryoWriter：制御ソフトウェア

すべての器具は、National Instruments LabVIEWソフトウェアを介して制御される（非特許文献29）。openBEB framework（www.openbeb.org）が、各器具プログラムを独立したプラグインとしてロードするのに使用される（非特許文献30）。試料装荷、堆積、及びクライオ注入などの多くの実験ステップが、openBEBのマクロ言語を使用して自動化された。図7は、プロセス・オートメーション用のマクロ・ウィンドウを含めて、制御ソフトウェアのスクリーンショットを示す。

30

【0168】

780nmレーザ・ダイオードによる水の厚さの実時間監視

グリッド及びステージが露点温度に維持された場合、グリッドに近接した微環境の相対湿度（rH）は100%である。水分凝縮を防止し、グリッド表面からの試水の制御蒸発を可能にするために、ステージ温度は、露点温度よりもわずかに上にある必要があり、例えば、温度オフセットは、グリッド表面において90% rHを示すように選択される。

40

【0169】

(I) DPステージ/グリッド微環境のrH及び部屋のrHへの感受性

計算により、露点温度からの小さなオフセット（例えば、 $+2^\circ\text{C}$ ）の場合、DPステージ微環境のrHは、 23°C の室温において20%から90%の範囲の部屋のrHにわたって直線的にステージ温度に依存することが分かる（図8A）。さらに、ステージ上に90% rHの微環境を作り出す必要がある温度オフセットは、 23°C において20%から90%の範囲の部屋のrHに対して0.3度未満だけ変動する（図8B）。したがって、cryoWriter手順は室内のrH変化に感受性がなく、システムは、必ずしも湿度制御されたチャンバを必要としないが、しかし、これは今後の適用例に望ましい可能性がある。

50

【 0 1 7 0 】

温度 T における rH、rH(T) は、以下のように計算された。

【 数 1 】

$$rH(T) = 100 \frac{E(RT)}{E_S(T)} = e^{17.62 \left(\frac{RT}{243.12+RT} - \frac{T}{243.12+T} \right)} \cdot rH(RT)$$

【 数 2 】

$$E(RT) = E_S(RT) \frac{rH(RT)}{100} \text{ 及び } E_S(T) = 611.2 e^{\frac{17.62 T}{243.12+T}}$$

10

【 0 1 7 1 】

ここで、E(RT) 及び E_S(T) は、Magnus 公式によって記載されるように、それぞれ、室温 RT における実際の蒸気圧 (単位パスカル) 及び温度 T における最大 (飽和) 蒸気圧である (非特許文献 31)。

【 0 1 7 2 】

上記の結論に一致して、より大きな試料容量がプロトコル 1 によって堆積したとき、それは、一般に、緩衝液アリコートを使用して試料堆積とピック・アンド・プランジ凍結との間に必要な時間のずれを決定するのに十分であったし、薄化の程度は実験的に監視する必要はなかった。

20

【 0 1 7 3 】

(II) レーザ透過の試料層厚さへの依存

cryoWriter 設定により、水分蒸発を 780 nm レーザ・ダイオードと光検出器とからなる光学系によって実験的に監視することが可能となる。これは上記に対する任意選択であり、堆積プロトコル 2 には特に重要である。グリッドを通るほとんど垂直のレーザ・ビームの透過は、測定される (図 1 及び 2 参照)。蒸発による膜厚の変化は、光検出器によって記録される信号の振幅に影響する (図 3)。これらの信号の変化が干渉効果によって支配されることを確認するために、透過信号は、異なる波長 (780 nm 及び 405 nm) で放射するレーザ・ダイオードに対して測定された。干渉理論から予測されるように (図 8c)、2 つのパターンは、質的に同じであったし、青色レーザ信号の正のピークは、より薄い水の層に向かってシフトされた (図 8d)。

30

【 符号の説明 】

【 0 1 7 4 】

1 0 0 システム

1 温度制御ステージ

2 ピンセット

3 第 1 のアダプタ

4 電磁石

5 調整手段

6 並進ステージ組立品

7 第 2 のアダプタ

8 運動発生手段、詳細にはソレノイド

9 永久磁石

1 0 二次電気回路

1 1 分配ヘッド、詳細には微小毛細管先端

1 2 容器

1 3 光源

1 3 a 第 1 の光源

1 3 b 第 2 の光源

40

50

- 1 4 光検出器
- 1 4 a 第 1 の光検出器
- 1 4 b 第 2 の光検出器
- 1 5 a 第 1 のダイクロイック・ミラー
- 1 5 b 第 2 のダイクロイック・ミラー
- 1 6 a 第 1 の開口部
- 1 6 b 第 2 の開口部
- 2 0 支持構造体
- 3 0 制御デバイス
- 5 0 保持手段
- 6 0 移送機構
- 6 1 回転ヒンジ
- 8 0 寒剤
- G ギャップ
- L 光経路
- L 1 第 1 の光ビーム
- L 2 第 2 の光ビーム
- T 透過光ビーム
- T 1 第 1 の透過光ビーム
- T 2 第 2 の透過光ビーム

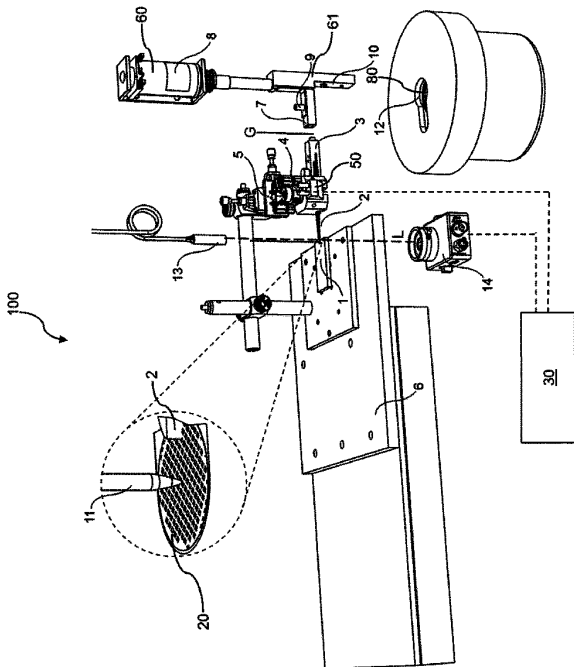
10

20

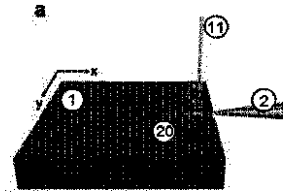
【 図 面 】

【 図 1 】

Figure 1



【 図 2 a 】

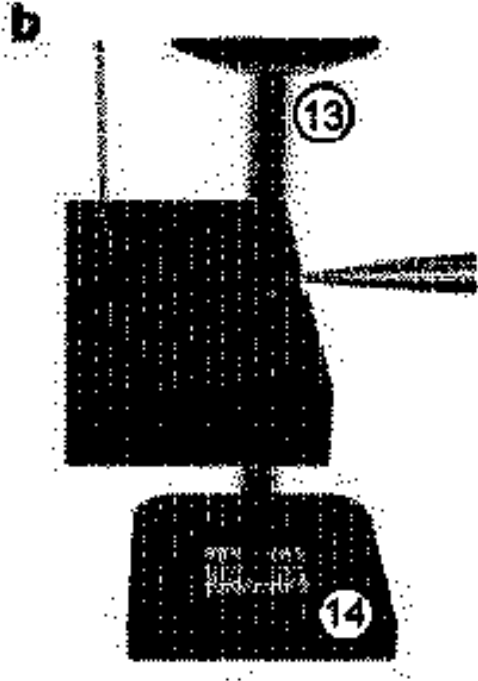


30

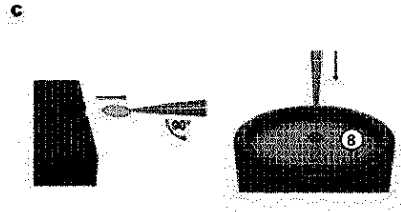
40

50

【図 2 b】



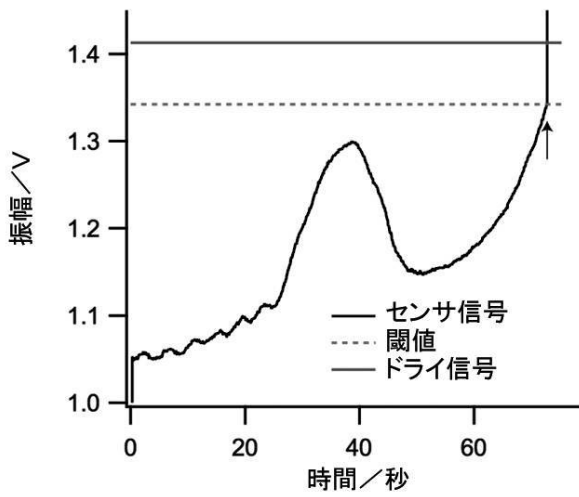
【図 2 c】



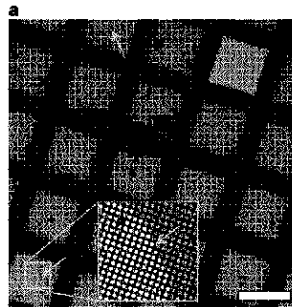
10

20

【図 3】




【図 4 a】

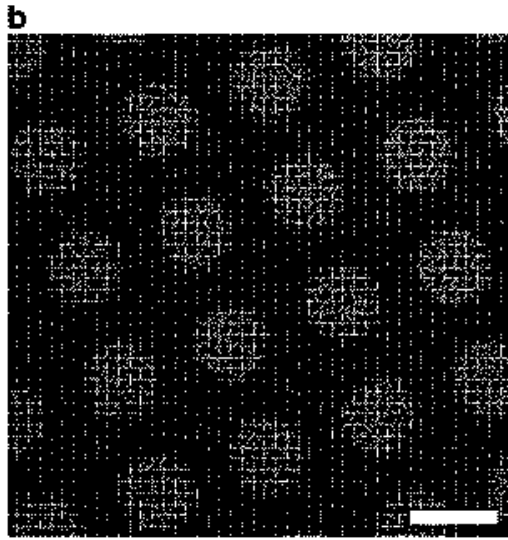



30

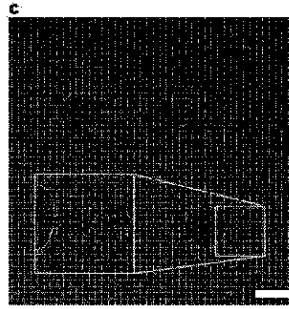
40

50


【 4 b】

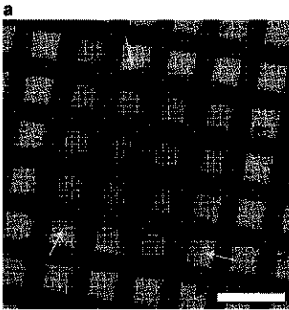



【 4 c】

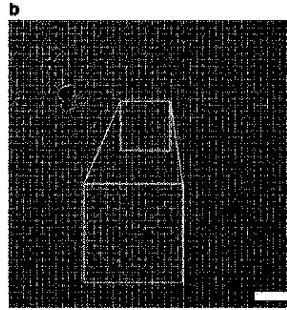


10

【 5 a】



【 5 b】



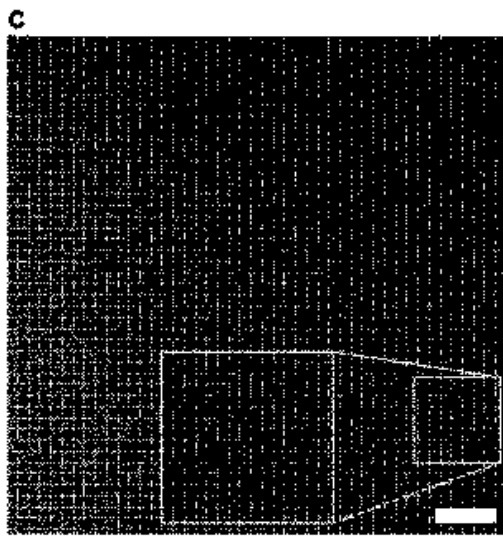
20

30

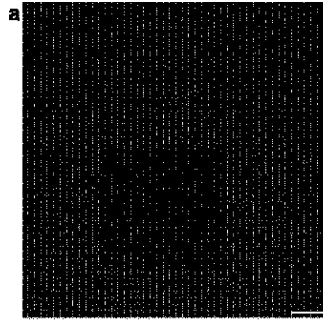
40

50

【 図 5 c 】

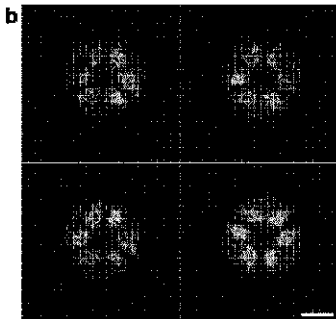


【 図 6 a 】

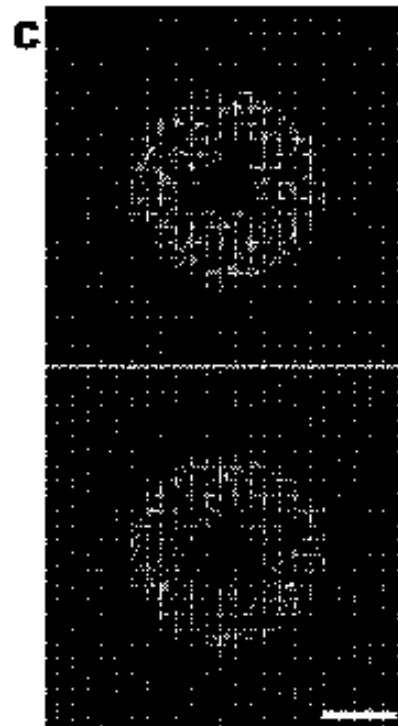


10

【 図 6 b 】



【 図 6 c 】



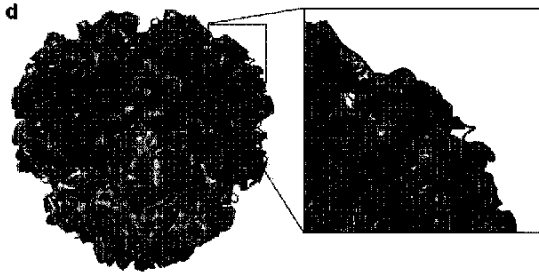
20

30

40

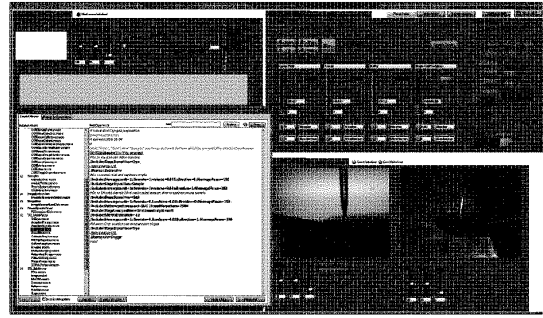
50

【 図 6 d 】



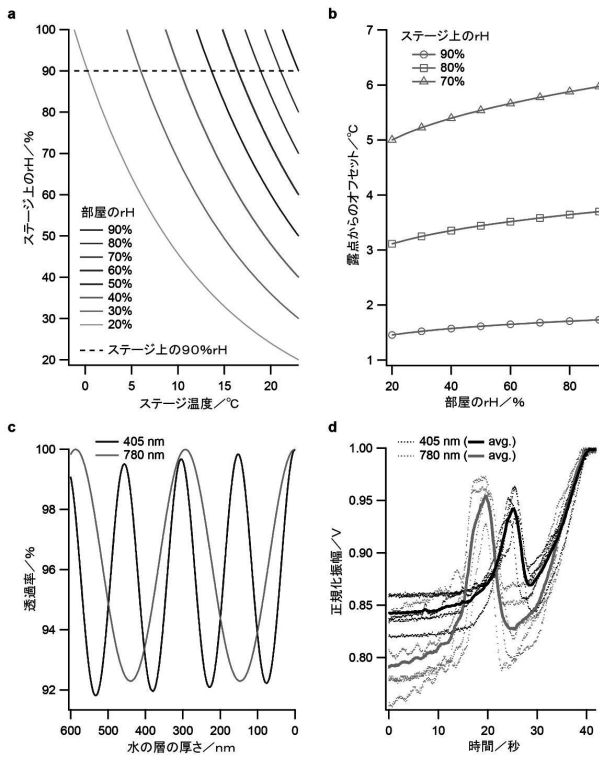
【 図 7 】

Figure 7

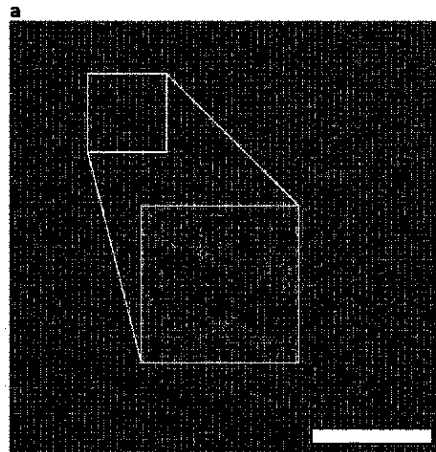


10

【 図 8 】



【 図 9 a 】



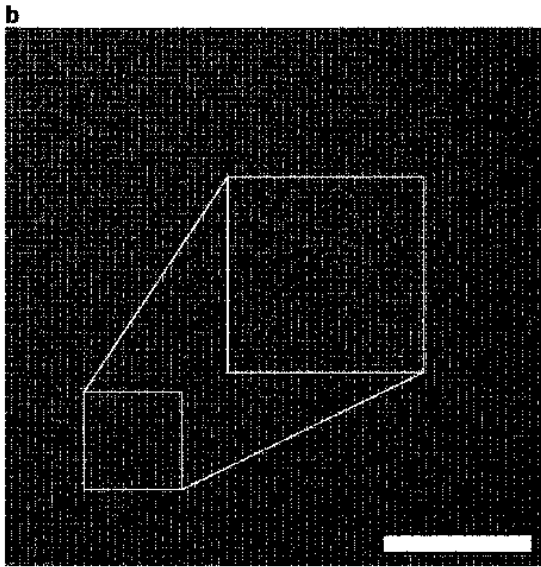
20

30

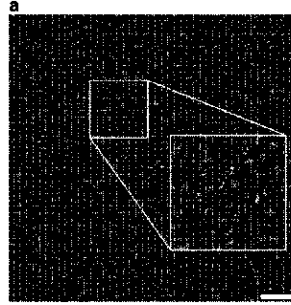
40

50

【 9 b 】

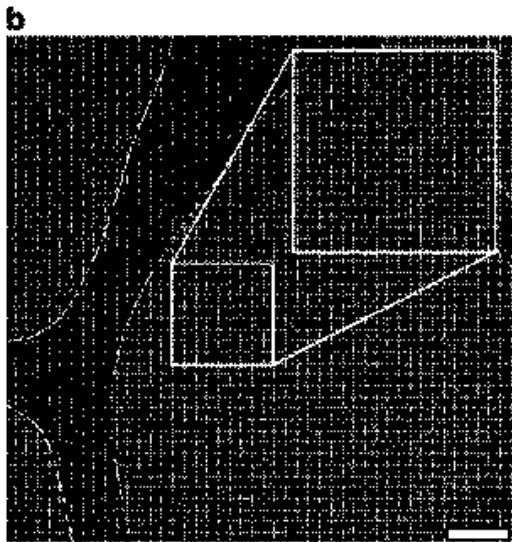


【 1 0 a 】

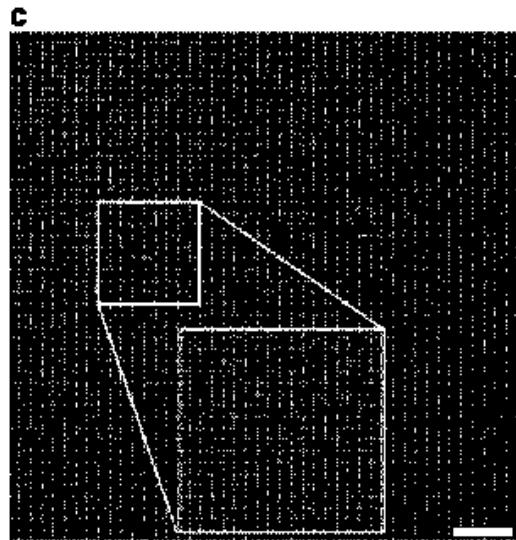


10

【 1 0 b 】



【 1 0 c 】



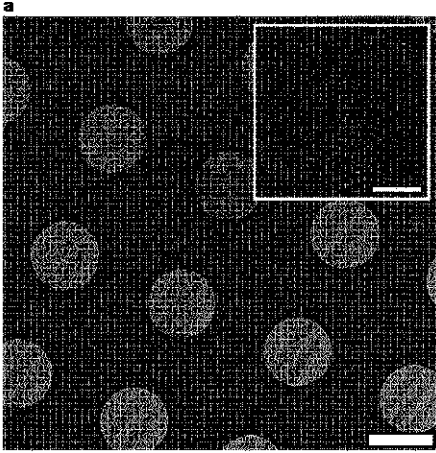
20

30

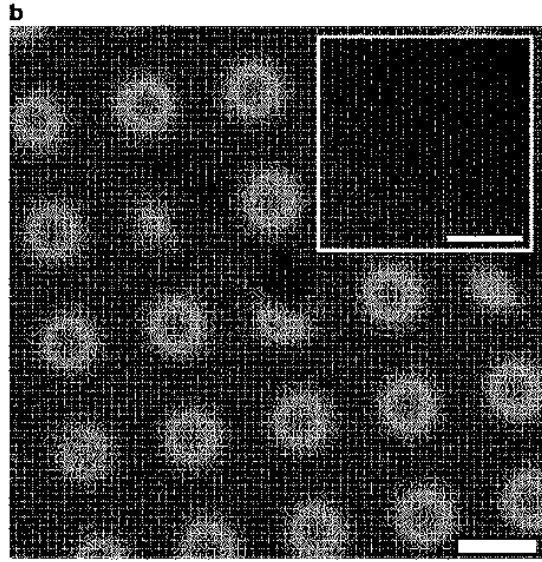
40

50

【図 1 1 a】

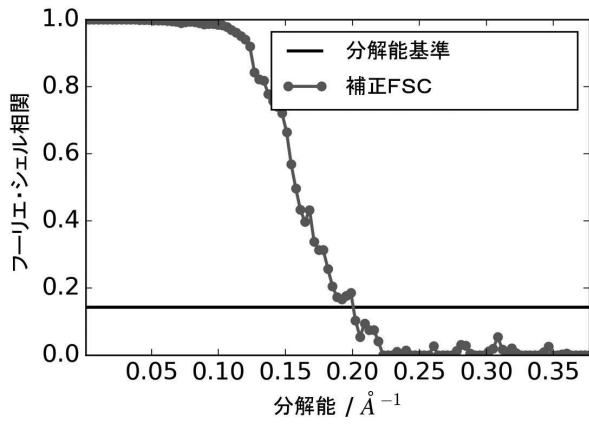


【図 1 1 b】



10

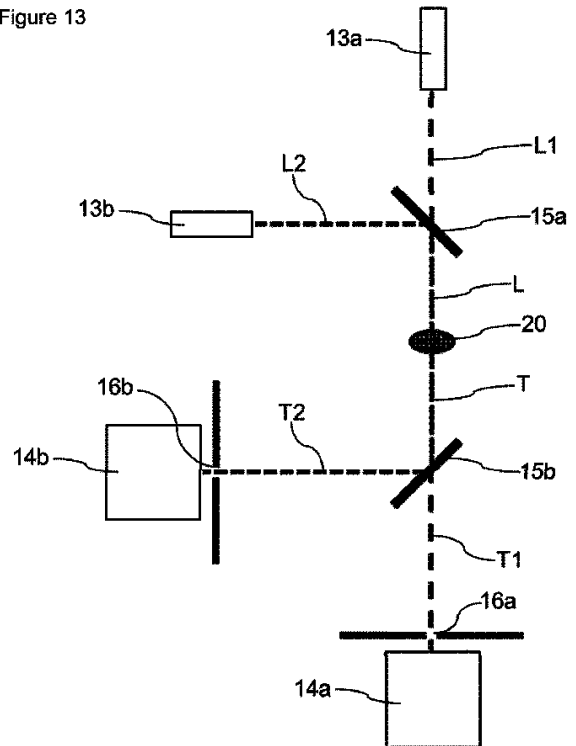
【図 1 2】



20

【図 1 3】

Figure 13



30

40

50

フロントページの続き

ーデンシュトラーゼ 59

審査官 山口 剛

(56)参考文献 欧州特許出願公開第3018467(E P, A 1)

実開平06-049952(J P, U)

特開平07-333120(J P, A)

特開2015-068832(J P, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

G 0 1 N 1 / 0 0 - 1 / 4 4

G 0 1 N 3 3 / 4 8

H 0 1 J 3 7 / 2 0 - 3 7 / 3 6

G 0 1 B 1 1 / 0 2 - 1 1 / 0 6