

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 916 673**

51 Int. Cl.:

**G01B 11/06** (2006.01)

**G01N 1/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2019 PCT/EP2019/074578**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2020 WO20058140**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2019 E 19772675 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2022 EP 3853581**

54 Título: **Disposición de medición de espesor de muestra y método para medir el espesor de una muestra a temperatura criogénica mediante interferometría utilizando un criostato**

30 Prioridad:

**18.09.2018 EP 18195081**

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

**05.07.2022**

73 Titular/es:

**EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY  
LABORATORY (100.0%)  
Meyerohofstrasse 1  
69117 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**CIPRIANI, FLORENT y  
PAPP, GÉRGELY**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 916 673 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

Disposición de medición de espesor de muestra y método para medir el espesor de una muestra a temperatura criogénica mediante interferometría utilizando un criostato

### Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una disposición para medir el espesor de una muestra y a un método para medir el espesor de una muestra que se va a examinar usando, por ejemplo, criomicroscopía electrónica. Además, la invención se refiere a un criostato para ser utilizado en tal disposición o método.

### Antecedentes de la invención

- 10 La microscopía electrónica se puede utilizar para examinar estructuras o partículas extremadamente pequeñas, por ejemplo, en un rango de nanómetros. Para poder examinar muestras biológicas, tales como células biológicas, se ha desarrollado la criomicroscopía electrónica (de CryoEM). La criomicroscopía electrónica es una forma de microscopía electrónica de transmisión (TEM), en la que las muestras biológicas se examinan a temperaturas criogénicas inferiores a -123 °C (150 K). En la criomicroscopía electrónica, las muestras generalmente se congelan rápidamente y, por lo tanto, se vitrifican antes de insertarlas en un microscopio electrónico de transmisión.

- 15 Por lo general, los datos de CryoEM se obtienen a partir de partículas de muestra incrustadas en una solución vitrificada, tal como hielo amorfo colocado en un portamuestras de CryoEM. En el mismo, el portamuestras de CryoEM puede consistir, por ejemplo, en una rejilla metálica de 3 mm de diámetro y de 10 a 20 micrómetros de espesor fabricada, por ejemplo de cobre, oro u otro metal y que se cubre, por ejemplo, con una película de carbono agujereada. La película de carbono puede tener un espesor de, por ejemplo, aproximadamente 10 nm y puede incluir una matriz de orificios del tamaño de una micra que contiene una solución de muestra. La solución de muestra normalmente puede comprender las muestras a examinar y puede incluir además agua, sales y/o un crioprotector. Tras la preparación de la muestra, la solución de muestra se puede dispensar en una rejilla de un portamuestras de CryoEM, luego se puede secar y finalmente se puede vitrificar enfriándola rápidamente, por ejemplo, en etano líquido. Un espesor de muestra óptimo puede ser de alrededor de 100 nm, lo que puede permitir tener en los orificios del portamuestras de CryoEM una sola capa de partículas de muestra incrustadas en el hielo vitrificado.

Las técnicas convencionales de preparación de muestras para el examen de CryoEM pueden implicar una serie de pasos manuales y pueden tener una reproducibilidad deficiente. En particular, puede ser difícil preparar y/o identificar muestras que tengan el espesor correcto para permitir el examen de partículas o células individuales durante el examen de CryoEM.

- 30 El documento US 9,927,336 B2 describe un aparato y un método para la dispersión de rayos X de ángulo pequeño a baja temperatura. El documento EP 2 381 236 A1 describe un aparato para preparar un espécimen TEM criogénico. El documento US 2012/201268 A1 describe un calorímetro de absorción óptica que comprende un criostato.

### Compendio de la invención y de las realizaciones

- 35 Por lo tanto, puede existir la necesidad de una disposición de medición de espesor de una muestra y de un método para medir el espesor de una muestra, que pueda permitir medir el espesor de la muestra con alta precisión y/o alta reproducibilidad y/o que por lo tanto pueda permitir una medición simple, una preparación de muestras y/o un control de calidad fiables y/o rentables, por ejemplo para aplicación en de CryoEM. Además, puede existir la necesidad de un criostato, que puede aplicarse ventajosamente en dicha disposición de medición de espesor de muestra o un método para medir el espesor de una muestra.

- 40 Esas necesidades pueden satisfacerse con el objeto de las reivindicaciones independientes. Otras realizaciones de ejemplo pueden derivarse de las reivindicaciones dependientes y la siguiente descripción.

- De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se propone un criostato que comprende un depósito de refrigerante para almacenar refrigerante líquido y una unidad de observación de muestras para observar las características de una muestra. En el mismo, el depósito de refrigerante comprende un recipiente que encierra un volumen de almacenamiento con paredes del recipiente que están térmicamente aisladas con una capa de aislamiento del depósito térmico para permitir el almacenamiento de refrigerante líquido a temperaturas inferiores a 150 K. La unidad de observación de muestras comprende un tubo de alta conductividad térmica, una capa de aislamiento de tubo térmico y una disposición de ventana. El tubo tiene paredes de tubo que encierran un volumen de tubo que incluye un volumen de observación. El tubo está abierto en un extremo distal y en un extremo proximal. El extremo distal del tubo está dispuesto dentro del volumen de almacenamiento del depósito de refrigerante. El tubo tiene dos aberturas laterales en sus paredes de tubo en lados opuestos con respecto al volumen de observación. Las paredes de tubo están recubiertas por su lado exterior con la capa de aislamiento térmico del tubo. La capa de aislamiento de tubo térmico tiene dos aberturas adyacentes a las aberturas en las paredes de tubo. La disposición de ventana comprende dos ventanas opuestas con cristales, estando dispuesto cada cristal en una de las aberturas de la capa de aislamiento térmico. Los cristales son transparentes a la luz láser.

- De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se propone una disposición de medición de espesor de muestra. La disposición de medición de espesor de muestra comprende un criostato de acuerdo con una realización del primer aspecto de la invención y además comprende una unidad de medición de espesor de muestra dispuesta y configurada para transmitir un haz de láser a través de la disposición de la ventana de la unidad de observación de muestras y para determinar el espesor de muestra basado en mediciones de interferometría con el haz de láser transmitido.
- Según un tercer aspecto de la invención, se propone un método para medir el espesor de una muestra. El método comprende al menos los siguientes pasos, preferiblemente en el orden indicado: se proporciona un criostato de acuerdo con una realización del primer aspecto de la invención. A continuación, se establece un flujo de gas refrigerante suave a baja temperatura a través del tubo de la unidad de observación de muestras del criostato. Luego, la muestra se inserta en el volumen de observación de la unidad de observación de muestras usando, por ejemplo una pinza. Finalmente, el espesor de la muestra se mide transmitiendo un haz de láser a través de la disposición de la ventana de la unidad de observación de muestras y determinando el espesor de la muestra con base en mediciones de interferometría con el haz de láser transmitido.
- Los principios subyacentes a las realizaciones de la presente invención pueden verse como basados, entre otras cosas, en las siguientes ideas y observaciones sin restringir, sin embargo, el alcance de la invención.
- Como ya se indicó brevemente en la parte introductoria anterior, la preparación precisa de la muestra puede ser esencial para obtener buenos resultados de medición de CryoEM. Entre los diversos criterios que definen una buena rejilla de muestra, se incluyen, entre otros, distribución de partículas, orientación de partículas, etc., un espesor de muestra correcto puede ser un requisito previo obligatorio.
- En la preparación de muestras convencional, se realizan normalmente varios pasos de preparación de forma manual, por lo que los resultados de la preparación pueden carecer de precisión y/o reproducibilidad. Por consiguiente, con tal preparación de muestra convencional, a menudo puede ser necesario un examen exhaustivo para encontrar una rejilla o una parte de una rejilla con el espesor de muestra adecuado, por ejemplo en la rejilla del portamuestras de CryoEM. Por lo tanto, por ejemplo, muchas plataformas de CryoEM pueden proponer a los usuarios la detección de sus rejillas en microscopios de resolución media con el fin de maximizar el tiempo utilizado de manera efectiva para la recopilación de datos en sus microscopios de alta resolución costosos y altamente solicitados. Incluso en este esquema, la evaluación de la red puede convertirse en un cuello de botella, en el que esto es particularmente cierto en las instalaciones que abren sus servicios a usuarios no expertos.
- Por lo tanto, un objetivo que condujo a la presente invención fue desarrollar aún más la preparación de muestras para fines de CryoEM. En particular, se pretendía desarrollar una máquina y un método de preparación de rejilla de CryoEM semiautomático o totalmente automatizado que, preferiblemente, puede incluir el control de calidad de la muestra.
- Básicamente, fue una idea utilizar un método existente de medición de espesores de alta precisión y desarrollarlo aún más para que pueda aplicarse de manera beneficiosa con el fin de medir espesores de muestras que se utilizarán en de CryoEM. Específicamente, fue una idea utilizar una unidad de medición del espesor de muestra que pueda determinar el espesor de una muestra en función de las mediciones de interferometría con un haz de láser transmitido a través de la muestra y adaptarlo a los requisitos específicos encontrados al preparar las muestras para su uso en de CryoEM. En la misma, el proceso de preparación de la muestra puede incluir la medición interferométrica del espesor de la muestra durante la fase de preparación y después de la vitrificación de la muestra.
- Particularmente, puede ser un objetivo controlar la calidad de una rejilla de muestra en términos de espesor del hielo y, opcionalmente, proporcionar información sobre la distribución del espesor de una muestra en toda la rejilla de un portamuestras. Dicha información puede suministrarse al microscopio para acceder rápidamente a aquellas partes de la rejilla que tienen un espesor de muestra óptimo. En principio, tal medición del espesor final también puede utilizarse para controlar rejillas preparadas manualmente, para control de calidad y/o para suministrar mapas de espesor de muestra al microscopio electrónico.
- Sin embargo, se ha observado que, si bien las técnicas de medición de espesores ópticos que utilizan mediciones de interferometría pueden proporcionar en principio una precisión muy alta hasta un rango de nanómetros, estas técnicas de medición pueden ser problemáticas cuando se aplican a temperaturas criogénicas. Particularmente, se ha encontrado que incluso ligeras fluctuaciones de temperatura, falta de homogeneidad de temperatura y/o gradientes de temperatura pueden influir significativamente en la precisión de tales técnicas de medición de espesores ópticos.
- Por consiguiente, los primeros intentos de aplicar técnicas de interferometría óptica para medir el espesor de las muestras de CryoEM no tuvieron éxito. Por ejemplo, las condiciones de medición eran insuficientemente estables cuando la muestra medida se enfriaba a temperaturas criogénicas, de tal modo que los patrones de interferencia no podían evaluarse con éxito.
- Por lo tanto, se describió en la presente memoria un enfoque para desarrollar un criostato específico que se puede usar al medir espesores de muestra con técnicas de interferometría a temperaturas criogénicas. Según el primer aspecto de la invención, tal criostato comprenderá un depósito de refrigerante y una unidad de observación de muestras. El depósito de refrigerante puede servir para almacenar refrigerante líquido que se ha de utilizar para mantener la muestra a temperaturas criogénicas en el volumen de observación. La unidad de observación de muestras

se puede adaptar específicamente de modo que, utilizando la unidad de observación de muestras, se pueden observar las características de la muestra, permitiendo posiblemente obtener información a partir de dichas características observadas sobre el espesor de la muestra.

5 Específicamente, el depósito de refrigerante puede comprender un recipiente que encierra un volumen de almacenamiento en el que se puede almacenar el refrigerante líquido. El refrigerante líquido puede ser un líquido que ya hierva a temperaturas criogénicas de aproximadamente o menos de 150 K (-123 °C). Por ejemplo, el refrigerante líquido puede ser nitrógeno líquido con una temperatura de ebullición de aproximadamente 77 K (-196 °C).

10 El recipiente del depósito de refrigerante comprende paredes que están térmicamente aisladas con una capa de aislamiento del depósito térmico. Debido a tal aislamiento térmico, el refrigerante líquido puede almacenarse dentro de este recipiente a temperaturas por debajo de 150 K durante períodos de tiempo suficientemente largos, por ejemplo de varios minutos a varias horas, es decir, por ejemplo, al menos durante diez minutos o al menos una hora, sin que el refrigerante líquido se caliente a más de 150 K debido al intercambio de calor con su ambiente y/o sin que partes significativas del refrigerante líquido se calienten a, o por encima de, su temperatura de ebullición. Para tal fin, la capa aislante del depósito térmico puede ser similar a las capas aislantes utilizadas en criostatos convencionales o recipientes Dewar. Opcionalmente, se puede proporcionar un sistema para rellenar el depósito con refrigerante. Dicho sistema puede ser semi o totalmente automatizado.

20 En principio, el recipiente del depósito de refrigerante puede estar sustancialmente cerrado y/o la capa de aislamiento del depósito térmico puede cubrir toda la superficie del recipiente. Sin embargo, como se explica más adelante, puede ser preferible que el depósito de refrigerante y su recipiente estén abiertos en un lado superior de modo que, por un lado, la unidad de observación de muestras pueda insertarse parcialmente fácilmente en el refrigerante líquido contenido en el depósito de refrigerante, parte de su tubo térmico se sumerge en el refrigerante líquido y, por otro lado, el refrigerante líquido puede llenarse fácilmente en el volumen de almacenamiento en el depósito de refrigerante.

25 La unidad de observación de muestras puede estar configurada de tal manera que, por un lado, se pueda insertar una muestra, cuyo espesor se va a medir, en el volumen de observación dentro de la unidad de observación de muestras y que, por otro lado, la muestra en el volumen de observación de la unidad de observación de muestras puede mantenerse a temperaturas criogénicas por debajo de 150 K. Como características adicionales, la unidad de observación de muestras puede configurarse de tal manera que la muestra en el volumen de observación pueda ser accesible para mediciones de espesor por interferometría.

30 Para tal fin, la unidad de observación de muestras puede comprender un tubo de alta conductividad térmica, una capa de aislamiento de tubo térmico y una disposición de ventana de observación de muestras de baja conductividad térmica, transparente a la luz.

35 El tubo tiene paredes que encierran un volumen de tubo que incluye el volumen de observación. Por ejemplo, el tubo puede ser cilíndrico. Alternativamente, el tubo puede tener cualquier otra estructura hueca alargada con una sección transversal circular o no circular. El tubo puede tener una sección transversal constante. Alternativamente, la sección transversal puede variar a lo largo de la longitud del tubo. Por ejemplo, el tubo puede tener una longitud de entre 5 cm y 10 cm y un diámetro de entre 5 mm y 10 mm.

40 Un extremo del tubo, denominado en la presente memoria "extremo distal", debe ser tal que parte de él pueda sumergirse en el refrigerante líquido para tomar la temperatura del refrigerante líquido y, parte de él puede estar abierto de modo que el gas evaporado del refrigerante líquido puede fluir a través del volumen de observación y salir por su segundo extremo opuesto, denominado aquí extremo proximal. El extremo distal del tubo puede estar abierto en toda su sección transversal o sólo en partes de su sección transversal.

45 El extremo proximal del tubo también puede estar abierto de manera que, por ejemplo, la muestra que se ha de medir pueda insertarse en el tubo en este extremo proximal. Por consiguiente, una abertura en el extremo proximal debe tener una sección transversal suficiente para permitir la inserción de la muestra o la rejilla que sostiene la muestra en el tubo hacia el volumen de observación.

50 En su cubierta, el tubo tiene dos aberturas laterales en las paredes de tubo. Las aberturas están dispuestas en lados opuestos con respecto al volumen de observación. Las aberturas laterales pueden ser agujeros pasantes a través de la pared del tubo. Las aberturas laterales pueden tener un área de sección transversal lo suficientemente grande como para que un haz de láser que se usa normalmente para mediciones interferométricas pueda transmitirse a través de las aberturas laterales y de tal manera que no obstruya u obstruya levemente un cono de visión de un objetivo del dispositivo de medición. Por ejemplo, las aberturas laterales pueden tener un área de sección transversal de al menos 1 mm<sup>2</sup>, preferiblemente al menos 4 mm<sup>2</sup> o al menos 10 mm<sup>2</sup> o incluso al menos 25 mm<sup>2</sup>. Preferiblemente, las aberturas laterales tienen un área de sección transversal de no superior a 200 mm<sup>2</sup>, preferiblemente no superior a 100 mm<sup>2</sup>.

55 Las paredes de tubo están recubiertas por el lado exterior con la capa de aislamiento térmico del tubo. Para generar una temperatura homogénea en todo el tubo y/o para facilitar la construcción, puede preferirse no tener una capa de cubierta aislante térmicamente en un lado interno. La capa de aislamiento de tubo térmico en el lado externo puede ser estructuralmente similar y/o puede tener características similares a las de la capa de aislamiento del depósito térmico. Particularmente, la capa de aislamiento térmico del tubo puede ser lo suficientemente gruesa y/o puede estar

hecha con un material térmicamente aislante para aislar térmicamente de manera sustancial el interior del tubo de su entorno exterior. En particular, la capa de aislamiento de tubo térmico puede configurarse de modo que impida una transferencia de calor excesiva desde un entorno hacia el volumen interior del tubo y, en particular, del volumen de observación.

5 La capa de aislamiento de tubo térmico comprende dos aberturas. Estas aberturas pueden estar dispuestas adyacentes a las aberturas laterales en las paredes de tubo. Particularmente, las aberturas en la capa de aislamiento de tubo térmico pueden tener la misma o similar geometría y/o sección transversal que las aberturas laterales en el tubo. Por consiguiente, se puede transmitir un haz de láser a través de una sucesión de aberturas laterales en las paredes de tubo que son intermedias a las aberturas en la capa de aislamiento de tubo térmico circundante.

10 La disposición de ventanas comprende dos ventanas con dos cristales. Cada cristal está dispuesto en una de las aberturas de la capa de aislamiento térmico. Por consiguiente, los cristales pueden disponerse en lados opuestos con respecto al volumen de observación. Además, los cristales son transparentes a la luz láser. En particular, los cristales pueden ser transparentes a la luz láser utilizada normalmente en las técnicas de medición de interferometría. Por ejemplo, los cristales pueden estar hechos de un material transparente en un rango de longitud de onda electromagnética de 200 nm a 3  $\mu\text{m}$  o cualquier rango de longitud de onda parcial del mismo.

15 Por consiguiente, uno o más haces de láser utilizados en técnicas de medición de espesores por interferometría pueden transmitirse a través de la disposición de ventanas ya través de la muestra ubicada dentro del volumen de observación entre los cristales de la disposición de ventanas.

20 Además, la conductividad térmica de los cristales de la disposición de ventanas debe ser significativamente menor que la conductividad térmica del tubo que acomoda la disposición de ventanas. Mientras que el tubo conducirá la temperatura criogénica del refrigerante para establecer una alta homogeneidad térmica en todo el volumen interior del tubo, la disposición de la ventana deberá establecer un aislamiento térmico suficiente frente a las temperaturas ambientales fuera del tubo de forma similar a como se establece con el aislamiento térmico en el lado exterior del tubo. Por ejemplo, la conductividad térmica del material de los cristales de las ventanas puede ser al menos diez veces, preferiblemente al menos 100 veces o incluso al menos 1000 veces menor que la conductividad térmica del material del tubo.

30 En el criostato propuesto, el extremo distal del tubo de la unidad de observación de muestras puede extenderse al volumen de almacenamiento del depósito de refrigerante. Por ejemplo, el tubo puede estar dispuesto por encima del depósito de refrigerante y puede orientarse, por ejemplo, en una dirección vertical de manera que su extremo distal inferior o una parte del mismo alcance el volumen de almacenamiento del depósito de refrigerante. Por consiguiente, el refrigerante líquido comprendido en este volumen de almacenamiento puede estar en contacto con al menos una parte del extremo distal del tubo para enfriar el volumen del tubo y el volumen de observación comprendido en el tubo.

35 Al medir el espesor de una muestra, por ejemplo, para fines de CryoEM, se puede usar una realización del criostato descrito para mantener la muestra a temperatura criogénica de manera que las medidas de espesor de interferometría óptica no se vean excesivamente perturbadas.

40 Allí, al llenar un refrigerante líquido tal como nitrógeno líquido en el volumen de almacenamiento del depósito de refrigerante, este refrigerante líquido entra al menos parcialmente y/o está en contacto con el extremo distal del tubo. Por consiguiente, se puede establecer un flujo suave de gas refrigerante a baja temperatura a través del tubo de la unidad de observación de muestras. El flujo de gas refrigerante puede establecerse cuando partes del refrigerante líquido se evaporan y generan un flujo de gas muy frío por todo el tubo de la unidad de observación de muestras. El caudal del flujo de gas refrigerante puede estar gobernado por las pérdidas térmicas del criostato que evaporan el líquido refrigerante, o controlado por un elemento calefactor dentro del criostato.

45 Como este flujo de gas refrigerante a baja temperatura puede tener temperaturas bajas de 150 K o significativamente inferiores, puede enfriar efectivamente el volumen de observación en el tubo de la unidad de observación de muestra. Por consiguiente, cuando se inserta una muestra en la unidad de observación, la muestra puede mantenerse a tales temperaturas criogénicas por debajo de 150 K.

50 En el mismo, debido a la estructura y las características de la unidad de observación de muestra, las fluctuaciones de temperatura, las faltas de homogeneidad de temperatura y/o los gradientes de temperatura en el volumen de observación y, en particular, en la muestra comprendida en este volumen de observación, pueden limitarse a un grado en el que no perturben excesivamente cualquier proceso preciso de medición del espesor de la muestra.

55 Finalmente, el espesor de la muestra se puede medir transmitiendo un haz de láser a través de la disposición de ventana de la unidad de observación de muestras y determinar el espesor de la muestra con base en las mediciones de interferometría con el haz de láser transmitido. Para tal fin, se pueden aplicar técnicas y/o dispositivos de interferometría conocidos. Tales técnicas de interferometría pueden permitir mediciones de espesor con una precisión de unos pocos nanómetros o menos, en casos específicos incluso con una precisión de 1 nm o menos.

De acuerdo con una realización, con el fin de mejorar aún más la aplicabilidad de la disposición de medición de espesor de muestra propuesta en la presente memoria, su unidad de medición del espesor de muestra puede configurarse

para determinar el espesor de la muestra en diversos lugares a lo largo de la muestra y para proporcionar un mapa bidimensional que representa el espesor determinado de la muestra.

5 Para una realización del método de medición de espesores propuesto en la presente memoria, esto significa que el espesor de la muestra se puede determinar en diversas ubicaciones a lo largo de la muestra y se puede proporcionar un mapa bidimensional que representa los espesores de muestra determinados.

10 En otras palabras, la unidad de medición del espesor de muestra no sólo puede estar adaptada para medir el espesor de la muestra en un solo lugar, sino también para medir tal espesor en diversos lugares vecinos. Puede proporcionarse una representación de los espesores medidos en forma de un mapa bidimensional presentado en un plano perpendicular a la dirección del haz de láser. Tal mapa puede comprender una multiplicidad de píxeles en una matriz bidimensional, representando cada píxel el espesor de la muestra en una pequeña área parcial.

15 Por ejemplo, la unidad de medición del espesor de muestra puede emitir un haz de láser que tenga una sección transversal sustancial y luego, después de la transmisión del haz de láser a través de la muestra, puede analizar las interferencias ópticas en el haz de láser transmitido, por ejemplo con un haz de láser de referencia en diversas ubicaciones de muestra. Tales interferencias generalmente resultan, por ejemplo, de cambios de fase en el haz de láser que se transmite a través de la muestra. Por ejemplo, las interferencias ópticas pueden detectarse en diversos píxeles a lo largo de una superficie bidimensional de un detector de haces de láser de la unidad de medición del espesor de la muestra. Con base en tal información sobre las interferencias ópticas que ocurren entre un haz de láser de referencia y el haz de láser transmitido a través de diversas ubicaciones de la muestra, se puede proporcionar el mapa bidimensional que representa los espesores de muestra determinados.

20 Alternativamente, el haz de láser se puede escanear en una dirección perpendicular a la dirección del rayo y se pueden obtener sucesivamente múltiples mediciones de espesor en diferentes lugares a lo largo de la muestra. Nuevamente, se puede determinar un mapa bidimensional que represente los espesores locales.

25 La información incluida en dicho mapa bidimensional se puede usar, por ejemplo, para determinar aquellas muestras en una rejilla sujeta, por ejemplo por un portamuestras de CryoEM que tiene un espesor adecuado para el análisis de CryoEM. En otras palabras, según la información contenida en el mapa bidimensional, ésta se puede simplificar para encontrar aquellas áreas en una rejilla en las que los espesores de las muestras son adecuados para el análisis de CryoEM.

30 Según una realización del criostato, el tubo de la unidad de observación de muestras está hecho de metal. En otras palabras, el tubo puede ser total o parcialmente de metal. Particularmente, al menos una superficie dirigida al volumen del tubo dentro del tubo está hecha de metal. Tal metal puede tener buenas características de conductividad térmica. Por consiguiente, al introducir el tubo con su extremo distal en el refrigerante líquido, las temperaturas criogénicas pueden transferirse por todo el tubo hacia la unidad de observación, enfriando así de forma eficaz la muestra insertada en la unidad de observación. En particular, pueden evitarse fluctuaciones excesivas de temperatura y/o gradientes de temperatura en todo el tubo debido a la alta conductividad térmica de su material metálico. Además, los metales son generalmente materiales mecánicamente estables y, por lo tanto, pueden proporcionar al tubo suficiente estabilidad mecánica y/o rigidez.

35 Particularmente, el tubo puede estar hecho de cobre, es decir, el tubo puede consistir en, o al menos comprender, cobre. El cobre es un metal que tiene características superiores de conductividad térmica y puede proporcionarse a un coste relativamente bajo.

40 De acuerdo con otra realización del criostato, los cristales de la disposición de ventanas en la unidad de observación de muestras pueden estar hechos de vidrio o plástico transparente, es decir, el cristal puede consistir en, o comprender al menos, vidrio o plástico transparente. El vidrio es generalmente muy transparente a los haces de láser. De manera similar, los plásticos transparentes como el poliéster pueden ser muy transparentes a los haces de láser. Además, el vidrio y los plásticos transparentes pueden tener características térmicamente aislantes muy elevadas. Por ejemplo, el poliéster puede tener incluso mejores propiedades de aislamiento térmico que el vidrio. Por consiguiente, los cristales hechos de vidrio o plástico transparente pueden actuar como un gran aislante térmico en un grado similar al de la capa de aislamiento de tubo térmico. Así, aunque los cristales interrumpen el aislamiento térmico proporcionado por la capa aislante de tubo térmico en las áreas de aberturas adyacentes al volumen de observación, no se generan fugas térmicas locales ya que los propios cristales pueden proporcionar un aislamiento térmico suficiente. Por consiguiente, no se inducen fluctuaciones de temperatura o gradientes de temperatura excesivos al nivel de la disposición de ventanas en el volumen de observación, y/o no aparece condensación de agua en los lados de las ventanas expuestos al aire ambiente.

55 En particular, según una realización, los cristales pueden tener un espesor de más de la mitad del espesor, o incluso más de un espesor total, de la capa de aislamiento de tubo térmico. Al tener un espesor tan significativo, los cristales pueden proporcionar un aislamiento térmico suficiente en el área de la disposición de la ventana. Esto puede aplicarse aunque el material de los cristales no tenga las mismas características de aislamiento térmico excelentes que el material de la capa de aislamiento de tubo térmico.

Según una realización particular, los cristales pueden ser huecos. En otras palabras, los cristales pueden no estar formados completamente con un material sólido, sino con un material transparente tal como el vidrio que puede encerrar un volumen hueco. Por ejemplo, el volumen hueco puede llenarse con un gas sin agua tal como nitrógeno, argón o un gas similar. Alternativamente, se puede generar un vacío dentro del volumen hueco. De este modo, las características de aislamiento térmico de los cristales pueden mejorarse aún más. Además, con por ejemplo un cristal de ventana hueco lleno de gas nitrógeno o con un cristal de ventana hueco al vacío, se pueden inducir menos variaciones en la trayectoria del haz de láser en comparación con cristales de ventana completamente macizos.

Según una realización, el criostato puede comprender adicionalmente un portamuestras dispuesto y configurado para contener una muestra dentro del volumen de observación de la unidad de observación de muestras en una ubicación dentro del tubo entre los cristales opuestos de la disposición de ventanas.

En otras palabras, el criostato puede estar provisto de un portamuestras específico. Utilizando el portamuestras, se puede insertar y mantener dentro del tubo de la unidad de observación de muestras una muestra o una rejilla que contenga dicha muestra. Específicamente, el portamuestras puede colocar la muestra en el volumen de observación entre los cristales opuestos de la disposición de ventana de modo que el espesor de la muestra pueda medirse usando técnicas de interferometría óptica al transmitir un haz de láser a través de la disposición de ventana.

En particular, según una realización, el portamuestras puede comprender unas pinzas para sujetar la muestra en el volumen de observación. Un par de pinzas puede tener patas alargadas sustancialmente paralelas conectadas mecánicamente en un extremo y libres en el extremo opuesto. Las puntas en el extremo libre pueden ser pequeñas o incluso puntiagudas, de modo que los elementos pequeños, tales como una rejilla pequeña que comprende la muestra, pueden agarrarse con el par de pinzas. Opcionalmente, puede existir un mecanismo de fijación para fijar el par de pinzas en su estado de agarre. Además, opcionalmente, puede haber un mecanismo de desplazamiento para desplazar el par de pinzas. Por consiguiente, el par de pinzas puede usarse para sujetar la muestra y luego insertar la muestra en el tubo de la unidad de observación de muestras.

Particularmente, de acuerdo con una realización, el portamuestras o las pinzas que forman parte del portamuestras pueden comprender un núcleo mecánicamente estabilizador que está hecho con un primer material y una funda exterior que encierra al menos una porción de sujeción de muestras del portamuestras, estando hecha la funda exterior con un segundo material que tiene una conductividad térmica más baja que el primer material.

En otras palabras, el portamuestras o las pinzas pueden tener un núcleo que proporciona principalmente la estabilidad requerida al portamuestras o las pinzas pero que puede tener una conductividad térmica relativamente alta. Para evitar efectos térmicos negativos debido a la inserción de dicho portamuestras o pinzas en el volumen de observación enfriado en la unidad de observación de muestras, dicho núcleo mecánicamente estabilizador puede cubrirse con la cubierta exterior hecha con el material de menor conductividad térmica. Por consiguiente, la funda exterior puede aislar térmicamente de forma eficaz el núcleo interior del portamuestras del entorno enfriado dentro de la unidad de observación de muestras.

De acuerdo con una realización específica, el portamuestras puede estar hecho de plástico o una resina, es decir, puede consistir en, o puede comprender, plástico o una resina. Los plásticos o la resina pueden estar cargados con vidrio. Generalmente, los materiales plásticos o de resina tienen una conductividad térmica baja, de modo que un portamuestras hecho o cubierto en su superficie por dichos materiales plásticos puede no perturbar o, como máximo, perturbar mínimamente las condiciones térmicas dentro de la unidad de observación de muestras.

Por ejemplo, las pinzas que forman el portamuestras pueden tener un núcleo de vidrio o metal por razones de estabilidad. El núcleo puede estar recubierto por una capa de plástico o resina que proporcione el aislamiento térmico requerido. Alternativamente, solo la punta de las pinzas puede estar hecha con dicho material termoaislante. Por ejemplo, la punta de las pinzas puede ser de polímero PEEK cargado con vidrio o de FR4, G11 u otras resinas cargadas con fibra.

Finalmente, cabe señalar que las posibles características y ventajas de las realizaciones de la presente invención se describen en la presente memoria en relación en parte con respecto a un criostato, en parte con respecto a una disposición de medición de espesor de muestra y en parte con respecto a un método para medir un espesor de una muestra. Un experto en la materia se dará cuenta de que las características descritas para un tipo de realizaciones pueden adaptarse, transferirse, reemplazarse y/o combinarse con otras características descritas para el mismo tipo u otro tipo de realizaciones, con el fin de llegar a realizaciones adicionales de la presente invención.

### Breve descripción de los dibujos

A continuación, se describirán ejemplos de realizaciones de la invención con referencia al dibujo adjunto. Ni el dibujo ni la memoria limitarán el alcance de las invenciones y sus realizaciones.

La figura 1 muestra una disposición de medición de espesor de muestra con un criostato de acuerdo con una realización de la invención.

La figura 2 muestra una disposición de medición de espesor de muestra con un criostato de acuerdo con una realización alternativa de la invención.

Los dibujos son solo esquemáticos y no están a escala. Los elementos iguales o similares se mencionan con los mismos signos de referencia en todos los dibujos.

## 5 Descripción detallada de realizaciones

La figura 1 muestra una disposición de medición de espesor de muestra 1 que incluye un criostato 3 según realizaciones de la presente invención. Además del criostato 3, el dispositivo de medición de espesor de muestra 1 comprende una unidad de medición de espesor de muestra 5.

10 La unidad de medición de espesor de muestra 5 está configurada para generar un haz de láser 9 que se transmitirá a través de una muestra transparente 49 y para medir los cambios de fase en el haz de láser 9 después de la transmisión a través de la muestra 49, con el fin de obtener información sobre el espesor de la muestra 49.

15 Tal unidad de medición de espesor de muestra 5 podría ser un microscopio holográfico digital comercial (DHM). La microscopía holográfica digital es un tipo de holografía digital aplicada a la microscopía. La microscopía holográfica digital se distingue de otros métodos de microscopía porque no registra una imagen proyectada del objeto, sino que registra digitalmente la información del frente de onda de luz que se origina en el objeto como un holograma. A partir de dicho holograma, una ordenadora puede calcular la imagen del objeto utilizando un algoritmo de reconstrucción numérico. La lente que forma la imagen en la microscopía tradicional se reemplaza así por un algoritmo informático. Otros métodos de microscopía estrechamente relacionados con la microscopía holográfica digital son la microscopía interferométrica, la tomografía de coherencia óptica y la microscopía de fase de difracción. Común a todos esos métodos es el uso de un frente de onda de referencia para obtener información de amplitud y fase. La información se registra en un sensor de imagen digital o por un fotodetector a partir del cual una ordenadora puede crear o reconstruir una imagen del objeto. A diferencia de esto, en la microscopía tradicional, no se utiliza un frente de onda de referencia, sino que solo se registra la información de intensidad y, por lo general, se pierde la información esencial sobre el objeto.

25 En un DHM, generalmente es necesario crear patrones de interferencia, es decir, un holograma. Por consiguiente, la iluminación utilizada en un DHM debe ser coherente. Por lo tanto, generalmente se aplica un haz de láser como fuente de iluminación. El haz de láser normalmente se divide en un rayo de objeto y un rayo de referencia. El haz del objeto expandido ilumina la muestra para crear el frente de onda del objeto. Después de que el objetivo del microscopio recoge el frente de onda del objeto, los frentes de onda del objeto y de referencia se unen, por ejemplo por un divisor de haz para interferir y crear el holograma. Usando el holograma grabado digitalmente, un ordenador puede actuar como una lente digital y calcular una imagen visible del frente de onda del objeto usando un algoritmo de reconstrucción numérico. Por consiguiente, puede usarse un DHM para proporcionar una imagen bidimensional del objeto transparente que comprende, entre otras cosas, información sobre los espesores locales del objeto. Opcionalmente, el DHM puede comprender adicionalmente un objetivo que incluye una lente de modo que la rejilla pueda ser reflejada directamente.

35 La unidad de medición de espesor de muestra 5 incluida en la disposición de medición de espesor de muestra 1 propuesta solo se visualiza de forma muy esquemática. Comprende un láser 7 que emite el haz de láser 9 y un detector de luz 11. El haz de láser 9 tiene un ancho de haz relativamente amplio y el detector de luz 11 comprende varios píxeles detectores para generar información bidimensional con respecto a una amplitud y fase de luz laser detectada. El láser 7, así como el detector de luz 11, están conectados a una unidad informática 13 que puede generar imágenes o mapas bidimensionales basados en la información recibida por el detector de luz 11, dichas imágenes o mapas representan anchos locales en diversos lugares a lo largo de la muestra 49. Tales imágenes o mapas pueden emitirse en una interfaz de salida 15. Por consiguiente, las imágenes o mapas pueden transmitirse a otros dispositivos como, por ejemplo, un de CryoEM o el ordenador de control de la máquina de preparación de muestras.

45 Como ya se indicó brevemente en la anterior sección "compendio de la invención y de las realizaciones", solo se pueden obtener buenos datos de CryoEM a partir de partículas incrustadas en una solución vitrificada, es decir, en hielo amorfo. Una vez vitrificadas, las muestras deben permanecer por debajo de los 150 K, es decir, la temperatura a la que el hielo vitificado se transforma en hielo hexagonal, cúbico o cristalino. Por razones prácticas, las rejillas de muestra preparadas se almacenan normalmente en nitrógeno líquido a 77,36 K. Las mediciones de espesor deben realizarse en condiciones criogénicas.

50 Sin embargo, esto ha demostrado ser un gran desafío. Por ejemplo, los métodos holográficos digitales utilizados en dispositivos comerciales para medir con precisión el espesor de muestras transparentes suelen ser extremadamente sensibles a los movimientos del aire y los gradientes de temperatura. Esta dificultad se amplifica a temperaturas criogénicas, donde la trayectoria de la luz de medición presenta grandes gradientes de temperatura que son difíciles de estabilizar.

55 Los inventores han realizado una primera tentativa utilizando un chorro criogénico estándar para mantener la rejilla de la muestra a 100 K, mientras se observa con un microscopio holográfico digital estándar. Sin embargo, esta tentativa no prosperó. Los patrones de interferencia eran muy inestables debido al gradiente de temperatura fluctuante del flujo

de nitrógeno frío en el chorro criogénico y la inestabilidad de la ventana de aire/nitrógeno. No se obtuvo ningún mapa de espesor explotable con este método. Una tentativa para separar el flujo de nitrógeno frío del aire ambiente no mejoró significativamente los resultados.

5 Por consiguiente, los inventores han buscado y desarrollado una configuración de observación criogénica específica que no perturbe la medición del espesor óptico. En esta configuración, las rejillas de muestra 50 se sujetan con un portamuestras 53 que comprende una pinza 51 en un tubo 31 en el que se establece un flujo laminar suave de gas nitrógeno a aproximadamente 80 K. Una disposición de ventana de observación 35 permite que el haz de láser 9 del microscopio holográfico digital pase a través de la muestra 49.

10 Para ello se ha desarrollado un criostato especial 3. El criostato 3 comprende un depósito de refrigerante 17 y una unidad de observación de muestras 19.

El depósito de refrigerante 17 comprende un recipiente 21 que encierra un volumen de almacenamiento 23. En el mismo, las paredes 25 del recipiente 23 están térmicamente aisladas con una capa de aislamiento de depósito térmico 27. Debido a dicho aislamiento, el líquido refrigerante 29 puede almacenarse dentro del depósito de refrigerante 17 a temperaturas criogénicas por debajo de 150 K.

15 La unidad de observación de muestras 19 comprende un tubo 31, una capa de aislamiento de tubo térmico 33 y una disposición de ventana 35.

20 El tubo 31 comprende unas paredes de tubo 32 y está abierto tanto en su extremo distal 37 como en su extremo proximal 39. El extremo distal 37 del tubo 31 está dispuesto dentro del volumen de almacenamiento 23 del depósito de refrigerante 17 de tal manera que partes del refrigerante líquido 29 pueden ingresar al interior del tubo 31 y/o hacer contacto térmico con el extremo distal 37 del tubo 31. Por consiguiente, el refrigerante líquido 29 puede enfriar el tubo 31 y puede evaporarse parcialmente para establecer un flujo suave de gas refrigerante a baja temperatura a través del tubo 31.

25 Preferiblemente, el tubo 31 está hecho de un metal como el cobre que tiene una alta conductividad térmica. Un lado externo del tubo 31 está cubierto con la capa de aislamiento térmico del tubo 33 para minimizar cualquier pérdida térmica. Por consiguiente, pueden minimizarse las pérdidas térmicas, las fluctuaciones térmicas y/o los gradientes térmicos en todo el tubo 31.

30 Cerca de su extremo proximal 39, el tubo 31 comprende dos aberturas laterales 41. Las aberturas laterales 41 están dispuestas en lados opuestos del tubo 31 y encierran un volumen de observación 43 en el medio. Adyacentes a las aberturas 41 en el tubo 31, también se proporcionan unas aberturas 45 dentro de la capa de aislamiento térmico de tubo 33. La disposición de ventana 35 comprende dos cristales gruesos 47 de vidrio o plexiglás. Estos cristales 47 tienen una geometría complementaria a la de las aberturas 45 en la capa de aislamiento de tubo térmico 33 y, por lo tanto, llenan y aíslan térmicamente estas aberturas 45 en la región de la disposición de ventana 35.

35 Con el fin de preparar, por ejemplo, unas muestras biológicas 49 para el análisis de CryoEM, se dispensa una solución que comprende las muestras 49 en una rejilla 50 y luego se vitrifica, por ejemplo en etano líquido. La rejilla 50 con las muestras vitrificadas 49 se introduce luego en el volumen de observación 43 en el tubo 31 del criostato 3.

Manteniéndose en el flujo de gas refrigerante a baja temperatura que fluye a través del tubo 31, se pueden realizar mediciones de microscopio holográfico digital para obtener información bidimensional de los espesores de las muestras 49.

40 Un punto crítico aquí puede ser el enfoque utilizado para mantener las muestras 49 o, más precisamente, la rejilla 50 con estas muestras 49, y para introducirlo en el volumen de observación 43 en el tubo 31. Para obtener una medición libre de perturbaciones ambiente, un portamuestras 53 comprende pinzas 51 para sostener y, opcionalmente, desplazar la rejilla 50 con las muestras 49. Aunque tales pinzas 51 pueden tener puntas delgadas, se observó que las pinzas metálicas 51 pueden conducir suficiente calor a las muestras 49 para modificar una densidad del flujo de gas refrigerante alrededor de la rejilla 50 y, por lo tanto, alterar las medidas de espesor.

45 Por consiguiente, se tomaron medidas para minimizar las influencias térmicas creadas por el portamuestras 53. Para tal fin, se han utilizado las pinzas 51 hechas de plástico (por ejemplo, PEEK cargado con vidrio) para sujetar la rejilla 50 con las muestras 49. Opcionalmente, tales pinzas 51 pueden tener un núcleo estabilizador 55 que sea mecánicamente estable. Por ejemplo, tal núcleo 55 puede estar hecho de vidrio. Una superficie de este núcleo 55 puede estar cubierta con una funda exterior 57 de plástico. Con tal disposición, podría minimizarse la transferencia de calor y, por consiguiente, no perturba el flujo de gas refrigerante laminar a través del volumen de observación 43.

50 Con la configuración descrita, fue posible la creación de un mapa de espesores de la rejilla 50, que comprende las muestras 49, con un ruido aceptable. De hecho, utilizando la unidad de observación de muestras 19 del criostato 3 propuesto en la presente memoria y acoplado dicha unidad de observación de muestras 19 con la unidad de medición de espesor de muestra 5 que comprende un microscopio holográfico digital comercial, se demostró que es posible  
55 medir el espesor de una muestra vitrificada 49 en una rejilla 50 de CryoEM con una precisión de unos pocos nanómetros y producir un mapa de espesor de muestra sobre una rejilla completa 50.

Tal mapa de espesor podría usarse para rechazar rejillas 50 con un espesor de muestra inadecuado y/o para acceder directamente a áreas de espesores de muestra óptimos durante el análisis de CryoEM. Por consiguiente, el sistema propuesto podría hacer que las tuberías de CryoEM, que comprenden la preparación de muestras, seguida de la detección y luego la recopilación de datos, sean más eficientes y que las plataformas de CryoEM sean más productivas.

El enfoque propuesto podría realizarse como una máquina independiente para controlar la calidad de las rejillas de muestra ya preparadas. Alternativamente, podría proporcionarse una unidad de inspección flexible que podría adaptarse a las máquinas de preparación de muestras en línea existentes.

Finalmente, se mencionará que la microscopía holográfica digital no solo se puede utilizar para medir espesores de muestra después de vitrificar la muestra. Adicional o alternativamente, el DHM también se puede aplicar para medir el espesor de una muestra antes de enfriar la muestra a temperaturas criogénicas. Por ejemplo, en un enfoque modificado, las muestras se pueden preparar dispensando la solución de muestra en una rejilla de CryoEM, eliminando luego posiblemente cualquier exceso de solución de muestra de la rejilla de CryoEM y midiendo luego el espesor de las muestras no congeladas utilizando medidas de interferometría como DHM. Opcionalmente, la estructura y/o el espesor de las muestras se pueden modificar en caso de que se observe un espesor no adecuado y/o una distribución de espesores no homogénea. Si el DHM proporciona resultados satisfactorios para los espesores de la muestra y/o la distribución del espesor en toda la rejilla de CryoEM, las muestras pueden vitrificarse. Por ejemplo, las muestras se pueden enfriar a temperaturas criogénicas al someter la rejilla de CryoEM a un flujo de etano muy frío. Después de tal vitrificación, puede verificarse el espesor de la muestra utilizando el enfoque descrito en la presente memoria midiendo el espesor, por ejemplo con un DHM mientras la rejilla de CryoEM se coloca dentro del volumen de observación del criostato descrito en la presente memoria.

La figura 2 muestra una disposición de medición de espesor de muestra 1 que incluye un criostato 3 según una realización alternativa de la presente invención. Las características y funcionalidades estructurales generalmente corresponden a las descritas para la realización que se muestra en la figura 1. Se observa una diferencia principal entre las realizaciones de la figura 1 y de la figura 2 en el extremo distal 37 del tubo 31.

En la realización de la figura 1, este extremo distal 37 está completamente abierto, es decir, las paredes de tubo 32 del tubo 31 se sumergen en el refrigerante líquido 29 sin obstruir un volumen interior del tubo 31, estableciendo así una conexión directa de flujo de gas entre el refrigerante líquido 29 y el volumen interior del tubo 31. Por consiguiente, el gas frío que se evapora del refrigerante líquido 29 puede entrar directamente en el volumen interior del tubo 31.

Sin embargo, se ha observado que tal gas frío, que se evapora del refrigerante líquido 29, puede tener una distribución de flujo de gas no homogénea y/o turbulencias de flujo de gas. Las faltas de homogeneidad temporales y/o espaciales en un efecto de enfriamiento de dicho flujo de gas refrigerante turbulento y/o no homogéneo pueden afectar las mediciones del espesor de la muestra realizadas con el dispositivo de medición de espesor de muestra 1. Por consiguiente, tales mediciones pueden, en determinadas circunstancias, adolecer de un ruido de medición excesivo.

Para minimizar tal ruido de medición, se puede disponer un homogeneizador de flujo de gas 59 en y/o dentro del tubo 31, por ejemplo, dentro o aguas arriba del extremo distal 37 del tubo 31. Tal homogeneizador de flujo de gas 59 puede configurarse, por ejemplo, para reducir las faltas de homogeneidad y/o turbulencias en un flujo de gas refrigerante en el tubo 31. En otras palabras, el homogeneizador 59 puede configurarse y disponerse para reducir al menos una de las faltas de homogeneidad y turbulencias dentro de un flujo de gas refrigerante a través del tubo 31 en un área en y aguas arriba del volumen de observación 43.

Por ejemplo, el homogeneizador de flujo de gas 59 puede ser, o puede comprender, una espuma 61. Tal espuma 61 puede ser una espuma de celda abierta 61 de modo que el gas pueda fluir a través de la espuma 61. Por consiguiente, el gas que se evapora del refrigerante líquido 29 puede atravesar el homogeneizador de flujo de gas 59 al fluir a través de la espuma 61. En tal trayectoria de flujo de gas, se genera un arrastre en el flujo de gas. De ese modo, pueden minimizarse las faltas de homogeneidad y/o las turbulencias en el flujo de gas. Así, al llegar al volumen de observación 43, el flujo de gas refrigerante sustancialmente homogéneo y laminar puede enfriar continua y homogéneamente la muestra 49 comprendida en el volumen de observación 43.

Para simplificar la manipulación del dispositivo de medición de espesor de muestra 1 y, en particular, para simplificar la carga y/o descarga de una muestra 49 en o desde dicho dispositivo 1, se proporciona un cajón 63 o cartucho dentro del depósito de refrigerante 17. El cajón 63 puede fabricarse con un material térmico altamente conductor tal como un metal térmico altamente conductor. El cajón 63 puede estar en contacto térmico con el refrigerante líquido 29. El cajón 63 puede desplazarse horizontalmente como se indica con la flecha discontinua 65.

Además, el tubo 31 también puede estar en contacto térmico con el refrigerante líquido 29. Por ejemplo, se puede proporcionar un émbolo 71 en el extremo distal 37 del tubo 31. El émbolo 71 se puede fabricar con un material térmico altamente conductor tal como un metal térmicamente muy conductor. Tal émbolo 71 puede extenderse desde el extremo distal 37 del tubo 31 hacia el refrigerante líquido 29 para enfriar el tubo 31.

Cerca de un extremo lateral, el cajón 63 comprende un orificio pasante vertical en el que se dispone la espuma 61 del homogeneizador 59. Allí, un extremo inferior del orificio pasante está por debajo del nivel del refrigerante líquido 29

dentro del volumen de almacenamiento 23. Un extremo superior del orificio pasante está dispuesto junto al extremo distal 37 del tubo 31. Por consiguiente, el refrigerante líquido 29 puede entrar en el orificio pasante desde abajo y el gas que se evapora de dicho refrigerante líquido 29 puede transmitirse, después de haber pasado por la espuma 61 del homogeneizador 59, al volumen interior del tubo 31.

5 Cerca de un extremo lateral opuesto, el cajón 63 comprende un volumen de alojamiento 67. En dicho volumen de alojamiento 67, se pueden disponer y almacenar una o más muestras 49.

10 En una primera configuración, como se muestra en la figura 2, el cajón 63 puede estar dispuesto de tal manera que el homogeneizador 59 esté situado junto al extremo distal 37 del tubo 31. En tal primera configuración, el volumen de alojamiento 67 está dispuesto debajo de una abertura de acceso 69 dispuesta en el lado superior del depósito de refrigerante 17. Por consiguiente, un usuario puede colocar una muestra 49 a través de la abertura de acceso 69 en el volumen de alojamiento 67 para almacenar la muestra 49 en el volumen de alojamiento enfriado 67 del cajón 63 hundido en el refrigerante líquido 29. Luego, para cargar la muestra 49 en la unidad de medición de espesor de muestra 5, el cajón 63 se puede desplazar lateralmente (a lo largo de la flecha 65) de tal modo que el volumen de alojamiento 67 esté dispuesto debajo del extremo distal 37 del tubo 31. En tal segunda configuración, la muestra 49 se puede sacar del volumen de alojamiento 67 utilizando, por ejemplo, la pinza 51. Por ejemplo, la pinza 51 puede agarrar la muestra 49 con un movimiento automático y puede transferir la muestra 49 en el volumen de observación 43 para medir su espesor. Después de haber transferido la muestra 49 al volumen de observación 43, es decir, antes de comenzar el procedimiento de medición real, el cajón 63 se puede desplazar lateralmente de vuelta a su primera configuración de tal manera que cualquier flujo de gas refrigerante hacia el tubo 31 tiene que cruzar el homogeneizador 59 antes de entrar en el tubo 31.

20 Finalmente, el término "que comprende" no excluye otros elementos o pasos, y el artículo indefinido "un" o "una" no excluye una pluralidad. El mero hecho de que ciertas medidas se mencionen en reivindicaciones subordinadas mutuamente diferentes no indica que no pueda utilizarse con ventaja una combinación de estas medidas. Cualquier signo de referencia en las reivindicaciones no debe interpretarse como una limitación del alcance.

## 25 **Lista de signos de referencia**

1	disposición de medición de espesor de muestra
3	criostato
5	unidad de medida de espesor de muestra
7	láser
30 9	rayo laser
11	detector de luz
13	unidad de computación
15	interfaz de salida
17	depósito de refrigerante
35 19	unidad de observación de muestras
21	recipiente
23	volumen de almacenamiento
25	paredes
27	capa de aislamiento de depósito térmico
40 29	refrigerante liquido
31	tubo
32	paredes de tubo
33	capa de aislamiento de tubo térmico
35	disposición de ventana
45 37	extremo distal

## ES 2 916 673 T3

	39	extremo proximal
	41	aberturas en el tubo
	43	volumen de observación
	45	aberturas en la capa de aislamiento de tubo térmico
5	47	cristales
	49	muestras
	50	red
	51	pinzas
	53	portamuestras
10	55	centro
	57	funda exterior
	59	homogeneizador
	61	espuma
	63	cajón
15	65	flecha que indica el movimiento del cajón
	67	volumen de alojamiento
	69	abertura de acceso
	71	émbolo

**REIVINDICACIONES**

1. Criostato (3) que comprende:
  - un depósito de refrigerante (17) para almacenar refrigerante líquido (29); y
  - una unidad de observación de muestras (19) para observar las características de una muestra (49);
- 5 en el que el depósito de refrigerante comprende un recipiente (21) que encierra un volumen de almacenamiento (23) con paredes (25) del recipiente que están térmicamente aisladas con una capa de aislamiento de depósito térmico (27) para permitir el almacenamiento de refrigerante líquido a temperaturas inferiores a 150 K;
  - en el que la unidad de observación de muestras comprende:
    - 10 un tubo (31) que tiene paredes de tubo (32) que encierran un volumen de tubo que incluye un volumen de observación (43);
    - una capa aislante de tubo térmico (33); y
    - una disposición de ventana (35);
    - en el que el tubo está abierto en un extremo distal (37) y en un extremo proximal (39);
    - 15 en el que el extremo distal del tubo está dispuesto dentro del volumen de almacenamiento del depósito de refrigerante;
    - en el que el tubo tiene dos aberturas laterales (41) en sus paredes de tubo en lados opuestos con respecto al volumen de observación;
    - en el que las paredes de tubo están recubiertas en su lado externo con la capa de aislamiento térmico de tubo;
    - 20 en el que la capa de aislamiento de tubo térmico tiene dos aberturas (45) adyacentes a las aberturas en las paredes de tubo, y
    - en el que la disposición de ventana comprende dos cristales opuestos (47), estando dispuesto cada cristal en una de las aberturas en la capa de aislamiento térmico, siendo los cristales transparentes a la luz de un haz de láser (9).
    - 25
2. Criostato según la reivindicación 1, en el que el tubo es metálico.
3. Criostato según la reivindicación 1, en el que el tubo es de cobre.
4. Criostato según una de las reivindicaciones anteriores, en el que los cristales están fabricados con al menos uno de vidrio y plástico transparente.
- 30 5. Criostato según una de las reivindicaciones anteriores, en el que los cristales tienen un espesor de más de la mitad del espesor de la capa de aislamiento de tubo térmico.
6. Criostato según una de las reivindicaciones anteriores, en el que los cristales son huecos.
7. Criostato según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un portamuestras (53) dispuesto y configurado para contener una muestra dentro del volumen de observación de la unidad de observación de muestras en una ubicación dentro del tubo entre los cristales opuestos.
- 35 8. Criostato según la reivindicación 7, en el que el portamuestras comprende unas pinzas (51) para sujetar la muestra en el volumen de observación.
9. Criostato según una de las reivindicaciones 7 y 8, en el que el portamuestras comprende un núcleo mecánicamente estabilizador (55) fabricado con un primer material y una funda exterior (57) que encierra al menos una parte del portamuestras que contiene la muestra, estando hecha la funda exterior con un segundo material que tiene una conductividad térmica más baja que la del primer material.
- 40 10. Criostato según una de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el portamuestras está fabricado con al menos uno de plástico, resina, plástico cargado con vidrio y resina cargada con vidrio.
- 45 11. Criostato según una de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además un homogeneizador configurado y dispuesto para reducir al menos una de las faltas de homogeneidad y turbulencias dentro de un flujo de gas refrigerante a lo largo del tubo en un área aguas arriba del volumen de observación.

12. Disposición de medición de espesor de muestra (1) que comprende:

un criostato (3) según una de las reivindicaciones 1 a 10;

una unidad de medición de espesor de muestra (5) que está dispuesta y configurada para transmitir un haz de láser (9) a través de la disposición de ventana (35) de la unidad de observación de muestras y para determinar el espesor de una muestra (49) con base en mediciones de interferometría con el haz de láser transmitido (9).

13. Dispositivo de medición de espesor de muestra según la reivindicación 12, en el que la unidad de medición de espesor de muestra está configurada para determinar el espesor de la muestra en diversos lugares de la muestra y para proporcionar un mapa bidimensional que representa los espesores de la muestra determinados.

14. Método para medir el espesor de una muestra (49), comprendiendo el método:

proporcionar un criostato (3) según una de las reivindicaciones 1 a 10;

establecer un flujo de gas refrigerante a baja temperatura a través del tubo (31) de la unidad de observación de muestras (19) del criostato;

insertar la muestra en el volumen de observación (43) de la unidad de observación de muestras; y

medir el espesor de la muestra transmitiendo un haz de láser (9) a través de la disposición de ventana (35) de la unidad de observación de muestras y determinar el espesor de la muestra basándose en mediciones de interferometría con el haz de láser transmitido (9).

15. Método de la reivindicación 14, en el que el espesor de la muestra se determina en diversas ubicaciones a lo largo de la muestra y se proporciona un mapa bidimensional que representa los espesores de muestra determinados.

Fig. 1

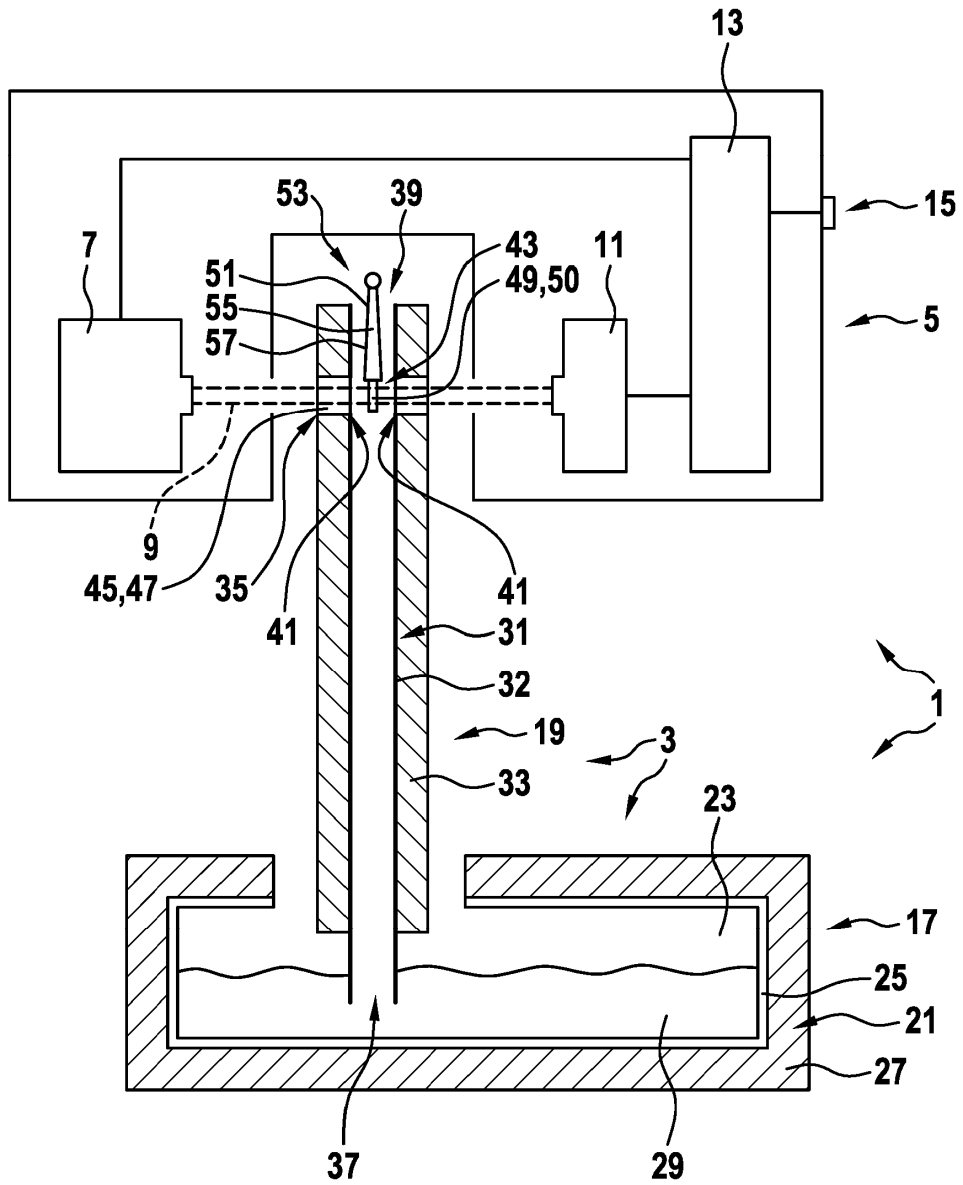


Fig. 2

