

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 701**

51 Int. Cl.:
H01J 37/02 (2006.01)
H01J 37/09 (2006.01)
H01J 37/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08762269 .2**
96 Fecha de presentación: **05.06.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2179437**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2010**

54 Título: **Microscopio electrónico de transmisión**

30 Prioridad:
09.07.2007 GB 0713276

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.09.2012

73 Titular/es:
**Medical Research Council
2nd Floor, David Phillips Building Polaris House,
North Star Avenue
Swindon, SN2 1FL, GB**

72 Inventor/es:
**BERRIMAN, John y
ROSENTHAL, Peter**

74 Agente/Representante:
Zea Checa, Bernabé

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).

ES 2 387 701 T3

DESCRIPCIÓN

Microscopio electrónico de transmisión

5 La presente invención se refiere a un microscopio electrónico de transmisión.

10 Cuando se obtienen imágenes de muestras no conductoras mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), una carga positiva inducida por haz se acumula en la muestra debido a la expulsión de electrones secundarios. Las imágenes de transmisión de dichas muestras cargadas se degradan debido a (1) una perturbación electrostática de la óptica de representación y (2) el movimiento inducido por la carga y la modificación de la muestra. Estos problemas suponen una limitación importante para una amplia variedad de experimentos de obtención de imágenes en biología y ciencias de materiales, incluyendo la obtención de imágenes de muestras hidratadas congeladas por criomicroscopía.

15 Para muestras que son resistentes al daño por radiación por el haz de electrones para la obtención de imágenes, las imágenes a menudo se registran tras una exposición previa suficiente de manera que la acumulación carga positiva sobre la muestra alcanza un estado estacionario debido a que los electrones secundarios no pueden escapar de la carga positiva. Para muestras que no son resistentes a daños por radiación, la exposición previa no es una opción, ya que deben registrarse importantes detalles estructurales de la muestra utilizando los primeros pocos electrones que irradian la muestra. De este modo, la carga sobre la muestra puede cambiar durante la exposición. La degradación de la imagen por la carga puede ser más problemática para la criomicroscopía de muestras biológicas precisamente en condiciones de obtención de imágenes que de otro modo son más ventajosas para obtener imágenes del detalle estructural, como por ejemplo cuando se suspenden en orificios en hielo, o a temperatura de helio líquido donde la conductividad de la muestra es reducida.

25 Brink y otros, "*Evaluation of charging on macromolecules in electron microscopy*", *Ultramicroscopy*, 72 (1998) 41-52 describe la acumulación de carga en muestras no conductoras debido a la emisión de electrones secundarios. En particular, se describe un experimento en el cual se utiliza un haz de pequeño diámetro para cargar una muestra, y se utiliza entonces un haz de diámetro ancho para observar el área cargada y eventualmente descargarla. Se sugiere que algunos de los electrones secundarios que se emiten a través de toda la zona cuando la muestra se examina con el haz ancho vuelven para compensar la carga positiva acumulada.

30 Warrington, "*A simple charge neutralizer for the electron microscope*", *J. Sci. Instrum.*, 43 (1966) 77-78, propone un neutralizador de carga que consiste en una película conectada a tierra de carbono y aluminio depositado al vacío sostenida por encima del plano de la muestra del objetivo. El haz de electrones atraviesa la película antes de golpear la muestra a examinar. Los electrones de baja energía que son expulsados de la película descargan entonces la muestra no conductora.

40 La carga positiva inducida por el haz puede acumularse en otros cuerpos no conductores, tales como elementos ópticos electrónicos, situados en la trayectoria del haz de electrones, y degradar su rendimiento. Ejemplos de estos cuerpos son placas de fase y biprismas electrónicos.

45 US 2002/0011566 describe una placa de fase antiestática para su uso en microscopía electrónica de contraste de fase, estando fabricada la placa de fase de una película delgada de un material amorfo conductor.

Frost, "*Image-plane off-axis electron holography: low-magnification arrangements*", *Meas. Sci. Technol.*, 10 (1999) 333-339, describe mediciones del ángulo de desviación en un biprisma electrónico que indican que la fibra biprisma está cargada positivamente por el haz de electrones de obtención de imágenes.

50 EP 0417354 propone un aparato de haz de electrones que comprende una fuente de electrones para generar un haz de electrones para irradiar una muestra situada en un espacio de campo de una lente de electrones, y una fuente de electrones auxiliar para generar un haz de electrones de baja potencia para inyectarlo en el espacio de campo de la lente y dirigirlo hacia la superficie de la muestra mediante la misma lente de campo.

55 La presente invención pretende superar o mitigar los problemas de la acumulación de carga positiva inducida por el haz.

La presente invención dispone un microscopio electrónico de transmisión (TEM) según la reivindicación 1.

60 Tal como aquí se utiliza, el término "haz de electrones fuera del eje separado" excluye cualquier haz de electrones fuera del eje que pueda producirse por dispersión o difracción del haz de electrones axial.

Al producir, simultáneamente con el haz de electrones axial, un haz de electrones fuera del eje separado que provoca que se emitan electrones secundarios neutralizantes de carga, el TEM puede utilizarse, por ejemplo, para obtener imágenes de una muestra no conductora mientras que, al mismo tiempo, opera para reducir la acumulación de carga sobre la muestra. En otras palabras, el haz de electrones fuera del eje separado y el cuerpo conductor eléctrico fuera del eje pueden considerarse como un sistema dedicado para reducir o eliminar la acumulación de carga. Ventajosamente, y a diferencia de las observaciones de Brink y otros, *ibid*, el operario del TEM puede obtener imágenes de una muestra con un haz de diámetro estrecho y aún así evitar problemas de acumulación de carga positiva inducida por el haz. Además, la inconveniencia y la perturbación de un neutralizador de carga dispuesto en la trayectoria del haz de electrones axial de acuerdo con la propuesta de Warrington *ibid*. puede evitarse.

Preferiblemente, el cuerpo conductor eléctrico fuera del eje está colocado adyacente a la posición del cuerpo de destino. Los electrones secundarios emitidos desde el cuerpo tendrán que recorrer entonces una distancia relativamente corta antes de incidir sobre el cuerpo de destino, lo que puede aumentar el flujo de electrones que inciden.

Preferiblemente, el haz de electrones fuera del eje es un haz de electrones paraxial. Un haz de electrones paraxial puede definirse como un haz que puede enfocarse sobre el eje óptico de electrones mediante los objetivos del TEM, pero tiene un ángulo de divergencia mínimo que es mayor que el ángulo de divergencia máximo del haz de electrones axial.

Convenientemente, el haz de electrones fuera del eje puede producirse a través de la misma fuente de electrones que produce el haz de electrones axial, es decir, el sistema para producir simultáneamente un haz de electrones fuera del eje separado puede incluir la fuente de electrones. Ventajosamente, utilizando este enfoque, un TEM convencional puede convertirse fácilmente en un TEM de acuerdo con la presente invención.

De este modo, el sistema para producir un haz de electrones fuera del eje puede comprender un cuerpo de aperturas situado entre la fuente de electrones y la posición cuerpo de destino, presentando el cuerpo de aperturas una apertura axial para la transmisión del haz de electrones axial y presentando, además, una apertura fuera del eje para la producción del haz de electrones fuera del eje. Dicho cuerpo de aperturas puede reemplazar a un cuerpo de aperturas de condensador existente de un TEM existente de una manera simple.

El sistema para producir un haz de electrones fuera del eje puede producir una pluralidad de dichos haces los cuales, en funcionamiento, inciden en el cuerpo conductor eléctrico (o, más preferiblemente, respectivos cuerpos conductores eléctricos). Esto hace que sea posible, por ejemplo, neutralizar la acumulación de carga positiva en respectivos cuerpos de destino en posiciones separadas en la posición del eje óptico electrónico. De este modo, el cuerpo de aperturas puede tener una pluralidad de aperturas fuera del eje para la producción de respectivos haces de electrones fuera del eje, incidiendo cada haz de electrones fuera del eje, en funcionamiento, sobre el cuerpo conductor eléctrico fuera del eje o un respectivo cuerpo conductor eléctrico fuera del eje.

Típicamente, el TEM tiene por lo menos una lente condensadora entre la fuente de electrones y la posición del cuerpo de destino, y el cuerpo de aperturas puede estar colocado entre la lente condensadora y la posición del cuerpo de destino. De este modo, la apertura puede limitar el campo de iluminación de la lente condensadora.

En otras realizaciones de la invención, el sistema para producir un haz de electrones fuera del eje puede comprender una fuente de electrones adicional (o una pluralidad de fuentes de electrones adicionales si se va a utilizar una pluralidad de haces de electrones fuera del eje). Esto puede aumentar la complejidad y el coste del TEM, y puede hacer más difícil convertir un TEM convencional en un TEM de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, una fuente de electrones adicional para producir el haz de electrones fuera del eje puede proporcionar una ventaja al permitir que la intensidad del haz fuera del eje varíe independientemente del haz axial, o para que el haz fuera del eje permanezca constante si el haz axial es pulsado.

Típicamente, la posición del cuerpo de destino es una posición de la muestra, el haz de electrones axial que, en funcionamiento, que incide contra una muestra, y los electrones secundarios emitidos que inciden sobre la muestra para neutralizar la carga positiva que puede acumularse en la muestra. Convenientemente, el cuerpo conductor eléctrico fuera del eje puede lo puede disponer un soporte de la muestra que sujeta la muestra en la posición de la muestra.

Sin embargo, el cuerpo de destino, o uno de los cuerpos de destino, puede ser un elemento óptico electrónico tal como una placa de fase o un biprisma electrónico. En tales casos, el haz axial incide típicamente en una muestra, y esa muestra puede ser otro cuerpo de destino. Si hay varios cuerpos de destino, cada uno puede tener un cuerpo conductor eléctrico respectivo.

Se describirán ahora realizaciones de la invención a modo de ejemplo con referencia a los dibujos que se acompañan, en los cuales:

5 La figura 1 muestra esquemáticamente una muestra no conductora, y un haz de electrones axial TEM utilizado para obtener imágenes de la muestra;

La figura 2 muestra esquemáticamente una sección longitudinal a través de un TEM de acuerdo con una realización de la invención;

10 La figura 3 muestra esquemáticamente una apertura de múltiples orificios;

La figura 4 es un registro en una película de rayos de electrones axiales y paraxiales;

15 La figura 5(a) es una imagen de una apertura de condensador de siete orificios, y la figura 5(b) es un microscopio electrónico de registro en una cámara CCD de haces de electrones producidos por la apertura de siete orificios diseñada;

20 La figura 6 es un registro en una cámara CCD de una muestra típica (congelada hidratada) sensible al haz con las posiciones de los haces indicadas para obtener imágenes de una muestra utilizando la apertura de siete orificios, y

25 La figura 7 muestra dos imágenes de la misma zona de una muestra de única partícula típica en hielo vítreo sobre un orificio en un soporte de carbono (a) con la apertura de siete orificios utilizada como un compensador de carga y (b) sin el compensador.

30 La figura 1 muestra esquemáticamente una muestra no conductora, y un haz de electrones axial TEM (flechas de bloque, e) que se utiliza para obtener imágenes de la muestra. El haz de electrones hace que los electrones secundarios (flechas de línea, SE) sean expulsados de la muestra, dejando la muestra con una carga positiva. Esta carga positiva puede producir una perturbación electrostática de la óptica de obtención de imágenes y también puede causar el movimiento y la explosión coulombiana de la muestra.

35 La figura 2 muestra esquemáticamente una sección longitudinal a través de un TEM de acuerdo con una realización de la invención. Un haz de electrones axial 1 producido por una fuente de electrones 2 incide sobre una muestra de material no conductor 3 sostenido por un portamuestras 4. Una apertura de múltiples orificios 5 situada entre una lente condensadora TEM 6 y la muestra tiene un orificio central 7 para el haz de electrones axial y un orificio desplazado del centro 8 que produce un haz de electrones paraxial 9.

40 El haz de electrones paraxial irradia un conductor a tierra 10 que es adyacente a la muestra, pero fuera del eje del TEM, siendo el conductor a tierra solidario del soporte de la muestra. La irradiación del haz de electrones paraxial hace que los electrones secundarios SE sean emitidos por el conductor a tierra, y algunos de estos electrones, a su vez, incidan en la muestra no conductora para neutralizar la carga positiva que se ha acumulado en la muestra. De este modo, el haz paraxial y el conductor a tierra actúan como un compensador de carga para la muestra.

45 Puede utilizarse una disposición similar (no ilustrada) para neutralizar la carga positiva sobre otros cuerpos, tales como una placa de fase o un biprisma electrónico, que son susceptibles de acumulación de carga debido a la emisión de electrones secundarios.

50 La figura 3 muestra esquemáticamente una apertura de varios orificios según se ve a lo largo del eje óptico de un TEM. La apertura tiene un orificio central 7 y seis orificios desplazados del centro 8 separados circunferencialmente alrededor del orificio central. Cada orificio desplazado del centro puede producir un haz paraxial respectivo. Un diámetro típico de los orificios podría ser de aproximadamente 50 μm , y una separación de los orificios entre centros típica podría ser de aproximadamente 200 μm . Dicha apertura podría adaptarse a un microscopio existente para permitir que se produzcan varios haces paraxiales fuera del eje.

55 La figura 4 es un registro en una película de los haces de electrones axiales y paraxiales producidos utilizando una apertura de condensador que tiene un orificio central de 50 μm de diámetro y un orificio desplazado del centro de 100 μm de diámetro.

60 La figura 5(a) es una imagen registrada en una cámara CCD de una apertura de condensador de siete orificios de acuerdo con una realización de la presente invención. La imagen se produjo colocando la apertura de siete orificios en el portamuestras del microscopio electrónico. Cada orificio es de 50 μm de diámetro y el desplazamiento es de 200 μm entre centros.

5 La figura 5(b) es un microscopio electrónico registrando en una cámara CCD de haces de electrones producidos por la apertura de siete orificios. La apertura está dispuesta para producir haces axiales y paraxiales en la muestra. La lente condensadora reduce el tamaño de la imagen de las aperturas sobre el plano de la muestra. Los haces paraxiales son ligeramente elípticos en comparación con el haz axial debido a la aberración esférica del sistema de lente condensadoras.

10 La figura 6 es un registro en una cámara CCD de una muestra típica (congelada hidratada) sensible al haz con las posiciones de los haces indicadas para obtener imágenes de una muestra utilizando la apertura de siete orificios. Si se requiere una única apertura en lugar de la apertura de siete orificios, ambas aperturas pueden montarse en el soporte de aperturas del microscopio de modo que una o la otra puedan cambiarse de posición según sea necesario. Alternativamente, podría insertarse una apertura de oclusión adicional para obstruir los haces paraxiales.

15 El protocolo de obtención de imágenes consiste en la identificación de una zona de interés en la muestra a bajo aumento (por ejemplo 10K aumentos) utilizando iluminación por un único haz, la determinación del foco obteniendo imágenes del soporte adyacente a la muestra a gran aumento (por ejemplo 200K aumentos) utilizando iluminación por un único haz y, a continuación, el registro de la imagen de la zona de interés a un aumento intermedio (por ejemplo 60K aumentos con parámetros de enfoque establecidos durante el modo de enfoque) utilizando la apertura única o la de siete orificios. De esta manera se minimiza la exposición previa de la zona de interés. La muestra es una película de carbono perforado cubierta con una fina película de hielo vítreo que contiene material de interés a temperatura de nitrógeno líquido (-195° C). La zona de interés es material situado en la película de hielo sobre cualquiera de los orificios. Tal como muestra la figura 6, en este caso la posición del haz axial se encuentra dentro de un orificio.

25 La figura 6 muestra una imagen de pocos aumentos registrada tras el enfoque y la exposición. La posición de enfoque se encuentra alejada 2 μm de la posición del haz axial y puede identificarse como un punto brillante donde la dosis concentrada ha eliminado una capa de hielo del carbono. También se indica la posición de los seis haces fuera del eje en el carbono circundante. Éstos producen una "huella" de carga característica en el hielo de la superficie (Brink y otros, *ibid.*). La irradiación del soporte de carbono en las posiciones del haz paraxial hace que los electrones SE incidan sobre la posición del haz axial situada en la película delgada de hielo sobre el orificio en el soporte de carbono.

35 La figura 7 muestra dos imágenes de la misma zona de una muestra de una partícula típica en hielo vítreo sobre un orificio en un soporte de carbono (a) con la apertura de siete orificios utilizada como compensador de carga y (b) sin el compensador. En cada caso el haz axial se encontraba dentro del orificio y no irradiaba el soporte de carbono adyacente. En la imagen (a) los haces paraxiales del compensador irradiaban el soporte de carbono adyacente. Estos haces no se encontraban en la imagen (b). La baja calidad de imagen en ausencia del compensador (imagen (b)) se atribuye a la carga de la película lo que dio como resultado una imagen borrosa y distorsión por los mecanismos descritos anteriormente.

40 Aunque la invención se ha descrito en combinación con las realizaciones de ejemplo descritas anteriormente, para los expertos en la materia serán claras muchas modificaciones equivalentes y variaciones a partir de esta descripción. Por lo tanto, las realizaciones de ejemplo de la invención que se han expuesto anteriormente se consideran ilustrativas y no limitativas.

REIVINDICACIONES

1. Microscopio electrónico de transmisión que presenta:

5 una posición de un cuerpo de destino sobre el eje óptico electrónico del microscopio, una fuente de electrones (2) para producir un haz de electrones axial (1) que, en funcionamiento, incide sobre un cuerpo de destino situado en la posición del cuerpo de destino, y un sistema para producir simultáneamente un haz de electrones fuera del eje separado;

10 caracterizado por el hecho de que:

15 el sistema para producir un haz de electrones fuera del eje separado comprende un cuerpo de aperturas (5) situado entre la fuente de electrones y la posición del cuerpo de destino, presentando el cuerpo de aperturas una apertura axial (7) para la transmisión del haz de electrones axial y presentando, además, una apertura fuera del eje (8) para la producción de un haz de electrones fuera del eje (9); y

comprendiendo el microscopio electrónico de transmisión, además, un cuerpo conductor eléctrico (10) fuera del eje del microscopio;

20 en el que el haz de electrones fuera del eje, en funcionamiento, incide sobre el cuerpo conductor eléctrico provocando que se emitan electrones secundarios desde el mismo, y el cuerpo conductor eléctrico está situado de manera que los electrones secundarios emitidos inciden sobre el cuerpo de destino para neutralizar la carga positiva que puede acumularse en el cuerpo de destino.

25 2. Microscopio electrónico de transmisión según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el haz de electrones fuera del eje es paralelo a un haz de electrones paraxial.

3. Microscopio electrónico de transmisión según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por el hecho de que el cuerpo conductor eléctrico fuera del eje está situado adyacente a la posición del cuerpo de destino.

30 4. Microscopio electrónico de transmisión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el hecho de que el cuerpo de aperturas presenta una pluralidad de aperturas fuera del eje para la producción de respectivos haces de electrones fuera del eje, incidiendo cada haz de electrones fuera del eje, en funcionamiento, sobre el cuerpo conductor eléctrico fuera del eje o un cuerpo conductor eléctrico fuera del eje respectivo.

35 5. Microscopio electrónico de transmisión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el hecho de que comprende, además, por lo menos una lente condensadora (6) entre la fuente de electrones y la posición del cuerpo de destino, quedando situado el cuerpo de aperturas entre la lente condensadora y la posición del cuerpo de destino, limitando el cuerpo de aperturas el campo de iluminación de la lente condensadora.

40 6. Microscopio electrónico de transmisión según la reivindicación 1 o 3, caracterizado por el hecho de que el sistema para producir un haz de electrones fuera del eje comprende una fuente de electrones adicional.

45 7. Microscopio electrónico de transmisión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el hecho de que:

la posición del cuerpo de destino es una posición de la muestra, el haz de electrones axial, en funcionamiento, incide sobre una muestra (3), y los electrones secundarios emitidos inciden sobre la muestra para neutralizar la carga positiva que puede acumularse en la muestra.

50 8. Microscopio electrónico de transmisión según la reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que el cuerpo conductor eléctrico fuera del eje lo dispone un portamuestras (4) que sujeta la muestra en la posición de la muestra.

55 9. Microscopio electrónico de transmisión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por el hecho de que:

la posición del cuerpo de destino es una posición de la placa de fase, el haz de electrones axial, en funcionamiento, incide sobre una placa de fase, y los electrones secundarios emitidos inciden sobre la placa de fase para neutralizar la carga positiva que puede acumularse en la placa de fase.

60 10. Microscopio electrónico de transmisión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por el hecho de que:

la posición del cuerpo de destino es una posición de un biprisma electrónico,
el haz de electrones axial, en funcionamiento, incide sobre un biprisma electrónico, y
los electrones secundarios emitidos inciden sobre el biprisma electrónico para neutralizar la carga
positiva que puede acumularse en el biprisma electrónico.

5

11. Microscopio electrónico de transmisión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el hecho de que presenta una pluralidad de posiciones del cuerpo de destino separadas en el eje óptico electrónico del microscopio, una pluralidad de respectivos cuerpos conductores eléctricos fuera del eje del microscopio, y un sistema para producir simultáneamente una pluralidad de haces de electrones fuera del eje separados que, en funcionamiento, inciden respectivamente sobre los cuerpos conductores eléctricos.

10

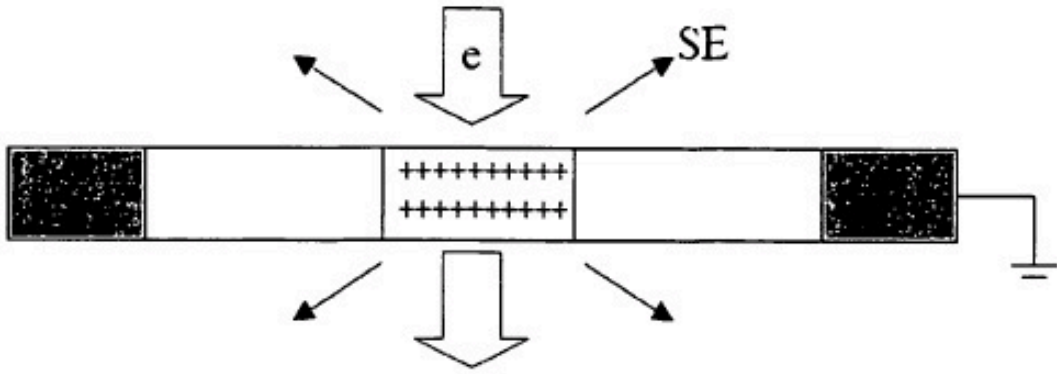


Fig. 1

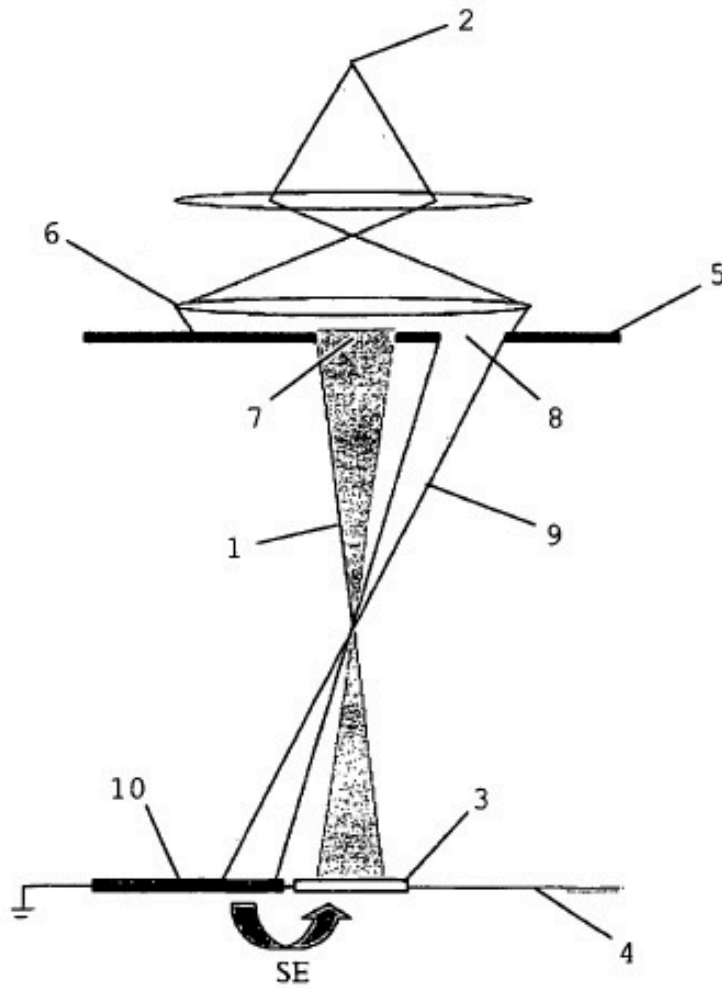


Fig. 2

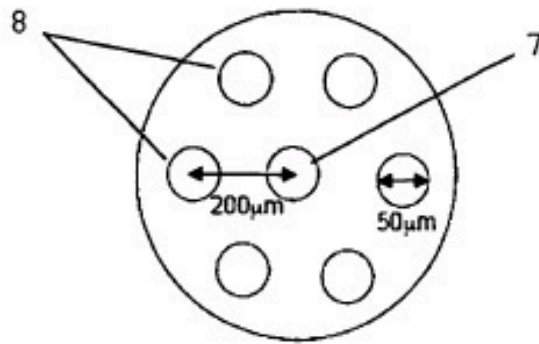


Fig. 3



Fig. 4

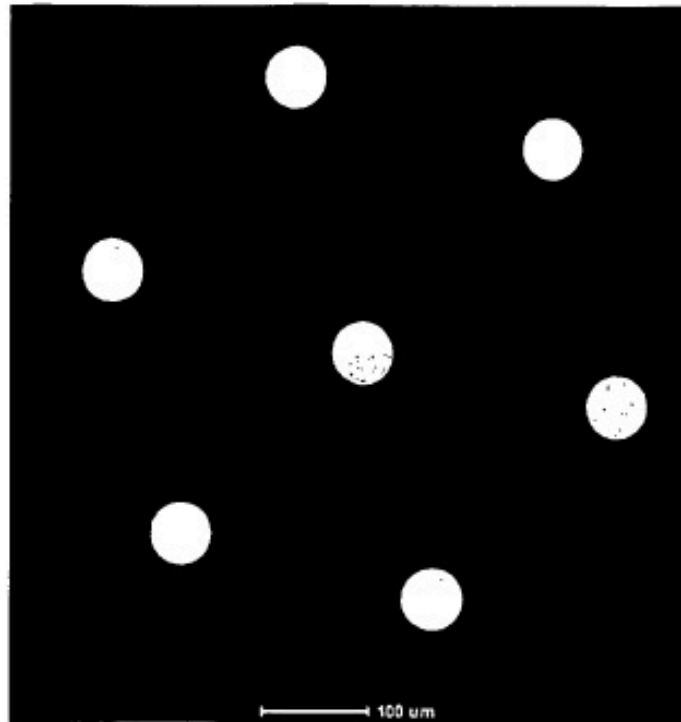


Fig. 5(a)

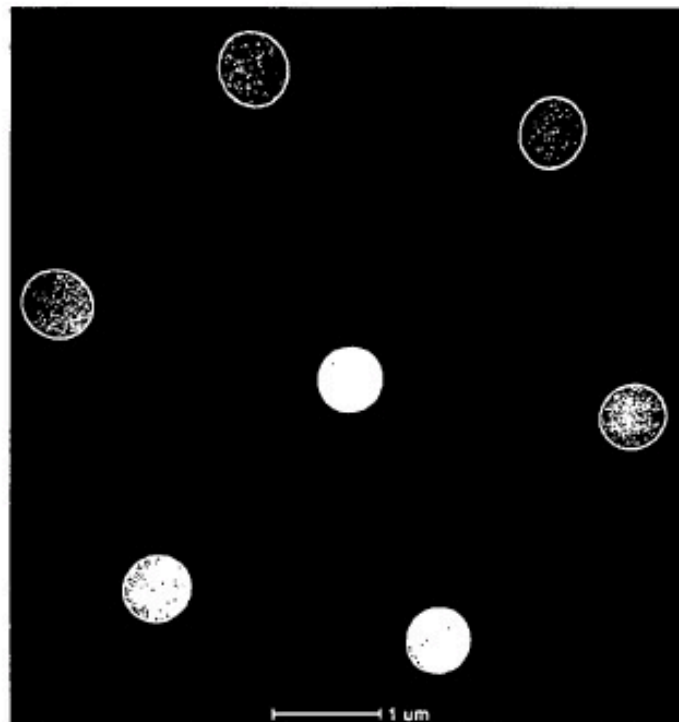


Fig. 5(b)

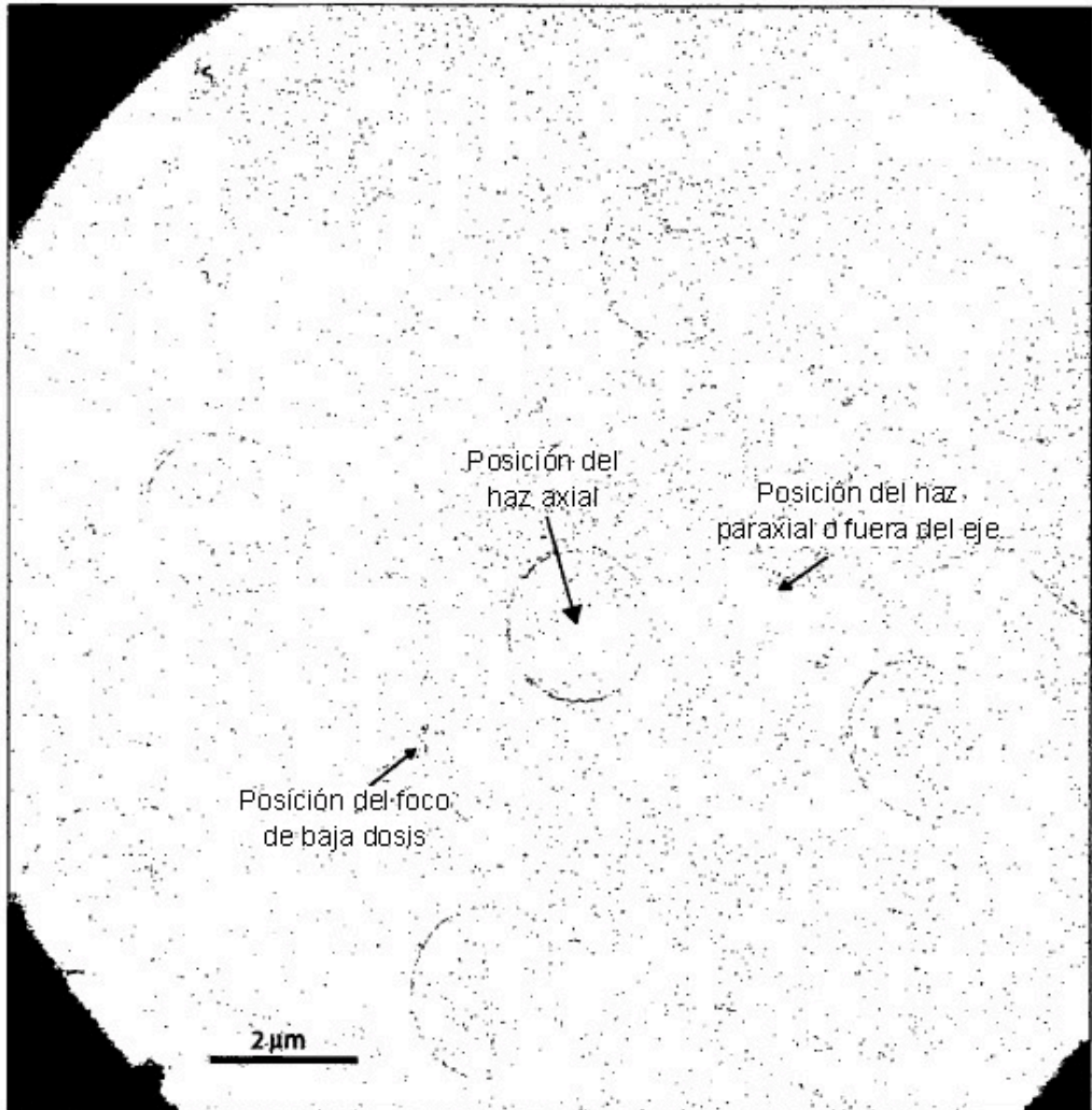
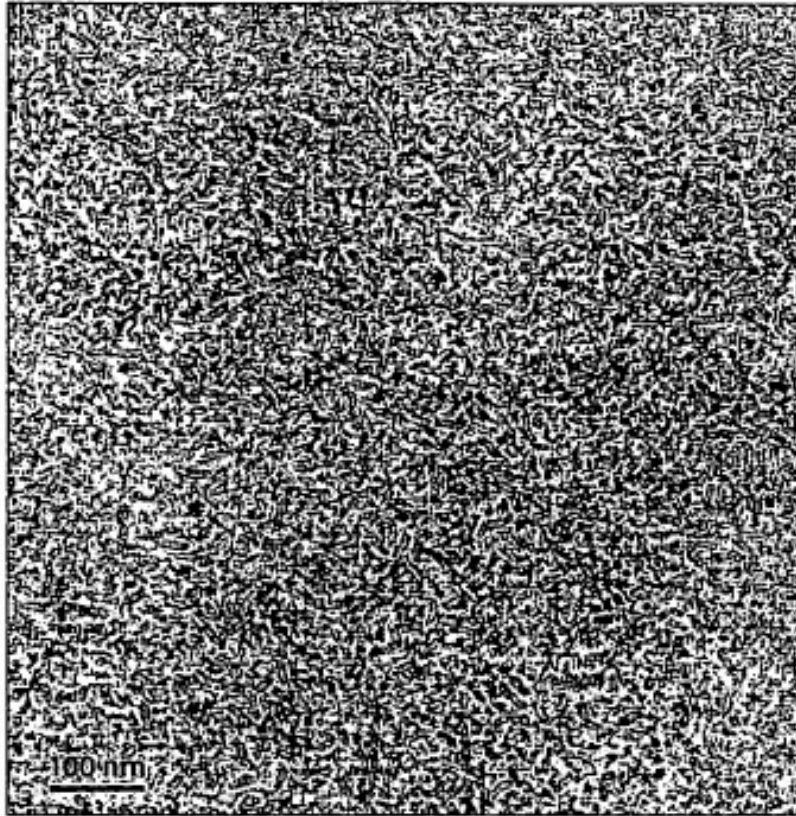


Fig. 6

A



B

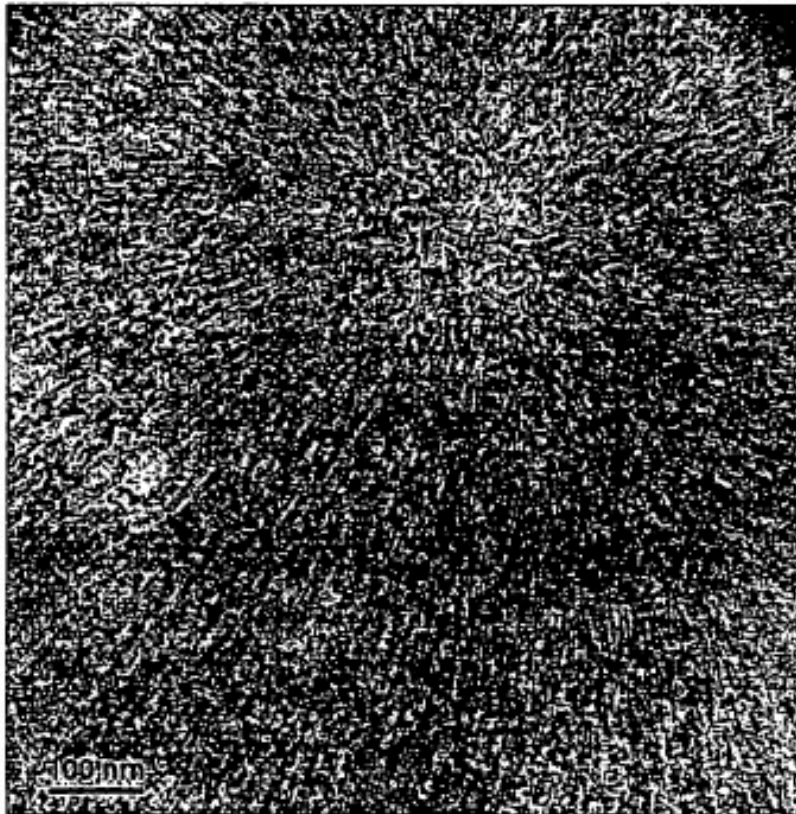


Fig. 7

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • US 20020011566 A
• EP 0417354 A

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 15 • BRINK et al. "Evaluation of charging on macromolecules in electron cryomicroscopy. *Ultramicroscopy*", 1998, vol. 72, 41-52
• WARRINGTON. "A simple charge neutralizer for the electron microscope", *J. Sci. Instrum.*, 1966, vol. 43, 77-78
20 • FROST. "Image-plane off-axis electron holography: low-magnification arrangements". *Meas. Sci. Technol.*, 1999, vol. 10, 333-339