

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 815**

51 Int. Cl.:

G01N 23/20 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2000 E 00957348 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 1210589**

54 Título: **Manipulación automatizada de muestras para cristalografía de rayos**

30 Prioridad:

11.08.1999 US 372134

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

15.02.2013

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
CHAD 0377/AP6D-2, 100 ABBOTT PARK ROAD
ABBOTT PARK, IL60064-6050, US**

72 Inventor/es:

**OLSON, JEFFREY, A.;
JONES, RONALD, B.;
NIENABER, VICKI, L.;
MUCHMORE, STEVEN, W.;
PAN, JEFFREY, Y. y
GREER, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 395 815 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

Manipulación automatizada de muestras para cristalografía de rayos

5 Antecedente de la invención

1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a la cristalografía de rayos X y, en particular, a los procedimientos y aparatos para montar y alinear muestras para análisis cristalográfico mediante rayos X.

2. Discusión de la técnica

15 La cristalografía de rayos X es una técnica consolidada y bien estudiada para proporcionar una representación tridimensional del aspecto de una molécula en un cristal. Los científicos han empleado la cristalografía de rayos X para determinar las estructuras cristalinas de muchas moléculas.

20 Para poder realizar un análisis cristalográfico mediante rayos X, se debe montar una muestra del cristal en un dispositivo de posicionamiento, a continuación, alinearla cuidadosamente de forma que la totalidad del cristal esté dentro del diámetro del haz de rayos X, y unos datos de difracción de rayos X recogidos en numerosos ángulos de rotación. Puesto que los tamaños típicos de los cristales y el diámetro del haz de rayos X están en el intervalo de 100 a 400 micrómetros, el alineamiento necesita un alto grado de precisión. Además, para garantizar la integridad de los cristales, los cristales deben almacenarse en nitrógeno líquido y mantenerse a temperaturas cercanas a las del nitrógeno líquido durante la totalidad de los procesos de montaje, alineamiento y adquisición de datos. En la actualidad, el montaje y el alineamiento de las muestras se llevan a cabo manualmente.

30 Un aparato típico de cristalografía de rayos X comprende un generador de rayos X, un detector y un husillo rotatorio sobre el que se monta un cabezal del dispositivo de posicionamiento de ajuste fino. Los datos de difracción brutos recogidos por el detector se introducen en un ordenador para su procesamiento. El cabezal del dispositivo de posicionamiento permite mínimos ajustes en dos ejes que son perpendiculares entre sí y con el eje del husillo. Algunos cabezales de dispositivos de posicionamientos también permiten ajustes angulares en uno de los ejes. Se proporciona un tercer eje de ajuste mediante la traslación del husillo giratorio en una dirección que es ortogonal a los dos ejes del cabezal del dispositivo de posicionamiento. La posición de montaje de la muestra del cabezal del dispositivo de posicionamiento se coloca de forma que, una vez montada, la muestra está casi en la línea central del haz de rayos X. Una cámara CCD está montada de forma que se pueda mostrar en un monitor de video una imagen ampliada de la muestra. Una mira en el monitor de video indica la posición deseada de la muestra, que corresponde a la intersección del centro del haz de rayos X con el eje de husillo. Para mantener la muestra a una temperatura lo suficientemente baja una vez montada, se dirige una corriente de nitrógeno gaseoso frío a la posición de montaje de la muestra.

40 Se describe a continuación el procedimiento manual de montaje y alineamiento de la muestra. Un operario coloca la muestra dentro de un pequeño recipiente con nitrógeno líquido y después lleva el recipiente hasta la proximidad de la posición de montaje de la muestra en el cabezal del dispositivo de posicionamiento. Tan rápidamente como puede, el operario retira la muestra y la monta en el cabezal del dispositivo de posicionamiento. Mediante la imagen de video del monitor, el operador gira los tornillos de ajuste que controlan los ejes "X", "Y", y "Z" hasta que la muestra está centrada dentro de los ejes del haz de rayos X y del husillo (como se indica mediante la mira del monitor de video) Una vez se ha centrado la muestra, comienza el análisis de la misma mediante rayos X. El procedimiento se ha descrito detalladamente en Garman, y col., "Macromolecular Cryocrystallography", J. Appl. Cryst. (1997)30, 211-237 (a partir de ahora en el presente documento "Garman y col."), incorporado al presente documento por referencia.

50 De acuerdo con Garman, y col., existen numerosos problemas implicados en los procedimientos manuales para recoger datos de difracción de rayos X procedentes de cristales macromoleculares a temperaturas criogénicas. De acuerdo con Garman, los requisitos previos para iniciar la adquisición de datos criogénicos son un criostato fiable, la capacidad de mantener un ambiente exento de hielo, cierto aparato para montaje del cristal, un número suficiente de cristales, y cierta destreza manual del operario para conseguir una operación rápida y suave. Una parte importante de una adquisición de datos criocristalográficos es el método de montaje del cristal y el hardware asociado con el mismo. Los cristales macromoleculares requieren un tratamiento especial en comparación con los cristales de pequeñas moléculas, debido a que los cristales macromoleculares tienen un contenido de líquido que oscila aproximadamente entre 5 y 70%. La técnica más utilizada en la actualidad es el método del bucle, que permite suspender un cristal por tensión superficial sobre una película fina de tampón crioprotectado. Los primeros bucles estaban fabricados en alambre de tungsteno chapado en oro. Estos bucles metálicos fueron sustituidos por bucles fabricados a partir de diferentes fibras finas (diámetro de 10-50 μm) que no absorben ni dispersan los rayos X en la misma medida que el metal, tal como cabello, fibra de vidrio, nylon, rayón, hilo de pescar, hilo dental sin recubrimiento de cera, algodón, sutura quirúrgica y lana de mohair.

Existen varias formas de conectar el pasador que soporta el bucle al cabezal del dispositivo de posicionamiento. Dos procedimientos muy usados son la inserción del pasador directamente en un orificio del cabezal del dispositivo de posicionamiento y la unión de un imán al cabezal del dispositivo de posicionamiento, mediante el que se une y se sujeta firmemente un soporte del pasador.

5

La evaporación desde la película suspendida en el bucle es muy rápida debido a su elevada relación entre la superficie y el volumen. Así, uno de los parámetros más críticos en un experimento de criocrystalografía es el tiempo que pasa entre la extracción del cristal y su refrigeración a chorro. Este tipo debe ser tan corto como sea posible, idealmente siendo inferior a un segundo, de lo contrario, el cristal se puede deshidratar, o los componentes del tampón pueden precipitar. De acuerdo con Garman y col., todas las manipulaciones y movimientos deben practicarse varias veces sobre seco, sin nada en el bucle, para asegurar después una operación suave y rápida. No se debe perder tiempo en observar el cristal dentro del bucle, ya que enfriar súbitamente un bucle vacío es menos perjudicial que perder los cristales antes del enfriamiento si uno se para a comprobar cuál es su posición exacta en el bucle.

10

15

Para la mayor parte de cristales de proteína, el enfriamiento súbito en una corriente de gas es perfectamente adecuado y representa la opción más segura y simple. Desde un punto de vista práctico, para un enfriamiento súbito en una corriente de gas es útil en primer lugar disponer de un segundo operario presente que pueda desviar la corriente de gas sujetando un trozo de cartón por encima tan pronto como se capturan las señales de "pesca" del cristal. Una vez el cristal se ha colocado, el cartón se retira rápidamente asegurando un enfriamiento rápido y reproducible. Los criocrystalógrafos experimentados tienden a desviar la corriente de gas frío por sí mismo o no desviarla en absoluto cuando colocan el cristal sobre el cabezal del dispositivo de posicionamiento, dependiendo el éxito de la rapidez y de la precisión de su acción.

20

25

La dificultad más habitual que tienen los experimentadores que empiezan a usar criotécnicas es el hielo que rodea, está próximo, por encima y/o dentro del cristal. Existen varios motivos para que se forme hielo alrededor del cristal. El extremo de la boquilla puede estar colocada demasiado lejos del cristal: idealmente, debería estar tan cerca como fuera posible porque el perfil de temperatura del nitrógeno frío es muy brusco (la temperatura aumenta desde 1000 K a temperatura ambiente a unos pocos milímetros para la mayoría de sistemas en flujo abierto). Además, más lejos de la boquilla, la corriente de gas se disipa y por tanto es más susceptible a los efectos de la turbulencia y la corriente. Si se coloca la crioboquilla cerca del cristal, esto produce una sombra en el detector de rayos X, por lo que se debe pensar en cambiar el ángulo de enfoque de la corriente. Si esto resulta imposible, la sombra se puede enmascarar durante el procesamiento de los datos.

30

35

Una pregunta que surge con frecuencia se refiere al ángulo de incidencia óptimo de la corriente fría sobre el cristal. Este no es un factor importante en un experimento sin tiro y cuidadosamente vigilado. Sin embargo, la mayoría de las corrientes frías funcionan mejor si el flujo es descendente. Análogamente, se deben tener en cuenta las restricciones experimentales. Por ejemplo, debe haber suficiente sitio para almacenamiento del cristal a fin de acceder al criovial.

40

Por lo general, un motivo importante para que se forme hielo es el flujo turbulento en la frontera entre el gas frío y la corriente coaxial más caliente y entre esta última y el aire húmedo y cálido de la sala. Para evitar esto y permitir el flujo laminar deseado, las velocidades de flujo de los gases frío y caliente deben ser equivalentes. Para igualar los flujos, pueden ajustarse las áreas relativas de las dos corrientes de gas y escalar las tasas de acuerdo con ello.

45

Mediante cristalografía de rayos X se pueden estudiar muchos tipos de moléculas biológicas incluyendo, pero sin limitación, proteínas, ADN, ARN, y virus. Los científicos han notificado las estructuras cristalinas de moléculas con ligandos en sus receptores, es decir, complejos receptor-ligando.

50

Dada una representación de una molécula diana o un complejo receptor-ligando, los científicos pueden buscar los lugares o los receptores en los que tiene lugar la actividad biológica. A continuación, los científicos pueden diseñar de forma experimental o asistida por ordenador ligandos (o fármacos) para los receptores. Se han usado como alternativa procedimientos asistidos por ordenador para seleccionar ligandos de moléculas pequeñas. Sin embargo, estos intentos anteriores han tenido solamente un éxito limitado. Algunos problemas son muy importantes en el diseño de ligandos mediante procedimientos asistidos por ordenador. Los procedimientos asistidos por ordenador están basados en estimaciones en lugar de en determinaciones exactas de las energías de enlace y se basan en cálculos sencillos cuando se comparan con las complejas interacciones que existen dentro de una biomolécula. Además, los modelos informáticos requieren confirmación experimental, lo que frecuentemente expone los modelos a falsos positivos que no funcionan sobre la diana real.

55

60

Se ha descubierto recientemente que la cristalografía de rayos X se puede utilizar para seleccionar compuestos que no son ligandos conocidos de una biomolécula dada según su capacidad para unirse a la diana. El procedimiento comprende las etapas de obtener un cristal de la biomolécula diana, exponer la diana a una o más muestras de ensayo que son potenciales ligandos de la diana, y determinar si se forma un complejo-receptor ligando. La diana se expone a ligandos potenciales mediante diferentes procedimientos, entre los que se incluyen pero sin limitación, introducir un cristal en una solución de uno o más ligandos potenciales o cristalizando simultáneamente una

65

biomolécula en presencia de uno o más ligandos potenciales. La información estructural de los complejos receptor-ligando descubierta se puede utilizar para diseñar ligandos que se unan con más fuerza, se unan con más especificidad, tengan mejor actividad biológica o tengan mejores perfiles de seguridad que los ligandos conocidos.

5 De acuerdo con este novedoso procedimiento, los ligandos de una molécula diana que tenga una forma cristalina se identifican exponiendo una biblioteca de moléculas pequeñas, tanto de forma individual como en mezclas, a la diana (por ejemplo, una proteína, un ácido nucleico, etc.). A continuación, se obtienen datos cristalográficos para comparar el mapa de densidad electrónica del posible complejo diana-ligando con el mapa de densidad electrónica de la biomolécula diana. El mapa de densidad electrónica proporciona simultáneamente evidencia directa de la unión del ligando, la identificación del ligando unido, y la estructura tridimensional detallada del complejo diana-ligando. La unión también se puede vigilar gracias a los cambios en las reflexiones individuales dentro del modelo de difracción cristalográfica que se sabe que es sensible a la unión de ligandos en el sitio activo. Esto podría servir como un cribado previo, pero nunca como el procedimiento principal de elección porque proporciona información estructural menos detallada.

10
15 Cuando se observan cambios en el nivel de densidad electrónica del ligando o la intensidad de algunas reflexiones en el modelo de difracción en función de la concentración del ligando bien añadido al cristal o en una cristalización simultánea, también se pueden determinar las afinidades de enlace de los ligandos por las biomoléculas. Las afinidades de enlace también se pueden obtener en experimentos de competición. Aquí, el compuesto o compuestos nuevos se sumergen o cristalizan simultáneamente con uno de una serie de ligandos de forma diversa que tienen afinidad de enlace conocida. Si el ligando conocido aparece en el mapa de densidad electrónica, los ligandos desconocidos son ligandos más débiles. Sin embargo, si se descubre que uno de los nuevos compuestos compete por el sitio, será un ligante más fuerte. Variando la concentración o la identidad del ligando conocido, se puede encontrar una constante de enlace para la novedad.

20
25 El cribado requiere exponer una molécula diana a miles de compuestos, individualmente o en mezclas. El cribado mediante cristalografía de rayos X requiere examinar muchos cristales, que a su vez puede implicar muchos días de trabajar 24 h al día. Este cribado completo solo se puede llevar a cabo mediante sistemas automatizados para montar cristales en el instrumento de rayos X y para alinear los cristales con el haz de rayos X.

30 El uso de técnicas criogénicas conlleva grandes ventajas para el cristalógrafo. Una ventaja es que la importante reducción en el daño por radiación que sufren los cristales a temperaturas criogénicas permite al cristalógrafo duraciones del cristal prácticamente infinitas en una fuente doméstica y duraciones del cristal increíblemente prolongadas en un sincrotrón. Otra ventaja de la adquisición de datos criogénicos es que los procedimientos para montar el cristal utilizados son mecánicamente más suaves e implican menos manipulación de la muestra. Una tercera ventaja de la técnica es la facilidad del cribado doméstico de cristales enfriados instantáneamente y la posibilidad de almacenarlos y transportarlos.

35
40 El problema del uso de técnicas criogénicas es el coste elevado de operarios entrenados en montar las muestras y recoger los datos. Por tanto, sería deseable desarrollar un procedimiento para recoger datos cristalográficos de rayos X automáticamente, sin que sea necesario que esté presente un operario entrenado.

45 La radiación de sincrotrón X se ha convertido en una fuente habitual de rayos X para examinar cristales de todo tipo de moléculas, tanto pequeños como macromoleculares. Debido a los rayos X especialmente intensos disponibles en un sincrotrón, el crioenfriamiento de las muestras es siempre deseable y a menudo necesario. A pesar de que los intensos rayos X dan como resultado una importante reducción en los tiempos de adquisición de datos, frecuentemente de solo minutos, los temas de seguridad complican la carga de la muestra, de forma que las etapas de montaje del cristal y alineamiento con el haz de rayos X a menudo tardan tanto o incluso más que la propia etapa de adquisición de datos. La duración de estas etapas de montaje y alineamiento dan como resultado una disminución significativa de la eficacia del uso de líneas de haces de sincrotrón, que tienen mucha demanda y son caras tanto de construir como de hacer funcionar. Un dispositivo automatizado para montar muestras en el instrumento de rayos X y para alinear con precisión las muestras del cristal con el haz de rayos X reduciría significativamente el tiempo necesario para cargar la muestra y aceleraría en gran medida el proceso de examinar un gran número de muestras. Así, un dispositivo automatizado conseguiría un incremento significativo en la eficacia de uso de las líneas de haces del sincrotrón.

Resumen de la invención

50
60 La presente invención se refiere a un procedimiento para montar una muestra que comprende un cristal para llevar a cabo un análisis de dispersión de rayos X que comprende las etapas de la reivindicación 1. Además, la presente invención se refiere a un aparato capaz de llevar a cabo el procedimiento de la reivindicación 1 para montar una muestra que comprende un cristal según se reivindica en la reivindicación 4.

65 El aparato de la reivindicación 4 puede comprender además:

- (a) un elemento giratorio capaz de recuperar el soporte del cristal de la celda de almacenamiento;

(b) un medio para hacer girar un elemento giratorio en una dirección de rotación dada cuando el medio giratorio está en posición bloqueada.

(c) un medio para proporcionar una cantidad de par controlada cuando el medio giratorio se está deslizando en relación al elemento giratorio; y

5 (d) un medio para activar el medio giratorio y el medio controlador del par.

El aparato de la reivindicación 4 puede comprender además:

10 (a) un embrague que tiene un alojamiento cilíndrico, comprendiendo el alojamiento un orificio rodeado por una pared;

(b) un pistón cilíndrico capaz de desplazarse axialmente dentro del orificio del alojamiento;

(c) teniendo el pistón al menos una ranura alargada en el perímetro exterior del mismo, pudiendo la ranura recibir un pasador de bloqueo;

(d) teniendo el alojamiento al menos una abertura que se extiende a través de la pared del mismo;

15 (e) al menos un pasador de resorte retenido en la abertura, siendo capaz el pasador de engranar la ranura alargada cuando el pistón está colocado en una primera posición del alojamiento, siendo capaz el pasador de desengranar la ranura alargada cuando el pistón está colocado en una segunda posición del alojamiento;

(f) un medio en el alojamiento para desviar de forma elástica el pistón hacia la primera posición del alojamiento;

20 (g) una placa de fricción en contacto con la pared interior del alojamiento, proporcionando la placa de fricción una fricción entre una pestaña de salida y la placa de fricción;

(h) un eje unido al pistón, siendo el eje capaz de transmitir par a la placa de fricción, siendo el eje capaz adicionalmente de desplazarse axialmente con respecto a la placa de fricción.

25 El aparato contiene una pluralidad de muestras y comprende una pluralidad de celdillas de almacenamiento. El aparato es capaz de mantener la temperatura de las muestras a una temperatura no superior a aproximadamente 160° K. Cada una de las celdillas de almacenamiento tiene un paso guiado; el paso guiado tiene una base en el extremo inferior del mismo y una abertura en el extremo superior del mismo. El área de la abertura es mayor que el área de la base. Al menos una pared lateral circunscribe la base y la abertura. La base tiene área suficiente para permitir la colocación del portamuestras. La abertura tiene área suficiente para permitir la introducción de una herramienta para recuperar el portamuestras. La base tiene unida a la misma un medio para bloquear el portamuestras en el dispositivo de sujeción de la muestra. El aparato puede estar también equipado con una tapa que se puede mover mediante un robot.

30 35 La presente invención también proporciona varias herramientas y dispositivos auxiliares para llevar a cabo los procedimientos descritos en el presente documento.

La presente invención proporciona numerosas ventajas sobre los procedimientos de cristalografía de rayos X convencionales. En primer lugar, la presente invención permite reducir el número de operarios entrenados necesarios para realizar el análisis mediante rayos X de los cristales. En segundo lugar, la presente invención permite analizar cristales sin necesidad de que un operario esté presente. Tercero, la presente invención permite aumentar la velocidad del análisis mediante cristalografía de rayos X, aumentando de esta forma el rendimiento del análisis. Cuarto, la presente invención permite normalizar la manipulación de las muestras y reducir la posibilidad de errores del operario. La presente invención también facilita la adquisición de datos 24 h al día, siete días a la semana, aumentando de esta forma el uso del caro equipo de cristalografía de rayos X. La presente invención facilita además la recuperación y conservación de muestras de cristal tras la adquisición de los datos, posibilitando de esta forma volver a analizar la muestra en una fecha posterior.

Breve descripción de los dibujos

50 La Fig. 1 es un diagrama esquemático que representa un sistema para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención.

La Fig. 2 es una vista en planta de un carril de muestras de la presente invención.

55 La Fig. 3 es una vista en sección transversal tomada a lo largo de la línea 3-3 del carril de muestras de la Fig. 2.

La Fig. 4 es una vista en sección transversal de una base magnética situada en el extremo inferior de una celdilla de almacenamiento al que se puede unir un soporte del cristal.

60 La Fig. 5 es una vista lateral en elevación de un soporte del cristal.

La Fig. 6 es una vista en planta superior de un soporte del cristal.

La Fig. 7 es un diagrama esquemático en sección transversal de una herramienta robotizada para recuperar un soporte del cristal.

5 La Fig. 8 es un diagrama esquemático en sección transversal de una herramienta robotizada con un soporte del cristal unido a la misma.

La Fig. 9 es un diagrama esquemático de una herramienta robotizada, embrague, robot, y soporte del cristal.

10 La Fig. 10 es un diagrama esquemático en sección transversal de un conjunto de embrague para transmitir par a la herramienta robotizada. En esta figura, el embrague se encuentra en modo bloqueado.

La Fig. 11 es un diagrama esquemático en sección transversal de un conjunto de embrague para transmitir par a la herramienta robotizada. En esta figura, el embrague se encuentra en modo de deslizamiento.

15 La Fig. 12 es una vista en planta de la base magnética del extremo del dispositivo de posicionamiento del sistema.

La Fig. 13 es una vista lateral en elevación de la base magnética de la Fig. 12.

20 La Fig. 14 es una vista lateral en elevación de un secador para ventilar la humedad procedente de la recogida con la herramienta robotizada.

25 Las Figs. 15, 16, 17, 18, 19, 20, and 21 son fotografías que ilustran las visualizaciones del cristal en varios puntos del procedimiento de la presente invención.

Descripción detallada

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "robot" significa una máquina o dispositivo que funciona automáticamente o por control remoto. Tal como se usa en el presente documento, el término "cristal" significa una red ordenada de moléculas que es capaz de difractar los rayos X. Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere al cristal contenido en el bucle del dispositivo para sujetar un cristal.

35 Haciendo referencia ahora a la FIG. 1, un sistema 10 para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención comprende un generador de rayos X (no mostrado), un dispositivo de posicionamiento, tal como por ejemplo un goniómetro 12 montado en un husillo 14 giratorio, una base 16 del instrumento, una cámara CCD 18, un recipiente 20 aislado, un carril de muestras 22, un robot 24 multieje, un controlador 26 del robot 24, un ordenador de automatización 28, un ordenador para adquisición de datos 30, al menos un controlador 32 motorizado, un detector 34, una boquilla 36 para la corriente fría, un actuador 38 para la corriente fría, y un motor 40 para desplazar el husillo 14 a lo largo de su eje principal. Aunque los ordenadores 28 y 30 se han mostrado como componentes separados, se pueden combinar en una sola unidad. El sistema 10 también incluye preferiblemente un sistema automatizado 41 para rellenar con nitrógeno líquido el recipiente 20 aislado. Dichos sistemas de relleno son bien conocidos del experto en la técnica de la cristalografía de rayos X. Se puede encontrar en Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, cuarta edición, volumen 25, John Wiley & Sons (Nueva York: 1998), páginas 742-759, que se ha incorporado en el presente documento por referencia, una revisión general una revisión general de los componentes de los sistemas para realizar la cristalografía de rayos X. El artículo anterior describe diferentes componentes, tales como los tubos de rayos X, detectores, goniómetros y otros componentes asociados de forma habitual con la cristalografía de rayos X.

50 Haciendo referencia ahora a las Figs. 2, 3, 4, 5, y 6, un recipiente 20 aislado lleno con nitrógeno líquido se coloca cerca del generador de rayos X. Un carril de muestras 22 que contiene una o más muestras de cristal está montado en el recipiente 20 aislado de forma que las muestras estén sumergidas en nitrógeno líquido. El carril de muestras 22 se utiliza para almacenar las muestras de cristal una vez que las muestras de cristal se han montado en un soporte del cristal 42. El carril de muestras 22 está diseñado para mantener las muestras bajo una capa de nitrógeno líquido, que preferiblemente está a una temperatura no superior a aproximadamente 160° K. El carril de muestras 22 está construido para que la inserción y retirada de los soportes del cristal 42, tanto por el operario humano como por el robot 24, sea más eficaz. El carril de muestras 22 contiene una matriz de celdillas de almacenamiento 44, siendo capaz cada celdilla de almacenamiento 44 de alojar un soporte del cristal 42. Cada celdilla de almacenamiento 44 comprende una base 46 magnética y un paso guiado 48 que va desde una abertura 50 en la celdilla de almacenamiento 44 del extremo superior 52 de la celdilla de almacenamiento 44 hasta la base 46 magnética situada en el extremo inferior 54 de la celdilla de almacenamiento 44. El paso guiado 48 está circunscrito por una pared 55 que va desde el extremo superior 52 de la celdilla de almacenamiento 44 hasta el extremo inferior 54 de la celdilla de almacenamiento 44. El carril de muestras está construido preferiblemente de metal. También es posible equipar el carril de muestras con una tapa (no mostrada). Esta tapa opcional se puede mover mediante un robot para permitir el acceso a los soportes del cristal 42 de las celdillas de almacenamiento 44.

65 El paso guiado 48 está construido preferiblemente de forma que la abertura 50 del extremo superior 52 de la celdilla

de almacenamiento 44 tenga mayor área que la base 46 situada en el extremo inferior 54 de la celdilla de almacenamiento 44. Este tipo de construcción facilita la introducción del soporte del cristal 42 en la celdilla de almacenamiento 44.

- 5 El objetivo de la base 46 magnética es retener el soporte del cristal 42 situado en el extremo inferior 54 de la celdilla de almacenamiento 44 mediante atracción magnética una vez que el soporte del cristal 42 se ha introducido dentro de la celdilla de almacenamiento 44 por el robot 24 o por el operario humano. El soporte del cristal 42 está hecho preferiblemente de un material que sea atraído magnéticamente por un material ferromagnético. Un pasador 56 que se extiende radialmente hacia el exterior desde el material ferromagnético 58 de la base 46 magnética engrana con una muesca 60 en la base 62 del soporte del cristal 42 para evitar el giro relativo entre el soporte del cristal 42 y la base 46 magnética. El paso guiado 48 guía el movimiento del operario humano o el robot 24 cuando el soporte del cristal 42 está introducido en la celdilla de almacenamiento 44. Además, el paso guiado 48 protege las muestras vecinas del daño cuando un operario humano está introduciendo o retirando un soporte del cristal 42. Este rasgo es especialmente importante en el caso de un operario humano, ya que la visibilidad se encuentra limitada cuando el carril de muestras 22 está lleno de nitrógeno líquido.

Los soportes del cristal 42 están fabricados preferiblemente de un material ferromagnético tal como, por ejemplo, acero. EL uso de un material ferromagnético permite la conexión segura entre el soporte del cristal 42 y la montura magnética 63 que está unida al extremo 64 del dispositivo de posicionamiento 12 y la base 46 magnética de la celdilla de almacenamiento 44 en el carril de muestras 22. Un elemento de conexión 66 del soporte del cristal 42 se proyecta desde la base 62 del soporte del cristal 42. El elemento de conexión 66 está roscado con un fileteado macho 67 normalizado. El elemento de conexión 66 se puede unir al fileteado hembra 68 correspondiente incorporado al extremo 70 de una herramienta robotizada 72. Se prefiere este tipo de medio roscado, ya que proporciona un procedimiento de sujeción eficaz para las muestras cuando están sumergidas en nitrógeno líquido. Desde el elemento de conexión 66 del soporte del cristal 42 se proyecta un vástago 74, en cuyo extremo se encuentra un bucle 76 para alojar la muestra de cristal. El elemento de conexión 66 tiene preferiblemente una abertura 77 practicada en el mismo para permitir que el nitrógeno líquido fluya por el soporte del cristal 42.

El robot 24 multieje está montado cerca del recipiente 20 aislado y al alcance del dispositivo 12 de posicionamiento. Haciendo referencia ahora a las Figs. 7 y 8, el robot 24 tiene una extensión que en el presente documento se denomina como la herramienta robotizada 72, que contiene una rosca 68 con fileteado hembra para encajar con la rosca 67 con fileteado macho del soporte del cristal 42. La herramienta robotizada 72 puede recuperar el soporte del cristal 42, que contiene la muestra, del carril de muestras 22 e insertarla en el soporte del cristal 42 sobre el dispositivo de posicionamiento 12 para la adquisición de datos. La herramienta robotizada es también capaz de recuperar el soporte del cristal 42 del dispositivo de posicionamiento 12 e insertar el soporte del cristal 42 en el carril de muestras 22 para almacenamiento. La herramienta robotizada 72 está diseñada para mantener la muestra a una temperatura criogénica, cercana a la del nitrógeno líquido, es decir, a una temperatura que no supere aproximadamente 160° K, durante el corto tiempo en el que la muestra 15 está en tránsito. La herramienta robotizada 72 está también diseñada para proteger la muestra del aire ambiental cuando el soporte del cristal 42 está unido a la herramienta robotizada 72. El robot 24 puede recuperar el soporte del cristal 42 poniendo en contacto el soporte del cristal 42 con el extremo 70 de la herramienta robotizada 72 y haciendo girar la herramienta robotizada 72 en el sentido de las agujas del reloj de forma que el soporte del cristal 42 y la herramienta robotizada 72 se atornillen entre sí.

45 Antes de usarse para sujetar el soporte del cristal 42, la herramienta robotizada 72 se sumerge en nitrógeno líquido durante un corto periodo de tiempo (de forma típica 20 segundos) con el fin de enfriar la herramienta robotizada 72 hasta una temperatura cercana a la del nitrógeno líquido. La aberturas 80 de venteo situadas en el cuerpo 82 de la herramienta robotizada 72 permiten que el aire se escape de la cavidad 84 interna de la herramienta robotizada 72 cuando el nitrógeno líquido rellena la cavidad 84 interna de la herramienta robotizada 72. Cuando la herramienta robotizada 72 y el soporte del cristal 42 están unidos, la muestra de cristal se mantiene a baja temperatura gracias al nitrógeno líquido contenido en la cavidad 84 interna y por las paredes metálicas 86 frías que rodean la cavidad 84 interna de la herramienta robotizada 72. El nitrógeno líquido fluye por la abertura 77 del soporte del cristal 42 hasta la cavidad 84 interna de la herramienta robotizada 72 cuando la herramienta robotizada 72 y el soporte del cristal 42 unido a la anterior están sumergidos en nitrógeno líquido.

El dispositivo de posicionamiento 12, que se puede trasladar a lo largo del eje X y del eje Y mediante los motores de avance gradual 88 y 90, respectivamente, está montado sobre un husillo 14 giratorio del instrumento de difracción de rayos X. El dispositivo 12 de posicionamiento también se puede trasladar a lo largo del eje Z mediante el motor de avance gradual 40. Existen sensores de la posición inicial (no se muestran) en el eje X, eje Y, y eje Z que permiten encontrar una posición de referencia para la traslación en cualquier momento. Los motores de avance gradual y los sensores de la posición de referencia están conectados a un controlador 32 motorizado, que a su vez se comunica con un ordenador 28 de automatización. La rotación del husillo 14 está controlada de una forma similar mediante controles comunicados por el ordenador 28 de automatización. Los movimientos del robot 24 multieje están controlados por el controlador 26 del robot, que también se comunica con el ordenador 28 de automatización. La salida de vídeo de la cámara CCD 18 se introduce en una tarjeta de grabación de vídeo incorporada (no se muestra) que está conectada con el ordenador 28 de automatización. Se proporciona una conexión de comunicación entre el

ordenador 28 de automatización y un ordenador 30 independiente de adquisición de datos.

Funcionamiento

5 El funcionamiento de la presente invención implica recuperar muestras, contenidas en los soportes del cristal, en un área de almacenamiento, montar las muestras recuperadas en un dispositivo de posicionamiento, alinear las muestras montadas antes de realizar la adquisición de datos, realizar la adquisición de datos, y devolver la muestra al área de almacenamiento.

10 Un operario "introduce" los números de identificación de las muestras a analizar e inicia el proceso automatizado introduciendo un comando adecuado en el ordenador 30 de adquisición de datos. Después de este punto, no se requiere más intervención del operario.

15 Se activa un programa almacenado en el controlador 26 del robot y el robot 24 recupera una muestra del carril de muestras 22 situado en el recipiente 20 aislado. La herramienta robotizada 72 permite que el robot 24 agarre la muestra mientras la muestra está sumergida en nitrógeno líquido. A continuación, la muestra se retira del carril de muestras 22 e inmediatamente se coloca sobre la montura 63 magnética del extremo 64 del dispositivo de posicionamiento 12.

20 Para que la herramienta robotizada 72 pueda sujetar y liberar de forma fiable la muestra, que está colocada en el soporte del cristal 42, se utiliza un embrague 94 conectado entre la etapa 96 de rotación del robot 24 y la herramienta robotizada 72. El embrague 94 se ilustra detalladamente en las Figs. 10 y 11. En general, el embrague puede tener cualquiera entre numerosas configuraciones pero, como mínimo y de forma genérica, el embrague 94 comprende:

- 25 (a) un elemento giratorio capaz de recuperar el soporte del cristal en la celdilla de almacenamiento;
 (b) un medio para hacer girar el elemento giratorio en una dirección de rotación dada cuando el medio giratorio está en un modo bloqueado;
 (c) un medio para proporcionar una cantidad controlada de par cuando el medio giratorio está en modo deslizamiento respecto al elemento giratorio; y
 30 (d) un medio para activar el medio giratorio y el medio de control del par.

El embrague 94 está normalmente en modo bloqueado. Cuando el embrague 94 está en modo bloqueado, la rotación iniciada en una pestaña de entrada 98 se transmite directamente a una pestaña de salida 100 sin permitir deslizamiento giratorio. Pasadores de resorte 102 sobresalen por ranuras 104 axiales de un pistón 106, que está situado en el orificio de un alojamiento 108, evitando de esta forma la rotación del pistón 106 en el alojamiento 108. Preferiblemente, el pistón 106 y el alojamiento 108 tienen forma cilíndrica. Cuando el embrague 94 está en modo bloqueado, se puede transmitir cualquier cantidad de par a la herramienta robotizada 72, hasta los límites de par del propio robot 24.

40 Para cambiar el embrague 94 al modo de deslizamiento, se debe imponer una fuerza axial al embrague 94 de forma que el pistón 106 se desvíe con respecto al alojamiento 108, de forma típica aproximadamente 0,2 pulgadas (0,51 cm) a la izquierda. Cuando el pistón 106 se desvíe, los pasadores de resorte 102 se desengranan de las ranuras 104 del pistón 106, permitiendo de esta forma la rotación relativa entre el pistón 106 y el alojamiento 108, y así, entre la pestaña de entrada 98 y la pestaña de salida 100. Sin embargo, cuando tiene lugar la rotación relativa, una cantidad controlada de fricción giratoria se genera mediante una placa de fricción 110, que incluye una placa 112 y una arandela 114, a medida que la placa de fricción frota contra la pestaña de salida 100. Un resorte 116 desvía de forma elástica la placa de fricción 110 hacia la pestaña de salida 100. El nivel de fricción entre la placa de fricción 110 y la pestaña de salida 100 se puede controlar por la selección adecuada del material y las propiedades de la arandela 114 y del resorte 116. Los materiales y propiedades de la placa 112, la arandela 114, y el resorte 116 son temas de elección del diseño, y su adecuada selección es bien conocida de los expertos en la técnica.

El embrague 94 funciona según el siguiente procedimiento:

55 (1) El soporte del cristal 42, que contiene la muestra, se asienta en el carril de muestras 22, sobre la base 46 magnética de la celdilla de almacenamiento 44. El carril de muestras 22 está sumergido en un recipiente 20 de nitrógeno líquido.

60 (2) El robot 24 apunta la herramienta robotizada 72 hacia abajo y la desplaza a una posición por encima de la celdilla de almacenamiento 44 situada en el carril de muestras 22 cerca del soporte del cristal 42 deseado.

65 (3) El robot 24 desplaza la herramienta robotizada 72 hacia abajo hasta que la herramienta robotizada 72 simplemente entra en contacto con el soporte del cristal 42. El robot 24 se para en esta posición para permitir que la herramienta robotizada 72 se enfríe a una temperatura cercana a la del nitrógeno líquido. Las aberturas 80 de venteo de la herramienta robotizada 72 permiten que la cavidad 84 interna de la herramienta robotizada

72 se llenen con nitrógeno líquido.

(4) El robot 24 desplaza la herramienta robotizada 72 hacia abajo aproximadamente 0,25 pulgadas (0,63 cm) con el fin de aplicar fuerza axial al embrague 94 y desbloquear el embrague 94.

(5) Mediante el uso de la etapa de rotación 96, el robot 24 hace girar la herramienta robotizada 72 en el sentido de las agujas del reloj para atornillar el soporte del cristal 42 sobre la herramienta robotizada 72. El roscado 67 del soporte del cristal 42 se une al roscado 68 de la herramienta robotizada 72. Por lo general, se requiere aproximadamente una sola vuelta de la herramienta robotizada 72 para atornillar completamente el soporte del cristal 42 a la herramienta robotizada 72. Preferiblemente, se realizan dos giros adicionales de la herramienta robotizada 72 para garantizar que el soporte del cristal 42 queda totalmente conectado a la herramienta robotizada 72. Como el embrague 94 está desbloqueado, se producirá un deslizamiento en el sentido del giro una vez que el soporte del cristal 42 esté totalmente conectado (es decir, totalmente atornillado a la herramienta robotizada 72). Si el embrague 94 no pudiera deslizarse, se produciría con probabilidad la sobrecarga o la rotura del robot tras la conexión completa entre el soporte del cristal 42 y la herramienta robotizada 72. El cumplimiento axial del embrague 94, junto a su capacidad para deslizarse cuando no está bloqueado, proporciona cierto grado de "compasión" al sistema. Los movimientos del robot 24 no tienen que corresponder perfectamente a la posición o a la longitud del roscado del soporte del cristal 42. Se toleran pequeños errores en los movimientos y la programación del robot gracias al cumplimiento axial y al deslizamiento del embrague 94.

(6) Una vez que el soporte del cristal 42 está totalmente conectado a la herramienta robotizada 72, el robot 24 retira la herramienta robotizada 72 con el soporte del cristal 42 del carril de muestras 22 y realiza la siguiente operación. La muestra de cristal en el soporte del cristal 42 está protegida de la atmósfera cálida porque está rodeada por el nitrógeno líquido contenido en la cavidad 84 interna de la herramienta robotizada 72 y protegida por las paredes 86 metálicas frías de la propia herramienta robotizada 72.

La herramienta robotizada 72 monta a continuación el soporte del cristal 42 sobre el dispositivo de posicionamiento 12 de la siguiente forma.

(1) El robot 24 guía la herramienta robotizada 72 hasta una posición horizontal (paralela a la base 16) y desplaza la herramienta robotizada 72 hasta una posición cercana al extremo 64 del dispositivo de posicionamiento 12.

(2) El robot 24 desplaza la herramienta robotizada 72 hacia la montura 63 magnética hasta que el soporte del cristal 42 simplemente entra en contacto con la montura 63 magnética y el extremo 64 del dispositivo de posicionamiento 12. La posición angular del soporte del cristal 42 es tal que la muesca 60 de la base 62 del soporte del cristal 42 engrana un pasador de alineación 118 de la montura 63 magnética. Este alineamiento evita la rotación angular del soporte del cristal 42 con respecto a la montura 63 magnética. Tal como se muestra en las FIGS. 12 y 13, la montura 63 magnética también incluye un imán, es decir, un material ferromagnético 120 y un pasador de conexión 122. El imán 120 sirve para retener el soporte del cristal 42 mediante atracción magnética una vez que el soporte del cristal 42 se ha montado sobre la montura 63 magnética en el extremo 64 del dispositivo de posicionamiento 12. El pasador de conexión 122 sirve para unir la montura 63 magnética al extremo 64 del dispositivo de posicionamiento 12. En este punto, el embrague 94 está bloqueado porque no se ha comprimido significativamente en dirección axial.

(3) El robot 24 hace girar la herramienta robotizada 72 mediante la etapa de rotación 96 en sentido contrario a las agujas del reloj, preferiblemente dos giros, para garantizar que la herramienta robotizada 72 se ha desatornillado totalmente del soporte del cristal 42. Puesto que el embrague 94 está bloqueado, se puede aplicar par suficiente para desatornillar el soporte del cristal 42 de la herramienta robotizada 72, incluso si el soporte del cristal 42 y la herramienta robotizada 72 se hayan pegado o congelado entre sí.

(4) Mientras se hace girar en sentido contrario a las agujas del reloj, la herramienta robotizada 72 se retira del extremo 64 del dispositivo de posicionamiento 12, dejando de esta forma el soporte del cristal 42 adherido a la montura 63 magnética y al extremo 64 del dispositivo de posicionamiento 12.

Una vez que el soporte del cristal 42 está montado sobre el dispositivo de posicionamiento 12, el soporte del cristal 42 se debe colocar correctamente para la adquisición de datos. Antes de colocar el soporte del cristal 42, la herramienta robotizada 72 se retira rápidamente del dispositivo de posicionamiento 12 hasta una posición de "descanso" en un secador 124. El secador 124 se muestra en la FIG. 14. El fin del secador 124 es evitar la deposición de humedad sobre la herramienta robotizada 72 cuando la herramienta robotizada 72 no está en uso. Una corriente de gas seco, por ej. nitrógeno, a temperatura ambiente, se introduce en el puerto 126, atraviesa una cámara 128 interna, y sale por el puerto 130. El material de construcción del secador no es crítico. Cuando la herramienta robotizada 72 está introducida en la cámara 128 interna del secador 124, el gas seco evita la deposición de humedad sobre la herramienta robotizada 72.

Tras montarse sobre el dispositivo de posicionamiento 12, la temperatura de la muestra se mantiene a baja temperatura mediante una corriente fría que se proporciona mediante la boquilla 36 de corriente fría, que está colocada tan cerca de la muestra como sea posible. La boquilla 36 de corriente fría, está montada sobre el actuador 38 de corriente fría, de forma que la boquilla 36 de corriente fría, se puede retraer cuando el soporte del cristal 42 está montado sobre el dispositivo de posicionamiento 12 y extenderse el resto del tiempo.

En este momento se ejecuta un programa de procesamiento de imagen/alineación de la muestra para posicionar automáticamente la muestra en la intersección entre el haz de rayos X y el eje del husillo. El procedimiento técnico de alineación usa un algoritmo de "visión artificial" para analizar la información de video obtenida mediante la cámara CCD 18 montada en la base 16 del sistema 10. El procedimiento de alineación invoca repetidamente el algoritmo de visión artificial como se describe más adelante, y utiliza la información de posición obtenida para recolocar la muestra mediante los motores de avance gradual 88, 90, y 40. El ciclo descrito a continuación se repite hasta que la diferencia entre la posición real de la muestra y la posición deseada de la muestra sea lo suficientemente pequeña a efectos de la adquisición de datos.

Se describirán a continuación los detalles del algoritmo de "visión artificial" adecuado para la presente invención. El algoritmo de "visión artificial" puede encontrar el centroide y la "punta" (punto más hacia la izquierda de la imagen) de la muestra de cristal. En la siguiente descripción, el eje Z es el eje de rotación de la muestra. El ángulo ϕ es el ángulo de rotación alrededor del eje Z. El eje X es el eje horizontal con respecto a la base 16 (y a la cámara CCD 18) del instrumento cuando el ángulo ϕ es 0° , y el eje Y es el otro eje ortogonal. Cuando el ángulo ϕ es 0° , la dirección horizontal de la imagen corresponde al eje X mientras que la dirección horizontal de la imagen corresponde al eje Z. Cuando el ángulo ϕ es 90° , la dirección vertical de la imagen corresponde al eje Y mientras que la imagen horizontal sigue correspondiendo al eje Z.

El algoritmo de "visión artificial" comienza con una imagen digitalizada, representada como una matriz de números de ocho bits correspondientes a los píxeles de la imagen. Una imagen de partida típica se muestra en la Fig. 17. El objetivo del procedimiento de procesamiento de imagen descrito a continuación es determinar el centroide del bucle 76 del soporte del cristal 42 como se muestra en el centro de la FIG. 17. El algoritmo de visión artificial debe ser capaz de discriminar entre el bucle 76 del soporte del cristal 42 y el resto de los elementos de la imagen. Estos elementos incluyen la mira y las graduaciones del retículo, así como el vástago 74 del soporte del cristal 42. Como mínimo, el algoritmo de visión artificial comprende las siguientes etapas:

(1) Ignorar el 10% de la imagen que se encuentra más hacia la derecha, como se muestra en la FIG. 18.

(2) Convertir la imagen en escala de grises de ocho bits en una imagen en blanco y negro de dos bits convirtiendo el 12% de los píxeles más oscuros en negro, y el resto de los píxeles en blanco, como se muestra en la FIG. 19.

(3) Poner en blanco el 20% más a la izquierda, el 10% superior y el 10% inferior de la imagen, eliminando de esta forma el efecto del sombreado debido a la corriente fría, y reduciendo la influencia de la iluminación no uniforme, como se muestra en la FIG. 20.

(4) Ejecutar un algoritmo de "adelgazamiento" de la siguiente forma:

- (a) para cada pixel oscuro, se examina una ventana de 20×20 (colocando el pixel oscuro en el centro de la ventana);
- (b) se han incluido en esta ventana menos de 280 píxeles oscuros, el pixel cambia a blanco;
- (c) esto elimina líneas de rejilla y otros artefactos, como se muestra en la FIG. 21.

(5) Calcular el centroide de los píxeles negros restantes.

Se han desarrollado distintos refinamientos del algoritmo anterior. Estos refinamientos utilizan técnicas conocidas de los expertos en la materia. Estos refinamientos aumentan la fiabilidad en casos inusuales, como en el caso de cristales muy pequeños.

El procedimiento de alineamiento consiste en dos partes –una fase de adquisición inicial seguida por una fase de centrado fino. En la fase de adquisición inicial, la muestra se desplaza mediante los motores a lo largo del eje X y del eje Z hasta una posición de partida. La posición de partida está definida de forma que el sistema pueda saber si la muestra se encuentra bien totalmente fuera de la imagen de la cámara o en la mitad derecha de la imagen de la cámara. Es importante comenzar en esta posición de forma que el vástago 74 sobre el que está montado el bucle 76 de la muestra no confunda al sistema.

A continuación, se invoca el algoritmo de "visión artificial". Si no se encuentra la muestra, comienza un patrón de búsqueda. El patrón de búsqueda implica un movimiento en zigzag de la muestra a lo largo del eje X y del eje Z invocando en cada posición del patrón de búsqueda el algoritmo de visión artificial. Una vez se encuentra la muestra, el sistema utiliza la información del centroide obtenida a partir del algoritmo de visión artificial para centrar

la muestra con respecto al eje X y al eje Z, mediante los motores de avance gradual 88 y 40. El centrado se repite a continuación para tener en cuenta la posibilidad de que la muestra no estuviera completamente incluida en el campo de visión de la cámara CCD 18. Con esta fase termina la fase de adquisición inicial de la rutina de alineamiento. En este punto, la posición de la muestra con respecto al eje X y al eje Z debe estar razonablemente cercana al alineamiento correcto, pero habitualmente el eje Y estará incorrectamente desalineado en una cantidad significativa. En teoría todo lo que se debe hacer para completar el alineamiento es poner el ángulo ϕ a 90° y repetir el procedimiento de centrado. Sin embargo, en algunas muestras esta técnica supone un posible problema. Muchas muestras de cristal son muy planas. Cuando se visualiza la cara del cristal, el algoritmo de "visión artificial" es muy preciso (véase la Fig. 15). Sin embargo, cuando se visualiza el borde del cristal, es difícil distinguir entre la muestra, el bucle 76, y el vástago 74 del bucle 76. Un ejemplo de este problema puede verse en la FIG. 16. Por tanto, intentar alinear correctamente la muestra usando solamente dos ángulos (0° y 90°) es potencialmente peligroso para la precisión si uno de los dos ángulos da como resultado una imagen de "visión artificial" similar a la de la FIG. 16, o si la muestra tiene otra característica que sea inusual, confundiendo de esta forma al algoritmo de visión artificial. Para ajustarse a esta posibilidad, el sistema 30 usa información de varios ángulos entre 0° y 90° , inclusive, para determinar con la mayor probabilidad la auténtica posición de la muestra del cristal en las tres dimensiones. El algoritmo se implementa realmente de la siguiente forma:

(1) Mover el ángulo ϕ desde 0° hasta 90° en incrementos de 5° , usando el algoritmo de "visión artificial", para encontrar el centroide de la muestra del cristal en cada ángulo.

(2) Llevar a cabo un ajuste paramétrico por mínimos cuadrados a la ecuación:

$$V_i = \Delta X \cos \phi_i + \Delta Y \sin \phi_i$$

en la que V_i representa la desviación vertical del centroide de la imagen de la muestra del cristal en el ángulo ϕ_i , y ΔX representa la desviación desconocida del centroide de la imagen de la muestra desde el eje X y el eje Y, y ΔY representa la desviación desconocida del centroide de la imagen de la muestra desde el eje Y.

(3) Cuando se encuentran los valores de ΔX y ΔY , se ajustan los motores para centrar la muestra.

(4) Se ajusta el eje Z mediante un simple promedio de todas las desviaciones desde la horizontal en la imagen.

(5) Se repitan las etapas (1), (2), (3), y (4) anteriores con la excepción de que el ángulo se mueve de 90° a 0° en incrementos de 5° .

(6) Se continúa iterando las etapas (1), (2), (3), (4), y (5) anteriores hasta que se cumplen los criterios de cierre. En la actualidad, la condición de cierre es una de las siguientes:

(a) la suma actual de los cuadrados de las desviaciones (respecto al eje X, el eje Y, y el eje Z) es inferior a 225 píxeles cuadrados.

(b) la diferencia entre la suma actual de los cuadrados de las desviaciones y el valor de la iteración inmediatamente anterior de la suma actual de los cuadrados de las desviaciones es inferior a 225 píxeles cuadrados.

(c) seis (6) iteraciones sin cumplir (a) o (b).

La primera condición (a) se considera el alineamiento perfecto. La segunda condición (b) es el caso en que el alineamiento ya no se va a mejorar significativamente y evita oscilaciones entre dos soluciones igualmente buenas. La condición (c) final se considera un fallo de alineamiento.

(7) Cuando se cumple la condición de cierre, se notifica el éxito o el fallo del alineamiento al ordenador 30 de adquisición de datos. A continuación, el ordenador 30 de adquisición de datos comienza a tomar datos si el alineamiento fue correcto, o solicita el siguiente cristal en caso de fallo del alineamiento.

Esta técnica utiliza información en 19 ángulos diferentes; así, es más consistente frente a los errores en un determinado ángulo que un algoritmo que solo use dos ángulos.

En este punto, se envía una señal al ordenador 30 de adquisición de datos y comienza el análisis por difracción de rayos X de la muestra.

Al final de la fase de adquisición de datos, se activa un programa informático almacenado en el controlador 26 del robot, cuando al robot 24 para retirar la muestra del dispositivo de posicionamiento 12 y devolverla a su posición original en el carril de muestras 22.

Se sigue el siguiente procedimiento para devolver el soporte del cristal 42 al carril de muestras 22.

- 5 (1) El robot 24 guía la herramienta robotizada 72 hasta una posición horizontal (paralela a la base 16) y desplaza la herramienta robotizada 72 hasta una posición próxima al extremo del soporte del cristal 42. El soporte del cristal 42 sigue montado sobre la montura 63 magnética sobre el extremo 64 del dispositivo de posicionamiento 12.
- 10 (2) El robot 24 desplaza la herramienta robotizada 72 hacia el soporte del cristal 42 hasta que la herramienta robotizada 72 simplemente entra en contacto con el soporte del cristal 42.
- 15 (3) El robot 24 desplaza la herramienta robotizada 72 aproximadamente 0,2 pulgadas (0,5 cm) en dirección al dispositivo de posicionamiento 12 para aplicar fuerza axial al embrague 94 y para desbloquear el embrague.
- 20 (4) Mediante la etapa de rotación 96, el robot 24 hace girar la herramienta robotizada 72 en el sentido de las agujas del reloj para atornillar el soporte del cristal 42 a la herramienta robotizada 72. Por lo general, se requiere aproximadamente una sola vuelta para atornillar completamente el soporte del cristal 42 a la herramienta robotizada 72. Preferiblemente, se realizan dos giros adicionales de la herramienta robotizada 72 para garantizar que el soporte del cristal 42 queda totalmente conectado a la herramienta robotizada 72.
- 25 (5) Una vez que el soporte del cristal 42 está totalmente conectado a la herramienta robotizada 72, el robot 24 retira la herramienta robotizada y el soporte del cristal 42 de la montura magnética.
- 30 (6) El robot 24 apunta la herramienta robotizada 72 hacia abajo y la desplaza hasta una posición deseada aproximadamente por encima de la celdilla de almacenamiento 44 en el carril de muestras 22.
- 35 (7) El robot 24 desplaza la herramienta robotizada 72 hacia abajo hasta que el soporte del cristal 42 simplemente entra en contacto con la base 46 magnética del fondo de la celdilla de almacenamiento 44. La posición angular del soporte del cristal 42 es tal que la muesca 60 de la base 62 del soporte del cristal 42 engrana el pasador 56 de la base 46 magnética. Esta conexión evita el giro angular del soporte del cristal 42 con respecto a la base 46 magnética. En este punto, el embrague 94 está bloqueado ya que no ha recibido compresión suficiente en la dirección axial.
- 40 (8) El robot 24 hace girar la herramienta robotizada 72 dos giros en sentido contrario a las agujas del reloj para garantizar que el soporte del cristal 42 se ha desatornillado totalmente de la herramienta robotizada 72. Puesto que el embrague 94 está bloqueado, se puede aplicar par suficiente para desatornillar las piezas, incluso aunque el soporte del cristal 42 y la herramienta robotizada 72 se hayan pegado o congelado entre sí.
- 45 (9) Mientras se continúa con el giro en sentido contrario a las agujas del reloj, la herramienta robotizada 72 se retira de la celdilla de almacenamiento 44 en el carril de muestras 22, dejando el soporte del cristal 42 adherido a la base 46 magnética en el fondo de la celdilla de almacenamiento 44.

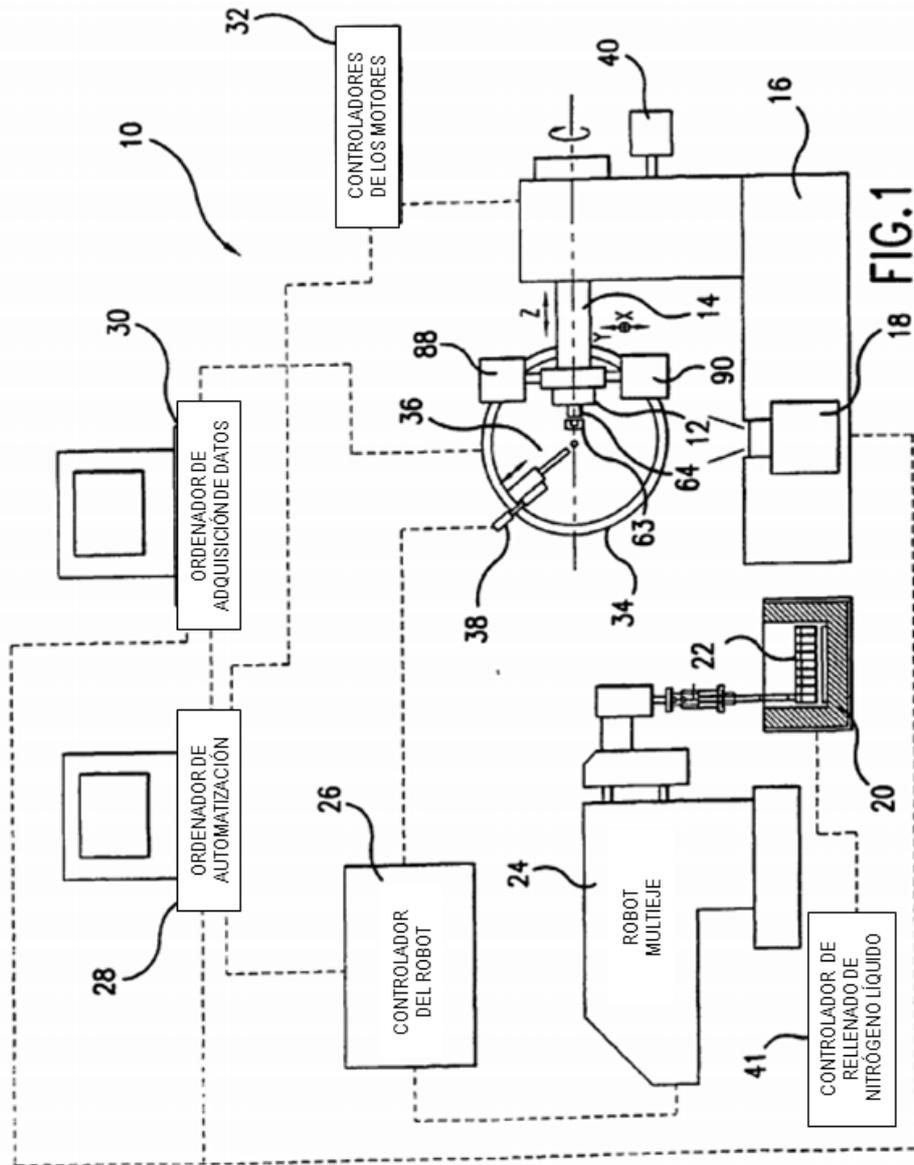
A continuación, la totalidad del procedimiento de funcionamiento se repite para la siguiente muestra a analizar. Una vez todas las muestras seleccionadas se han analizado y devuelto a sus posiciones en el carril de muestras 22, la herramienta robotizada 72 queda aparcada en una posición del reposo, y el sistema se pone en el modo de espera.

Varias modificaciones e invenciones de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica, sin separarse del ámbito de la presente invención, y deberá entenderse que la presente invención no queda simplemente limitada a las realizaciones ilustrativas definidas en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para montar una muestra que comprende un cristal para llevar a cabo un análisis por difracción de rayos X, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 (a) proporcionar un soporte del cristal (42) que contiene al menos un cristal;
 (b) proporcionar una herramienta (72) capaz de recuperar dicho soporte del cristal (42);
 (c) desplazar dicha herramienta mediante un robot (24);
 10 (d) proporcionar un dispositivo de posicionamiento (12) para montar dicho soporte del cristal (42) de forma que dicho cristal esté en el camino de un haz de rayos X; y
 (e) activar dicho robot (24) de forma que dicha herramienta recupere dicho soporte del cristal (42), reciba una cantidad suficiente de un fluido para mantener dicho cristal en dicho soporte del cristal (42) a una temperatura que no supere aproximadamente 160° K, transferir dicho soporte del cristal (42) recuperado a dicho dispositivo de posicionamiento (12), y montar dicho soporte del cristal (42) transferido a dicho dispositivo de
 15 posicionamiento (12), en el que dicho cristal en dicho soporte del cristal (42) recuperado se mantiene a una temperatura que no supere aproximadamente 160° K.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho soporte del cristal (42) está montado en dicho dispositivo de posicionamiento (12) mediante roscas trefiladas.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho cristal en dicho soporte del cristal (42) recuperado está protegido del aire.
4. Un aparato capaz de llevar a cabo el procedimiento de la reivindicación 1 para montar una muestra que comprende un cristal, comprendiendo dicho procedimiento: un carril (22) que incluye celdillas de almacenamiento (44) para alojar una pluralidad de soportes de cristales (42), un aparato para recuperar un soporte del cristal (42) de una celdilla de almacenamiento (44), un dispositivo de posicionamiento (12) montado en un husillo (14) móvil, un robot (24), un controlador (26) del robot y un ordenador (28) de automatización en comunicación con dicho controlador (26) del robot, **caracterizado por que** dicho robot (24) es un robot (24) mutieje y dicho aparato para recuperar un soporte del cristal (42) comprende una herramienta robotizada (72) que está activada por dicho robot (24) y está adaptada para alojar una cantidad suficiente de un fluido para mantener un cristal en un soporte del cristal (42) recuperado a una temperatura que no supere aproximadamente 160.
- 25 30 35 5. El aparato de la reivindicación 4, **caracterizado por que** dicho soporte del cristal (42) comprende:
- (a) una base (62);
 (b) un elemento de conexión (66) desde dicha base (62);
 (c) un vástago (74) que se proyecta desde dicho elemento de conexión (66), soportando dicho vástago (74) un bucle (76) para alojar dicho cristal; y
 40 (d) al menos una abertura (77) en dicho elemento de conexión (66) para permitir el venteo de dicho dispositivo, pudiéndose conectar dicho dispositivo tanto a una celdilla de almacenamiento (44) como a un dispositivo de posicionamiento (12).
6. El aparato de la reivindicación 5, en el que dicha base (62) de dicho soporte del cristal (42) tiene forma cilíndrica y comprende de forma preferible una muesca (60) para bloquear dicho dispositivo en dicho carril (22).
- 45 7. El aparato de la reivindicación 5, en el que dicho elemento de conexión (66) de dicho soporte del cristal (42) tiene forma cilíndrica y está preferiblemente trefilado.
- 50 8. El aparato de la reivindicación 5, en el que dicho soporte del cristal (42) se puede atraer mediante un imán (120).
9. El aparato de la reivindicación 4, **caracterizado por que** dicho aparato para recuperar un soporte del cristal (42) desde una celdilla de almacenamiento (44) comprende:
- 55 (a) un elemento giratorio capaz de recuperar el soporte del cristal (42) de la celdilla de almacenamiento (44);
 (b) un medio para hacer girar un elemento giratorio en una dirección de rotación dada cuando el medio giratorio está en posición bloqueada;
 (c) un medio para proporcionar una cantidad de par controlada cuando dicho medio giratorio se está deslizando en relación al elemento giratorio; y
 60 (d) un medio para activar dicho medio giratorio y dicho medio controlador del par.
10. El aparato de la reivindicación 4, **caracterizado por que** dicho aparato para recuperar un soporte del cristal (42) de una celdilla de almacenamiento (44), comprende:
- 65 (a) un embrague (94) que tiene un alojamiento cilíndrico (108), comprendiendo dicho alojamiento (108) un orificio rodeado por una pared;

- (b) un pistón cilíndrico (106) capaz de desplazarse axialmente dentro de dicho orificio de dicho alojamiento (108);
- (c) teniendo dicho pistón (106) al menos una ranura (104) alargada en el perímetro exterior del mismo, pudiendo dicha ranura (104) recibir un pasador de bloqueo (56);
- 5 (d) teniendo dicho alojamiento (108) al menos una abertura que se extiende a través de la pared del mismo;
- (e) al menos un pasador de resorte (102) retenido en dicha abertura, siendo capaz dicho pasador (102) de engranar dicha ranura (104) alargada cuando dicho pistón (106) está colocado en una primera posición de dicho alojamiento (108), siendo capaz dicho pasador (102) de desengranar dicha ranura (104) alargada cuando dicho pistón (106) está colocado en una segunda posición de dicho alojamiento (108);
- 10 (f) un medio en dicho alojamiento (108) para desviar de forma elástica el pistón (106) hacia la primera posición de dicho alojamiento (108);
- (g) una arandela (114) circular en contacto con dicha pared interior de dicho alojamiento (108), proporcionando fricción entre una pestaña de salida (100) y una placa de fricción (110);
- y
- 15 (h) un eje unido a dicho pistón, siendo dicho eje capaz de transmitir par a la placa de fricción (110), siendo dicho eje capaz adicionalmente de desplazarse axialmente con respecto a la placa de fricción (110).
11. El aparato de la reivindicación 10, que incluye además medios para proporcionar cumplimiento axial de dicha pestaña de salida (100) con respecto a dicha pestaña de entrada (98).
- 20 12. El aparato de la reivindicación 4, **caracterizado por que** cada una de dichas celdillas de almacenamiento (44) de dicho carril (22) para alojar los soportes del cristal (42) comprende una base (46) y una abertura, siendo el área de dicha abertura más grande que el área de dicha base (46), circunscribiendo al menos una pared lateral dicha base (46) y dicha abertura, teniendo dicha base (46) área suficiente para dejar sitio a un soporte del cristal (42),
- 25 teniendo dicha abertura área suficiente para permitir la introducción de una herramienta para recuperar el portamuestras de cristal; teniendo dicha base (46) unida a la misma un medio para bloquear dicho soporte del cristal (42) a dicho carril (22).
13. El aparato de la reivindicación 12, **caracterizado por que** dicho medio para bloquear dicho soporte del cristal (42) en dicho carril (22) es un pasador de bloqueo (56).
- 30 14. El aparato de la reivindicación 4, **caracterizado por que** dicho aparato para recuperar un soporte del cristal (42) de una celdilla de almacenamiento (44) hasta un dispositivo de posicionamiento (12), comprende un elemento alargado que tiene un primer extremo y un segundo extremo, siendo capaz dicho primer extremo de estar unido a un robot (24), siendo capaz dicho extremo de estar acoplado a dicho soporte del cristal (42), siendo capaz dicho dispositivo de mantener un cristal en dicho soporte del cristal (42) a una temperatura no superior a aproximadamente 160 K cuando dicho segundo extremo está acoplado a dicho soporte del cristal (42).
- 35 15. El aparato de la reivindicación 4, **caracterizado por que** dicho aparato para recuperar un soporte del cristal (42) de una celdilla de almacenamiento (44) hasta un dispositivo de posicionamiento (12), comprende un elemento alargado que tiene un primer extremo y un segundo extremo, siendo capaz dicho primer extremo de estar unido a un robot (24), siendo capaz dicho extremo de estar acoplado a dicho soporte del cristal (42), siendo capaz dicho dispositivo de apantallar dicho soporte del cristal (42) del aire ambiental cuando dicho segundo extremo está acoplado a dicho soporte del cristal (42).
- 40 45 16. El aparato de la reivindicación 14 o 15, que incluye además un venteo (80) para dejar que el aire se escape de dicho dispositivo.



18 FIG. 1

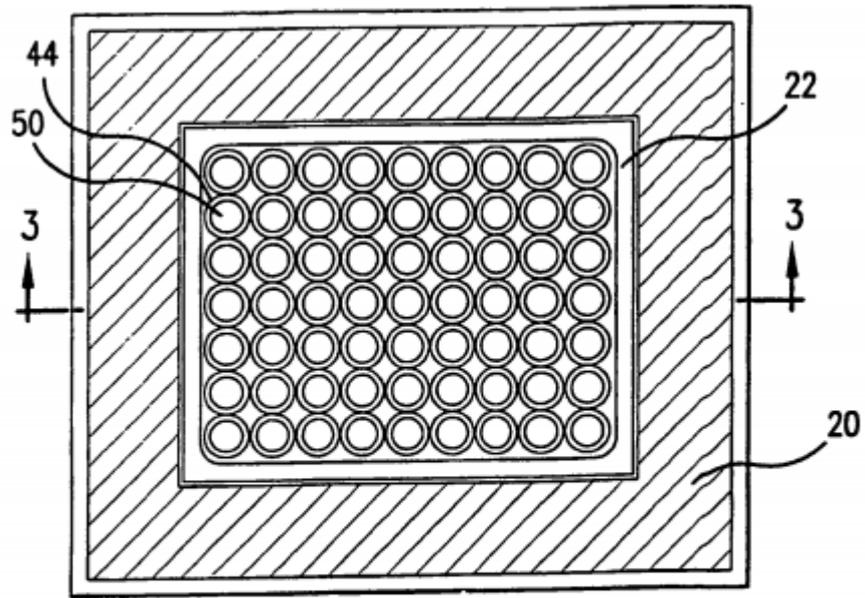


FIG. 2

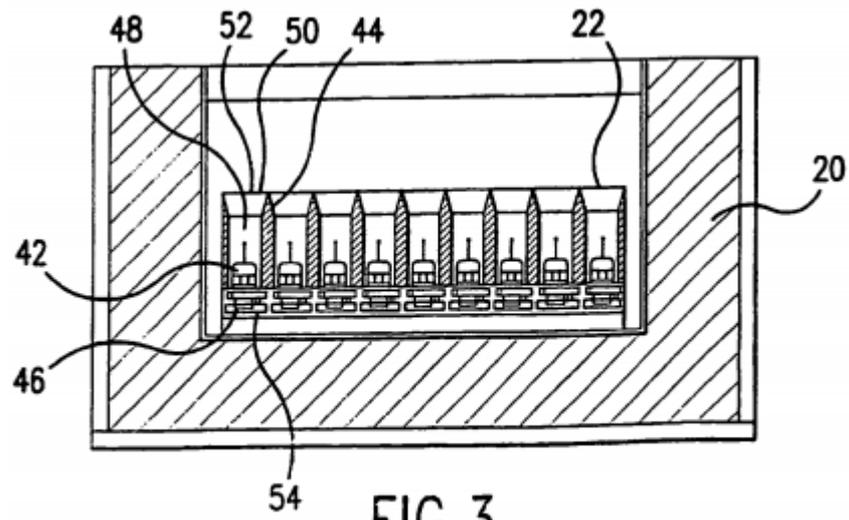


FIG. 3

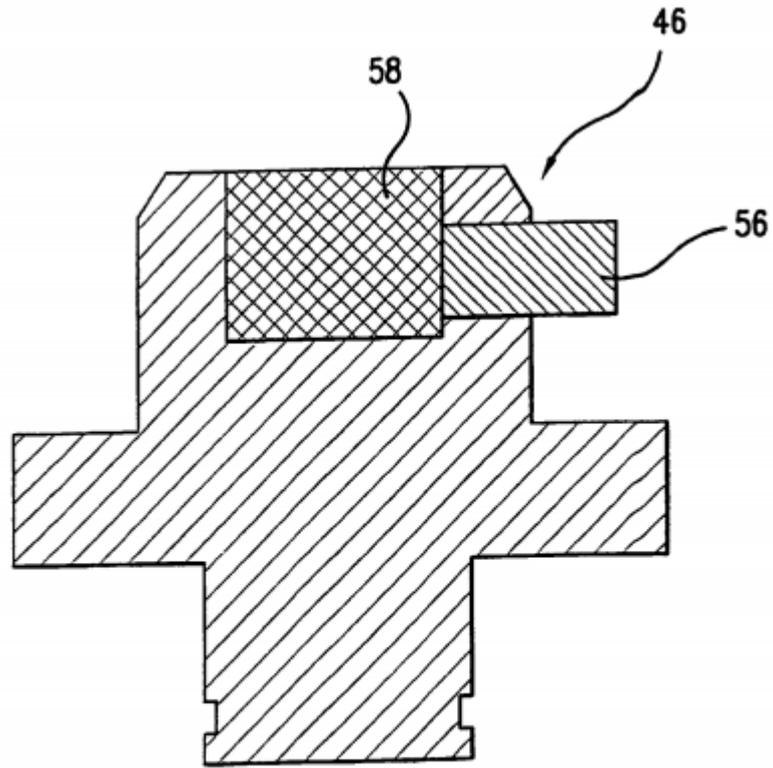


FIG.4

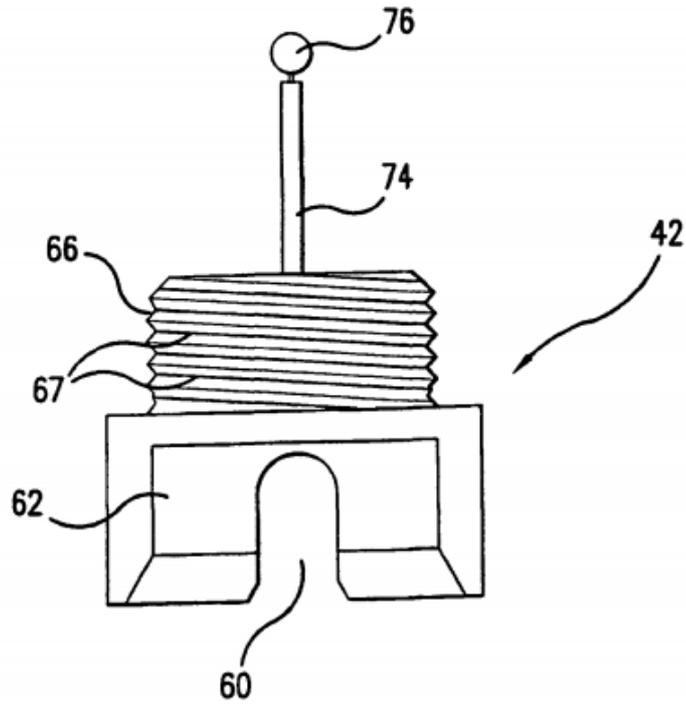


FIG.5

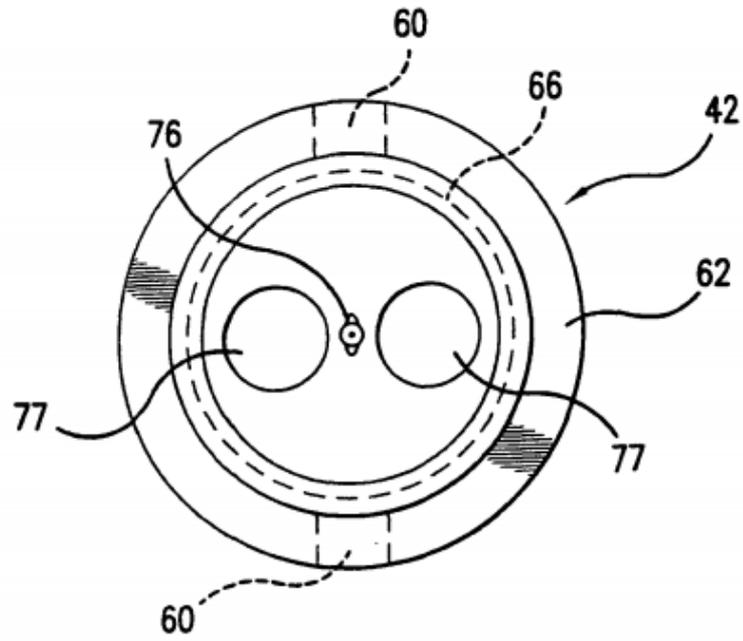


FIG. 6

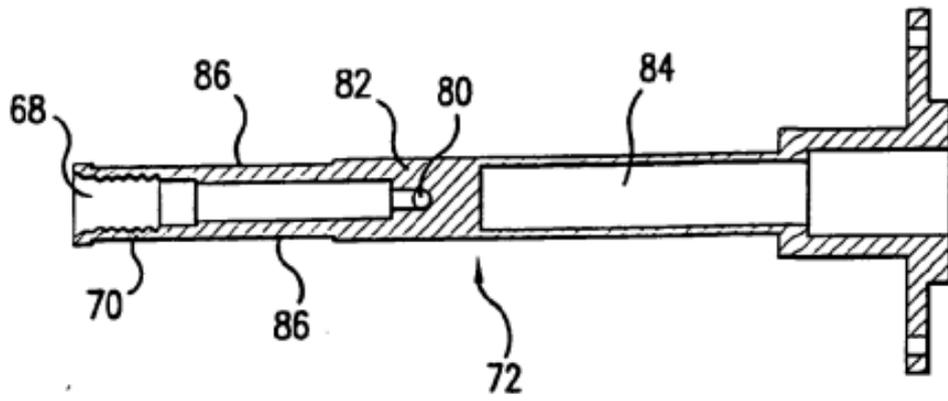


FIG.7

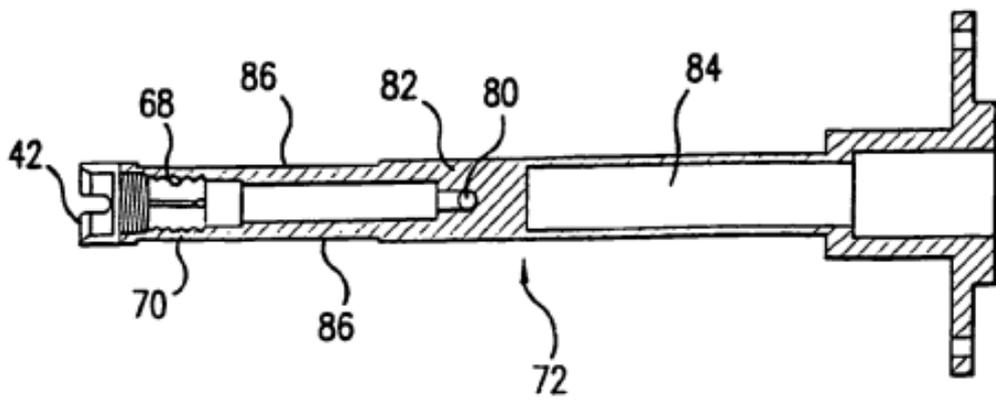


FIG.8

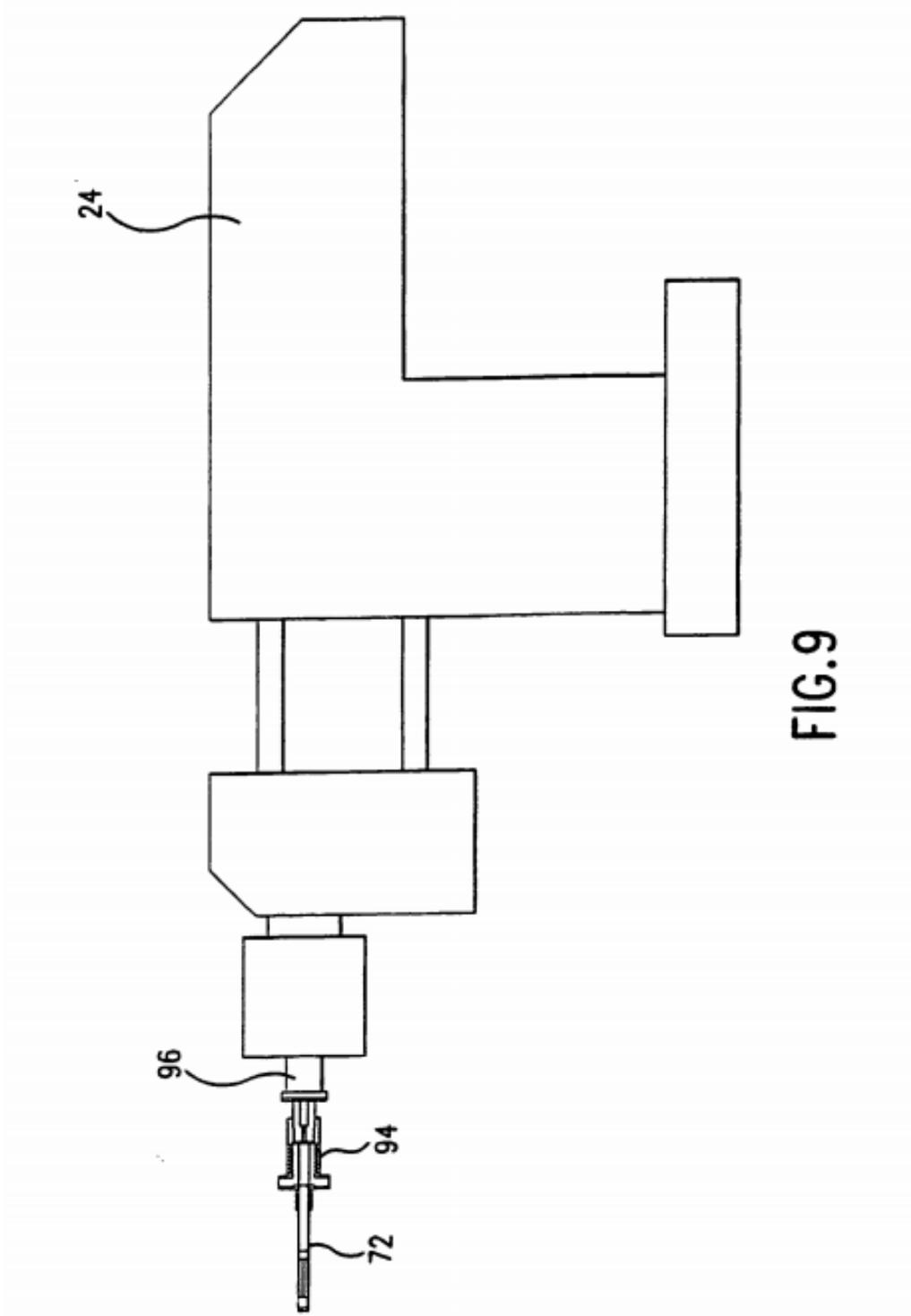


FIG. 9

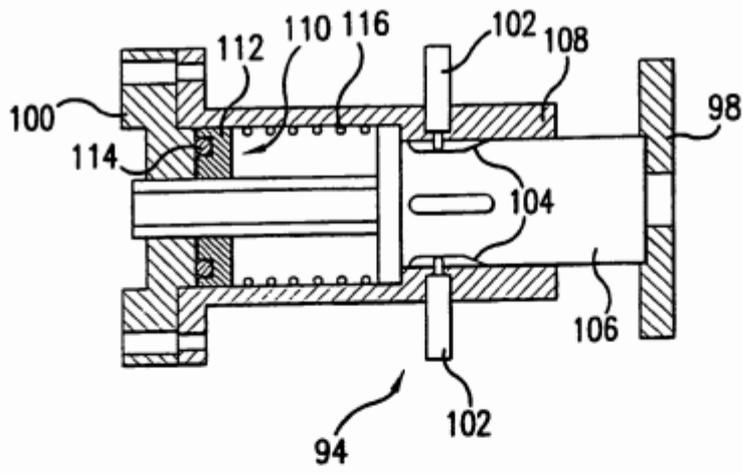


FIG.10

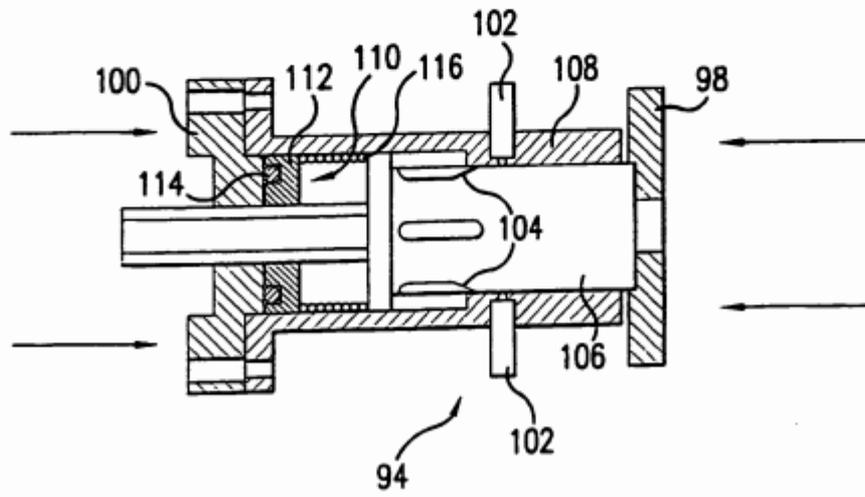


FIG.11

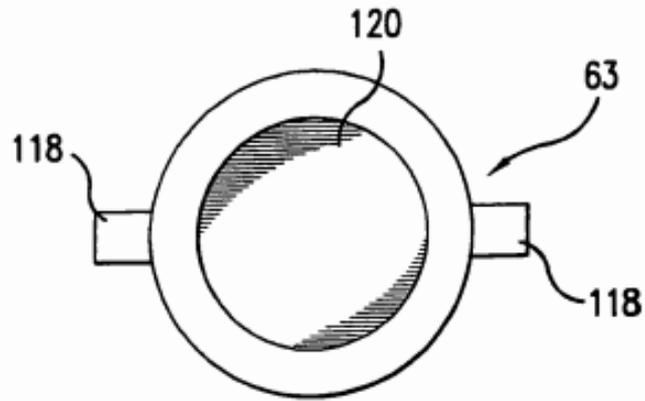


FIG. 12

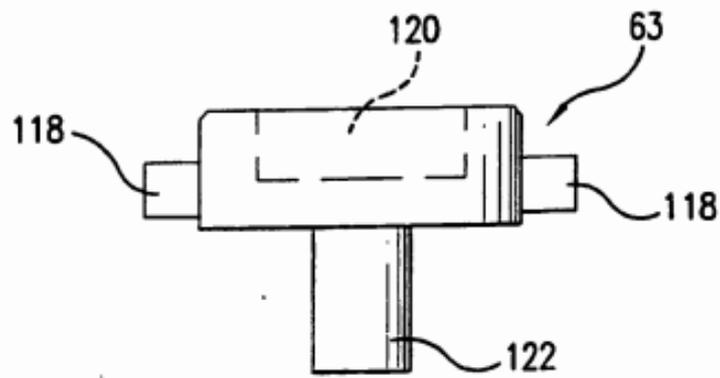
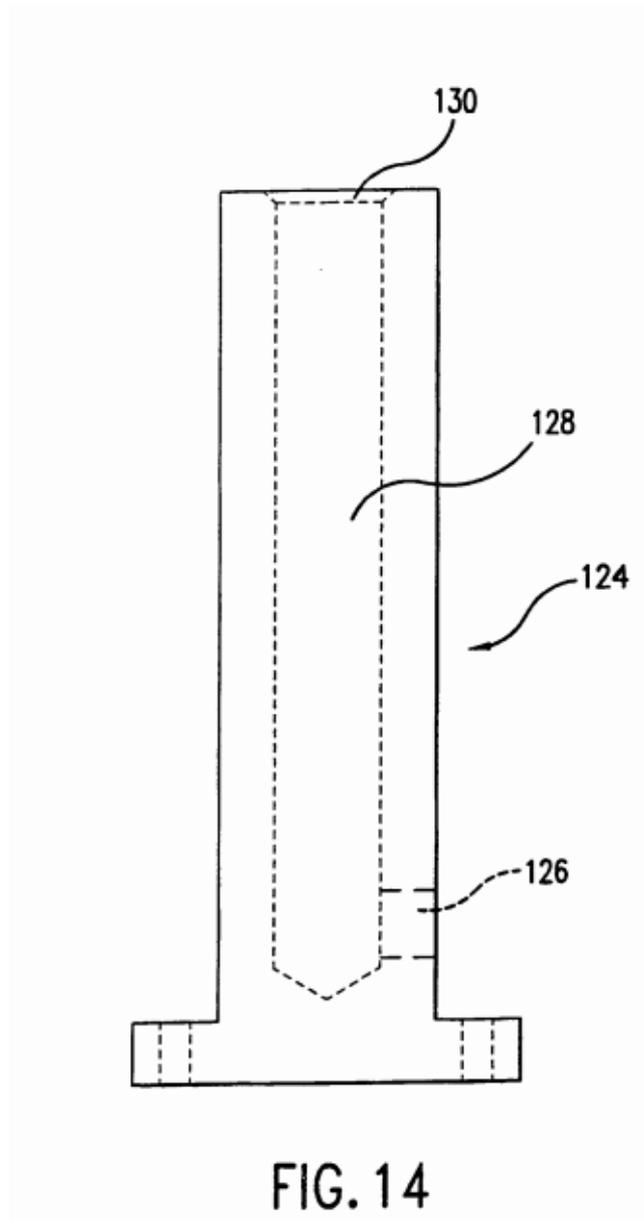


FIG. 13



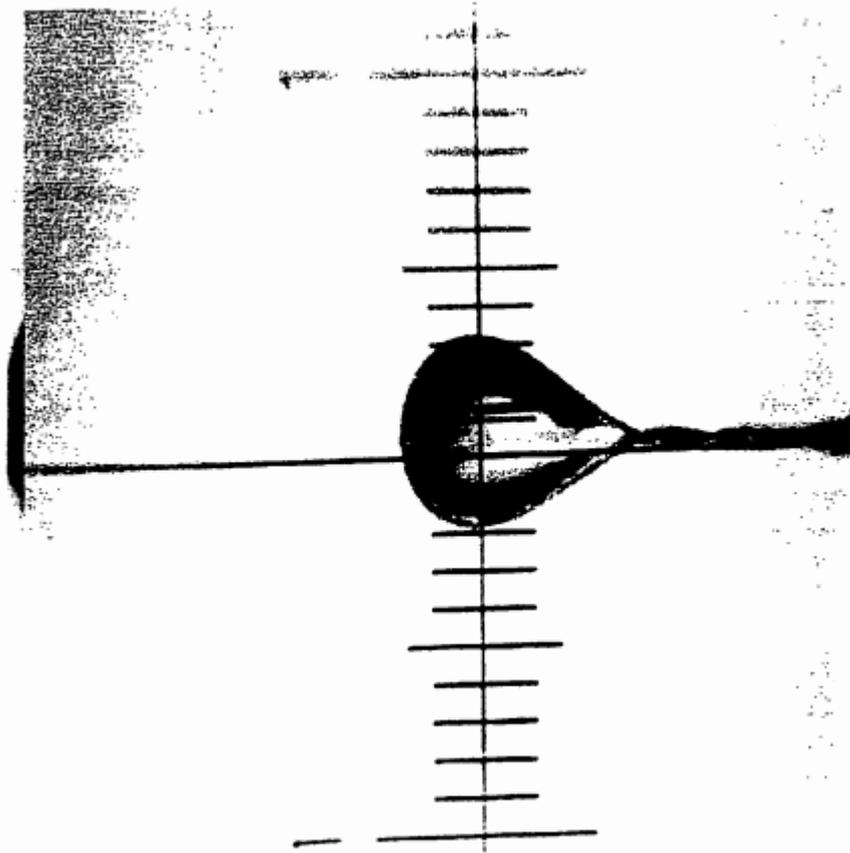


FIG.15

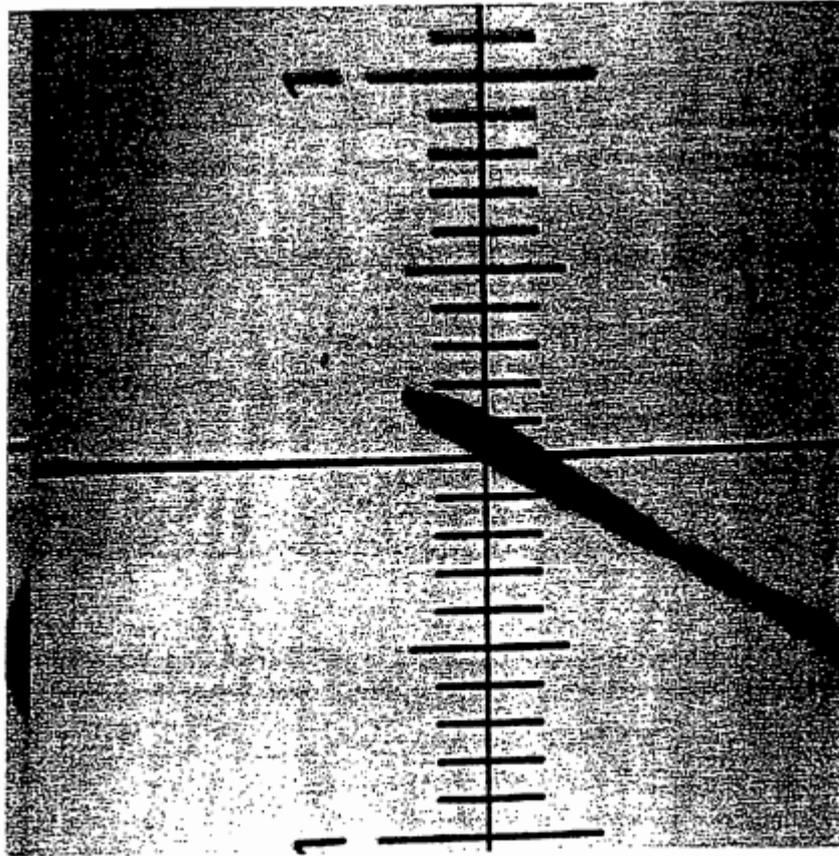


FIG. 16

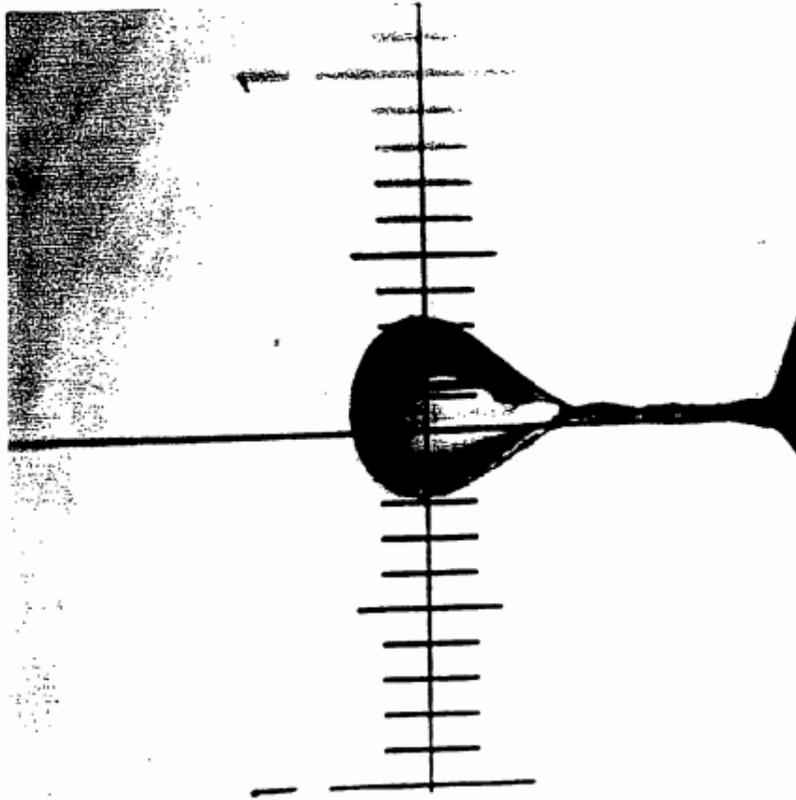


FIG.17

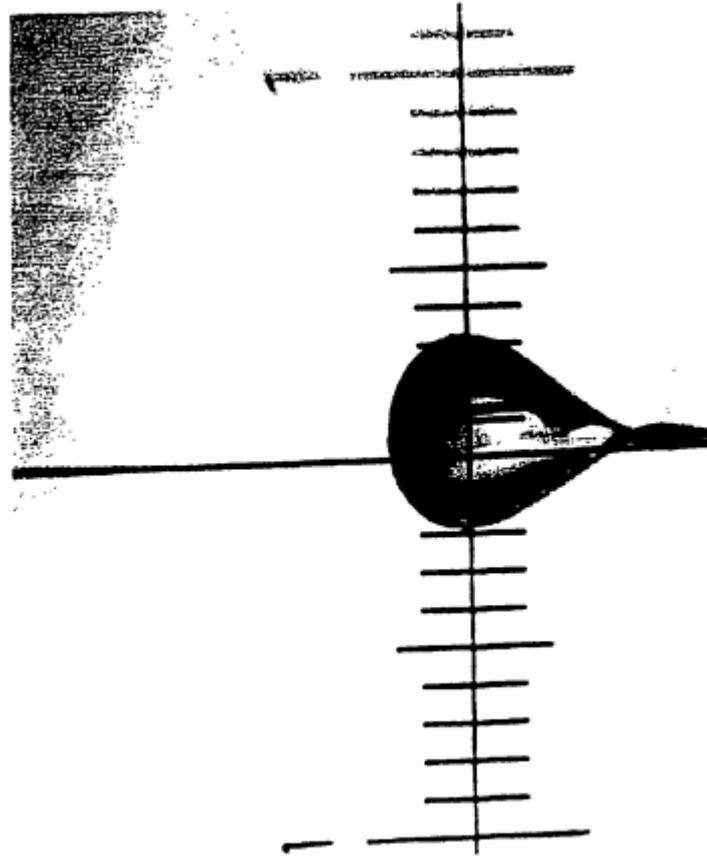


FIG. 18

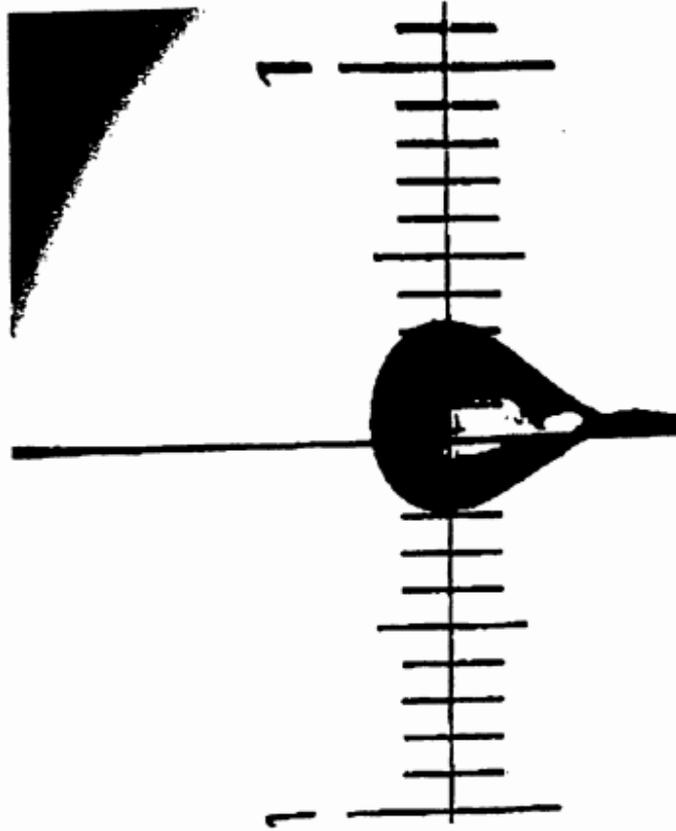


FIG.19

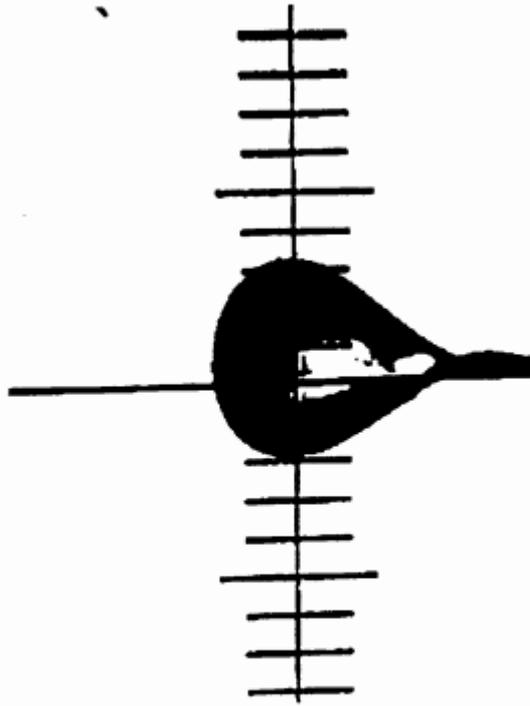


FIG.20



FIG.21