

(12)

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



1 Número de publicación: 2 721 205

51 Int. CI.: H01J 37/20 (2006.01)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

Т3

Becha de presentación y número de la solicitud internacional:			12.08.2014		PCT/GB2014/052454	
87 Fecha y número de publicación internacional:	19.02	2.2015	WO1	5022510		
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea:	12.08	8.2014	E 147	/50632 (3)		
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea:	27.03	8.2019	EP 3	033762		

54 Título: Soporte de muestra de microscopía electrónica que comprende una lámina de metal porosa

30 Prioridad:	73 Titular/es:
13.08.2013 US 201361865365 P 29.10.2013 GB 201319070 20.06.2014 WO PCT/GB2014/051896	UNITED KINGDOM RESEARCH AND INNOVATION (100.0%) Polaris House, North Star Avenue Swindon SN2 1FL, GB
<ul> <li><sup>45</sup> Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:</li> <li>29.07.2019</li> </ul>	72) Inventor/es:
	PASSMORE, LORI y RUSSO, CHRISTOPHER
	74) Agente/Representante:
	ELZABURU, S.L.P

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

Soporte de muestra de microscopía electrónica que comprende una lámina de metal porosa

#### Campo de la invención

La presente invención se refiere a un soporte de muestra de microscopía electrónica; un método para fabricar tal soporte 6 de muestra de microscopía electrónica; un método para la formación de imágenes que utiliza tal soporte de muestra de microscopía electrónica y un aparato operable para realizar tal método para la formación de imágenes.

### Antecedentes

10

Se pueden utilizar técnicas de microscopía electrónica para la formación de imágenes de un espécimen. De acuerdo con tales técnicas, un haz de electrones es utilizado para "iluminar" un espécimen. La presencia del espécimen en el haz de electrones da como resultado cambios en ese haz. Los cambios en el haz inducidos por la muestra pueden ser examinados para crear una imagen ampliada del espécimen.

Con el fin de ser iluminado por un haz de electrones, un espécimen debe ser soportado adecuadamente en ese haz. A menudo los electrones que forman el haz de electrones tienen una energía elevada y se apreciará que bombardear un objeto, por ejemplo, un espécimen para examen, junto con el soporte que sostiene el espécimen en posición dentro del

15 haz de electrones, pueda dar como resultado cambios físicos, químicos y/o eléctricos en el soporte y/o espécimen. Tales cambios pueden tener un impacto en el resultado, incluyendo la resolución de la imagen, obtenida a través de la utilización de técnicas de microscopía electrónica.

EUGEN ERMANTRAUT y col: "Perforated support foils with pre-defined hole size, shape and arrangement" ("Láminas de soporte perforadas con agujeros de tamaño, forma y disposición predefinidos") ULTRAMICROSCOPY, vol. 74, nº 1-2, 1

- 20 de Julio de 1998 (1998-07-01) páginas 75-81, XP055141410, ISSN: 0304-3991, DOI: 10.1016/SO304-3991 (98) 00025-4 describe láminas de soporte perforadas con agujeros de tamaño, forma y disposición predefinidos, con tamaños de agujero por debajo del intervalo de orden inferior al micrómetro. Las láminas son fabricadas utilizando técnicas litográficas semiconductoras. Se ha descrito un método de fabricación para crear láminas llenas de agujeros utilizando la fotorresistencia como una base y gelatina reticulada con glutaraldehído como un nuevo tipo de capa de sacrificio entre la
- 25 capa de fotorresistencia y la oblea. Por otro lado se han descrito técnicas litográficas estándar. Una lámina intermedia llena de agujeros formada a partir de fotorresistencia es creada y hecha flotar sobre agua, donde es recogida sobre rejillas EM, secada, revestida con 15-20 nm de carbono u otros materiales, p.ej. oro, mediante técnicas de deposición al vacío. La fotorresistencia puede ser disuelta, produciendo rejillas cubiertas con una lámina llena de agujeros, consistiendo esa lámina solo en carbono.
- 30 S JANBROERS y col: "Preparation of carbon-free TEM microgrids by metal sputtering" ("Preparación de micro-rejillas de MET libres de carbono mediante pulverización de metal"), ULTRAMICROSCOPY, vol. 109, nº 9, 1 de Agosto de 2009, páginas 1105-1109, XP027274561, ISSN: 0304-3991 describe un método para preparar rejillas de Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) de temperatura estable libres de carbono. Una película de 80% oro/20% de metal Pd es depositada sobre un carbono de micro-rejilla lleno de agujeros soportado en rejillas de MET Au de malla mezclada. La
- 35 película de carbono es eliminada posteriormente de forma selectiva mediante limpieza con plasma. Así, en esas áreas seleccionadas se realiza una película de MET totalmente metálica que contiene la "misma" micro-rejilla que la película de carbono original. Se reduce la transparencia electrónica de la lámina entera. Las áreas abiertas permiten la inspección de MET de materiales en esas áreas.
- Se desea proporcionar un soporte de espécimen, para utilizar en microscopía electrónica, que pueda abordar algunas de 40 las características de soportes de espécimen conocidos.

#### Compendio

Por consiguiente, un primer aspecto proporciona un soporte de muestra de microscopía electrónica según la reivindicación 1.

- El primer aspecto reconoce que el contenido de la información en micrografías electrónicas de especímenes, que incluye, por ejemplo, partículas a nanoescala, puede estar limitado por: movimiento inducido por haz de electrones de partículas individuales; acumulación de carga en el espécimen inducida por el haz de electrones y/o transformación química de un soporte de espécimen, por ejemplo, un sustrato de carbono. Tales fenómenos se han ilustrado esquemáticamente en las figs. 1 a 3.
- Los fenómenos descritos anteriormente pueden ser de relevancia particular en relación con la criomicroscopía electrónica, también conocida como microscopía crioelectrónica, en la cual se utiliza la microscopía electrónica de transmisión para estudiar especímenes a temperaturas criogénicas. Las técnicas de criomicroscopía electrónica pueden ser particularmente útiles en el estudio de especímenes biológicos hidratados, congelados. La pérdida en el contenido de la información como resultado de fenómenos tales como los mencionados anteriormente puede limitar la resolución de

imágenes recopiladas mediante criomicroscopía electrónica en relación con tales muestras biológicas hidratadas congeladas, particularmente en relación con la reconstrucción en 3D de imágenes de tales muestras. Las técnicas conocidas imponen un límite a la precisión de las asignaciones angulares de las partículas individuales como resultado de la información limitada disponible de tal manera que las partículas más pequeñas, tales como las de menos de ~500 kDa, no puedan ser alineadas de forma fiable.

5

El primer aspecto reconoce que aunque se conoce la utilización de soportes de rejilla metálica en microscopía electrónica y se conoce la utilización de una película de carbono poroso, la utilización de una lámina metálica porosa fina para soportar especímenes para su análisis puede tener ventajas, a pesar de que parece, en primer lugar, ser una estructura que podría ser perjudicial para las imágenes resultantes. En particular, se puede pensar que las muestras de alojamiento en la región de poros prevista en una lámina metálica darían como resultado imágenes más pobres, ya que la lámina

- 10 en la región de poros prevista en una lámina metálica darían como resultado imágenes más pobres, ya que la lámina metálica no es transparente a un haz de electrones y puede causar una interferencia excesiva a un haz de electrones incidente. Como resultado, se han utilizado sustratos de carbono típicamente porosos, estando soportados esos sustratos mediante, por ejemplo, rejillas metálicas, siendo operables las rejillas metálicas para añadir estabilidad mecánica al soporte de espécimen y para "conducir" lejos los electrones desde una muestra según se requiera.
- 15 Un soporte de muestra de acuerdo con el primer aspecto incluye una lámina de oro, que tiene propiedades seleccionadas para permitirle proporcionar, por ejemplo, suficientes electrones secundarios a una muestra ubicada en la región de un poro en la lámina metálica si está alineada correctamente dentro de un haz de electrones incidentes. Tales electrones secundarios pueden neutralizar entonces la carga positiva acumulada en la muestra durante la exposición a un haz de electrones incidente. El rendimiento electrónico de un metal elegido de forma apropiada puede actuar para
- 20 minimizar los efectos de carga experimentos por una muestra o espécimen en la región de un poro de la lámina. Además, el oro es seleccionado como si fuera sustancialmente inerte y no reactivo en presencia de un haz de electrones. La naturaleza no reactiva del oro puede minimizar la deformación mecánica de la lámina.

En una realización, la lámina de oro está dispuesta para estar en contacto óhmico con el miembro de soporte. Es decir, el contacto entre la lámina y el miembro de soporte actúa como una unión sin rectificación, permitiendo así la facilidad de movimiento de cualesquiera electrones libres entre la lámina y el soporte y mejorando los efectos de carga que pueden resultar como consecuencia de la exposición del soporte a un haz de electrones.

El oro es un metal de alta conductividad. Por consiguiente, la provisión de este metal de alta conductividad para la lámina permite el movimiento relativamente libre de los electrones dentro de la lámina, que puede mejorar los efectos de carga que pueden resultar como consecuencia de la exposición del soporte a un haz de electrones.

- 30 La lámina de oro tiene un rendimiento total elevado de electrones emitidos por la lámina para cada electrón que incida en la lámina. Por consiguiente, la exposición a un haz de electrones de energía elevada puede permitir la generación de electrones que pueden caer sobre una región de espécimen o muestra, mejorando así los efectos de carga que pueden resultar como consecuencia de la exposición de la muestra a un haz de electrones.
- La lámina de oro tiene una resistencia mecánica al grosor seleccionado que es suficiente para reducir el movimiento de la muestra durante la exposición a un haz de electrones incidente a menos que la inversa de la resolución espacial deseada para una imagen resultante. Por consiguiente, la lámina puede estar configurada para que sea auto-portante cuando se extiende a lo largo de un miembro de soporte. La lámina puede, si se ha elegido que tenga un módulo de Young apropiado, ser de tal manera que pueda ser relativamente fuerte a lo largo de un espacio entre los lados de un miembro de soporte, a pesar de ser relativamente delgada por naturaleza. Además, por medio de la elección de oro
- 40 como el material de lámina que tiene una estabilidad mecánica apropiada, se pueden abordar cualesquiera efectos de la distorsión mecánica causada mediante cambio químico o desequilibrio de carga en la lámina metálica porosa. Es decir, cuanto más rígido sea el material, menos probable es que un desequilibrio de carga pueda causar la deformación física de la lámina. Mejorar la deformación física puede ayudar a mejorar el desdibujado causado por el movimiento en las imágenes de micrografía de una muestra.
- 45 La lámina de oro comprende un metal no reactivo. Por consiguiente, la exposición a un haz de electrones de energía elevada puede dar como resultado pocos cambios físicos en la lámina metálica y por lo tanto se pueden mejorar cualesquiera efectos de distorsión química causados por cambios químicos en la lámina metálica porosa.

El oro también es compatible con una muestra de microscopía electrónica biológica. Por consiguiente, se minimiza una reacción con un espécimen. En particular, la lámina de oro muestra poco reacción con una sustancia biológica.

- 50 En algunas realizaciones, los poros individuales en la lámina metálica están dimensionados de tal manera que son comparables con un área que ha de ser interrogada por un haz de electrones incidente de un microscopio electrónico. Por consiguiente, un haz de microscopio electrónico puede ser operable para ver la totalidad de un solo poro. En algunas realizaciones, cada poro, o agujero está dimensionado para permitir la formación de imágenes simultánea de una pluralidad de muestras de microscopía electrónica de interés en un solo agujero. En algunas realizaciones, cada poro
- 55 está dimensionado para ser menor que el tamaño de un haz de electrones de microscopio electrónico incidente. Por consiguiente, un haz incidente puede estar dispuesto para cubrir la muestra alojada en el poro y extenderse sobre, o superponerse a, una región de una lámina metálica que rodea el agujero o poro. La superposición del haz sobre la

lámina metálica puede ayudar a asegurar una neutralización uniforme de la carga de una muestra mediante electrones secundarios generados como un resultado del haz de electrones incidente sobre la lámina. En una realización, la región porosa de la lámina de oro comprende una capa de oro que incluye una pluralidad de agujeros. La región porosa puede extenderse a lo largo de toda la lámina sostenida en su lugar por el miembro de soporte. En algunas realizaciones, solo

- 5 una región de la lámina puede incluir agujeros. Esos agujeros pueden estar dispuestos regular o irregularmente en la región porosa. En algunas realizaciones, esos agujeros pueden ser de un tamaño sustancialmente uniforme. En algunas realizaciones, el tamaño de los agujeros puede variar a lo largo de la lámina. Es decir, se puede prever una pluralidad de regiones porosas en la lámina de oro, teniendo cada una un tamaño de poro diferente. Alternativamente, pueden preverse poros de diferentes tamaños a lo largo de la región porosa de la película de oro. Por consiguiente, se puede 10
- probar un número de condiciones en una sola rejilla.

largo de una región de la malla.

20

40

50

En una realización, los aquieros están dimensionados para recibir al menos una muestra de microscopía electrónica. Por consiguiente, al menos una muestra puede ser vista por un haz de electrones de interrogación cuando la muestra sostenida en posición es irradiada. Es decir, en una realización, la lámina metálica tiene un grosor seleccionado para ser al menos la dimensión más pequeña de la muestra de microscopía electrónica.

15 En una realización, el miembro de soporte comprende un elemento sustancialmente anular. La forma en sección transversal de ese anillo puede, por ejemplo, ser sustancialmente circular, ovalada, rectangular o triangular. Por consiguiente, la lámina puede extenderse a lo largo de dicho elemento anular.

El miembro de soporte comprende una pluralidad de elementos de soporte espaciados. La pluralidad de elementos de soporte espaciados están dispuestos para formar una malla. Por consiguiente, el miembro de soporte puede comprender un elemento anular que soporta una estructura similar a una rejilla. La estructura similar a una rejilla puede soportar entonces, entre los elementos de malla advacentes, la lámina. Tal rejilla puede proporcionar una estabilidad estructural adicional a la lámina de oro. En una realización, la región porosa de la lámina de oro está dispuesta para extenderse a lo

- El miembro de soporte y los elementos de soporte comprenden oro.
- 25 El miembro de soporte, los elementos de soporte y la lámina metálica están todos formados del mismo metal, es decir, oro.

Por consiguiente, los componentes principales que forman el soporte de muestra están formados de un material que tiene sustancialmente el mismo coeficiente de dilatación térmica (CDT). Como resultado, se pueden mitigar el estrés, la deformación, el estiramiento o el desgarro inducidos en la lámina metálica, donde esos cambios son inducidos por un

- 30 cambio en la temperatura, tal como se ha experimentado cuando un soporte de muestra es reducido a, por ejemplo, temperaturas de nitrógeno líquido. Si el soporte está fabricado de tal manera que la lámina está bajo tensión, hacer coincidir el coeficiente térmico del soporte de muestra y/o del o de los elementos de soporte con el coeficiente térmico de la lámina metálica puede ayudar a mitigar la probabilidad de daños en la lámina y el movimiento relativo entre la lámina y el soporte de muestra y/o el o los elementos de soporte. Además, se apreciará que tal coincidencia térmica entre los
- componentes de soporte puede ser deseable para mantener una cantidad prescrita de tensión en la membrana de la 35 lámina metálica durante el enfriamiento para mantener la rigidez a la flexión de la membrana a lo largo de un intervalo de temperaturas.

En una realización, el soporte comprende además una capa de grafeno. En algunas realizaciones, esa capa de grafeno puede comprender una película delgada. Por consiguiente, se ha proporcionado una capa de grafeno que puede ser sustancialmente transparente a un haz de electrones incidente.

En una realización, la capa de grafeno está configurada para extenderse a lo largo de los poros en la región porosa de la lámina metálica. Como resultado de la naturaleza transparente del grafeno, la provisión de tal capa en dicho soporte de muestra puede permitir una estabilidad estructural adicional, mientas no degrade la calidad de la imágenes resultantes.

En una realización, la capa de grafeno está configurada para estar en contacto óhmico con la lámina de oro. Por 45 consiguiente, el impacto de la provisión de una capa de grafeno en el soporte de muestra puede ser minimizado, y los beneficios de una lámina de oro porosa mantenidos.

En una realización, la capa de grafeno está configurada para soportar la muestra de microscopía electrónica. Por consiguiente, la capa de grafeno, que puede extenderse a lo largo de los poros en la lámina metálica, puede ser utilizada como una superficie sobre la cual soportar una muestra, o formar una capa delgada que contiene una muestra, de tal manera que el grafeno rodee, o encierre una muestra. La capa continua de grafeno puede permitir la creación de una estructura que contenga una muestra más uniforme.

En una realización, los agujeros en la región porosa de la lámina de oro están configurados para recibir un material sensible a la radiación que ha de ser examinado utilizando microscopía electrónica. Las muestras que han de ser examinadas pueden asentarse sobre, bajo o en los poros de la lámina porosa. El material sensible a la radiación puede

comprender una proteína. Esa proteína puede ser sustancialmente destruida por el proceso de microscopía electrónica. 55 En una realización, el material sensible a la radiación comprende material biológico. En una realización el material

biológico está soportado en dicha región porosa de dicha lámina en hielo vítreo.

Por consiguiente, la estructura del hielo puede no interrumpir la formación de imágenes de la muestra o espécimen de interés.

En algunas realizaciones, el soporte de muestra comprende un soporte de muestra de criomicroscopía electrónica. 5 Algunos de los problemas descritos en la presente memoria pueden ser de particular relevancia en el campo de la criomicroscopía electrónica, y por lo tanto el soporte de muestra de aspectos y realizaciones puede encontrar una aplicabilidad particular en tal campo.

Un segundo aspecto proporciona un método para fabricar un soporte de muestra de microscopía electrónica según la reivindicación 11.

10 Un tercer aspecto proporciona un método para la formación de imágenes de una muestra de microscopía electrónica según la reivindicación 12.

Un cuarto aspecto proporciona un aparato para la formación de imágenes operable para proporcionar una imagen de microscopía electrónica de una muestra según la reivindicación 13.

Otros aspectos particulares y preferidos se han expuestos en las reivindicaciones dependientes e independientes adjuntas. Las características de las reivindicaciones dependientes pueden ser combinadas con características de las reivindicaciones independientes cuando sea apropiado, y en otras combinaciones que las expuestas explícitamente en las reivindicaciones.

Cuando una característica del aparato se ha descrito como siendo operable para proporcionar una función, se apreciará que esta incluye una característica del aparato que proporciona esa función o que está adaptada o configurada para proporcionar esa función.

Breve descripción de los dibujos

20

25

40

45

Se describirán ahora más a fondo realizaciones de la presente invención, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La fig. 1 ilustra esquemáticamente el movimiento de partículas inducido por haz de electrones en hielo vítreo;

La fig. 2 ilustra esquemáticamente la acumulación de carga de la muestra inducida por haz de electrones;

La fig. 3 ilustra esquemáticamente la transformación química inducida por haz de electrones de un sustrato de soporte;

La fig. 4a ilustra esquemáticamente un alzado en sección, en planta y lateral de un soporte de microscopía electrónica de acuerdo con una realización;

La fig. 4b ilustra esquemáticamente una parte del soporte de microscopía electrónica mostrado en la fig. 4a con más detalle;

Las figs. 5a a 5c muestran imágenes ópticas y electrónicas de un dispositivo según una realización;

La fig. 6 muestra los resultados de un experimento para medir el movimiento de partículas de oro en hielo vítreo en soportes de microscopía electrónica ejemplares;

Las figs. 7a y 7b muestran un ejemplo comparativo de un espécimen del que se ha formado una imagen utilizando un soporte de acuerdo con una realización;

Las figs. 8a y 8b muestra resultados experimentales que ilustran el movimiento reducido de soportes de rejilla de oro de acuerdo con una disposición en comparación con soportes de rejilla de carbono amorfos convencionales; y

Las figs. 9a a 9d muestran resultados experimentales que ilustran el desplazamiento medio del ribosoma 80S desde una posición inicial como un gráfico en función del tiempo/fluencia electrónica para datos recopilados en hielo utilizando una variedad de estructuras de soporte de microscopía.

### Descripción de las realizaciones

Se ha reconocido que el contenido de la información en micrografías electrónicas de especímenes que incluyen, por ejemplo, partículas a nanoescala, puede estar limitado por: movimiento inducido por haz de electrones de partículas individuales; acumulación de carga en el espécimen inducida por el haz de electrones y/o transformación química de un soporte de espécimen, por ejemplo, un sustrato de carbono. Tales fenómenos se han ilustrados esquemáticamente en las figs. 1 a 3.

La fig. 1 ilustra esquemáticamente el movimiento de partículas inducido por haz de electrones en hielo vítreo. La fig. 1

ilustra partículas, en este caso, proteínas, incrustadas en hielo vítreo. La muestra es irradiada con un haz de electrones. Los electrones que forman el haz tienen energía que es impartida a las muestras de proteína cuando colisionan con, o pasan a través de, esas muestras. Se apreciará que, durante la formación de imágenes, las partículas que están siendo estudiadas pueden moverse tanto de forma giratoria como en traslación tras la irradiación con el haz de electrones, causando el desdibujado en las imágenes capturadas resultantes.

La fig. 2 ilustra esquemáticamente la acumulación de carga de la muestra inducida por haz de electrones. La fig. 2 muestra esquemáticamente muestras, de nuevo proteínas, mantenidas en posición en hielo vítreo formado en agujeros en un sustrato de carbono amorfo soportado entre barras de una rejilla metálica. La irradiación de las muestras y del soporte (formado, en este caso, de una rejilla metálica y un soporte de carbono amorfo) con electrones de energía elevada que forman un haz de electrones puede causar la liberación o el movimiento de electrones que forman parte de la muestra y/o del soporte. El movimiento o desplazamiento resultante de los electrones puede dar como resultado la carga de la muestra que puede introducir fuerzas eléctricas que actúan sobre la muestra y el sustrato, causando el movimiento de partículas y el desdibujado de la imagen por la desviación del haz de electrones.

La fig. 3 ilustra esquemáticamente la transformación química inducida por haz de electrones de un sustrato de soporte.
En la disposición mostrada en la fig. 3 las partículas, en este caso proteínas, están incrustadas en hielo vítreo. El hielo vítreo está formado en un agujero formado en un sustrato de carbono. La muestra es irradiada con un haz de electrones. La irradiación con un haz de electrones de energía elevada puede dar como resultado que los electrones que forman el haz actúen para romper los enlaces químicos en el sustrato de carbono, lo que a su vez puede alterar la densidad y la forma del sustrato. El cambio en la densidad y la forma del sustrato puede inducir estrés mecánico y movimiento y causar
"la formación de una cúpula" de la capa de hielo. Esa formación de una cúpula de la capa de hielo, que soporta las partículas puede causar el desdibujado en la imagen de microscopía electrónica resultante.

Los soportes y sustratos de muestra actuales para crio-EM comprenden típicamente un disco de malla metálica, denominado "rejilla" formado de un material adecuado. Ese material adecuado puede comprender un metal. La rejilla está cubierta típicamente con una capa delgada de carbono amorfo llena de agujeros. La rejilla puede tener una agrupación regular de agujeros. La capa delgada de carbono amorfo llena de agujeros puede comprender un agrupación regular de agujeros. También se pueden utilizar sustratos de carbono "enlazados" irregulares. Se apreciará que en el caso de crio-EM, el hielo vítreo es utilizado a menudo para encapsular muestras en agujeros formados en el carbono amorfo. Dado que el hielo es un aislante y el carbono amorfo es un conductor pobre y muy variable, ambos acumulan una carga superficial móvil significativa que puede desviar un haz de electrones y ejercer fuerzas electrostáticas fuertes sobre la muestra, como se ha mostrado en la fig. 2 y en la fig. 3. Además, si el carbono amorfo es irradiado por un haz de electrones de energía elevada, puede sufrir cambios químicos que pueden cambiar la densidad y por lo tanto la forma del material de soporte de carbono amorfo, causando así el movimiento de partículas individuales en

#### Visión general

55

una muestra.

5

10

- 35 Antes de tratar las realizaciones con más detalle, primero se proporcionará una visión general. Los aspectos y las realizaciones descritos en la presente memoria pueden proporcionar un soporte de muestra ultra-estable que puede mejorar, reducir o eliminar cada uno de los problemas con soportes utilizados para microscopía electrónica descritos anteriormente.
- La fig. 4a ilustra esquemáticamente un alzado en sección, en planta, y lateral de un soporte de microscopía electrónica de acuerdo con una realización. La fig. 4a ilustra un soporte de muestra de microscopía electrónica que comprende: un elemento de soporte, en este caso, un miembro sustancialmente anular junto con una rejilla metálica y una lámina metálica que se extiende entre vigas adyacentes de la rejilla metálica. La lámina metálica comprende una región porosa. El elemento de soporte está configurado para dar estabilidad estructural a la lámina metálica porosa. La región porosa de la lámina metálica está configurada para recibir una muestra de microscopía electrónica. Según la invención, el soporte 45 de microscopía electrónica comprende una lámina de oro perforada montada sobre una rejilla de malla de oro.

La fig. 4b ilustra esquemáticamente una parte del soporte de microscopía electrónica mostrado en la fig. 4a con más detalle. En particular, la fig. 4b muestra una vista en primer plano de una membrana de lámina llena de agujeros suspendida en una rejilla. Las inserciones de la fig. 4b muestran la estructura de soporte en detalle.

Las figs. 5a a 5c muestran imágenes ópticas y electrónicas de un dispositivo según una realización. La escala de cada imagen está indicada. La fig. 5a muestra una imagen óptica de bajo aumento de una región de un dispositivo según una realización. La realización mostrada comprende una "rejilla" de malla metálica de oro de 3 mm que está cubierta en una lámina delgada suspendida de oro lleno de agujeros.

La fig. 5b es una imagen de aumento superior del dispositivo del dispositivo mostrado en la fig. 5a y muestra un cuadro de rejilla individual. Se puede ver una agrupación regular de agujeros en la lámina de oro delgada entre soportes de rejilla.

La fig. 5c es una micrografía electrónica de transmisión de un agujero individual en la lámina de la realización de la fig.

5a. El agujero mostrado contiene una muestra que comprende ribosomas 70S incrustados en una capa delgada de hielo.

Se apreciará que se pueden alterar distintos parámetros de un soporte de acuerdo con aspectos y realizaciones con el fin de construir un soporte adecuado para un intervalo de aplicaciones de microscopía electrónica de interés. En particular, se pueden ajustar parámetros que incluyen los enumerados en la presente memoria para proporcionar un soporte adecuado para un espécimen de interés:

#### Elección de material

5

15

20

En las realizaciones mostradas en las figs. 4 y 5, el oro es seleccionado por ser un material metálico adecuado tanto para la lámina metálica porosa como para la estructura de soporte. La estructura de soporte de la realización de la fig. 4 y de la fig. 5 adopta la forma de una rejilla, montada sobre un soporte anular. El oro es altamente conducto (resistividad 2,3 u.O. em on comparación con a 1400 u.O. em para carbono amorfo) y colocar la lómina de ora porte anular.

10 μΩ cm en comparación con ~1400 μΩ cm para carbono amorfo) y colocar la lámina de oro perforada en la parte superior de una rejilla de oro genera un plano de tierra eléctrico continuo sin discontinuidad en el coeficiente de expansión térmica.

Además, el número de electrones secundarios generados a partir de un sustrato de oro es mucho mayor que a partir de un sustrato de carbono, o ciertamente a partir de muchos otros metales candidatos. El número de electrones secundarios generados puede ser una consideración importante en el diseño de un soporte, dado que los electrones secundarios, generados cuando un haz de electrones de un microscopio electrónico golpea un sustrato, actúan para neutralizar cualquier carga superficie positiva en un espécimen.

El oro tiene una estabilidad mecánica similar al carbono. El módulo de Young de oro es comparable al de carbono amorfo: 79 GPa para oro y ~100 GPa para carbono). Por el contrario, el oro no es sometido a transformación química y es por lo tanto más estable en un haz de electrones.

Se apreciará que esta combinación de propiedades materiales hace del oro un metal particularmente adecuado para la lámina perforada que forma el soporte de espécimen. Otros metales que tienen propiedades similares también son sustratos adecuados, por ejemplo, platino, paladio, rodio o hafnio.

### Grosor de la lámina de oro

- El grosor (t en la fig. 4b) de la capa de lámina metálica perforada es un parámetro ajustable de un soporte de acuerdo con aspectos y realizaciones descritos en la presente memoria. El grosor mínimo de la lámina metálica es establecido por el tamaño de los granos metálicos evaporados. La lámina de oro del soporte de espécimen debe ser más gruesa que el grano de oro para proporcionar suficiente estabilidad mecánica y conductividad eléctrica uniforme. El grosor de la lámina de oro perforada también afecta al grosor de, por ejemplo, el hielo que llena los agujeros en la lámina y mantiene
- 30 los especímenes en posición en esos agujeros. El grosor máximo de lámina metálica puede ser seleccionado dependiendo del grosor de huelo deseado, que a su vez es establecido por las dimensiones de partícula del espécimen. Tomando en consideración tales factores la lámina de oro perforada debería ser ~500 Å o el diámetro de la partícula de espécimen de interés, cualquiera que sea mayor.

### Relación de aspecto de los agujeros

- Pueden existir limitaciones prácticas al diseñar un soporte respecto a la relación de aspecto de los orificios (t/d en la fig. 4) en la lámina metálica. Esas limitaciones pueden ser dictadas, por ejemplo, por restricciones prácticas en la fabricación y el tamaño del campo de visión de un microscopio electrónico de interés. El diámetro (d) del agujero puede, en algunas realizaciones, ser seleccionado para hacer coincidir el campo de visión de un microscopio electrónico de interés de tal manera que el haz de electrones de microscopio pueda estar dispuesto para iluminar uniformemente un agujero en la
- 40 lámina metálica, ese agujero que contiene hielo en el que se pueden encapsular especímenes, junto con un "anillo" de metal, por ejemplo, oro, abarcando y rodeando el borde de la perforación en la lámina metálica. En una realización, el diámetro óptico viene dado por el tamaño mínimo que cumple los criterios anteriores en un aumento seleccionado de formación de imágenes. Los agujeros más grandes pueden sufrir típicamente una carga aumentada y un movimiento inducido por el haz dado que comprenden regiones más grandes de hielo aislante. Por ejemplo, para condiciones típicas
- 45 de formación de imágenes en un microscopio electrónico moderno, con un aumento de 39.000 X y con un diámetro de haz de 1,2 μm, el tamaño óptimo del agujero de perforación de lámina puede ser calculado para ser *d* aproximadamente igual a 1 μm.

### Dispositivos de grafeno

Según algunas realizaciones, un soporte de muestra puede comprender además una capa de grafeno. En tales realizaciones, se puede incorporar una capa de grafeno al sustrato de soporte. Tal capa de grafeno puede estar dispuesta de tal manera que esté ubicada en la parte superior de la lámina de oro perforada. En algunas realizaciones, la capa de grafeno puede estar dispuesta para asentarse entre la rejilla de soporte y la lámina perforada.

La provisión de una capa de grafeno en el soporte puede ser tal que la capa de grafeno puede actuar para disminuir adicionalmente la acumulación de carga superficial. Esa reducción adicional puede venir como resultado de las

propiedades conductoras del grafeno. Según las realizaciones en la que se ha incorporado grafeno, el grafeno está dispuesto para estar en contacto óhmico con la lámina metálica. El grafeno también puede estar en contacto óhmico con el soporte. La provisión de una capa de grafeno en un soporte puede ser tal que actúe para aumentar la resistencia mecánica del sustrato.

- En una disposición de soporte en la que se ha previsto una capa de grafeno por encima de la provisión de la lámina 5 metálica de esa capa de grafeno puede ser tal que un revestimiento sustancialmente uniforme que incluye una o más muestras o especímenes para su análisis puede estar dispuesto para extenderse a lo largo de dicha capa de grafeno. Tal disposición puede permitir controlar el grosor de la capa de revestimiento que incluye una o más muestras. En tal disposición, el grosor de un revestimiento, por ejemplo, una capa de hielo que incluye muestras de proteína, puede ser controlad independientemente del grosor de la lámina metálica. 10

En una disposición de soporte en la que se ha previsto una capa de grafeno debajo de la lámina metálica, la capa de grafeno puede estar dispuesta de tal manera que una sustancia que contiene una o más muestras para su análisis puede estar soportada en agujeros o poros en la película metálica por el grafeno.

La provisión de una capa de grafeno en un soporte según algunas realizaciones puede ser tal que se mejore la 15 estabilidad mecánica del soporte y/o la muestra para su análisis.

Además, la selección de grafeno apropiado puede ser tal que la inclusión de tal capa puede ser útil al examinar muestras biológicas, dado que puede permitir la deposición controlada de proteína en el soporte.

#### Método de producción

- Se apreciará que se pueden emplear distintos métodos de producción para construir un soporte de muestra de acuerdo 20 con aspectos y realizaciones descritos en la presente memoria. A modo de ejemplo solamente, para producir una realización de un dispositivo según una realización, se puede utilizar una rejilla de oro que tiene una capa suspendida de carbono amorfo perforada en la parte superior como una plantilla. Se apreciará que se pueden utilizar otros tipos de plantilla, incluyendo: carbono de encaje, policarbonato nanoporoso y otros plásticos con patrón.
- El oro es entonces evaporado sobre la plantilla suspendida. La plantilla es retirada posteriormente exponiendo el 25 dispositivo a un plasma de oxígeno/argón de baja energía. El plasma puede ser ajustado de tal manera que reaccione muy fuertemente con todos los materiales que contienen carbono pero no tiene efecto sobre el oro. Tal disposición permite la retirada selectiva de sustancialmente toda la capa de la plantilla, dejando una lámina de oro puro perforada unida directamente a una rejilla de malla de oro puro.
- La fig. 6 muestra los resultados de un experimento para medir el movimiento de las partículas de oro en hielo vítreo en 30 soportes de microscopía electrónica ejemplares. Mediante la formación de imágenes de partículas de oro se puede mostrar que existe un movimiento de espécimen reducido cuando se forman imágenes en un soporte de muestra ultraestable de acuerdo con una realización. El panel izquierdo de la fig. 6 ilustra una trayectoria de movimiento típica para un espécimen en hielo en un sustrato típico (curva etiquetada como sustrato Quantifoil) en función de una trayectoria típica para un espécimen en hielo en nuestras rejillas ultra-estables (curva etiquetada como Nuevo sustrato de oro). El panel
- 35 derecho de la fig. 6 muestra cinco trayectorias de espécimen individuales determinadas cuando se utiliza un soporte de acuerdo con una realización. Se puede ver que el movimiento es menor que la precisión con la que se pueden ubicar los especímenes, es decir, menor que un Ángstrom por momento. Indicar que la escala en el panel derecho de la fig. 6 es el desplazamiento en píxeles.

### Uso experimental del soporte

- 40 Se han encontrado que las muestras y los especímenes preparados en un soporte de muestra ultra-estable según una realización presentan carga reducida cuando son colocados en un haz de electrones. El "efecto de enjambre de abejas" es una fluctuación en la granularidad de imágenes con un aumento bajo y es un resultado de de la carga superficial. El "efecto de enjambre de abejas" con un soporte típico ha sido comparado con el efecto experimentado al utilizar un sustrato ultra-estable según una realización y se encontró que el efecto es reducido en gran medida, indicando que carga 45 de muestra/espécimen es probable que se reduzca al utilizar un soporte de acuerdo con aspectos y realizaciones
- descritos en la presente memoria.

Las realizaciones pueden estar diseñadas de tal manera que durante la formación de imágenes un haz de electrones de un microscopio electrónico ilumine el oro alrededor de toda la circunferencia del agujero poroso que contiene el espécimen, en algunos casos, encapsulado en hielo vítreo. Tal disposición puede permitir la generación uniforme de

- 50 electrones secundarios por la lámina metálica. Estos electrones secundarios pueden neutralizar cargas positivas generadas dentro y sobre la superficie del hielo en el poro de la lámina. Cuando el haz de electrones está dispuesto para estar descentrado con respecto al agujero, el haz de electrones no toca el oro alrededor de toda la circunferencia del poro y se puede observar un desdibujado en la imagen resultante. Ese desdibujado puede ser indicativo de que los electrones secundarios de la lámina de oro son importantes para neutralizar cualquier fenómeno de carga experimentado
- 55 por el espécimen.

En comparación con los sustratos de ME estándar, las muestras y los especímenes preparados en soportes ultraestables según algunas realizaciones parecen tener un movimiento de partícula disminuido y sufren efectos de carga disminuidos. El movimiento de partícula disminuido aumenta el contraste en cada imagen resultante debido al desdibujado reducido. El movimiento de partícula disminuido puede ser un resultado de, por ejemplo: alta estabilidad

- 5 mecánica, fuerza reducida sobre el hielo debido a la acumulación de carga reducida, y eliminación de cambios químicos en el soporte que inducirían estreses en una membrana de lámina perforada. Los efectos de carga disminuidos pueden mejorar adicionalmente el contraste de fase de las imágenes reduciendo la lente inducida por la carga del haz de electrones.
- Las figs. 7a y 7b muestran un ejemplo comparativo de un espécimen del que se ha formado una imagen que utiliza un soporte de acuerdo con una realización. En particular, las figs. 7a y 7b muestran mapas de densidad electrónica en 3D realizados utilizando el mismo número de imágenes de la misma muestra de proteína en (a) rejillas de carbono llenas de agujeros estándar y (b) un soporte según una realización. Las hélices alfa de la muestra de proteína están determinadas claramente en la fig. 7b como regiones cilíndricas de densidad electrónica. El diámetro de la apoferritina, la proteína octaédrica de masa molecular de 450 kDa de la gue se ha formado una imagen en las figs. 7a y 7b es 120 Å. La
- 15 alineación de una pluralidad de imágenes de apoferritina para construir una imagen en 3D requiere información a resoluciones superiores a 1/10 Å. Utilizando crio-ME en rejillas convencionales, no ha sido posible determinar la estructura en 3D de la apoferritina (fig. 7a). Utilizando imágenes obtenidas mediante la utilización de un soporte de acuerdo con una realización, se ha generado una reconstrucción en 3D de apoferritina (fig. 7b). Tal imagen demuestra que un soporte de muestra de acuerdo con aspectos y realizaciones descritos en la presente memoria puede ser tal que
- 20 el contenido de la información en micrografías electrónicas donde se mejore significativamente la información espacial cuya frecuencia es superior a ~1/10 Å.

Los soportes de espécimen de acuerdo con aspectos y realizaciones pueden reducir el movimiento de partícula y/o la carga de muestra en microscopía electrónica, y por lo tanto mejor el contenido de la información disponible a partir de micrografías electrónicas. Los soportes diseñados y construidos de forma apropiada pueden conducir a una resolución aumentada por partícula y una precisión aumentada de la asignación angular en reconstrucciones en 3D de, por ejemplo,

25 aumentada por partícula y una precisión aumentada de la asignación angular en reconstrucciones en 3D de, por ejemplo, especímenes biológicos. Esto puede permitir la determinación de estructuras de proteínas más pequeñas y más difíciles de lo que antes era posible utilizando técnicas de ME.

Las figs. 8a y 8b muestran resultados experimentales que ilustran el movimiento vertical reducido de soportes de tejilla de oro de acuerdo con una disposición en comparación con soportes de rejilla de carbono amorfo convencionales. En general, las figs. 8a y 8b ilustran gráficamente el movimiento reducido de rejillas de oro bajo irradiación de electrones de energía elevada cuando son comparadas con rejillas de carbono amorfo convencionales. Cada punto mostrado en los gráficos de la fig. 8a y 8b representa el desplazamiento vertical del r.m.s. de un agujero particular en, por ejemplo, el sustrato de carbono (puntos o líneas superiores) o el sustrato de oro (puntos o líneas inferiores) en relación con su posición inicial antes de la irradiación de electrones. Cada línea continua es el desplazamiento medio para múltiples
35 agujeros en múltiples cuadros de una rejilla. Se puede ver a partir de la fig. 8a que las rejillas de carbono amorfo convencionales exhiben un alto grado de movimiento perpendicular al plano de la rejilla bajo condiciones de iluminación típicas de crio-ME (300 ke V, 16 e/ºA2/s y 80 K). Los puntos y las curvas inferiores mostrados en la fig. 8a representan la

La fig. 8b comprende una medición y un análisis análogos realizados en relación con los soportes de rejilla de carbono amorfo (puntos y líneas superiores) y un soporte de oro (puntos y líneas inferiores) cuando está presente una capa delgada típica de hielo vítreo. Se puede ver que el movimiento vertical es reducido aproximadamente el doble con respecto a rejillas sin hielo y que, en general, el movimiento se vuelve más complicado en la naturaleza. En ambos casos hay de media una reducción de 50 veces en el movimiento vertical de la rejilla durante el primer 16 e/º A2 de irradiación para rejillas de oro en comparación con la utilización de rejillas de carbono amorfo convencionales.

misma medición en relación con las rejillas de oro.

- 45 Las figs. 9a a 9d muestran resultados experimentales que ilustran el desplazamiento medio de ribosoma 80S desde una posición inicial como un gráfico en función del tiempo/fluencia electrónica para datos recopilados en hielo utilizando una variedad de estructuras de soporte de microscopía. En particular, la Fig. 9a se refiere a una muestra soportada por una capa continua de carbono amorfo; la Fig. 9b se refiere a una muestra sin ninguna capa de soporte en membrana de soporte perforadas de carbono amorfo; la Fig. 9c se refiere a una muestra soportada sobre un sustrato de grafeno; y la
- Fig. 9d se refiere a una muestra de hielo no soportado sobre sustratos de oro. Todos los gráficos (Figs. 9a a 9d) tienen la misma escala. Cada punto (líneas de puntos) representa el desplazamiento del valor cuadrático medio (RMS) de miles de partículas desde una sola rejilla, cuyas posiciones se midieron utilizando una media de cinco fotogramas bajo irradiación de haz de electrones constante (300 ke V; 16e-/Å2/s). Las líneas continuas de las figs. 9a a 9d son los ajustes lineales de las dos fases de movimiento. Las barras de error representa el error estándar de la medio de experimentos repetidos (3 rejillas separadas en relación con las Figs. 9 a, b, d y 4 para la Fig. 9c).

Aunque se han descrito en detalle realizaciones ilustrativas de la invención en la presente memoria, con referencia a los dibujos adjuntos, se entiende que la invención no se limita a la realización precisa y que se pueden realizar distintos cambios y modificaciones en la misma por un experto en la técnica sin salirse del alcance de la invención como se ha definido por las reivindicaciones adjuntas.

El trabajo que conduce a esta invención ha recibido financiación del Consejo Europeo de Investigación bajo el Séptimo Programa Marco de la Unión Europea (FP7/2007-2013) / acuerdo de subvención ERC nº 261151.

### REIVINDICACIONES

1. Un soporte de muestra de microscopía electrónica que comprende:

un miembro de soporte metálico que comprende una pluralidad de elementos de soporte especiados dispuestos para formar una malla; y

5 una lámina metálica que comprende una región porosa;

estando configurado dicho miembro de soporte para dar estabilidad estructural a dicha lámina metálica, y estando configurada dicha región porosa de dicha lámina metálica para recibir una muestra de microscopía electrónica, caracterizado por que

10

35

dicho miembro de soporte, la pluralidad de elementos de soporte espaciados y la lámina metálica están todos formados de oro y dicha lámina metálica es de oro y tiene un grosor de 5 x 10<sup>-8</sup> m o mayor.

2. Un soporte de muestra de microscopía electrónica según cualquier reivindicación precedente, en donde dicha lámina metálica tiene un grosor seleccionado para ser al menos la dimensión más pequeña de dicha muestra de microscopía electrónica.

15 3. Un soporte de muestra de microscopía electrónica según cualquier reivindicación precedente, en donde dicha lámina metálica está dispuesta para estar en contacto óhmico con dicho miembro de soporte.

4. Un soporte de muestra de microscopía electrónica según cualquier reivindicación precedente, en donde dicha región porosa de dicha lámina metálica comprende una capa de metal que incluye una pluralidad de agujeros.

5. Un soporte de muestra de microscopía electrónica según la reivindicación 4, en donde cada uno de dichos agujeros está dimensionado para recibir al menos dicha muestra de microscopía electrónica.

6. Un soporte de muestra de microscopía electrónica según cualquier reivindicación precedente, en donde que dicha región porosa de dicha lámina metálica está dispuesta para extenderse a lo largo de una región de dicha pluralidad de elementos de soporte espaciados.

7. Un soporte de muestra de microscopía electrónica según cualquier reivindicación precedente, en donde dicho soporte
 comprende además una capa de grafeno.

8. Un soporte de muestra de microscopía electrónica según la reivindicación 7, en donde dicha capa de grafeno está configurada para extenderse a lo largo de los poros en dicha región porosa de dicha lámina metálica.

9. Un soporte de muestra de microscopía electrónica según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde dicha capa de grafeno está configurada para estar en contacto óhmico con dicha lámina metálica.

30 10. Un soporte de muestra de microscopía electrónica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde dicha capa de grafeno está configurada para soportar dicha muestra de microscopía electrónica.

11. Un método para fabricar un soporte de muestra de microscopía electrónica, comprendiendo dicho método:

proporcionar un miembro de soporte metálico que comprende una pluralidad de elementos de soporte espaciados dispuestos para formar una malla; y una lámina metálica que comprende una región porosa; en donde dicho miembro de soporte, la pluralidad de elementos de soporte espaciados y la lámina metálica están todos formados del mismo metal, y en donde dicha lámina metálica es de oro y tiene un grosor de 5 x 10<sup>-8</sup> m o mayor,

configurar dicho miembro de soporte para dar estabilidad estructural a dicha lámina metálica, y

configurar dicha región porosa de dicha lámina metálica para recibir una muestra de microscopía electrónica.

40 12. Un método para la formación de imágenes de una muestra de microscopía electrónica que comprende:

configurar dicha muestra de microscopía electrónica en un soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;

disponer dicho soporte en un haz de electrones de un microscopio; y recopilar datos de imagen para su análisis.

13. Aparato para la formación de imágenes operable para proporcionar una imagen de microscopía electrónica de una
 45 muestra, comprendiendo dicho aparato:

la muestra montada en un soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;

un microscopio dispuesto para hacer que un haz de electrones incida en dicho soporte; y un dispositivo de recopilación para recopilar datos de imagen para su análisis.





Transformación química inducida por haz de electrones del sustrato.

FIG. 3







FIG. 4b



FIG. 5a







FIG. 5c







