

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

## CAMPOBASSO



### CAPITOLATO TECNICO

Di seguito sono riportate le caratteristiche minime per la fornitura di un sistema combinato di microscopia confocale per analisi FLIM, FRET, TIRF e Super-risoluzione su microscopio ottico rovesciato.

Tali caratteristiche sono ritenute obbligatorie, il mancato rispetto di questi requisiti determinerà l'esclusione dal procedimento:

#### Componenti del sistema

##### Microscopio ottico rovesciato

- Microscopio rovesciato predisposto per tutte le metodiche di osservazione, da ricerca, motorizzato ad elevata stabilità e solidità e predisposto ad avere fino a 5 uscite fotografiche dotato di dispositivo, integrato nello stativo, di mantenimento continuo della posizione di fuoco con lenti di offset (real - time focus correction) per la memorizzazione di più piani di fuoco mantenendo lo stesso riferimento nel campione.
- Stativo del microscopio motorizzato con rilevazione delle periferiche e rilevazione automatica del posizionamento (revolver sestuplo, ruota filtri fluorescenza, shutter motorizzato)
- Dispositivo di messa a fuoco motorizzato macro e micrometrica bilaterale ergonomica con risoluzione 0.02 um o migliore), range almeno 8 mm.
- Tutti i valori devono poter essere visualizzabili da pad senza l'utilizzo del PC (indicazione del fuoco, movimentazione X, Y, ecc.)
- Sistema di traslazione motorizzato risoluzione 0.1 um e riproducibilità +/- 3 um o migliore
- Adattatore per vetrini e Petri
- Tubo binoculare indice di campo 22 mm, distanza inter pupillare 50-75 mm
- Dispositivo di messa a fuoco motorizzato bilaterale ergonomico, con incremento 0,01 micron
- Variatore di ingrandimento incluso nello stativo con lente 1x e 1,5x, con rilevazione automatica della posizione.
- Almeno 2 uscite foto/TV con ripartizione oculari 100%, dx 100%, sx 100%, oculari 20% /sx80%
- Uscita laterale per telecamera con FOV da almeno 22 mm
- Revolver portaobiettivi motorizzato ad almeno 6 posizioni, per campo chiaro e DIC in tutte le posizioni
- Condensatore universale motorizzato per campo chiaro, DIC e contrasto di fase.
- Illuminazione a fluorescenza motorizzata a LED con controllo da PC
- Set di filtri per DAPI, FITC, TRITC, Cy5

- Torretta portafiltri per fluorescenza motorizzata a 6 posizioni con riconoscimento automatico del filtro in uso
- Corredo ottico corretto all'infinito
- Obiettivo 10x A.N. 0,50 WD 1,1 mm
- Obiettivo 25X plan apocromatico al silicone con A.N. 1,05
- Obiettivo 40x Plan Apocromatico al silicone A.N. 1,25 WD 0,3 con collare di correzione
- Obiettivo 60Plan Apocromatico ad immersione ad olio W.D.0.13 mm A.N.1.40
- Obiettivo. CFI 100x Apocromatico per TIRF e Super Risoluzione A.N.1.49
- Stage incubator con controllo digitale della temperatura, umidità e CO2

### TESTA DI SCANSIONE CONFOCALE

- Testa di scansione Confocale predisposta per accoppiamento del laser pulsato in aria
- Scanner galvanometrico per acquisizioni a risoluzione 512x512 in almeno 10 fps
- Doppio sistema di scansione, a risonanza per esperimenti rapidi e galvanometrico per l'acquisizione di immagini ad alta risoluzione.
- Velocità non inferiore a 428 FPS con risoluzione non inferiore a 512x16 pixel
- Acquisizione simultanea con almeno quattro canali + luce trasmessa
- Risoluzione massima 8192x8192 pixel per singolo frame e campo di scansione pari ad almeno 22 mm
- Sistema di rivelazione del segnale fluorescente in emissione con almeno 2 canali spettrali indipendenti con tecnologia GaAsP e 2 PMT
- Detector spettrale GaASP con risoluzione selezionabile da 5, 10 o 20nm nanometri di risoluzione con variazione delle lunghezze d'onda a step di 1 nm
- Canale per luce trasmessa
- Il sistema deve essere a struttura modulare ed aperta; sono richiesti 2 ingressi in testa di scansione, una per i laser continui e una per banco laser pulsati per FLIM.
- Sono richieste 2 uscite per mappe di intensità e mappe FLIM.
- Pinhole variabile in continuo, interamente gestito via software.
- Velocità di scansione per esperimenti rapidi 512x16 ad almeno 720 fps
- Zooming: continuo e variabile
- N. 4 Laser per l'acquisizione di DAPI, FITC e TRITC o similari e CY5.
- Sono richieste le segg. Linee laser con una potenza di uscita dalla fibra non inferiore a 15 mW (su tutte le linee): 405 nm, 488 nm, 561 nm, 640 nm.
- Sorgente Laser pulsata per analisi FLIM con lunghezza d'onda almeno 488 e 640 nm o similari
- Il software deve permettere il controllo dell'intero sistema confocale senza l'utilizzo di software aggiuntivi in background non-proprietari
- Sistema di rilevazione FLIM a doppio canale simultaneo sul microscopio rovesciato e sistema per analisi FCS.

- Software in grado di offrire acquisizione dati ed analisi che permetta acquisizione di dati bidimensionali e routine di analisi FLIM ed analisi FRET integrato nel pacchetto
- Sistema completamente integrato con tecniche di Imaging Confocale, FLIM, TIRF, Fotoattivazione, Fotostimolazione, e Super Risoluzione gestite da un unico software.
- Tavolo con piano antivibrante di tipo attivo e foratura di tutto il piano di appoggio con passo M6
- PC ad alte prestazioni di ultima generazione con le seguenti caratteristiche (o similari):
  - WORKSTATION HP Z8 dedicato a Storm
  - Dual Intel Xeon 6136 3.0 2666MHz 12C
  - 64 GByte RAM max 24 slots
  - Win 10 Pro 64 for Workstations Plus
  - NVIDIA Quadro RTX5000
  - HP Z Turbo Drive M.2 512Gbyte SSD
  - HP Z Turbo Drive Quad Pro 512GB disk for acquisition
  - HP Z Turbo Drive Quad Pro 512GB disk for acquisition
  - Disk per storage 4TB 7200RPM SATA 3.5in
  - HP USB Keyboard
  - HP USB Optical Mouse
  - Scheda Grafica serie ATX per poter lavorare con algoritmi basati su intelligenza artificiale
- Monitor a 30"

### **Software di gestione dello strumento, acquisizione ed analisi dell'immagine**

- Il programma dovrà gestire in modo completo il processo di acquisizione delle immagini da microscopio per la parte Confocale, FLIM, TIRF e Super Risoluzione
- Software di acquisizione per esperimenti per T-C-Z bleaching e multiposizione ed analisi dei dati come 3D, Co-localizzazione, misure, analisi FRET e FRAP
- Possibilità di gestire da mouse messa a fuoco e movimentazione del tavolino motorizzato
- Completa integrazione con software per esperimenti in 6D
- Modulo di deconvoluzione delle immagini acquisite
- Modulo time lapse per acquisizioni veloci che richiedono filmati o scatti ad intervalli con possibilità di editing e playback
- Strumento che permetta il collage in acquisizione di immagini per ottenere viste di insieme di grandi dimensioni
- Acquisizioni multiple con gestione del tavolino motorizzato e relativo controllo degli assi X/Y/Z.
- Completo set di misure manuali ed automatiche che comprende misure di lunghezze, aree, perimetro, conta di oggetti.

- Conta di oggetti semplici con differenziazione di appartenenza a classi diverse (es. cellule vive, morte, in apoptosi).
- Strumenti di rimozione del background in modalità manuale o automatica.
- Pacchetto di misure automatiche per quantificazione di intensità di fluorescenza,
- Conta e classificazione automatica di oggetti con possibilità di discriminazione secondo fattori di dimensione, forma, morfologia, colorimetria
- Pacchetto per lo studio di colocalizzazione dei segnali di fluorescenza
- Pacchetto di rendering 3D in diverse modalità per evidenziare le caratteristiche di superficie dell'oggetto oppure per osservare l'oggetto 3D in trasparenza
- Possibilità di report di stampa con le immagini visualizzate nei diversi rendering 3D
- Possibilità di acquisire nel tempo, selezionare regioni di interesse e quantificare un segnale medio di fluorescenza sia nell'immagine acquisite nel tempo sia su Z-stack.
- Pacchetto di programmazione ad oggetti per l'acquisizione e l'analisi di immagini per la realizzazione esperimenti complessi. Il pacchetto dovrà essere completo di funzioni logiche che consentano all'operatore di impostare criteri decisionali a seconda di diversi parametri (di tipo quantitativo, dimensionale, morfologico e morfometrico). Tutto questo deve essere possibile senza dover inserire righe di comando o conoscere linguaggi di programmazione. L'interfaccia grafica dovrà consentire di inserire delle task semplicemente trascinando le icone in un foglio di lavoro pe assegnare un preciso comando al microscopio o al pc.
- Sistema per l'ottenimento di immagini in Super Risoluzione basato su sistema di localizzazione (STORM)
- Pacchetti software basati su Intelligenza Artificiale per effettuare analisi, lavorare su grandi quantità di dati, migliorare la qualità delle immagini, effettuare segmentazioni complesse, essere in grado di ricostruire un canale di acquisizione a partire da un'immagine.

## **SISTEMA A SUPER RISOLUZIONE STORM**

- Sistema a Super Risoluzione secondo il sistema di localizzazione a singola molecola tramite metodo STORM, PALM o DNA-PAINT. È richiesta risoluzione= 20nm su xy e 50 nm su asse Z.
- Sistema di correzione automatica del collare dell'obiettivo per ottimizzare la point-spread function (PSF) dell'acquisizione.
- Obiettivo al silicone 100x con indice di rifrazione compreso nel range ( $n=1.38-1.42$ ) per una ottimale imaging di campioni spessi.
- È richiesto un Field of view  $> 80 \text{ um} \times 80 \text{ um}$  anche con l'obbiettivo a più alto ingrandimento (100x), per consentire di acquisire dati su aree ampie

- Il Sistema deve consentire di lavorare con cellule fissate, vive, sezioni di tessuto
- Il Sistema deve essere compatibile con I metodi dSTORM, N-STORM, DNA PAINT
- Il Sistema deve consentire di usare sistemi di illuminazione tipo Hi-Lo o TIRF per l'acquisizione delle immagini.
- È richiesta TIRF totalmente motorizzata.
- Il software deve poter aggiustare automaticamente la Potenza del laser per mantenere il numero di eventi di attivazione casuale delle molecole fluorescenti
- È richiesta la fornitura di lenti con correzione automatica dell'astigmatismo per la 3D STORM.
- È richiesto Sistema automatico di messa a fuoco di tipo hardware ai fini di garantire un'alta stabilità nell'acquisizione sull'asse Z, durante l'acquisizione di uno stack Z.
- È richiesto un pacchetto software che consenta di effettuare imaging complesso, compreso la possibilità di acquisire large images (stitching di immagini) su punti diversi del vetrino. Tale acquisizione dovrà essere gestita da una interfaccia grafica semplice ed ad oggetti, senza l'uso di righe di comando o macro.
- È richiesta la correzione automatica dello shift laterale e l'autoallineamento delle sezioni acquisite negli Z stack
- È richiesta la possibilità di visualizzare in real time l'analisi STORM (visualizzare la formazione dell'immagine in super risoluzione) durante l'acquisizione dell'esperimento.
- Funzioni aggiuntive richieste: modelling function, Clustering analysis functions – Ripley's K, Ripley's H
- È richiesta la totale integrazione nel software confocale: entrambe le modalità, confocale e STORM devono essere gestite da un unico software, sia nell'acquisizione che nell'analisi delle immagini
- Deve essere possibile poter combinare l'imaging confocale e l'imaging STORM nello stesso esperimento e con un unico software.
- Possibilità di implementare in future alter tecniche a Super Risoluzione, come SIM sullo stesso strumento e gestite dallo stesso software.
- Banco Laser per STORM ad alta potenza con le seguenti linee di eccitazione:
  - Laser a 405 nm almeno 15 mW
  - Laser a 488 nm 70mW
  - Laser a 561 nm 70mW
  - Laser a 640 nm 120mW

## **SISTEMA FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)**

- Sistema per le mappe dei tempi di vita delle molecole fluorescenti
- È richiesto un pacchetto software specifico per l'analisi quantitative dei dati FLIM,
- Il software di gestione deve poter visualizzare un'immagine nella quale la scala delle intensità rappresenta il tempo di vita della fluorescenza.
- E' richiesta FLIM fino a 2 canali;
- È richiesta la possibilità di effettuare Lifetime decay; Lifetime histogram; Phase plot per la selezione di regioni di interesse; overlay con l'immagine confocale; 3D rendering;
- È richiesta alta precisione ed alta velocità di acquisizione ad oltre 10frames/secondo
- È richiesto un repetition rate variabile in continuo (dal singolo shot fino a 80MHz) compreso la correzione per eccitazioni cicliche

### **Formazione del personale e garanzia:**

- A seguito dell'installazione e di un primo training di familiarizzazione allo strumento, la ditta aggiudicataria dovrà effettuare un ulteriore corso di addestramento specialistico non inferiore a 6 giorni lavorativi diviso tra le sessioni FLIM, TIRF, STORM (da concordare nelle modalità);
- Garanzia: 24 mesi.

### **Ulteriori obblighi a carico del fornitore**

Il fornitore è obbligato a garantire l'aggiornamento tecnologico sia software che strumentale. Tutti gli aggiornamenti devono essere inclusi nel prezzo della fornitura.

Area Acquisti e Contratti

Il Responsabile

F.to Dott.ssa Rossella Cacchione

Il Direttore Generale

F.to Dott. Valerio Barbieri