

1. Specifiche tecniche del sistema patch-clamp e microscopia

Vengono riportati in tabella tutti gli item che compongono il sistema patch-clamp e microscopia, le specifiche tecniche che ogni componente deve avere come requisito minimo e la quantità.

| # | ITEM | Requisiti Minimi Specifiche Tecniche | Quantità |
|----|---|--|----------|
| A. | Microscopio diritto | Microscopio diritto da ricerca, dotato di modulo di fluorescenza e di porta-obiettivi, adattato per l'acquisizione di immagini di campioni <i>in vitro</i> quali cellule in coltura ed <i>ex vivo</i> come sezioni di tessuto, sferoidi ed organoidi. Il microscopio diritto deve essere posizionato sulla piattaforma per traslazione XY al punto B. | 1x |
| B. | Piattaforma per traslazione XY del microscopio | Piattaforma per traslazione manuale XY del microscopio, con range di corsa di almeno 25 mm sia in X che in Y sul piano laterale (piano di messa a fuoco). | 1x |
| C. | Sistema di illuminazione per luce trasmessa | Sorgente di luce bianca a lampada alogena per illuminazione in campo chiaro. Il sistema deve comprendere sia un'illuminazione nello spettro visibile che infrarosso. Lungo il cammino ottico della luce trasmessa devono essere presenti un filtro passabanda per l'NIR (NIR-pass) ed un filtro bloccante per l'NIR (NIR-block). | 1x |
| D. | Sistema di illuminazione a fluorescenza | Sistema di illuminazione a fluorescenza basato su sorgenti di luce LED con controllo TTL governabile da PC. Le sorgenti LED dell'illuminatore devono includere tre LED con picchi di emissione centrati sulle lunghezze d'onda 470 nm, 590 nm e 630nm (o equivalenti preventivamente concordati con FHT). | 1x |
| E. | Sistema dinamico di selezione del campo illuminato | Il sistema deve permettere il controllo dell'intensità e del campo di illuminazione di almeno due sorgenti LED specificate al punto D. I due campi di illuminazione devono essere indipendentemente governabili in XY per permettere di controllare separatamente il campo di illuminazione dei due LED. | 1x |
| F. | Predisposizione per sistema DMD | Predisposizione per un sistema Digital Micromirror device (DMD) sul percorso di epi illuminazione. | 1x |
| G. | Set di filtri per fluorescenza | Set completi (dotati di filtro di eccitazione, specchio dichroico e filtro di emissione) per l'imaging dei singoli GFP, RFP, mCherry/Texas Red, GCaMP e dual band GFP-RFP, dual band GFP-mCherry. Set di filtri che permetta l'eccitazione di GCaMP e ChRimsonR e raccolga l'emissione specifica di GCaMP. Set di filtri che permetta l'eccitazione di ChRiff e QuasAr ma permetta di raccogliere l'emissione specifica di QuasAr. Inoltre, per permettere la stimolazione e acquisizione contemporanea in due lunghezze d'onda differenti, come sopra elencate, è necessario avere due fonti LED indipendenti e contemporaneamente montate sul microscopio. | 1x |
| H. | Obiettivi | Obiettivi 10x (aria) e 40x (water dipping) per elettrofisiologia, a lunga distanza di lavoro (minimo 3 mm) e compatibili con epifluorescenza. | 1x |
| I. | Camera di registrazione porta-campioni (compatibile con vetrini copri oggetto) | Camera di registrazione per campioni <i>in vitro</i> , adatta a bassi volumi di soluzione e con adattatori per tubi di perfusione. La camera deve poter alloggiare un vetrino da 25mm con fondo in vetro o in altro materiale compatibile con le tecniche di trans-illuminazione ed almeno un set di vetrini di ricambio, e anello di montaggio magnetico da almeno 35 mm di diametro. | 1x |
| J. | Camera di registrazione porta-campioni (compatibile con campioni <i>ex-vivo</i>) | Camera di registrazione per campioni <i>ex-vivo</i> , adatta a bassi volumi di soluzione e con adattatori per tubi di perfusione. La camera deve avere un fondo in vetro o altro materiale compatibile con le tecniche di trans-illuminazione. La camera di registrazione deve avere un'apertura a forma di diamante per favorire il flusso, compatibile con le ancorette per tenere fermo il tessuto. | 1x |
| K. | Adattatore per porta-campioni | Adattatore per porta-campioni da posizionare su piattaforma di cui al punto L, adatto alla camera di registrazione di cui al punto I e J. | 1x |
| L. | Piattaforma per campione e micromanipolatore | Piattaforma per montaggio del campione integrata con micromanipolatore per patch-clamp quale al punto M. I micromanipolatori di cui al punto M, devono poter essere alloggiati direttamente sulla piattaforma. | 1x |
| M. | Micromanipolatore per patch-clamp | Micromanipolatore con caratteristiche di stabilità e precisione meccaniche che consentano il corretto posizionamento di microelettrodi da patch-clamp. Compatibile con il montaggio sulla piattaforma del campione e micromanipolatore descritto al punto L. Dotato di interfaccia indipendente di controllo digitale per il movimento sui 4 assi, range di corsa di almeno 20 mm in XYZ con una risoluzione compresa tra 20 nm e 100 nm, e 4 direzioni di movimento (incluse eventuali direzioni virtuali). Drift massimo di 1 micron in un | 1x |

| | | | |
|-----------|--|---|----|
| | | periodo di due ore. Dotato di componenti di montaggio e rotazione del micromanipolatore, e di carrello per il montaggio dell'headstage di cui al punto Q. | |
| N. | Oculari | Oculari per l'osservazione diretta del campione da parte dell'utente. | 1x |
| O. | Camera CMOS per imaging | Camera CMOS e relativa interfaccia hardware per imaging veloce di ioni. Efficienza quantistica minima 80%; velocità di acquisizione di almeno 80 immagini al secondo full frame e possibilità di arrivare a 1000 immagini al secondo riducendo il campo di acquisizione. | 1x |
| P. | Headstage | Headstage per voltage- e current-clamp compatibile con l'amplificatore di cui al punto R. | 1x |
| Q. | Holder per pipette | Holder per pipette da patch-clamp di dimensioni compatibili con l'headstage di cui al punto P. | 1x |
| R. | Amplificatore microelettrodi per | Amplificatore per microelettrodi compatibile con minimo 2 headstages (punto Q), adatto a registrazioni intracellulari a cellula intera in modalità corrente e voltaggio, e compatibile con le registrazioni di singoli canali ionici. Controllabile via software. | 1x |
| S. | Convertitore analogico-digitale | Convertitore analogico-digitale (A/D) a 16 bit e 500 kSPS, con funzione di sottrazione del rumore elettrico ambientale (50 Hz) sul segnale in entrata attiva su un minimo di 4 canali di input. Minimo 8 canali di input analogico e 8 canali di output analogico, più 8 canali di output digitale e presenza di input digitali per rilevare segnali TTL esterni. | 1x |
| T. | Software per acquisizione, visualizzazione e analisi dati di elettrofisiologia | Software di acquisizione e analisi dati di tipo patch-clamp (corrente e voltaggio) compatibile con il sistema amplificatore e convertitore A/D (punto R), con possibilità di creare protocolli avanzati di stimolo e registrazione di corrente/voltaggio e analisi di dati in batch. | 1x |
| U. | Software per acquisizione, visualizzazione e analisi dati di ion imaging | Il software deve avere un'interfaccia grafica che permetta di integrare l'acquisizione delle immagini mediante la camera (punto O) e di coordinare le funzionalità dei dispositivi descritte ai punti D, E, O ed R, consentendo la regolazione dei tempi di stimolazione e acquisizione del segnale di flussi ionici (es: Calcio). In particolare, il software deve permettere di gestire il triggering del sistema di optogenetica e di stimolazione tramite patch clamp. Per la parte ottica nello specifico deve poter controllare indipendentemente almeno 2 LED descritti al punto D in modo da poterli sincronizzare con una precisione di 1 ms con scheda di controllo esterna e indipendente. | 1x |
| V. | PC workstation | PC workstation per elettrofisiologia e imaging, con software di acquisizione pre-installati, compatibile con le componenti hardware specificate ai punti , R, S, T ed U. | 1x |