

Al Magnifico Rettore

Università degli Studi Magna  
Graecia di Catanzaro  
SEDE

Università degli Studi Magna Graecia di Catanzaro  
Pc ENTRATA Prof. n. 104 /U.C.G.  
del 09/03/2020

Oggetto: richiesta autorizzazione acquisto apparecchiature

Magnifico Rettore,

con la presente, il sottoscritto Prof. Giuseppe Viglietto, richiede l'autorizzazione all'acquisto, con procedura di unicità, della seguente apparecchiatura scientifica, nell'ambito del Progetto PONA3\_00435, denominato "Biomedpark@UMG", finanziato dal MIUR:

- no. 1 Upgrade Beam splitter acustico-ottico (LEICA AOBS)
- no. 1 Upgrade WLL E per SP8, sorgente di eccitazione a Laser bianco – WLL (LEICA White Light Laser).
- no. 1 Obiettivo LEICA HC PL FLUOTAR 5x/0.15
- no. 1 Obiettivo LEICA HC PL FLUOTAR 10x/0.30
- no. 1 Obiettivo LEICA HC PL APO 40x/1.30 Oil CS2

#### **Motivazione tecnico-scientifica**

L'acquisizione della strumentazione suddetta è indispensabile per consentire di adeguare le funzionalità e le prestazioni del microscopio confocale TCS SP8 presente nel nostro Istituto. L'installazione del suddetto aggiornamento permetterà di allestire sofisticati esperimenti di immunofluorescenza con estrema semplicità. L'aggiornamento permetterà di ottenere immagini ad alta risoluzione fino alla ricostruzione tridimensionale del campione. Il microscopio confocale è, infatti, indispensabile per tutti gli studi morfologici e funzionali, oggetto di numerosi progetti di ricerca in corso presso il nostro Ateneo, e destinati alla caratterizzazione delle strutture cellulari, nell'ambito sia della fisiologia che

patologia umana. L'aggiornamento richiesto risulta pertanto indispensabile per permettere l'adeguamento delle tecnologie disponibili al fine di raggiungere brillanti risultati scientifici che frutteranno all'Ateneo importanti collaborazioni scientifiche e pubblicazioni su prestigiose riviste internazionali.

### **Relazione tecnica**

L'aggiornamento risulta fondamentale per implementare il microscopio confocale, TCS SP8, già acquisito dalla nostra piattaforma in modo da consentire una maggiore flessibilità delle procedure sperimentali grazie alle caratteristiche tecniche che lo caratterizzano.

Il pacchetto è progettato per l'aggiornamento di un microscopio confocale Leica TCS SP8 dotato di LIAchroic splitter di fascio o AOBS verso un sistema con AOBS e laser a luce bianca. Il dispositivo Acusto-ottico AOBS per la selezione delle lunghezze d'onda in eccitazione/emissione, permette la registrazione degli spettri d'emissione senza la distorsione dovuta ad un'eventuale dicroico. Inoltre, l'efficienza di questo dispositivo ci permetterà di lavorare con potenze del laser molto basse 0.05 mW (laser Ar) 0.01 mW (laser He-Neon) evitando così il fenomeno di fotodecadimento (photobleaching) comune sia in campioni biologici che nello studio d'autofluorescenze di materiali.

Grazie all'adozione del AOBS è possibile upgradare il confocale con una sorgente laser a singolo fotone denominata White Light Laser (WLL = laser "bianco").

La sorgente laser a luce bianca è in grado di generare segnali nell'intervallo 470-670 nm e si adatta perfettamente alla lunghezza d'onda di qualsiasi fluoroforo. È possibile selezionare fino a otto linee di eccitazione dallo spettro, ciascuna delle quali può essere liberamente sintonizzata in termini di colore e intensità. In questo modo è possibile eccitare i fluorocromi sul picco della loro massima espressione con una ottimizzazione del segnale in emissione. Di conseguenza, qualunque fluorocromo può ora essere eccitato in maniera ottimale, riducendo al minimo l'eccitazione incrociata e i danni per il campione (photobleaching). E' poi possibile sintonizzare l'eccitazione fuori picco, se ciò è necessario, per ragioni di raccolta delle emissioni o per migliorare la separazione dei coloranti adiacenti. Il sistema integrato AOBS-WLL rende quindi possibile acquisire fluorofori spettralmente vicini, come ad esempio green fluorescent protein (GFP) e yellow fluorescent protein YFP, in una finestra di rilevamento più stretta rispetto a qualsiasi altro sistema. Il

laser a luce bianca, una sorgente laser che copre l'intero spettro della luce visibile, offre così la massima flessibilità per esperimenti che richiedono l'utilizzo di più colori su uno stesso campione.

### **Caratteristiche uniche e vantaggi offerte dall'apparecchiatura**

L'aggiornamento risulta assolutamente indispensabile per implementare le potenzialità del confocale TCS SP8 già acquisito e pertanto è unicamente fornito dalla Leica Microsystems. I vantaggi offerti dal WLL sono diversi. Considerando che questo laser è in grado di generare linee nell'intervallo da 470 a 670nm con passo di 1nm, è possibile eccitare i fluorocromi sempre sul loro valore di picco, con conseguente limitazione della potenza necessaria e riduzione del fotodecadimento del campione. Inoltre, questo approccio permette di ridurre significativamente le interazioni in eccitazione se comparato con quanto accade con linee laser standard. Grazie alla possibilità di regolare la lunghezza d'onda di eccitazione, oltre alla tradizionale scansione per la ricostruzione dello spettro di emissione di un fluorocromo, è possibile effettuare anche scansioni per la ricostruzione dello spettro di eccitazione. Pertanto, si può mappare al livello di singolo pixel la relazione tra eccitazione ed emissione e quindi caratterizzare campioni complessi con fluorocromi non standard oppure auto fluorescenze. Essendo una sorgente pulsata, il laser bianco WLL abbinato ai detector Hybrid, permette di sfruttare la tecnologia esclusiva Leica denominata LightGate che permette di sopprimere segnali di autofluorescenza o luce riflessa. Il laser bianco WLL può anche essere impiegato in un eventuale e futura espansione del confocale con accessorio FLIM. L'implementazione degli obiettivi è legata alla necessità di completare la dotazione per poter osservare campioni di diversa tipologia.

Sulla base delle caratteristiche tecniche prima descritte il sistema brevettato da Leica offre i seguenti vantaggi:

- velocità di cambio d'eccitazione di 10 microsecondi;
- possibilità di uso fino ad 8 linee laser in contemporanea (e quindi di lavorare con 8 fluorocromi contemporaneamente);
- elevatissima capacità selettiva (0,6 - 2 nm di larghezza banda);
- regolazione senza soluzione di continuità lungo tutto lo spettro del visibile;
- incremento di efficienza quantica del sistema di scansione fino al 30% in più



rispetto ai sistemi confocali che adottano i tradizionali filtri dicroici e che rendono il microscopio confocale Leica TCS SP8 con AOBS estremamente flessibile in termini applicativi, preservando il campione dal photobleaching, soprattutto in esperimenti di time lapse;

- AOTF (filtro acusto-ottico regolabile) a 8 canali per la rapida modulazione dell'intensità del laser, in particolar modo per l'eccitazione di ROI (regions of interests);
- registrazione di spettri 2D eccitazione/emissione
- considerevole aumento di selettività, con miglioramento del rapporto segnale/rumore;
- minor energia di eccitazione e quindi minore photobleaching con aumento del tempo di vita delle cellule *in vivo*;
- permette una separazione ottimale riducendo l'overlapping delle bande di emissione;
- estrema semplicità di utilizzo e versatilità;
- poca manutenzione poiché non vengono utilizzate parti meccaniche.

### **Informazioni commerciali**

Lo strumento di cui si chiede l'acquisto viene unicamente prodotto e fornito in Italia da:

Leica Microsystems Srl, Via Emilia, 26, Buccinasco (MI), I-20090 Italy

Telefono : +39 0257 4861

Il costo orientativo è 145.000 euro (IVA esclusa)

Per quel che riguarda l'esclusività di produzione e di vendita, si veda la dichiarazione allegata.

In Fede

Prof. Giuseppe Viglietto

