



OGGETTO : *Acquisto di strumentazione all'interno del Progetto Prot IR0000028 - PRP@CERIC (D.D n. 371 del 11.10.2022, pubblicato sul sito MUR al seguente link [https://www.mur.gov.it/it/atti-e-normativa/decreto-direttoriale-n-371 dell'11-10-2022](https://www.mur.gov.it/it/atti-e-normativa/decreto-direttoriale-n-371-dell'11-10-2022)) - a valere sulle risorse di cui all'Avviso n. 3264 del 28/12/2021 "Rafforzamento e creazione di IR nell'ambito del Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza (PNRR)*

SCHEDA TECNICA

1. Fabbisogno

L'obiettivo del Progetto Infrastrutturale PRP@CERIC (Prot. IR0000028 , CUP J97G22000400006) consiste nel potenziamento dell'infrastruttura di ricerca CERIC-ERIC con l'integrazione di una struttura digitale per lo studio dei patogeni, che fornisca agli utenti accademici e industriali gli strumenti adeguati per affrontare gli agenti patogeni umani, animali e vegetali emergenti che destano preoccupazione per la salute, la sicurezza e l'economia, al fine di migliorare le strategie di preparazione e risposta a future epidemie, in conformità con il principio DNSH e per la sostenibilità ambientale. L'obiettivo sarà raggiunto integrando laboratori a supporto degli utenti e strutture analitiche complementari all'avanguardia con metodologie biofisiche. Questo approccio promuoverà i progressi scientifici sia nella ricerca fondamentale che in quella applicata nel campo delle malattie infettive, attraverso lo sviluppo di strategie dedicate per la manipolazione e il trattamento dei campioni infettivi.

In particolare il progetto prevede il rafforzamento del Laboratorio HOLO TEM del BIO OPEN LAB, recentemente finanziato (PON Ricerca e Innovazione 2014-2020), presso il Dipartimento di Matematica e Fisica dell'Università del Salento, in qualità anche di nodo italiano dell'infrastruttura europea CERIC-ERIC.

A tale scopo, sui fondi del Progetto infrastrutturale PRP@CERIC (Prot. IR0000028 , CUP J97G22000400006), è stato previsto l'acquisto di :

- Un sistema Cryo FIB/SEM integrato con microscopia a fluorescenza: una piattaforma composta da un fascio di elettroni e da un fascio di ioni utilizzabili in modo disgiunto e congiunto per l'osservazione e la preparazione di campioni di cryo-lamelle da materiali biologici vetrificati per la tomografia cryo-TEM, con la capacità di combinare imaging a fluorescenza, osservazione con elettroni e milling ionico all'interno di un unico strumento.

La disponibilità di una colonna elettronica e di una colonna ionica garantirà sia un riconoscimento dettagliato dell'ultrastruttura del campione, della morfologia superficiale e della composizione subcellulare del campione, nonché una manipolazione e una preparazione sicura del campione in situ per la successiva analisi con HOLO TEM.

La presenza di un sistema per la misura della fluorescenza consentirà di individuare con precisione l'area di interesse e di preparare il campione da quella specifica area. Lo strumento dovrà consentire di trasferire immediatamente la lamella preparata all'interno del cryo-holder e quindi nel microscopio, senza alcun innalzamento della temperatura del campione, e senza alcuna ulteriore manipolazione del campione.

La strumentazione dovrà garantire elevatissimi standard di operatività a temperature criogeniche in maniera ottimizzata , con elevate velocità di raffreddamento, sistema di



trasferimento del campione dall'azoto liquido allo stadio cryogenico rapido e dovrà assicurare il mantenimento della temperatura ($< -150^{\circ}\text{C}$) in ogni momento, dal trasferimento del campione attraverso tutte le fasi di produzione della cryolamella. Il sistema dovrà garantire protocolli avanzati di preparazione dei campioni e software dedicato per: i) la gestione del flusso di lavoro in correlativa, ii) per la preparazione automatizzata di cryo-lamelle di campioni in situ, e iii) l'imaging del cryovolume su campioni vetrificati mediante tomografia FIB/SEM. La tecnologia del sistema dovrà essere ottimizzata per limitare il numero di operazioni di trasferimenti e/o estrazione del campione.

2. Requisiti minimi

Stante il sopra indicato fabbisogno, si riportano di seguito tutte le caratteristiche e requisiti minimi che i sistemi da acquisire e la ditta appaltatrice devono soddisfare.

- 1) **INFRASTRUTTURA CRYO COMPLETA:** Dewar di azoto liquido in grado di garantire tempi di funzionamento prolungati senza eccessive interruzioni, scambiatore di calore, controlli digitali del flusso, sistema di blocco del carico, stazione di preparazione dei campioni, controller e dispositivo di trasferimento. Il sistema deve comprendere tutti gli accessori necessari al caricamento dei campioni sull'holder ed all'interno del SEM/FIB senza innalzamento di temperatura come di seguito specificato:
 - a) Caratteristiche stage portacampioni:
 - i) Tavolino compucentrico, motorizzato su tutti i cinque assi
 - ii) Escursioni: $X \geq 130$ mm (-65 mm to $+65$ mm); passo minimo ≤ 160 nm, $Y \geq 130$ mm (-65 mm to $+65$ mm); passo minimo ≤ 160 nm
 - iii) $Z \geq 90$ mm
 - iv) Rotazione: 360° in continua,
 - v) Tilt: da -60° a $+90^{\circ}$
 - vi) Altezza massima del campione: 90 mm (con rotazione), 132 mm (senza rotazione)
 - vii) Sistema attivo di smorzamento delle vibrazioni meccaniche con lettura istantanea delle stesse tramite accelerometri e motori piezoelettrici di retroazione istantanea e cancellazione, completamente integrati nel plinto del FIB-SEM Cryo-preparation station con Vacuum Cryo Manipulation
 - b) Controller per Cryo-preparation station
 - c) Sistema di cryo-trasferimento del campione (Vacuum Cryo transfer)
 - d) Cryo-loader: sistema SEM load lock per il trasferimento del campione.
 - e) Sistema cryo lift-out con nanomanipolatore integrato nello strumento per la preparazione di lamelle cryo-TEM di campioni idratati congelati a temperature cryogeniche (con la possibilità di raffreddare l'ago). Il sistema deve essere pilotabile da software avanzato ed il nanomanipolatore dovrà essere controllato da motori piezoelettrici che garantiscano l'altissima precisione di movimentazione richiesta in applicazioni quali la preparazione e l'estrazione di lamelle TEM, la manipolazione di nanofili e o di blocchi di campioni. Il software di movimentazione del nanomanipolatore dovrà essere interamente integrato in quello principale di gestione del SEM. Il sistema di movimentazione dovrà avere le seguenti caratteristiche minime:
 - i) Spostamenti $X=Y=Z \geq 18$ mm
 - ii) Velocità: Max 5 mm/s
 - iii) Ripetibilità Omnidirezionale: < 150 nm
 - f) Dewar di azoto liquido che consenta tempi di operazione di almeno 4 ore senza significative interruzioni e di poter essere collegato ad un sistema per il refill automatico che consentirà autonomie di lavorazione superiori.
 - g) Sistema da vuoto di tipo dry, con pompa turbomolecolare, pompa di back-up, pompa ionica e valvola di isolamento VAT che permetta di mantenere la colonna in UHV e la camera in HV
 - h) Predisposizione per l'utilizzo di gas ausiliari oltre al Pt disponibile come standard



- i) Sistema GIS per la deposizione protettiva di film di Pt di protezione del campione
- j) Sistema di decontaminazione al plasma di ossigeno per la rimozione e gassificazione degli idrocarburi presenti in camera e sul campione. Completamente integrato e controllabile dall'ambiente software del SEM, include la flangia di interfaccia per montaggio.
 - i) Preset di pressione, potenza e tempo attraverso l'interfaccia software
 - ii) Possibilità di usare aria o altri gas
 - iii) Logica avanzata di gestione plasma
 - iv) Potenza RF: 5-20 Watts @ 13.56 MHz

2) COLONNA ELETTRONICA

- a) Tipo di emettitore: sorgente FEG di tipo Schottky, ad alta brillantezza
- b) Minima risoluzione garantita in alto vuoto a temperatura ambiente e in condizioni cryogeniche: 0.9nm@15kV; 1.4nm@1kV
- c) Range MINIMO di ingrandimenti: da 4X sino a 2.000.000X
- d) Campo inquadrato $\geq 7\text{mm}$ @ WD analitica di 10mm, $\geq 21\text{mm}$ @ WD di 30mm
- e) Tensione di accelerazione: da 50V a 30kV, selezionabile in continuo
- f) Corrente di fascio: da 2pA (o inferiore) a 400nA

3) COLONNA IONICA:

- a) Sorgente: Gallium liquid metal
- b) Risoluzione garantita in alto vuoto a temperatura ambiente e in condizioni cryogeniche: $< 2,5\text{nm}$ @ 30 keV @ punto di coincidenza
- c) Range di energia del fascio: 500 eV-30 keV
- d) Massimo campo di vista $\geq 1\text{ mm}$ @ 10 keV
- e) Vita minima della sorgente min. 3000 μAh
- f) Corrente di fascio compresa tra 1 pA e 100 nA
- g) Numero di aperture piezo-motorizzate ≥ 30
- h) Ingrandimento: Minimo 150x Massimo 1.000.000x
- i) Punto di coincidenza SEM-FIB: WD 6 mm (per il SEM) - WD 12 mm (per il FIB)

4) RIVELATORI:

- a) Rivelatore per elettroni E-T (di tipo Everhart Thornley) con monocristallo di scintillazione per elettroni secondari.
- b) Rilevatore per elettroni BSE retrodiffusi ad ampio angolo con altissima sensibilità e risoluzione di numero atomico $< 0.1 Z$, retraibile con motorizzazione.
- c) Rivelatore assiale in asse per la raccolta degli elettroni SE o BSE coassiali al fascio.
- d) Rivelatore per la raccolta in colonna di elettroni a basso angolo ad alta efficienza, con griglia per il filtraggio in energia del segnale. Il rivelatore raccoglie gli elettroni SE e BSE attraverso una selezione angolare o in energia degli stessi.
- e) Telecamere CCD IR per la visualizzazione interna della camera.
- f) Sensore di corrente di campione assorbita e sensore per allarme contatto del campione con colonna o camera SEM
- g) Misura della corrente completamente integrata

5) SISTEMA INTEGRATO PER LA MICROSCOPIA IN FLUORESCENZA E CORRELATIVA con software di gestione sviluppato da DELMIC e perfettamente integrato con la piattaforma del SEM/FIB

Sistema integrato in colonna per la correlativa in fluorescenza, con sorgente a 4 LED a differenti lunghezze d'onda (tipicamente 385 nm, 470 nm, 505nm, 625 nm) così composto:

- a) METEOR for TESCAN Amber cryo: METEOR for TESCAN Amber Cryo chamber, 1X workstation with the license-free Odemis software
- b) LMPLFLN50x/NA0.5/WD10.6: Semi-Apochromat objective 50x/0.5 WD 10.6 mm
- c) Andor Zyla 4.2 water cooler for METEOR: Andor Zyla-4.2P-USB3-2E1 water-cooled sCMOS camera, 2048x2048, 6.5 micron pixel size, up to 82%QU



- d) DAPI/GFP/RFP/Cy5 filter set: DAPI/GFP/RFP/Cy5 filter set to use with Omicron LedHUB w/LED's for DAPI/GFP/RFP/Cy5
- e) Omicron LedHUB w/LED's for DAPI/GFP/RFP/Cy5
- f) Water recirculatory cooler

6) Software per Tomografia 3D, utilizzato per la raccolta automatica e seriale di immagini SEM di sezioni FIB multiple.

- a) Caratteristiche principali:
 - i) Automatizzazione del processo di acquisizione guidato di tipo Step by Step
 - ii) Routine automatiche di preparazione per volumi selezionati
 - iii) Erosione automatica di lamelle di materiale con spessore predefinito
 - iv) Acquisizione automatica di dataset
 - v) Correzione automatica delle derive e degli allineamenti FIB SEM
 - vi) Anteprima immagini acquisite
 - vii) Strategie di scansione avanzate per ottimizzazione immagini

7) Computer di controllo dotati di tutti i monitor e con adeguate schede grafiche

8) Interfaccia utente Windows 10 o superiore

9) Software di correlazione e puntamento delle mappe

10) Software di automazione per la preparazione di lamelle TEM

11) Interfaccia di programmazione delle applicazioni (API) basata su Python che offre il controllo dei sistemi SEM e FIB avanzata per lo scripting

12) Software per preparazione automatizzata dei campioni in condizioni cryogeniche

13) Software che consente la correlazione dei dati LM ed EM, il tiling e lo stitching.

14) Image processor per scansione e modellazione digitale ad alta risoluzione controllato dall'interfaccia utente

15) Water chiller se necessario per il funzionamento dello strumento

16) Compressore

17) UPS

18) Training on-site per almeno 5 utenti della durata minima di una settimana.

DNSH: si precisa che trattandosi di acquisto finanziato nell'ambito del Programma nazionale per la Ricerca (PNR) di cui al DM 737/2021, è assoggettato a quanto previsto dal Regolamento UE n. 241/2021, dal PNRR 2021-2026 (M4C2, investimento 1.1), e dal rispetto di principi e obblighi previsti dall'art 1 comma 6 del DD 2243 del 24-9-21, in particolare della lettera a) - non arrecare un danno significativo agli obiettivi ambientali ai sensi dell'articolo 17 del Regolamento (UE) 2020/852 - DNSH.

3. Strumentazione individuata

A seguito di una prolungata e attenta indagine di mercato, il produttore *TESCAN ORSAY HOLDING, a.s. | Libušina třída 21, 623 00 Brno, Czech Republic, distribuita in Italia ASSING SpA - Via Edoardo Amaldi 14 00015 Monterotondo (Roma)* risulta l'unico soggetto in grado di fornire:

- un sistema integrato cryo SEM/FIB a doppio fascio con sistema di fluorescenza in correlativa integrato, sistema di nanomanipolazione integrato ed interno per



l'ottenimento di lamelle FIB da regioni di campioni cryo, per life science e per scienza dei materiali, utilizzabili per microscopia elettronica e tomografia.

che soddisfi tutte le caratteristiche tecniche minime richieste e descritte nei precedenti elenchi.

Il costo stimato a disposizione dell'amministrazione per l'acquisto del sistema, inclusi trasporto e installazione e training avanzato, è di € 850000,00, oltre IVA come per legge.