

AVVISO DI INDAGINE DI MERCATO

per la fornitura di un sistema a quattro strumenti di microscopia criogenica per la realizzazione di workflow Cryo-ET e SPA

La Fondazione Human Technopole (nel seguito anche “HT”) con sede in Via Cristina Belgioioso snc – 20157, Milano, sta predisponendo l'avvio di una procedura finalizzata alla fornitura di un sistema di microscopia criogenica (di seguito anche “Sistema”) per l’analisi e la ricerca in dettaglio di struttura 3D e funzione delle macromolecole nel loro stato nativo e in soluzione.

Le attuali procedure consolidate per la determinazione della struttura 3D comprendono analisi di singole particelle criogeniche (SPA) a temperatura ambiente e fresatura criogenica di fasci ionici (cryo-FIB), tomografia (Tomo), eventualmente precedute da cryo microscopia a luce correlativa (CLEM).

Il centro di Biologia Strutturale di HT si concentrerà sugli studi cryo-EM di:

1. Complessi molecolari isolati, che saranno congelati e registrati in soluzione (analisi di singole particelle, SPA);
2. Complessi macromolecolari proiettati *in situ* (cioè in una cellula intatta congelata) attraverso un approccio di tomografia crioelettronica (cryo-ET), accoppiando sistemi cryo-FIB e cryo-EM.

Per ottenere le informazioni dal complesso isolato, in soluzione acquosa o *in situ* all'interno del contesto cellulare con cryo-EM, la pipeline deve essere organizzata come segue:

1. Caratterizzazione iniziale mediante colorazione negativa;
2. Screening diagnostico cryo-EM;
3. Raccolta preliminare di dati cryo-EM;
4. Raccolta dati cryo-EM ad alta risoluzione.

Ad oggi, per quanto a conoscenza di HT, la società in grado di fornire il suindicato sistema di microscopia così correlato (workflow), è Thermo Fischer Scientific, per mezzo di FEI Italia srl, che la rappresenta in esclusiva sul territorio Italiano con sede legale in Milano, Piazzale Luigi Cadorna 4, 20123, P.Iva e C.F. 11944100152.

La società è l’unico Operatore Economico presente sul mercato capace di eseguire la fornitura necessaria a consentire il corretto svolgimento dell’attività di ricerca di cui HT necessita, fornendo le seguenti soluzioni hardware e software:

1. Glacios Cryo-EM;
2. Aquilos Cryo-FIB;
3. Talos L120C;

4. Krios G3i Cryo-EM;
5. MAPS software platform.

Tanto sopra rappresentato, con il presente avviso, si intende sondare il mercato al fine di conoscere se, diversamente dalle informazioni in possesso di HT, vi siano altri operatori economici in grado di eseguire la fornitura richiesta secondo le caratteristiche descritte nel prosieguo.

Il presente avviso, pertanto, è da intendersi quale mera indagine finalizzata alla raccolta di manifestazioni di interesse da parti di Operatori Economici che siano in grado eseguire la fornitura avente le specifiche tecniche di seguito meglio individuate. Si precisa che la ricezione delle manifestazioni di interesse non vincola in alcun modo HT e non determina l'insorgere di diritti o interessi legittimi a favore dei soggetti coinvolti.

CARATTERISTICHE DELLA FORNITURA

Premesso quanto sopra, per l'efficiente messa in funzione del workflow, sono richieste seguenti soluzioni hardware e software:

1. Un microscopio a trasmissione provvisto di una sorgente LaB6 a 120kV per effettuare l'analisi delle griglie a temperatura ambiente, notoriamente plastic section e negative staining:
 - il microscopio, deve poter modificare la HT (High Tension) nel range 20kV -120kV;
 - la colonna elettronottica e i suoi accessori sono inclusi in un enclosure (copertura) per garantire la minor contaminazione ambientale, la miglior stabilità termica e meccanica;
 - le aperture del microscopio (obiettivo, condensatore, diffrazione) sono completamente automatiche e motorizzate;
 - la camera con tecnologia CMOS da almeno 16 Mpixels, deve essere compatibile col software di acquisizione dati e con il software correlativo presente negli altri microscopi TEM e nel Cryo-FIB/SEM;
 - flusso di corrente costante tra tutte le lenti del microscopio (constant power objective lens) per minimizzare isteresi delle lenti e deriva del raggio.
2. Un microscopio Cryo FIB-SEM dedicato alla produzione di lamelle di cellule dello spessore di 200-300nm:
 - capacità di garantire temperature criogeniche in tutti gli stadi della produzione della lamella (< -170° C);
 - porta campione criogenico rotante fino a 360° in condizioni criogeniche;
 - capacità di ricoprire la lamella prodotta con Pt-GIS all'interno della camera FIB/SEM;
 - dotazione, all'interno della camera FIB/SEM, di "sputter coater" retrattile capace di ricoprire la lamella con uno strato di platino conduttivo per consentire l'utilizzo del piatto fasico nell'applicazione di tomografia;

- trappola fredda in grado di raggiungere e mantenere una temperatura uguale o inferiore ai -180°C . Strumento anti-contaminazione in grado di raggiungere e mantenere una temperatura di -185°C o inferiore;
 - capacità di trasferire due campioni simultaneamente dalla stazione di preparazione all'interno della camera cryo-FIB/SEM;
 - capacità di raggiungere la temperatura criogenica di utilizzo ottimale (-180°C) in 30 minuti o meno.
3. Un microscopio criogenico provvisto di una sorgente FEG a 200kV per l'analisi preliminare delle griglie:
- caricatore automatico multigriglia (minimo dodici unità) per microscopia elettronica con singola interruzione del vuoto;
 - il microscopio proposto deve essere provvisto di una sorgente Field Emission Gun (FEG) capace di soddisfare le seguenti condizioni: la variazione della corrente emessa deve essere inferiore al 1% al giorno per un periodo di 7 giorni o superiore in assenza di correzioni automatiche o manuali;
 - capacità di scambio del campione all'interno del microscopio, in assenza di contaminazione da ghiaccio;
 - deriva del microscopio pari o inferiore a 0.25 nm/s dopo 30 minuti dall'inserimento del campione; la deriva deve essere pari o inferiore a 0.05 nm/s dopo 60 minuti dallo scambio del campione;
 - flusso di corrente costante tra tutte le lenti del microscopio (constant power objective lens) per minimizzare isteresi delle lenti e deriva del raggio;
 - perdita di trasmissione elettronica dovuta alla crescita di ghiaccio pari o inferiore al 5% giornaliero durante l'uso criogenico;
 - durata della vita media di un campione, in stato di conservazione criogenico all'interno della colonna del microscopio e in assenza di ogni individuabile deterioramento, pari o superiore a 24 ore;
 - il microscopio deve essere dotato di un sistema automatico per maneggiare e manipolare le griglie. In particolare dev'essere possibile estrarre le griglie dal microscopio in perfette condizioni criogeniche e conservare in tale stato indefinitamente per un successivo utilizzo all'interno di un altro componente del Sistema. Le seguenti condizioni devono essere tutte soddisfatte:
 - estrazione del campione dal microscopio dopo la raccolta dei dati e conservazione in un normale dewar per l'azoto liquido, a fronte di un tasso massimo di contaminazione da ghiaccio per i campioni, individuabile come ice-ring nello spettro a trasformata di fourier, pari o inferiore al 25%;

- lo stesso porta-campioni utilizzato nel microscopio a trasmissione può essere impiegato anche nel microscopio FIB/SEM dedicato alla produzione della lamella;
 - lo stesso porta-campioni utilizzato nel microscopio a trasmissione a 200kV può essere impiegato anche nel microscopio ad alta risoluzione a 300kV;
 - il microscopio deve essere provvisto di sistemi per aumentare il contrasto, qualora il campione sia intrinsecamente dotato di basso contrasto. Lo strumento deve essere dotato di un sistema per l'aumento del contrasto del campione nella misura massima del 20% rispetto all'originale.
4. Un microscopio criogenico ad alta risoluzione provvisto di una sorgente FEG a 300kV, per raccogliere dati SPA e Cryo-ET provvisto di un filtro d'energia e un sensore per l'acquisizione diretta degli elettroni (DED):
- caricatore automatico multigriglia (minimo dodici unità) per microscopia elettronica con singola interruzione del vuoto;
 - sorgente Field Emission Gun (FEG) con capacità pari o superiori a 300kV Spot Size < 1 nm e Probe Current ≥ 1.2 nA. La variazione della corrente emessa deve essere pari o inferiore al 1% giornaliero su un periodo minimo di 7 giorni in assenza di correzioni automatiche o manuali;
 - aberrazione sferica e cromatica dello strumento pari a 2.7mm o inferiore;
 - deriva del microscopio pari o inferiore a 0.25 nm/s dopo 30 minuti dall'inserimento del campione; pari o inferiore a 0.035 nm/s dopo 60 minuti dallo scambio del campione;
 - distorsione lineare delle immagini pari o inferiore a 1%;
 - flusso di corrente costante tra tutte le lenti del microscopio (constant power objective lens) per minimizzare isteresi delle lenti e deriva del raggio;
 - perdita di trasmissione elettronica dovuta alla crescita di ghiaccio pari o inferiore al 1% giornaliero durante l'uso criogenico;
 - durata della vita media di un campione, in stato di conservazione criogenico all'interno della colonna del microscopio e in assenza di individuabile deterioramento pari o superiore a 72 ore;
 - sistema automatico per maneggiare e manipolare le griglie. Dev'essere possibile estrarre le griglie dal microscopio in perfette condizioni criogeniche e conservarle in tale stato indefinitamente per un successivo utilizzo all'interno di un altro componente del Sistema. Le condizioni seguenti devono essere tutte soddisfatte:
 - estrazione del campione dal microscopio dopo la raccolta dei dati e conservazione in un normale dewar per l'azoto liquido, a fronte di un tasso massimo di contaminazione da ghiaccio per i campioni, individuabile come ice-ring nello spettro a trasformata di fourier, pari o inferiore al 25%;

- porta-campioni utilizzato nel microscopio a trasmissione compatibile per l'impiego nel microscopio FIB/SEM;
 - il microscopio deve essere equipaggiato, con un sistema comprendente Filtro d'energia e un sensore per l'acquisizione diretta degli elettroni (DED). Tale combinazione, deve essere perfettamente integrata nella piattaforma del workflow richiesta, in termini di hardware e software. La gestione (interfaccia grafica) deve dialogare perfettamente con il Microscopio elettronico;
 - disponibilità di un sistema per la raccolta dati sul microscopio ottenuti in fase di impiego dello strumento e condivisione con il Fornitore.
5. Soluzione software univoca in grado di analizzare, visualizzare e segmentare i tomogrammi ottenuti da ciascuno strumento.

In particolare, il Sistema dovrà garantire:

1. Acquisizioni dati a elevato throughput

L'acquisizione dati a elevato throughput è una caratteristica fondamentale per l'installazione dell'infrastruttura di cryo-EM. Ciò include la semplificazione dei flussi di lavoro, l'integrazione del software tra diversi strumenti cryo-EM/FIB e una riduzione dei costi operativi senza compromettere la qualità dei dati.

Specifiche per supportare l'automazione:

- a. sistema automatico di caricamento del campione criogenico che permetta l'inserimento e la conservazione di più campioni contemporaneamente all'interno del microscopio (una caratteristica fondamentale quando il microscopio è utilizzato da diversi Utenti);
- b. trasferimento semplificato e rapido dei campioni da un microscopio all'altro all'interno del flusso di lavoro senza manipolazione dei campioni, prevenendo la contaminazione di questi ultimi durante il processo;
- c. specifici supporti per il campione sono richiesti per la preparazione e il trasferimento delle lamelle dal Sistema cryo-FIB SEM (passaggio rilevante); i supporti devono essere compatibili con tutti i sistemi cryo-EM del workflow e con l'autoloader;
- d. per migliorare la qualità dei dati e consentire la loro acquisizione automatica e su larga scala, un sistema di acquisizione immagini stabile è fondamentale. Inoltre, l'aumentata stabilità contribuisce a ridurre il numero di allineamenti complessi che l'utente deve realizzare, fondamentale per sostenere elevate produttività in un ambiente multi utente;
- e. sensori per l'acquisizione diretta degli elettroni e filtro di energia sono componenti fondamentali della strumentazione per tomografia crioelettronica all'avanguardia. La rilevazione diretta degli elettroni consente di acquisire immagini con una dose

ridotta di elettroni (riducendo il deperimento del campione durante l'acquisizione), oltre a un'elevata velocità di acquisizione. A dosi e velocità costanti, c'è un significativo miglioramento nel *"signal-to-noise ratio"*, rendendo possibile trovare il compromesso ottimale tra tutti gli aspetti già menzionati.

2. Sistema software

La soluzione software deve essere compatibile con tutti gli strumenti del workflow e permettere l'allineamento automatico di ciascun microscopio. L'utente può facilmente passare da una piattaforma all'altra (cryo-FIB e sistemi cryo-EM), e deve poter riconoscere files provenienti da altri microscopi ottici, prima di passare ai sistemi EM.

Gli operatori economici che non sono in grado di fornire specificatamente i prodotti sopra indicati possono proporre prodotti equivalenti, fermo restando che dovrà essere onere dei medesimi fornire alla scrivente informazioni utili ad accertare detta equivalenza.

MODALITA' DI PRESENTAZIONE DELLA MANIFESTAZIONE DI INTERESSE

La manifestazione di interesse dovrà essere presentata utilizzando la piattaforma digitale "Gare Telematiche" messa a disposizione da HT sul proprio profilo del committente www.htechnopole.it, accedendo alla sezione eTenders/Bandi.

Per l'utilizzo della Piattaforma digitale, si precisa fin d'ora che sono richieste:

- la previa registrazione alla piattaforma per la gestione degli albi informatizzati e delle gare telematiche;
- il possesso e l'utilizzo della firma digitale di cui all'art. 1, comma 1, lett. s) del D.Lgs. 82/2005;
- la seguente dotazione tecnica minima: un personal computer collegato ad internet e dotato di un browser Microsoft Internet Explorer, Mozilla Firefox, Google Chrome, Opera, Safari e un programma software per la conversione in formato .pdf dei file che compongono l'offerta.

La manifestazione di interesse dovrà essere compilata possibilmente in conformità al **facsimile manifestazione di interesse** e, comunque, dovrà fornire tutte le dichiarazioni/attestazioni contenute nel medesimo facsimile, che s'intendono qui trascritte. La manifestazione di interesse resa quale dichiarazione sostitutiva ai sensi del D.P.R. 445/2000 e s.m.i., dovrà essere sottoscritta digitalmente dal legale rappresentante o procuratore dell'operatore economico e, nel caso di procuratore, da copia autentica della procura ai sensi degli artt. 18 e 19 del D.P.R. 445/2000 e s.m.i.

La manifestazione di interesse dovrà essere trasmessa a HT entro il giorno entro le **ore: 10:00** del giorno **27 Giugno 2019**.

Tale termine è fissato a pena di irricevibilità. Le candidature che, per qualunque motivo, non perverranno entro la data suindicata non saranno prese in considerazione.

NOTE INFORMATIVE

Il trattamento dei dati inviati dai soggetti interessati si svolgerà conformemente alle disposizioni contenute nel Regolamento UE 2016/679 per finalità unicamente connesse alla procedura di affidamento della fornitura.

Per ogni ulteriore dettaglio si rimanda all'allegata "Informativa per il trattamento dei dati personali per i fornitori".

Richieste di chiarimento possono essere inoltrate tramite la Piattaforma, nell'area messaggistica on line presente nella sezione dedicata al presente avviso.

Il Responsabile del Procedimento
Prof. Iain Mattaj

Allegati:

1. Fac simile manifestazione di interesse
2. Informativa per il trattamento dei dati personali per i fornitori