



Piattaforma imaging, microscopia confocale, citofluorimetria e cell sorting

Responsabili scientifici

Prof. Claudio Brancolini

Dott. Antonio Paolo Beltrami

Personale tecnico/assegnisti

Dott.ssa Francesca D'Este (supervisore confocale Leica SP8)

La programmazione nell'utilizzo degli strumenti deve rispettare e consentire la fruibilità al maggior numero di soggetti interessati, compatibilmente con lo svolgimento di ciascuna attività prevista.

L'autorizzazione all'accesso alla piattaforma è subordinato al rispetto delle norme sottoindicate, incluse quelle in materia di sicurezza. Gli utenti **hanno l'obbligo di osservare strettamente le procedure di sicurezza specifiche** definite dalla Referente per la sicurezza del DAME, la tecnica Silvia Lolini.

Al cospetto di inadempienze da parte dei soggetti utilizzatori nell'ottemperare alle regole sopraindicate sarà interdetto l'accesso alle strumentazioni della piattaforma e l'imputazione delle spese della cattiva gestione.

ELENCO STRUMENTI E RISPETTIVE CARATTERISTICHE/POTENZIALITÀ

- FACSAria II, Becton Dickinson (Centro Servizi Laboratori ASUIUD)
- FACSCalibur, Becton Dickinson (DAME – Kolbe)
- Nanosight LM10, Malvern Panalytical (Centro Servizi Laboratori ASUIUD)
- Microscopio per epifluorescenza Leica AF6000 con stazione per l'analisi in vivo in condizioni di umidità, temperatura e CO2 controllate (DAME – Kolbe)
- Stazione confocale Leica TCS SP8X ad elevata risoluzione ed associato nanoscopio STED attrezzato anche per l'analisi in vivo in condizioni di umidità, temperatura, O₂ e CO₂ controllate (DAME – Kolbe), stazione così costituita:
 - Microscopio rovesciato motorizzato dotato di obiettivi: semi-apocromatici 10x/0.3 a secco e 25x/0.95 ad acqua; plan-apocromatici 40x/1.1 ad acqua, 63x/1.4 ad olio (in prestito dall'Anatomia Patologica) e 100x/1.4 ad olio. Accessori per contrasto interferenziale su obiettivi 25x, 40x, 63x. Movimento fine asse



- z galvanometrico. Filtri long-pass DAPI, FITC, Rodamina per osservazione ad oculare. Insetto portacampione per vetrini e chambered coverglass; inserto universale adatto anche a petri da 35 e 60 mm.
- Laser 405 nm, laser multilinea Argon (458, 476, 488, 496, 514 nm), laser pulsato a luce bianca e dispositivo AOBS che consentono la selezione di ogni lunghezza di eccitazione compresa tra 470 e 670 nm (selezionabili fino a 8 linee simultaneamente).
 - Testa di scansione multiband dotata di 5 detector spettrali per fluorescenza: 3 fotomoltiplicatori e 2 detector HyD ad alta efficienza operabili anche in modalità photon count e light-gate (in associazione con laser bianco, limitando la rilevazione ad una determinata finestra temporale consente di eliminare segnali dovuti ad autofluorescenza o riflessione); 1 fotomoltiplicatore per luce trasmessa.
 - Sistema di messa a fuoco automatica software (autofocus) e sistema di mantenimento del piano focale basato su dispositivo hardware (Adaptive Focus Control).
 - Microdispensatore d'acqua per il refill automatico dell'acqua sugli obiettivi 25x e 40x nel corso di esperimenti di live imaging a 37°C.
 - Moduli software per l'esecuzione di esperimenti FRAP, FRET, time-lapse con controllo del microdispensatore d'acqua. Modulo Navigator per ottenere anteprime dell'intero campione in live. Funzione analisi spettrale fluorescenza (Lambda e Lambda quadro scan) con delta fino a 10 nm. Funzioni per scansioni multiposizione e a mosaico.
 - Modulo di super-risoluzione Hyvolution (risoluzione laterale 140 nm, applicabile a qualsiasi fluoroforo).
 - Modulo per nanoscopia STED 2D (xy) con laser di deplezione continuo a 660 nm, che consente una risoluzione laterale di 40 nm su fluorofori con emissione nella regione dell'arancio-rosso.
 - Sistema di incubazione termostato con sistema di controllo della CO₂ (intervallo 0-20%) e dell'O₂ (intervallo 1-95%) per esperimenti di live imaging, dotato di inserti portacampione per petri da 35 mm e chambered coverglass (tipologia standard e Labtek-II). Adattatore per iniezione/perfusione per petri da 35 mm modello Will-Co, utilizzabile con siringhe o sistemi di fluidica (non in dotazione al sistema).
 - Moduli software per elaborazione/analisi delle immagini, colocalizzazione, ricostruzione 3D. Software di deconvoluzione Huygens Essential.
 - Ulteriore postazione PC per elaborazioni post-osservazione.

Potenzialità citofluorimetria (strumenti: FACSAria II, Becton Dickinson, FACSCalibur, Becton Dickinson, Nanosight LM10, Malvern Panalytical).

La piattaforma offre la possibilità, tramite l'utilizzo delle tecnologie e strumentazioni disponibili di:

- caratterizzare l'immunofenotipo, effettuare test di vitalità, saggiare la frequenza di cellule apoptotiche, avere una valutazione semiquantitativa della lunghezza dei telomeri, valutare la ploidia di una popolazione cellulare, valutare le caratteristiche dimensionali ed immunofenotipiche di vescicole extracellulari (microvescicole ed esosomi), ovvero di quantificare saggi cellulari basati sulla fluorescenza
- separare contemporaneamente fino a 4 popolazioni di cellule omogenee rispetto a parametri analizzati in citofluorimetria (flow-sorting o FACS) e C) seminare, su piastre multipozzetto, fino ad una cellula per pozzetto (single-cell sorting), identificata sulla base di caratteristiche ben definite, ed analizzate come in A).



Potenzialità microscopia (strumenti: microscopio Leica AF6000 e stazione confocale Leica TCS SP8X STED ONE). Analisi cellulari e tissutali in fluorescenza, analisi in vivo e su fissato. Analisi in vivo in contrasto di fase. Immagini in microscopia confocale ad elevata risoluzione ed in nanoscopia. Risoluzione massima laterale raggiungibile 40 nm su X/Y.

Personale dedicato alla piattaforma: Assegnista dott.ssa Francesca D'Este

Viene garantito per il Confocale Leica SP8 da parte della dott.ssa D'Este:

Training sull'utilizzo dello strumento, supervisione e assistenza durante l'acquisizione, supporto nella messa a punto ed ottimizzazione delle condizioni di imaging, eventualmente acquisizione di immagini in presenza dei responsabili dell'esperimento per l'osservazione e la scelta dei campi, supporto nella progettazione degli esperimenti e nell'analisi dei risultati, pulizia/manutenzione/aggiornamento dello strumento.

CITOFUORIMETRIA

La richiesta di accesso ai servizi di citofluorimetria della piattaforma dovrà essere presentata tramite apposita e-mail indirizzata al personale dedicato alla strumentazione (prof. Antonio Beltrami (antonio.beltrami@uniud.it)).

Nella domanda dovranno essere indicati i servizi richiesti e i nominativi del personale per i quali si richiede l'utilizzo della strumentazione. Per consentire l'accesso agli strumenti al numero massimo di gruppi interessati, si caldeggia la prenotazione per non più di 2 giorni/settimana per gruppo. Nel caso di esigenze sperimentali particolari, tale regola può essere modificata, previa discussione con i responsabili della piattaforma.

L'accesso ai servizi di citofluorimetria della piattaforma sarà consentito solamente dopo autorizzazione da parte del responsabile e l'utilizzo delle attrezzature sarà comunque consentito solo sotto supervisione del personale dedicato o previa verifica dei requisiti tecnici dei soggetti richiedenti.

Nel caso in cui il responsabile della piattaforma garantisca il nulla osta a lavorare in autonomia sul FACSAria II, l'utilizzatore si impegnerà a rispettare le norme di utilizzo che verranno fornite.



Per quanto riguarda il FACSCalibur, si ricorda che gli utilizzatori che riceveranno il nulla osta a lavorare in autonomia da parte dei responsabili sono tenuti a rispettare le seguenti indicazioni:

1. cellule molto grandi che tendono ad aggregarsi (cellule in adesione) vanno filtrate subito prima di essere analizzate.
2. va prestata particolare attenzione alle analisi del ciclo cellulare fatte con PI. Le cellule trattate tendono a lisarsi ed aggregarsi, sembrano cellule in replicazione se si ha la fortuna che transitino, ma in verità è solo un falso aggregato. Le cellule vanno filtrate.
3. non andranno acquisiti più di 600 eventi/secondo
4. alla fine di ogni utilizzo dovranno essere fatti i lavaggi appropriati:
 - candeggina (1:4) : 2 ml a carrello aperto, più 5 minuti a carrello chiuso (velocità alta)
 - acqua: 2 ml a carrello aperto, più 5 minuti a carrello chiuso (velocità alta)
5. se non vi sono prenotazioni successive (oppure è venerdì) il FACS va messo in acqua, il che non vuol dire solamente mettere acqua nella tanica, ma fare passare anche acqua nel sistema. Il cambio va fatto quindi prima del lavaggio in acqua bypassando il filtro.
6. Se sono state analizzate cellule provenienti da colture in adesione o si è analizzato il ciclo cellulare con PI, deve essere fatta una pulizia approfondita utilizzando il FACSclean e quindi l'acqua.
7. Nello specifico va sostituita la tanica del FACSflow con la tanica di FACSclean (ovviamente bypassando il filtro) e deve essere fatto andare lo strumento per 40 min – 1h. Successivamente deve essere nuovamente sostituita la tanica con quella contenente H₂O oppure FACSflow (riconnettendo il filtro se c'è FACSflow) e lo strumento deve andare in RUN per una quindicina di minuti in modo da eliminare i residui di FACSclean dalla fluidica (per evitare corrosioni).
8. il condizionatore deve stare sempre acceso e la stanza deve essere mantenuta a 18°-19° C.

Il responsabile dei servizi di citofluorimetria della piattaforma, sulla base della disponibilità delle attrezzature e tenuto conto dell'ordine cronologico delle richieste pervenute ed eventuali/relative priorità, provvederà a comunicare al richiedente i tempi e i modi di utilizzo dei servizi.

I servizi di citofluorimetria della piattaforma sono disponibili per attività di ricerca rivolte a soggetti terzi, quali aziende il 30% del suo utilizzo complessivo.

L'utilizzo delle strumentazioni da parte di soggetti terzi è subordinato ad un addebito di costi d'uso (spese di manutenzione ordinaria ed extra-ordinaria, materiale consumabile, aggiornamento degli strumenti, smaltimento rifiuti speciali, costo orario del personale dedicato alla piattaforma), stabiliti da apposito tariffario, salvo accordi specifici preesistenti.

L'accesso alle strumentazioni (ad eccezione di consumabili, quali anticorpi, plastiche, liquidi di scorrimento e di pulizia degli strumenti) della piattaforma è invece esente da addebiti di costi d'uso per tutti gli afferenti al DAME che ne vorranno fare uso a scopo di Ricerca senza fini di lucro.



MICROSCOPIA

L'utilizzo del microscopio confocale o delle stazioni di microscopia è consentito esclusivamente nell'ambito delle seguenti attività:

- ✓ ricerca
- ✓ didattica

Utilizzo di particolari microrganismi: non saranno poste limitazioni al tipo di organismi e/o materiale osservati, qualunque sia l'origine e la natura. Ove necessario saranno a carico del soggetto interessato l'attivazione delle procedure e gli oneri relativi ad ottenere le necessarie autorizzazioni ministeriali.

La programmazione nell'utilizzo degli strumenti di microscopia deve rispettare e consentire la fruibilità al maggior numero di soggetti interessati, compatibilmente con lo svolgimento di ciascuna attività prevista.

La richiesta di accesso al microscopio confocale dovrà essere presentata tramite richiesta email indirizzata a francesca.deste@uniud.it

Nella domanda dovranno essere indicati i servizi richiesti e i nominativi del personale per i quali si richiede l'utilizzo della strumentazione.

L'accesso alle due stazioni di microscopia sarà consentito solamente dopo autorizzazione da parte di uno dei responsabili e l'utilizzo delle attrezzature sarà comunque consentito solo sotto supervisione del personale dedicato o previa verifica dei requisiti tecnici dei soggetti richiedenti.

- Confocale Leica SP8: l'utilizzo diretto dello strumento è consentito, previa autorizzazione ed eventuale training, al personale strutturato e ad un solo non-strutturato (preferibilmente Post-Doc) per gruppo, che quindi dovrà farsi carico anche delle analisi dei preparati di altri collaboratori del gruppo di ricerca. L'utilizzo da parte dei dottorandi è consentito solo nei casi in cui nel gruppo di ricerca non siano presenti Post-Doc, e comunque in presenza di personale strutturato autorizzato o del personale dedicato alla supervisione dello strumento. L'utilizzo non è consentito agli studenti. Studenti ed altro personale possono



assistere agli esperimenti, in presenza di personale autorizzato e compatibilmente con lo spazio a disposizione e le esigenze di sicurezza dello strumento. Un elenco aggiornato del personale autorizzato all'utilizzo autonomo e all'utilizzo con supervisione verrà esposto sulla porta del laboratorio. Nel caso di un utilizzo troppo saltuario per garantire dimestichezza sufficiente ad operare con sicurezza sul sistema, gli utenti potranno essere autorizzati solo all'utilizzo con supervisione. Oltre all'utilizzo diretto dello strumento, è possibile richiedere l'acquisizione di immagini da parte del personale dedicato partecipando all'osservazione e alla scelta dei campi.

Il responsabile del microscopio confocale, sulla base della disponibilità delle attrezzature e tenuto conto dell'ordine cronologico delle richieste pervenute, provvederà a comunicare al richiedente i tempi e i modi di utilizzo dei servizi.

Per le prenotazioni verranno considerate le seguenti norme/priorità:

➤ Confocale Leica SP8:

- la prenotazione degli slot temporali è aperta agli utenti del DAME e del DI4A con uguale priorità.
- Possono essere prenotati slot temporali fino a 4 h, a meno di esigenze sperimentali particolari da discutere con i responsabili della piattaforma. Per permettere l'accesso al numero massimo di gruppi interessati, le prenotazioni anticipate vanno limitate a 2 per gruppo a settimana. L'utilizzo può essere esteso qualora in corso di settimana rimangano slot liberi, lasciando comunque priorità ad altri utenti.
- esperimenti che prevedano un utilizzo continuo dello strumento (time-lapse): se brevi possono essere programmati in settimana (3 ore di durata); entro le 16 ore possono essere organizzati come overnight; per tempi più lunghi vanno programmati nei fine settimana alternandosi con gli altri utenti che richiedano questo tipo di utilizzo. L'utilizzo per tempi lunghi (max 24 ore) durante la settimana può essere autorizzato solo nel caso in cui al momento di inizio dell'esperimento non vi siano richieste di utilizzo per la giornata interessata.

La stazione di microscopia confocale è disponibile per attività di ricerca rivolte a soggetti terzi, quali altri Dipartimenti di UniUD altri atenei, enti di ricerca o altre aziende sia pubbliche che private



compatibilmente con gli impegni per i ricercatori dei due Dipartimenti (DAME, DI4A) a cui la stazione di microscopia confocale afferisce.

L'utilizzo del microscopio confocale da parte di soggetti terzi è subordinato alla supervisione della dott.ssa D'Este ed ad addebiti di costi d'uso per 150€/ora. Nel caso in cui sia necessario il training formativo il costo sarà di 100€/ora.

L'accesso al confocale Leica SP8 è subordinato al rispetto delle seguenti norme:

- Al fine di non compromettere il funzionamento dello nanoscopio non è consentito spegnere il climatizzatore della stanza o modificarne le impostazioni, nemmeno a strumento spento. La porta della stanza va mantenuta chiusa.
- Non vanno portati cellulari e smartwatch in prossimità dello strumento.
- L'accesso degli utenti al PC del confocale e a quello dell'analisi è organizzato con diversi account con password, in base al settore scientifico-disciplinare di appartenenza. Nel caso di nuovi utenti che nell'arco di 6 mesi dimostrino un utilizzo consistente dello strumento potrà essere creato un nuovo account dedicato, qualora non ve ne sia uno già presente per il medesimo SSD. Per utilizzi saltuari è disponibile un account generico.
- Il backup e la conservazione dei dati sono sotto la responsabilità dei singoli utenti, che dovranno scaricare i propri file alla fine di ogni sessione di lavoro. Per un utilizzo razionale dello spazio su disco i dati vanno salvati sul disco E e non lasciati sul desktop. Eventuali cartelle sul desktop dedicate ai trasferimenti vanno svuotate di volta in volta. Ai fini di un funzionamento ottimale della macchina verrà periodicamente richiesta agli utenti, previo avviso con congruo anticipo, la cancellazione dei file obsoleti per liberare spazio su disco.
- Non è consentito collegarsi al PC del confocale o a quello dedicato all'analisi con chiavette USB o altri dispositivi di archiviazione. Il trasferimento dei dati può essere effettuato dalla postazione PC dedicata all'analisi, tramite rete di ateneo o servizi di condivisione/trasferimento file (es Dropbox, WeTransfer).
- Al termine di ogni sessione gli utenti devono concordare con il personale dedicato alla supervisione le modalità in cui lasciare lo strumento (spegnimento completo, stand-by laser, etc). In assenza del supervisore è responsabilità degli utilizzatori accertarsi di eventuali prenotazioni successive nella stessa giornata ed accordarsi direttamente con l'utente successivo. Per periodi di inutilizzo superiori alle 2 ore lo strumento va spento completamente.
- Eventuali problemi o anomalie nel funzionamento vanno tempestivamente segnalati al supervisore o al responsabile della piattaforma.
- E' richiesta agli utilizzatori una corretta pulizia post-utilizzo della postazione (stage, obiettivi utilizzando la carta per lenti dedicata, tavolo). Si raccomanda di avvisare quando olio e carta per lenti siano in esaurimento.
- Le spese per l'acquisto dell'olio di immersione e della carta per la pulizia delle lenti verranno ripartite tra i principali utilizzatori. L'acquisto di altri consumabili (es. reagenti e materiali per la preparazione dei campioni, petri o camerette multipozzetto per analisi in vivo, siringhe/tubicini/raccordi per iniezione/perfusione) è a carico dei singoli utenti.

Gli utilizzatori del microscopio Leica AF6000 sono tenuti a rispettare le indicazioni riportate nei documenti presenti sulla postazione, ad accordarsi con gli utenti successivi e a provvedere alla pulizia post-utilizzo.