

激光显微切割植物细胞的研究新趋势

张栋, 唐威华*

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032

Trends in Laser Microdissection of Plant Cells

ZHANG Dong, TANG Wei-Hua*

Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

摘要: 2006年以来, 激光显微切割技术(LM)逐渐发展成为植物及植物-微生物互作领域的常用技术。从激光技术方面, 激光捕获显微切割(LCM)和激光显微切割及压力弹射(LMPC)成为两大主流技术。在材料准备方面, 改良的石蜡包埋切片技术在植物成熟组织切割中应用日益广泛, 而冰冻包埋切片则在幼嫩组织切割中十分有效。激光显微切割所得样品主要仍用于RNA水平的基因表达分析, 而且能从全基因组规模上深度分析基因表达谱。此外, 对激光显微切割所得细胞进行小分子代谢物的分析也取得了实质性成果。总之, 激光显微切割技术作为从复杂背景中直接分离特定细胞(群)的一种有效工具, 在植物分子生物学研究中的应用已经成熟, 正为提高植物研究的精准度做出贡献。

关键词: 激光捕获显微切割; 激光显微切割及压力弹射; 样品准备; 固定剂

激光显微切割(laser microdissection, LM 或 LMD)是显微观察和分子生物学研究之间的桥梁。它将在显微镜下观察到的目标细胞直接用激光取出, 从而与旁邻的其他细胞分开, 并且可以将目标细胞放入试管中进行分子生物学的分析研究。

利用激光分离细胞的研究开始得较早(例如 Berns 等 1981), 但是直到 1996 年基于近红外激光熔膜原理的激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)成功应用于动物细胞的切割和 DNA、RNA 分析(Emmert-Buck 等 1996)后, 这一技术才在生物研究中迅速发展并被广泛应用。而在植物研究中的成功应用, 则又滞后了 6 年(Asano 等 2002; Nakazono 等 2003)。2003~2005 年间, 激光显微切割技术在植物研究中的应用逐渐发展, 越来越受重视(聂玉哲等 2006; 蔡民华等 2006; Nelson 等 2006)。本文结合本研究组的实际经验, 针对自 2006 年以来激光显微切割在植物研究中应用的新趋势进行介绍。

1 激光捕获显微切割和激光显微切割及压力弹射(laser microdissection and pressure catapulting, LMPC)两大主流技术

从激光类型和技术原理上分, 目前主要存在基于近红外激光(810 nm 波长)的激光捕获显微切割(以 Arcturus PixCell 系列为代表)和基于紫外激光

(337~355 nm 波长)的激光显微切割及压力弹射(以 Zeiss PALM 和 Leica LMD 系列为代表)两种。两种技术各有优缺点(表 1), 以往由于激光捕获显微切割的近红外激光具有对 DNA、RNA 分子基本无损伤、收集稳定等优点, 被大多数实验室采用(Nakazono 等 2003)。近年来, 紫外激光对 DNA、RNA 损伤的顾虑通过实践被逐渐消除, 例如 Tang 等(2006)研究中显示采用 PALM 公司激光显微切割及压力弹射得到 RNA 样品仍具有良好的完整度。而且紫外激光的精准度高、切割速度快等优点逐渐显示出来, 因此采用激光显微切割及压力弹射的实验室逐渐增多。目前, 两种技术均有多个成功应用于植物研究的报道(表 1)。Arcturus 公司近年还推出了同时采用紫外激光切割和近红外激光捕获的新机型 Veritas, 它不仅保留了 PixCell 系列激光捕获显微切割的优点, 还克服了原有的切割速度慢的缺点。例如, 本研究组就用 Arcturus Veritas 成功分离小麦胚芽鞘的单个细胞(图 1)。预计将来这两种技术仍是激光显微切割用于植物研究领域的两大主流技术。

收稿 2007-08-20

资助 国家“973”计划(2006CB101901)。

* 通讯作者(E-mail: whtang@sippe.ac.cn; Tel: 021-54924072)。

表1 激光显微切割系统技术比较

技术体系	代表机型	激光类型(波长)	对RNA完整度的影响	分离、收集细胞方式	目标细胞收集率	旁邻细胞污染度
激光显微切割及压力弹射	Zeiss PALM	紫外激光(337~340 nm)	基本无损伤	紫外激光切割及紫外激光弹射(向上)	中等	轻度
	Leica LMD	紫外激光(355 nm)	基本无损伤	紫外激光切割及重力+紫外激光弹射(向下)	中等	中度
激光捕获显微切割	Arcturus PixCell	近红外激光(810 nm)	无损伤	近红外激光熔膜粘附捕获	高	中度
	Arcturus Veritas	近红外激光(810 nm)、紫外激光(349 nm)	基本无损伤	紫外激光切割、近红外激光熔膜粘附捕获	高	轻度

技术体系	代表机型	分离精度*		细胞分离收集速度	对制片要求	植物研究应用论文数**		显微镜装置	是否适用于活细胞分离
		40× 物镜	100× 物镜			RNA	代谢物		
激光显微切割及压力弹射	Zeiss PALM	1 μm (紫外)	1 μm (紫外)	快	一般	8	3	倒置	是
	Leica LMD	2 μm (紫外)	1 μm (紫外)	快	一般	3	2	正置	是
激光捕获	Arcturus PixCell	5 μm (红外)	5 μm (红外)	慢	很高	8	0	倒置	不了解
显微切割	Arcturus Veritas	5 μm (红外)、	5 μm (红外)、	快	很高	新型号尚 未有报道	新型号尚 未有报道	倒置	不了解
		1 μm (紫外)	1 μm (紫外)						

*以激光最小直径来衡量,光径越小,精度越高。**截至2007年6月的不完全统计(Pubmed),植物及植物-微生物互作领域采用激光显微切割发表研究论文总数30篇,其中用于RNA分析21篇,用于代谢物分析5篇。

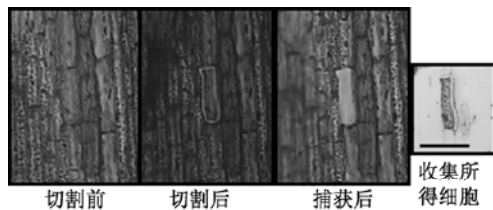


图1 激光显微切割单个的小麦胚芽鞘表皮细胞

样品经丙酮固定、石蜡包埋和切片后,采用 Arcturus Veritas 进行激光捕获显微切割。具体样品准备方法见文献(Tang 等 2006)。Scale bar=50 μm。

2 样品准备趋于标准化

样品准备包括固定、包埋、切片等步骤,激光显微切割对样品准备有特殊的要求,既要保持其细胞学形态,又要保证其中的RNA等生物分子的完整度。样品准备一度曾是阻碍激光显微切割在植物研究中推广应用的瓶颈。通过各实验室的技术改良与经验,以丙酮或乙醇:乙酸(3:1)混合液等沉淀型固定剂的石蜡包埋、切片技术已经成为标准化方法(例如 Kerk 等 2003; Balestrini 等 2007),普遍适用于各类植物、各种组织,尤其是成熟组织细胞的制片。而对于幼嫩的植物组织,如胚等,冰冻切片仍是十分有效的(Spencer 等 2007)。几个小的技术改进使石蜡制片成功地广泛应用于植

物研究,首先采用微波辅助缩短了制片时间,显著提高了RNA的完整度(Inada和 Wildermuth 2005);其次石蜡切片转移系统应用于乙醇固定的样品避免了复水带来的RNA降解的问题(Cai和 Lashbrook 2006);另外,真空渗透提高了固定效率(参见 <http://maize-meristems.plantgenomics.iastate.edu/resources/protocols/> 网页中 Paraffin Sectioning for LCM)。最后值得一提的是,丙酮固定材料在一定程度上保持荧光蛋白的荧光活力,为辨别切割目标提供了便利(Tang 等 2006)。

由于石蜡切片的技术含量要求比冰冻切片低,而且切片机器也比较廉价,同时石蜡切片对细胞组织形态的保存度较高,便于识别,所以用石蜡制片进行激光显微切割的样品准备已成为一项常规操作。

3 激光显微切割得到的植物细胞可以用于RNA、DNA和代谢物分析

2006年以来,激光显微切割在植物研究中的应用明显增加,主要仍以供RNA分析为主。用定量RT-PCR等方法检测激光显微切割得到的细胞中个别基因的表达已经成为原位杂交方法的一个替代选项或补充(Raab 等 2006; Wu 等 2006; Jiang

等 2006 ; Corpas 等 2006 ; Henderson 等 2006 ; Yu 等 2007 ; Ohkama-Ohtsu 等 2007 ; Balestrini 等 2007)。例如, Raab 等(2006)在报道草莓芳香分子合成途径中关键酶之一FaQR是一个烯酮氧化还原酶一文中,采用激光显微切割证实了FaQR基因在草莓果实皮质细胞中表达。对于激光显微切割得到的细胞进行全基因组规模的表达谱分析目前也有了更多的成功报道(Cai 和 Lashbrook 2006 ; Tang 等 2006 ; Spencer 等 2007 ; Zhang 等 2007 ; Ithal 等 2007)。Zhang 等(2007)报道将激光显微切割与芯片分析结合使用,比较了野生型玉米和 Narrow Sheath 突变型的茎尖分生组织和叶原基中的表达谱,并确定出了为数不多的几个基因的表达存在差异,从而揭示出 Wox 类基因和部分专一的激素信号途径可能决定了玉米早期叶的发育。Singh 和 Bhalla (2006)还指出,植物干细胞发育研究常常受困于无法了解某一两个关键细胞中的特异性事件,激光显微切割技术的应用可以直接取到这些关键的干细胞,将大大促进植物干细胞的研究向深度和广度发展。

对于用激光显微切割所得的少量细胞,能够进行芯片分析得益于微量 RNA 抽提和高保真的 RNA 扩增两项技术。目前最常用的 PicoPure 试剂盒抽提激光显微切割所得微量细胞的 RNA 效果较好,而 Epicentre 的 RNA 线性扩增试剂盒能够将低于 1 ng 的总 RNA 作为起始材料特异性扩增 100 万倍,足以进行芯片分析,而且其保真度达到约 80% (Tang 等 2006)。对于用交联型固定剂(如福尔马林等)准备的样品,以往由于其在保持 RNA 完整度方面表现极差而无法用于 RNA 分析。Arcturus 公司新推出的 ParadiseTM RNA 抽提试剂盒可以显著提高从该类样品中抽提出的 RNA 的完整度,在动物研究中已有成功应用(Ma 等 2004),预期可能也适用于植物材料。

对于没有全基因组序列信息的植物对象,无法进行全基因组芯片分析,但是也能用 454 测序进行表达谱分析(Emrich 等 2007)。

由于 DNA 分子比 RNA 分子稳定性好,用于 DNA 分析的激光显微切割的样品准备比较容易。已有多个报道成功应用激光显微切割分离植物染色体(Liu 等 2004 ; Hobza 和 Vyskot 2007)。例如,

Liu 等(2004)采用激光显微切割技术分离到水稻第 4 号染色体(单条),然后通过加接头的 PCR 扩增构建成第 4 号染色体专一性基因组文库。新近 Zeiss PALM 等发展出的光镊(MicroTweezer)系统,将可能更适用于染色体或其他亚细胞结构、乃至活细胞分离。

更为可喜的是,对于用激光显微切割所得到的细胞进行代谢物分析也有了多个成功的报道(Kajiyama 等 2006 ; Li 等 2007 ; Holscher 和 Schneider 2007 ; Angeles 等 2006)。例如, Li 等(2007)对激光显微切割得到的挪威云杉(Norway spruce)树皮中的石细胞,采用核磁共振(NMR)和质谱(MS)分析揭示其代谢物中富含 2 种酚类化合物,可能与抗虫机制相关。目前用于代谢物分析的激光显微切割的样品准备均采用不经固定直接冷冻包埋制冰冻切片的方法,以避免由固定剂可能导致的化学污染。虽然目前用于 RNA 分析和代谢物分析的激光显微切割的样品准备方法有所不同,但是我们预期随着进一步的技术改进,将来可能达到对激光显微切割得到的同一样品可以分别进行 RNA 和代谢物分析的目标。

总之,近年来激光显微切割技术的样品准备趋于标准化,显微切割操作自动化,使这一技术正成为植物研究者的常用工具。

参考文献

- 蔡民华, 胡英考, 李雅轩, 晏月明(2006). 激光捕获显微切割技术在植物基因组研究中的应用. 遗传, 28: 1325~1329
- 聂玉哲, 张晓磊, 李玉花(2006). 激光捕获显微切割技术及其在植物研究中的应用. 植物生理学通讯, 42: 695~699
- Angeles G, Berrio-Sierra J, Joseleau JP, Lorimier P, Lefebvre A, Ruel K (2006). Preparative laser capture microdissection and single-pot cell wall material preparation: a novel method for tissue-specific analysis. Planta, 224: 228~232
- Asano T, Masumura T, Kusano H, Kikuchi S, Kurita A, Shimada H, Kadowaki K (2002). Construction of a specialized cDNA library from plant cells isolated by laser capture microdissection: toward comprehensive analysis of the genes expressed in the rice phloem. Plant J, 32: 401~408
- Balestrini R, Gómez-Ariza J, Lanfranco L, Bonfante P (2007). Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. Mol Plant Microbe Interact, 20: 1055~1062
- Berns MW, Aist J, Edwards J, Strahs K, Girton J, McNeill P, Rattner JB, Kitzes M, Hammer-Wilson M, Liaw LH et al (1981). Laser

- microsurgery in cell and developmental biology. *Science*, 213: 505~513
- Cai S, Lashbrook CC (2006). Laser capture microdissection of plant cells from tape-transferred paraffin sections promotes recovery of structurally intact RNA for global gene profiling. *Plant J*, 48: 628~637
- Corpas FJ, Fernandez-Ocana A, Carreras A, Valderrama R, Luque F, Esteban FJ, Rodriguez-Serrano M, Chaki M, Pedrajas JR, Sandalio LM et al (2006). The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Cell Physiol*, 47: 984~994
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang ZP, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA (1996). Laser capture microdissection. *Science*, 274: 998~1001
- Emrich SJ, Barbazuk WB, Li L, Schnable PS (2007). Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome Res*, 17: 69~73
- Henderson DC, Zhang X, Brooks L III, Scanlon MJ (2006). RAGGED SEEDLING2 is required for expression of KANADI2 and REVOLUTA homologues in the maize shoot apex. *Genesis*, 44: 372~382
- Hobza R, Vyskot B (2007). Laser microdissection-based analysis of plant sex chromosomes. *Methods Cell Biol*, 82: 433~453
- Holscher D, Schneider B (2007). Laser microdissection and cryogenic nuclear magnetic resonance spectroscopy: an alliance for cell type-specific metabolite profiling. *Planta*, 225: 763~770
- Inada N, Wildermuth MC (2005). Novel tissue preparation method and cell-specific marker for laser microdissection of *Arabidopsis* mature leaf. *Planta*, 221: 9~16
- Ithal N, Recknor J, Nettleton D, Maier T, Baum TJ, Mitchum MG (2007). Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. *Mol Plant Microbe Interact*, 20: 510~525
- Jiang K, Zhang S, Lee S, Tsai G, Kim K, Huang H, Chilcott C, Zhu T, Feldman LJ (2006). Transcription profile analyses identify genes and pathways central to root cap functions in maize. *Plant Mol Biol*, 60: 343~363
- Kajiyama S, Harada K, Fukusaki E, Kobayashi A (2006). Single cell-based analysis of torenia petal pigments by a combination of ArF excimer laser micro sampling and nano-high performance liquid chromatography (HPLC)-mass spectrometry. *J Biosci Bioeng*, 102: 575~578
- Kerk NM, Ceserani T, Tausta SL, Sussex IM, Nelson TM (2003). Laser capture microdissection of cells from plant tissues. *Plant Physiol*, 132: 27~35
- Li SH, Schneider B, Gershenzon J (2007). Microchemical analysis of laser-microdissected stone cells of Norway spruce by cryogenic nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta*, 225: 771~779
- Liu X, Wang H, Li Y, Tang Y, Liu Y, Hu X, Jia P, Ying K, Feng Q et al (2004). Preparation of single rice chromosome for construction of a DNA library using a laser microbeam trap. *J Biotechnol*, 109: 217~226
- Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, Muir B, Mohapatra G, Salunga R, Tuggle JT et al (2004). A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell*, 5: 607~616
- Nakazono M, Qiu F, Borsuk LA, Schnable PS (2003). Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. *Plant Cell*, 15: 583~596
- Nelson T, Tausta SL, Gandotra N, Liu T (2006). Laser microdissection of plant tissue: what you see is what you get. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 181~201
- Ohkama-Ohtsu N, Radwan S, Peterson A, Zhao P, Badr AF, Xiang C, Olliver DJ (2007). Characterization of the extracellular γ -glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in *Arabidopsis*. *Plant J*, 49: 865~877
- Raab T, Lopez-Raez JA, Klein D, Caballero JL, Moyano E, Schwab W, Munoz-Blanco J (2006). *FaQR*, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, encodes an enone oxidoreductase. *Plant Cell*, 18: 1023~1037
- Singh MB, Bhalla PL (2006). Plant stem cells carve their own niche. *Trends Plant Sci*, 11: 241~246
- Spencer MW, Casson SA, Lindsey K (2007). Transcriptional profiling of the *Arabidopsis* embryo. *Plant Physiol*, 143: 924~940
- Tang W, Coughlan S, Crane E, Beatty M, Duvick J (2006). The application of laser microdissection to *in planta* gene expression profiling of the maize anthracnose stalk rot fungus *Colletotrichum graminicola*. *Mol Plant Microbe Interact*, 19: 1240~1250
- Wu Y, Machado AC, White RG, Llewellyn DJ, Dennis ES (2006). Expression profiling identifies genes expressed early during lint fibre initiation in cotton. *Plant Cell Physiol*, 47: 107~127
- Yu Y, Lashbrook CC, Hannapel DJ (2007). Tissue integrity and RNA quality of laser microdissected phloem of potato. *Planta*, 226: 797~803
- Zhang X, Madi S, Borsuk L, Nettleton D, Elshire RJ, Buckner B, Janick-Buckner D, Beck J, Timmermans M, Schnable PS et al (2007). Laser microdissection of narrow sheath mutant maize uncovers novel gene expression in the shoot apical meristem. *PLoS Genet*, 3: e101