技术与方法 Techniques and Methods

激光捕获显微切割技术及其在植物研究中的应用

聂玉哲　张晓磊　李玉花*
东北林业大学花卉生物工程研究所，哈尔滨150040

Laser Capture Microdissection and Its Application in the Research of Plant Science

NIE Yu-Zhe, ZHANG Xiao-Lei, LI Yu-Hua*
Institute of Flower Biotechnology, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

提要 若要获得植物特定类型细胞的准确信息，首要的是获得同质的目标细胞。近年发展起来的激光捕获显微切割技术能够在显微镜下准确、快捷地获得所需要的目标细胞群甚至是单个细胞，从而成功地解决了组织中细胞异质性问题。文章概述了激光捕获显微切割技术的原理、注意的问题以及在植物科学研究中的应用和前景。
关键词 激光捕获显微切割；植物；同质细胞

植物体是由彼此相互联系的多种类型细胞所构成，正是由于这种结构上的复杂性，目前多数的研究都是通过分析混合组织样品来获得数据。虽然这些研究提供了一些有用的信息，但是有时对某些结果却不能做出很好的解释，尤其是某一种类型细胞占组织的主要部分，而研究对象只是暂时存在其中或细胞数量相对很少时的情况，从而具有很大的局限性。因此，为了获得特定类型细胞的准确信息，分离出同质的目标细胞就显得非常重要。

已报道过的从植物中分离同质细胞样品的方法至少有3 种。一种方法是从其中分离原生质体，这种方法能够获得很多同一种类型的细胞，但可能导致基因或蛋白表达发生不可思议的变化(Grosset等1990；Celis等1999)。另一种方法是用毛细管从植物活体中获得植物细胞组分(Tomos等1994)，所获得的细胞样品体积在皮升级，虽然能进行部分代谢(Tomos和Sharrock 2001)、基因表达(Laval等2002；Brandt等1999，2002；Richert等1996；Karrer等1995)和蛋白表达的分析(Roy等2003)，但数量上的限制使得应用这种方法采集到足够数量的单纯种类细胞样品来进行全局分析(尤其对RNA和蛋白质)将是很困难的。此外，为了保持细胞特定的生理状态，样品可以在固定、包埋、切片后，从冰冻或者石蜡包埋的组织中分离，分离技术包括直接手工分离(Outlaw和Zhang 2001)和激光显微切割分离(Roberts 2002；Schüitze和Lahr 1998；Emmert-Buck等1996)。激光捕获显微切割技术与以上其它方法相比，能够精确、快捷地获得大量的特定种类细胞样品，显现出极大的优越性。

1　激光捕获显微切割的原理

自1996年激光捕获显微切割技术首次采用以来，已经有多种激光捕获显微切割系统得到开发，文献报道中经常使用的是Arcturus Engineering公司的PixCell II系统(http://www.arctur.com)和P.A.L.M. Microlaser Technologies公司的PALM Microbeam系统(http://www.palm-microlaser.com)。

PixCell II系统属于经典的激光捕获显微切割技术，它的原理很容易理解。在显微镜下，用激光束照射特殊的转移膜使其熔化，粘附组织切片上的靶细胞，提起转移膜，粘附的靶细胞即和所有非靶细胞分离。其主要操作步骤为：将制备好的切片放在倒置显微镜载物台上，调整表面贴附有一层乙烯乙酸乙烯酯(EVA)膜的塑料帽，使

收稿　2005-11-14　**修定**　2006-05-29
资助　国家自然科学基金(30371189)和国家“863”计划(2001AA246102)。
*通讯作者(E-mail: lyhshen@126.com, Tel: 0451-82191783)。

其覆于切片的组织表面，并使目的细胞(群)位于视野中心；发射激光束，瞬间升温使EVA膜局部熔化，渗透到目的细胞周围，随即迅速冷却固化，EVA膜即与其下方的细胞紧密粘合在一起；揭起EVA膜，被捕获的目的细胞与EVA膜一起脱离切片上的其它组织(图1)。透明的热塑性EVA膜含有吸收近红外线的特殊染料，在整个激光捕获切割过程中发挥着重要的作用。它不吸收显微镜所使用的可见光，但当使用波长与该染料所特异吸收的光波长相一致的激光束照射时，激光的能量绝大部分被EVA膜吸收。随着温度的升高，EVA膜的黏滞度急剧下降，这一特性可保证EVA膜局部的轻度加热就能使其渗透到细胞间隙，并迅速冷却，固化成牢固的连接，足以使目的细胞脱离切片。

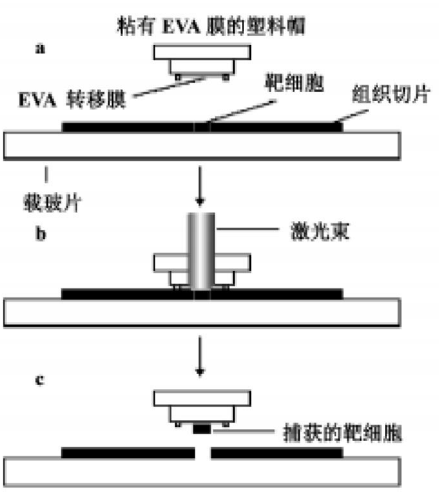

图1 激光捕获显微切割的过程
引自Schnable等(2004)并作修改。

PALM Microbeam系统的原理是利用激光光压将分离的样品弹入装有裂解液的管盖中，具体分3种情况：当组织细胞间是相互分离的时候，可以直接用光压弹射；若用激光切割的组织较小的时候，在切割完成时，样品在切割激光作用力下直接飞入装有裂解液的管中；若切割组织比较大，则在切割完成后要再加一次激光脉冲将样品弹入装有裂解液的管中(图2)。这种技术相对于经典的激光捕获显微切割技术来说，有以下优点：(1)不需要特制的贴附有EVA膜的塑料帽，可减小试验消耗；(2)采用激光压力弹射技术使样品从载

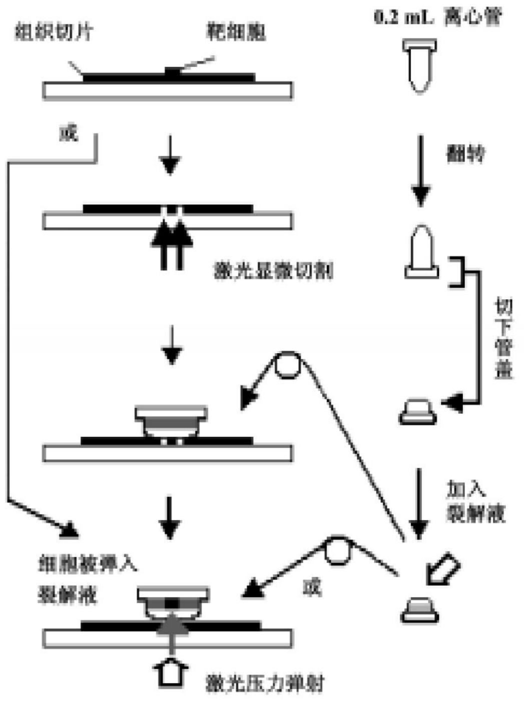

图2 激光压力弹射的过程
引自Asano等(2002)并作修改。

玻片到管盖逆重力飞行，可保证样品不受污染。由于这种技术更具优势，因此，近年来得到了越来越广泛的应用。

此外，还有一些文献报道中应用较少的激光捕获显微切割系统，如Cell Robotics公司的Laser-Scissors Pro300系统(http://www.cellrobotics.com)，Leica Microsystems公司的Leica AS LMD系统(http://www.leica-microsystems.com)，MMI AG公司的μCUT系统(http://www.mmi-micro.com)等。

2 植物样品激光捕获显微切割技术

激光捕获显微切割包括以下几个步骤：材料的固定、包埋、切片、脱水和激光捕获显微切割。

为了从显微解剖材料中获得最佳的核酸或蛋白回收率，从材料的固定开始就必须特别注意。材料的准备必须平衡组织形态和样品质量的关系，也就是在显微镜下要能够分辨出目标细胞的特征，而同时也要争取获得最大的高质量核酸或蛋白的回收率。在激光捕获显微切割中，载玻片上方没有盖玻片，这就使组织的识别变得更困难，所以，组织在形态上要保存得更完好。一些靶细胞群需要进行染色才能保证区分出来，但是有些染色步骤不仅会增加生物分子的降解，而且还可能会导

致不期望的细胞组分的改变(Ahram等2003；Okuducu等2003)。在用固定液固定时，采用改变大分子结构来固定形态的方法可能会影响其完整性及可提取性(Goldsworthy等1999)。经验证明，沉淀固定剂像乙醇或丙酮比交联固定剂(例如乙醛和福尔马林)效果要好，能够得到更高的核酸和蛋白回收率(Ahram等2003；Goldsworthy等1999；Kerk等2003)。

在激光捕获显微切割中，对于人类和动物的组织，低温固定是获取材料的推荐方法。尽管如此，冰冻常常在组织内产生大的冰晶而破坏组织学鉴别的特征，这在植物中尤为突出，这是因为植物的大多数组织中有大的液泡和空隙(Casson等2005)。因此，如果研究的器官或组织部分受冰晶影响不大，可以直接通过冷冻处理准备样品；若影响较大，则需要在冰冻之前经过冰冻保护剂处理，通常采用的冰冻保护剂是添加了10%蔗糖的磷酸盐缓冲溶液(137 mmol·L^{-1} NaCl、8.01 mmol·L^{-1} Na_2HPO_4、2.68 mmol·L^{-1} KCl和1.47 mmol·L^{-1} KH_2PO_4，pH 7.3)和添加15%蔗糖的磷酸盐缓冲溶液，依次分别抽真空15 min渗入，在4℃环境中摇床摇动1 h。处理后的样品包埋于Tissue-Tek® OCT基质中(Sakura Finetek公司,美国)，液氮冷冻后保存于-80℃中(Nakazono等2003)。

对于在Tissue-Tek® OTC基质中冰冻固定和包埋的样品，在-20℃下制备10 μm冷冻切片，并用CryoJane切片转移系统(Instrumedics公司,美国)将其粘贴在有黏性的载玻片上。用360 nm紫外光瞬间照射后，可以将切片牢牢地固定在黏性载玻片上。切片固定好以后，在冰上用乙醇逐级脱水，再在二甲苯中浸泡2次即可进行激光显微切割。在激光显微切割以前，可以将样品保存在新鲜的二甲苯中(Nakazono等2003)。

样品除了冰冻包埋以外，还可以用石蜡包埋。固定后用石蜡进行包埋，已经广泛应用于动物和植物中，并且与乙醇固定配合使用能够非常好地保存组织的形态(Ahram等2003；Kerk等2003；Gillespie等2002)。将材料放入Farmer's固定液(乙醇:乙酸=3:1)，在4℃固定16 h；然后，通过逐级浓度(75%、85%、100%、100%、100%)的乙醇在室温脱水，每级3 h；接着，逐级渗入二甲苯(乙醇:二甲苯=75:25、50:50、25:75、0:100、0:100、0:100)；最后，在室温加入液态的Paraplast X-Tra (Fisher Scientific公司,加拿大)，在58℃换2次Paraplast X-Tra基质，随后在4℃使Paraplast X-Tra固化。使用旋转式切片机切出10 μm的切片。42℃热水中展片，粘贴在载玻片上，空气中干燥，将粘有切片的载玻片经二甲苯浸泡2次(每次5 min)进行脱蜡，随后便可以进行激光捕获显微切割(Murata和De Luca 2005)。

与冰冻组织相比，虽然石蜡包埋会导致提取的RNA和蛋白质总量降低(Ahram等2003)，但还是可以从动物和植物组织中获得足够数量的材料用于反转录PCR扩增和RNA表达的全局分析(Kabbarah等2003)。此外，几百种蛋白质已经被成功地从乙醇固定、石蜡包埋的组织切片中提取出来，最后得到的蛋白表达谱与从冰冻组织中获得的高度相似，并且并不妨碍其后的分析和应用，如蛋白水解消化和质谱测定等(Ahram等2003)。由于它在保持形态上比冰冻切片有一定的优越性，因此，对于许多样品来说，采用石蜡包埋是一个理想的折中方法。

3 激光捕获显微切割在植物学研究中的应用

3.1 组织特异表达基因的寻找 Nakazono等(2003)应用激光捕获显微切割方法，从冰冻切片中分离玉米表皮细胞和维管束组织。从这些细胞中分离的RNA经过线性PCR扩增，然后与玉米的cDNA基因芯片杂交。经过比较，大约有1.5% (130/8 791)的cDNA在表皮细胞中偏爱表达，大约有1.5% (137/8 791)的cDNA在维管束中偏爱表达。试验中发现，表皮或维管束鞘细胞中偏爱表达的一些基因与以前报道中认为主要表达在表皮细胞或维管束细胞中的基因一致，这也验证了这一试验的可靠性。

Asano等(2002)将改进的激光捕获显微切割系统成功地应用于获得水稻叶片中与周围细胞在形态上有明显区别的韧皮部组织细胞，从这些显微切割获得的韧皮部细胞(大约150个)中提取出总RNA，这些RNA经过T7 RNA聚合酶扩增以后，用来建立cDNA文库。从文库中随机挑选413个

克隆进行序列测定的结果表明，大约有37%的克隆含有新基因，而其它大约有63%的克隆所含有的基因，或者与已经报道的多种植物中位于韧皮部的已知基因同源，或者与其它已知基因同源。原位杂交表明，推定的氨基酸通透酶在韧皮部特异表达。

3.2 在植物胚胎发育研究中的应用　为了鉴别在受精后玉米二细胞胚顶细胞或基细胞上调或下调的基因，Okamoto等(2005)应用激光捕获显微切割技术，从二细胞胚中分离顶细胞和基细胞，然后从顶细胞、基细胞、卵细胞、二细胞胚和多细胞胚中合成cDNA。以这些cDNA为模板，应用随机扩增多态DNA (RAPD)引物进行PCR。特异的基因表达模式得到鉴定，随后将这些表达模式分成6组：(1)配子融合后只在顶细胞上调表达的基因；(2)配子融合后只在基细胞上调表达的基因；(3)配子融合后在顶细胞和基细胞中都上调表达的基因；(4)配子融合后只在顶细胞下调表达的基因；(5)配子融合后只在基细胞下调表达的基因；(6)在卵细胞和胚胎中持续表达的基因。其后的试验表明，在顶细胞或基细胞中上调表达的基因在早期的合子中已经表达，假如是这样的话，那么，这些基因的转录产物就可以推定是定位于合子顶部或基部区域的，或者在合子细胞分裂后的一个子细胞中迅速降解。

3.3 研究植物与病原体的相互作用　根结线虫是一类在农作物上危害极大的植物病原线虫，它能够在寄主根部诱导特定的称为巨细胞的饲喂细胞。由于以往获得纯的巨细胞很困难，所以，分析巨细胞的形成和分化的分子机制受到很多限制。

Ramsay等(2004)应用激光显微切割技术，从番茄根部诱导4 d的含有巨细胞的石蜡切片中收集巨细胞，并从这些样本中分离总RNA，然后用RT-PCR研究巨细胞中细胞周期基因的表达。在巨细胞中，相对于其它细胞来说，2种D-型细胞周期蛋白基因*LeCyc-D3;2*和*LeCycD3;3*可以高水平表达，表明细胞周期的G_1期诱导可能是对线虫感染刺激的反应。

4 结语

激光捕获显微切割技术对研究复杂异质组织中的不连续细胞中所发生的分子和生化过程来说是一个有力的工具。它操作简单、重复性好、精确、快速，并且能同时采集大量细胞特异性材料。许多动物组织的试验结果表明，由激光捕获显微切割得到的样品可以被成功地应用在基因组、转录组和蛋白质组分析中。目前，激光捕获显微切割技术的局限在于它要求靶细胞在形态上容易辨认，这会导致分离与周围细胞在形态上区分不明显的异质细胞变得比较困难，但目前已经发展出一些可以用来协助识别某些特定细胞的方法，例如免疫组织化学(Fend等1999；Murakami等2000)、荧光原位杂交(Klitgaard等2005)等。相信，随着激光捕获显微切割技术在医学和动物研究中被越来越广泛而深入地应用，植物领域研究中也可以得到更多的借鉴，现在已有了一些方法应用到了植物的研究领域中，这项技术还会深入到植物组织或细胞水平中去。

参考文献

Ahram M, Flaig MJ, Gillespie JW, Duray PH, Linehan WM, Ornstein DK, Niu SL, Zhao YM, Petricoin EF, Emmert-Buck MR (2003). Evaluation of ethanol-fixed, paraffin-embedded tissues for proteomic applications. Proteomics, 3: 413~421

Asano T, Masumura T, Kusano H, Kikuchi S, Kurita A, Shimada H, Kadowaki K-I (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

Brandt S, Kehr J, Walz C, Imlau A, Willmitzer L, Fisahn J (1999). A rapid method for detection of plant gene transcripts from single epidermal, mesophyll and companion cells of intact leaves. Plant J, 20: 245~250

Brandt S, Kloska S, Altmann T, Kehr J (2002). Using array hybridization to monitor gene expression at the single cell level. J Exp Bot, 53: 2315~2323

Casson S, Spencer M, Walker K, Lindsey K (2005). Laser capture microdissection for the analysis of gene expression during embryogenesis of *Arabidopsis*. Plant J, 42: 111~123

Celis A, Rasmussen HH, Celis P, Basse B, Lauridsen JB, Ratz G, Hein B, Ostergaard M, Wolf H, Orntoft T et al (1999). Short-term culturing of low-grade superficial bladder transitional cell carcinomas leads to changes in the expression levels of several proteins involved in key cellular activities. Electrophoresis, 20: 355~361

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA (1996). Laser capture microdissection. Science, 274: 998~1001

Fend F, Emmert-Buck MR, Chuaqui R, Cole K, Lee J, Liotta LA,

Raffeld M (1999). Immuno-LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis. Am J Pathol, 154: 61~66

Gillespie JW, Best CJM, Bichsel VE, Cole KA, Greenhut SF, Hewitt SM, Ahram M, Gathright YB, Merino MJ, Strausberg RL et al (2002). Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. Am J Pathol, 160: 449~457

Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, Foley JF, Maronpot RR (1999). Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. Mol Carcinogen, 25: 86~91

Grosset J, Marty I, Chartier Y, Meyer Y (1990). Messenger RNAs newly synthesized by tobacco mesophyll protoplasts are wound inducible. Plant Mol Biol, 15: 485~496

Kabbarah O, Pinto K, Mutch DG, Goodfellow PJ (2003). Expression profiling of mouse endometrial cancers microdissected from ethanol-fixed, paraffin-embedded tissues. Am J Pathol, 162: 755~762

Karrer EE, Lincoln JE, Hogenhout S, Bennett AB, Bostock RM, Martineau B, Lucas WJ, Gilchrist DG, Alexander D (1995). *In situ* isolation of mRNA from individual plant cells: creation of cell-specific cDNA libraries. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 3814~3818

Kerk NM, Ceserani T, Tausta SL, Sussex IM, Nelson TM (2003). Laser capture microdissection of cells from plant tissues. Plant Physiol, 132: 27~35

Klitgaard K, Molbak L, Jensen TK, Lindboe CF, Boye M (2005). Laser capture microdissection of bacterial cells targeted by fluorescence *in situ* hybridization. Biotechniques, 39 (6): 864~868

Laval V, Koroleva OA, Murphy E, Lu C, Milner JJ, Hooks MA, Tomos AD (2002). Distribution of actin gene isoforms in the *Arabidopsis* leaf measured in microsamples from intact individual cells. Planta, 215: 287~292

Murakami H, Liotta L, Star RA (2000). IF-LCM: laser capture microdissection of immunofluorescently defined cells for mRNA analysis rapid communication. Kidney Int, 58: 1346~1353

Murata J, De Luca V (2005). Localization of tabersonine 16-hydroxylase and 16-OH tabersonine-16-*O*-methyltransferase to leaf epidermal cells defines them as a major site of precursor biosynthesis in the vindoline pathway in *Catharanthus roseus*. Plant J, 44: 581~594

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

Okamoto T, Scholten S, Lörz H, Kranz E (2005). Identification of genes that are up- or down-regulated in the apical or basal cell of maize two-celled embryos and monitoring their expression during zygote development by a cell manipulation- and PCR-based approach. Plant Cell Physiol, 46 (2): 332~338

Okuducu AF, Janzen V, Hahne JC, Ko Y, Wernert N (2003). Influence of histochemical stains on quantitative gene expression analysis after laser-assisted microdissection. Int J Mol Med, 11: 449~453

Outlaw Jr WH, Zhang S (2001). Single-cell dissection and microdroplet chemistry. J Exp Bot, 52: 605~614

Ramsay K, Wang ZH, Jones MGK (2004). Using laser capture microdissection to study gene expression in early stages of giant cells induced by root-knot nematodes. Mol Plant Pathol, 5: 587~59

Richert J, Kranz E, Lörz H, Dresselhaus T (1996). A reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for gene expression studies at the single cell level. Plant Sci, 114: 93~99

Roberts JP (2002). The cutting edge in laser microdissection. Biophotonics Int, 9: 50~53

Roy SJ, Cuin TA, Leigh RA (2003). Nanolitre-scale assays to determine the activities of enzymes in individual plant cells. Plant J, 34: 555~564

Schnable PS, Hochholdinger F, Nakazono M (2004). Global expression profiling applied to plant development. Curr Opin Plant Biol, 7: 50~56

Schüitze K, Lahr G (1998). Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. Nat Biotechnol, 18: 737~742

Tomos AD, Hinde P, Richardson P, Pritchard J, Fricke W (1994). Microsampling and measurements of solutes in single cells. In: Harris N, Oparka KJ (eds). Plant Cell Biology, A Practical Approach. Oxford: Oxford University Press, 297~314

Tomos AD, Sharrock RA (2001). Cell sampling and analysis (SiCSA): metabolites measured at single cell resolution. J Exp Bot, 52: 623~630