

LASERSKA MIKRODISEKCIJA – MOST MED MIKROSKOPIJO IN MOLEKULARNIMI TER FIZIKALNO-KEMIJSKIMI METODAMI

Laser microdissection – the bridge linking microscopy with molecular methods and methods of physical chemistry

Tanja Mrak*, Hojka Kraigher

Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za gozdno fiziologijo in genetiko, Večna pot 2, 1000 Ljubljana

Ključne besede: laserska mikrodisekcija, mikroskopija, analiza tkiv

Keywords: laser microdissection, microscopy, tissue analyses«

Laserska mikrodisekcija je orodje za izolacijo specifičnih tkiv, celic, subcelularnih struktur in organelov iz mikroskopskih preparatov kompleksnih heterogenih tkiv. Vzorci, pridobljeni na ta način, so primerni za ekstrakcijo DNK, RNK, proteinov in metabolitov (Emmert-Buck s sod. 1996; Day s sod. 2005; Moco s sod. 2009). Mikroskopske preparate, ki so lahko v nekaterih primerih pripravljene na običajnih objektnih steklih ali pa na posebnih objektnih steklih z membranami, opazujemo pod invertnim ali pokončnim mikroskopom, laserski žarek pa potuje skozi leče objektiva. Preparati morajo biti pripravljene brez krovnih stekel, če pa uporabljamo arhivske vzorce, je potrebno krovno steklo pred lasersko mikrodisekcijo odstraniti.

Prve aparature za lasersko mikrodisekcijo so delovale tako, da je IR laserski žarek aktiviral termoplastični film nad mikroskopskim preparatom, pri čemer so se izbrane celice pod filmom prilepile nanj (Emmert-Buck s sod. 1996) in ta način uporabljajo še danes. Poleg tega so na voljo aparati, pri katerih se izbrani del tkiva izreže s pomočjo UV laserskega žarka, nato pa izrezani del bodisi pade v zbirno posodico pod njim zaradi težnosti bodisi se s pomočjo defokusiranega laserskega žarka katapultira v zbirno posodico nad njim. Ta dva načina sta natančnejša od prej omenjenega, saj omogočata izrezovanje delov, manjših od 1 µm (Day s sod. 2007).

Ključna za uspešno lasersko mikrodisekcijo ter nadaljnje postopke ekstrakcije je priprava vzorca, pri čemer je potrebno ohraniti histološke podrobnosti, ki omogočajo izbor zelenega dela tkiva, hkrati pa

se morajo v vzorcu ohraniti tudi molekule, ki jih želimo v nadaljevanju analizirati. Za živalska tkiva se najpogosteje uporablja rezanje zamrznjenih tkiv s kriptomom, za rastlinska tkiva pa ta način ni najbolj primeren zaradi tvorbe ledenih kristalov v vakuolah in medceličnih prostorih, ki poškodujejo vzorec (Kerk s sod. 2003; Day s sod. 2005). Za fiksacijo tkiv se zaradi slabega izkoristka pri ekstrakciji nukleinskih kislin in proteinov izogibamo uporabi fiksativov, ki vsebujejo formalin. Namesto tega za rastlinska tkiva uporabljamo Farmerjev fiksativ (mešanica etanola in očetne kisline). Fiksacija poteka pri 4 °C, nadaljnji postopki dehidracije in vklapljanja v parafin pa kot pri pripravi klasičnih mikroskopskih preparatov. Odstranjevanje parafina izvedemo tik pred lasersko mikrodisekcijo (Kerk s sod. 2003). Namesto parafina, kjer težavo predstavlja tako kontaminacija z RNazami kot visoka temperatura, ki ji je izpostavljeno tkivo, lahko uporabljamo vklapljanje v vosek, ki ima nizko temperaturo tališča (Gomez s sod. 2009), ali v metakrilatno plastiko, ki polimerizira pri nizkih temperaturah (Klink in Thibaudeau 2014). Če želimo v nadaljevanju delati z RNK, moramo uporabljati reagente, pipetne nastavke in plastično posodje, ki ne vsebuje RNaz v kombinaciji s tretiranjem vodnih raztopin z 0.1 % dietilpirokarbonatom ter pogosto menjavati rokavice (Carl Zeiss Microscopy 2012). Za ekstrakcijo DNK in RNK uporabljamo komplete, namenjene majhnim vzorcem, na primer PicoPure DNA/RNA Extraction Kit (Life Technologies), QI-Amp DNA Micro Kit (Qiagen) ali RNeasy Micro Kit (Qiagen).



Slika 1: Sistem za lasersko mikrodisekcijo PALM MicroBeam z invertnim mikroskopom ZEISS ter izvorom laserske svetlobe PALM (avtorica: Tanja Mrak)

Pomnoževanje ekstrahirane DNK iz večjih vzorcev, pridobljenih z lasersko mikrodisekcijo, je relativno enostavno z uporabo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Tako pomnožene markerje lahko nadalje analiziramo z več pristopi (sekvenciranje, fragmentna analiza, analiza polimorfizma posameznih nukleotidov, genotipizacija kratkih tandemskih ponovitev in drugo) (Day s sod. 2005).

Kvantifikacijo ekstrahirane RNK lahko opravimo spektrofotometrično ali z občutljivejšimi fluorescentnimi sistemi detekcije. Za ocenjevanje kakovosti pridobljene RNK lahko uporabljamo mikrokapilarno elektroforezo ali PCR s predhodno obratno transkripcijo (RT-PCR), pri kateri pomnožujemo fragmente tako s 3' kot s 5' konca ter ugotavljamo njuno razmerje. Ker je količina RNK, izolirane z lasersko mikrodisekcijo, majhna, jo je običajno pred nadaljnji analizami transkriptov potrebno pomnožiti, npr. s PCR, in vitro-transkripcijo (IVT) ali z Ribo-Spia pomnoževanjem. Nadaljnje analize transkriptov zajemajo metode, kot so PCR, Northern blot, in-situ hibridizacija, konstrukcija reporterskih genov, mikromreže ter serijska analiza izražanja genov (SAGE) (Day s sod. 2007).

Analize proteinov (v zadnjem času pa tudi metabolitov) so omejene s količino posameznih tipov celic, ki jih lahko pridobimo z lasersko mikrodisekcijo in količino produktov v njih. Za analizo proteinov v vzorcih, pridobljenih z lasersko mikrodisekcijo, uporabljamo gelsko elektroforezo, metodo imunoblot in masno spektrometrijo (MS) (Day s sod. 2005), za analize metabolitov pa metode, ki temeljijo na MS in jedrski magnetni resonanci (NMR). Pred analizo z MS molekule ločimo z eno od separacijskih tehnik, kot so tekočinska in plinska kromatografija ter kapilarna elektroforeza (Moco s sod. 2009)

Možnosti uporabe laserske mikrodisekcije v gozdarstvu in lesarstvu so številne in zajemajo raziska-

ve interakcij med rastlinami in patogeni oz. simbionti v različnih fazah infekcije oz. kolonizacije, raziskave specializacije in diferenciacije celic, raziskave epigenetske regulacije ključnih genov, identifikacijo endofitov, identifikacijo komponent kompleksnih in heterogenih vzorcev, dendrokronologijo visoke ločljivosti v povezavi z izotopskimi analizami, izdelavo kromosomskih knjižnic ipd.

Zahvala:

Pripravo prispevka je financiral evropski projekt EU-FORINNO European Forest Research and Innovation (RegPot No. 315982), financiran iz 7 okvirnega infrastrukturnega programa ter sofinancirala programska skupina »Gozdna biologija, ekologija in tehnologija« (P4-0107).

Viri:

- Carl Zeiss Microscopy. 2012. LCM Protocols – RNA handling (http://www.zeiss.com/microscopy/en_de/products/laser-microdissection/laser-microdissection-microbeam.html#downloads, april 2014).
- Day R.C., Grossniklaus U., Macknight R.C. 2005. Be more specific! Laser-assisted microdissection of plant cells. *TRENDS in Plant Science* 10, 8: 397-406.
- Day R.C., McNoe L.A., Macknight R.C. 2007. Transcript analysis of laser microdissected plant cells. *Physiologia Plantarum* 129, 2: 267-282.
- Emmert-Buck M.R., Bonner R.F., Smith P.D., Chuaqui R.F., Zhuang Z., Goldstein S.R., Weiss R.A., Liotta L.A. 1996. Laser Capture Microdissection. *Science*, 274, 5289: 998-1001.
- Gomez S.K., Javot H., Deewatthanawong P., Torres-Jerez I., Tang Y., Blancaflor E.B., Udvardi M.K., Harrison M.J. 2009. Medicago truncatula and Glomus intraradices gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology*, 9: 10.
- Kerk N.M., Ceresani T., Tausta L., Sussex I.M., Nelson T.M. 2003. Laser Capture Microdissection of Cells from Plant Tissues. *Plant Physiology*, 132, 1: 27-35.
- Klink V.P., Thibaudeau G. 2014. Laser Microdissection of semi-thin sections from plastic-embedded tissue for studying plant-organism developmental processes at single cell resolution. *Journal of Plant Interactions*, 9, 1: 610-617.
- Moco S., Schneider B., Vervoort J. 2009. Plant Micrometabolomics: The Analysis of Endogenous Metabolites Present in a Plant Cell or Tissues. *Journal of Proteome Research*, 8, 4: 1694-1703.