

## ЛАЗЕРНАЯ МИКРОДИССЕКЦИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

© *О. В. Подгорный*<sup>1,2</sup>, *В. Н. Лазарев*<sup>1</sup>, *В. М. Говорун*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической медицины  
Федерального медико-биологического агентства  
и <sup>2</sup>Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва;  
<sup>1,2</sup> электронный адрес: *olegpodgorny@inbox.ru*

При традиционной подготовке проб для молекулярно-генетического или биохимического анализа лизирующий раствор помещают кусочки ткани, которые, как правило, включают в себя клетки различных типов. В результате лизат содержит компоненты этих клеток, что затрудняет интерпретацию результатов последующего молекулярного анализа. Эту проблему позволяет преодолеть метод лазерной микродиссекции, который сравнительно недавно стал активно использоваться в молекулярных исследованиях. С его помощью можно выделять и накапливать определенные фрагменты ткани, отдельные клетки и даже субклеточные структуры (органеллы, хромосомы и т. д.). Из таких фрагментов могут быть выделены и в дальнейшем проанализированы с помощью различных методов молекулярной биологии и биохимии ДНК, РНК, белки и низкомолекулярные продукты метаболизма. Благодаря своим возможностям метод лазерной микродиссекции находит все более и более широкое применение в таких областях, как онкология (фундаментальные исследования и диагностика), клеточная и молекулярная биология, биохимия, а также судебно-медицинская экспертиза. В обзоре рассматриваются примеры применения лазерной микродиссекции и ее принципы, реализованные в различных коммерчески доступных системах, а также проблемы подготовки образцов для лазерной микродиссекции.

**Ключевые слова:** лазерная микродиссекция, методы молекулярной биологии и биохимии.

Хорошо известно, что любая ткань многоклеточного организма гетерогенна, т. е. состоит из различных типов клеток, организованных в определенные компартменты. Эта гетерогенность сильно затрудняет интерпретацию результатов молекулярно-генетического или биохимического анализа, поскольку при обычной подготовке проб часто неизвестно, какие именно клетки дают те или иные компоненты лизата. Более того, неизвестно и то, каков вклад различных типов клеток в общее количество того или иного компонента. Метод лазерной микродиссекции позволяет преодолеть эти трудности.

С помощью лазерной микродиссекции можно выделять с высокой точностью определенные фрагменты ткани, отдельные клетки и даже субклеточные структуры (органеллы, хромосомы и т. д.), что обеспечивает достаточную чистоту стартового материала для последующего молекулярного анализа. Кроме того, этот метод позволяет осуществлять контролируемое накопление клеточного материала, что дает возможность проводить более точный количественный молекулярный анализ.

Лазерная микродиссекция появилась более 30 лет назад, но бурное развитие метода началось в середине 90-х годов XX столетия. К настоящему времени лазерная микродиссекция зарекомендовала себя как простой и весьма эффективный метод пробоподготовки для молекулярно-генетического или биохимического анализа. Из фрагментов тканей, «вырезанных» с ее помощью, могут быть выделены геномная ДНК (Kernek et al., 2003), митохондриальная ДНК (Markaryan et al., 2008), мРНК (Khodosevich et al., 2009), белки (Mouledous et al., 2002) и даже

низкомолекулярные продукты метаболизма (Schad et al., 2005). Выделенный материал затем может быть проанализирован с применением различных молекулярно-генетических и биохимических методов, таких как качественная и количественная полимеразная цепная реакция геномной ДНК (Takeshima et al., 2001) и кДНК, синтезированной по мРНК (Leethanakul et al., 2000; Khodosevich et al., 2007); микроаррей-анализ РНК (Wang et al., 2006; Khodosevich et al., 2009); Вестерн-блот-анализ белков (Martinet et al., 2004); протеомный анализ с помощью двумерного гель-электрофореза белков (De Souza et al., 2004), масс-спектрометрии SELDI-TOF (Kwapiszewska et al., 2004) и MALDI-TOF (Xu et al., 2002); анализ низкомолекулярных продуктов метаболизма клеток с использованием хромато-масс-спектрометрии (Schad et al., 2005).

Таким образом, метод лазерной микродиссекции позволяет установить связь между результатом молекулярно-генетического или биохимического анализа и структурой биологического образца, что делает его весьма востребованным в различных областях биологии, медицины, биотехнологии и биоинженерии. Кроме того, лазерная микродиссекция позволяет вывести молекулярно-генетический и биохимический анализ биологических образцов на уровень отдельных клеток или даже их частей.

В настоящем обзоре рассмотрены принципы лазерной микродиссекции, реализованные в различных коммерчески доступных системах, примеры применения лазерной микродиссекции для решения различных задач, а также проблемы подготовки проб для лазерной микродиссекции.

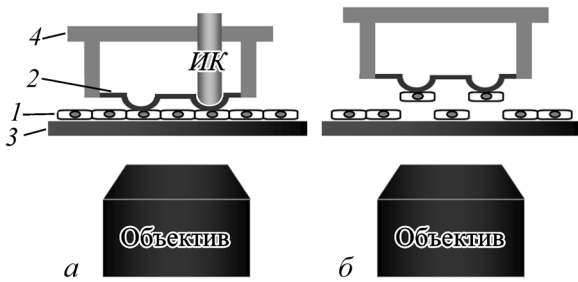


Рис. 1 (а, б). Принцип лазерной микродиссекции с захватом при использовании инфракрасного лазера.

1 — срез ткани, 2 — термопластичная мембрана, 3 — предметное стекло, 4 — крышечка центрифужной пробирки. Обозначения на рис. 1—5: ИК — инфракрасный лазер, УФ — ультрафиолетовый лазер. Ко всем рис. см. объяснения в тексте.

### Системы для лазерной микродиссекции

Метод лазерной микродиссекции появился в середине 70-х годов прошлого столетия. В то время была разработана техника, позволяющая с использованием импульсного азотного лазера с длиной волны 337 нм и длительностью импульса 3 нс вырезать фрагменты из гистологических препаратов (Isenberg et al., 1976; Meier-Ruge et al., 1976). Захват же вырезанного материала производился механически, что делало лазерную микродиссекцию весьма трудоемким процессом. Однако эти эксперименты позволили показать, что использование лазера в качестве режущего инструмента позволяет добиться высокой точности микродиссекции.

В связи с трудоемкостью лазерная микродиссекция сначала не получила широкого распространения. Только в 1996 г. был предложен метод лазерной микродиссекции с автоматизированным захватом фрагментов, который получил название «Laser Capture Microdissection», или «LCM» (Emmert-Buck et al., 1996). Именно с этого времени начались бурное развитие и активное использование лазерной микродиссекции.

Принцип лазерной микродиссекции с захватом (Emmert-Buck et al., 1996) состоит в следующем. Препарат (высушенные срезы ткани или органа, прикрепленные к предметному стеклу) помещают на предметный столик инвертированного микроскопа таким образом, чтобы срезы были обращены к конденсору (рис. 1, а). Под микроскопом на препарате выбирают поле, из которого предполагается вырезать и захватить материал для дальнейшего анализа. В выбранном поле над препаратом с помощью

автоматики устанавливают прозрачную тонкую термопластичную мембрану. Затем в выбранные для микродиссекции области со стороны конденсора подают импульсы инфракрасного лазера. Под воздействием инфракрасных импульсов расположенная над препаратом мембрана, расплавляясь, прикрепляется к выбранным для микродиссекции областям. Далее устройство с мембраной убирают от препарата (рис. 1, б). В результате области интереса оказываются захваченными на мембране. Затем выделенный материал подвергают молекулярно-генетическому или биохимическому анализу.

Сегодня такой принцип захвата материала реализован в системах для лазерной микродиссекции, производимых компанией Arcturus ([www.moleculardevices.com](http://www.moleculardevices.com)). Кроме того, он был усовершенствован введением в систему импульсного ультрафиолетового лазера (рис. 2). Это позволило работать со срезами, прикрепленными к мембранам на основе полиэтилена. В результате больше нет необходимости инфракрасным лазером плавить термопластичную мембрану по всей площади выбранной для захвата области. Достаточно сделать только несколько точек прикрепления (рис. 2, а), а затем отрезать выбранную область с помощью ультрафиолетового лазера (рис. 2, б), фокусируемого на препарате через объектив, и изъять вырезанный фрагмент (рис. 2, в). Это позволило увеличить производительность системы, т. е. скорость накопления фрагментов ткани.

В 1998 г. была предложена оригинальная схема, сочетающая в себе лазерную микродиссекцию и катапультирование вырезанного образца (Schütze, Lahr, 1998; Schütze et al., 1998). В этой схеме (рис. 3) срезы ткани или органа располагаются на мембране из полиэтилен-нафтала, приклеенной по краю к предметному стеклу. Готовый препарат помещают на предметный столик инвертированного микроскопа таким образом, чтобы срезы были обращены к конденсору. Между препаратом и конденсором устанавливают крышечку центрифужной пробирки, внутренняя поверхность которой покрыта специальным адгезивным слоем. Затем на препарате с помощью компьютерной программы, управляющей системой, задают границы области для микродиссекции. Через объектив микроскопа на препарате фокусируется луч ультрафиолетового импульсного лазера. Предметный столик с препаратом начинает перемещаться таким образом, чтобы пятно сфокусированного лазера двигалось вдоль заданных границ выбранной области (рис. 3, а).

После того как заданная область мембраны с прикрепленным к ней срезом ткани полностью вырезана, на всю поверхность этой области подается сильный импульс расфокусированного лазерного излучения. Этот импульс

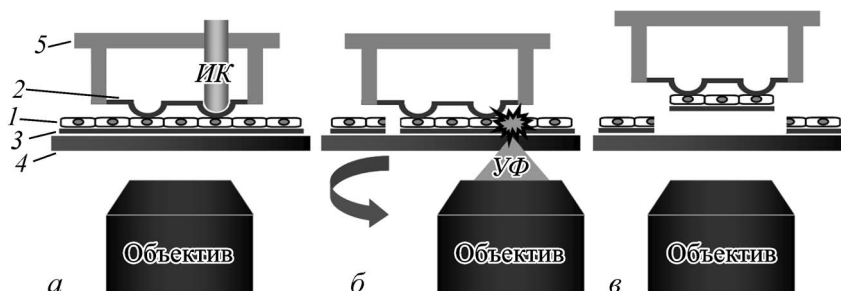


Рис. 2 (а—в). Принцип лазерной микродиссекции с захватом при использовании ультрафиолетового и инфракрасного лазеров.

1 — срез ткани, 2 — термопластичная мембрана, 3 — мембрана на основе полиэтилена, 4 — предметное стекло, 5 — крышечка центрифужной пробирки.

подбрасывает вырезанный фрагмент вверх, и он попадает в расположенную над препаратом крышечку пробирки с адгезивным слоем (рис. 3, б). Таким образом, вырезанный фрагмент оказывается захваченным и в дальнейшем может быть проанализирован с помощью методов молекулярной биологии. Описанная выше схема реализована сегодня в системе, которая производится под маркой Zeiss PALM Microbeam, и называется «Laser Microdissection and Pressure Catapulting», или «LMPC» ([www.zeiss.com](http://www.zeiss.com)).

В основе систем лазерной микродиссекции, созданных совместно компаниями Olympus ([www.microscopy.olympus.eu](http://www.microscopy.olympus.eu)) и Molecular Machines and Industries ([www.molecular-machines.com](http://www.molecular-machines.com)), лежит следующий принцип (рис. 4). Срезы органа или ткани наносят на металлическую рамку с натянутой на одну ее сторону мембраной на основе полиэтилена. Затем эту рамку со срезами прикладывают к предметному стеклу таким образом, чтобы срезы оказались зажатыми между поверхностью предметного стекла и мембраной. Готовый препарат типа «сэндвич» устанавливают на предметный столик инвертированного микроскопа таким образом, чтобы стекло было обращено к объективу, а рамка с мембраной — к конденсору. Между конденсором и препаратом устанавливают крышку центрифужной пробирки особой формы с клейким слоем, которая имеет особый профиль, как показано на рис. 4. Далее на препарате с помощью компьютерной программы задают границы области, которую предполагается вырезать. Объективом микроскопа на препарате фокусируется луч ультрафиолетового импульсного лазера, и предметный столик с препаратом начинает перемещаться таким образом, чтобы пятно сфокусированного лазера двигалось вдоль заданных границ (рис. 4, а). После того как заданная область полностью вырезана, автоматизированная механическая подача прижимает крышку центрифужной пробирки к мембране (рис. 4, б), а затем поднимает ее. В результате вырезанный фрагмент приклеивается к крышке и изымается из препарата (рис. 4, в).

Система лазерной микродиссекции, которую производит компания Leica Microsystems ([www.leica-microsystems.com](http://www.leica-microsystems.com)), кардинально отличается от всех предыдущих тем, что, во-первых, реализована она на прямом микроскопе, а во-вторых, резка производится движением луча по препарату (рис. 5). Здесь срезы органов и тканей могут быть нанесены как на рамки с мембраной, так и на предметные стекла с мембраной. Готовые препараты устанавливают на предметный столик таким образом, чтобы срезы были обращены к конденсору. Между конденсором и препаратом устанавливают крышку центрифужной пробирки. В управляющей компьютерной программе задают границы области для микродиссекции. Затем сфокуси-

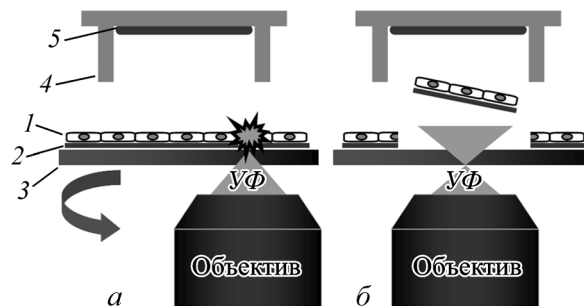


Рис. 3 (а, б). Принцип лазерной микродиссекции с катапультированием.

1 — срез ткани, 2 — мембрана на основе полиэтилена, 3 — предметное стекло, 4 — крышечка центрифужной пробирки, 5 — адгезивный слой.

ванный через объектив луч ультрафиолетового лазера с помощью системы призм перемещается вдоль заданных границ по неподвижному препарату (рис. 5, а). После того как выбранная область полностью вырезана, она под действием силы тяжести падает в расположенную под препаратом крышку центрифужной пробирки (рис. 5, б). Таким образом, вырезанный фрагмент оказывается захваченным для дальнейшего молекулярного анализа.

Все перечисленные системы для лазерной микродиссекции позволяют находить структуры интереса с использованием традиционных микроскопических методов: светлое поле, темное поле, освещение поляризованным светом, дифференциально-интерференционный контраст Номарского, фазовый контраст и эпифлуоресценция. Кроме того, поиск структур интереса во всех системах для лазерной микродиссекции может осуществляться в автоматическом режиме путем сканирования препарата и последующего распознавания на получаемых изображениях объектов интереса по таким критериям, как размер (периметр, площадь), форма, цвет и др. Это в значительной мере упрощает процедуру микродиссекции в тех случаях, когда необходимо найти и накопить большое количество фрагментов.

### Механизм микродиссекции с использованием ультрафиолетового импульсного лазера

В основе лазерной микродиссекции с помощью импульсного ультрафиолетового лазера с длительностью импульсов порядка пико- или наносекунд и энергией в импульсе от долей до 150 мкДж лежит так называемая аб-

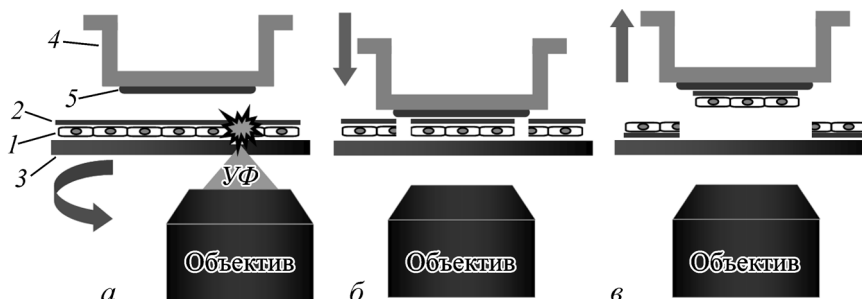


Рис. 4 (а–в). Принцип лазерной микродиссекции с механическим захватом.

1 — срез ткани, 2 — мембрана на основе полиэтилена, 3 — предметное стекло, 4 — крышечка центрифужной пробирки, 5 — клейкий слой.

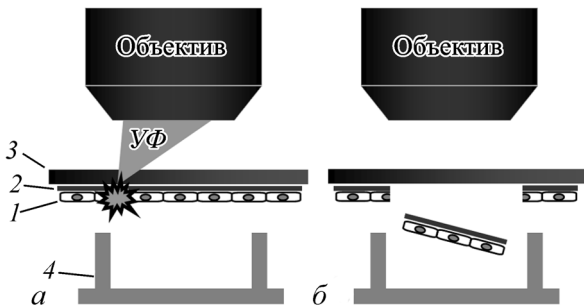


Рис. 5 (а, б). Принцип лазерной микродиссекции с захватом за счет гравитации.

1 — срез ткани, 2 — мембрана на основе полиэтилена, 3 — предметное стекло, 4 — крышечка центрифужной пробирки.

ляция с образованием плазмы (plasma-mediated ablation или plasma-induced ablation) (Niemz, 2004; Vogel et al., 2007). Это явление представляет собой процесс уноса вещества под воздействием лазерного излучения с поверхности твердого тела без теплообмена с окружающей средой; по этой причине его часто называют «холодной абляцией» (cold ablation) (Shi et al., 2003).

Лазерный пучок фокусируется в плоскости мембраны, на которой расположен биологический объект (отдельные клетки, срез органа или ткани). В фокусе лазерного пучка достигается плотность энергии от  $10^{11}$  до  $10^{13}$  Вт/см<sup>2</sup>. При такой плотности энергии, во-первых, происходит разрыв молекулярных связей вещества мембраны и самого биологического объекта, а во-вторых, молекулы и атомы, на которые распадается вещество, ионизируются. Благодаря этому в фокальном пятне лазера формируется так называемая микроплазма. Эта микроплазма адиабатически расширяется, благодаря чему вся тепловая энергия, запасенная в ней, расходуется на совершение работы по ее расширению. Именно за счет этого эффекта не происходит теплообмена с окружающей средой.

В коммерческих системах для лазерной микродиссекции используются, как правило, следующие лазеры: азотный лазер (337 нм), а также твердотельные лазеры с умножением частоты на кристаллах Nd:YAG (355 нм) и Nd:YLF (349 нм). Лазерные линии выбраны таким образом, что они попадают в зону А (320—400 нм) ультрафиолетовой области, где поглощение ультрафиолетового излучения молекулами ДНК, РНК и белков, а следовательно, и их повреждение минимально (Coochill, 2002). Это обеспечивает лучшую сохранность материала для молекулярно-генетического и биохимического анализа.

### Применение лазерной микродиссекции в молекулярно-генетических и биохимических исследованиях

Наиболее часто лазерная микродиссекция применяется для выделения и накопления определенных фрагментов из окрашенных или неокрашенных срезов органа или ткани как животных, так и растений, которые невозможно выделить никакими иными методами препарирования. Так, например, с использованием лазерной микродиссекции проводили анализ различий в уровне экспрессии генов в нейронах в различных полях гиппокампа в норме и при гипоксии (Newrzella et al., 2007), оценивали долю

делетированной митохондриальной ДНК в различных структурах слуховой улитки у пожилых людей с прогрессирующей старческой глухотой (Markaryan et al., 2008), анализировали тканеспецифическое распределение продуктов метаболизма (аминокислот, коферментов, жирных кислот и др.) в проводящих пучках и остальных тканях стебля растения *Arabidopsis thaliana* (Schad et al., 2005).

С помощью лазерной микродиссекции отделяют опухолевую ткань от нормальной (Xu et al., 2002; Gjerdrum et al., 2004; Dietrich et al., 2009) или же вырезают различные компоненты опухолей из биопсийного материала (Kernek et al., 2003; Кекеева и др., 2007, 2008). Из вырезанных фрагментов затем выделяют ДНК, РНК и белки. Такой подход является очень удобным в изучении опухолевых тканей с целью определения потери гетерозиготности, анализа изменений в экспрессии генов, связанных с развитием опухоли, а также поиска белковых маркеров опухолевого роста.

Лазерная микродиссекция применяется для вырезания отдельных клеток из срезов тканей. Это позволяет проводить анализ ДНК и РНК, выделенных из одиночных клеток. Так, например, было продемонстрировано, что в отдельных кератиноцитах кожи человека происходят спонтанные мутации в гене, кодирующем белок p53, даже несмотря на полное исключение попадания солнечного излучения (Ling et al., 2001).

Были также проведены исследования с целью анализа эффективности РНК-редактирования (RNA-editing) в сайте Q/R субъединицы GluR2 AMPA-рецептора, отвечающей за вход в клетку ионов кальция, в одиночных мотонейронах у пациентов со спинальной мышечной атрофией и трансгенных мышей SOD1<sup>G93A</sup> и SOD1<sup>H46R</sup>, которые являются моделью наследственного бокового амиотрофического склероза (Kawahara et al., 2006). Эти исследования позволили показать, что дегенерация мотонейронов, наблюдаемая при спинальной мышечной атрофии и наследственном боковом амиотрофическом склерозе, в отличие от дегенерации мотонейронов при ненаследственном боковом амиотрофическом склерозе не связана с нарушением эффективности РНК-редактирования.

Метод лазерной микродиссекции позволяет делать накопление определенного количества биоматериала и даже определенного количества отдельных клеток из ткани. Это дает возможность проводить количественные и сравнительные молекулярные исследования. Так, например, для поиска неизвестных сигнальных путей, регулирующих миграцию новорожденных нейробластов по роstralному миграционному пути из перивентрикулярной зоны боковых желудочков мозга в обонятельную луковицу, был использован следующий подход (Khodosevich et al., 2009). У трансгенных мышей 5HT3<sub>A</sub>-EGFP, у которых под промотором серотонинового рецептора 5HT3<sub>A</sub> экспрессируется флуоресцентный белок EGFP, с помощью лазерной микродиссекции выделяли две популяции новорожденных нейробластов. Одну популяцию выделяли в начале, а другую — в конце роstralного миграционного пути. Затем проводили микроаррей-анализ экспрессируемых генов в этих двух популяциях.

Сравнение результатов микроаррей-анализа позволило установить, что у 1100 генов статистически значимо изменялся уровень экспрессии. Гены, у которых уровень экспрессии возрастал, анализировали с помощью методов биоинформатики. Это позволило объединить гены в функциональные группы и установить наиболее вероятные сигнальные пути, участвующие в регуляции миграции но-

ворожденных нейробластов. Затем были проведены исследования, в которых с помощью нокдаун ключевых генов удалось подтвердить, что установленные наиболее вероятные сигнальные пути действительно являются функциональными (Khodosevich et al., 2009).

С помощью лазерной микродиссекции можно выделять не только отдельные клетки, но и субклеточные структуры. Так, например, удастся вырезать отдельные метафазные хромосомы и даже их плечи (Thalhammer et al., 2004). Это позволяет получать флуоресцентные зонды с единичной хромосомы или ее фрагмента для FISH-анализа в биологии и медицине. Использование лазерной микродиссекции особенно востребовано тогда, когда хромосомы очень плохо разделяются путем проточной сортировки (Kubickova et al., 2002). Стоит отметить, что точность лазерной микродиссекции недостаточна для того, чтобы выделять отдельные бэнды хромосом. По этой причине лазерная микродиссекция не может служить альтернативой традиционной микродиссекции хромосом с помощью микроманипуляторов (Senger et al., 1990).

### Лазерная микродиссекция живых клеток

Одной из главных проблем, связанных с развитием методов культивирования клеток, на сегодняшний день остаются весьма трудоемкие и ограниченные возможности по манипулированию с культурами клеток, а также с отдельными клетками. В частности, весьма трудной до сих пор остается задача отбора клеточных колоний и отдельных клеток для дальнейшего рекультивирования. Именно с этой трудной задачей постоянно сталкиваются исследователи, когда необходимо, к примеру, чисто выделить из адгезивной культуры клетки, экспрессирующие трансген или синтезирующие определенный продукт. Другим примером в проблеме отбора клеток для рекультивирования является выделение клеток по морфологическим или иным признакам из гетерогенных клеточных культур.

Оказалось, что метод лазерной микродиссекции настолько деликатен, что позволяет решать задачу выделения живых клеток из адгезивных клеточных культур для последующего рекультивирования. Так, было продемонстрировано, что кластеры культивируемых клеток карциномы мочевого пузыря при посеве после лазерной микродиссекции способны давать новые растущие колонии (Mayer et al., 2002). Несколько циклов лазерной микродиссекции с последующим рекультивированием не оказывают влияния на жизнеспособность и клеточный цикл выделенных клеток (Stich et al., 2003). Кроме того, было показано, что после лазерной микродиссекции не происходит изменения кариотипа клеток (Langer et al., 2005a; Terstegge et al., 2009).

Показано, что после выделения колоний эмбриональных стволовых клеток человека с помощью лазерной микродиссекции с катапультированием жизнеспособность выделенных клеток составляла  $80.6 \pm 8.7\%$  (Terstegge et al., 2009). Это оказалось вполне сравнимо с жизнеспособностью колоний, выделенных традиционным методом вручную ( $88.6 \pm 1.7\%$ ). Однако в дальнейшем меньшее число областей, выделенных с помощью лазерной микродиссекции, давало начало новым колониям по сравнению с числом областей, выделенных вручную ( $36.4 \pm 9.2$  против  $53.3 \pm 11.5\%$ ). Эффективность переноса

са выделенных областей с помощью лазерной микродиссекции была также меньше по сравнению с эффективностью переноса вручную ( $72.5 \pm 7.3$  против  $98.6 \pm 0.9\%$ ). Анализ дифференцировки плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток после лазерной микродиссекции показал, что они сохраняют свои свойства. Таким образом, лазерная микродиссекция хотя и уступает в нетравматичности традиционной технике выделения вручную, но тем не менее является весьма эффективным методом выделения живых клеток.

### Применение лазерной микродиссекции в молекулярно-генетической судебно-медицинской экспертизе

Возможности лазерной микродиссекции по разделению клеточных смесей сегодня начинают активно использоваться в области молекулярно-генетической судебно-медицинской экспертизы. Так, одними из объектов молекулярно-генетических судебно-медицинских исследований являются клеточные мазки, которые берут для анализа у жертв сексуального насилия. Эти мазки представляют собой смесь сперматозоидов (клеток преступника) и других типов клеток (клеток пострадавшего) в зависимости от того, откуда взят мазок. Поэтому анализ коротких двойных повторов для генетической идентификации преступника из таких образцов затруднен. Лазерная микродиссекция позволяет преодолеть эти трудности благодаря тому, что из нанесенного на мембрану мазка могут быть вырезаны исключительно сперматозоиды (Sanders et al., 2006), из которых в дальнейшем будет выделена ДНК и проведен анализ коротких двойных повторов.

Другим примером применения лазерной микродиссекции для нужд судебно-медицинской экспертизы является выделение волосяных фолликулов из волос, обнаруженных на месте преступления (Di Martino et al., 2004). Применение лазерной микродиссекции здесь оправдано следующими факторами. Во-первых, как правило, обнаруживаемые волосы — это старые волосы, находящиеся в стадии телогена волосяного цикла. Эта стадия характеризуется малым количеством живых клеток в волосяном фолликуле. Во-вторых, сам волос состоит из кератинов, которые ингибируют полимеразную цепную реакцию (ПЦР). В-третьих, он может содержать химические вещества, снижающие эффективность выделения ДНК и ингибирующие ПЦР, а также, например, следы крови другого человека. Все это затрудняет проведение молекулярно-генетической экспертизы целого волоса. Выделение же волосяного фолликула с помощью лазерной микродиссекции позволяет решить эти проблемы.

### Подготовка проб для лазерной микродиссекции

Лазерная микродиссекция — это метод выделения определенных фрагментов ткани, отдельных клеток и субклеточных структур с помощью лазерного излучения. Соответственно поиск и выбор структур, которые предполагается выделить, производится с помощью микроскопа. Поэтому сначала требуется подготовить исследуемые образцы для анализа их под микроскопом. Именно подготовка образцов для микроскопического анализа и оказывает существенное влияние на конечный результат молекулярно-генетической экспертизы.

кулярного исследования, поскольку не используется при проведении обычного молекулярно-генетического или биохимического анализа.

Пробоподготовка материала для лазерной микродиссекции включает в себя фиксацию объекта исследования, приготовление срезов и окрашивание (если структуры интереса не могут быть выявлены без окрашивания). Поэтому важно всегда знать и контролировать влияние того или иного этапа подготовки на конечный результат.

Фиксация биоматериала обеспечивает остановку посмертных процессов и сохранение картины тканевой структуры, соответствующей исходному состоянию. Для фиксации используются различные фиксирующие жидкости. Все фиксаторы можно разделить на два класса — коагулянты и кросс-линкеры. Коагулянты останавливают посмертные процессы путем замещения воды. В качестве коагулянтов наиболее часто используют органические растворители — метанол, этанол и ацетон. Коагулянты плохо сохраняют морфологию, но не производят химической модификации белков и нуклеиновых кислот. Кросс-линкеры связывают реактивные группы аминокислот, нуклеиновых кислот и липидов ковалентными сшивками, благодаря чему хорошо сохраняется морфология. Наиболее распространенными кросс-линкерами являются формалин и глутаральдегид. Фиксаторы могут быть составными и включать в себя компоненты, относящиеся к различным классам.

Из описанных свойств фиксаторов следует, что для проведения молекулярного анализа после лазерной микродиссекции предпочтительнее использовать коагулянты. Это подтверждают и многочисленные работы, в которых проводился анализ влияния различных фиксаторов на выделение ДНК и в особенности на выделение РНК, на ее выход и качество (Scheidl et al., 2002; Uneyama et al., 2002; Delfour et al., 2006; Sonne et al., 2009). Однако для некоторых задач фиксация коагулянтами не подходит. Это может быть связано, например, с тем, что для поиска объектов интереса необходимо обеспечить сохранность морфологической структуры.

Для таких случаев может быть использован обратимый кросс-линкер дитио-бис(сукцинимидил-пропионат) (Xiang et al., 2004). Он сшивает аминокислотные группы дисульфидными связями, которые могут быть разорваны восстанавливающим агентом дитиотрейтолом. Такая фиксация обеспечивает достаточный выход и качество РНК. Другим характерным примером применения кросс-линкеров для фиксации материала, который затем предполагается использовать для лазерной микродиссекции, является фиксация головного мозга трансгенных мышей 5HT<sub>3A</sub>-EGFP низкими концентрациями параформальдегида (Khodosevich et al., 2007). В данном случае фиксация коагулянтами полностью ликвидирует флуоресценцию EGFP в клетках интереса, что делает невозможным их поиск для микродиссекции. Правда, для того чтобы выделить РНК из материала, фиксированного параформальдегидом, авторы использовали свой собственный протокол выделения, поскольку коммерчески доступные наборы не давали хорошего результата (подробнее см.: Khodosevich et al., 2007).

Были также разработаны специальные фиксаторы, после использования которых из образцов могут быть успешно выделены ДНК, РНК и белки даже после заключения в парафин. Это коммерческие фиксаторы HOPE (Uhlir et al., 2004; Goldmann et al., 2006), RCL2 (Delfour et al., 2006; Belief et al., 2008) и FineFIX (Stanta et al., 2006).

Говоря о проблеме фиксации для протеомных исследований, стоит отметить, что фиксация коагулянтами — этанолом и ацетоном, как правило, оказывает незначительное влияние на результаты двумерного гель-электрофореза (Mouldous et al., 2002; De Souza et al., 2004) и MALDI TOF масс-спектрометрии (Xu et al., 2002). Однако и в области протеомных исследований для определенных задач может быть использована фиксация формальдегидом при подготовке биоматериала, поскольку разработана техника экстракции белков из таких проб (Kroll et al., 2008).

Для того чтобы найти и выделить с помощью лазерной микродиссекции структуры интереса, их нужно, как правило, окрасить. Для этих целей используют такие рутинные гистологические окраски, как, например, гематоксилин-эозин, окраска по Нислю, толуидиновый синий, метиленовый зеленый с пиронином и др. (Mouldous et al., 2002; Xu et al., 2002; Delfour et al., 2006; Wang et al., 2006). Все эти окраски в той или иной мере оказывают влияние как на результаты анализа экспрессии генов, так и на результаты протеомного анализа.

Так, было продемонстрировано, что выход и качество тотальной РНК в случае окрашивания криосрезов клеточных комков, полученных путем центрифугирования клеток линии ТЕРС 1165, метиленовым зеленым с пиронином выше по сравнению с окрашиванием гематоксилин-эозином или по Нислю (Wang et al., 2006). Микроаррей-анализ экспрессии генов, проведенный на том же материале, показал, что в случае окрашивания метиленовым зеленым с пиронином изменения в уровне экспрессии по отношению к неокрашенному контролю обнаруживаются у меньшего числа генов, чем в случае окрашивания гематоксилин-эозином или по Нислю (Wang et al., 2006).

Рутинная окраска гематоксилин-эозином, по Нислю и толуидиновым синим существенно снижает и качество двумерного гель-электрофореза. Однако использование протоколов для менее интенсивного окрашивания (как правило, этого достигают уменьшением времени экспозиции в растворе красителя) позволяет значительно улучшить качество разделения белков с помощью двумерного гель-электрофореза, приближая его к качеству, получаемому при использовании неокрашенного материала (Mouldous et al., 2002). Однако стоит отметить, что, несмотря на эти данные, окрашивание гематоксилин-эозином остается наиболее часто используемым при подготовке материала для лазерной микродиссекции.

Для поиска структур интереса можно проводить иммуноцитохимическое окрашивание, причем как иммунопероксидазное (Fend et al., 1999), так и иммунофлуоресцентное (Burbach et al., 2004; Xiang et al., 2004), а также гибридную *in situ* и FISH (Fassunke et al., 2004; Langer et al., 2005b). Стоит заметить, что одной из характерных модификаций иммуноцитохимического окрашивания для лазерной микродиссекции является значительное сокращение времени инкубации в растворах антител. Так, в одной из работ для выявления астроцитов в криосрезах мозга, фиксированных ацетоном, условия иммунофлуоресцентного окрашивания были подобраны таким образом, что время инкубации в растворе первичных антител против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) составило 5 мин, а в растворе вторичных антител — 2 мин (Burbach et al., 2004). Для сравнения, при обычном иммуноцитохимическом окрашивании для детальных цитологических и морфологических исследований инкубация в растворе первичных антител, как правило, длится 1 сут.

Такой подход быстрого иммуноцитохимического окрашивания направлен на сохранение качества молекулярного материала для его анализа после процедуры лазерной микродиссекции.

Хорошо известно, что в нервной системе определенные популяции нейронов могут быть визуализированы с применением флуоресцентных маркеров, транспортирующихся ретроградно, таких как, например, тетраметилродамин, связанный с декстраном. Такой подход является вполне подходящим для выявления структур интереса в ЦНС, которые затем предполагается выделить с помощью лазерной микродиссекции для последующего анализа экспрессии генов (Ruge et al., 2008).

В подготовке проб биоматериала для лазерной микродиссекции есть еще одна существенная проблема — оптическая. Во-первых, препарат устанавливается таким образом, что объектив микроскопа всегда смотрит сквозь предметное стекло. Конденсор загорожен контейнером. В качестве контейнера выступает матовая крышечка центрифужной пробирки, которая сильно рассеивает свет. Во-вторых, подготовленные для лазерной микродиссекции срезы ткани не могут быть помещены в традиционные среды для заключения с большими показателями преломления, которые обеспечивают высокое качество микроскопического изображения. Связано это, как понятно из представленных схем, с самой техникой лазерной микродиссекции. Приготовленные для лазерной микродиссекции препараты — это срезы ткани, высушенные на воздухе и не просветленные, поэтому качество микроскопического изображения и, в частности, оптическое разрешение будут всегда невысокими. Однако качество микроскопического изображения может быть немного улучшено. Так, в одном исследовании (Van Dijk et al., 2003) было предложено использовать водорастворимую клейкую среду PinPoint solution (Pinpoint slide DNA isolation system; Zymo Research, Orange, USA; www.zymor.com). Эта среда после высыхания заполняет равномерно всю толщину среза, просветляя его и улучшая, таким образом, качество микроскопического изображения. При этом среда не оказывает никакого влияния на саму процедуру лазерной микродиссекции и на результаты последующего молекулярно-генетического анализа.

Таким образом, подготовка проб материала для лазерной микродиссекции является нетривиальной задачей и требует постоянного контроля со стороны исследователя. Как правило, подбор способов фиксации материала и окрашивания сводится к поиску компромисса между возможностью визуализировать под микроскопом структуры интереса и качеством получаемых результатов молекулярно-генетического и биохимического анализа.

### Заключение

Лазерное излучение находит все более широкое применение в различных областях молекулярной и клеточной биологии, а также биохимии. Использование лазерного луча, сфокусированного объективом микроскопа, в качестве «режущего» инструмента позволяет выделять объекты интереса микроскопических размеров с высокой точностью. Благодаря этому лазерная микродиссекция стала революционным методом, который вывел молекулярный анализ на уровень индивидуальных клеток и даже субклеточных структур. Это дает возможность решать принципиально новые задачи и углублять уже полученные знания.

Пожалуй, одним из наиболее перспективных применений лазерной микродиссекции является выделение живых клеток из адгезивных клеточных культур для последующего рекультивирования, поскольку предоставляет новые возможности для проведения исследований в области клеточных технологий.

На сегодняшний день появляется все больше и больше исследований, в которых была применена лазерная микродиссекция для выделения областей интереса из срезов органов и тканей. Абсолютно очевидно, что использование лазерной микродиссекции в подготовке материала для молекулярных исследований в скором времени станет одним из обязательных требований, предъявляемых к таким исследованиям, поскольку позволяет точно контролировать, из каких структур биологического образца выделяются ДНК, РНК, белки или же иные продукты метаболизма клеток.

Авторы выражают глубокую признательность Л. П. Незлину (Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН) за критический обзор текста и существенные замечания по содержанию и изложению материала.

### Список литературы

- Кекеева Т. В., Попова О. П., Шегай П. В., Алексеев Б. Я., Андреева Ю. Ю., Залетаев Д. В., Немцова М. В. 2007. Аномальное метилирование генов p16, HIC1, N33 и GSTP1 в эпителии и стромальных клетках рака предстательной железы. Молекуляр. биол. 41 (1) : 79—85.
- Кекеева Т. В., Попова О. П., Шегай П. В., Завалишина Л. Э., Андреева Ю. Ю., Залетаев Д. В., Немцова М. В. 2008. Потеря гетерозиготности и микросателлитная нестабильность в стромальных и эпителиальных клетках рака предстательной железы. Молекул. биол. 42 (1) : 96—101.
- Belief V., Boissiere F., Bibeau F., Desmetz C., Berthe M. L., Rochaix P., Maudelonde T., Mange A., Solassol J. 2008. Proteomic analysis of RCL2 paraffin-embedded tissues. J. Cell Mol. Med. 12 : 2027—3206.
- Burbach G. J., Dehn D., Nagel B., Del Turco D., Deller T. 2004. Laser microdissection of immunolabeled astrocytes allows quantification of astrocytic gene expression. J. Neurosci. Methods. 138 : 141—148.
- Coochill T. P. 2002. Uses and effects of ultraviolet radiation on cells and tissue. In: Lasers in medicine. Boca Raton: CRC Press. 86—108.
- Delfour C., Roger P., Bret C., Berthe M. L., Rochaix P., Kalfa N., Raynaud P., Bibeau F., Maudelonde T., Bouille N. 2006. RCL2, a new fixative, preserves morphology and nucleic acid integrity in paraffin-embedded breast carcinoma and microdissected breast tumor cells. J. Mol. Diagn. 8 : 157—169.
- De Souza A. I., McGregor E., Dunn M. J., Rose M. L. 2004. Preparation of human heart for laser microdissection and proteomics. Proteomics. 4 : 578—586.
- Dietrich D., Lesche R., Tetzner R., Krispin M., Dietrich J., Hedicke W., Schuster M., Kristiansen G. 2009. Analysis of DNA methylation of multiple genes in microdissected cells from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. J. Histochem. Cytochem. 57 : 477—489.
- Di Martino D., Giuffrè G., Staiti N., Simone A., Todaro P., Saravo L. 2004. Laser microdissection and DNA typing of cells from single hair follicles. Forensic Sci. Int. 146 : 155—157.
- Emmert-Buck M. R., Bonner R. F., Smith P. D., Chuqui R. F., Zhuang Z., Goldstein S. R., Weiss R. A., Liotta L. A. 1996. Laser capture microdissection. Science. 274 : 998—1001.
- Fassunke J., Majores M., Ullmann C., Elger C. E., Schramm J., Wiestler O. D., Becker A. J. 2004. In situ-RT and immunolaser microdissection for mRNA analysis of individual cells

- isolated from epilepsy-associated glioneuronal tumors. *Lab. Invest.* 84 : 1520—1525.
- Fend F., Emmert-Buck M. R., Chuahqui R., Cole K., Lee J., Littotta L. A., Raffeld M. 1999. Immuno-LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis. *Amer. J. Pathol.* 154 : 61—66.
- Gjerdrum L. M., Sorensen B. S., Kjeldsen E., Sorensen F. B., Nexø E., Hamilton-Dutoit S. 2004. Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma: an alternative method for HER-2/neu analysis. *J. Mol. Diagn.* 6 : 42—51.
- Goldmann T., Burgemeister R., Sauer U., Loeschke S., Lang D. S., Branscheid D., Zabel P., Vollmer E. 2006. Enhanced molecular analyses by combination of the HOPE-technique and laser microdissection. *Diagn. Pathol.* 1 : 2. doi:10.1186/1746-1596-1-2.
- Isenberg G., Bieler W., Meier-Ruge W., Remy E. 1976. Cell surgery by laser microdissection: a preparative method. *J. Microsc.* 107 : 19—24.
- Kawahara Y., Sun H., Ito K., Hideyama T., Aoki M., Sobue G., Tsuji S., Kwak S. 2006. Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA. *Neurosci. Res.* 54 : 11—14.
- Kernek K. M., Ulbright T. M., Zhang S., Billings S. D., Cummings O. W., Henley J. D., Michael H., Brunelli M., Martignoni G., Foster R. S., Eble J. N., Cheng L. 2003. Identical allelic losses in mature teratoma and other histologic components of malignant mixed germ cell tumors of the testis. *Amer. J. Pathol.* 163 : 2477—2484.
- Khodosevich K., Inta D., Seeburg P. H., Monyer H. 2007. Gene expression analysis of *in vivo* fluorescent cells. *PLoS One.* 2 : e1151.
- Khodosevich K., Seeburg P. H., Monyer H. 2009. Major signaling pathways in migrating neuroblasts. *Front. Mol. Neurosci.* 2 : 7. doi:10.3389/neuro.02.007.2009.
- Kroll J., Becker K. F., Kuphal S., Hein R., Hofstadter F., Boserhoff A. K. 2008. Isolation of high quality protein samples from punches of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks. *Histol. Histopathol.* 23 : 391—395.
- Kubickova S., Cernohorska H., Musilova P., Rubes J. 2002. The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. *Chromosome Res.* 10 : 571—575.
- Kwapiszewska G., Meyer M., Bogumil R., Bohle R. M., Seeger W., Weissmann N., Fink L. 2004. Identification of proteins in laser-microdissected small cell numbers by SELDI-TOF and Tandem MS. *BMC Biotechnol.* 4 : 30. doi:10.1186/1472-6750-4-30.
- Langer S., Geigl J. B., Ehnle S., Gangnus R., Speicher M. R. 2005a. Live cell catapulting and recultivation does not change the karyotype of HCT116 tumor cells. *Cancer Genet. Cytogenet.* 161 : 174—177.
- Langer S., Geigl J. B., Gangnus R., Speicher M. R. 2005b. Sequential application of interphase-FISH and CGH to single cells. *Lab. Invest.* 85 : 582—592.
- Leethanakul C., Patel V., Gillespie J., Shillito E., Kellman R. M., Ensley J. F., Limwongse V., Emmert-Buck M. R., Krizman D. B., Gutkind J. S. 2000. Gene expression profiles in squamous cell carcinomas of the oral cavity: use of laser capture microdissection for the construction and analysis of stage-specific cDNA libraries. *Oral Oncol.* 36 : 474—483.
- Ling G., Persson A., Berne B., Uhlen M., Lundberg J., Ponten F. 2001. Persistent p53 mutations in single cells from normal human skin. *Amer. J. Pathol.* 159 : 1247—1253.
- Markaryan A., Nelson E. G., Tretiakova M., Hinojosa R. 2008. Technical report: laser microdissection of cochlear structures from celloidin embedded human temporal bone tissues and detection of the mitochondrial DNA common deletion using real time PCR. *Hear Res.* 244 : 1—6.
- Martinet W., Abbeloos V., Van Acker N., De Meyer G. R., Herman A. G., Kockx M. M. 2004. Western blot analysis of a limited number of cells: a valuable adjunct to proteome analysis of paraffin wax-embedded, alcohol-fixed tissue after laser capture microdissection. *J. Pathol.* 202 : 382—388.
- Mayer A., Stich M., Brocksch D., Schutze K., Lahr G. 2002. Going *in vivo* with laser microdissection. *Methods Enzymol.* 356 : 25—33.
- Meier-Ruge W., Bielser W., Remy E., Hillenkamp F., Nitsche R., Unsold R. 1976. The laser in the Lowry technique for microdissection of freeze-dried tissue slices. *Histochem. J.* 8 : 387—401.
- Mouledous L., Hunt S., Harcourt R., Harry J., Williams K., Gutstein H. 2002. Lack of compatibility of histological staining methods with proteomic analysis of laser-capture microdissected brain samples. *J. Biomol. Tech.* 13 : 258—264.
- Newrzella D., Pahlavan P. S., Krüger C., Boehm C., Sorgenfrei O., Schröck H., Eisenhardt G., Bischoff N., Vogt G., Wafzig O., Rossner M., Maurer M. H., Hiemisch H., Bach A., Kuschinsky W., Schneider A. 2007. The functional genome of CA1 and CA3 neurons under native conditions and in response to ischemia. *BMC Genomics.* 8 : 370. doi:10.1186/1471-2164-8-370.
- Niemz M. H. 2004. Laser-tissue interactions: fundamentals and applications. Berlin; Heidelberg; New York: Springer. 308 p.
- Ryge J., Westerdahl A. C., Alstrom P., Kiehn O. 2008. Gene expression profiling of two distinct neuronal populations in the rodent spinal cord. *PLoS One.* 3 : e3415.
- Sanders C. T., Sanchez N., Ballantyne J., Peterson D. A. 2006. Laser microdissection separation of pure spermatozoa from epithelial cells for short tandem repeat analysis. *J. Forensic. Sci.* 51 : 748—757.
- Schad M., Mungur R., Fiehn O., Kehr J. 2005. Metabolic profiling of laser microdissected vascular bundles of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods.* 1 : 2. doi:10.1186/1746-4811-1-2.
- Scheidl S. J., Nilsson S., Kalen M., Hellstrom M., Takemoto M., Hakansson J., Lindahl P. 2002. mRNA expression profiling of laser microbeam microdissected cells from slender embryonic structures. *Amer. J. Pathol.* 160 : 801—813.
- Schütze K., Lahr G. 1998. Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat. Biotechnol.* 16 : 737—742.
- Schütze K., Posl H., Lahr G. 1998. Laser micromanipulation systems as universal tools in molecular biology and medicine. *Cell. Mol. Biol.* 44 : 735—746.
- Senger G., Lüdecke H. J., Horsthemke B., Claussen U. 1990. Microdissection of banded human chromosomes. *Hum. Genet.* 84 : 507—511.
- Shi X., Kleeff J., Zhu Z. W., Schmied B., Tang W. H., Zimmermann A., Buchler M. W., Friess H. 2003. Gene-expression analysis of single cells-nested polymerase chain reaction after laser microdissection. *World J. Gastroenterol.* 9 : 1337—1341.
- Sonne S. B., Dalgaard M. D., Nielsen J. E., Høe-Hansen C. E., Rajpert-De Meyts E., Gjerdrum L. M., Leffers H. 2009. Optimizing staining protocols for laser microdissection of specific cell types from the testis including carcinoma *in situ*. *PLoS One.* 4 : e5536.
- Stanta G., Mucelli S. P., Petrera F., Bonin S., Bussolati G. 2006. A novel fixative improves opportunities of nucleic acids and proteomic analysis in human archive's tissues. *Diagn. Mol. Pathol.* 15 : 115—123.
- Stich M., Thalhammer S., Burgemeister R., Friedemann G., Ehnle S., Luthy C., Schutze K. 2003. Live cell catapulting and recultivation. *Pathol. Res. Pract.* 199 : 405—409.
- Takeshima Y., Amatya V. J., Daimaru Y., Nakayori F., Nakano T., Inai K. 2001. Heterogeneous genetic alterations in ovarian mucinous tumors: application and usefulness of laser capture microdissection. *Hum. Pathol.* 32 : 1203—1208.
- Terstegge S., Rath B. H., Laufenberg I., Limbach N., Buchstaller A., Schutze K., Brustle O. 2009. Laser-assisted selection and passaging of human pluripotent stem cell colonies. *J. Biotechnol.* 143 : 224—230.
- Thalhammer S., Langer S., Speicher M. R., Heckl W. M., Geigl J. B. 2004. Generation of chromosome painting probes from single chromosomes by laser microdissection and linker-adaptor PCR. *Chromosome Res.* 12 : 337—343.
- Uhlig U., Uhlig S., Branscheid D., Zabel P., Vollmer E., Goldmann T. 2004. HOPE technique enables Western blot analysis from paraffin-embedded tissues. *Pathol. Res. Pract.* 200 : 469—472.



Uneyama C., Shibutani M., Masutomi N., Takagi H., Hirose M. 2002. Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected, paraffin-embedded tissue specimens. *J. Histochem. Cytochem.* 50 : 1237—1245.

Van Dijk M. C., Rombout P. D., Dijkman H. B., Ruiter D. J., Bernsen M. R. 2003. Improved resolution by mounting of tissue sections for laser microdissection. *Mol. Pathol.* 56 : 240—243.

Vogel A., Lorenz K., Horneffer V., Huttmann G., von Smolinski D., Gebert A. 2007. Mechanisms of laser-induced dissection and transport of histologic specimens. *Biophys. J.* 93 : 4481—4500.

Wang H., Owens J. D., Shih J. H., Li M. C., Bonner R. F., Muskhinski J. F. 2006. Histological staining methods preparatory to laser capture microdissection significantly affect the integrity of the cellular RNA. *BMC Genomics.* 7 : 97. doi:10.1186/1471-2164-7-97.

Xiang C. C., Mezey E., Chen M., Key S., Ma L., Brownstein M. J. 2004. Using DSP, a reversible cross-linker, to fix tissue sections for immunostaining, microdissection and expression profiling. *Nucl. Acids Res.* 32 : e185.

Xu B. J., Caprioli R. M., Sanders M. E., Jensen R. A. 2002. Direct analysis of laser capture microdissected cells by MALDI mass spectrometry. *J. Amer. Soc. Mass. Spectrom.* 13 : 1292—1297.

Поступила 29 XI 2011

## LASER MICRODISSECTION FOR BIOLOGY AND MEDICINE

O. V. Podgorny,<sup>1,2</sup> V. N. Lasarev,<sup>1</sup> V. M. Govorun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physical-Chemical Medicine, FMBA,  
and <sup>2</sup>N. K. Kol'zov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow;  
e-mail: olegpodgorny@inbox.ru

For routine extraction of DNA, RNA, proteins and metabolites, small tissue pieces are placed into lysing solution. These tissue pieces in general contain different cell types. For this reason, lysate contains components of different cell types, which complicates the interpretation of molecular analysis results. The laser microdissection allows overcoming this trouble. The laser microdissection is a method to procure tissue samples contained defined cell subpopulations, individual cells and even subcellular components under direct microscopic visualization. Collected samples can be undergone to different downstream molecular assays: DNA analysis, RNA transcript profiling, cDNA library generation and gene expression analysis, proteomic analysis and metabolite profiling. The laser microdissection has wide applications in oncology (research and routine), cellular and molecular biology, biochemistry and forensics. This paper reviews the principles of different laser microdissection instruments, examples of laser microdissection application and problems of sample preparation for laser microdissection.

Key words: laser microdissection, methods of molecular biology and biochemistry.