



Лазерная микродиссекция и катапультирование PALM



Лазерная микросистема позволяет успешно решать задачу проведения микроопераций с биообъектами – выделение интересующего элемента (например, живой клетки, хромосомы, макромолекулы определенного вида) из имеющегося биологического материала без его загрязнения и повреждения.

Сфокусированный УФ-лазерный луч (длина волны не более 350 нм) длительностью всего в 3 наносекунды не только аккуратно вырезает нужный микрообъект, но и катапультирует его в

улавливающий микроконтейнер, отделяя таким образом от остального материала. Мощность лазерного пучка и фокусировка автоматически регулируются с большой точностью. Этим же лазерным лучом можно предварительно разрушить в исследуемом образце те элементы, которые могут мешать выделению (иссечению и катапультированию) нужного объекта.

Принцип лазерного иссечения с помощью УФ-лазера, заложенный в микросистеме PALM (компания PALM Microlaser Technology недавно объединилась с корпорацией Carl Zeiss), основан на явлении так называемого "абляционного фоторазложения" - фотохимического процесса уноса массы с поверхности твердого тела без теплообмена с окружающей средой. Узкий лазерный пучок фокусируется чуть ниже биологического объекта, на подложке, на которой он расположен. В фокусе пучка достигается экстремально высокая плотность фотонов (плотность энергии более 1012 Вт/см²), которая достаточна для разрыва молекулярных связей биомолекул на ионы, электроны и другие частицы, т.е. для образования плазмы. Формирование и разрушение микроплазмы вблизи фокальной точки лазера происходит в течение наносекунд, то есть настолько быстро, что не происходит теплопереноса за границы сфокусированного лазерного пятна.

Этот же процесс является движущей силой катапультирования. Все происходящее визуализируется с помощью видеокамеры и записывается на управляющий компьютер, где хранится подробная информация обо всех манипуляциях и экспериментах. Компьютер регулирует скорость вырезания объекта, интенсивность лазерного луча, позиционирует луч в интересующем месте и т.д.

Использование дополнительного ИК-лазерного луча позволяет при необходимости точно удерживать биологические объекты в растворе в определенном положении, сближать их (например, клетки) для последующих манипуляций.

Микродиссекция может использоваться для огромного числа манипуляций с биологическими и медицинскими объектами: выделения и анализа ДНК, РНК, хромосом и изучения экспрессии генов, клонирования, культивирования клеток, исследования раковых тканей, искусственного оплодотворения и т.д.

Возможности и актуальные приложения метода лазерной микродиссекции.

Общие принципы работы PALM Microdissection Combi System, а также основы происходящих физических процессов наиболее кратко и доступно представлены в брошюре **Microdissection from Carl Zeiss – “Laser Micromanipulation in Life Sciences”**.

I. Выделение одной или нескольких клеток для микроэррей исследований: разработка молекулярных маркеров для персонафицированной медицины.

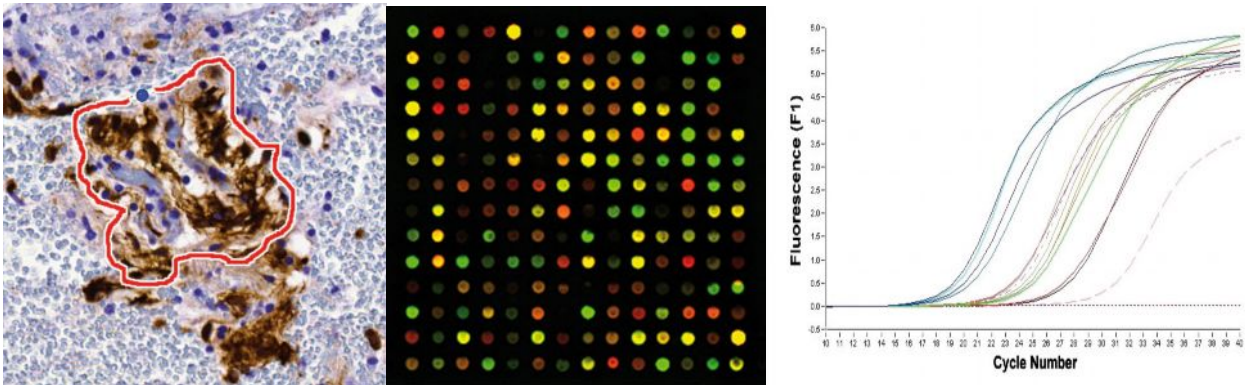


Рис. 1. Выделение и анализ отдельных клеточных популяций из препарата целостной ткани.

В тканевом препарате патологически измененные клетки могут представлять собой меньшинство, и характерные для них гены окажутся скрытыми при исследовании такого материала. Отделение одной клетки или определенной клеточной популяции позволяет описать специфическую именно для этой популяции экспрессию. При использовании микроэррей методов даже на малом количестве материала можно обнаружить молекулярный маркер данного типа клеток.

II. Протеомный анализ: поиск биомаркеров и идентификация в опухолях.

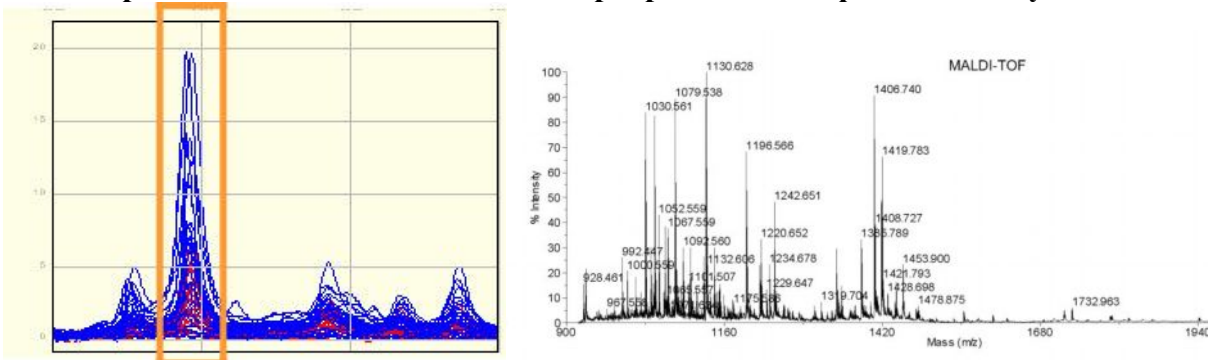


Рис. 2. Лазерная микродиссекция позволяет собрать достаточное количество чистого материала для протеомного анализа опухолей.

Протеомный анализ представляет собой одну из наиболее сложных задач в биологии на протяжении последних 20 лет, поскольку клетки каждого органа и даже его частей существенно различаются по составу белков. Для достижения наилучших результатов в протеомных исследованиях перед анализом оказывается весьма полезным разделить различные функциональные области ткани. Метод лазерной микродиссекции позволяет легко разделить функциональные области ткани. После этого выделенные области, например, опухолевой ткани могут быть проанализированы отдельно от смежных с ними здоровых участков и сравнены с ними. Подобный подход позволит обнаружить,

определить и охарактеризовать маркерные белки данной опухоли. При таком подходе могут быть определены белки, ответственные за инвазию и метастазирование.

III. Анализ индивидуальной клетки



Рис. 3. Лазерная микродиссекция и катапультирование отдельной стволовой клетки ValbC; после катапультирования первое деление произошло через 3 дня, через 13 дней сформировалась новая колония.

Структурные и функциональные характеристики клеток зависят от специфической экспрессии генов. Метод лазерной микродиссекции позволяет изучать и сравнивать генетическую экспрессию на уровне одной клетки, что предоставляет широкий спектр возможностей как для фундаментальных, так и прикладных исследований. Даже чистые клеточные популяции далеки от того, чтобы быть гомогенными. Новые методы исследования на уровне единственной клетки делают возможным детальный анализ внутриклеточных процессов. В сочетании с различными методами анализа, метод лазерной микродиссекции представляет собой перспективную платформу для подобных исследований.

IV. Получение чистых культур клеток

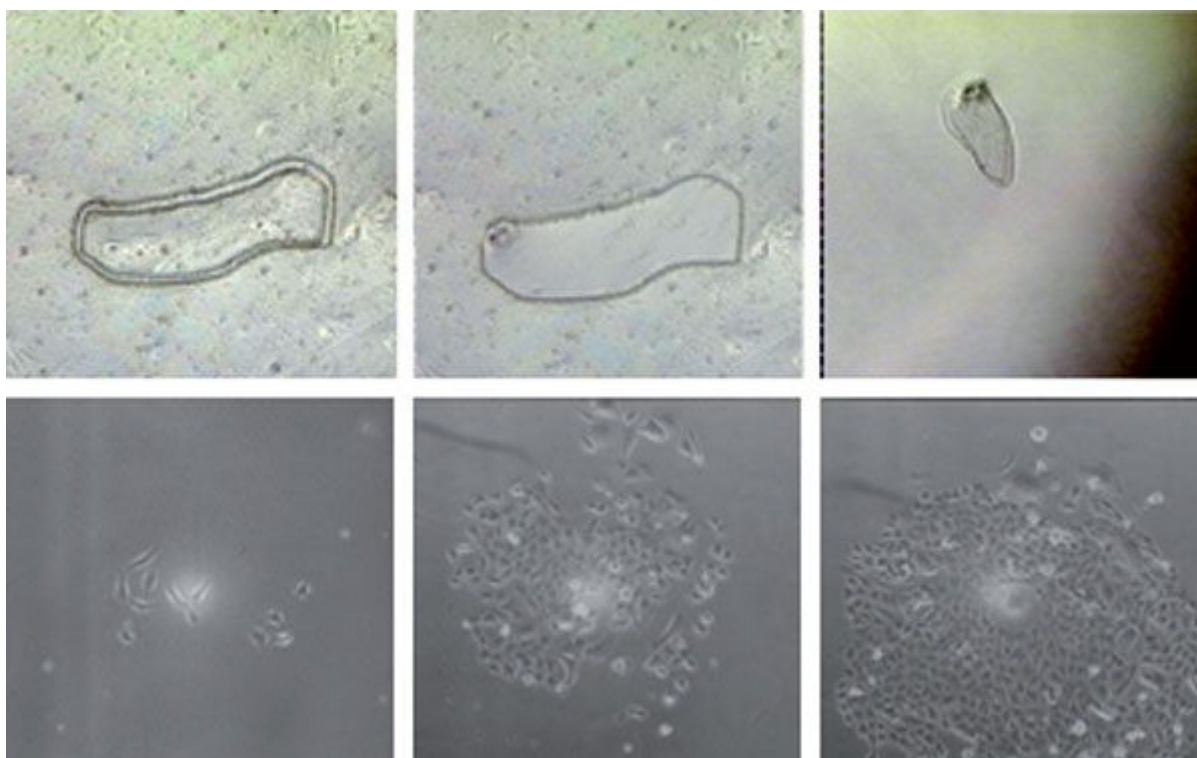


Рис. 4. Рекультивирование чистой культуры клеток после лазерной микродиссекции из смешанной культуры.

При получении первичной культуры часто основной проблемой является загрязнение целевой группы клеток сопутствующими. С помощью PALM Microdissection Combi System можно выбирать только необходимые экспериментатору клетки и рекультивировать их, получая чистую культуру.

Более того, система позволяет получать флуоресцентные изображения исследуемых клеток в культуре или ткани. Таким образом, будучи мечеными по определенному маркерному белку, клетки могут выделены отдельно от сопутствующих.

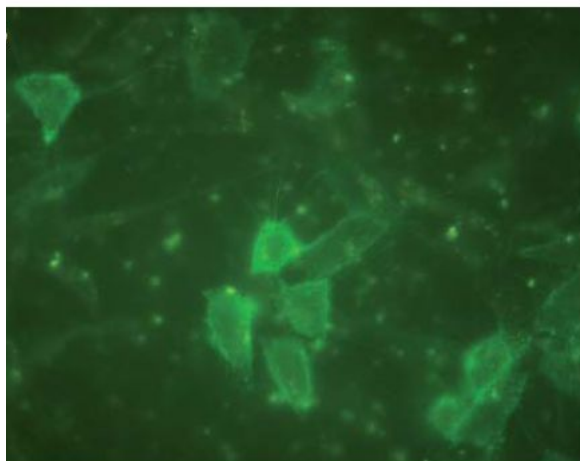


Рис. 4. Флуоресценция стволовых клеток RM26, экспрессирующих маркер CD 34. После микродиссекции, катапультирования и рекультивирования экспрессия маркера сохраняется.

Например, трансфицированные определенным геном клетки могут быть помечены зеленым флуоресцентным белком. Зачастую трансфицированные клетки составляют небольшую часть всей культуры. Однако с помощью метода лазерной микродиссекции такие клетки могут быть выделены и рекультивированы в виде чистых клонов. Следует отметить, что все операции при этом совершаются бесконтактно, неинвазивно и при сохранении стерильности.

V. Микрохирургия и микроповреждение отдельных клеток и их частей в культуре

Довольно распространенной моделью клеточного повреждения является травматическое повреждение. PALM Microdissection Combi System предоставляет возможность бесконтактного нанесения микроповреждения отдельной клетки или её части. Так, например, постановка аксотомии – отрезания аксона нервной клетки, не представляет собой сложной задачи для системы.

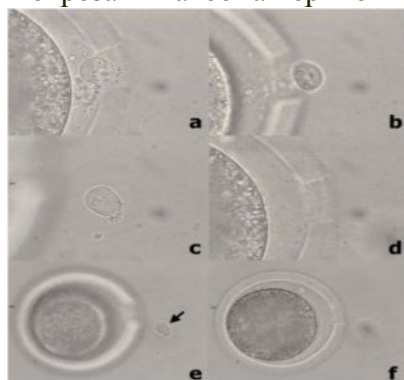


Рис. 5. Выделение полярного тельца из ооцита коровы при использовании комбинации метода лазерной микродиссекции и оптического пипета.

Кроме того, поскольку система оборудована инфракрасным лазером, создающим оптическую ловушку, можно бесконтактно перемещать микрообъекты внутри клетки и снаружи её. Таким образом, PALM Microdissection Combi System является инструментом для микрохирургии клеток в культуре.

Стоит заметить, что при работе с живыми клетками можно соблюсти стерильность, поскольку все операции выполняются бесконтактно.

VI. Сортировка различных типов клеток.

Будучи определены морфологически или по флуоресценции каких-либо маркеров, клетки могут быть отсортированы с помощью лазерного пинцета – оптической ловушки.

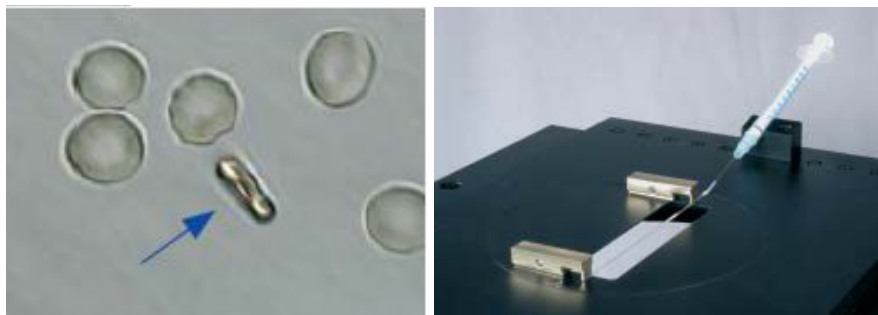


Рис. 6. Перемещение и сортировка эритроцитов в капилляре с помощью оптического пинцета.

Благодаря наличию держателей образцов различной формы, подобная сортировка может проводиться в капилляре, чашках Петри, на стекле или в культуральном планшете.

VII. Судебно-медицинские экспертизы.

ДНК – типирование биологического материала широко применяется в судебных и медицинских экспертизах во всем мире, поскольку каждый индивид обладает уникальным набором генов. Однако препятствием для применения данных методов является сложность получения генетического материала должного качества.

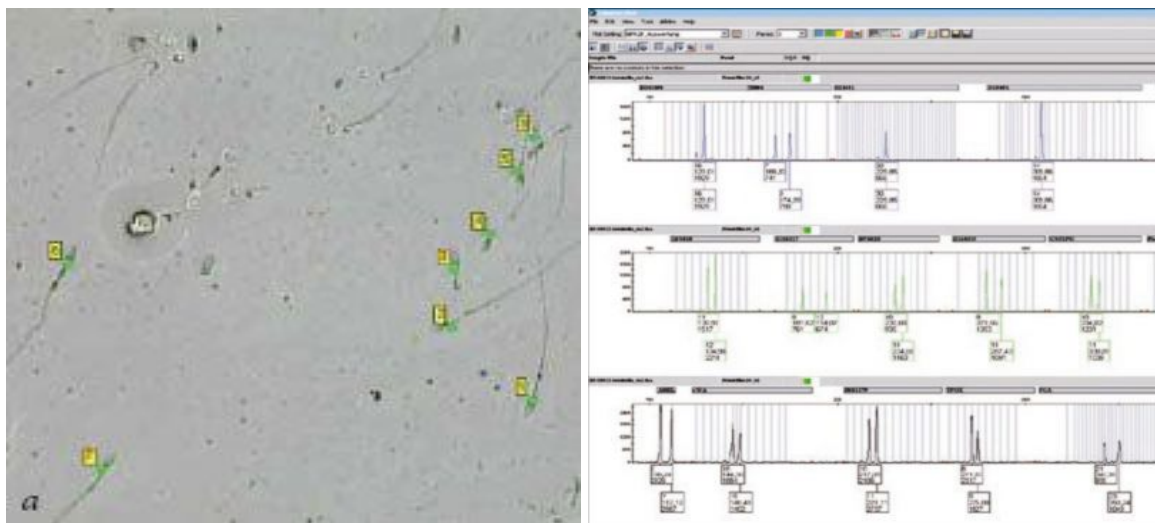


Рис. 7. Отбор сперматозоидов и анализ генетического материала.

Использование технологии лазерной микродиссекции в целях судебных экспертиз получает все более и более широкое признание в мире. Бесконтактное вычленение и сбор клеток без дополнительных воздействий представляет собой совершенный подход, позволяющий избежать потерь материала и его загрязнения. PALM Microdissection Combi System является идеальным инструментом для выполнения подобных задач.

VIII. Хромосомные исследования

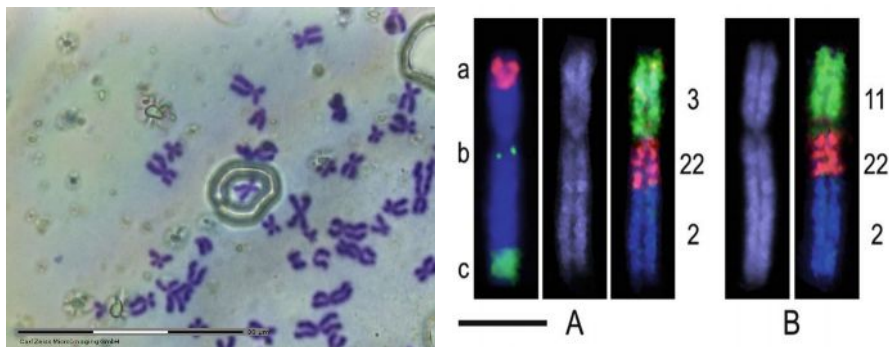


Рис. 8. Выделение и анализ отдельных хромосом.

Молекулярная цитогенетика представляет собой ведущую отрасль изучения человеческого, животного, растительного и бактериального геномов. Видимые под микроскопом перестройки хромосом составляют немаловажную часть исследований. Однако для анализа этих процессов на молекулярном уровне часто бывает необходимо быстро и без загрязнения выделить отдельные хромосомы. Лазерная микродиссекция позволяет решать такие задачи, быстро переходя от цитогенетических наблюдений к молекулярным исследованиям.

IX. О применении к стволовым клеткам

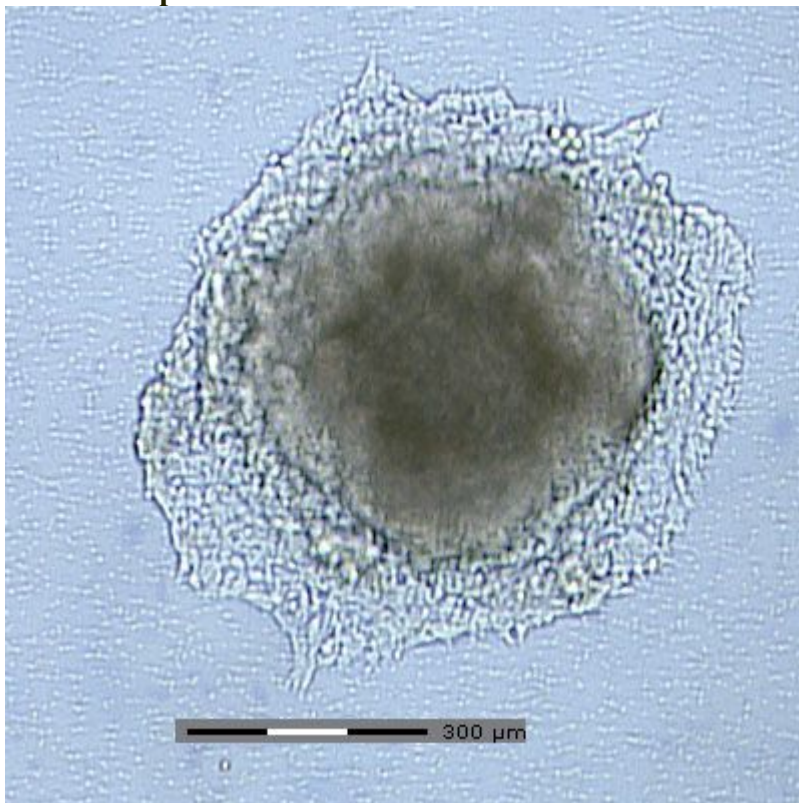


Рис. 9. Целый агрегат стволовых клеток, выделенный с помощью лазерной бесконтактной микродиссекции.

Стволовые клетки экспрессируют целый набор специфических маркеров плюрипотентности. Уровень экспрессии этих маркеров весьма существенен в недифференцированных клетках. Любые манипуляции с эмбриональными или зрелыми стволовыми клетками могут вызвать их дифференцировку, сопровождающуюся изменениями в морфологии и экспрессии маркеров плюрипотентности. Используя уникальную технологию лазерной микродиссекции, реализованную в PALM Microdissection Combi System, можно изолировать и использовать в экспериментах без

изменения экспрессии маркеров. Кроме того, стволовые клетки можно разделять на гомогенные субпопуляции, а также отсортировать эмбрионидные тельца.

X. Исследования растительных объектов: анализ генома растений, исследование молекулярных маркеров и селекция.

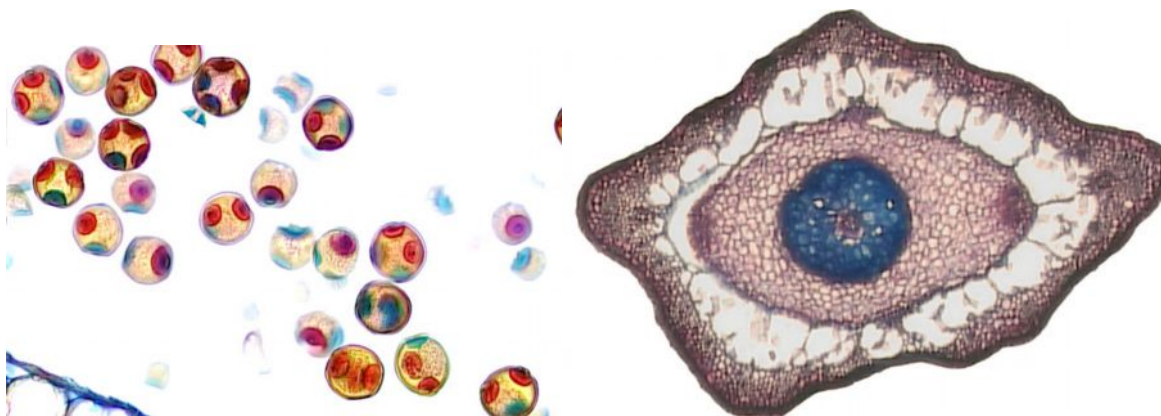


Рис. 9. Лазерная микродиссекция может применяться также для отбора генетического материала в целях селекции растений.

Долгое время сравнительная анатомия, физиология и эмбриология служили основой для селекционеров и ботаников во всем мире. При сохранении важности упомянутых подходов все более важную роль в последние годы стал приобретать анализ молекулярных маркеров. Будучи однажды определены, эти маркеры позволяют выделять с помощью лазерного микродиссектора генетические единицы с гораздо более высокой точностью, увеличивая таким образом эффективность селекции.

Ссылка:

Сайт <http://www.zeiss.de>,

Основные материалы касательно PALM Microdissection Combi System представлены на странице <http://www.zeiss.de/c12567be0045acf1/Contents-Frame/a10e754d858edd65c1256fb30034098e>