

激光显微切割技术在药用植物学研究中的应用

刘富裕, 郭庆梅*

山东中医药大学药学院, 济南250355

摘要: 激光显微切割技术是最近发展起来的一种新兴技术, 它结合激光与显微镜的功能, 主要用于分离复杂组织中的单一细胞及类群, 从而为更精确地了解药用植物提供一定的技术支持。本综述概述了现有的激光显微切割技术及其在组织化学定位、分子生物学、植物生长调控以及与微生物相互作用等方面的应用。

关键词: 激光显微切割技术; 药用植物; 综述

激光显微切割技术(laser microdissection, LMD)是在显微镜下利用微激光束从不同的组织中快速切割、分离和纯化生物体的目标组织、细胞及其组分, 然后用于细胞和分子生物学研究的一种技术, 它是显微观察和分子生物学研究之间的桥梁。激光显微切割包括激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)、激光辅助显微切割(laser-assisted microdissection, LAM)及压力弹射激光显微切割(laser microdissection and pressure catapulting, LMPC)等。不同的名称源自它们略有差别的工作系统, 但原理都是选择性地将组织碎片或目标细胞粘附到由低能红外激光脉冲激活的热塑膜[乙烯乙酸乙烯酯(ethylene vinylacetate, EVA)膜]上(Mahalingam等2018)。激光显微切割系统包括倒置显微镜、固态红外激光二极管、激光控制单元、操纵杆控制的显微镜载物台、用于载玻片固定的真空吸盘、CCD相机和彩色显示器(Fend等2000)。起初, 人们只是利用激光显微切割来分离细胞, 从而用于诊断和治疗疾病, 直到1996年, 激光显微切割技术才开始用于植物研究。2003年以后, 其在植物研究发展中的应用越来越受重视。如今, 激光显微切割技术在药用植物方面的应用主要包括组织化学定位以及分子生物学、植物生长调控以及与微生物的相互作用等研究。

1 激光显微切割技术

1.1 一般操作流程

试样准备(组织固定, 切片, 染色)→显微切割→后续实验。

1.1.1 试样制备

(1) 组织固定

组织固定可分为两种: 化学固定和冷冻固定。化学固定常用基于醛的固定剂(例如, 10%福尔马林), 其具有成本低并且能够快速、完全穿透组织的优点; 但是福尔马林是一种附加固定剂, 它会在DNA与蛋白质、蛋白质与蛋白质、DNA与DNA之间产生交联, 所以大分子通常会严重受损(Mahalingam等2018)。冷冻切片由于不含化学固定剂而不会发生交联, 因此可以获得高质量的mRNA和蛋白质; 但是冷冻通常会破坏组织结构, 所以也存在一定的限制。

(2) 组织切片

组织切片的厚度具有一定的要求, 切片太薄通常需要多次显微切割才能获得足够数量的细胞; 而切片太厚会使显微镜分辨率变低, 从而不能清晰地找到靶细胞(Mahalingam等2018)。此外, 实验目的不同, 所需切片厚度也不同; 组织化学定位的切片最佳厚度为30~40 μm , 基因表达分析为8~30 μm , 生长调控研究为10~16 μm , 植物与微生物作用研究为10~20 μm 。

(3) 染色

染色时组织切片浸泡于染料溶液中的时间应尽量较短, 才能避免干扰所需的大分子。染色时间越短, 蛋白质改变越少, 因接触试剂而发生化学修饰的风险也会越小。通常情况下, 组织切片在染料溶液中几秒钟就可完成染色, 染色完成后应快

收稿 2019-07-15 修定 2019-08-28

资助 山东省重点研发计划项目(2018GSF119004)。

* 通讯作者(qmguo@sina.com)。

速洗去多余的染料。常用的染色剂有苏木精(hematoxylin)、曙红(eosin)、亚甲蓝(methylene blue)、瑞氏-吉姆萨复合染色液(Wright-Giemsa)、甲苯胺蓝(toluidine blue)等(Mahalingam等2018)。

1.1.2 显微切割

将目标切片放到载物台上,然后在10、20、40或100倍镜下选择目标组织或细胞,切割后的组织或细胞落入收集管内。载物台的移动、切割路径的选择、切割长度的测量、聚焦、激光能量、切割速度、拍照、保存、收集等都可自行设置(Mahalingam等2018)。激光显微切割基本过程为:经组织切片后的材料置于特定的载玻片上,并将载玻片安装在激光显微切割系统上,其全固态半导体激光器(DPSS, diode pumped solid state laser)激光束的波长、光圈、切割速度、能量可按需设置,然后在荧光滤光器系统下,通过DPSS激光束切割分离不同的靶组织,用微量离心管收集,最后通过离心将组织或细胞转移到管底部,表示激光显微切割的完成。

1.1.3 后续实验

富集目标组织或细胞,进行后续实验。

2 在植物学中的应用

2.1 组织化学定位

激光显微切割技术可对组织特异性代谢物(如黄酮、皂苷、生物碱、多糖、萜类、挥发油等)进行分析,以便于对药用植物进行更精确的组织化学定位。

2.1.1 黄酮类化合物组织化学定位

LMD与超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q/TOF-MS)结合,可以确定射干(*Belamcanda chinensis*)根茎各组织中的类黄酮;使用LMD分离出射干根茎的各组织(木栓层、皮层、内皮层、维管束、薄壁组织),通过UPLC-Q/TOF-MS共检测到43个峰,初步鉴定26个峰为黄酮类化合物,他们分别是:(1)鸢尾酚酮2-O- β -葡萄糖苷(iriflophenone 2-O- β -glucoside);(2)芒果苷(mangiferin);(3)鸢尾黄酮7-O- β -葡萄糖苷-4'-O-葡萄糖苷(tectorigenin 7-O-glucosyl-4'-O-glucoside);(4)异芒果苷(isomangiferin);(5)7-O-甲基-异芒果苷(7-O-methylisomangiferin);

(6)鸢尾黄酮-7-O- β -葡聚糖(1 \rightarrow 6)葡萄糖苷(tectorigenin-7-O- β -glucosyl (1 \rightarrow 6) glucoside);(7)射干苷(tectorigenin);(8)野鸢尾苷同分异构体(iridin isomer);(9)鸢尾甲黄素A-7-O- β -葡聚糖(1 \rightarrow 6)葡萄糖苷(iristectorigeninA-7-O- β -glucosyl (1 \rightarrow 6) glucoside);(10)鸢尾甲苷B(iristectorin B);(11)羟基射干苷(hydroxyltectoridin);(12)鸢尾甲苷A(iristectorin A);(13)野鸢尾苷(iridin);(16)3',5'-二甲氧基尼鸢尾黄素-4'-O- β -D-葡萄糖苷(3',5'-dimethoxyirisonone-4'-O- β -D-glucoside);(17)鸢尾黄酮(tectorigenin);(18)6-O-香草酰野鸢尾苷(6-O-vanilloyliridin);(19)鸢尾黄素(isotectorigenin);(20)鸢尾甲黄素A(iristectorigenin A);(21)鸢尾甲黄素B(iristectorigenin B);(22)5,7,4'-三羟基-6,3',5'-三甲氧基大豆异黄酮(5,7,4'-trihydroxy-6,3',5'-trimethoxyisoflavone);(23)鸢尾甙元(irigenin);(24)异野鸢尾黄素(isoirigenin);(25)去甲次野鸢尾黄素(noririsfloreantin);(26)德鸢尾素(irilone);(27)次野鸢尾黄素(irisfloreantin);(28)白射干素(dichotomitin)。其中2、4、5、14~28主要存在于木栓层,3主要存在于皮层或内皮层,1、6、8、9、11主要存在于维管束和薄壁组织中;因此得出结论,疏水性化合物(包括类黄酮和异黄酮苷元以及咕吨酮)主要分布在射干根茎的木栓层中,而亲水性化合物(即类黄酮和异黄酮苷类)通常聚集在皮层或维管束内(Chen等2014)。

2.1.2 皂苷类化合物组织化学定位

柴胡皂苷是柴胡属植物的主要次生代谢产物,其峰可以通过其生成的分子离子峰[M-H]⁻或[M+HCOO]⁻识别出来;利用LMD分离狭叶柴胡(*Bupleurum scorzoniferifolium*),北柴胡(*Bupleurum Chinense*),柴胡(*Bupleurum falcatum*)根的各组织(木栓层,皮层,木质部,韧皮部),然后用UPLC-Q-TOF-MS进行分析,并对柴胡皂苷进行表征和测定;实验初步鉴定峰3、6和15分别为柴胡皂苷a、柴胡皂苷c和柴胡皂苷d,且柴胡皂苷a、c和d主要存在于木栓层和皮层,而在木质部和韧皮部中含量较少;因此,主根较少、侧根较多的柴胡含有较高的活性成分,具有较好的临床应用价值(Liang等2014)。

2.1.3 生物碱类化合物组织化学定位

使用LMD分离青风藤(*Sinomenium acutum*)的

各组织和细胞(表皮、皮层、石细胞、中柱鞘、维管束和髓), 然后用UPLC-Q/TOF-MS对青风藤中的生物碱进行组织特异性代谢物分析, 结果在不同组织和细胞中共检测到6种生物碱, 即6-甲基醚-12-O-β-d-吡喃葡萄糖苷劳丹碱(6-Me-ether-12-O-β-d-glucopyranoside-laudanosoline)、青藤碱(sinomenine)、N-去甲青藤碱(N-norsinoacutine)、木兰花碱(magnoflorine)、樟叶木防己碱(laurifoline)和蝙蝠葛碱(menisperine), 主要分布在皮层的外部、韧皮部和木质部中, 其中青藤碱和木兰花碱最多, 青藤碱在木质部区域相对富集; 由于茎主要由木质部组成, 所以青风藤茎的直径越大, 其活性成分含量越高, 药材质量越好(Yi等2012)。组织中某种化学物质的含量不同, 则荧光颜色以及荧光强度也不同; 利用荧光显微镜对青风藤、黄连(*Coptis chinensis*)、山豆根(*Sophora tonkinensis*)、北豆根(*Menispermum dauricum*)进行分析, 发现他们的主要化学成分即青藤碱、小檗碱(Berberine)、苦参碱(Matrine)和蝙蝠葛碱存在于不同组织中并且荧光颜色不同; 在用生物碱沉淀剂碘化铋钾溶液处理后, 生物碱存在的组织内荧光强度减弱甚至淬灭, 而其他组织内的荧光与处理前无明显变化, 表明荧光强度与生物碱含量有关; 因此, 除具有很强的自发荧光的细胞壁外, 植物组织中呈现的荧光颜色常常与其中所含代谢产物的类型和含量相关(Liang等2009)。利用LMD将两年生不同生长期博落回(*Macleaya cordata*)根的木栓层、皮层、韧皮部、维管束的木质部和木射线分别进行切割, 发现在博落回根部整个切片中木栓层和维管束的木质部中呈现出强的荧光(在此部位细胞壁也出现较强的荧光), 进一步使用HPLC-MS/MS对切割的组织进行生物碱的检测, 在博落回根的木栓层和维管束的木质部中共检测到6种生物碱, 即原阿片碱(protopine)、别隐品碱(allo cryptopine)、血根碱(sanguinarine)、白屈菜红碱(chelerythrine)、二氢白屈菜红碱(dihydrochelerythrine)和二氢血根碱(dihydrosanguinarine) (左姿等2016)。

2.1.4 多糖类化合物组织化学定位

将LMD和高效凝胶渗透色谱-带电气溶胶检测器(HPGPC-CAD)和超高效液相色谱-三重四极

杆串联质谱(UPLC-QqQ-MS/MS)联用对人参(*Panax ginseng*)根中的人参多糖进行组织化学分析, 通过切割分别得到人参根的木栓层、皮层、木质部、韧皮部和树脂道, 然后从各种组织中提取多糖、酸水解、PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone)衍生化、HPGPC-CAD定性分析、UPLC-QqQ-MS/MS分析, 发现人参多糖在木质部、韧皮部和树脂道中含量较高, 在皮层和木栓层中含量较低(Chen 2017)。

2.1.5 萜类化合物组织化学定位分析

将LMD与超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)联用, 来确定益母草(*Leonurus japonicus*)叶的盾状腺毛(peltate glandular trichomes, PGT)中特异性积累的次生代谢产物, 利用LMD准确收集益母草叶中的盾状腺毛, 并用UPLC-MS/MS分析其次级代谢产物, 在盾状腺毛中发现了益母草二萜(leoheterin)和鼬瓣花二萜(galeopsin)两种二萜类化合物(Xiao等2017)。

2.1.6 挥发油组织化学定位分析

传统上, 人们认为药材肉桂的皮越厚质量越好, 挥发油是药材肉桂主要的生物活性成分, 但至今尚没有相关科学依据支持该观点。使用LMD分离出肉桂(*Cinnamomum cassia*)的木栓层、皮层、周皮和韧皮部, 然后利用UPLC-Q/TOF-MS对肉桂皮不同组织中的挥发油进行分析, 实验初步确定了5个峰, 分别是香豆素(coumarin)、肉桂酸(cinnamic acid)、肉桂醛(cinnamaldehyde)、肉桂醇(cinnamyl alcohol)、2-甲氧基肉桂醛(2-methoxycinnamaldehyde), 其中, 肉桂醛的含量远高于其他4种成分, 并且肉桂醛主要存在于韧皮部, 2-甲氧基肉桂醛、香豆素也主要存在于韧皮部, 肉桂醇和肉桂酸在韧皮部也有一定分布; 组织化学定位研究确定了肉桂韧皮部是挥发油含量最高的组织。因此, 该实验进一步说明肉桂韧皮部越厚, 肉桂质量越好(Zhou等2018)。

2.2 分子生物学

2.2.1 基因片段微切割

为了进一步完善现有药用植物学遗传图谱, 需要对植物染色体进行微切割、微收集和微扩增, 并建立DNA文库以用于基因表达分析。以往主要

采用激光微束法、流式染色体分级分离法和玻璃针法,但这三种方法存在操作复杂、技术难度大、污染较重等问题。因此,激光显微切割技术应运而生。SLUCUT-A全自动激光显微切割系统通过鼠标勾画各种图形来选择切割目标,并且通过有黏性的收集管盖黏附分离下来的样本,整个操作过程简便快捷。同时,简并寡核苷酸引物PCR (degenerated oligonucleotide primed PCR, DOP-PCR) 微量扩增技术可对植物染色体进行DNA高效扩增,从而为进一步基因表达分析建立基础(高居荣等2010)。采用LMD分离水稻(*Oryza sativa*)第4号染色体,然后通过PCR扩增,构建第4号染色体基因组文库,以用于基因表达分析(Liu等2004)。采用LCM分离水稻叶片韧皮部细胞,建立cDNA文库,并进行基因序列分析(Asano等2002)。采用LMD分离植原体(phytoplasma)感染的葡萄(*Vitis vinifera*)叶韧皮部,并进行RNA纯化、RNA扩增,然后构建cDNA文库,以用于基因表达分析(Santi等2019)。采用LMD从玉米(*Zea mays*)胚芽鞘中获得大量的表皮细胞和维管组织,从中提取RNA并进行扩增,然后与含约8 800个cDNA的玉米芯片进行杂交,结果发现有250个基因存在特异表达,因此,LMD还可用于高通量的植物基因表达分析(Nakazono等2003)。

2.2.2 蛋白质组学

蛋白质是生物系统的主要结构和功能组成部分,蛋白质组学应用于药用植物有利于提高中药材质量,提高对病虫害和非生物胁迫(例如干旱、盐度等)的抵抗力。然而,由于敏感性限制,植物蛋白质组学分析通常需要大量的材料,而激光显微切割技术可以富集特定的植物组织和细胞,进一步结合其他方法进行蛋白质组学测定。

将LCM和自动化样品制备系统(nanoPOTS, 纳米液滴样品制备技术)相结合用于番茄(*Solanum lycopersicum*)果皮组织的蛋白质组分析; LCM切割冷冻固定的番茄果实,然后置于nanoPOTS芯片中进行处理,再利用纳米液相色谱-串联质谱联用(nanoLC-MS/MS)分析,结果在8~15个薄壁组织细胞中共鉴定出1900种独特的肽和422种蛋白质,使用外表皮细胞和薄壁组织细胞进行空间分辨蛋白质组分析,共鉴定出1 870个蛋白质组(Liang等

2018)。通过LMPC从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)茎中收集维管束,提取蛋白质然后利用二维凝胶电泳(2D-PAGE)或高效液相色谱(LC)与串联质谱(MS/MS)进行蛋白质分析,共获得了33个维管束特异表达的蛋白质(Schad等2005); 将LAM与2D-PAGE相结合进行蛋白质组分析,生成了一份凝胶蛋白提取物的蛋白质组图谱,该图谱有助于理解野生型玉米和*rum1*突变体之间的蛋白质组水平差异(Liu等2010)。将LAM、二维凝胶电泳(2D PAGE)和基质辅助激光解吸电离(MALDI)结合,已经生成了玉米根毛的参考蛋白质组图谱(Ludwig等2014; Woll等2005)。

2.2.3 转录物分析

植物生物学的一个重要目标是识别单个细胞类型的特定功能,激光显微切割技术可以获得特定细胞或组织,从而分析细胞类型特异性转录物,提供其分子功能信息。

将LAM和超低RNA测序(RNA-seq)相结合来对拟南芥胚胎的表皮细胞进行转录组学分析。选择*AtML1*或*AtPDF2*以及两种不同代谢途径(即角质层蜡和类黄酮合成途径)的相关基因进行分析,实验证明表皮细胞和叶肉细胞转录组之间存在差异表达(Sakai等2018)。使用LMD分离水稻胚珠,并进行微阵列分析,结果发现发育中胚珠的基因表达处于动态变化过程中,并且在减数分裂中期和后期转录组有很大的变化;此外,胚珠发育过程中还存在转录因子的富集,其可能在雌配子发育过程中起关键作用(Kubo等2013)。针叶树茎组织对昆虫和病原体的防御与皮层树脂道中萜类化合物的积累有关;使用LMD从白云杉(*Picea glauca*)茎中获得大量皮层树脂道、形成层和整个横切面组织,利用白云杉TPS基因的特异性引物b-蒎烯合酶(b-pinene synthase),通过qRT-PCR分析,比较三个组织中参与萜类代谢的单萜合酶基因的相对转录物丰度,b-蒎烯合酶基因转录物丰度在皮层树脂道中比在其他两个组织中丰富12倍,因此可推断皮层树脂道是萜类化合物积累的主要场所(Abbott等2010)。

2.3 生长调控

植物基因调控在植物生长发育过程中起着重

要的作用, 掌握植物基因表达的调控机理, 能够更好地理解药用植物各组织、结构、器官的生长发育与调控作用。

使用激光显微切割结合芯片技术(LM-microarray)获得水稻处于几个关键发育阶段的花粉和绒毡层, 芯片分析发现它们在不同发育阶段具有不同的基因表达谱, 还鉴定出了更多调控花粉及绒毡层细胞特异性基因表达的顺式元件, 此外, 还通过系统分析得出了多种植物激素(如赤霉素, 吲哚乙酸等)在花粉发育中细胞水平上的时空分布(汤湘等2009)。为了在分子水平上了解不定根形成的机制, 利用LCM, 在黑胡桃(*Juglans nigra*)扦插生根过程中从皮层, 韧皮纤维和韧皮薄壁细胞中分离RNA并进行基因表达分析, 发现在幼枝和成熟枝中, 生长素处理的9个生根相关基因的丰度都发生改变, 且在第16天和18天SCL (scarecrowlike-1) 基因在生根细胞内变化最大, 但在无生根能力细胞内几乎没有变化(Stevens等2018)。一些禾本科植物(如玉米), 为了适应土壤中的涝渍, 在根皮层形成溶生性通气组织, 该通气组织是由玉米在涝渍过程中积累的乙烯促成的; 然而, 其形成的分子机制尚不清楚, 为了更好地了解其形成的分子机制, 使用LMD分离玉米根部皮层细胞, 并进行微阵列分析, 实验显示有575个基因存在差异表达, 其差异表达主要包括正性调控和负性调控两种, 他们均受乙烯感知抑制剂1-甲基环丙烯(1-MCP)预处理的影响, 并且都与活性氧(ROS)产生或清除、Ca²⁺信号传导和细胞壁修饰等有关(Rajhi等2011)。采用LMD建立了分离黄梁木(*Neolamarckia cadamba*)不定根原基细胞的体系, 该体系获得RNA并可以满足后续RNA-seq文库构建的要求, 为揭示黄梁木不定根原基发生的分子机制奠定了关键基础(董甜甜等2019)。

2.4 植物与微生物作用

植物和微生物(线虫、细菌、真菌和病毒)之间的相互作用发生在复杂的细胞环境中, 涉及两种生物体之间的致病或共生相互作用的信号传导。这些反应可以定位在特定的细胞类型或微生物结构中, 激光显微切割技术作为一种强有力的工具, 可以在显微镜下观察到与特定感染阶段相关

的细胞并且被进一步获取, 为更好的了解植物和微生物之间的作用奠定了基础(Balestrini等2008)。

根线虫作为一种寄生虫, 对植物生长影响很大, 可诱导寄主根部产生特异的巨大细胞, 由于很难从高度专化的细胞中获得纯净的细胞质, 所以对巨大细胞诱导与分化的分子机制的研究尚不完全。用LCM收集番茄根部巨大细胞(接种根线虫所引起), 提取总RNA并用RT-PCR分析巨大细胞中的细胞周期基因的表达情况, 结果发现两个D型细胞周期蛋白基因(LeCycD 3;2和LeCycD 3;3)表达水平提高, 其原因可能是根线虫可产生具有生物活性的细胞分裂素, 该细胞分裂素可以使D型细胞周期蛋白基因活性提高 (Ramsay等2004)。丛枝菌根真菌(AMF)是一类重要的土壤微生物, 一般来说, 当AMF穿透根内部皮层细胞时, 它会产生一种叫作丛枝的复杂结构(有的不产生丛枝); 为了区分能产生丛枝的AMF和不产生丛枝的AMF, 使用LMD结合基因测序技术, 对AMF群体的丛枝细胞(AC)进行表征, 然后将其与从全根DNA提取中发现的AMF群体进行比较, 结果发现能够产生丛枝和全根样品的AMF群落显著不同, 产生丛枝样品的AMF群体中有五个真菌门分类群都涉及丛枝的形成(Beruti等2013)。为了证明油菜素类固醇(BR)在根瘤(根部变形, 出现纺锤状肿瘤)形成中的作用, 对拟南芥根[被芸薹根瘤菌(*Plasmodiophora brassicae*)接种]进行转录分析, 实验使用LMD和LMPC来分离单个细胞, 微阵列分析发现了生长素和细胞分裂素代谢和信号传导基因的上调, 定量PCR发现了油菜素类固醇合成和信号感知基因的上调(Schuller等2014)。

3 问题与展望

激光显微切割技术的优点是速度快、精度高和功能齐全。根据激光点的大小、组织的结构特征和显微切割的期望精度, 可以在短时间内收集数千个细胞, 并且不会破坏邻近的组织。此外, 低功率激光产生的薄膜和热量不会影响DNA、RNA或蛋白质的完整性, 为后期基因工程相关工作奠定基础。同时, 激光显微切割技术也具有一定的局限性, 如显微切割的组织切片没有盖玻片覆盖,

所以不能防止组织切片表面的物理接触作用。此外, 如果安装介质与组织切片之间的折射率不匹配, 则会在高倍镜下模糊细胞细节, 给显微切割带来一定的困难。另外, 大多数激光显微切割都需要借助针尖或微毛细管移除分离的细胞, 该步骤需要一定的技巧和长期的实践。激光显微切割技术作为一种新兴的技术, 可以在小样本中收集大数据, 因此是一个强大的转化工具。使用激光显微切割先进的技术研究精细的生命形态, 可以进一步推进基础科学的发展(Datta等2015)。

参考文献(References)

- Abbott E, Hall D, Hamberger B, et al (2010). Laser microdissection of conifer stem tissues: isolation and analysis of high quality RNA, terpene synthase enzyme activity and terpenoid metabolites from resin ducts and cambial zone tissue of white spruce (*Picea glauca*). *BMC Plant Biol*, 10 (1): 106–121
- Asano T, Masumura T, Kusano H, et al (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 (3): 401–408
- Balestrini R, Bonfante P (2008). Laser Microdissection (LM): Applications to plant materials. *Plant Biosyst*, 142 (2): 331–336
- Berruti A, Borriello R, Lumini E, et al (2013). Application of laser microdissection to identify the mycorrhizal fungi that establish arbuscules inside root cells. *Front Plant Sci*, 4: 135–144
- Chen QL, Chen YJ, Zhou SS, et al (2017). Laser microdissection hyphenated with high performance gel permeation chromatography-charged aerosol detector and ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry for histochemical analysis of polysaccharides in herbal medicine: Ginseng, a case study. *Int J Biol Macromol*, 2017: S014181301732336X.
- Chen YJ, Liang ZT, Zhu Y, et al (2014). Tissue-specific metabolites profiling and quantitative analyses of flavonoids in the rhizome of *Belamcanda chinensis* by combining laser-microdissection with UHPLC-Q/TOF-MS and UHPLC-QqQ-MS. *Talanta*, 130: 585–597
- Datta S, Malhotra L, Dickerson R, et al (2015). Laser capture microdissection: big data from small samples. *Histol Histopathol*, 30 (11): 1255–1269
- Dong TT, Wang X, Liu SW, et al (2019). Establishment of adventitious root primordia cells capture system by laser microdissection in *Neolamarckia cadamba*. *Plant Physiol J*, 55 (5): 685–695 (in Chinese with English abstract) [董甜甜, 王雪, 刘思雯等(2019). 激光显微切割分离黄梁木不定根原基的技术体系建立. *植物生理学报*, 55 (5): 685–695]
- Fend F, Raffeld M (2000). Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol*, 53 (9): 666–672
- Gao JR, Cui F, Feng DS, et al (2010). Technique application of plant chromosome microdissection microcollection and microcloning. *Res Lab Explor*, 29 (7): 11–13+26 (in Chinese with English abstract) [高居荣, 崔法, 封德顺等(2010). 植物染色体微切割、微收集及微扩增技术应用. *实验室研究与探索*, 29 (7): 1–13+26]
- Kubo T, Fujita M, Takahashi H, et al (2013). Transcriptome analysis of developing ovules in rice isolated by laser microdissection. *Plant Cell Physiol*, 54 (5): 750–765
- Liang Y, Zhu Y, Dou M, et al (2018). Spatially resolved proteome profiling of < 200 cells from tomato fruit pericarp by integrating laser-capture microdissection with nanodroplet sample preparation. *Anal Chem*, 90 (18): 11106–11114
- Liang Z, Chen H, Zhao Z (2009). An experimental study on four kinds of Chinese herbal medicines containing alkaloids using fluorescence microscope and microspectrometer. *J Microsc*, 233 (1): 24–34
- Liang Z, Oh K, Wang Y, et al (2014). Cell type-specific qualitative and quantitative analysis of saikosaponins in three *Bupleurum* species using laser microdissection and liquid chromatography–quadrupole/time of flight-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 97: 157–165
- Liu X, Wang H, Li Y, et al (2004). Preparation of single rice chromosome for construction of a DNA library using a laser microbeam trap. *J Biotechnol*, 109 (3): 217–226
- Liu Y, Behrens IV, Muthreich N, et al (2010). Regulation of the pericycle proteome in maize (*Zea mays* L.) primary roots by *RUM1* which is required for lateral root initiation. *Eur J Cell Biol*, 89 (2–3): 236–241
- Ludwig Y, Hochholdinger F (2014). Laser Microdissection of Plant cells. *Methods Mol Biol*, 1080: 249–258
- Mahalingam M (2018). Laser Capture Microdissection: Insights into Methods and Applications. *Methods Mol Biol*, 1723: 1–17
- Nakazono M, Qiu F, Borsuk LA, et al (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 (3): 583–596
- Rajhi I, Yamauchi T, Takahashi H, et al (2011). Identification of genes expressed in maize root cortical cells during lysigenous aerenchyma formation using laser microdis-

- section and microarray analyses. *New Phytol*, 190 (2): 351–368
- Ramsay K, Wang Z, 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 (6): 587–592
- Sakai K, Taconnat L, Borrega N, et al (2018). Combining laser-assisted microdissection (LAM) and RNA-seq allows to perform a comprehensive transcriptomic analysis of epidermal cells of *Arabidopsis* embryo. *Plant Methods*, 14 (1): 10–21
- Santi S (2019). Laser microdissection of phytoplasma-infected grapevine leaf phloem tissue for gene expression study. In: Musetti R, Pagliari L (eds). *Phytoplasmas*. New York: Humana Press, 1875: 279–290
- Schad M, Lipton MS, Giavalisco P, et al (2005). Evaluation of two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for tissue-specific protein profiling of laser-microdissected plant samples. *Electrophoresis*, 26 (17): 3406–3406
- Schuller A, Kehr J, Ludwig-Müller J (2014). Laser microdissection coupled to transcriptional profiling of *Arabidopsis* roots inoculated by *Plasmodiophora brassicae* indicates a role for brassinosteroids in clubroot formation. *Plant Cell Physiol*, 55 (2): 392–411
- Stevens ME, Woeste KE, Pijut PM (2018). Localized gene expression changes during adventitious root formation in black walnut (*Juglans nigra* L.). *Tree Physiol*, 38 (6): 877–894
- Tang X, Liu QQ, Tang WH (2009). Laser microdissection facilitates a comprehensive understanding of molecular mechanisms of plant male gametes production. *Chin J Cell Biol*, 31 (2): 151–156 (in Chinese with English abstract) [汤湘, 刘巧泉, 唐威华(2009). 激光显微切割技术推进全面解析植物雄配子发生的分子机制. *细胞生物学杂志*, 31 (2): 151–156]
- Woll K, Borsuk LA, Stransky H, et al (2005). Isolation, Characterization, and Pericycle-Specific Transcriptome Analyses of the Novel Maize Lateral and Seminal Root Initiation Mutant *rum1*. *Plant Physiol*, 139 (3): 1255–1267
- Xiao CJ, Liu YC, Luo SH, et al (2017). Localisation of two bioactive labdane diterpenoids in the peltate glandular trichomes of *leonurus japonicus* by laser microdissection coupled with UPLC-MS/MS. *Phytochem Anal*, 28 (5): 404–409
- Yi L, Liang ZT, Peng Y, et al (2012). Tissue-specific metabolite profiling of alkaloids in *Sinomenii* Caulis using laser microdissection and liquid chromatography–quadrupole/time of flight-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1248: 93–103
- Zhou W, Liang Z, Li P, et al (2018). Tissue-specific chemical profiling and quantitative analysis of bioactive components of *Cinnamomum cassia* by combining laser-microdissection with UPLC-Q/TOF-MS. *Chem Cent J*, 12 (1): 71–79
- Zuo Z, Zheng YJ, Liang ZT, et al (2016). Histochemical localization study of alkaloids in root of *Macleaya cordata*. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 47 (10): 1785–1790 (in Chinese with English abstract) [左姿, 郑亚杰, 梁之桃等 (2016). 博落回根中生物碱的组织化学定位研究. *中草药*, 47 (10): 1785–1790]

Research progress of laser microdissection technique for medicinal botany

LIU Fu-Yu, GUO Qing-Mei*

College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Laser microdissection is an emerging technology that has recently been developed to combine the functions of lasers and microscopes to separate single cells and groups in complex tissues, providing technical support for a more accurate understanding of medicinal plants. This review outlines existing laser microdissection techniques and their applications in histochemical localization, molecular biology, growth regulation, and plant-microbial interactions.

key words: laser microdissection technology; medicinal botany; review

Received 2019-07-15 Accepted 2019-08-28

This work was supported by the Shandong Key Research and Development Project (2018GSF119004).

*Corresponding author (qmguo@sina.com).