

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01521

激光显微切割分离细胞的微量 RNA 质量鉴定体系的建立

杨燕青^{1,2}, 张雯², 张宝峰², 郇恒骏², 张庆华^{1,2}

1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院上海血液学研究所, 医学基因组学国家重点实验室, 上海 200025;
2. 生物芯片上海国家工程研究中心, 上海 201203

摘要: 探索一套激光显微切割(Laser capture microdissection, LCM)分离细胞后获得的微量 RNA 质量鉴定标准操作流程。选取 3 个低温保存的胃癌旁组织样本, 冰冻切片进行甲酚紫染色和病理学检查, 利用激光显微切割技术分离非癌上皮细胞, 提取 RNA 并以 Agilent 2100 生物分析仪鉴定 RNA 的纯度和完整性。同时, 选择高、中、低 3 种不同表达丰度的 6 个基因(*EF1A*, *ACTB*, *GAPDH*, *B2M*, *MED1*, *CK20*), 在每个基因的 5' 和 3' 端设计引物, RT-PCR 扩增。以 3 个培养细胞制备的高质量 RNA 和 3 个有降解的胃癌旁组织样本 RNA 作对照, RT-PCR 扩增结果与 Agilent 2100 生物分析仪的结果高度一致。结果显示冻存组织进行冰冻切片结合病理学检查后, LCM 获取细胞提取微量 RNA 采用 RT-PCR 进行质量鉴定是一种操作简单的稳定方法, 可以作为肿瘤基因组研究的有效和常规方法。

关键词: 激光显微切割; RT-PCR; RNA 完整性; 质量鉴定

Establishment of the pipeline for RNA quality assessment from the cells obtained by laser capture microdissection

YANG Yan-Qing^{1,2}, ZHANG Wen², ZHANG Bao-Feng², GAO Heng-Jun²,
ZHANG Qing-Hua^{1,2}

1. State Key Laboratory of Medical Genomics and Shanghai Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China;
2. National Engineering Center for Biochip at Shanghai, Shanghai 201203, China

Abstract: We developed a standard protocol for quality assessment of low amount RNA from the cells obtained by laser capture microdissection (LCM). Three gastric noncancerous tissues were cryo-sectioned, stained with Cresyl Violet, and pathologically rechecked. Epithelial cells were obtained by LCM and RNA was isolated. Agilent 2100 bioanalyzer was used to check the RNA quality. To validate the results from 2100 bioanalyzer, RT-PCR was performed with six genes at both 5' and 3' end-regions of different abundance (*EF1A* and *ATCB* of high abundance, *GAPDH* and *B2M* of moderate abundance, and *MED1* and *CK20* of low abundance). RT-PCR analysis of 3 good quality RNAs from cultured cell lines and 3 poor

收稿日期: 2008-03-04; 修回日期: 2008-05-28

基金项目: 国家重大科学研究计划项目(973 计划)(编号: 2006CB910402)、国家高科技发展计划项目(863 计划)(编号: 2002AA2Z2002), 上海市科技发展基金计划项目(编号: 05XDB1404, 0402H1P19, 07JC14041)和浦东新区科技发展基金项目(编号: PKJ-2005-49)资助 [Supported by the Chinese National Key Program for Science Research (No.2006CB910402), the Chinese National High-Tech Program (No.2002AA2Z2002), the Development Projects of Shanghai Commission of Science and Technology (No.05XDB1404, 0402H1P19, 07JC14041), and Development Projects of Pudong (No. PKJ-2005-49)]

作者简介: 杨燕青(1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤基因组学。E-mail: yanqing_yang@shbiochip.com

通讯作者: 张庆华(1967-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤基因组学和系统生物学。Tel: 021-51320288; E-mail: qinghua_zhang@shbiochip.com

quality RNAs from gastric noncancerous tissues showed high correlations with that from 2100 bioanalyzer. In conclusion, the pipeline for low amount RNA quality assessment by RT-PCR from tissue cryo-section, pathological recheck, LCM purification and RNA isolation is applicable as a routine method in cancer genome research.

Keywords: laser capture microdissection (LCM); RT-PCR; RNA integrity; quality assessment

随着基因组研究的逐步深入,肿瘤研究方面对肿瘤细胞的分离显得日益重要。实体肿瘤组织具有高度不均一性,除含有肿瘤细胞外还有其他如间质细胞、结缔组织、浸润的淋巴细胞等杂细胞的存在。由于肿瘤组织中所含细胞比例不是固定不变,个体差别较大,因此将整块肿瘤组织用于基因组和基因表达谱分析所得到的结果重复性不佳,也不能真实反应肿瘤细胞分子水平的改变^[1,2]。而激光捕获显微切割技术^[3-5](Laser capture microdissection, LCM)可以有效解决组织中的细胞异质性问题,快速、准确、无细胞损伤和切割前后记录,是肿瘤学及分子病理学研究的一项有效的技术。目前 LCM 技术已经普遍在多种组织包括结肠、乳腺、前列腺和肾脏中用于核酸方面研究^[6-9]。肿瘤的基因表达谱研究是肿瘤研究的最基本工作, RNA 的提取是其中的第一步,也是一个非常关键的环节。获得高质量的 RNA 又是后续实验进展顺利及结果可靠的有力保障。RNA 的纯度和完整性等质量指标对确保下游应用的可靠性和可重复性来说也是首要的,低质量 RNA 是不被基因组学研究者接受的。传统的 RNA 质量鉴定方法如紫外分光光度计和琼脂糖电泳等对于检测来自于 LCM 的微量 RNA 而言不甚理想, Agilent 公司 2100 生物分析仪虽然能够分析低至 50 pg 的总 RNA,但是其价格较高,短时期也尚难在常规实验室普及使用。

本研究旨在探索一套激光显微切割标准操作流程和简便易行的方法用于微量 RNA 的质量完整性检测。选择不同表达丰度的基因以及 RT-PCR 的灵敏度为本研究提供了有效的理论和方法学基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验组:胃癌旁组织 3 个(sample1~3)用于激光显微切割,来自生物芯片上海国家工程中心建立的组织库,为手术切除后液氮速冻后-80 保存。

对照组:胃癌细胞系 3 个(sample 4: SGC-7901,

sample 5: BGC-823, sample 6: HGC-27), 本实验室引进保存,常规培养提取总 RNA; 3 个胃癌旁组织(sample7~9)来自生物芯片上海国家工程中心建立的组织库,提取 RNA 发现有降解,均用于 RNA 质量鉴定对照。

1.2 方法

1.2.1 实验组组织样本 RNA 提取与质量鉴定

-80 低温冰箱中取出实验组组织样本,取部分组织块称重,按说明书加入适量 Trizol(Invitrogen, 美国)冰上机械匀浆,加入 1/5 体积氯仿离心取上清;加等体积异丙醇沉淀总 RNA 后 70%乙醇洗涤并用 RNase-free H₂O 溶解总 RNA。260 nm 紫外吸收测定浓度,取 100 ng RNA 用 Agilent RNA 6000 Nano Kit 于 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent, 美国)进行质量鉴定。

1.2.2 组织冰冻切片病理学复检

冰冻切片机(HM550, Mircom, 德国)预冷至-25 至-30 ,从-80 冰箱中取出经过 RNA 质量鉴定合格的组织放入切片机操作室中静置平衡 10 min 后用 Neg-50 (Neg-50, Richard-Allan scientific,美国)包埋。所有与组织样本接触的器械均用 RnaseZap (Ambion, 美国)去除 RNA 酶污染。切片厚度为 8 μm,每个组织 2~4 片贴附于普通载玻片上,70%异丙醇固定 30 s; DEPC 水冲洗 3 次;苏木素染色 2 min; 70%异丙醇冲洗 3 次;伊红染色时间 40 s; 70%异丙醇冲洗 3 次; 100%异丙醇脱水 30 s, 2 次。由具有丰富经验的病理学医生对切片进行病理检查,确定病理类型和相关的位置。

1.2.3 组织切片染色和激光显微切割

经过 HE 染色检查后的组织标本, 8 μm 连续切 4~6 片贴附于显微切割仪专用膜(MMI, 瑞士)上,所有固定染色步骤均按 Ambion LCM staining kit(Ambion,美国)说明书室温操作。贴有切片的膜浸入 95%乙醇 30~40 s; 75%乙醇 30~40 s; 50%乙醇 25~30 s 固定;滴加 150 μL 甲酚紫(Cresyl Violet)染

色 8~10 s; 50%乙醇, 25~30 s; 75%乙醇 25~30 s; 95%乙醇 30~40 s; 100%乙醇 30~40 s, 2 次; 二甲苯, 淋洗 3~4 次; 二甲苯, 放置 5 min; 通风橱斜置, 晾干 5 min。在 MMI 激光显微切割系统的视野中选取目的细胞约 5×10^3 个左右进行切割收集。

1.2.4 微量 RNA 抽提和质量鉴定

微量 RNA 提取采用 RNAqueous-Micro kit (Ambion, 美国)。显微切割获得的细胞加入 100 μ L 裂解液, 42 $^{\circ}$ C 裂解后按照说明书要求操作分离得到微量 RNA, 并经过 RNase-free DNase 处理。RNA 用

ND-1000 分光光度计初步估计所得 RNA 量, 并取约 5 ng RNA 用 Agilent RNA 6000 Pico Kit 于 Agilent 2100 生物分析仪进行质量鉴定。

1.2.5 RT-PCR 检测 RNA 的完整性

根据高、中、低 3 个基因表达丰度选取 6 个基因(*EF1A*, *ACTB*, *GAPDH*, *B2M*, *MED1*, *CK20*)从 GenBank 中获取相应序列, 采用 Primer express 2.0 软件从基因的近 5' 和 3' 末端分别设计引物, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物相关信息见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR amplification

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank accession No.	引物位置 Primer position	上游引物序列 Forward primer	下游引物序列 Reverse primer	产物长度 Length of product (bp)
<i>EF1A</i>	NM_001402	5	GTGGCATCGACAAAAGAACCA	CGTTCACGCTCAGCTTTCAGT	113
		3	ATATGGTTCCTGGCAAGCCC	TGATGACACCCACCGCAAC	107
<i>ATCB</i>	NM_001101	5	TACAATGAGCTGCGTGTGG	TCTCAAACATGATCTGGGTCA	106
		3	TTGCCGACAGGATGCAGAAG	GCCGATCCACACGGAGTACT	101
<i>GAPDH</i>	NM_002046	5	CAATGACCCCTTCATTGACCTC	TGACAAGCTTCCCGTTCTCA	107
		3	CTCCTCCACCTTTGACGCTG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCC	102
<i>B2M</i>	NM_004048	5	GGCTATCCAGCGTACTCCAAAG	CGGATGGATGAAACCCAGA	104
		3	TCTTTCAGCAAGGACTGGTCTT	CATGTCTCGATCCCACTTAACATC	135
<i>MED1</i>	NM_003925	5	CGTCACCTCTAGTGAGCGCCTA	TTTGTTCCCTCATCTTCTCCCACTC	101
		3	GGCAAAAACCATTTGTCAAGTTCTC	GACACAAAAAATTCGGTAAGAGTCG	115
<i>CK20</i>	NM_019010	5	GGACGACACCCAGCGTTTA	GGACACACCGAGCATTTTG	289
		3	CGCCAGAACAACGAATACC	ACGACCTTGCCATCCACTA	197

LCM 得到的微量 RNA 以及 3 个有降解胃组织 RNA 和高质量细胞 RNA 各取约 50 ng 总 RNA, 经 70 $^{\circ}$ C 变性后用随机引物由 SuperScript (Invitrogen, 美国)反转录合成 cDNA 第一链, -20° C 冰箱保存。

PCR 扩增体系: 总体积为 20 μ L, 包括 5 μ mol/L 引物, 200 μ mol/L dNTP, 10 mmol/L Mg^{2+} , 5 U *Taq* 酶 (TaKaRa, 日本)

PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min, 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。取 10 μ L 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 切割前组织样本和对照组样本的 RNA 质量检查

胃的癌旁组织样本在显微切割之前首先进行 RNA 质量鉴定以保证下游切割操作的顺利进行。如图 1A 所示, 2100 Bioanalyzer 毛细管电泳显示切割

前样品有明显的 3 个主要峰形(28S,18S,5.8/5S rRNA), 且 RNA 质量完整性指数 RIN(RNA integrity number)都大于 7(一般大于 6 被认为质量可靠)(表 2), 适合进行下一步的显微切割操作 (图 1A)。对照培养细胞提取的 RNA 完整性相当高(图 1B), 而有降解的 RNA 与上述 RNA 存在明显差别, 主要峰形消失, 出现明显降解杂峰(图 1C), *RIN* 值见表 2。

2.2 激光显微切割结果

冰冻切片经过染色、脱水和干燥后置于激光显微切割仪上切割分离目的细胞。如图 2 所示, 胃组织的组织和细胞形态都比较好。目的细胞经过分离后的地方留下空白, 而分离得到的细胞则被粘贴于样品收集管的管盖上。

2.3 激光显微切割后微量 RNA 毛细管电泳结果

由于 LCM 得到的 RNA 量非常少, 不适合琼脂糖电泳鉴定其质量。将 3 个 LCM 获取样本提取的总

RNA 各取约 5 ng 经 Agilent 2100 毛细管电泳, 结果如图 3 所示。3 个主要的峰形明显, 比例合适, 表明 RNA 质量较高, 可以进行后续的有关实验。相应的 *RIN* 值如表 2 所示。

2.4 RT-PCR 验证

微量 RNA 经过反转录后模板作适当稀释进行

PCR 反应, 并通过琼脂糖电泳, 观察有无产物扩增, 片段的位置和大小。结果如图 4 所示, 经过 2100 分析仪检测 RNA 质量较好的 LCM 样品和细胞样品在本次 RT-PCR 验证中均有片段扩增; 而已知有降解的 RNA 在本次 RT-PCR 扩增中无法扩增出完整的基因。

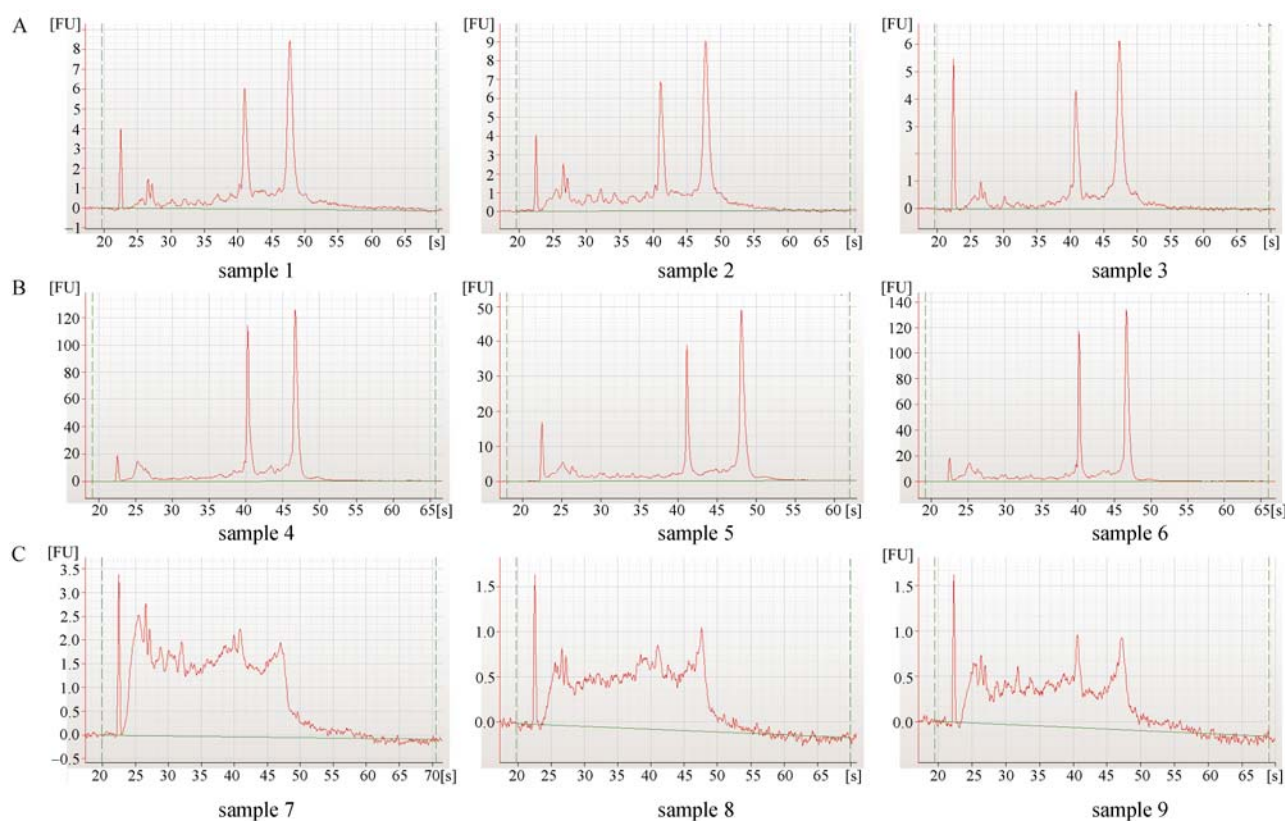


图 1 RNA 质量鉴定结果

A: 切割前质量完好的胃组织样本(sample 1~3); B: 培养的胃癌细胞(sample 4: SGC7901, sample 5: BGC823, sample 6: HGC27); C: 发生 RNA 降解的胃组织样本(sample 7~9)。

Fig. 1 RNA quality assessment

A: Gastric tissue of high quality (sample 1~3); B: Cultured gastric cell lines (sample 4: SGC7901, sample 5: BGC823, sample 6: HGC27); C: Gastric tissue with RNA degradation (sample 7~9).

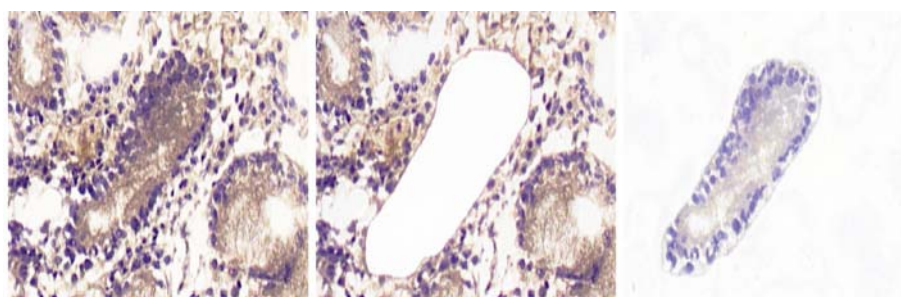


图 2 LCM 进行胃腺体上皮细胞的切割分裂(Cresyl Violet 染色, 200×)

A: 染色后的胃组织; B: 切割后剩余组织细胞; C: 切割获得的胃腺体上皮细胞。

Fig. 2 Microdissection of the gastric epithelium with LCM (Cresyl Violet staining, 200×)

A: Gastric tissue with Cresyl Violet staining; B: After microdissection; C: Gastric epithelial cells obtained.

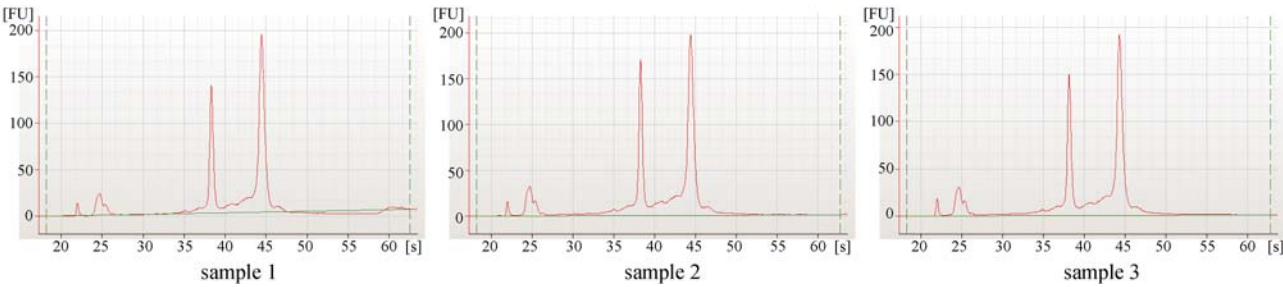


图 3 显微切割后提取的 RNA 毛细管电泳图
Fig. 3 Capillary electrophoresis of RNA of samples after LCM

表 2 样品的 RNA 完整性指数
Table 2 RNA integrity number of the samples

样本号	组织块提取	LCM 分离细胞
sample ID	Block samples	LCM cells
sample 1	9.2	8.9
sample 2	8.7	8.3
sample 3	8.9	8.5
sample 4	9.6	ND
sample 5	9.8	ND
sample 6	9.7	ND
sample 7	3.5	ND
sample 8	4.2	ND
sample 9	4.8	ND

ND: 未测定。
ND: Not determined.

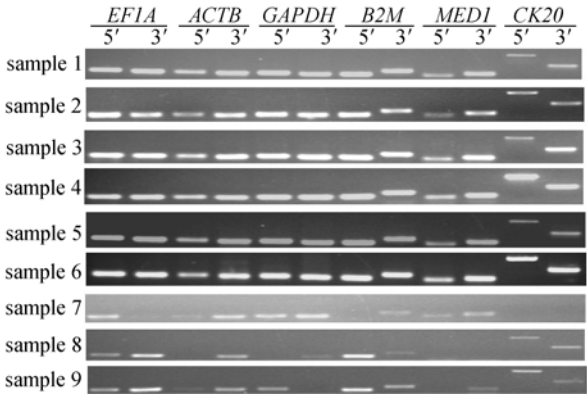


图 4 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测
sample1~3: LCM 分离获得细胞提取的 RNA; sample 4~9: 同图 1 样品 4~9。
Fig. 4 Detection of RT-PCR products with agarose electrophoresis
samples 1~3: RNA from the cells obtained by LCM; samples 4~9: same as samples 4~9 in Fig. 1.

3 讨论

LCM 技术的发展解决了组织异质性问题, 推动了肿瘤学、尤其肿瘤基因组学、分子生物学、分子

病理学等多学科的共同发展, 充分显示出该技术准确性高、特异性强、与形态学紧密结合并能保证分子结构完整等优越性, 显示出良好的应用前景, 但其仍需一定的发展和完善。因此, 如何建立一套完整且标准化操作对于课题研究的效率和准确性方面意义重大, 对于经过长期保存的手术组织样品的质量鉴定, 是一个具有非常挑战性的工作。

实验中我们对样本质控、病理复检、切片制备和染色等技术方面进行一些优化整合, 以期达到理想效果。样本组织块首先应当进行 RNA 质控才能进行下游显微操作, 因为 LCM 的应用成本和人力耗费较高。在初次切片时对组织进行病理复检可以提高课题研究的准确性, 同时也有效的辅助解决显微切割过程中切片和染色问题造成的辨别困难问题。而目前组织切片必须经过染色才能分离靶细胞, 由于染色的过程中是一个亲水状态, 在较长时间的染色过程中造成 RNase 的复活从而造成细胞 RNA 的降解, 为下游分析带来困难。因此染色时间的长短直接关系着细胞 RNA 的完整性, 成为显微切割的关键点之一。目前大多数显微切割研究仍然采用常规 HE 染色。只对第一片切片进行 HE 染色^[10]或者改良的 HE 染色^[11]目的均在于缩短染色时间以防止 RNA 降解。然而不对切片进行染色切割分离目的细胞需要较高的切片技术病理学知识从而在辨认靶细胞上造成一定偏差, 不利于普通人员的技术普及, 而即使采用改良 HE 染色, 切片接触水的时间也长达数分钟, 从而对 RNA 的质量完整性带来很大挑战。我们采用甲酚紫(Cresyl violet)的染色时间仅仅在 10 s 左右, 大大降低染色时间, 如果个别染色切片不易辨别可同时参考之前 HE 染色复诊切片, 提高了结果的准确性。

完整和均一是评价 RNA 质量的最关键标准, 也是下游生物学分析尤其基因组学研究的基础和保

障。从显微切割而来 RNA 的特点就是量非常少而宝贵。根据我们的经验,一般获得 100 ng 总 RNA 大约需要 5×10^3 至 10^4 个细胞。最为常用的 RNA 完整性鉴定方法是琼脂糖凝胶电泳,但其缺点是对 RNA 用量要求较高,至少 200 ng 以上,因而无法检测微量 RNA。目前较为先进的 Agilent 2100 生物分析仪能够分析 ng 级的 RNA,但成本较高,短时间也难以普及。为了更为科学和完整的分析微量 RNA,我们选择高、中、低 3 个表达丰度基因 *EF1A*, *ACTB*, *GAPDH*, *B2M*, *MED1*, *CK20*^[12~15],且同时在 mRNA 的两端设计引物对靶基因进行扩增来评价微量 RNA 质量。通过激光显微切割分离的 RNA 与对照组 RNA 进行 RT-PCR 验证的结果与 Agilent 2100 生物分析仪的结果对比分析呈现高度一致性。与针对 *GAPDH* 一个基因设计一个引物来评价的方法相比较^[11],采用多个基因的同时检测可靠性显然更高。

本研究是一套较为完整的激光显微切割操作流程,采用的方法操作简便易行,可靠性较高,经过质量验证的 RNA 可用于线性扩增、microarray^[15]和 microSAGE^[16]等实验。

参考文献(References):

- [1] St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, Lal A, Riggins GJ, Lengauer C, Vogelstein B, Kinzler KW. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science*, 2000, 289(5482): 1197–1202. [\[DOI\]](#)
- [2] Sugiyama Y, Sugiyama K, Hirai Y, Akiyama F, Hasumi K. Microdissection is essential for gene expression profiling of clinically resected cancer tissues. *Am J Clin Pathol*, 2002, 117(1): 109–116. [\[DOI\]](#)
- [3] Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA. Laser capture microdissection. *Science*, 1996, 274(5289): 998–1001. [\[DOI\]](#)
- [4] Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, Pohida T, Chuaqui R, Goldstein S, Liotta LA. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science*, 1997, 278(5342): 1481–1483. [\[DOI\]](#)
- [5] CAI Min-Hua, HU Ying-Kao, LI Ya-Xuan, YAN Yue-Ming. Application of laser capture microdissection in plant genomic research. *Hereditas(Beijing)*, 2006, 28(10): 1325–1329. 蔡民华, 胡英考, 李雅轩, 晏月明. 激光捕获显微切割技术在植物基因组研究中的应用. *遗传*, 2006, 28(10): 1325–1329.
- [6] Nambiar PR, Nakanishi M, Gupta R, Cheung E, Firouzi A, Ma XJ, Flynn C, Dong M, Guda K, Levine J, Raja R, Achenie L, Rosenberg DW. Genetic signatures of high- and low-risk aberrant crypt foci in a mouse model of sporadic colon cancer. *Cancer Res*, 2004, 64(18): 6394–6401. [\[DOI\]](#)
- [7] Yang F, Foekens JA, Yu J, Sieuwerts AM, Timmermans M, Klijn JG, Atkins D, Wang Y, Jiang Y. Laser microdissection and microarray analysis of breast tumors reveal ER-alpha related genes and pathways. *Oncogene*, 2006, 25(9): 1413–1419. [\[DOI\]](#)
- [8] Hughes S, Yoshimoto M, Beheshti B, Houlston RS, Squire JA, Evans A. The use of whole genome amplification to study chromosomal changes in prostate cancer: insights into genome-wide signature of preneoplasia associated with cancer progression. *BMC Genomics*, 2006, 7: 65. [\[DOI\]](#)
- [9] Kohda Y, Murakami H, Moe OW, Star RA. Analysis of segmental renal gene expression by laser capture microdissection. *Kidney Int*, 2000, 57(1): 321–331.
- [10] HAN Wei-Nong, LI Hong, WANG Shuang, ZHOU Wen, YAO Kai-Tai. Application of microdissection combined with RNA linear amplification. *Chinese Journal of Cancer*, 2002, 21(9): 1022–1025. 韩为农, 李虹, 王爽, 周文, 姚开泰. 显微切割结合 RNA 线性扩增技术的应用. *癌症*, 2002, 21(9): 1022–1025.
- [11] JIANG Pei-Zhou, SHEN Xin-Ming, HUANG Hua, SHI Yi-Min, YAO Kai-Tai. Rapid isolation of cancer cells from tumor tissue by micromanipulator and extraction of tiny amount of RNA. *Journal of First Military Medical University*, 2002, 22(6): 551–553. 江培洲, 沈新明, 黄华, 石益民, 姚开泰. 显微操作仪快速分离癌细胞并提取微量 RNA 的方法. *第一军医大学学报*, 2002, 22(6): 551–553.
- [12] Upson JJ, Stoyanova R, Cooper HS, Patriotis C, Ross EA, Boman B, Clapper ML, Knudson AG, Bellacosa A. Optimized procedures for microarray analysis of histological specimens processed by laser capture microdissection. *J Cell Physiol*, 2004, 201(3): 366–373. [\[DOI\]](#)
- [13] Mikulowska-Mennis A, Taylor TB, Vishnu P, Michie SA, Raja R, Horner N, Kunitake ST. High-quality RNA from cells isolated by laser capture microdissection. *Biotechniques*, 2002, 33(1): 176–179.
- [14] Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, Foley JF, Maronpot RR. Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol Carcinog*, 1999, 25(2): 86–91. [\[DOI\]](#)
- [15] Ohyama H, Zhang X, Kohno Y, Alevizos I, Posner M, Wong DT, Todd R. Laser capture microdissection-generated target sample for high-density oligonucleotide array hybridization. *Biotechniques*, 2000, 29(3): 530–536.
- [16] Datson NA, van der Perk-de Jong J, van den Berg MP, de Kloet ER, Vreugdenhil E. MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(5): 1300–1307. [\[DOI\]](#)