

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 57.086.862;57.088.5

**РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ
ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОТ-ПЦР ЕДИНИЧНЫХ
КЛЕТОК БЕЗ ВЫДЕЛЕНИЯ РНК В СОЧЕТАНИИ С ЛАЗЕРНОЙ
ЗАХВАТЫВАЮЩЕЙ МИКРОДИССЕКЦИЕЙ[#]**

© 2013 г. G. Huang¹, S. Wang^{2*}

¹Department of Pathology, Shantou University Medical College, Shantou, 515041, China

²Shantou University Mental Health Center, Shantou University, Shantou, 515065, China

Поступила в редакцию 27.07.2012 г.

Принята в печать 17.10.2012 г.

Лазерная захватывающая микродиссекция (laser capture microdissection, LCM) в сочетании с количественной ОТ-ПЦР представляется перспективным методом для анализа уровня экспрессии генов в интересных типах клеток. Нами разработана методология, позволяющая избежать деградации РНК эндогенными и экзогенными РНКазами и целенаправленно выделять только изучаемые клетки. Мы комбинируем инактивацию экзогенных и эндогенных РНКаз реагентами RNaseZap и RNAlater с иммунофлуоресцентным мечением, и полученные таким образом меченые клетки в срезах используем на последовательных этапах LCM и ОТ-ПЦР в реальном времени. С помощью LCM меченные антителами нейроны захватываются на крышки микроцентрифужных пробирок, не содержащих РНКаз, и там же подвергаются лизису в 3%-ном растворе NP-40 без предварительного выделения РНК. Следующую стадию – обратную транскрипцию для синтеза кДНК – проводят *in situ* на поверхности крышки, чтобы избежать потерь РНК при переносе в пробирку. Используя этот протокол, мы оценили уровни мРНК иммуноглобулина G (IgG), фактора роста нервов (NGF) и GAPDH в небольшом числе захваченных нейронов. Таким образом, предлагаемый нами новый метод, в котором использована комбинация LCM и количественной ОТ-ПЦР без предварительного выделения РНК, представляется эффективным инструментом для анализа транскрипции интересных генов в небольшом числе клеток, изолированных из предварительно обработанных реагентом RNAlater образцов тканей.

Ключевые слова: лазерная захватывающая микродиссекция, иммунофлуоресценция, кДНК, количественная ОТ-ПЦР без выделения РНК, единичные клетки.

ESTABLISHMENT OF A NEW METHOD TO DETECT GENE EXPRESSION BY LASER CAPTURE MICRODISSECTION-ASSISTED SINGLE-CELL REAL TIME RT-PCR WITHOUT RNA PURIFICATION, by Guowei Huang¹, Sheng Wang^{2*} (¹Department of Pathology, Shantou University Medical College, Shantou, 515041, China, *e-mail: shengwang.diamond@gmail.com; ²Shantou University Mental Health Center, Shantou University, Shantou, 515065, China). Laser capture microdissection (LCM) combined with real time RT-PCR represents a powerful method for analyzing gene expression levels in selected cell types. To avoid degradation of RNA by endogenous and exogenous RNases and to ensure selection of target cells only, we designed a protocol in which the inactivation of exogenous and endogenous RNases by RNaseZap and RNAlater is combined with immunofluorescent labeling, and labeled cells in sections used for subsequent LCM and real time RT-PCR. Immunolabelled neurons were captured onto the caps of RNase-free microcentrifuge tubes using LCM and lysed with 3% NP-40 without prior RNA purification. Subsequent reverse transcription for cDNA synthesis was performed *in situ* on the cap surface to avoid mRNA loss due to transfer between tubes. Applying this protocol, we determined immunoglobulin G (IgG), nerve growth factor (NGF) and GAPDH mRNA levels into small numbers of captured neurons with real time RT-PCR. Thus, this novel method combining LCM with real time RT-PCR without RNA purification appears to be an effective tool for the analysis of cell-specific target gene transcription in small numbers of cells isolated from RNAlater-treated tissues.

Keywords: laser capture microdissection, immunofluorescence, cDNA, real time RT-PCR without RNA purification, single cells.

DOI: 10.7868/S0026898413040058

[#] Текст статьи представлен авторами на английском языке.

* Эл. почта: shengwang.diamond@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Лазерная захватывающая микродиссекция (LCM) — это один из основных методов выделения высокочистых популяций клеток из срезов гетерогенных тканей с непосредственной визуализацией целевых клеток под микроскопом [1]. Ассоциированная с LCM ОТ-ПЦР представляется весьма элегантным методом исследования мРНК генов-мишеней в клетках, захваченных LCM [2]. Однако, чтобы избежать попадания загрязнений от нецелевых клеток, приходится прилагать особые усилия. Для того чтобы облегчить идентификацию целевых клеток, можно перед процедурой LCM провести иммуногистохимическое окрашивание клеток с помощью антител к специфичным клеточным маркерам [3]. Затем, не прибегая к процедуре выделения РНК, можно использовать гнездовую ОТ-ПЦР для детектирования целевой мРНК [3]. Однако при большом числе циклов гнездовой ОТ-ПЦР возрастает и риск возникновения ошибок в ходе амплификации [4]. Показано, что при проведении ассоциированной с LCM количественной ОТ-ПЦР после предварительной процедуры очистки РНК для достижения удовлетворительной оценки уровня экспрессии целевого гена требуется как минимум 100 захваченных клеток [5]. При разработке нового метода, который позволил бы проводить количественное определение мРНК с использованием меньшего числа захваченных клеток, нами использованы реагенты RNaZAP и RNAlater, которые предотвращают деградацию РНКазыми внутриклеточных РНК, благодаря чему смогли избежать стадии выделения РНК. Как известно, в процессе приготовления замороженных срезов, введения иммунофлуоресцентной метки и LCM эндогенные и экзогенные РНКазы вносят большой вклад в деградацию РНК — особенно при использовании небольшого числа клеток из образцов, богатых эндогенными РНКазыми. Хотя RNaZAP эффективно инактивирует экзогенные нуклеазы при предобработке лезвий криостата, инструментов, пленок и стекол, этот ингибитор не оказывает влияния на действие эндогенных РНКаз, которые присутствуют в образцах тканей. Вот почему для инактивации в исследуемых образцах эндогенных РНКаз перед проведением LCM мы использовали еще один реагент — RNAlater. Описанный протокол успешно использован для оценки уровня экспрессии генов иммуноглобулина G (*IgG*), фактора роста нервов (*NGF*) и *GAPDH* в небольшом числе нейронов, представленном 30 или менее клетками, выделенными из ткани гиппокампа крысы. Таким образом, разработан новый подход, основанный на сочетании ранее признанных технологий и позволяющий количественно опреде-

лять уровень экспрессии генов в небольшом числе клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Обработка тканей и иммунофлуоресценция. Нож криостата, инструменты, поверхности и пленки предварительно обрабатывали реагентом RNaseZAP (“Ambion”, США); для приготовления всех растворов использована вода, обработанная диэтилпирикарбонатом (DEPC). Трех крыс двухмесячного возраста линии Sprague Dawley, приобретенных в Лабораторном центре животных провинции Гуандонг (Laboratory Animal Center of Guangdong province), декапитировали, и мозг сразу же замораживали в жидком азоте. Все крысы использованы с одобрения Комитета по уходу и использованию животных Медицинского колледжа университета Шантоу (Animal Care and Use Committee of Shantou University Medical College). Пятимикрометровые тонкие срезы тканей, сделанные во фронтальной плоскости мозга, помещали на предметные стекла, покрытые полимерной PEN-мембраной (“Leica”, Германия). Срезы тканей инкубировали с реагентом RNAlater (“Ambion”, США) в течение 5 мин, промывали водой (для удаления RNAlater) и затем фиксировали 96%-ным этанолом в течение 5 мин. Этанол удаляли ополаскиванием стекол в фосфатно-солевом буфере (PBS), также обработанном DEPC, а затем в PBS с 2 М NaCl (PBS+) [6]. Срезы тканей инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре с мышиными анти-NeuN моноклональными антителами (“Millipore”, США) в разведении 1 : 50 в PBS+, а затем трижды промывали PBS+. Далее срезы окрашивали конъюгированными с флуорохромом NL557 ослиными антителами против IgG мыши (“R&D”, США) в разведении 1 : 100 в PBS+ в течение 5 мин при комнатной температуре, затем споласкивали тем же буфером три раза по 30 с, после чего быстро ополаскивали PBS. Для полной дегидратации срезы ополаскивали трижды 100%-ным этанолом, а затем трижды ксилолом — каждый раз по 30 с [6].

Лазерная захватывающая микродиссекция. LCM проводили с использованием системы лазерной микродиссекции “Leica” (США). Флуоресцентно окрашенные клетки визуализировали с помощью микроскопа при 63-кратном увеличении. Приблизительно 30 клеток помещали на свободную от РНКаз крышку 0.5-мл центрифужной пробирки, в которой находилось 10 мкл реакционного буфера для ДНКазы I (“Invitrogen”, США) с добавлением 3% NP-40 (“Invitrogen”).

Удаление ДНК-примесей из образцов РНК. Клетки лизировали непосредственно на крышке

пробирки в 10 мкл буфера для ДНКазы I, содержащего 3% NP-40, при 42°C в течение 20 мин, после чего проводили реакцию расщепления ДНКазой I [3]. Для этого на крышку наносили 2 мкл 10× буфера для ДНКазы I, 1 мкл ДНКазы I (1 ед./мкл) и 7 мкл воды и оставляли при комнатной температуре на 5 мин [7]. ДНКазу I инактивировали путем добавления к реакционной смеси 1 мкл 25 мМ раствора ЭДТА с последующим прогревом крышки при 65°C в течение 10 мин.

Обратная транскрипция. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора для синтеза первой цепи SuperScript III (“Invitrogen”, США) согласно инструкции: 1 мкл смеси случайных гексамеров, 1 мкл смеси 10-мМ dNTPs и 8 мкл воды вносили в находящийся на крышке обработанный ДНКазой I образец, крышку инкубировали при 65°C в течение 5 мин и затем помещали на лед как минимум на 1 мин. Смесь синтезированных кДНК далее обрабатывали, прямо на крышке, следующими компонентами в указанном порядке: 4 мкл 10× буфера для обратной транскрипции, 4 мкл 25 мМ MgCl₂, 2 мкл 0.1 М DTT, 1 мкл 40 ед./мкл RNaseOUT, 1 мкл 200 ед./мкл SuperScript III RT. Крышку инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем 50 мин при 50°C, после чего останавливали реакцию при 85°C в течение 5 мин. Продукты реакции собрали центрифугированием при 1000 × g в течение 5 мин и затем инкубировали с РНазой H (2 ед./мкл) в течение 20 мин при 37°C.

ПЦР в реальном времени (количественная ПРЦ). Количественную ПРЦ полученных кДНК проводили с помощью набора Sybr Premix Ex Taq (“Takara”, Япония), следуя рекомендациям [8]. Использованы следующие праймеры для области, кодирующей константный участок тяжелой цепи IgG:

5'-AGGCTTCTATCCCCAGACATTTAT-3'
(прямой) и

5'-AGACTCTTCTCAGTATGGTGGTTGT-3'
(обратный);

для *NGF* [8]:

5'-TGTGGACCCCAAAGTGTTAAGA-3'
(прямой) и

5'-GTCTAAATCCAGAGTGTCCGAAGAG-3'
(обратный);

для *GAPDH*: 5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3'
(прямой) и

5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3' (обратный).

Размер продуктов ПЦР составил 212 п.н. для *IgG*, 194 п.н. для *GAPDH* и 100 п.н. для *NGF*. Ко-

нечный объем реакционной смеси соответствовал 50 мкл и состоял из 25 мкл Sybr Premix Ex Taq, 1 мкл стандартизованного (референс) образца красителя ROX, 0.125 мкл 40 пмоль/мкл прямого праймера, 0.125 мкл 40 пмоль/мкл обратного праймера, 2 мкл матрицы кДНК и 21.75 мкл воды. Условия проведения ПЦР: денатурация при 95°C в течение 5 с, отжиг при 60°C в течение 31 с, а затем 45 циклов в амплификаторе для ПЦР в реальном времени ABI 7300 (“Applied Biosystems”, США).

Получение РНК *IgG in vitro* для построения калибровочной кривой. Чтобы амплифицировать кДНК *IgG* из образцов тканей, мы модифицировали праймеры, добавив последовательность T7-промотора на 5'-конец прямого праймера и последовательность поли(Т) к обратному праймеру [9]. После модификаций получены следующие праймеры: 5'-GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGAAAAGCATCTCCAAACCCGAAGG-3' (прямой) и 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGAGGTAGGTGTTGGCATCCTTTAG-3' (обратный). Последовательность GATCAC добавили на 5'-конец прямого праймера с целью повысить эффективность транскрипции. Поли(Т)-последовательность присоединена к 5'-концу обратного праймера для увеличения стабильности мРНК в ходе транскрипции *in vitro*. Размер ПЦР-продукта составляет 398 п.н. Экстрагированная мРНК из нейронов, захваченных из срезов тканей гиппокампа крысы, транскрибирована в кДНК, и ПЦР-продукт очищен электрофорезом в 2%-ном агарозном геле, а затем экстрагирован при помощи набора для экстракции ДНК из агарозного геля (“Promega”, США).

Транскрипцию *in vitro* с использованием очищенной кДНК *IgG* в качестве матрицы осуществляли согласно инструкции к набору для транскрипции *in vitro* (“Takara”). Для этого смешивали 2 мкл 10× буфера для транскрипции, 2 мкл раствора АТР, 2 мкл раствора ГТР, 2 мкл раствора СТР, 2 мкл раствора УТР, 0.5 мкл ингибитора РНКаз, 2 мкл Т7 РНК-полимеразы, 2.5 мкл не содержащей РНКаз dH₂O и 5 мкл ДНК. Транскрипцию *in vitro* проводили при 42°C в течение 2 ч с последующим удалением ДНК-матрицы ДНКазой I при следующих условиях: 2 мкл не содержащей РНКаз ДНКазы I (5 ед./мкл) добавляли к реакционной смеси и выдерживали при 37°C в течение 30 мин; полученную РНК очищали, используя набор RNA Clean Kit (“BioTeke Corporation”, Китай).

Построение калибровочных кривых для *IgG* и *GAPDH*. Прежде всего, определяли эффективность ПЦР относительно целевого гена и гена сравнения. Для количественной оценки содержания

генного транскрипта использован метод $2^{-\Delta\Delta CT}$ как относительный количественный метод для ПЦР в реальном времени. Для построения калибровочных кривых использовали кДНК *GAPDH*, синтезированную в ходе обратной транскрипции. Делали десятикратные серийные разведения кДНК *GAPDH*, от 1 до 10^{-5} , и амплифицировали с помощью ПЦР в реальном времени, определяя значения порогового цикла C_t – для всех образцов оно не превышало 35 (значение C_t меньше 35 считается результативным). Вследствие этого серийные разведения кДНК *GAPDH* использовали как опорные точки для построения калибровочной кривой. Однако содержание транскрипта *IgG* оказалось слишком низким, так что максимальные значения C_t в количественной ПЦР были выше 35 при использовании десятикратных серийных разведений кДНК *IgG*. Вот почему для построения калибровочного графика для *IgG* использовали следующую схему: методом обратной транскрипции *in vitro* получали транскрипт *IgG* и использовали его в качестве матрицы для синтеза кДНК, делали десятикратные серийные разведения кДНК, от 1 до 10^{-5} , и использовали их для построения соответствующей калибровочной кривой. После этого проводили количественную ОТ-ПЦР для всех кДНК в различных концентрациях и получали значения C_t для каждого случая. Значения C_t по оси Y соотносили с логарифмом разведения, отложенным по оси X, и получали линейную зависимость для целевого гена и гена сравнения. Для всех генов рассчитывали разницу между абсолютными значениями наклона кривой линейной регрессии.

Анализ данных. Существуют два основных подхода для оценки изменений в количестве транскрипта целевого гена: это метод оценки $2^{-\Delta\Delta CT}$

[10] и метод построения калибровочных кривых [11]. Первый метод ($2^{-\Delta\Delta CT}$) может быть использован, если разница между абсолютными значениями наклона кривой линейной регрессии целевого гена и гена сравнения составляет менее 0.1 [12], тогда как метод калибровочных кривых может быть использован и в случае, если разница составляет более 0.1. В этой работе разница во всех случаях была менее 0.1, поэтому для обработки результатов использован метод $2^{-\Delta\Delta CT}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммунофлуоресценция нейронов из гиппокампа крыс

Нейроны гиппокампа окрашивали введением иммунофлуоресцентной метки (рис. 1а). Положительный и отрицательный контроли иммунофлуоресценции не использовали, поскольку захваченные клетки в дальнейшем анализировали с помощью количественной ОТ-ПЦР на наличие маркера нейронов и *NGF*. Методом количественной ОТ-ПЦР показано, что при использовании системы LCM (рис. 1б) из ткани гиппокампа было захвачено 30 нейронов (рис. 2б).

Оценка уровней мРНК IgG, NGF и GAPDH в нейронах гиппокампа крыс методом количественной ОТ-ПЦР

Для проверки предложенного экспериментального метода мы выбрали следующие гены: *IgG* [13], *NGF* [14] и *GAPDH*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что все три гена успешно амплифицировались, что позволило определить их количество (рис. 2). На кривых диссоциации были только специфические пики генов *IgG*, *NGF* и *GAPDH*, что свидетельствует о

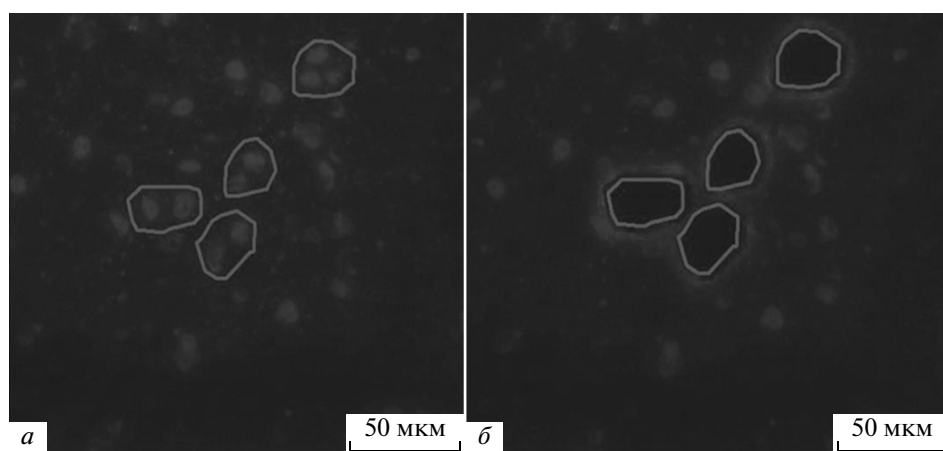


Рис. 1. Иммунофлуоресцентно окрашенные нейроны в гиппокампе крысы. а – До проведения LCM; б – после LCM. Шкала 50 мкм.

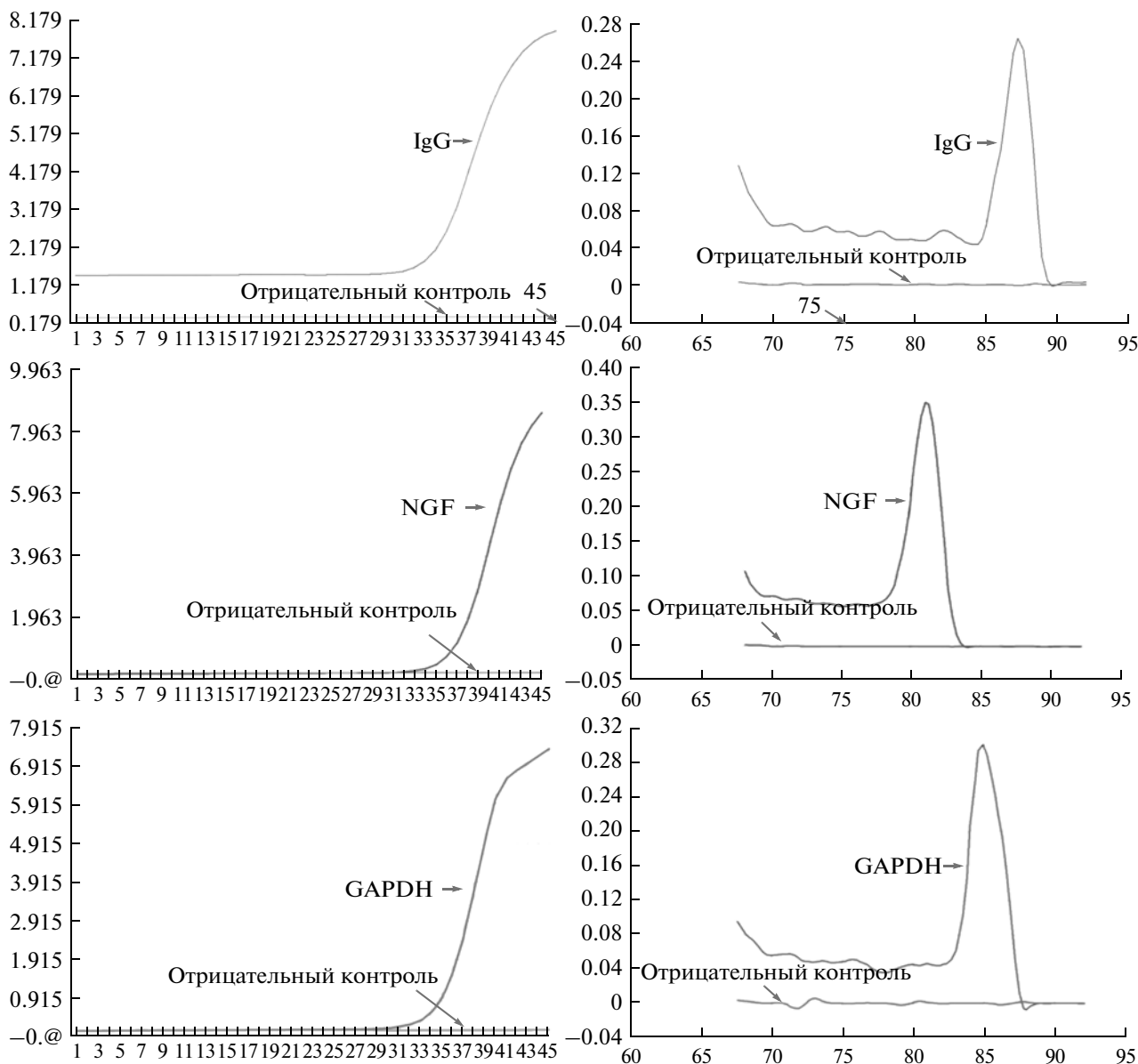


Рис. 2. Определение уровня транскрипции целевого гена методом ПЦР реальном времени. В отрицательном контроле в качестве матрицы для ПЦР использована вода (степень чистоты “ultra”). Слева: кривая амплификации; по оси X отложено количество циклов, по оси Y – интенсивность флуоресценции. Справа: кривая диссоциации; по оси X – температура, по оси Y – производная интенсивности флуоресценции по температуре. Кривые накопления и диссоциации продуктов ПЦР для *IgG* (а), *NGF* (б) и *GAPDH* (в).

специфичности ПЦР-амплификации. Размер каждого из продуктов ПЦР подтвержден с помощью электрофореза в агарозном геле.

Калибровочные кривые для *IgG* и *GAPDH* в нейронах гиппокампа

Для *IgG* и *GAPDH* наклон уравнения линейной регрессии соответствовал -3.38 и -3.46 (рис. 3а и 3б). Так как разница между этими значениями составила менее 0.1, для анализа результатов коли-

чественной ОТ-ПЦР образцов *IgG* и *GAPDH* использован метод $2^{-\Delta\Delta CT}$.

В процессе построения калибровочных графиков для *IgG* и *GAPDH* и анализа разницы между абсолютными значениями наклона уравнения линейной регрессии нами показано, что количество транскрипта *IgG* можно определить в разных тканях с использованием метода $2^{-\Delta\Delta CT}$. В данной работе в захваченных нейронах крыс определяли количество транскрипта целевого гена *IgG*, нормализованное на количество транскрипта *GAP-*

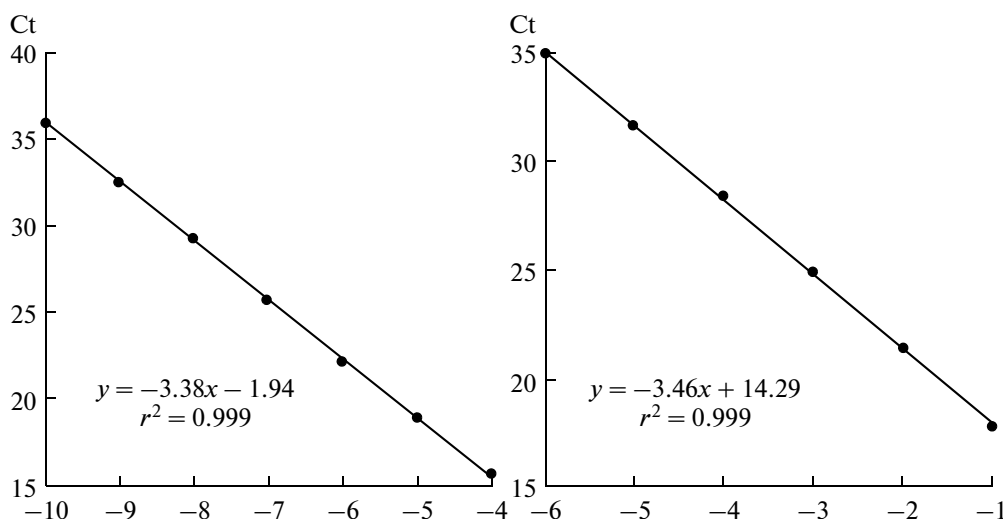


Рис. 3. Построение калибровочных кривых для *IgG* (а) и *GAPDH* (б) с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

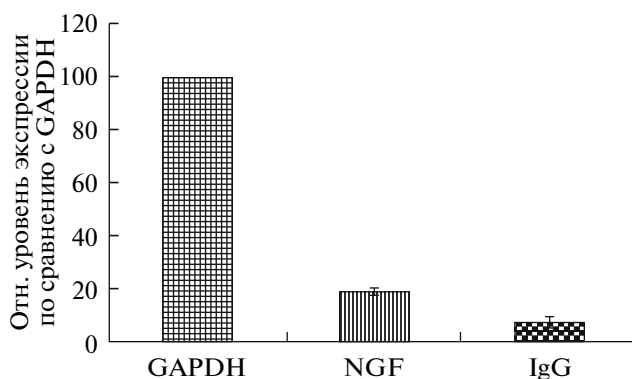


Рис. 4. Анализ методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ результатов, полученных с помощью количественной ПЦР, по содержанию транскриптов целевых генов. Для каждого образца ПЦР проведена дважды. Шкала ошибок отмечает стандартное отклонение.

DH, используя для этого полученные методом количественной ОТ-ПЦР значения C_t . Таким же образом оценено количество транскрипта *NGF* относительно *GAPDH* (рис. 4) и показано, что *GAPDH* в 5.1 раз больше, чем *NGF*, и в 12.7 раз больше, чем *IgG*. На основании полученных результатов мы полагаем, что разработанная нами методология может применяться для сравнения количества транскрипта *IgG* в нейронах гиппокампа крыс, подвергнувшихся острому стрессу, с его же количеством у контрольных крыс. К тому же, метод может быть применен для количественной оценки транскрипта *IgG* в ходе развития и дифференцировки нормальных и опухолевых тканей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Комбинация ОТ-ПЦР с LCM – это мощный инструмент для анализа уровня геной экспрес-

сии в клетках интересующего типа. Однако подобный анализ затруднен в случае небольшого числа исследуемых клеток, так как из них может быть выделено весьма ограниченное количество мРНК. В целях решения этой проблемы некоторые исследовательские группы проводили ОТ-ПЦР без предварительной очистки РНК. Этот подход, в отличие от ОТ-ПЦР с предварительным выделением РНК, дает некоторое преимущество, позволяя избежать потерь мРНК в процессе переноса образцов из пробирки в пробирку. Также методика позволяет в некоторой степени уменьшить стоимость экспериментов. Однако в этом случае детектирование уровня транскрипции целевых генов в небольшом числе клеток при проведении количественной ОТ-ПЦР затруднено из-за быстрой деградации мРНК [15]. Известно, что использование реагента RNAlater в некоторой степени предотвращает деградацию мРНК эндогенными РНКазами

[16]. В своем стремлении разработать методологию, пригодную для анализа уровня экспрессии генов в небольшом числе клеток, мы решили использовать RNAlater для обработки образцов перед проведением LCM. Однако при этом мы столкнулись с новой проблемой: образцы, промытые впоследствии PBS (обработанным DEPC), по-видимому, все еще содержали небольшие количества RNAlater, что, похоже, мешало работе Taq-полимеразы в ходе ОТ-ПЦР. Мы обошли это влияние RNAlater на Taq-полимеразу, увеличив конечный объем реакционной смеси для ПЦР. Полученные результаты показывают, что в отсутствии стадии очистки РНК применение преобработки образцов тканей с помощью RNAlater позволяет анализировать количество мРНК с помощью ОТ-ПЦР в очень небольшом числе клеток (менее 30). Мы пробовали захватить один индивидуальный нейрон гиппокампа крысы с помощью LCM, чтобы оценить в нем уровень транскрипции генов *IgG* и *GAPDH* методом ОТ-ПЦР, однако эта попытка не удалась. Хотя технология локальной фиксации потенциала (patch clamp) и может быть использован для получения цитоплазмы отдельной клетки в составе культуры клеток, он не пригоден для получения цитоплазмы отдельной клетки из образцов тканей [17]. Также мы ввели в клетки иммунофлуоресцентную метку со специфическим клеточным маркером, чтобы во время LCM захватить только интересующие нас клетки. Последующая количественная ОТ-ПЦР с праймерами к *NGF* подтвердила, что захваченные клетки — действительно нейроны.

В предлагаемом нами протоколе есть несколько моментов, которые можно считать ключевыми для успешного детектирования транскриптов генов в малом количестве клеток. Прежде всего, самое важное условие относится к образцам ткани, которые должны быть свежими (“as fresh as possible”). Во-вторых, использование RNAlater совершенно необходимо для инактивации эндогенных РНКаз, особенно при работе с такими тканями, как селезенка или поджелудочная железа — в них особенно много эндогенных РНКаз. В-третьих, важно использовать этанол для обезвоживания срезов тканей, чтобы РНКазы так и оставались инактивированными, а затем удалять избыток этанола при помощи ксилола. В-четвертых, во время проведения LCM целевые клетки должны быть захвачены и собраны в течение короткого периода времени.

Нами показано, что разработанный подход позволяет детектировать низкокопийный транскрипт *IgG* в нейронах крысы с помощью количественной ОТ-ПЦР. Полагаем, что его можно использовать для анализа уровня транскрипции любых генов,

включая факторы роста, цитокины, гормоны, факторы транскрипции в различных типах тканей. Это подходящий метод для изучения молекулярных и клеточных механизмов физиологических и патологических процессов.

Работа поддержана грантом Национального Фонда Естественных Наук Китая (The National Natural Science Foundation of China, 81102280 для WS).

Экспериментальная часть работы, ее концепция, оформление и написание выполнены GWH. Приобретение реагентов, материалов, оборудования, анализ данных и редактирование манускрипта сделаны WS.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bonner R.F., Emmert-Buck M., Cole K., Pohida T., Chuaqui R., Goldstein S., Liotta L.A. 1997. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science*. **278**, 1481–1483.
2. Macdonald J.A., Murugesan N., Pachter J.S. 2008. Validation of immuno-laser capture microdissection coupled with quantitative RT-PCR to probe blood-brain barrier gene expression *in situ*. *J. Neurosci. Methods*. **174**, 219–226.
3. Keays K.M., Owens G.P., Ritchie A.M., Gilden D.H., Burgoon M.P. 2005. Laser capture microdissection and single-cell RT-PCR without RNA purification. *J. Immunol. Methods*. **302**, 90–98.
4. Freeman W.M., Walker S.J., Vrana K.E. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*. **26**, 112–125.
5. Porombka D., Baumgartner W., Herden C. 2008. A rapid method for gene expression analysis of Borna disease virus in neurons and astrocytes using laser microdissection and real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods*. **148**, 58–65.
6. Clément-Ziza M., Munnich A., Lyonnet S., Jaubert F., Besmond C. 2008. Stabilization of RNA during laser capture microdissection by performing experiments under argon atmosphere or using ethanol as a solvent in staining solutions. *RNA*. **14**, 2698–2704.
7. Luciakova K., Hodny Z., Barath P., Nelson D. 2000. *In vivo* mapping of the human adenine nucleotide translocator-2 (ANT2) promoter provides support for regulation by a pair of proximal Sp1-activating sites and an upstream silencer element. *Biochem. J.* **352**, 519–523.
8. Sabsovich I., Wei T., Guo T.Z., Zhao R., Shi X., Li X., Yeomans D.C., Klyukin M., Kingery W.S., Clark J.D. 2008. Effect of anti-NGF antibodies in a rat tibia fracture model of complex regional pain syndrome type I. *Pain*. **138**, 47–60.
9. Stoflet E.S., Koeberl D.D., Sarkar G., Sommer S.S. 1988. Genomic amplification with transcript sequencing. *Science*. **239**, 491–494.
10. Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR

- and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. **25**, 402–408.
11. Morrison T.B., Weis J.J., Wittwer C.T. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. **24**, 954–962.
 12. Senchenko V., Liu J., Braga E., Mazurenko N., Loginov W., Seryogin Y., Bazov I., Protopopov A., Kissel'ov F.L., Kashuba V., Lerman M.I., Klein G., Zabarovsky E.R. 2003. Deletion mapping using quantitative real-time PCR identifies two distinct 3p21.3 regions affected in most cervical carcinomas. *Oncogene*. **22**, 2984–2992.
 13. Huang J., Sun X., Mao Y., Zhu X., Zhang P., Zhang L., Du J., Qiu X. 2008. Expression of immunoglobulin gene with classical V-(D)-J rearrangement in mouse brain neurons. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **8**, 1604–1615.
 14. Salama-Cohen P., Arévalo M.Á., Meier J., Grantyn R., Rodríguez-Tébar A. 2005. NGF controls dendrite development in hippocampal neurons by binding to p75NTR and modulating the cellular targets of Notch. *Mol. Biol. Cell*. **16**, 339–347.
 15. Copois V., Bibeau F., Bascoul-Mollevi C., Salvétat N., Chalbos P., Bareil C., Candeil L., Fraslon C., Conseiller E., Granci V., Mazière P., Kramar A., Ychou M., Pau B., Martineau P., Molina F., Del Rio M. 2007. Impact of RNA degradation on gene expression profiles: assessment of different methods to reliably determine RNA quality. *J. Biotechnol.* **127**, 549–559.
 16. Micke P., Ohshima M., Tahmasebpoor S., Ren Z.P., Ostman A., Pontén F., Botling J. 2006. Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. *Lab. Invest.* **86**, 202–211.
 17. Shino M., Ozawa S., Furuya N., Saito Y. 2008. Membrane properties of excitatory and inhibitory neurons in the rat prepositus hypoglossi nucleus. *Eur. J. Neurosci.* **27**, 2413–2424.