

УДК 577.21:576.315/.316-082.263-086.164
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-4-111-119>

Современные методы синтеза ДНК-зондов для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH): технологии и применение

Бабай Т.С., Васильев С.А.

Научно-исследовательский институт (НИИ) медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

РЕЗЮМЕ

Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) остается незаменимым инструментом молекулярной диагностики, позволяющим с высокой точностью выявлять хромосомные аномалии, лежащие в основе многих наследственных и онкологических заболеваний. Движение медицины в сторону персонализированных подходов и расширение спектра диагностируемых патологий требуют постоянного совершенствования методов синтеза ДНК-зондов. Несмотря на существующие ограничения, такие как стоимость и сложность синтеза, будущее диагностики с помощью FISH связано с разработкой высокоспецифичных, мультиплексных и доступных зондов, которые позволят перейти к комплексному анализу генома и транскриптома. Данная работа написана с целью отразить эволюцию методов получения зондов от классических к высокотехнологичным, включая SABER-FISH, технологии на основе CRISPR/Cas9 (CASFISH), smFISH.

Ключевые слова: флуоресцентная гибридизация *in situ*, молекулярная цитогенетика, синтез ДНК-проб, хромосомные aberrации

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов при проведении исследования.

Для цитирования: Бабай Т.С., Васильев С.А. Современные методы синтеза ДНК-зондов для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH): технологии и применение. *Бюллетень сибирской медицины*. 2025;24(4):111–119. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-4-111-119>.

Modern methods of DNA probe synthesis for fluorescence *in situ* hybridization (FISH): technologies and applications

Babay T.S., Vasilyev S.A.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences
10 Naberezhnaya reki Ushaiki St., 634050 Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) remains an indispensable tool for molecular diagnostics, which makes it possible to detect chromosomal abnormalities underlying many hereditary and oncological diseases with high accuracy. The advancement of medicine towards personalized approaches and the expansion of the spectrum of diagnosed pathologies require constant improvement of methods for synthesizing DNA probes. Despite existing limitations such as the cost and complexity of synthesis, the future of FISH diagnostics is linked to the development of highly specific, multiplex, and affordable probes that will enable the transition to complex genome and transcriptome analysis. The aim of this article was to reflect the evolution of probe production methods from classical to high-tech, including SABER-FISH, CRISPR/Cas9 (CASFISH), and smFISH technologies.

✉ Бабай Татьяна Сергеевна, tatyana.babay@medgenetics.ru

Keywords: fluorescence in situ hybridization, molecular cytogenetics, DNA probe synthesis, chromosomal aberrations

Conflict of interest. The authors declare no obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out according to the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 075-00490-25-04 (Registration number 125042105351-3).

For citation: Babay T.S., Vasilyev S.A. Modern methods of DNA probe synthesis for fluorescence in situ hybridization (FISH): technologies and applications. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2025;24(4):111–119. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-4-111-119>.

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) остается одним из самых надежных и чувствительных цитогенетических методов обнаружения протяженных хромосомных aberrаций, таких как делеции, амплификации, транслокации и инверсии, позволяющая с высокой точностью регистрировать количество клеток, имеющих данные нарушения [1]. Этот мощный метод визуализации позволяет детектировать и локализовать специфические нуклеотидные последовательности непосредственно на хромосомах или в интерфазных ядрах с беспрецедентной точностью, используя флуоресцентно меченные ДНК-зонды. В медицине FISH стал незаменимым инструментом для диагностики хромосомных аномалий (анеуплоидий, транслокаций, делеций, амплификаций), лежащих в основе многих наследственных заболеваний и онкологических процессов. В фундаментальных исследованиях FISH открывает возможности для изучения архитектуры генома, пространственной организации хромосом, экспрессии генов и динамики хроматина.

Эволюция технологии FISH неразрывно связана с прогрессом в разработке ДНК-зондов. Пройден путь от использования радиоактивных меток, сопряженных с низким разрешением и рисками для здоровья, к современным флуоресцентным системам детекции. Флуоресцентно меченные зонды обеспечили высочайшее пространственное разрешение, мультиплексность, безопасность и возможность количественного анализа. Качество, специфичность и доступность ДНК-зондов напрямую определяют эффективность и широту применения FISH.

В свете стремительного развития молекулярной биологии и геномики, требующих все более сложных и специализированных зондов, систематизация современных методов их синтеза становится критически важной задачей. Целью исследования является проведение комплексного анализа актуальных технологий синтеза ДНК-зондов для FISH, сравнение их эффективности, а также выделение наиболее перспективных направлений в этой динамично развивающейся области.

КЛАССИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ДНК-ЗОНДОВ ДЛЯ FISH

Глобально ДНК-зонды для FISH можно разделить на три группы: (1) цельнохромосомные; (2) зонды, состоящие из повторяющихся блоков ДНК, и (3) локус-специфичные зонды. Каждая из этих групп выполняет свои задачи, и подходы к созданию каждого из этих типов отличаются.

Для обнаружения сложных межхромосомных перестроек применяют цельнохромосомные зонды, нашедшие свое применение как в научных исследованиях, так и в клинической практике [2]. В классическом варианте цельнохромосомные зонды получают путем микродиссекции интересующих метафазных хромосом или их частей с помощью лазера или скаблывания их стеклянной микропипеткой, после чего остается амплифицировать полученный материал и включить в последовательность ДНК флуоресцентную метку [3]. Такой способ крайне трудоемок и требует высокой квалификации специалиста, выполняющего эти процедуры. Для производства коммерческих проб применяют комбинацию проточной цитофлуорометрии и клеточного сортера [4]. У человека таким способом могут быть выделены все хромосомы, за исключением хромосом 9–12, имеющих сходный размер и морфологию. На создание одного зонда уходит около 300 хромосом. Полученную ДНК фрагментируют, амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), что увеличивает количество матрицы и способствует снижению числа случаев неспецифического связывания [5].

Нередко для создания как цельнохромосомных, так и локус-специфичных ДНК-зондов используют методы клонирования протяженных участков ДНК в различные варианты искусственных хромосом. Среди этих систем особое внимание получили бактериальные искусственные хромосомы (BAC) из-за ряда преимуществ: легкая очистка полученной ДНК, малая подверженность химеризму и большая стабильность [6]. И хотя получение зондов из BAC/плазмидных клонов сопряжено с дополнительной работой по культивированию микроорганизмов и последующей

изоляции ДНК, данная методика остается востребованной, в частности, в сфере получения прицентромерных и субтеломерных зондов. Это обусловлено тем, что наличие повторов как для ферментативного, так и для химического синтеза все еще является лимитирующим фактором.

Принципиально отличные варианты зондов – олигонуклеотидные зонды. Такие зонды могут быть созданы на основе как повторяющихся элементов генома, так и уникальных последовательностей ДНК, представленных в виде одной копии. Для первого варианта даже не требуется полностью секвенированный эталонный геном [7]. За счет наличия самих повторов происходит многократная амплификация сигнала, и, как правило, длина такого зонда составляет 15–30 пар нуклеотидов (п. н.), получается в ходе химического синтеза. Короткие зонды имеют более легкий доступ к своей мишени, но на них можно расположить меньшее количество флуоресцентных меток [8]. В случае же олигонуклеотидных зондов, представленных уникальными последовательностями, необходимо синтезировать пул таких олигонуклеотидов, суммарная длина которых должна превышать 10–30 тыс. п. н., чтобы ДНК-зонд хорошо визуализировался в нужном регионе хромосомы при проведении FISH-анализа.

Зонды для FISH-анализа стали неотъемлемой частью в цитогенетической диагностике для определения уровня мозаицизма, поиска маркерных хромосом и установления их происхождения и состава [9]. Сформированы и постоянно дополняются хромосомоспецифичные ДНК-библиотеки для диагностики наиболее частых синдромов, таких как Патау, Эдвардса, Дауна (трисомии по ауто索мам 13, 18, 21 соответственно), Кляйнфельтера и Шерешевского – Тернера (связанные с нарушением числа половых хромосом X и Y).

Для определения робертсоновских транслокаций, синдромов Прадера – Вилли, Ангельмана и пр. разработаны локус-специфичные зонды, которые также применяются с целью выявления некоторых делеций и перестроек хромосом [10]. Кроме того, ген-специфические мишени могут быть использованы для обнаружения амплификаций генов, часто обнаруживаемых в опухолевых клетках. Примером может служить обнаружение изменений числа копий гена рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (*HER2*) в качестве прогностического биомаркера при раке молочной железы [11] и яичников [12]. Тип зондов, которые располагаются особняком, – PNA-зонды (peptide nucleic acid). PNA-зонд похож на ДНК-зонд, за исключением того, что фосфатный остов представляет собой псевдопептидный полимер. Он не имеет заряда, что

позволяет PNA-зонду связываться с комплементарной последовательностью ДНК или РНК с более высоким сродством, нежели в парах ДНК-ДНК или РНК-РНК [13]. PNA была разработана командой Питера Нильсена в 1991 г. [14].

Атипичная структура PNA-зондов не распознается нуклеазами и протеазами, что продлевает их срок службы *in vivo* и *in vitro* [15], при этом внесение флуоресцентных меток напрямую остается возможным.

PNA-FISH позволил детектировать сигналы на концевых участках хроматид и точно измерять длину теломера в метафазных хромосомах [16, 17].

Методы синтеза ДНК-зондов

Как уже было отмечено выше, достаточно широкое распространение получили ферментативный и химический синтез олигонуклеотидных зондов *de novo*.

К ферментативным методам синтеза ДНК-зондов относится ПЦР с частично вырожденными праймерами (degenerate oligonucleotide-primed PCR, DOP-PCR) и ПЦР длинных фрагментов.

В полимеразной цепной реакции необходимо присутствие целевой последовательности, которая и станет основой синтеза будущего зонда. Для DOP-PCR в качестве матрицы чаще всего используют ВАС-клоны или микродиссектированные хромосомы, так как в этом случае имеется изолированный участок генома, интересующий исследователя. Принцип DOP-PCR заключается в использовании частично вырожденных праймеров, содержащих случайную последовательность из шести оснований, фланкированную на 3'- и 5'-концах фиксированными последовательностями.

Необходимо провести два последовательных раунда ПЦР. При этом во втором этапе ПЦР-амплификации участвуют праймеры, нацеленные на фиксированную последовательность частично вырожденных олигонуклеотидов из предыдущего цикла, а реакция амплификации проходит при более высокой температуре отжига [18]. Использование полимераз с корректирующей активностью, например *Pwo*, и увеличение времени отжига и элонгации улучшают производительность анализа, что приводит к меньшему количеству ошибок, более длинным фрагментам и увеличению покрытия [19, 20].

Синтез ДНК-зондов для FISH посредством ПЦР длинных фрагментов включает в себя следующие стадии: определение целевого региона генома; последующий подбор олигонуклеотидных праймеров на выбранные участки; наработка ДНК-продуктов с помощью ПЦР длинных фрагментов (длиной до 15 тыс. п. н.); получение библиотеки фрагментов

ДНК (не)ферментативными методами; амплификация библиотеки с помощью синтезированных целевых праймерных последовательностей; введение в геномную библиотеку флуоресцентной метки. Такой метод синтеза чаще всего применяют для создания локус-специфичных ДНК-зондов.

Химический синтез олигонуклеотидов для гибридизации *in situ* подразделяют на твердофазный и микроматричный. В настоящее время на рынке синтеза олигонуклеотидов доминируют автоматизированные приборы, использующие метод твердофазного фосфорамидитного синтеза, впервые разработанного Марвином Карутерсом в 1980-х гг. [21, 22]. Синтез олигонуклеотидов состоит из повторяющегося четырехэтапного цикла, в котором к растущей цепи, закрепленной на твердом носителе, по одному добавляются фосфорамидиты. Сначала удаляется защитная группа, открывая 5'-гидроксильную группу для реакции. Затем происходит присоединение активированного мономера (фосфорамидита) с образованием фосфитной связи. Далее экранируются непрореагировавшие гидроксильные группы, чтобы предотвратить последующее присоединение нуклеозидов, помогая избежать ошибок. Завершением цикла служит окисление фосфита до стабильного фосфата. Цикл повторяется до достижения нужной длины цепи. По завершении синтеза олигонуклеотиды отделяют от носителя [23]. Олигомеры могут быть очищены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии или гель-электрофореза.

Логичным этапом развития твердофазного синтеза олигонуклеотидов стала технология микроматричного синтеза. В начале 1990-х гг. фирма Affymetrix (США) разработала один из первых микрочиповых синтезаторов олигонуклеотидов с использованием фотолабильных соединений, что в конечном итоге привело к созданию целой индустрии ДНК-микрочипов [24]. Фактически в основе синтеза олигонуклеотидов лежит традиционный фосфорамидитный метод, но с заменой кислотолабильной 4,4'-диметокситритильной группы на фотолабильную защитную группу [25].

Лидером по числу одновременно синтезируемых олигонуклеотидов и их длине является синтезатор фирмы Agilent Technologies (США). Он способен синтезировать на одной подложке до 1 млн олигонуклеотидов, длина которых достигает 200 нуклеотидных звеньев [24].

Ферментативные методы синтеза ДНК-зондов находят большее применение в лабораторной практике, что, с одной стороны, частично объясняется трудоемкостью технологии химического синтеза.

С другой стороны, химический синтез обеспечивает более высокую степень кастомизации: нуклеотиды могут быть заменены на их атипичные аналоги, число включаемых флуорохромов может быть четко задано и т.д. Химически синтезированные олигонуклеотиды чаще всего короткие (до 100 нуклеотидов), что позволяет им проще проникать к мишеням, особенно если гибридизация проводится не на отдельных клетках, а на срезах тканей. Более длинные зонды, полученные посредством ПЦР, демонстрируют более высокую специфичность сигнала, однако побочные продукты амплификации могут приводить к повышению общего фона. Зонды для клинических целей (диагностики крупных хромосомных перестроек при разнообразных патологиях), имеющие высокий спрос, преимущественно производятся с помощью ферментативного синтеза. Основным потребителем коммерческих химически синтезированных зондов – различные исследовательские институты, такие зонды имеют более высокую стоимость, больший потенциал к мультиплексированию, а значит и обеспечивают возможность проведения более сложных исследований, вплоть до количественного анализа единичных транскриптов.

Методы мечения зондов

Методы мечения зондов для FISH-анализа принято подразделять на прямые, в этом случае флуорофоры ковалентно присоединены к нуклеотидной цепи, и непрямые, где флуоресцентная метка представлена более сложным комплексом и связана с нуклеотидной последовательностью опосредованно.

Один из наиболее простых методов прямого мечения ДНК/РНК-олигонуклеотидов – мечение цепи во время химического синтеза. В данном варианте непосредственно к растущей цепи присоединяются флуоресцентно меченые фосфорамидиты. Химический способ более воспроизводим, так как не зависит от удельной активности лабильных ферментов.

Классические варианты ферментативного прямого мечения основаны на способности ДНК-полимераз наращивать нуклеотидные цепи. Прямое мечение осуществляют путем DOP-PCR, удлинения затравки и ник-трансляции.

Метод удлинения затравки предполагает гибридизацию на одну из цепей короткого праймера, комплементарного интересующему известному участку генома, после чего ДНК-полимераза достраивает небольшой участок цепи. В отличие от любого из вариантов ПЦР в данной методике не происходит кратной амплификации матрицы, а вместе с ней и флуоресцентного сигнала [26].

В методе ник-трансляции используется комбинация двух ферментов: дезоксирибонуклеазы I, которая наносит одноцепочечные разрывы ДНК, оставляя свободной 3'-гидроксильную группу, и ДНК-полимеразы I, которая последовательно добавляет нуклеотиды к 3'-концу. При росте цепи ДНК-полимераза, обладающая 5'-3' экзонуклеазной активностью, удаляет нуклеотиды с 5'-конца. В ходе реакции происходит встраивание как меченных, так и немеченных нуклеотидов и в конечном итоге образуются двухцепочечные меченые зонды [27]. Основным недостатком данного метода является то, что внесение разрывов в зонд снижает его специфичность по отношению к целевой последовательности ДНК, кроме того, для применения этого метода требуется достаточно большое количество исходной ДНК (около 1 мкг).

Прямое мечение находит большее применение, так как является более простой и удобной процедурой и после гибридизации требует только отмывания оставшегося несвязанного меченого зонда.

При непрямом мечении в участок нуклеотидной цепи встраивается дезоксиуридилмонофосфат, конъюгированный с репортерной молекулой, которая, в свою очередь, образует прочную пару с флуоресцентно меченными молекулами. Пары репортерных молекул, нашедшие наиболее широкое применение: биотин-авидин/стрептавидин, дигоксигенин и эстроген в парах со специфическими антителами [28]. Наибольший недостаток непрямого мечения – необходимость выполнения дополнительных этапов после гибридизации. Однако это часто компенсируется усилением флуоресцентного сигнала, что особенно важно для небольших проб.

При необходимости амплифицировать сигнал, полученный в реакции непрямого мечения, можно прибегнуть к тирамидной амплификации (TSA). TSA основан на способности пероксидазы хрена в присутствии низких концентраций пероксида водорода превращать меченый тирамин-содержащий субстрат в окисленный, высокореактивный свободный радикал, который ковалентно связывается с остатками тирозина белковых молекул, расположенных рядом с ним [29]. Процедура маркировки TSA состоит из следующих этапов: фиксирование образца клеток или ткани; инкубация с первичным биотинилированным антителом; инкубация с вторичным антителом, меченным пероксидазой хрена; инкубация с тирамидным субстратом.

Поскольку связывание тирамидной метки является ковалентным, тирамиды разных красителей можно использовать в нескольких последовательных раундах TSA-окрашивания, для обнаружения нескольких мишеней в одном и том же образце.

Методы увеличения отношения специфического сигнала к фону

Для успешной детекции сигнала при FISH-анализе необходимо соблюдать следующее условие: интенсивность специфического сигнала должна превосходить фоновый уровень флуоресценции образца. Увеличение относительной интенсивности специфического сигнала может быть достигнуто либо уменьшением интенсивности сигнала диспергированных повторяющихся последовательностей, либо усилением интенсивности сигнала непосредственно от интересующих последовательностей. Первая стратегия, как правило, основывается на подавлении гибридизации повторяющихся последовательностей. Вторая – на увеличении доли уникальных последовательностей в используемой ДНК-пробе [30].

Одним из первых методов по выведению части присутствующих в ДНК-пробе повторов из гибридизации стала CISS-гибридизация (*Chromosomal In Situ Suppression Hybridization*). В основе методики лежит проведение предварительной гибридизации меченой ДНК с избытком C_0 -t-1 ДНК соответствующего вида. C_0 -t-1 ДНК содержит большое количество различных типов репетитивных последовательностей. [31]. CISS-гибридизация часто неэффективна для организмов с крупными геномами, так как избыток повторяющихся последовательностей препятствует их эффективной супрессии [32].

Противоположное направление исследований – разработка методов элиминации повторенных последовательностей из ранее приготовленных ДНК-клаток. Один из вариантов удаления повторов из ДНК-пробы – сепарация молекул ДНК с помощью метода магнитного разделения макромолекул [33]. Для этого применяют магнитные нано- или микро-частицы, с которыми формируют комплексы фрагменты ДНК. В классическом примере магнитного разделения на первом шаге материал исходной ДНК-клатотеки гибридизуется с C_0 -t-1 ДНК, меченой биотином. Затем с помощью аффинной хроматографии дуплексы, связавшиеся с покрытыми стрептавидином магнитными частицами, отделяются от ДНК исходной клатотеки. Очищенный таким способом от повторяющихся последовательностей материал амплифицируется в ПЦР, что позволяет после введения в него метки получать ДНК-пробы с увеличенной долей уникальных последовательностей [30]. Эффект такой очистки сходен с эффектом CISS-гибридизации, однако использование C_0 -t-1 ДНК для создания ДНК-проб с малым содержанием повторов связано с риском потери части уникальных последовательностей в полученной ДНК-пробе.

ПЕРЕДОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ДНК-ЗОНДОВ

Наиболее широкое распространение как в лабораторной, так и в диагностической практике получили зонды, в производстве которых используются классические технологии синтеза, рассмотренные выше. Несмотря на это, исследовательские группы по всему миру продолжают модифицировать и улучшать уже имеющиеся технологии и предлагать инновационные подходы получения зондов для FISH.

SABER-FISH

В основе метода лежит технология замены праймера в реакции амплификации (primer exchange reaction, PER), предложенная J. Kishi и соавт. в 2017 г. [34]. Позже, в 2019 г., этот же коллектив авторов предложил модифицированный метод под названием SABER-FISH [35]. В данной технологии зонд состоит из последовательности, комплементарной молекуле-мишени (30–50 нуклеотидов), а также дополнительных 9 нуклеотидов на 3'-конце, которые выступают в качестве праймера в реакции PER. Праймер отжигается на каталитическую шпильку, служащую основой для формирования конкатемера. Во время синтеза происходит замещение одной из цепей каталитической шпильки благодаря таким полимеразам, как *Bst* LF, обладающих активностью смещения цепи без ее разрыва. Реакция амплификации терминируется нагревом до 80 °C. В результате одного цикла к цепи добавляются 10 нуклеотидов, а в конце всей реакции конкатемер может достигать в длину до нескольких сотен нуклеотидов, в зависимости от желаемой интенсивности сигнала флуоресценции. Полученные зонды предварительно гибридизуют с мишенями, после чего необходим второй раунд гибридизации с олигонуклеотидами-имиджерами – короткими цепями (20–30 нуклеотидов), комплементарными конкатемерам, и напрямую меченными флуорохромами. За счет этого достигается 5–450-кратное усиление сигнала, а также возможность мультиплексирования различных ДНК-зондов на одном образце.

LNA зонды

Замкнутые нуклеиновые кислоты (locked nucleic acids, LNA) представляют собой аналог РНК, в которых рибозное кольцо «запирается» метиленовым мостиком между 2'-кислородом и 4'-углеродом, приводя к «заблокированной» 3'-эндо конформации. LNA подчиняются правилам Уотсона – Крика при гибридизации с комплементарными ДНК и РНК, а их основания соединены тем же фосфатным остовом, что и в природных ДНК/РНК, что позво-

ляет синтезировать смешанные LNA/ДНК- и LNA/РНК-олигонуклеотиды с помощью стандартных фосфорамидитов.

Конформационная жесткость и повышенная термостабильность дуплексов увеличивают аффинность связывания LNA с комплементарными последовательностями ДНК и РНК [36, 37]. Атипичная природа подобных олигонуклеотидных зондов, как и в случае PNA-зондов, защищает их целостность от воздействия нуклеаз.

smFISH

Метод количественного анализа FISH единичных молекул (smFISH) позволяет создавать точные математические модели, что способствует изучению различных биологических процессов на еще более глубоком уровне. Количественная визуализация РНК, например, позволяет точно измерить число копий транскрипта в клетках, субклеточных компартментах и в комплексах отдельных рибонуклеопротеинов [38].

На сегодняшний день существует большое разнообразие готовых решений флуоресцентной гибридизации *in situ* для обнаружения единичных молекул РНК, предоставляемых такими компаниями, как Thermo Fisher Scientific (Affymetrix) – наборы ViewRNA и PrimeFlow, Bio-Techne (Advanced Cell Diagnostics, ACD) – платформа RNAscope, LGC Biosearch Technologies – зонды Stellaris FISH. Несмотря на это, продолжают появляться новые методы мечения зондов, направленные на снижение их стоимости.

Пример относительно дешевой и эффективной технологии – 3P³ (three-pot probe production assay), представленный авторами в статье 2018 г. [39]. Данная технология состоит из трех основных этапов: (1) конъюгация метки с терминаторным нуклеотидом NH₂-ddUTP; (2) мечение олигонуклеотидов оцДНК посредством терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TdT); (3) очистка зондов. Весь метод строится на независимом от матрицы добавлении dNTP на 3'-конец цепи с помощью TdT. Этот фермент может наращивать 3'-конец до бесконечности, однако использование дидезоксирибонуклеотидов гарантирует включение лишь одного меченного нуклеотида в цепь. Такую активность фермента использовали и ранее, но авторы впервые продемонстрировали возможность мечения наборов обычных олигонуклеотидов методом ПЦР, используя специально изготовленные ddUTP, конъюгированные с биотином. На выходе реакции получают более 90% зондов с одиночной меткой.

Более трудоемкий процесс получения зондов для smFISH описал коллектив авторов в 2022 г. [40].

Первым этапом технологии является дизайн пула первичных оцДНК олигонуклеотидов, комплементарных участкам молекулы-мишени. Впоследствии эти олигонуклеотиды проходят через два раунда ПЦР и транскрипцию *in vitro*. В завершении полученные оцРНК олигонуклеотиды метят с помощью коротких LNA олигонуклеотидов, конъюгированных с флуорохромами. Преимущество данной технологии заключается в переходе к мультиплексной детекции различных РНК-мишеней одновременно.

Метод квантовых точек

Широко распространенные флуорохромы органической природы обладают фотофизическими недостатками, накладывающими ограничения на их использование для FISH. Неорганические нанокристаллы – квантовые точки (quantum dots, QD) нового поколения демонстрируют исключительную фотостабильность и более надежную количественную оценку транскриптов благодаря повышенной интенсивности сигнала. Ключевой проблемой при использовании QD в качестве меток в FISH анализе является их гораздо больший размер в сравнении с органическими красителями: 25–35 нм к ~1 нм в диаметре [41]. Современные исследования нацелены на получение более компактных QD [42]. Другая проблема – неспецифическое связывание QD, которые, будучи твердофазными коллоидами, имеют склонность адсорбироваться на клеточных структурах. Для преодоления этого явления достаточно ввести в состав гибридизационной смеси бычий сывороточный альбумин и полианионы.

CASFISH

В 2015 г. W. Deng с соавт. [43] предложили использование системы CRISPR/Cas9 для проведения FISH-анализа, назвав технологию CASFISH. К рекомбинантному белку dCas9 был ковалентно пришит лиганд Halo, конъюгированный с флуорохромом, при этом направляющая РНК, специфичная к целевой сателлитной последовательности, также несла флуоресцентную метку. Первая гибридизация была осуществлена на мышинных эмбриональных фибробластах и заняла всего 30 мин, после чего в флуоресцентный микроскоп удалось зафиксировать сигналы в прицентромерных областях. Дальнейшие исследования продемонстрировали высокую стабильность формирующегося комплекса dCas9/sgRNA/ДНК-мишень: даже при стократном избытке конкурирующей ДНК, интенсивность флуоресценции не меняется. Данные характеристики технологии позволяют проводить процедуру CASFISH на одном образце с разными зондами как последовательно, так и одновременно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ современных методов синтеза ДНК-зондов для FISH демонстрирует разнообразие технологий с уникальными преимуществами. Классические подходы (ник-трансляция, ПЦР с меченными нуклеотидами) остаются актуальными для создания длинных зондов для картирования обширных геномных регионов. Методы химического и ферментативного мечения обеспечивают гибкость модификации олигонуклеотидов. Наиболее революционным направлением оказался синтез олигонуклеотидных зондов, позволяющих создавать конструкции с заданными свойствами, высокой специфичностью и мультиплексностью для анализа сложных геномных перестроек и изучения пространственной транскриптомики.

Однако сохраняются существенные ограничения – синтез длинных специфичных зондов остается трудоемким и дорогостоящим. Методы на основе олигонуклеотидов, хотя и становятся доступнее, требуют сложного биоинформатического дизайна и оптимизации для минимизации фона, особенно для повторяющихся последовательностей.

Перспективы развития области лежат в нескольких ключевых направлениях: 1) дальнейшая автоматизация и стандартизация процессов синтеза и очистки зондов для снижения стоимости и повышения воспроизводимости; 2) разработка новых, более ярких и фотостабильных флуорофоров и систем их детекции; 3) интеграция биоинформатических подходов для оптимизации дизайна зондов и прогнозирования гибридизационной эффективности; 4) создание гибридных методов, комбинирующих преимущества разных технологий синтеза.

Можно уверенно прогнозировать, что совершенствование методов синтеза ДНК-зондов будет и впредь стимулировать развитие FISH-технологий, расширяя их диагностический и исследовательский потенциал.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Cheng L., Davidson D.D., Zhang S. Genomic aberration detection by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum. Pathol.* 2025; 7:105906. DOI: 10.1016/j.humpath.2025.105906.
2. Lu S., Liu K., Wang D., Ye Y., Jiang Z., Gao Y. Genomic structural variants analysis in leukemia by a novel cytogenetic technique: Optical genome mapping. *Cancer Sci.* 2024;115(11):3543–3551. DOI: 10.1111/cas.16325.
3. Рубцов Н.Б. Методы работы с хромосомами млекопитающих: учеб. пособие. Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2006:152.
4. Нугис В.Ю. FISH-метод: способ цитогенетической ретроспективной оценки дозы. *Саратовский научно-медицинский журнал.* 2016;12(4):671–678.

5. Levsky J.M. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*. 2003;116(14):2833–2838. DOI: 10.1242/jcs.00633.
6. Kumar R., Baisvar V.S., Kushwaha B., Murali S., Singh V.K. Improved protocols for BAC insert DNA isolation, BAC end sequencing and FISH for construction of BAC based physical map of genes on the chromosomes. *Mol. Biol. Rep.* 2020;47(3):2405–2413. DOI: 10.1007/s11033-020-05283-z.
7. Jiang J. Fluorescence *in situ* hybridization in plants: recent developments and future applications. *Chromosome Res.* 2019;27(3):153–165. DOI: 10.1007/s10577-019-09607-z.
8. Prudent E., Raoult D. Fluorescence in situ hybridization, a complementary molecular tool for the clinical diagnosis of infectious diseases by intracellular and fastidious bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2019;43(1):88–107. DOI: 10.1093/femsre/fuy040.
9. Sun M.L., Zhang H.G., Liu X.Y., Yue F.G., Jiang Y.T., Li S.B. et al. Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of a small supernumerary marker chromosome (sSMC) inherited from her mosaic sSMC(15) mother and a literature review. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 2020;59(6):963–967. DOI: 10.1016/j.tjog.2020.09.030.
10. Буяновская О.А., Глинкина Ж.И., Каретникова Н.А., Бахареv В.А. Молекулярно-генетические методы в пренатальной диагностике хромосомных аномалий. *Акушерство и гинекология*. 2012;8-1:4–9.
11. Duffy M.J., Harbeck N., Nap M., Molina R., Nicolini A., Senkus E. et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur. J. Cancer*. 2017;75:284–298. DOI: 10.1016/j.ejca.2017.01.017.
12. Luo H., Xu X., Ye M., Sheng B., Zhu X. The prognostic value of HER2 in ovarian cancer: A meta-analysis of observational studies. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191972. DOI: 10.1371/journal.pone.0191972.
13. Paulasova P., Pellestor F. The peptide nucleic acids (PNAs): a new generation of probes for genetic and cytogenetic analyses. *Ann. Genet.* 2004;47:349–358. DOI: 10.1016/j.ann-gen.2004.07.001.
14. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*. 1991;254(5037):1497–500. DOI: 10.1126/science.1962210.
15. Pellestor F., Paulasova P., Macek M., Hamamah S. Les PNA (peptide nucleic acids): des sondes high-tech pour l'analyse génétique et cytogénétique moléculaire [The peptide nucleic acids (PNAs): “high-tech” probes for genetic and molecular cytogenetic investigations]. *Med. Sci. (Paris)*. 2005;21(8-9):753–758. DOI: 10.1051/medsci/2005218-9753.
16. Pellestor F., Paulasova P., Hamamah S. Peptide nucleic acids (PNAs) as diagnostic devices for genetic and cytogenetic analysis. *Curr. Pharm. Des.* 2008;14(24):2439–2444. DOI: 10.2174/138161208785777405.
17. Bolzán A.D. Considerations on the scoring of telomere aberrations in vertebrate cells detected by telomere or telomere plus centromere PNA-FISH. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2024;794:108507. DOI: 10.1016/j.mrrev.2024.108507.
18. Huang L., Ma F., Chapman A., Lu S., Xie X.S. Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2015;16:79–102. DOI: 10.1146/annurev-genom-090413-025352.
19. Volozonoka L., Miskova A., Gailite L. Whole genome amplification in preimplantation genetic testing in the era of massively parallel sequencing. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(9):4819. DOI: 10.3390/ijms23094819.
20. Darouich S., Popovici C., Missirian C., Moncla A. Use of DOP-PCR for amplification and labeling of BAC DNA for FISH. *Biotech. Histochem.* 2012;87(2):117–121. DOI: 10.3109/10520295.2011.559175.
21. Beaucage S.L., Caruthers M.H. Deoxynucleoside phosphoramidites – a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedr. Lett.* 1981;22:1859–1862. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)90461-7.
22. Kosuri S., Church G.M. Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications. *Nat. Methods*. 2014;11(5):499–507. DOI: 10.1038/nmeth.2918.
23. Lönnberg H. Synthesis of oligonucleotides on a soluble support. *Beilstein J. Org. Chem.* 2017;13:1368–1387. DOI: 10.3762/bjoc.13.134.
24. Сняжков А.Н., Рябинин В.А., Костина Е.В. Применение олигонуклеотидов, полученных с помощью микрочиповых синтезаторов ДНК, для синтеза генетических конструкций. *Молекулярная биология*. 2021;55(4):562–577. DOI: 10.1134/S0026893321030109.
25. Hughes T.R., Mao M., Jones A.R., Burchard J., Marton M.J., Shannon K.W. et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat. Biotechnol.* 2001;19(4):342–347. DOI: 10.1038/86730.
26. Дымшиц Г.М. Нерадиоактивно меченые олиго- и полинуклеотидные зонды – инструмент изучения структуры генома и диагностики. *Соросовский образовательный журнал*. 2001;7(9):30–37.
27. Morrison L.E., Ramakrishnan R., Ruffalo T.M., Wilber K.A. Labeling fluorescence in situ hybridization probes for genomic targets. *Methods Mol. Biol.* 2002;204:21–40. DOI: 10.1385/1-59259-300-3:21.
28. Chudova I. Fluorescence in situ hybridization. In: Chromosomal alterations: methods, results and importance in human's health. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. 2007;285–299.
29. Fominaya A., Loarce Y., González J.M., Ferrer E. Tyramide signal amplification: fluorescence *in situ* hybridization for identifying homoeologous chromosomes. *Methods Mol. Biol.* 2016;1429:35–48. DOI: 10.1007/978-1-4939-3622-9_4.
30. Богомолов А.Г., Карамышева Т.В., Рубцов Н.Б. Флуоресцентная гибридизация *in situ* ДНК-проб, полученных из индивидуальных хромосом и хромосомных районов. *Молекулярная биология*. 2014;48(6):881–890. DOI: 10.7868/S0026898414060032.
31. Kesälahti R., Kumpula T.A., Cervantes S., Kujala S.T., Mattila T.M., Tyrmi J.S. et al. Optimising exome captures in species with large genomes using species-specific repetitive DNA blocker. *Mol. Ecol. Resour.* 2025;25(3):e14053. DOI: 10.1111/1755-0998.14053.
32. Schubert I., Fransz P.F., Fuchs J., de Jong J.H. Chromosome painting in plants. *Methods Cell Sci.* 2001;23(1-3):57–69. Masabanda J.S., Griffin D.K. Generation of chromosome

- paints: approach for increasing specificity and intensity of signals. *Biotechniques*. 2003;34(3):530–532,534,536. DOI: 10.2144/03343st05.
33. Masabanda J.S., Griffin D.K. Generation of chromosome paints: approach for increasing specificity and intensity of signals. *Biotechniques*. 2003;34(3):530–532,534,536. DOI:10.2144/03343st05.
 34. Kishi J.Y., Schaus T.E., Gopalkrishnan N., Xuan F., Yin P. Programmable autonomous synthesis of single-stranded DNA. *Nat Chem*. 2018;10(2):155–164. DOI: 10.1038/nchem.2872.
 35. Kishi J.Y., Lapan S.W., Beliveau B.J., West E.R., Zhu A., Sasaki H.M. et al. SABER amplifies FISH: enhanced multiplexed imaging of RNA and DNA in cells and tissues. *Nat. Methods*. 2019;16(6):533–544. DOI: 10.1038/s41592-019-0404-0.
 36. Silahatoglu A.N., Tommerup N., Vissing H. FISHing with locked nucleic acids (LNA): evaluation of different LNA/DNA mixmers. *Mol. Cell Probes*. 2003;17(4):165–169. DOI: 10.1016/s0890-8508(03)00048-3.
 37. Fontenete S., Carvalho D., Guimarães N., Madureira P., Figueiredo C., Wengel J. et al. Application of locked nucleic acid-based probes in fluorescence in situ hybridization. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2016;100(13):5897–5906. DOI: 10.1007/s00253-016-7429-4.
 38. Gaspar I., Wippich F., Ephrussi A. Enzymatic production of single-molecule FISH and RNA capture probes. *RNA*. 2017;23(10):1582–1591. DOI: 10.1261/rna.061184.117.
 39. Gaspar I., Wippich F., Ephrussi A. Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated production of labeled probes for single-molecule FISH or RNA capture. *Bio-Protoc*. 2018;8(5):e2750. DOI: 10.21769/BioProtoc.2750.
 40. Safieddine A., Coleno E., Lionneton F., Traboulsi A.M., Sal-loum S., Lecellier C.H. et al. HT-smFISH: a cost-effective and flexible workflow for high-throughput single-molecule RNA imaging. *Nat. Protoc*. 2023;18(1):157–187. DOI: 10.1038/s41596-022-00750-2.
 41. Liu Y., Le P., Lim S.J., Ma L., Sarkar S., Han Z. et al. Enhanced mRNA FISH with compact quantum dots. *Nat. Commun*. 2018;9(1):4461. DOI: 10.1038/s41467-018-06740-x.
 42. Liu Y., Han Z., Sarkar S., Smith A.M. Fluorescence *in situ* hybridization with quantum dot labels in *E. coli* cells. *Methods Mol. Biol*. 2021;2246:141–155. DOI: 10.1007/978-1-0716-1115-9_10.
 43. Deng W., Shi X., Tjian R., Lionnet T., Singer R.H. CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(38):11870–11875. DOI: 10.1073/pnas.1515692112.

Информация об авторах

Бабай Татьяна Сергеевна – мл. науч. сотрудник, лаборатория инструментальной геномики, НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, г. Томск, tatyana.babay@medgenetics.ru, <https://orcid.org/0009-0000-3514-6569>

Васильев Станислав Анатольевич – д-р биол. наук, руководитель лаборатории инструментальной геномики, НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, г. Томск, stanislav.vasilyev@medgenetics.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5301-070X>

(✉) **Бабай Татьяна Сергеевна**, tatyana.babay@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 03.09.2025;
одобрена после рецензирования 10.09.2025;
принята к публикации 19.09.2025