

荧光原位杂交技术研究进展

白 鹭, 谢家松, 周文科*

武汉工程大学环境生态与生物工程学院, 湖北 武汉

收稿日期: 2025年11月10日; 录用日期: 2025年12月3日; 发布日期: 2025年12月11日

摘 要

荧光原位杂交技术, 即其FISH技术是一项在已有放射性原位杂交技术根基之上, 逐渐发展起来的非放射性原位杂交技术, 该项技术是应用了核苷酸之间的碱基互补配对原则来进行操作, 因其在操作过程中含有未与特定的靶标分子结合时不发光, 而与特定的靶标分子结合时发生相互作用后才会发出荧光的标记探针, 从而被广泛地应用于各种检测之中。更为重要的是其将分子检测与基因检测完美地连接起来, 在分子层面它直接在细胞核内或染色体上对特定的DNA序列进行定位定性和相对定量, 实现了对基因异常的可视化分析, 在基因层面, 它的检测目标直接指向具体的基因或基因片段揭示了遗传物质的改变与疾病表型之间的关联。从诞生发展至今, 其已经具有四十多年的历史。本文主要介绍其现今的研究进展, 以及该技术的特点和优势, 来具体体现荧光原位杂交技术的强大检测能力。

关键词

荧光原位杂交技术, 荧光标记探针, 研究进展

Advances of Fluorescence *in situ* Hybridization Technology

Lu Bai, Jiasong Xie, Wenke Zhou*

School of Environmental Ecology and Biological Engineering, Wuhan Institute of Techonlogy, Wuhan Hubei

Received: November 10, 2025; accepted: December 3, 2025; published: December 11, 2025

Abstract

Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) Technology is a non-radioactive *in situ* hybridization technique that has gradually developed on the basis of the existing radioactive *in situ* hybridization technology. This technique operates based on the principle of complementary base pairing between

*通讯作者。

文章引用: 白鹭, 谢家松, 周文科. 荧光原位杂交技术研究进展[J]. 生物过程, 2025, 15(4): 307-315.
DOI: 10.12677/bp.2025.154039

nucleotides. Due to the fact that the labeled probes used in this technique do not emit fluorescence when they are not bound to specific target molecules but do so after interacting with them, it has been widely applied in various detection processes. At the molecular level, it directly locates, qualitatively and relatively quantitatively specific DNA sequences within the cell nucleus or on chromosomes, achieving visual analysis of gene abnormalities. At the genetic level, its detection targets directly point to specific genes or gene fragments, revealing the association between changes in genetic material and disease phenotypes. Since its birth and development, it has a history of more than 40 years. This article mainly introduces its current research progress, as well as the characteristics and advantages of this technology, to specifically demonstrate the powerful detection capability of Fluorescence *in situ* Hybridization Technology.

Keywords

FISH, Fluorescently Labeled Probe, Research Progress

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 背景介绍

1.1. 发展历程

原位杂交技术最早于 1969 年,是由耶鲁大学的 Pardue 等人将标记过的 rDNA 探针,成功地完整地定位在非洲爪蟾的初级卵母细胞细胞核内的染色质上开始[1]。原位杂交技术是一种通过将一段已知的特定的核苷酸序列作为探针,将其与待检测目标组织或者细胞中的靶核苷酸序列进行杂交,对目标核苷酸序列进行物理上的定位和定量判定[2]。该技术的基本原理是根据核酸序列的碱基互补配对原则,将探针与染色体上经过变性后得到的单链 DNA 片段在一定的条件下互补配对、互相结合、形成特定的核酸杂交分子,然后经过相对应的检测方法,将待测核苷酸序列片段在其染色体上的所在位置暴露出来,进一步确定待测核酸与探针的同源性,来达到鉴定靶核苷酸序列性质的目的[3]。

但是原位杂交技术所采用对探针进行标记的物质多为放射性同位素,该物质存在一定危害[4]且应用时还具有分辨率低、信号延迟、制作成品成本高[1][2]等问题。因此在实际应用上该技术会受到一定程度上的限制[5]

进入 20 世纪 80 年代,使用非放射性同位素标记的探针来进行原位杂交的报道相继出现。1975 年 Manning 等[6]开创了非放射性标记;1977 年 Rudkin 等[7]发明了用间接免疫荧光法来检测目的基因的非同位素原位杂交技术;1982 年 Langer 等[8]人成功实现了用生物素标记探针的原位杂交;Bauman 等人[9]又公布了可以用荧光素作为标记来进行原位杂交实验进而检测特定的 DNA 序列[1],这一操作完成了非放射性技术的创新[10]。

伴随这些非放射性同位素标记探针的涌现、商品化探针持续地增加以及方法学的相继改良和完善,相关的新技术—荧光原位杂交技术,正式建立并开始逐步走向大众。

荧光原位杂交技术,其是一项在已有放射性原位杂交技术根基之上,逐渐发展起来的非放射性原位杂交技术,该项技术是应用了核苷酸之间的碱基互补配对原则来进行操作[11]。荧光原位杂交技术从正式建立到发展至今已经拥有着四十多年的历史[12]在这期间该技术的大部分是通过修缮靶标序列、更新探针种类的类型来不断提高自身分辨率和灵敏度从而展开发展的。荧光原位杂交技术是一种在染色体、间

期细胞核和 DNA 纤维结构上, 进行 DNA 序列定位的特殊方法, 它研究的大部分主体对象是来自于某些细胞的发生在有丝分裂中期的染色体。因为对于处在这一时间段内的染色体来说, 它们的形态十分完美, 因此制片技术较为简单, 可是相对应的该时段分辨率较为低下, 对于精细的物理图谱构建具有一定的难度。

随着荧光原位杂交技术(FISH)逐渐地完备与进步, 现今已被广泛应用在基因的定位、基因组进化研究、转基因生物的鉴定、核型分析研究、物理图谱构建等[12]。而以荧光原位杂交技术为基础从而建立起来形成和发展的 - 多色荧光原位杂交技术(multiplex-FISH, M-FISH), 今日已经可利用并通过多色荧光来同时探测多个目标, 例如可以通过使用不同的颜色的探针, 检测鉴定人的 46 条染色体[13]。进而又将 M-FISH 作为基础, 进行建立另外两门技术 - 分别是比较基因组原位杂交(CGH)与三维荧光原位杂交(3D-FISH)技术。三维荧光原位杂交技术选择了不去改变细胞核与染色体最初的形态, 而是通过更加先进的激光共聚焦显微镜成像系统, 加上软件的三维重构处理功能来共同探索细胞核与染色体空间结构域的组织, 以及这些组织与基因表达调控之间微妙的关系。与此同时比较基因组原位杂交技术, 则是通过对供试材料 and 对照组样本的核苷酸序列, 采用不同颜色的荧光基团来分别标记, 之后再对对照组的染色体发生杂交, 再根据所得结果的颜色差异去对监测两个基因组内相对 DNA 拷贝数的改变与否, 通过相应改变将其定位到相应的染色体上[14]。而依靠 CGH-FISH 进行检测辨别的原理, 从而发展起来的 CGH 芯片技术与 SNP 芯片技术, 通过对其采用数字化信号进行收集, 使 FISH 技术变成了一种新的高通量的检测技术[15][16]。与此同时现在对于活细胞的检测 4D-FISH 也逐渐被应用其中[17]。

除此以外, 近些年来, 荧光原位杂交技术同免疫组化、物理化学等相关学科的充分结合, 在一定范围程度上成功地推动了 FISH 技术的迅速发展[12]。

1.2. 技术原理

荧光原位杂交技术是应用核苷酸之间的碱基互补配对原则, 来进行操作, 先利用已经带有半抗原标记的 DNA 或 RNA 探针和经过高温变性双链打开的目标 DNA 的其中的某一条单链核苷酸序列通过碱基互补配对, 发生杂交, 形成杂交核酸分子, 再通过带有荧光基团的抗体来识别选定的半抗原标记, 对杂交后的分子进行镜检; 或者也可以采取使用荧光基团对已经选定的 DNA 或者 RNA 探针直接进行标记, 然后和目标核苷酸序列结合的方法, 完成杂交后再用荧光显微镜来观察待检核苷酸序列在细胞核中、染色体上和切片样本内的具体位置分布情况。

在 FISH 技术中会应用的半抗原标记物一般是, 例如生物素和地高辛等物质, 而被用来作为检测信号的荧光基团则是, 异硫氰酸荧光素、罗丹明、花菁染料[18]等。而对荧光基团而言, 其最重要的特性之一就是其对周围的环境具有快速响应能力[19], 因其具有该种能力而被设计成为, 当未与特定的靶标分子结合时不发光, 而与特定的靶标分子结合发生相互作用后才会发出荧光的模型。

而对于探针的标记的方法, 一般会采用直接标记和间接标记这两种标记方法[20]。直接法是通常会将荧光物质直接标记到对应的核苷酸上, 而间接法则通常是会先向相应的 DNA 探针上接入某些半抗原物质, 等来到荧光显微镜下镜检时, 使用那些可以与半抗原物质发生特异性结合的蛋白质来进行检测。现今对探针的标记方法一般有以下几种方法, 如缺口平移、PCR 扩增、体外转录和随机引物延伸等[21]。

① 缺口平移标记法: 缺口平移标记法设计使用 DNA 酶随机切开双链 DNA, 然后选择其中一条单链作为起始点。随后, 通过 DNA 聚合酶的作用, 切除带有 5'磷酸的核苷酸, 并在新合成的链上加入标记的互补核苷酸沿着 5'—3' 进行。这一过程将导致原始 DNA 链上的核苷酸逐步被新合成的标记核苷酸所替代, 从而形成新的探针。

② 随机引物标记法: 随机引物标记法使用六聚寡核苷酸作为引物, 以待标记的 DNA 作为模板。在

DNA 聚合酶 Klenow 的作用下, 标记的单核苷酸被掺入到新合成的 DNA 链中。这个过程形成了包含标记物的新探针序列。

③ PCR 扩增法: PCR 扩增法利用一对引物, 在 DNA 聚合酶的协同作用下, 通过变性、退火和延伸的循环反应, 大量合成靶 DNA 序列。在引入标记的 dNTP 时, 所有通过 PCR 反应产生的靶 DNA 片段都带有标记物, 从而生成新的探针。这种方法是目前较为先进的标记技术, 具有经济快速、产量高、模板消耗少、灵敏度和特异性强等优点。

因为探针标记时可以采用直接和间接两种方法, 所以在荧光镜检下也有两种检测方法。例如采用荧光染料直接进行标记的探针[20], 可使用直接荧光法来直接对这些探针进行检测; 而一旦这些探针使用了某种半抗原物质作为标记, 就需通过间接免疫荧光法来进行检测。间接标记法是先向相应的 DNA 探针上连接一种半抗原物质, 然后利用能与半抗原物质发生特异性结合的标记蛋白, 对目标核苷酸分子进行观测。其中最常用到的半抗原物质是生物素和地高辛酸基[22]。例如使用了生物素作为标记的探针大部分将与荧光素, 罗丹明标记的亲合素发生偶联, 后续就会通过产生的生物素抗亲和素抗体的特性, 来产生夹层逐级放大信号来帮助检测进行[20]。

采用直接标记的探针在合格后, 经简单的洗涤就可以进行镜下检测, 这样操作可以忽略采用间接标记探针进行杂交后采用的一系列的繁杂的检测步骤。但是直接标记的探针仍然无法做到像间接标记的探针那样, 发生与进行多重次数多步骤的信号放大特性, 所以该类探针在灵敏度上远不如间接标记探针, 但是如果靶基因序列的片段相对较长(几百 kb)时, 直接标记与间接标记的探针都可以使用且两者相对没有区别[22]。

此外, 在 FISH 技术中探针的选择往往决定着操作结果的成败和观察的准确与否, 优质的探针选择[23]会令实验操作事半功倍, 所以探针的质量尤为重要。

随着 FISH 技术的进步, 探针的种类也在不断改进, 以适应不同的研究对象和研究目的。目前主要的探针类型包括染色体特异重复序列探针、基因组探针、单拷贝序列探针、寡核苷酸文库探针以及 RNA 探针[23]。① 染色体特异重复序列探针: 这类探针通常用于检测非整倍体, 如 rDNA、端粒、着丝粒以及 α 卫星、卫星 III 等重复序列。它们具有高拷贝数(达到 106 个拷贝), 其杂交靶位点通常大于 1 Mb, 因此杂交信号易于检测。② 基因组探针: 这些探针用于分析多倍体的起源、进化和基因组成等。高等动物基因组 DNA 除了编码序列外, 还包含高频率的重复序列, 具有较高的保守性, 维持物种特异性。③ 单拷贝序列探针: 用于靶片段中的单拷贝序列分析。这类探针通常是某个基因的 DNA 克隆、RFLP 或 RAPD 标记, 或是相对较大的插入片段。④ 寡核苷酸文库探针: 由基因组文库中的染色体或某一区域核酸片段组成, 片段较小, 因此破坏的可能性较低。这种探针可用于鉴定染色体的易位与畸形、分析中期染色体重组和间期核结构。⑤ RNA 探针: RNA 探针不需要变性即可形成与目标核酸比 DNA 探针更紧密的杂交体。它们包括 ssRNA 探针和寡核苷酸 RNA 探针两种类型[23]。

这些探针类型各有不同的功能和应用, 能够有效地支持细胞遗传学和基因组学研究, 为科学家们提供了丰富的工具来探索生物体内复杂的遗传信息和结构变化。

制备探针[24]通常可以采用 PCR 扩增、酶切扩增及化学合成等方法[2]来进行。例如现在可以用醌氧化还原酶来进行氧化还原作用, 得到高效灵敏的荧光探针[25], 此外也可通过化学方法制备出罗丹明增强型荧光探针, 其在药物分析应用[26]和食品检测[27]中也发挥了相当优秀的表现。

在 FISH 技术中, 另外一个不可或缺的工具就是荧光显微镜。它被用来观察杂交后的分子, 检测荧光信号。其重要性与探针之于 FISH 同样重要。它的工作原理与一般普通的光学显微镜相比还是存在相当大的差异的。普通光学显微镜的工作原理[28]一般是: 当被观察对象 AB 处在物镜的前焦点 F_1 外侧范围, 光线就会穿过物镜, 形成一个倒立的实像 B_1A_1 形成在目镜的前焦点 F_2 内侧范围之内, 这个中间像会通

过目镜进而形成一个放大虚像 B_2A_2 在我们的观测范围处, 即可得到放大图像[28]。

而对于普通的荧光显微镜来说, 其工作原理[29]却是: 荧光显微镜的光源通常为汞灯, 汞灯会发射全波长波段的不同的激发光, 之后会首先通过激发滤色片, 进而形成一些特定波长的激发光, 再被分光镜反射映照在物镜上, 这时物镜就会把光聚集到标本上, 令标本受到它的激发, 产生不同的荧光。而样本受激发发射的小部分荧光与那些未被吸收的激发光一起通过物镜来到分光镜, 分光镜则会过滤相当多的剩余的激发光将它们滤除, 最后样本自身被激发产生的荧光则会通过顶部阻挡滤色镜, 被选择性地透过所需要的观察的荧光。

其相较于普通显微镜的优势[29]在于: ① 荧光显微镜的数值孔径数目远远超过普通显微镜物镜。观察时十分有利进而导致分辨率特别灵敏, 相较普通显微镜远远提高; ② 其一般使用汞灯作为自发光源, 来激发全波长波段的激发光; ③ 其照明方式通常是直落式照明, 就是可以让光源穿过物镜直接照射到标本上; ④ 在镜内一般会含有两个极为特殊的滤光片处在不同的位置, 其中位于光源前的滤光片的作用是屏蔽可见光, 而另外一个位于物镜与目镜之间的滤光片的作用是用以屏蔽紫外线, 防止紫外线对观察者的眼睛造成损伤。

有优势就会有劣势, 荧光显微镜也存在一定的不足之处, 普通荧光显微镜的问题在于: ① 其自发光源是混合光源; ② 光谱范围较宽, 在成像发生时, 样品上的各个点都会被照亮, 它们产生相对的散射、衍射, 色差都会直接对成像的质量造成影响。由于还存在着这些问题, 导致它们促进着 FISH 技术持续不断地向前发展。现在除了普通的荧光显微镜外, 科学家们还进一步发明了激光扫描共聚焦显微镜、多光子激光扫描显微镜和超分辨率显微镜。正是这些先进工具的出现, 它们一次又一次推动着荧光显微技术的革新与突破。

2. 操作流程

2.1. 具体步骤

在进行 FISH 实际操作时, 一般有以下 5 个步骤: ① 核酸探针设计与标记; ② 杂交样品的制备; ③ 样品杂交; ④ 样品清洗; ⑤ 杂交信号的检测与分析[30]。我们在进行每一步的操作时, 都要十分注意, 如果任何一个步骤出现失误都有可能会导致最后的观察结果不理想。所以在操作之前必须小心仔细, 认真接受相关培训[31]。

① 核酸探针设计与标记: 在进行 FISH 操作之前已经人为设计制备完成, 做好荧光标记。也可以直接采用买入的探针。如果某些特殊的探针市面没有成品, 必须自己进行合成标记时, 就可以采用以下几种方法: 缺口平移标记法、随机引物标记法和 PCR 标记法[32]。

② 杂交样品的制备: 这一步骤中又分为好几个小步骤, 可谓是 FISH 技术的核心关键, 主要有组织固定、脱水切片、脱蜡和预处理[24]。

组织固定: 将待测组织取出洗净后, 立刻放入制备的固定液中, 保证固定 2~12 小时。

脱水切片: 将固定完成后的组织, 通过梯度浓度的酒精脱水, 完成浸蜡操作并进行包埋, 再经过切片机进行切片, 在摊片机中进行捞片, 再进入烤箱完成烤片。

脱蜡: 将切片脱去蜡衣外壳。

预处理: 主要目的是将染色体或染色质上与 DNA 结合的组蛋白轴消化去除, 以使 DNA 双链暴露并释放, 让探针可以进入组织细胞样品内部。其是 FISH 技术的核心, 在操作时可使用酶、物理或者化学的方法使组织细胞的细胞结构松散, 使固定造成的蛋白交联部分打开, 细胞膜发生穿孔, 细胞骨架离散, 这样一来, 探针就能顺利进入核内与目的基因结合。预处理包括消化和洗涤两大操作, 其中消化又是重中之重, 消化时可以用酶[31]来消化组织细胞, 一般可以采用胃蛋白酶或者蛋白酶 K 来进行。如果对于

组织样品不确定具体消化时间,可以先消化推荐的反应时间,最佳的消化结果应为细胞样品内既没有空洞(可能是消化过度),也没有显著的云雾形状腾块(可能是消化不足)。同时我们也可借助显微镜去观察,在镜下可以调整红绿通道来切换观察,以观察红绿通道没有明显的背景为合适,一旦观察到的背景相对较高,则应该选择延长消化时间。此外,针对那些相对陈旧石蜡组织切片,也该适当地加长消化时间,否则可能会出现大规模的自发性荧光。而如果发生消化不足,则会导致 FISH 信号的减弱以及丢失。

③ 样品杂交:变性时间的多少和温度的控制,是杂交成功与否的核心,推荐使用相对较为专业的原位杂交仪,来执行变性与杂交步骤,这样操作不仅可以大大地帮助减少实验的繁琐性,且更加利于对实验实质操作外在条件的把控,比如像温度、时间和避光操作等。另外,如果想要防止杂交液的耗损在变性和杂交过程中,必须要在盖玻片的边缘四角,使用橡胶水泥进行封堵加密。这样也可以防止干片。

同时对于缓冲液的选择来说,一般杂交缓冲液的成分有氯化钠、SDS、Tris-HCl 缓冲液、硫酸葡聚糖和甲酰胺。其中 SDS 的用途是进行去污作用,而硫酸葡聚糖的用途则是用以提高杂交探针的相对浓度,加上甲酰胺的含量则会对杂交特异性产生直接影响。因而,我们应该根据探针的不同和不同的杂交温度去挑选适合的缓冲液。

④样品清洗:杂交完成以后,一定要用缓冲液清洗,保证将没有结合的探针洗除掉,而洗脱结果是否完全,这也直接影响着杂交结果的准确与否,故而常常采用多梯度和以及多次进行的洗脱方法[30]。清洗结束后在进行样品复染,等到复染滴加 DAPI 染液完成之后,再对切片进行加盖盖玻片,最后再用指甲油去密封和固定住盖玻片的四角,这样做的目的是可以防止在油镜下观察时盖玻片的意外脱落。

由于荧光信号十分容易淬灭,所以在染色后应立即观察,如果当时不能观察,可将切片放入切片盒中,保存于-20℃冰箱里在 2 周以内的时间里完成观察。

⑤ 杂交信号的检测与分析:当我们用荧光显微镜观察、照相并进行分析时,我们应选择细胞核大小一致、且细胞核边界完整、DAPI 染色后镜下观察染色相对均一、细胞核没有重叠、荧光信号清晰的细胞。且只有染色质量合格后才可以进行 FISH 结果判别。

2.2. 技术特点

首先从 FISH 技术自身来看,其操作中应用荧光试剂和探针与放射性物质相比它们十分经济安全、而荧光探针相对稳定持久,可长期保存。但也不宜保存过久,荧光素还是容易发生淬灭,应尽快观测。此外 FISH 技术还可以定位到只有 1Kb 的基因序列,其所具有的灵敏度完全可以比之放射性探针。

其次 FISH 技术比之普通的核型分析,其实验周期短、效率高、又因其采用探针分子进行杂交,所以结果特异性好,定位准确。

最后,对于 FISH 技术来说,其样品目标多为间期和中期染色体,所以在操作时不仅可以显示样本中期染色体的数目和结构的变化,还可以呈现样本间期染色质的结构,且对于样品种类的要求相对较为宽松。

此外, FISH 技术因其独特的操作方式,在检测方面具有出众的能力。不仅可以实现 DNA 序列在染色体和染色质及 DNA 纤维等基因组介质上的准确定位,还可以用来揭示组蛋白修饰和特异基因组区之间的联系[33]。现如今 FISH 技术往往不再单独使用,当其与其他技术共同应用时,其特点和优势会得到更大的发挥,如今随着其与其它技术相结合,该技术已经被广泛地应用在基因定位、染色体结构变异、起源进化和亲缘关系研究、外源染色质检测等方面[10]。

2.3. 技术优势

FISH 技术的优势在于其在不改变被检样本(维持其原位)情况下对靶 DNA 进行定位、定性与半定量分析。而大多数检测技术则往往会破坏细胞结构来达到观测的目的,例如分子层面的检测,一般会待

测细胞结构破坏,来检测混合状态下的染色体,而不能对一个一个的细胞进行分析,来检测染色体结构。而这一点优势已经足以证明 FISH 技术的强大。

此外, FISH 技术中其所应用的探针是属于分子层面,而待测物大多数情况下是来自细胞层面的组织细胞样本,这样一来运用 FISH 技术检测则正好架起分子与细胞之间的桥梁,加强了分子学与细胞学的联系,有助于两门学说之间的互相突破与相互印证。

更重要的是对于分子层面的检测方法,一般会将待测细胞破坏,而采用细胞层面中的传统的核型分析的分辨率又十分低,但是应用 FISH 技术时既可以破坏目标样本结构,又可以得到分辨率、精准度极高的观察结果,灵敏度远远超过核型分析。

FISH 技术不仅融合分子与细胞层面的优势,还同时避免他们的劣势,既可以检测染色体的结构又有着极高的分辨率,以其独特的优势将逐渐用于解决相关的生物学难题,这些生物学难题往往不能单纯依靠 DNA 序列定位来解决。这时 FISH 技术无疑是能帮助我们的最佳伙伴之一。目前 FISH 技术作为最新兴起的一项技术,已经成功地应用在检测技术的最前沿。比如在产前诊断中就可以用来检测性染色体是否发生异常[34]、及用来对造成男性的前列腺疾病不育的基因的比对[35]、对儿童 Turner 综合征序列的探索[36]和通过穿刺羊膜[37][38]提取羊水组织细胞样本进行检验筛查唐氏综合征高危人群的潜在可能[39]等等。

其帮助医生更好诊断判别患者病情,做出合适的治疗方案,同时在产前诊断中可以更好的帮助了解新生儿的健康状况,这一系列的功劳都是其他技术所望尘莫及的。

其中最具有代表性的实例就是对乳腺癌患者 Her-2 基因的检测[40], Her-2 基因全名又称人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, Her-2),其本质是原癌基因的一种,可以控制编码一种特异单链跨膜磷酸糖蛋白合成,研究发现在 30%-20%的乳腺癌患者群体中 Her-2 基因及其编码形成的蛋白存在过度表达现象。因此我们推测 Her-2 基因可能是判断病人是否患有乳腺癌的一个重要指标[41]。

因此在之后检测中,一旦发现 Her-2 有大量扩增的迹象,我们就会做进一步检测,去对是否患有乳腺癌做出精细判别以确认病症。

2.4. 技术劣势

任何一项技术都不可能是完美无缺的,都会有一定的局限性,对于 FISH 技术而言,其也有着一定的应用限制,因为其核心的操作步骤是探针与待测样本进行杂交,所以其中一个限制就是其仅能针对已知位点进行检测,检测位点相对有限,并非全基因组。

还有就是样品处理过程中,待观测的切片需要个体化控制消化时间,因消化的时间是没有固定值的,对于一些已经有过处理的样本,可以作为下次应用的参考,但是对于一些未处理的样本,对其消化时间的控制就可能会发生偏差,且无论消化的时间过长还是过短都会对样品的结构产生不可逆的改变,进而极易导致观测结果的失败。

最后就是探针的选择也会对随后的观测结果产生巨大的影响。

3. 前沿应用

在人的口腔内部大多埋伏着各种各样的微生物,这导致与口腔疾病相关的微生物会在其中发生和发展,然而,目前对生物膜的分布和原位丰度仍不清楚。为了促进对口腔微生物群生态系统的认知与了解并及时对口腔疾病做出诊断,可以对口腔不同生态位的口腔微生物进行原位监测和比较, FISH 技术是最常用的高效的方法之一,它的优点是速度快,安全性、敏感性和特异性高。FISH 允许同时鉴定和量化不同的口腔微生物通过结合其他分子生物学技术来可视化微生物,展示口腔生物膜中每个微生物群落[42]

[43]的分布。

目前 FISH 技术还在肿瘤诊断领域持续发挥重要作用,例如间充质肿瘤,尤其是高级别的肉瘤,常常带有混沌基因型。很少有与肿瘤抑制基因中的种系突变相关的遗传性易感综合征相关的肿瘤出现。越来越多的软组织和骨肿瘤的特征之一是复发性基因组改变,这些改变[44]可以通过其他技术中的荧光原位杂交来检测。

4. 总结展望

现今随着基因时代的蓬勃发展,不断进步, FISH 技术作为一项可以探索基因结构的强大武器,在之后的生命科学、分子细胞、遗传信息等重要领域必将得到越来越广泛地应用。此外,荧光原位杂交衍生技术不仅融合了其他各门技术的优势,集百家之长,还使分辨率、稳定性、精准度和工作效率产生显著提高,令其得到更加开阔的发展空间。而且 FISH 技术与其他新型技术结合所得到的衍生技术是一个全新未知的领域,当其一旦与新的技术相结合,就一定会产生新的衍生技术,随之带来全新的技术特点和应用领域。

随着物理、化学和生物等不同的基础学科领域的新型技术的不断产生与发展, FISH 技术会产生越来越多的衍生技术。其不仅仅只是应用在临床检验当中,还会应用于更加细致的生活之中,它们会共同推动人类生命科学的进一步建设!

参考文献

- [1] 娄昆鹏, 程安春, 汪铭书. 原位杂交在病原微生物检测中的应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010(5): 21-23.
- [2] 姜春秀, 姚伟, 张木清, 等. 新型寡聚核苷酸荧光原位杂交: 发展与应用[J]. 植物遗传资源学报, 2023, 24(2): 349-356.
- [3] 裴冬丽, 李锁平. 原位杂交技术在植物研究中的应用[J]. 河南农业科学, 2004(2): 7-9.
- [4] 董振军, 尹俊清, 冯冬颖, 等. 核医学科工作人员放射性职业危害因素来源及防护对策研究进展[J]. 职业与健康, 2021, 37(2): 276-279.
- [5] Gall, J.G. and Pardue, M.L. (1969) Formation and Detection of RNA-DNA Hybrid Molecules in Cytological Preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **63**, 378-383. <https://doi.org/10.1073/pnas.63.2.378>
- [6] Manning, J.E., Hershey, N.D., Broker, T.R., Pellegrini, M., Mitchell, H.K. and Davidson, N. (1975) A New Method of in Situ Hybridization. *Chromosoma*, **53**, 107-117. <https://doi.org/10.1007/bf00333039>
- [7] Rudkin, G.T. and Stollar, B.D. (1977) High Resolution Detection of DNA-RNA Hybrids in Situ by Indirect Immunofluorescence. *Nature*, **265**, 472-473. <https://doi.org/10.1038/265472a0>
- [8] Langer, P.R., Waldrop, A.A. and Ward, D.C. (1981) Enzymatic Synthesis of Biotin-Labeled Polynucleotides: Novel Nucleic Acid Affinity Probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **78**, 6633-6637. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.6633>
- [9] Bauman, J.G.J., Wiegant, J., Borst, P. and van Duijn, P. (1980) A New Method for Fluorescence Microscopical Localization of Specific DNA Sequences by in Situ Hybridization of Fluorochrome-Labelled RNA. *Experimental Cell Research*, **128**, 485-490. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(80\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(80)90087-7)
- [10] 梁韶, 雷秀娟, 宋娟, 等. 荧光原位杂交衍生技术及其在药用植物遗传学中的应用[J]. 特产研究, 2016, 38(3): 72-75.
- [11] 柴局, 刘淑英, 张文广, 等. 荧光原位杂交技术在染色体上应用的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2008(1): 53-56.
- [12] 何世斌, 柴连琴, 谭琨隽, 等. 荧光原位杂交技术的研究进展[J]. 植物科学学报, 2014, 32(2): 199-204.
- [13] Speicher, M.R., Ballard, S.G. and Ward, D.C. (1996) Karyotyping Human Chromosomes by Combinatorial Multi-Fluor FISH. *Nature Genetics*, **12**, 368-375. <https://doi.org/10.1038/ng0496-368>
- [14] Kallioniemi, A., Kallioniemi, O., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., et al. (1992) Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. *Science*, **258**, 818-821. <https://doi.org/10.1126/science.1359641>
- [15] Fiegler, H., Gribble, S.M., Burford, D.C., Carr, P., Prigmore, E., Porter, K.M., et al. (2003) Array Painting: A Method

- for the Rapid Analysis of Aberrant Chromosomes Using DNA Microarrays. *Journal of Medical Genetics*, **40**, 664-670. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.9.664>
- [16] Matsuzaki, H., Dong, S., Loi, H., Di, X., Liu, G., Hubbell, E., *et al.* (2004) Genotyping over 100,000 SNPs on a Pair of Oligonucleotide Arrays. *Nature Methods*, **1**, 109-111. <https://doi.org/10.1038/nmeth718>
- [17] Cremer, T., Küpper, K., Dietzel, S. and Fakan, S. (2004) Higher Order Chromatin Architecture in the Cell Nucleus: On the Way from Structure to Function. *Biology of the Cell*, **96**, 555-567. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.07.002>
- [18] 郭冰雪, 吴疆, 林鹏程, 等. 基于罗丹明 B 为荧光基团的三肽荧光探针的设计及应用研究[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(6): 930-938.
- [19] 张晓婷, 戴志飞, 岳秀丽. 可激活型靶向荧光探针[J]. 中国医药生物技术, 2023, 18(6): 481-486.
- [20] 王智新. 荧光原位杂交技术在基因定位中的应用[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(9): 7-10.
- [21] 郑文岭, 吴旻. 染色体荧光原位杂交技术[J]. 中华医学杂志, 1994, 74(8): 511-513.
- [22] 陈成忠, 于洪芹. 荧光原位杂交技术及其应用[J]. 生物学教学, 2007, 32(1): 2-4.
- [23] 祝娟, 杨颜慈. 荧光原位杂交技术及其在植物学中的应用现状[J]. 科技传播, 2012, 4(17): 110-111.
- [24] 张凡凡, 邢新滢, 石文清, 等. 植物寡核苷酸荧光原位杂交技术方法[J]. 植物学报, 2023, 58(2): 274-284.
- [25] 高旭, 焦扬, 段春迎. 醌氧化还原酶检测荧光探针制备及性能[J]. 大连理工大学学报, 2023, 63(2): 229-234.
- [26] 李花, 白莹, 张爱菊, 等. 基于碘-罗丹明 6G 缔合物增强型荧光探针的表征及在药物分析中的应用[J]. 分析科学学报, 2023, 39(2): 235-239.
- [27] 赖丽清, 范晓慧, 黄鹭强, 等. 一种新型基于罗丹明 B 选择性检测食品中铬离子的荧光探针的研究[J]. 福建轻纺, 2023(11): 15-19+26.
- [28] 王伟象, 梅国栋, 郭利杰, 邱黎明. 不同成像原理显微镜在煤微表面形貌表征中的应用[J]. 中国矿业, 2022, 31(9): 162-170
- [29] 林曼娜. 荧光显微镜的成像原理及其在生物医学中的应用[J]. 电子显微学报, 2021, 40(1): 90-93.
- [30] 夏铁骑. 荧光原位杂交技术及其在微生物生态学中的应用[J]. 新乡学院学报(自然科学版), 2009, 26(2): 52-54.
- [31] 江冬瑞, 王弦, 吴强. 荧光原位杂交技术操作的常见问题分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2015, 31(12): 1426-1427.
- [32] 董玉玮. 荧光原位杂交技术研究现状[J]. 科技资讯, 2008, 6(32): 6+8.
- [33] 刘玉玲, 刘林杰, 彭仁海. 荧光原位杂交技术的发展及其在植物基因组研究中的应用[J]. 分子植物育种, 2018, 16(17): 5696-5703.
- [34] 朱重阳, 许培培, 李鹏云, 等. 荧光原位杂交技术在性染色体异常产前诊断中的应用[J]. 郑州大学学报(医学版), 2023, 58(4): 577-581.
- [35] 刘萍. 荧光原位杂交技术在前列腺疾病致男性不育的临床应用[J]. 医学食疗与健康, 2021, 19(18): 168-169+171.
- [36] 徐红艳, 张东光, 熊枫, 等. 荧光原位杂交技术在儿童 Turner 综合征中的应用研究[J]. 江西医药, 2021, 56(2): 260-262.
- [37] 柳宛璐, 乔福元, 唐红菊, 等. 荧光原位杂交技术在产前诊断中的应用价值[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2013, 29(3): 197-199.
- [38] 钱源, 肖雪, 郭知, 等. 荧光原位杂交技术在羊水染色体数量分析中的应用[J]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2012, 4(3): 16-18.
- [39] 李翠, 赵明刚, 赵乐, 等. 荧光原位杂交技术在唐筛高危人群产前诊断中的应用[J]. 中国妇幼保健研究, 2018, 29(11): 1454-1457.
- [40] 陈婷婷, 田一辰. 免疫组织化学法与荧光原位杂交技术检测 861 例乳腺癌 HER-2 表达的一致性分析[J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2021, 8(16): 122-124.
- [41] 王文义, 王桂芝, 张明智. 荧光原位分子杂交技术检测乳腺癌组织中 HER-2 基因的表达[J]. 医药论坛杂志, 2011, 32(13): 60-62.
- [42] 巴恩平, 李晓瑛, 吕亚莉, 等. 乳腺小管癌和黏液癌 HER-2 基因扩增荧光原位杂交技术的检测[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(17): 1319-1322.
- [43] 顾俊杰, 王华宇, 张梦业, 等. 荧光原位杂交(FISH)在口腔微生物检测中的应用[J]. 病原体. 2022, 11(12): 1450.
- [44] Bertram, S. and Schildhaus, H. (2020) Fluoreszenz-in-situ-hybridisierung bei der diagnostik von weichgewebs- und knochentumoren. *Der Pathologe*, **41**, 589-605. <https://doi.org/10.1007/s00292-020-00838-0>