



基于DNA条形码技术的高通量介观联接组学*

胡鹏凯^{1,2)} 黄龙文^{1,2)**}

(¹⁾ 中国科学院生物物理研究所, 脑与认知科学国家重点实验室, 北京 100101; ²⁾ 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049)

摘要 联接组学作为研究不同脑区、不同神经元之间突触联接模式的一个重要神经科学研究领域, 是理解神经计算, 揭示情感、学习、认知等复杂功能的关键之一。其中微米级的介观联接组学以其独有的优势成为了目前在啮齿类动物等的神经系统研究中应用最为广泛的技术, 且在非人灵长类动物的脑科学研究中也有着重要的应用前景。传统的介观联接组学测量技术通常采用荧光标记和光学成像的原理, 对神经环路进行逆行或逆行示踪。为了实现单细胞精度的示踪成像以绘制更精细的联接图谱, 人们发明了稀疏标记神经元的方法, 但在单个动物的示踪通量、数据的多组学跨模态整合等方面仍面临着挑战。近十年来, 基于DNA条形码的高通量介观联接组学测量技术正快速发展, 与传统的介观联接组学测量技术相比具有高通量、低成本以及多组学分析的优势。本文根据示踪原理及所用病毒感染模式的不同介绍了几种较成熟的基于DNA条形码的介观联接组学代表性技术, 并从技术原理、技术应用以及技术的优缺点等方面进行总结。最后, 总结了基于DNA条形码的高通量介观联接组学测量技术领域的发展现状, 并提出了一些未来的研究方向。

关键词 DNA条形码, 介观联接组, 脑联接图谱

中图分类号 Q189, Q-331

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0278

结构决定功能是生物学的基本原则之一。在神经系统中, 不同脑区、不同神经元之间的突触联接模式, 对大脑如何传递并整合信息、完成神经计算、实现高度复杂且灵活的功能起着决定性作用。因此, 开发高通量、高精度的脑联接组测量技术, 并绘制高质量脑联接图谱, 是理解神经计算, 揭示情感、学习、认知等复杂功能的关键之一, 联接组学也成为了神经科学的一个重要的研究领域^[1-2]。从研究对象尺度和精度上划分, 联接组学可以分为宏观、介观和微观^[2]。宏观联接组学通常依赖于核磁共振成像中的弥散张量成像技术, 具有高效、非侵入性等优势。宏观联接组学可以获得人、灵长类动物、啮齿类动物等整个大脑的联接图谱, 但通常仅能达到脑区精度的空间分辨率, 较难实现对神经环路高精度和高特异性的测量^[2]。微观联接组学则利用电子显微镜实现对脑组织超薄切片的扫描及三维重构, 其纳米级的空间分辨率可以在单突触水平定量解析神经网络的精细联接模式, 但受限于可以解析的脑样本体积, 目前微观联接组学多应用于线虫、果蝇等较小的神经系统。对于具有更高级

神经系统及功能的模式动物如啮齿类动物、非人灵长类动物等, 微观联接组学的应用仍然相对较少^[2]。相比于前述两种组学, 微米级的介观联接组学可以实现单细胞水平上测量神经环路的联接模式, 且更容易与细胞类型特异性的遗传学标记技术结合, 并能整合对神经元功能、转录组等其他模态信息的测量。因此, 介观联接组学成为了目前在啮齿类动物等的神经系统研究中应用最为广泛的技术, 且在非人灵长类动物的脑科学研究中也有着重要的应用前景^[2-3]。

近十年来, 传统的介观联接组测量技术有了新的进展, 而新兴的多种基于DNA条形码的介观联接组测量技术也相继被发明, 且被应用于解决不同的科学问题。本文就介观联接组测量技术, 尤其是多种基于DNA条形码的新介观联接组测量技术的

* 科技部科技创新2030-“脑科学与类脑研究”重大项目(2022ZD0206900)和国家自然科学基金(32271143)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64889866, E-mail: huanglongwen@ibp.ac.cn

收稿日期: 2024-06-30, 接受日期: 2024-08-21

原理、技术优势、技术局限性、技术应用以及未来发展前景进行综述。

1 传统的介观联接组测量技术

传统的介观联接组测量技术通常采用荧光标记和光学成像的原理,对神经环路进行顺行或逆行示踪^[1, 4-5]。以顺行示踪为例,研究者通过病毒注射使源脑区神经元带上荧光蛋白质,这些荧光蛋白质会随着轴突延伸到投射脑区,再通过光学成像就能直接观察到源脑区投射到哪些目标脑区^[1]。在此基础上,通过对神经元进行细胞类型特异性的遗传学标记,该方法可以进一步实现对特定的细胞类型构成的神经环路进行示踪^[4, 6]。然而,大量细胞类型特异性的示踪研究发现,即便被同一个标记基因所标记的神经元亚型,其单细胞的投射模式在大多数情况下仍然呈现高度的异质性^[3]。由于神经元是大脑活动和神经编码的基本单元,在单细胞精度上揭示其联接组的规律,进而阐明其参与神经信号处理的机制是亟需回答的重要问题。因此,为了将投射示踪推进到单细胞精度,一些研究者发明并改进了神经元的稀疏标记技术。这种技术通过在单个动物中的神经元进行相对稀疏地荧光标记,然后结合全脑尺度的显微断层成像以及手动或者半手动的神经元轴突形态重构,实现单细胞精度上神经元轴突形态的重构^[4, 7-13]。在过去十年间,这个方向的技术取得了重大进展,解释了包括运动皮层、前额叶皮层、海马体等脑区的单细胞联接组的组织规律^[7, 9-10]。2024年2月Qiu等^[9]在《科学》(*Science*)上的报道重构了10 100个小鼠海马神经元的全脑轴突形态,这是目前最大的单神经元介观联接组数据集。然而该方法需要对神经元进行稀疏标记,所以在单个动物中所能测量的神经元数量较为有限(通常在几十到上百个左右)。另一方面,由于手动或半手动的轴突形态重构需要较高的人力和时间成本,并且该方法难以实现同时测量并整合单细胞转录组等其他模态信息,所以介观联接组学的研究仍然面临着新的机遇与挑战^[9-10]。

2 DNA条形码与介观联接组绘制

为了实现对单细胞联接组进行高通量、高效率的检测,有研究者提出了基于DNA条形码的介观联接组学测量新方法^[14-15]。DNA条形码指的是由随机核苷酸序列所构成的DNA片段。 n 个碱基所组成的寡核苷酸片段的理论多样性高达 4^n ,因此其

具备特异地标记并区分大量单细胞的能力。早在几十年前,就有研究者利用DNA条形码的方法对神经发育过程中的细胞命运进行了追踪^[16-17]。如果通过病毒载体赋予DNA条形码顺行或逆行示踪的能力,再利用高通量测序技术解析DNA条形码所编码的联接组信息,就能实现单细胞联接组学的高通量检测^[15]。此外,由于该策略将神经元联接组信息转化为DNA序列信息,所以相比于基于光学成像的联接组学技术,该策略更容易实现与转录组等其他模态单细胞信息的整合。例如,在2014年,多位神经生物学家共同提出了使用每个细胞的形态、转录组和活动模式注释联接组数据的“罗塞塔脑”策略^[14]。在此策略的启发下,多种基于DNA条形码的介观联接组测量技术快速发展并应用于科学研究^[18-23]。相比于传统光学的方法,这些技术都具有单细胞精度、高通量且方便与转录组学数据结合分析的优势。

3 基于DNA条形码的介观联接组学技术路线

根据示踪原理及所用病毒感染模式的不同,可以将基于DNA条形码的介观联接组测量技术分为三大类:顺行示踪技术、逆行示踪技术和跨突触示踪技术。接下来会依次介绍其中的代表性技术的原理、应用以及优缺点。

3.1 顺行示踪技术

3.1.1 MAPseq

MAPseq (multiplexed analysis of projections by sequencing) 技术是Kebschull等^[18]在2016年开发并报道的基于DNA条形码的高通量单细胞介观联接组学测量技术,也是基于DNA条形码测量介观联接组学领域最早的相对成熟的技术。MAPseq的基本原理是通过改造后带高度多样性条形码的辛德毕斯病毒感染神经元,让每个神经元带上特异性的mRNA条形码,同时表达工程改造后的突触前蛋白MAPP-n λ 。该蛋白质会特异性结合条形码尾端的boxB发卡结构,将条形码运送到神经元的各个突触末端,从而实现用相同的条形码标记同一个神经元的胞体和轴突末端^[18, 24]。之后作者通过切取注射病毒的源脑区和潜在的目标投射脑区的组织,并对组织中的条形码进行测序比对,重构了源脑区感染了病毒的单个神经元的投射图谱^[18](图1)。

作者介绍了应用MAPseq技术重构的具有释放去甲肾上腺素功能的蓝斑脑区的投射模式^[18]。在群

体荧光标记追踪中蓝斑显示出对皮层的广泛投射, 但应用 MAPseq 技术获得的单神经元投射数据显示, 单个蓝斑神经元具有对皮层前后轴投射的偏好, 同时在群体上显示的投射强度相当^[18]。作者认为, 蓝斑作为具有觉醒功能的重要核团, 这种特殊的投射模式可能有助于单个蓝斑神经元释放的觉醒信号对不同的皮层区域发挥不同的作用^[18]。

在另一篇应用 MAPseq 的文章中, Han 等^[25]发现了与传统观念不符的皮层内部的投射模式。传统观点认为, 皮层分块处理各自特定的信息, 并且每个神经元只投射到一个特定的目标区域传递信息^[25]。但应用 MAPseq 技术分析后, 作者发现, 在数百个初级视觉皮层的神经元中, 大多数神经元会投射到多个目标区域并传递信息。作者进一步分析发现, 其中某些投射区域的组合出现的概率高, 其他组合出现的概率则相对较低, 这表明皮层内部的投射不是一对一的信息流动, 而是一种更复杂的模型^[25]。除此以外, MAPseq 也被成功应用于外侧僵核、海马体以及灵长类动物杏仁核等脑区的投射模式解析^[26-28]。

MAPseq 技术有效地规避了传统荧光标记的颜色及成像限制, 利用 DNA 条形码将光学成像的观测改为测序测量联接图谱, 有效地提高了介观联接组测量的精度和通量, 节约了时间和金钱成本, 并且将介观联接组数据转为和单细胞转录组数据一样的类型^[17, 29-31]。同时, MAPseq 技术也有一些局限性, 第一点是只能获得一个源脑区的神经元群体的联接组数据, 数据尺度还达不到全脑范围, 第二点是投射区域的空间分辨率取决于切割组织块的空间大小, 很难达到单细胞精度, 第三点是无法获得源脑区单个神经元对应的转录组数据和空间位置信息^[30]。

3.1.2 BRICseq

BRICseq (brainwide individual animal connectome sequencing) 技术是由 Huang 等^[19]在 MAPseq 技术的基础上进一步开发的可以用于测量单个体全脑介观联接组学的技术, 相关论文发表于 2020 年。其基本原理与 MAPseq 一致, 都是通过辛德毕斯病毒和 DNA 条形码特异性标记单个神经元的胞体和轴突。但相比 MAPseq, BRICseq 在同一个动物大脑中同时注射了几百个源脑区进行全脑的投射示踪, 病毒中的大量条形码标签会唯一标记所有源脑区的数十万个细胞。待病毒表达完全后作者切取了所有的目标投射脑区和源脑区 (在 BRICseq 中

源脑区也可以是投射脑区) 进行测序。最后根据条形码在胞体中比在轴突中丰富得多的客观事实, 作者为每一个条形码分配一个已知的源脑区定位, 从而获得全脑的源脑区神经元投射图谱^[19] (图 1)。

作者利用 BRICseq 绘制了两只成年雄性 C57BL/6 J 小鼠的皮层介观联接组图谱^[19]。每次实验在 120 个源脑区和总共 280 个目标区域中重构了约 70 000 个被唯一标记的神经元投射模式。通过分析区域到区域之间的批量神经元投射模式, 作者发现, 测量结果在多个个体间具有高度重复性, 并且和已发表的艾伦联接图谱的参考数据集非常接近^[19]。之后作者又绘制了两只同年龄的雄性 BTBR 小鼠 (一种以缺失胼胝体为显著特征的近交品系) 的全脑介观联接组, 并与之前测量的野生型小鼠的联接图谱进行比较。结果发现, BTBR 小鼠的皮层完全没有对侧连接, 这和该品系生理上胼胝体结构的缺失完全一致, 但同时也发现 BTBR 小鼠的同侧皮层联接组结构基本维持和野生型小鼠一致^[19]。

BRICseq 基本解决了 MAPseq 的第一点局限性, 而且首次实现了单个动物个体中全脑介观联接图谱的绘制。相比于其他绘制全脑介观联接组图谱的方法, BRICseq 的时间成本和经济成本有显著优势, 并且有完善的数据处理方式去除因多次源脑区注射导致的各种可能误差, 从而获得较准确且高通量的联接组数据, 而且 BRICseq 可以推广到其他品系、物种进行全脑的绘制。但 MAPseq 的第二、三点局限性在 BRICseq 中仍存在。

3.1.3 BARseq 和 BARseq2

鉴于 MAPseq 无法获取源脑区单个神经元的空间位置信息和基因表达数据, Chen 等^[21]在 2019 年发表了基于 MAPseq 的下一代技术 BARseq (barcoded anatomy resolved by sequencing), 之后 Sun 等^[22]在 2021 年发表了优化后的 BARseq2 (second-generation BARseq)。对于介观联接组学的测量, BARseq 和 BARseq2 仍采用 MAPseq 所用的实验方法和原理, 但对于源脑区的组织处理 BARseq 和 BARseq2 由切割研磨改为原位测序, 以收集表达条形码的源脑区神经元的空间位置信息和某些基因的表达数据 (图 1)。相比于 BARseq, BARseq2 改进了原位测序的方法以便获得源脑区神经元相对更完整的基因表达数据, 能同时测量的基因数由 BARseq 的几个增加到了几十个^[21-22]。

Chen 等^[21]通过 BARseq 技术成功地在听觉皮

层中分离出三种公认的主要的兴奋性神经元亚群：皮层丘脑神经元（corticothalamic, CT）、锥体束样神经元（pyramidal tract-like, PT-like）和端脑内侧束神经元（intratelencephalic, IT），并获得它们对应的单神经元投射模式和皮层内空间分布情况。同时他们还发现了一些非三大类的神经元亚群以及它们的投射模式。其中只有IT类神经元具有明显的空间位置和投射模式的对应关系，位于不同层的IT神经元会有明显与其他层不同的投射模式。

Sun等^[22]利用改进的BARseq2技术测量了听觉皮层和运动皮层中几万个细胞的钙黏蛋白基因和其他细胞类型标记基因的表达情况，以及其中3 500个细胞的长距离投射情况。他们通过数据分析发现，即使是来自不同皮层的神经元，若是具有相同的下游投射情况，它们的钙黏蛋白基因的表达图谱也是类似的。

BARseq和BARseq2技术也被应用于多项研究，实现了高通量地解析单个脑区神经元的单细胞转录组数据及其对应的单细胞介观联接组数据，从而更深入地挖掘神经环路的结构与基因之间的内在联系^[8, 32]。

在BARseq的基础上，为了实现对投射区域中轴突的高空间分辨率解析，Yuan等^[33]报道了axonal BARseq技术。该技术通过对条形码分子原位检测灵敏度的进一步改进与提升，将原位测序检测的范围从源脑区扩展到包括108张20 μm冠状面的投射脑区^[33]。该工作实现了对初级听觉皮层单细胞投射模式的高空间分辨率测量，发现了单个神经元向下游脑区不同分层的投射特异性^[33]。

除MAPseq已有的优势之外，BARseq还能获取源脑区神经元的空间位置和基因表达信息，部分解决了MAPseq的第二、三点局限性。但由于原位测序技术的限制，源脑区检测的基因需要事先确定并合成价格较高的分子探针。BARseq等技术通常仅能检测特定且数量相对较少的基因，实现对单细胞全转录组的测量仍然有一定难度。此外，axonal BARseq仅实现了对部分投射脑区的高分辨率解析，之后仍需要将解析尺度扩展到全脑范围，以获得单神经元投射模式的完整信息。

3.1.4 ConnectID

另一个解决MAPseq无法获取源脑区单个神经元的全基因表达数据的技术是ConnectID（scRNA-seq combined with MAPseq），由Klingler等^[23]在2021年报道。对于介观联接组学的测量，

ConnectID也采用MAPseq所用的实验方法和原理，但关于源脑区的组织处理方法ConnectID采用和BARseq不同的策略。ConnectID通过体外组织解离、流式分选和微流控芯片分离源脑区的单细胞，并制备单细胞测序文库进行测序从而获得源脑区的单细胞基因表达情况^[25]（图1）。

Klingler等^[23]通过ConnectID技术比较了初级体感皮层（S1）中投射到运动皮层的区域间皮层投射神经元（ μ ICPN）和投射到次级体感皮层的区域间皮层投射神经元（ γ ICPN）在不同年龄小鼠中的基因表达情况。他们发现，SOX11基因表达的时间差异可能是促使ICPN投射到不同脑区的原因^[23]。这篇报道的结果表明，发育阶段的基因表达差异可能是导致皮层神经元类型多样性的原因。

与BARseq相比，ConnectID无法获得源脑区单细胞的空间位置信息，但不需要高分辨率成像仪器和提前设计合成基因探针。但由于ConnectID所用的单细胞分离技术的限制，每只小鼠能测到的源脑区神经元数量相对较少，只有几百个。

3.2 逆行示踪技术

3.2.1 Projection-seq

Projection-seq是由Zhao等^[34]在2022年发表的用改造的逆行腺相关病毒进行介观联接组测量的方法。其原理是用带不同DNA条形码的逆行腺相关病毒感染源脑区的下游各个投射位点，利用逆行示踪病毒的特点将不同投射位点的DNA条形码聚集到源脑区的神经元中表达。之后作者通过对源脑区的神经元进行单细胞测序同时获得基因和DNA条形码的表达情况，进而获得源脑区的单细胞介观联接组和转录组数据^[34]。在该技术中，DNA条形码的设计与MAPseq等顺行示踪技术有着根本的不同：在MAPseq中，条形码是高度多样且随机的，理论上每个细胞都会携带独一无二的条形码；而在Projection-seq中，DNA条形码的序列完全已知，且每个条形码序列对应一个下游的投射位点。

作者为了研究迷走神经元怎样编码来自不同器官感受器的投射开发了Projection-seq技术^[34]。在实验中，作者利用7种改造后带有不同DNA条形码的逆行腺相关病毒，标记了同一只小鼠的不同内脏。1周后，作者分离出迷走神经元进行单细胞测序^[34]。Projection-seq的结果表明，迷走神经元通过基因的不同表达模式来编码不同的内脏器官，并且沿着基因表达的某种轨迹，按照从头到尾的体位顺序编码内脏器官信号^[34]。这就解释了为什么迷

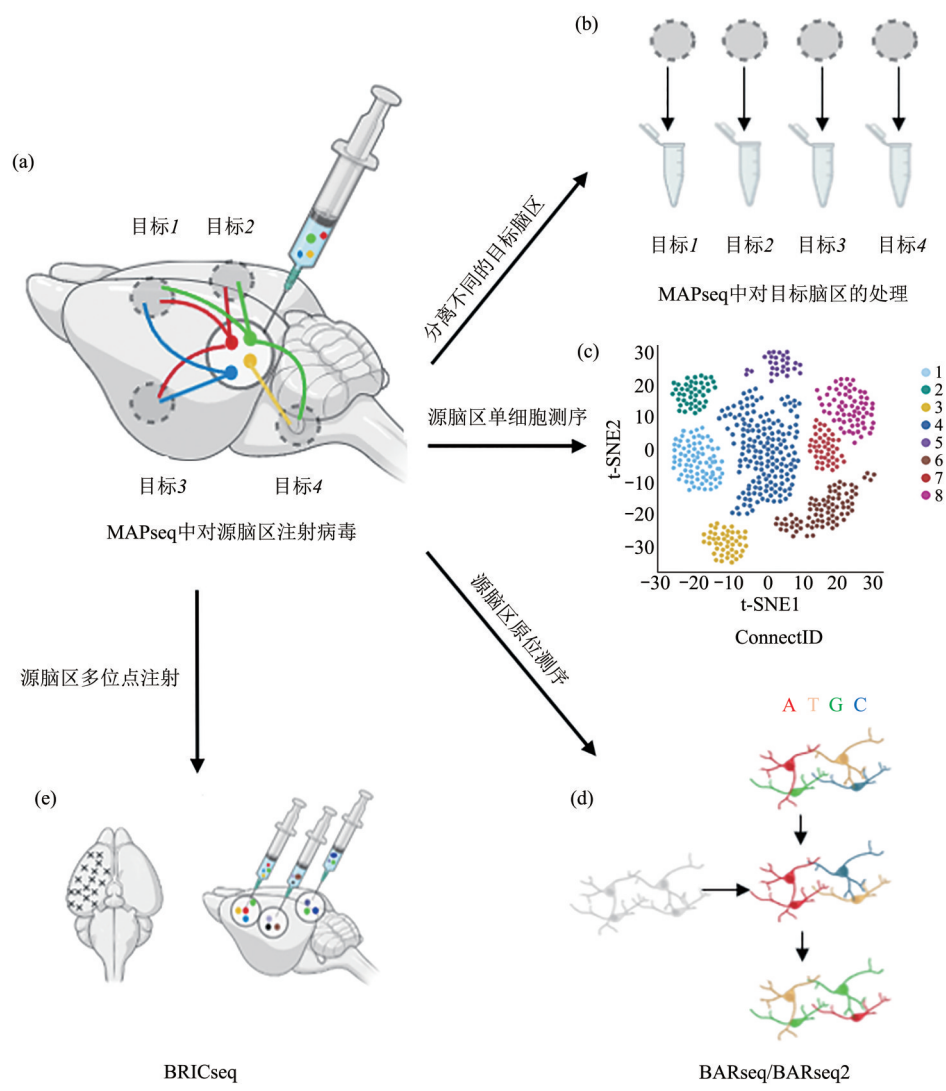


Fig. 1 MAPseq and its extensions
图1 MAPseq及其衍生技术

(a) MAPseq中携带大量不同条形码的辛德毕斯病毒被注射到源脑区, 不同颜色代表不同的DNA条形码。(b) MAPseq中通过对潜在目标区域脑组织的分离收集测序, 获得不同区域内包含的条形码列表以及源脑区投射到该区域的神经元的信息。(c) ConnectID中对源脑区进行单细胞分离测序以同时获得源脑区内单个细胞的转录组和联接组数据 (仅为示意图, 非真实实验数据)。(d) BARseq中利用原位测序技术获得源脑区单个细胞的基因表达数据和空间位置信息, 图中示例中颜色代表原位测序中荧光所对应的序列情况, 红色代表腺嘌呤A, 黄色代表胸腺嘧啶 (T), 绿色代表鸟嘌呤 (G), 蓝色代表胞嘧啶 (C)。(e) BRICseq中对源脑区进行多位点病毒注射以实现全皮层投射检测。

走神经元可以实现同时准确地处理来自不同器官的相同信号^[34]。

Projection-seq技术的优势首先是能通过相对简单的实验操作获得高通量的单细胞精度数据。在注射病毒后, 作者只需要对源脑区进行单细胞测序就能同时获得单细胞转录组和介观联接组数据。其次是逆行腺相关病毒应用广泛, 改造技术成熟且对神经元的毒性小。但Projection-seq也有一些局限性。第一, 由于该技术依赖于将特定条形码病毒注射于

特定的下游位点, 其所能解析的投射位点的精度受病毒的扩散范围、与相邻位点的空间距离等因素影响, 而病毒的扩散范围又和病毒的滴度、剂量、注射方式、注射位点等因素有关, 因此该技术的空间分辨率和检测灵敏度可能会受注射方式、注射位置等多种因素的影响。在Zhao等^[34]的文章中, 作者主要应用Projection-seq解析不同内脏器官的投射模式, 不同的内脏相距较远, 但若应用该技术解析中枢神经内较小的下游脑区或若干相邻的下游脑

区,可能具有一定难度。第二, Projection-seq 需要预先知道源脑区投射的下游位置,且病毒需要根据下游位点数量分开改造(同一个病毒文库只能对应一个条形码)并注射。第三,该方法通常仅能解析某个细胞是否投射向某个位点,而较难获得投射强度信息。第四,该技术尚未实现在源脑区获得被标记细胞对应的空间位置信息。

3.2.2 MERGE-seq

MERGE-seq (Multiplexed projEction neuRons retroGrade barcode) 技术由 Xu 等^[35]于 2024 年发表,其原理和 Projection-seq 基本一致,都是利用携带不同 DNA 条形码的逆行腺相关病毒标记投射脑区,从而标记源脑区中投射到这些投射脑区的神经元,对源脑区进行单细胞测序获得高通量的单细胞转录组和介观联接组数据。但与 Projection-seq 不同的是,该工作应用于解析中枢神经系统的内部投射模式^[35]。

作者利用他们所改造的带有不同 DNA 条形码的逆行腺相关病毒,将 5 种不同的条形码注射到腹内侧前额叶皮层 (ventromedial prefrontal cortex, vmPFC) 下游的 5 个脑区,待条形码在 vmPFC 表达后,作者对 vmPFC 进行单细胞测序获得其投射到这 5 个下游脑区的介观联接组数据^[35]。作者的数据显示,投射到相同下游脑区的 vmPFC 神经元在转录组上是异质的,由转录组上不同的神经元亚型组成^[35]。根据选定的 5 个下游脑区的 MERGE-seq 数据,作者发现,vmPFC 神经元既有专一的投射模式(单神经元仅投射一个下游脑区),也有分支投射模式(单神经元投射到多个下游脑区)^[35]。

3.3 跨突触示踪技术

前述两大种 DNA 条形码标记所用的病毒都无法跨突触感染神经元,因此它们只能获取单神经元投射到下游的区域信息,而无法获得突触后单神经元的信息。在这种情况下,许多研究者将目光放在了一种逆行跨单突触标记的病毒——假型狂犬病毒 (pseudotyped rabies) 上,如果能够改造假型狂犬病毒让其用条形码特异性地标记单个突触前后的神经元,就能通过测序获得单突触水平的介观联接组数据,从而实现对完整神经网络联接结构的重建^[2]。

假型狂犬病毒实现单层跨突触的原理是通过改造狂犬病毒实现的:研究者将狂犬病毒感染细胞的关键衣壳蛋白 (G 蛋白) 从基因组去除变成假型狂犬病毒,再添加另一个帮助它感染初始神经元

(starter neuron) 的蛋白质 (如 EnvA),然后在需要感染的区域用腺相关病毒将衣壳蛋白基因 (G 蛋白) 和辅助蛋白受体基因 (如 TVA) 转入初始神经元内,这样只有同时表达这两种蛋白质的细胞会被假型狂犬病毒感染并逆行跨突触传递到突触前细胞^[36]。然而,为了保证假型狂犬病毒中的条形码传递到突触前细胞后就不再继续向上游跨突触传递,需要确保突触前细胞不能表达衣壳蛋白,因此普遍的做法是让表达衣壳蛋白的细胞 (即起始细胞) 尽量稀疏,保证它们互相之间没有突触联接,这限制了用假型狂犬病毒实现 DNA 条形码标记的通量^[36-38]。此外,高多样性条形码的假型狂犬病毒有较高的制备难度,而条形码多样性不足可能会造成多个携带相同条形码的病毒感染了不同的起始细胞,给联接组数据的分析与解释带来影响^[37]。假型狂犬病毒的毒性也可能会对转录组的分析、起始细胞中条形码的检测等带来挑战,但目前报道的新一代假型狂犬病毒有着更低的毒性,有望改善此问题^[39]。截至目前已有许多研究者在这方面做了尝试,但目前尚未在体内实现高质量、单突触精度的介观联接组数据的测量^[37-39]。

4 展 望

总体来说,现在基于 DNA 条形码的高通量介观联接组测量技术正快速发展 (图 2)。这类技术普遍具有高通量,低成本以及多组学分析的鲜明特色与优势,但在空间分辨率上与基于显微成像技术的联接组学方法相比仍然有着明显的不足 (表 1)。在未来,两者的结合与互补有望将介观联接组学的研究推进到新的阶段。

联接组学不仅需要为神经科学的研究提供模式动物的标准脑联接图谱,也同样需要实现对不同发育阶段、生活经验、疾病模型、模式物种等的大脑联接图谱的动态、比较学研究^[40]。基于 DNA 条形码的联接组学技术以其高通量、低成本的优势,将允许各个实验室针对这些各自感兴趣的问题设计实验进行研究,推动联接组学从静态、标准图谱向动态、比较图谱的跨越。

更有希望的是跨模态组学的发展,这或许是实现绘制完美的“罗塞塔脑”,从而统一基因表达、神经联接和神经活动的最佳途径^[14]。以 BARseq 技术为代表的空间转录组学技术的发展,将为单细胞精度上基因表达和神经联接和神经活动的高通量整合分析提供有力的工具,这是进一步理解神经环路

组成结构和功能的必经之路。

基于条形码的联接组学技术, 作为一个发展十年左右的新领域, 已取得了许多重要的进展和突破, 也仍存在许多可能进一步发展、与其他新兴技术相融合的方向, 相信未来新技术的百花齐放可以向破解大脑之谜的根本目标进一步迈进。

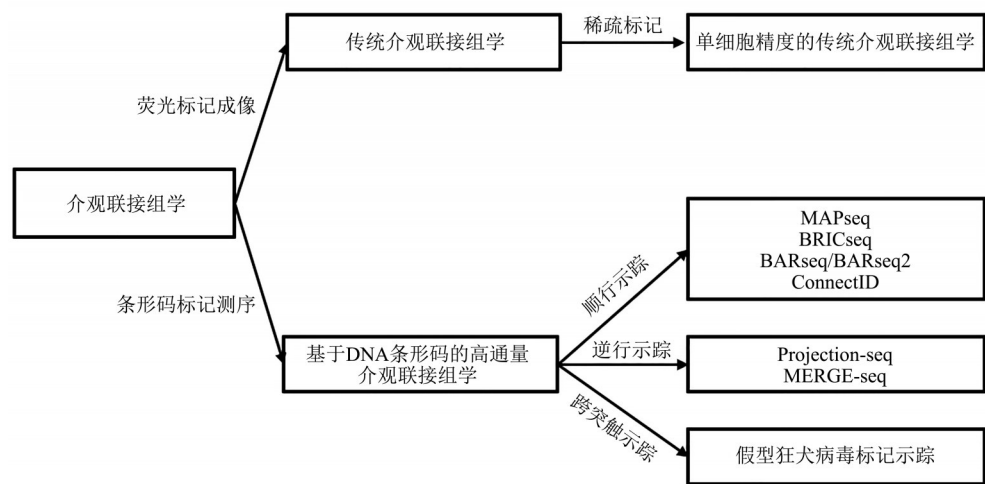


Fig. 2 Representative technologies of mesoscale connectomics

图2 介观联接组学的代表性技术

介观联接组学主要分为两个领域, 传统的介观联接组学以荧光标记神经元和成像示踪为基础, 新兴的介观联接组学以DNA条形码标记神经元和测序示踪为基础, 各自发展出具备单细胞精度的介观联接组学技术, 图中右半部分展示了各种策略的代表性技术。

Table 1 Different technologies of measuring mesoscale connectome

表1 不同测量介观联接组技术对照表

名称	核心特点	优点	缺点
单细胞精度传统介观联接组 [6, 8, 10-13]	荧光稀疏标记, 超分辨成像, 人工重构轴突	空间分辨率高, 数据直观且易于展示	成本高, 单个动物通量低, 难以结合其他组学数据
MAPseq [18]	源脑区注射带多样性条形码的辛德毕斯病毒, 激光切割目标脑区, 顺行非跨突触标记胞体和突触末端	成本低, 单个动物高通量, 理论上能与其他组学数据结合	目标脑区空间分辨率低, 未与其他组学技术结合, 未实现全脑尺度测量
BRICseq [19]	源脑区多位点注射, 全皮层激光切割, 其他与MAPseq一致	成本低, 单个动物获得全皮层数据, 理论上可以实现跨物种	目标脑区空间分辨率低, 未与其他组学技术结合
BARseq/BARseq2 [21-22, 33]	源脑区进行原位测序, 其他与MAPseq一致	单个动物高通量, 可同时获得源脑区细胞特定基因的表达数据	成本较高, 需要额外仪器设备, 只能获得提前确定的基因的表达数据
ConnectID [23]	源脑区进行单细胞测序, 其他与MAPseq一致	单动物高通量, 可同时获得源脑区细胞的全转录组学数据	能同时获得联接组学和转录组学数据的细胞相对较少
Projection-seq [34]	注射逆行非跨突触病毒到投射脑区, 在源脑区进行单细胞测序分析	成本低, 实验操作简单, 能同时获得源脑区转录组学和联接组学数据	投射脑区检测精度受多因素影响, 需要提前知道投射脑区位置并分别改造病毒, 未实现获得源脑区细胞的空间位置信息
MERGE-seq [35]	与Projection-seq一致	与Projection-seq一致, 且成功应用于中枢神经系统的联接组学解析	与Projection-seq一致
假型狂犬病毒标记示踪 [37-39]	带多样性条形码的假型狂犬病毒标记单个突触的前后神经元	检测投射可以达到单个突触精度	难以实现高通量测量投射, 高多样性条形码的假型狂犬病毒制备难度大, 病毒具有较强毒性, 体内实验暂无成果发表

参 考 文 献

- [1] Oh S W, Harris J A, Ng L, *et al.* A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, 2014, **508**(7495): 207-214
- [2] Saleeba C, Dempsey B, Le S, *et al.* A student's guide to neural circuit tracing. *Front Neurosci*, 2019, **13**: 897
- [3] BRAIN Initiative Cell Census Network BICCN). A multimodal cell census and atlas of the mammalian primary motor cortex. *Nature*, 2021, **598**(7879): 86-102
- [4] Economo M N, Clack N G, Lavis L D, *et al.* A platform for brain-wide imaging and reconstruction of individual neurons. *Elife*, 2016, **5**: e10566
- [5] Zingg B, Hintiryan H, Gou L, *et al.* Neural networks of the mouse neocortex. *Cell*, 2014, **156**(5): 1096-1111
- [6] Harris J A, Mihalas S, Hirokawa K E, *et al.* Hierarchical organization of cortical and thalamic connectivity. *Nature*, 2019, **575**(7781): 195-202
- [7] Gao L, Liu S, Gou L, *et al.* Single-neuron projectome of mouse prefrontal cortex. *Nat Neurosci*, 2022, **25**(4): 515-529
- [8] Chen X, Fischer S, Rue M C P, *et al.* Whole-cortex *in situ* sequencing reveals input-dependent area identity. *Nature*, 2024. DOI: 10.1038/s41586-024-07221-6
- [9] Qiu S, Hu Y, Huang Y, *et al.* Whole-brain spatial organization of hippocampal single-neuron projectomes. *Science*, 2024, **383**(6682): eadj9198
- [10] Muñoz-Castañeda R, Zingg B, Matho K S, *et al.* Cellular anatomy of the mouse primary motor cortex. *Nature*, 2021, **598**(7879): 159-166
- [11] Peng H, Xie P, Liu L, *et al.* Morphological diversity of single neurons in molecularly defined cell types. *Nature*, 2021, **598**(7879): 174-181
- [12] Gong H, Xu D, Yuan J, *et al.* High-throughput dual-colour precision imaging for brain-wide connectome with cytoarchitectonic landmarks at the cellular level. *Nat Commun*, 2016, **7**: 12142
- [13] Lin R, Wang R, Yuan J, *et al.* Cell-type-specific and projection-specific brain-wide reconstruction of single neurons. *Nat Methods*, 2018, **15**(12): 1033-1036
- [14] Marblestone A H, Daugherty E R, Kalhor R, *et al.* Rosetta brains: a strategy for molecularly-annotated connectome. *arXiv*, 2014. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1404.5103>
- [15] Zador A M, Dubnau J, Oyibo H K, *et al.* Sequencing the connectome. *PLoS Biol*, 2012, **10**(10): e1001411
- [16] Walsh C, Cepko C L. Clonal dispersion in proliferative layers of developing cerebral cortex. *Nature*, 1993, **362**: 632-635
- [17] Kebschull J M, Zador A M. Cellular barcoding: lineage tracing, screening and beyond. *Nat Methods*, 2018, **15**(11): 871-879
- [18] Kebschull J M, Garcia da Silva P, Reid A P, *et al.* High-throughput mapping of single-neuron projections by sequencing of barcoded RNA. *Neuron*, 2016, **91**(5): 975-987
- [19] Huang L, Kebschull J M, Fürth D, *et al.* BRICseq bridges brain-wide interregional connectivity to neural activity and gene expression in single animals. *Cell*, 2020, **183**(7): 2040
- [20] Wu X, Zhang Q, Gong L, *et al.* Sequencing-based high-throughput neuroanatomy: from mapseq to bricseq and beyond. *Neurosci Bull*, 2021, **37**(6): 746-750
- [21] Chen X, Sun Y C, Zhan H, *et al.* High-throughput mapping of long-range neuronal projection using *in situ* sequencing. *Cell*, 2019, **179**(3): 772-786.e19
- [22] Sun Y C, Chen X, Fischer S, *et al.* Integrating barcoded neuroanatomy with spatial transcriptional profiling enables identification of gene correlates of projections. *Nat Neurosci*, 2021, **24**(6): 873-885
- [23] Klingler E, Tomasello U, Prados J, *et al.* Temporal controls over inter-areal cortical projection neuron fate diversity. *Nature*, 2021, **599**(7885): 453-457
- [24] Kebschull J M, Garcia da Silva P, Zador A M. A new defective helper RNA to produce recombinant sindbis virus that infects neurons but does not propagate. *Front Neuroanat*, 2016, **10**: 56
- [25] Han Y, Kebschull J M, Campbell R A A, *et al.* The logic of single-cell projections from visual cortex. *Nature*, 2018, **556**(7699): 51-56
- [26] Mathis V P, Williams M, Fillinger C, *et al.* Networks of habenula-projecting cortical neurons regulate cocaine seeking. *Sci Adv*, 2021, **7**(45): eabj2225
- [27] Gergues M M, Han K J, Choi H S, *et al.* Circuit and molecular architecture of a ventral hippocampal network. *Nat Neurosci*, 2020, **23**(11): 1444-1452
- [28] Zeisler Z R, London L, Janssen W G, *et al.* Single basolateral amygdala neurons in macaques exhibit distinct connectational motifs with frontal cortex. *Neuron*, 2023, **111**(20): 3307-3320.e5
- [29] Peikon I D, Kebschull J M, Vagin V V, *et al.* Using high-throughput barcode sequencing to efficiently map connectomes. *Nucleic Acids Res*, 2017, **45**(12): e115
- [30] Kebschull J M. DNA sequencing in high-throughput neuroanatomy. *J Chem Neuroanat*, 2019, **100**: 101653
- [31] Yonehara K, Roska B. "MAPseq" -uencing long-range neuronal projections. *Neuron*, 2016, **91**(5): 945-947
- [32] Chen Y, Chen X, Baserdem B, *et al.* High-throughput sequencing of single neuron projections reveals spatial organization in the olfactory cortex. *Cell*, 2022, **185**(22): 4117-4134.e28
- [33] Yuan L, Chen X, Zhan H, *et al.* Massive multiplexing of spatially resolved single neuron projections with axonal BARseq. *bioRxiv*, 2023. DOI: 10.1101/2023.02.18.528865
- [34] Zhao Q, Yu C D, Wang R, *et al.* A multidimensional coding architecture of the vagal interoceptive system. *Nature*, 2022, **603**(7903): 878-884
- [35] Xu P, Peng J, Yuan T, *et al.* High-throughput mapping of single-neuron projection and molecular features by retrograde barcoded labeling. *eLife*, 2024, **13**: e85419
- [36] Wickersham I R, Lyon D C, Barnard R J O, *et al.* Monosynaptic restriction of transsynaptic tracing from single, genetically targeted neurons. *Neuron*, 2007, **53**(5): 639-647
- [37] Saunders A, Huang K W, Vondrak C, *et al.* Ascertaining cells' synaptic connections and RNA expression simultaneously with barcoded rabies virus libraries. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 6993
- [38] Zhang A, Jin L, Yao S, *et al.* Rabies virus-based barcoded neuroanatomy resolved by single-cell RNA and *in situ* sequencing. *Elife*, 2024, **12**: RP87866
- [39] Jin L, Sullivan H A, Zhu M, *et al.* Long-term labeling and imaging of synaptically connected neuronal networks *in vivo* using double-deletion-mutant rabies viruses. *Nat Neurosci*, 2024, **27**(2): 373-383
- [40] van den Heuvel M P, Bullmore E T, Sporns O. Comparative connectomics. *Trends Cogn Sci*, 2016, **20**(5): 345-361

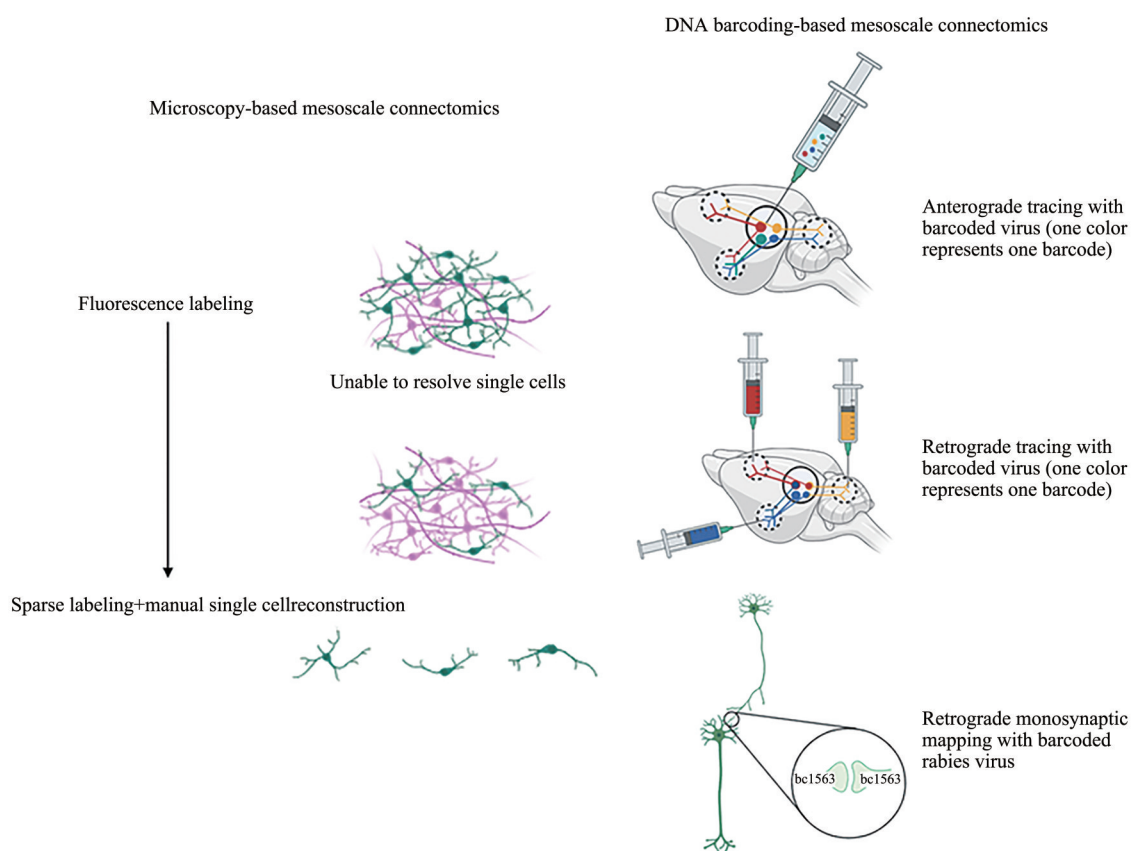
DNA Barcode-based High-throughput Mesoscale Connectomics*

HU Peng-Kai^{1,2)}, HUANG Long-Wen^{1,2)}**

⁽¹⁾State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Graphical abstract



Abstract Connectomics, a research field in neuroscience studying the synaptic connectivity patterns between neurons across different brain regions, is crucial for understanding neural computations underlying complex functions such as emotion, learning, and cognition. Specifically, micrometer-resolution mesoscale connectomics has become the most widely used technology in rodent neuroscience due to its unique advantages, and it also has

* This work was supported by grants from Science and Technology Innovation 2030 (2022ZD0206900), and The National Natural Science Foundation of China (32271143).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-64889866, E-mail: huanglongwen@ibp.ac.cn

Received: June 30, 2024 Accepted: August 21, 2024

the potential to transform brain research in non-human primates. Traditional mesoscale connectome techniques typically use fluorescence labeling and optical imaging to perform anterograde or retrograde tracing of neural circuits. To achieve single-cell resolution, methods for sparse labeling of neurons have been developed. However, it remains challenging to trace neurons in high throughput in individual animals and integrate multi-omics data across modalities. In the past decade, high-throughput mesoscale connectome technologies based on DNA barcoding have made significant progress. These technologies have provided novel tools to map single cell connectome, with higher throughput, lower cost, and multi-omics compatibility. Here we review several mature mesoscale connectome technologies based on DNA barcoding, discussing their principles, applications, advantages and disadvantages. We also propose future directions for barcoding-based connectomics.

Key words DNA barcode, mesoscale connectome, brain connectivity atlas

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0278