



基于成像的三维空间转录组学技术发展现状

王浩贤^{1,2}, 江伏青^{1,2}, 邹商杰¹, 彭广敦^{1*}

1. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 谱系技术与装备研究中心, 广州 510530

2. 中国科学院大学, 北京 100049

* 联系人, E-mail: peng_guangdun@gibh.ac.cn

收稿日期: 2025-05-01; 接受日期: 2025-05-22; 网络版发表日期: 2025-06-11

广东省基础与应用基础研究基金(批准号: 2019B151502054, 2022A1515110942)、广州国家实验室专项(批准号: GZNL2023A03005)和中国科学院广州生物医药与健康研究院基础研究项目(批准号: G1BHBRP23-01)资助

摘要 基于成像的三维空间转录组学技术通过整合空间转录组学、成像技术与组织透明化技术, 突破传统空间转录组学二维空间的局限性, 实现转录本的三维空间原位解析. 本文系统综述以基于滚环扩增、杂交链式反应及多重荧光原位杂交为代表的三类三维空间转录组学技术发展, 总结当前这些技术突破二维成像的局限性所进行的相关技术优化细节, 以及比较现有的基于成像的三维空间转录组学技术的各种性能, 并对该领域未来发展提出思考, 旨在为未来三维空间转录组学技术的开发提供见解.

关键词 三维空间转录组学, 组织透明化, 基于成像的空间转录组学

生物体是由数百到数万亿个细胞构成的复杂系统, 尽管所有细胞共享同一遗传信息, 但其在类型、发育时序以及三维空间位置的差异决定了功能的多样性. 因此, 为了全面理解个体的发育、衰老、疾病与死亡的生物学过程, 需要从细胞类型(种类)、发育时序(时间)和三维空间位置(空间)三个维度来共同解析细胞的分子信息, 包括但不限于基因组、转录组、表观基因组、蛋白组和代谢组等, 从而深入揭示不同分子层面的复杂调控关系. 基于此, 本文将重点介绍目前基于成像的空间组学的技术及其在三维厚组织应用上的最新进展.

1 单细胞组学技术的出现

早期的二代测序(bulk-cell-based next-generation

sequencing)将大量混杂的细胞作为一个整体进行分析, 获得一群细胞的平均信号以揭示某个生物学过程的分子变化和调控通路. 随着测序技术的迭代, 单细胞测序技术(single-cell sequencing technologies)的出现, 使得研究者能够从异质性细胞群中解析单个细胞的特征. 如今, 单细胞测序技术已从最初的转录组测序扩展到三维基因组、表观基因组和蛋白质组等多个层面的测序, 甚至实现了高通量的单细胞多组学测序. 2009年, 汤富酬团队^[1]发表了世界上首篇单细胞mRNA测序的文章, 标志着单细胞测序的时代的开启. 2013年, Tanay团队^[2]首次提出单细胞Hi-C(single-cell Hi-C)技术, 揭示了单细胞水平基因组的三维折叠模式; 同年, 汤富酬团队^[3]发表单细胞DNA甲基化测序技术, Greenleaf团队^[4]首次提出单细胞ATAC-seq技术, 实现对单细胞的

引用格式: 王浩贤, 江伏青, 邹商杰, 等. 基于成像的三维空间转录组学技术发展现状. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 1149–1162

Wang H X, Jiang F Q, Zou S J, et al. Current progress of imaging-based 3D spatial transcriptomics (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 1149–1162, doi: 10.1360/SSV-2025-0140

染色质开放性区域的测序. 2015年, van Oudenaarden团队^[5]和Ponting团队^[6]分别提出实现同时检测转录组和基因组的检测的不同测序方法. 2016年, 汤富酬团队^[7]开发出scTrio-seq技术, 实现了单细胞的基因组拷贝数变异(copy number variation, CNV)、DNA甲基化和转录组的联合测序. 随着不同单细胞组学技术的建立和发展, 单细胞测序技术已经在生物医学领域的诸多研究方向上发挥着巨大的推动作用^[8].

2 空间组学技术的兴起

随着单细胞多组学测序技术的广泛应用, 研究者逐渐意识到这项技术在解释组织器官中细胞生物学过程的局限性: 单细胞测序的样本处理中破坏了细胞所处的空间位置信息, 从而导致无法检测邻近细胞及周围环境变化对细胞的作用, 以及细胞的空间位置与功能的协同变化关系. 众所周知, 细胞的生命活动不仅受到自身内部遗传物质的调控, 还受所处的空间位置和微环境所调控, 意味着相同类型的细胞在不同的空间位置上所发挥的作用也是有所区别的. 此外, 在个体发育过程中, 存在着广泛的细胞迁移与细胞区域性互动, 如胚胎发育过程中的原肠运动, 这些信息都是无法通过解离后的单细胞测序所观测到的. 因此, 能够保留细胞空间信息的空间组学技术应运而生.

目前, 空间组学技术根据空间信息获取的途径, 主要可以分为五类^[9]: (i) 基于显微切割的技术(technologies based on microdissected gene expression), 如LCM-seq^[10], GEO-seq^[11], TSCS^[12]; (ii) 原位杂交技术(*in situ* hybridization, ISH), 如smFISH^[13-17], seqFISH^[18,19], MERFISH^[20]; (iii) 原位测序技术(*in situ* sequencing, ISS), 如FISSEQ^[21], HybISS^[22], STARmap^[23]; (iv) 原位捕获技术(*in situ* capturing technologies), 如ST^[24], Slide-seq^[25], DBiT-seq^[26], MISAR-seq^[27]; (v) 空间数据的算法重构技术(*in silico* reconstruction of spatial data), 如Seurat^[28], Tomo-seq^[29], PROCEDURE^[30], ViBrism DB^[31]等. 根据底层的分子检测原理的不同, 也可以简单地分为两大类: 以测序为基础的非靶向空间组学技术(基于测序的空间组学技术)以及成像依赖的靶向空间组学技术(基于成像的空间组学技术).

基于测序的空间组学技术脱胎于单细胞测序, 经过十来年的发展和商业化迭代, 目前应用较为普遍的

空间转录组学技术是2016年Lundeberg团队^[24]提出的基于空间条形码的空间转录组学技术(spatial transcriptomics, ST), 他们创新性地将单细胞测序里的细胞标签转换为空间位置标签, 将捕获单细胞的微珠(beads)转换为芯片上固定尺寸分割的位置点(spot), 从而基于单细胞转录组测序类似的扩增与拆分原理, 实现了高通量的空间转录组测序; 而成像空间组学技术则通过对组织原位核酸的靶向识别, 结合多轮的荧光成像实现多重检测.

空间组学技术的快速发展使得我们对细胞在生理、病理及衰老与凋亡生物学过程的理解更加全面和深刻. 从最初的批量测序技术只能确定大量混杂细胞的平均分子信号, 到单细胞测序能够特异性揭示某个细胞的独特分子图谱, 再到空间单细胞组学实现对组织器官不同区域中异质性细胞或不同区域中同质性细胞执行生物学过程中的一系列基因以及细胞间互作关系的解析.

3 基于成像的三维空间转录组学技术

基于成像的原位空间转录组技术(image-based *in situ* transcriptomics)包括两大类: ISH和ISS. 不同于测序空间组学技术直接从组织中提取RNA分子, 基于成像的原位空间转录组技术通过设计荧光标记的寡核苷酸探针与目标RNA原位杂交, 将RNA分子信息直接转化为可定位定量的荧光信号. 凭借其高灵敏度、亚细胞分辨率及可视化优势, 现已成为空间转录组学研究的重要方向. 早期单分子荧光原位杂交技术(single molecular fluorescence *in situ* hybridization, smFISH)通过靶向单个转录本的探针设计, 为原位空间转录技术奠定了方法学基础. 此后, 多重FISH技术(multiplexed FISH)进一步实现了亚细胞分辨率下多个转录本的同步检测. 随着技术迭代, 基于成像的原位空间转录组技术在基因通量、信噪比优化及RNA类型兼容性方面持续突破, 检测范围已从早期的固定的几十个细胞中的几十个基因拓展到能够检测组织切片上万个细胞中的上万个基因.

尽管现有的空间转录组学技术已取得显著进展, 但其“空间”解析仍多局限于二维切片(XY轴), 而组织内的细胞和分子的结构和分布是三维的(XYZ轴), 这一局限性在早期的免疫组织化学领域同样存在, 受限

于只能对组织二维切片进行免疫染色成像, 无法还原出完整组织的三维结构. 直到最近出现的组织透明化技术, 使得能够对完整组织甚至整个生物体实现光学透明, 并允许光线完全穿透到被透明化的组织深处, 结合高景深的显微成像技术发展, 使得对厚组织甚至完整组织的三维免疫染色成像逐渐成为现实.

现有的基于组织透明化的三维免疫荧光技术分为以下三类: (i) 油性组织透明化(solvent-based tissue clearing), 如BABB^[32], 3DISCO^[33], iDISCO^[34], PEAG-SOS^[35]; (ii) 水性组织透明化(aqueous-based tissue clearing), 如Scale^[36], seeDB^[37], CUBIC^[38], FRUIT^[39], RTF^[40]; (iii) 凝胶组织透明化(hydrogel embedding tissue clearing), 如CLARITY^[41], PACT^[42], SWITCH^[43], ACT-PRESTO^[44], SHILD^[45]. 近年来, 组织透明化技术的快速发展和迭代, 为基于荧光成像的原位空间转录组技术应用于三维组织器官提供了理论上的可行性. 基于这一思路, 近几年诞生了许多结合组织透明化的三维空间转录组学方案, 比如, 结合CLARITY的Ex-Seq, STARmap, Deep-STARmap, 3DEEP-FISH, EAZI-FISH, cycleHCR, 3D MERFISH; 结合PACT的smHCR; 结合BABB的mFISH3D; 结合iDISCO的DIIFCO和TRISCO. 在此, 本文将重点综述目前三维空间转录组学技术的发展和前景展望, 并根据技术的分类和发表时间顺序依次介绍(图1), 并总结对比各项技术的特性(表1).

现有的基于成像的三维空间转录组技术根据成像

策略的不同可主要分为以下3类: (i) 基于滚环扩增(rolling cycle amplification, RCA)的原位测序技术; (ii) 基于杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR)的原位杂交技术; (iii) 基于多重荧光原位杂交(multiplexed fluorescence *in situ* hybridization, mFISH)的原位杂交技术(图2)^[46].

3.1 基于RCA的原位测序技术

滚环扩增反应是一种基于DNA聚合酶的信号放大技术, 其核心机制是以环状DNA为模板, 通过持续合成线性重复的DNA序列实现靶标分子的指数级扩增. 根据探针设计与反应路径差异, RCA的实现策略主要分为两类: 第一类逆转录的RCA策略, 通过寡核苷酸探针靶向转录本后, 利用逆转录酶生成单链DNA, 经环化酶闭合为环状模板, 最终由DNA聚合酶启动RCA反应并合成DNA扩增子; 第二类直接环化的RCA策略, 即通过设计特殊单链DNA锁式探针(padlock)直接靶向RNA, 探针两端与靶序列互补结合后形成带有缺口的环状结构, 经DNA连接酶修复缺口完成环化, 随后无需逆转录步骤, 直接通过DNA聚合酶进行RCA反应合成DNA扩增子.

2014年, 哈佛大学Church团队^[21]开发的全转录组的荧光原位测序技术(fluorescent *in situ* sequencing, FISSEQ)是基于逆转录的RCA策略的代表性方法. 该技术通过随机设计的6~9碱基寡核苷酸探针靶向细胞内RNA, 经逆转录生成单链DNA后, 利用CircLigase将

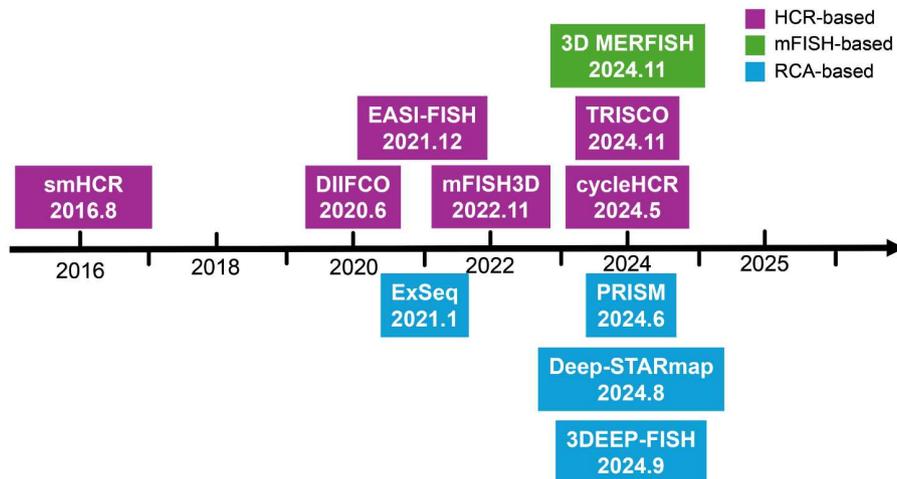


图1 现有的基于成像的三维空间转录组学技术的时间线

Figure 1 Timeline of current imaging-based 3D spatial transcriptomics techniques

表 1 现有的三维空间转录组学技术和方法的详细比较

Table 1 Detailed comparison of current methods and technologies for imaging-based 3D spatial transcriptomics

成像策略	方法	组织切片厚度(μm)	理论基因检测通量 ^{a)}	实际基因检测数	分辨率	组织透明化策略
RCA-based	ExSeq	50	几乎全转录组	~300	亚细胞	ExM
	STARmap	150	1024	28	亚细胞	CLARITY
	Deep-STARmap	150	1024	1017	亚细胞	CLARITY
	3DEEP-FISH	400	4^N	85	亚细胞	CLARITY
	PRISM	100	124	30	亚细胞	CUBIC
HCR-based	smHCR	500	—	1	亚细胞	PACT
	DIIFCO	~4000	—	<4	细胞	iDISCO
	EASI-FISH	300	3^N	24	亚细胞	ExM
	mFISH3D	~4000	3^N	10	细胞	BABB
	cycleHCR	310	2700	256	亚细胞	CLARITY
	TRISCO	~10000	4	4	细胞	iDISCO
FISH-based	3D MERFISH	100	~322	242	亚细胞	CLARITY
		200		156		

a) N 为多轮探针杂交的轮数

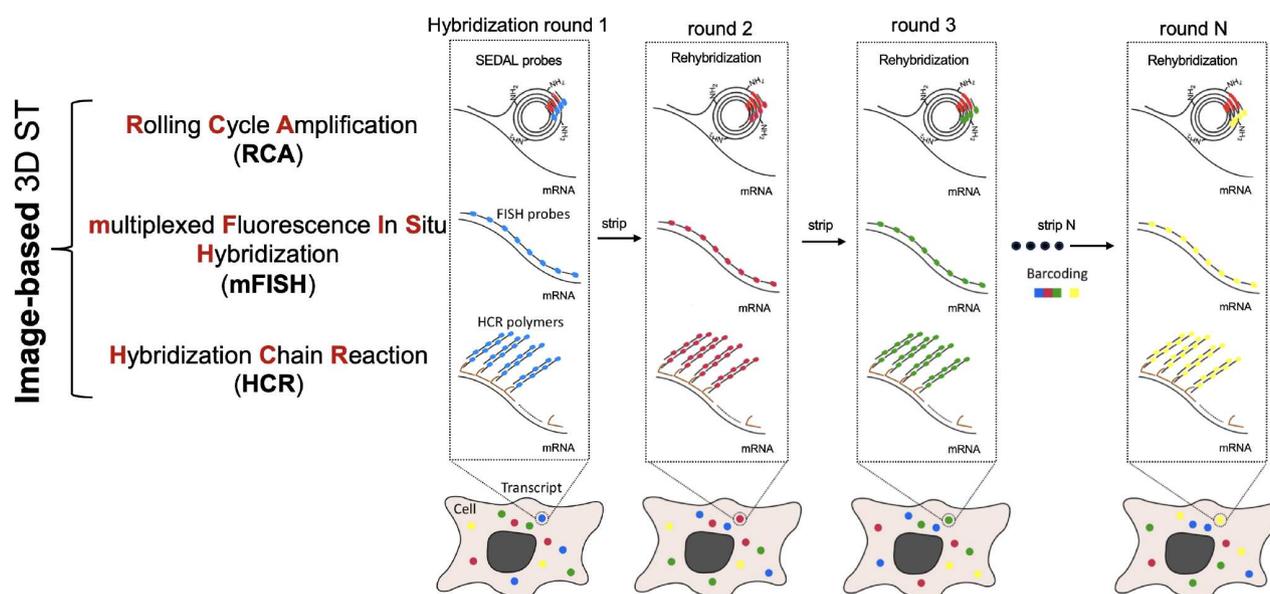


图 2 三类基于成像的三维空间转录组学技术路线^[46]

Figure 2 Three different imaging strategies for imaging-based 3D spatial transcriptomics^[46]

其环化形成环状DNA。为克服逆转录产物扩散问题, FISSEQ创新性地地在逆转录过程中引入氨基烯丙基-dUTP, 并通过双功能交联剂BS(PEG), 将环状DNA共价锚定于胞内蛋白网络, 从而实现分子原位固定。随后, DNA聚合酶以环状DNA为模板进行RCA反应, 生成包含多拷贝重复序列的线性DNA扩增子, 并借助SOLiD (sequencing by oligo ligation detection)测序平台实现

原位解码(读长50~75 bp)。尽管FISSEQ对全转录组的覆盖存在一定偏好性, 且检测的灵敏度受限, 但其高通量检测能力显著优于传统靶向基因检测方法。2021年, Church团队与Boyd团队^[47]合作进一步将FISSEQ与膨胀显微镜技术(expansion microscopy, ExM)整合, 开发出膨胀测序技术(expansion sequencing, ExSeq)。通过Label X介导的RNA-聚丙烯酰胺凝胶交联, ExSeq可

使组织样本均质膨胀4倍, 显著提升基因检出率、测序读长与分辨率, 并支持50 μm 厚度的三维亚细胞成像, 解析了神经元RNA空间定位及肿瘤微环境中细胞互作引发的基因表达异质性.

基于直接环化的RCA策略, 王潇^[23]于2018年开发了STARmap(spatially-resolved transcript amplicon read-out mapping)技术, 实现亚细胞分辨率下对完整组织切片进行空间转录组分析, 其中包括对10 μm 厚的小鼠脑组织切片的1020个基因和150 μm 厚的小鼠胼胝体切片中28个基因进行检测, 成功识别出了脑厚组织切片中的主要细胞类型的空间分布以及细胞间的潜在相互作用. STARmap技术借鉴了靶向ISS策略^[48]的设计原理, 其核心是使用成对匹配的引物和挂锁探针(SNAIL探针, 图3A), 这样的设计比起传统的单用锁式探针, 进一步提升了基因检测的特异性, 将目标RNA分子转化为具有基因唯一编码的DNA扩增子, 然后通过多轮带误差剔除的连接测序(sequencing with error-reduction by dynamic annealing and ligation, SEDAL)在组织水凝胶中实现高度复用的RNA检测. 该技术针对不同厚度组织差异化设计探针锚定策略: 对于10 μm 薄切片, 采用SNAIL探针靶向转录本, 其中引物的5'端半段能

结合转录本, 剩下3'端半段同时结合锁式探针的5'端和3'端形成环状, 经T4 DNA连接酶闭合缺口后, 通过氨基烯丙基-dUTP修饰的DNA扩增子与水凝胶化学交联实现原位固定; 对于150 μm 厚切片, 则使用5'端丙烯酰胺修饰的SNAIL探针预嵌入聚丙烯酰胺凝胶网络, 结合蛋白酶K/SDS脱脂透明化处理, 然后RCA后通过BS(PEG)₉交联带有修饰的DNA扩增子, 两种方案均依赖SEDAL测序对DNA扩增子上大量重复的5位核苷酸组成的特定基因身份识别码(gene barcode)(可得到 $4^5=1024$ 种组合编码, 理论上的基因检测能力)进行多轮杂交成像来解码转录本信息. 基于STARmap的基础框架, 王潇团队近几年在多组学整合、组学类型扩展、厚组织兼容上进行了改进升级, 在2023年推出STARmap PLUS^[49](蛋白组-转录组双模态空间解析技术)和RIBOmap^[50](核糖体结合mRNA空间解析技术); 2024年8月, 他们在*bioRxiv*上发表了厚组织成像技术Deep-STARmap^[51], 通过对STARmap技术的优化, 在降低成本的同时突破在厚组织中低基因数目的局限性, 实现对150 μm 小鼠大脑半球的冠状切片的1017个基因的三维空间原位成像. 三维厚组织的成像测序一直存在信号拥挤与配准对齐的挑战, Deep-STARmap针对适

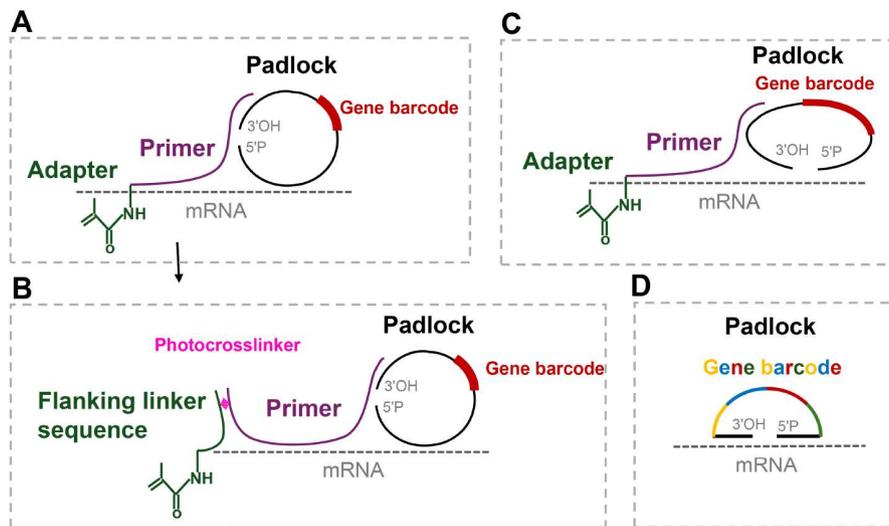


图 3 基于RCA的三维空间转录组学探针设计示意图: A: STARmap的SNAIL探针具体是由带有修饰的引物和锁式探针组成; B: Deep-STARmap探针由侧翼接头序列、引物以及锁式探针组成; C: 3DEEP-FISH探针与STARmap的SNAIL探针类似, 但是缺口位置以及基因条形码长度有所区别; D: PRISM的锁式探针存在连续4个条形码序列共同组成基因条形码

Figure 3 The diagram of probe design of the RCA-based 3D spatial transcriptomics. A: STARmap SNAIL probe is composed of modified primer and padlock; B: Deep-STARmap probe consists of flanking linker sequence, primer and padlock; C: 3DEEP-FISH probe is similar to SNAIL probe of STARmap, but the gap position and the length of gene barcode are different; D: PRISM padlock has four consecutive barcode sequences to form specific gene barcode

配三维厚组织样本的检测进行了如下改进: (i) 使用更低价格的通用接头“侧翼接头序列”(“flanking linker sequence”)来替代SNAIL探针中引物上的丙烯酰胺基修饰(图3B), 这个接头序列的一端带有丙烯酰胺基修饰的同时, 还具有能够与所有锁式探针的引物碱基互补配对的通用序列, 并且二者配对的区域加入了光交联基团^{CVN}K(3-cyanovinylcarbazole nucleoside), 在紫外光照射下将通用接头和引物以牢固的共价键结合。(ii) 引入二次凝胶的策略, 即进行两次凝胶聚合反应, 由于低浓度单体得到的聚丙烯酰胺凝胶刚性较弱, 在多轮荧光成像的过程中容易发生形变导致荧光点发生大幅度偏移而无法区分(仅进行两轮荧光成像就无法区分单个荧光), 所以他们引入二次凝胶的策略以保证组织凝胶的刚性, 显著降低形变, 保证了进行6轮荧光成像后单个点的位置几乎不发生改变。

同样采用直接环化的RCA策略还有黄岩谊团队^[52]在2024年6月在*bioRxiv*上发表的新技术PRISM (profiling of RNA *in-situ* through single-round of imaging), 能够实现快速(24 h)、高效(单次64个基因)、亚细胞分辨率三维空间转录组分析(兼容100 μm厚样品), 成功解析了小鼠E12.5~E14.5胚胎发育、人肝癌的肿瘤微环境和100 μm厚的小鼠脑组织中的关键基因空间分布, 揭示了*Wnt5a/Tbx5*在肢体发育、肿瘤相关成纤维细胞在免疫抑制, 以及*Dlx1/Gad2*在神经分化中的重要作用。PRISM的创新点如下: (i) 创新性编码方式。以光谱强度级别(spectrum intensity levels)和半径向量(radius vector)作为编码策略, 首先设计靶向RNA的带有条形码的锁式探针, 其中条形码区域具有四段序列能够分别与带有四种不同荧光的二级探针结合(图3D), 经RCA扩增形成DNA扩增子以放大检测信号, 随后采用四通道荧光探针系统(Ch1, Ch2, Ch3, Ch4)进行基因编码, 其中前三个通道基于半径向量编码原理构建三维荧光强度空间。通过将荧光标记探针与无荧光同源探针按预设比例混合(如Ch1通道3:2混合产生强度值3), 调控各通道离散化荧光梯度, 形成独特的基因条形码(如Ch1: 3, Ch2: 1, Ch3: 2)。理论上, 依靠3个通道的5种组合即可实现对124个基因的检测, 然而在实践中, 由于多种因素干扰, 许多理论的编码组合无法使用, 例如, 强度编码020与030, 040因光谱重叠难以区分。为此, 经过验证和筛选, 研究团队提出约束条件Ch1+Ch2+Ch3=4的平面编码空间, 将线性强度编码

转换为半径向量模式, 通过矢量角度差异增强编码分辨力, 使三个通道在归一化总强度为4时获得15种可区分组合。同时, 针对Ch4通道的光稳定性限制, 采用二元化信号(0/1)作为独立编码维度, 使总编码容量提升至30种。(ii) 高效编码能力。进行一次PRISM的时间小于24 h, 并且通过这种编码策略单次PRISM能够理论上成像64个基因以上。(iii) 实现厚组织成像。通过使用BS(PEG)₉将带有修饰的cDNA纳米球固定在原位后, 结合CUBIC组织透明化技术中的Cubic L脱脂过程, 实现对100 μm厚的样品实现透明化以实现三维空间转录组分析。

在更大厚度的成像测序方面, Kalhor团队^[53]于2024年9月在*bioRxiv*上报道了新技术——3DEEP-FISH(3D hydrogel-embedding for expression profiling with fluorescence *in situ* hybridization), 该技术同样采用直接环化的RCA的基本策略, 并且能够在400 μm的组织中实现亚细胞分辨率的三维空间转录组成像分析。利用该新技术, Kalhor团队对280 μm厚的小鼠皮肤的85个基因进行成像, 绘制了新生小鼠的毛囊的三维发育转录图谱。3DEEP-FISH的转录本条形码编码策略、具体的组织透明化、条形码读出的方式如下: 锁式探针设计5'端到3'端具体由20 nt的靶向转录本的“臂”(arm)、19 nt的通用滚环扩增引物结合序列(用于后续的滚环扩增)、2 nt隔开序列、18 nt的身份码序列(ID)、20 nt靶向转录本的另一个“臂”组成(图3C), 5个不同的锁式探针靶向同一个转录本的5个不同区域, 并且靶向同一个转录本的5个不同的锁式探针的ID是相同的, 仅仅两个“臂”的序列不同。并且在探针杂交前, 需要额外对样品进行基因组DNA消化, 接着将5'端带有丙烯酰胺基的RCA引物和锁式探针与组织样品进行杂交, 然后进行组织凝胶聚合将RCA引物和锁式探针固定在组织原位, 随后通过蛋白酶K/SDS脱脂实现组织透明化, 紧接着进行连接酶补齐缺口和DNA聚合酶进行滚环扩增, 在RCA过程中同样加入氨基烯丙基-dUTP, 使得扩增得到的cDNA纳米球带有特定修饰, 再用Acryloyl-X, SE(AcX)与cDNA纳米球上的氨基烯丙基-dUTP的氨基进行反应将AcX连接到cDNA上, AcX作为接头在随后进行水凝胶二次包埋中固定住DNA扩增子, 提高凝胶刚性的同时稳定DNA扩增子, 最后使用HybISS(hybridization-based *in situ* sequencing)测序的方式解码转录本信息。HybISS编码策略中

每轮杂交成像中赋予一个转录本一个荧光颜色编码, 因此使用4个荧光通道进行 N 次杂交能够赋予转录本由四种颜色组成的 N 位荧光颜色组合码(如绿绿蓝红黄蓝绿……), 即理论上能够识别 4^N 个基因.

3.2 基于HCR的原位杂交技术

杂交链式反应HCR最早是由Dirks和Pierce^[54]在2004年开发并命名的, 这是一种等温、无酶、熵驱动的DNA分子自组装的信号放大技术, 其原理是利用DNA发夹探针(hairpin probes)在引发链(initiator strand)触发下发生级联杂交, 形成长链DNA聚合物. 具体而言, 即HCR始于引发链与第一个发夹探针结合并与其形成茎环结构, 从而暴露出发夹探针内部的与其他发夹探针互补的序列, 这个序列又能打开第二个发夹探针的茎环结构并暴露出其互补序列, 依次打开后续发夹探针, 从而形成线性或分支的DNA聚合物. 得益于其自主等温复制、高效无酶扩增、单分子灵敏度高以及反应动力学可控等优势, HCR常被选作传统扩增方法的替代策略, 广泛应用于生物传感、生物成像以及DNA纳米结构组装等领域.

2010年Pierce团队^[55]首次将HCR应用到空间转录组成像技术开发中, 开发出基于正交扩增和杂交链式反应的多重荧光原位杂交方法, 通过设计靶向特定转录本的RNA引发链探针, 这样的探针由靶向转录本序列和HCR引发链序列组成(图4A), 然后再加入带有荧光基团的发夹探针, 启动HCR形成带有荧光的RNA聚合物, 从而将荧光信号放大, 接着对上一轮的探针和HCR产物进行洗脱, 再进行下一轮杂交成像, 实现多轮杂交成像, 这项技术成功对完整或者切片的斑马鱼胚胎中5个靶基因进行成像, 展现了出色的组织穿透能力、高信噪比等优点. 更进一步, 2014年Pierce团队^[56]改进HCR成像策略, 开发出二代HCR空间转录组成像技术HCR v2.0, 在原来的HCR技术基础上将RNA引发链改成DNA引发链, 并且将原来的单侧引发链结构改成双侧引发链结构, 即二代DNA引发链探针的构成变为双侧HCR引发链序列加上中部的靶向转录本序列(图4B), 实现更强的荧光信号产生. 在斑马鱼胚胎中进行成像验证, 优化的HCR技术在降低了HCR成像条件的严苛度以及成本的同时, 比上一代HCR信噪比提高了5倍. 2018年Pierce团队^[57]再次改进HCR技术, 开发出第三代原位HCR技术(HCR v3.0), 将原来设计

的单个DNA引发链探针改为成对分裂-引发探针(split-initiator probes), 其中两个成对的探针的组成均为靶向转录本序列和半个HCR引发链序列(图4C), 只有成对匹配的分裂-引发链探针结合到正确位置且相互靠近时, 它们的各自半个HCR引发链才能组合成完整的引发链从而起始杂交链式反应, 而这样的设计赋予了HCR v3.0比起1代HCR更高的探针特异性、更强组织渗透能力以及更重要的多重编码的能力.

在获得更高的成像深度上, 2016年8月Pierce团队与蔡龙团队^[58]合作开发出smHCR(single-molecule hybridization chain reaction)并发表在*Development*杂志, 在检测培养的细胞和完整斑马鱼胚胎mRNA中展现媲美smFISH的高灵敏度, 并且smHCR可以检测500 μm 厚的成年小鼠脑切片深处的单个转录本. smHCR中的探针设计使用的是1代HCR技术的变体, 即将1代HCR中用的RNA探针改成DNA探针, 探针的组成并不进行改变, 对于单层培养细胞和斑马鱼胚胎成像中直接使用变体HCR进行成像, 而在对厚组织成像中smHCR技术将HCR技术(HCR v1.0)和PACT透明化技术结合, 实现500 μm 厚的小鼠脑切片的三维单转录本成像.

在实现更多的基因检测能力上, 2021年12月, 美国霍华德·休斯医学研究所Tillberg和Sternson团队^[59]开发了EASI-FISH(expansion-assisted iterative fluorescence *in situ* hybridization)技术, 实现了ExM和HCR v3.0的结合. 该技术能够对小鼠300 μm 脑切片的下丘脑外侧区(lateral hypothalamic area, LHA)的24种标记基因进行亚细胞分辨率三维空间转录组成像, 区分出9个分子结构域, 揭示了LHA中分子定义的细胞类型及其空间分布, 并且还描述了不同细胞类型在形态和功能上的多样性. 值得注意的是, EASI-FISH技术在上述两种技术中进行了以下改良: (i) 优化ExM的分子锚定步骤, 使用DNA 烷化剂MelpalanX(Melphalan与Acryloyl-X, SE反应得到)替代ExFISH^[60]中使用的昂贵的Label-IT. (ii) 拓展多轮成像能力. 每轮成像完成后, 均使用DNA酶将上一轮的探针和HCR产物进行消化, 然后再进行下一轮成像, 以实现多轮成像标记的能力. (iii) 特殊的细胞标记方式. 在用DNA酶处理过的细胞使用DAPI染色时, DAPI能够标记细胞RNA从而实现细胞质的标记, 用于后续细胞分割和图像配准.

以上的尝试都还主要集中在微米的尺度, 2020年6月卡罗林斯卡研究院Uhlén团队^[61]在*Nature Biomed-*

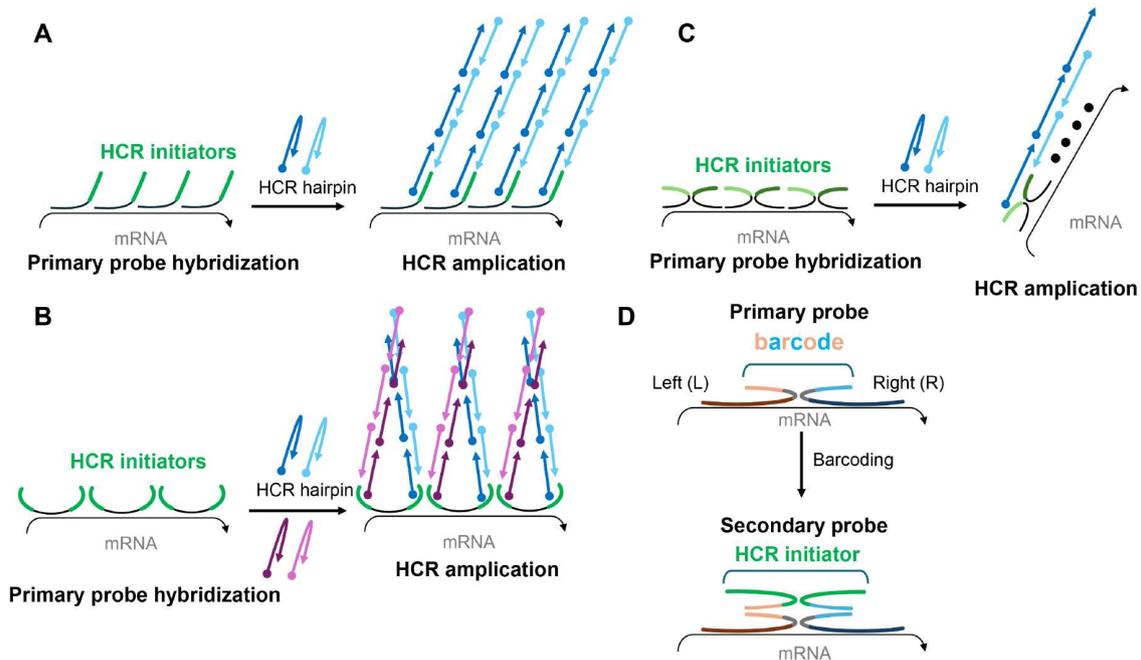


图 4 基于HCR的三维空间转录组学探针设计与信号放大示意图. A: HCR v1.0; B: HCR v2.0; C: HCR v3.0; D: cycleHCR
 Figure 4 The diagram of probe design and amplification of the HCR-based 3D spatial transcriptomics. A: HCR v1.0; B: HCR v2.0; C: HCR v3.0; D: cycleHCR

cal Engineering上发表了大体积多模态三维单细胞空间成像技术DIIFCO(diagnosing *in situ* immunofluorescence-labeled cleared oncosamples), 能够以单细胞分辨率对完整的毫米级的新鲜冷冻样本和FFPE的肿瘤组织的几种RNA(包括非编码和编码RNA)和几种蛋白质联合成像, 从而揭示肿瘤内部复杂的肿瘤微环境、肿瘤干细胞的分布、肿瘤细胞异质性及其空间分布特征. DIIFCO技术的亮点是通过改良iDISCO⁺技术^[62]的同时结合HCR v3.0的转录组成像技术. 具体来说, (i) 优化RNA保留措施: 所有流程均使用RNA稳定剂RNAlater来最大限度降低RNA降解. (ii) 优化样品固定步骤: 对比了8种固定RNA策略, 最终选择只用4%的多聚甲醛对样品固定, 能够实现最高的成像的SNR. (iii) 优化二氯甲烷(DCM)处理时间: 长时间的DCM处理样品会导致细胞核染色荧光强度变弱, 所以降低DCM处理时间到30分钟, 保证了透明化效果的同时, 还不削弱细胞核染色的效果. (iv) 整合改良版iDISCO⁺和HCR v3.0技术: 简单来说, 在原有的iDISCO⁺处理的实验步骤中的蛋白质抗体杂交步骤前增加HCR v3.0的长时间探针杂交和杂交链聚合反应两个步骤, 从而实现对大体积样品的RNA组和蛋白质组进行

成像.

2022年11月的霍华德·休斯医学研究院的Murakami和Heintz^[63]在bioRxiv上发表单细胞空间转录组成像技术mFISH3D(multiplexed fluorescence *in situ* hybridization in 3D)技术, 将HCR v3.0与BABB透明化技术相结合, 能够实现对2~4 mm大小的小鼠脑块或者人的脑块进行10个基因以及几种蛋白质的联合成像. mFISH3D在常规三维空间转录组成像策略中进行了独到的优化: (i) 优化探针渗透速率. 常规方法使用硫酸葡聚糖辅助杂交, 然而大分子量的硫酸葡聚糖会阻碍探针的渗透, 转而选用聚乙二醇(PEG 8000)保证在促进探针杂交的同时还能协同提高探针渗透的能力. (ii) 使用油性组织透明化策略. 为了避免使用水性组织透明化时PH和盐浓度的变化对已杂交探针稳定性的影响, 选用了BABB油性透明化技术. (iii) 提高成像信噪比. 他们发现, 在进行探针杂交前对样品进行酸处理和蛋白酶K消化的前处理能够显著提高2 mm厚的小鼠脑块的荧光信噪比. (iv) 实现多轮杂交成像. 厚组织之所以难以实现多轮杂交成像的重要原因之一就是长时间的重复杂交-洗脱的过程中RNA的快速降解, 为了克服这个问题, 基于DNA链与RNA链形成的

RNA:DNA杂合体能够显著提高RNA的稳定性, 通过设计一系列的不具备引发序列的阻断探针(简称阻断探针)以形成RNA:DNA杂合体, 同时不产生荧光信号, 接着引入热辅助去杂交的步骤, 将上一轮的包含一级探针和阻断探针以及DNA聚合体在内全部洗脱, 再杂交下一轮的一级探针和阻断探针, 并进行杂交链式反应, 实现多轮洗脱-杂交成像的能力。

2024年5月Liu团队^[64]在*bioRxiv*上发表cycleHCR技术, 且在2025年2月正式在*Science*上发表. cycleHCR技术的核心是将HCR v.3.0改良并结合凝胶组织透明化技术, 实现对厚组织切片进行亚细胞分辨率的三维空间转录组以及蛋白组分析, 通过对E6.5~7.0时期的完整小鼠胚胎(~310 μm)的254个基因进行成像(成像85轮, 历时20天), 揭示了早期胚胎发育中的复杂基因表达模式和细胞的空间组织以及命运决定机制. 此外, 他们还对小鼠海马切片(40~60 μm)同时进行了RNA和蛋白质成像, 分析了120个基因的表达和8种蛋白质的分布, 揭示了海马中不同细胞类型的基因表达梯度和核结构差异. 其中cycleHCR有三个技术亮点, (i) 多轮杂交成像: 基于HCR v3.0的成对分裂-引发探针的基础上进行改进, 首先选择了更长的成对分裂探针(各45 nt, HCR v3.0的是25 nt)作为一级探针(primary probes)(图4D), 使得其与靶RNA结合时 T_m (解链温度)达到90°C以上, 这样的设计既能进一步提高一级探针的靶向特异性, 还能保证在多轮成像中充分洗脱除了一级探针以外的其他分子; 其次是引入了条形码编码过程, 使用成对的14 nt的二级分裂-引发探针, 分别为分裂左DNA条形码(split left DNA barcode, 简称L)和分裂右DNA条形码(split right DNA barcode, 简称R), 其中只有L与R组合且结合于同一转录本的邻近位置时, L和R的非转录本的结合区域会形成完整的引发序列从而启动杂交链式反应, 通过设计多个L和R, 来实现编码能力, 例如, 本文中各设计了30个L和R的DNA条形码序列, 其中每一对左右DNA条形码的组合来标记一个转录本, 即能标记 $30^2=900$ 个转录本, 如果分别用三种荧光基团来进行标记的话, 则能够标记 $30 \times 30 \times 3=2700$ 个转录本, 这样的编码方式不需要跨轮解码, 避免了分子拥挤问题, 适合稀疏和密集标记的目标成像. (ii) 多轮杂交成像自动化系统: 设计了自动化程序来实现每一步反应添加的溶液和除去以及自动成像, 能够每天完成5轮杂交-成像, 识别15个不同的转录

本, 极大地减轻了多轮成像的人力耗费, 弥补了该方法低通量的缺点(然而低通量技术一定程度上可缓解成像过程中的荧光信号拥挤的问题). (iii) 双组学成像: 将转录本的成像策略结合到抗体上, 能够在40~60 μm 组织切片上同时进行RNA cycleHCR和protein cycleHCR, 此外在对组织切片和细胞单独进行protein cycleHCR成像时, 还能结合膨胀显微技术来实现亚细胞分辨率上的细胞三维空间蛋白组成像。

2024年11月, 瑞典卡罗林斯卡研究院的Uhlén及Kanatani团队^[65]在*Science*上发表的三维单细胞转录组空间成像技术TRISCO(Tris buffer-mediated retention of *in situ* hybridization chain reaction signal in cleared organs)技术, 其能够实现全脑的单细胞分辨率四基因的空间转录组学成像, 揭示不同物种全脑(小鼠、大鼠、豚鼠)以及小鼠的跨器官(心脏、肺、脊髓、肾)的RNA(包括编码RNA和非编码RNA)的三维空间分布和表达模式. TRISCO是DIIFCO技术的改良版, 针对DIIFCO技术由于样品的RNA完整性差、探针渗透问题引发的荧光标记的内外不均一、处理后样品透明度差等缺陷导致不能在成年小鼠全脑很好地成像的问题, 他们对DIIFCO进行改良, 具体如下, (i) 提高RNA的完整性: 所有流程均使用低廉高效的RNA抑制剂聚乙烯磺酸(PVSA), 以及增加一步对甲醇脱水后的样品直接转移到50%甲酰胺溶液中的流程, 以最大化抑制RNA酶活性. (ii) 提升荧光全脑内外均匀标记: 对大组织样品应用isHCR(*in situ* hybridization chain reaction)时, 由于荧光发夹探针渗透到样品表面和样品内部的时间不同使得绝大多数的荧光发夹探针在样品表面耗尽, 从而出现表面荧光强度高, 内部无荧光的情况, TRISCO针对这个问题进行了各种方法的测试, 其中包括改变杂交反应液的成分或盐浓度、外加电场、外加压力、离心、降低反应温度等, 结果发现仅降低反应温度就能使得全脑荧光的内外不均匀的问题得到缓解, 因为HCR反应为熵驱动的反应, 温度合适则会迅速启动, 反之则会非常缓慢发生反应, 利用这个特性, 他们最终发现在4°C情况下HCR的缓慢反应能够保证脑组织内外荧光强度保持均匀. (iii) 克服DIIFCO处理全脑后内部不透明: 增加500 mmol/L的Tris-HCl洗涤步骤, 充分洗去在常规isHCR中使用的 $5 \times \text{SSC}$ 缓冲液和Tween 20($5 \times \text{SSCT}$)残留, 因为在小鼠成年脑内部残留的 $5 \times \text{SSCT}$ 会导致透明化效果变差。

3.3 基于mFISH的原位杂交技术

2015年, 哈佛大学医学院庄小威团队^[20]在*Science*上发表新技术MERFISH(multiplexed error-robust FISH), 通过构建二进制条形码系统(如0100010..., 1011101...), 利用多轮探针杂交为每个转录本赋予独特的 N 位二进制身份码, 实现理论上无偏全转录组成像. 2024年12月, 庄小威团队^[66]在原有的MERFISH技术路线上进行修改, 在*eLife*发表了能够用于厚组织切片的三维空间转录组成像的技术3D MERFISH, 技术的核心是采用带有丙烯酰胺基和多聚胸腺嘧啶脱氧核糖核酸(poly T)的锚定探针(5' acryd-polyA-anchor probes), 该探针能够与组织中的mRNA杂交并通过水凝胶组织化学的方式将带有多聚腺嘌呤核糖核苷酸(poly A)修饰的mRNA锚定在组织原位的凝胶网上, 然后进行MERFISH的常规成像. 此外, MERFISH还结合深度学习模型的图像增强的能力, 对低曝光时间得到的低信噪比的图像进行增强, 实现高速高信噪比成像; 改进水凝胶配方来降低多轮成像中出现的组织形变引起的荧光位移; 在凝胶中掺入成像基准珠(imaging fiducial beads)来校准双色通道的轴向色差, 实现跨通道图像精准对齐. 这些优化使得3D MERFISH能够实现100 μm 的组织切片中242个基因和200 μm 的组织切片的156个基因的成像, 并在小鼠下丘脑200 μm 切片中鉴定出21个兴奋性神经元簇、26个抑制性神经元簇和7个非神经元亚类的三维空间分布.

4 总结和展望

通过对现有的三维空间转录组成像技术的总结及不同方法的比较, 实现三维空间转录组成像技术似乎是一件简单且直接的事情: 只需要将目前的基于成像的空间转录技术和组织透明化技术相结合, 通过透明化技术匹配组织与成像溶液的折射率, 以减少光线穿过组织的荧光的散射, 从而将二维切片成像拓展至三维组织块. 但为了达到厚组织上的高效灵敏与多重检测, 还存在众多的挑战. 其中一个核心挑战在于如何有效整合基于成像的空间转录组学技术与组织透明化技术. 尽管目前有各种的组织透明化方法和基于成像的空间转录组学技术, 但最基础的策略还是基于成像的空间转录组学技术结合水凝胶组织透明化, 如Ex-Seq, STARmap, Deep-STARmap, 3DEEP-FISH, cy-

cleHCR, 3D MERFISH和EASI-FISH, 主要原因有三点: (i) 探针杂交是在水性环境下进行的, 使得其他类型的组织透明化方法难以兼容; (ii) 组织凝胶化学的方法能够稳定地将组织中感兴趣的分子锚定在原位的凝胶网络上; (iii) 基于水性的组织透明化的方法能有效地保留荧光分子的荧光. 然而, 目前没有一个结合基于凝胶的组织透明化的三维空间转录组成像技术能够实现全组织的成像, 能够分析的样品最大厚度只达到500 μm , 其中主要原因可能是由于: (i) 聚丙烯酰胺凝胶的存在一定程度上会阻碍探针渗透、脂质清除, 尤其是干扰反应所需的酶渗透到组织内部的过程; (ii) 在多轮成像过程中, 更厚的组织凝胶样品会出现更加严重的形变和位移的问题, 给高分辨率下测序成像信号对齐带来更大困难, 进而导致基因检出率和基因读数(reads)显著降低; (iii) 水性组织透明化和凝胶组织透明化技术在对较大组织透明化的过程中, 其透明化效果和效率远不及油性透明化技术, 意味着如果加大样品厚度就需要大幅度延长处理时间, 反而带来更多不利后果. 因此, 相应的另一类创新性策略结合了HCR的成像和油性组织透明化, 以DIIFCO和TRISCO, mFISH3D为代表, 值得注意的是, 这三项技术均能够对毫米级的组织块或完整组织进行空间转录组成像, 并且TRISCO甚至能实现对大鼠和豚鼠的全脑进行成像. 这主要归功于HCR技术与油性透明化策略的优势互补. 具体来说, 在基于成像的空间转录组的实验流程中, 当成像的组织切片厚度越大时, 反应液、酶、探针的渗透时间就显著增加($t=d^2/Deff$, t 为渗透到样品中心的时间; d 为样品厚度; $Deff$ 为分子的渗透速率), 随着样品的厚度提升两到三个数量级(微米级到厘米级), 渗透时间则增加到了四到六个数量级. 在这种情况下, HCR技术恰恰是三种策略中最合适的, 因为HCR是一个等温、无酶、熵驱动 DNA 分子自组装的技术, 并且有探针渗透速率快、灵敏度高、信号强的优点, 而且油性组织透明化技术, 也同样有高渗透率的优点. 例如, iDISCO只需要3~7天即能完成小鼠成年脑的透明化, 而基于水性的组织透明化方法往往需要7~14天以上才能完成组织的脱脂. 此外, 虽然基于油性组织透明化方法的试剂会淬灭探针的荧光的问题, 但是对于HCR形成的强信号的荧光探针聚合体淬灭带来的影响并不大, 并且可以降低甲醇脱水处理时间也能很好地降低荧光淬灭的效应. 正是这些的优势,

造就了三项技术超常的样品成像厚度。但是这种策略并没有克服多轮杂交成像中组织的变形与高分辨率下的测序成像信号对齐的问题, 因为DIIFCO和TRISCO直接舍弃了多轮成像的功能, 仅进行一次性的成像, 而虽然mFISH3D能够实现多轮杂交成像, 但是其能够检测的基因数目还非常有限。

在三维空间转录组学成像技术中, 除了关注空间转录组学技术和组织透明化技术整合, 还需要考虑如何提高技术的基因检出数目/多重检测能力(multiplex capability)和多组学检测能力。一般来说基因检出数目与成像的样品厚度成反比, 即样品厚度提高的同时基因检出数目会减少, 具体原因是成像细胞的数目增加后, 荧光拥挤的问题更加严重, 导致可区分的荧光数目减少。而在如何在提高样品厚度的同时保证更多的基因检出数目的问题上, Deep-STARmap采用了特别的多轮杂交成像的读出策略, 从原来的STARmap技术在10 μm 厚的组织切片中检测1000个基因到Deep-STARmap技术对150 μm 组织切片中检测1017个基因^[51]。另外, 采用了膨胀显微镜技术的ExSeq和EASI-FISH等方法, 通过线性放大样品的尺寸, 一方面提高了成像的分辨率, 另一方面还能减轻在成像中出现的荧光拥挤的问题从而提高成像的基因数。不仅如此, 如PRISM技术采用创新性的光谱强度级别和半径向量的编码策略, 实现超高单次基因成像数目64个, 甚至超越了如mFISH3D和EASI-FISH这类能够进行多轮成像检测的总基因数。总的来说, 良好的编码和特别的读出策略的设计, 保证样品进行反复处理时的形状不变以及克服成像中的荧光拥挤问题, 是目前提高基于成像的三维空间转录组学技术的基因检测数目主要可改进

的方面。而在多组学的三维成像中, 已经实现的基于成像的三维空间多组学技术代表技术cycleHCR, 它不仅能够实现亚细胞分辨率的转录组和蛋白组的三维成像, 还能够在厚组织切片实现双组学的分析, 两个组学能够实现的核心在于: (i) 蛋白组和转录组的检测流程并不会相互干涉, 即免疫染色和原位杂交是兼容且可以良好并行的技术。(ii) 蛋白组成像策略可以直接采用转录组成像的策略, 即设计偶联了具有编码信息的寡聚核苷酸链的抗体, 能识别或者结合到特定表观修饰或蛋白质等分子, 仅仅实验流程中免疫染色中的抗体杂交的步骤, 即可以实现蛋白组和转录组的同时检测。其中值得注意的是, 在cycleHCR的蛋白质组分析中, 可以选用靶向特定表观基因组修饰的抗体, 实现对细胞或组织块的三维空间表观基因组进行成像, 这也暗示基于成像的三维空间转录组学技术的策略能够迁移到三维空间表观基因组技术中。

综上所述, 三维空间组学作为前沿交叉技术, 其理论框架与功能实现仍深度依赖于空间组学技术体系与组织透明化方法学的系统性整合。因此, 该领域的技术突破本质上受限于上述两大核心技术的迭代效率与适配性优化, 即如何克服成像样品尺寸小、基因检测通量低与多组学技术的局限性, 是目前三维空间组学技术亟待解决的关键挑战。此外, 这项技术的未来发展还需聚焦于新型分子探针设计、深度学习驱动的图像重建算法、物理-化学耦合透明化策略的创新以及显微成像技术的革新, 进而在未来实现生物大分子在三维空间中的高精度动态解析, 从而为发育生物学、肿瘤微环境研究及神经生物学等重大领域提供革命性研究范式。

参考文献

- 1 Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*, 2009, 6: 377–382
- 2 Nagano T, Lubling Y, Stevens T J, et al. Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. *Nature*, 2013, 502: 59–64
- 3 Guo H, Zhu P, Wu X, et al. Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res*, 2013, 23: 2126–2135
- 4 Buenrostro J D, Giresi P G, Zaba L C, et al. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods*, 2013, 10: 1213–1218
- 5 Dey S S, Kester L, Spanjaard B, et al. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 285–289
- 6 Macaulay I C, Haerty W, Kumar P, et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods*, 2015, 12: 519–522
- 7 Hou Y, Guo H, Cao C, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular

- carcinomas. *Cell Res*, 2016, 26: 304–319
- 8 Heumos L, Schaar A C, Lance C, et al. Best practices for single-cell analysis across modalities. *Nat Rev Genet*, 2023, 24: 550–572
- 9 Asp M, Bergenstråhle J, Lundeberg J. Spatially resolved transcriptomes—next generation tools for tissue exploration. *BioEssays*, 2020, 42: 1900221
- 10 Nichterwitz S, Chen G, Aguila Benitez J, et al. Laser capture microscopy coupled with Smart-seq2 for precise spatial transcriptomic profiling. *Nat Commun*, 2016, 7: 12139
- 11 Chen J, Suo S, Tam P P, et al. Spatial transcriptomic analysis of cryosectioned tissue samples with Geo-seq. *Nat Protoc*, 2017, 12: 566–580
- 12 Casasent A K, Schalck A, Gao R, et al. Multiclonal invasion in breast tumors identified by topographic single cell sequencing. *Cell*, 2018, 172: 205–217.e12
- 13 Femino A M, Fay F S, Fogarty K, et al. Visualization of single RNA transcripts *in situ*. *Science*, 1998, 280: 585–590
- 14 Fan Y, Braut S A, Lin Q, et al. Determination of transgenic loci by expression FISH. *Genomics*, 2001, 71: 66–69
- 15 Levisky J M, Shenoy S M, Pezo R C, et al. Single-cell gene expression profiling. *Science*, 2002, 297: 836–840
- 16 Raj A, Peskin C S, Tranchina D, et al. Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Biol*, 2006, 4: e309
- 17 Raj A, van den Bogaard P, Rifkin S A, et al. Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nat Methods*, 2008, 5: 877–879
- 18 Lubeck E, Coskun A F, Zhiyentayev T, et al. Single-cell *in situ* RNA profiling by sequential hybridization. *Nat Methods*, 2014, 11: 360–361
- 19 Shah S, Lubeck E, Zhou W, et al. *In situ* transcription profiling of single cells reveals spatial organization of cells in the mouse hippocampus. *Neuron*, 2016, 92: 342–357
- 20 Chen K H, Boettiger A N, Moffitt J R, et al. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science*, 2015, 348: aaa6090
- 21 Lee J H, Daugharthy E R, Scheiman J, et al. Highly multiplexed subcellular RNA sequencing *in situ*. *Science*, 2014, 343: 1360–1363
- 22 Gyllborg D, Langseth C M, Qian X, et al. Hybridization-based *in situ* sequencing (HybISS) for spatially resolved transcriptomics in human and mouse brain tissue. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: e112
- 23 Wang X, Allen W E, Wright M A, et al. Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science*, 2018, 361: eaat5691
- 24 Ståhl P L, Salmén F, Vickovic S, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*, 2016, 353: 78–82
- 25 Rodrigues S G, Stickels R R, Goeva A, et al. Slide-seq: a scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution. *Science*, 2019, 363: 1463–1467
- 26 Liu Y, Yang M, Deng Y, et al. High-spatial-resolution multi-omics sequencing via deterministic barcoding in tissue. *Cell*, 2020, 183: 1665–1681.e18
- 27 Jiang F, Zhou X, Qian Y, et al. Simultaneous profiling of spatial gene expression and chromatin accessibility during mouse brain development. *Nat Methods*, 2023, 20: 1048–1057
- 28 Satija R, Farrell J A, Gennert D, et al. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 495–502
- 29 Junker J P, Noël E S, Guryev V, et al. Genome-wide RNA tomography in the zebrafish embryo. *Cell*, 2014, 159: 662–675
- 30 Durruthy-Durruthy R, Gottlieb A, Heller S. 3D computational reconstruction of tissues with hollow spherical morphologies using single-cell gene expression data. *Nat Protoc*, 2015, 10: 459–474
- 31 Morita M, Shimokawa K, Nishimura M, et al. ViBrism DB: an interactive search and viewer platform for 2D/3D anatomical images of gene expression and co-expression networks. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: D859–D866
- 32 Dodt H U, Leischner U, Schierloh A, et al. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods*, 2007, 4: 331–336
- 33 Ertürk A, Becker K, Jährling N, et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc*, 2012, 7: 1983–1995
- 34 Renier N, Wu Z, Simon D J, et al. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*, 2014, 159: 896–910
- 35 Jing D, Zhang S, Luo W, et al. Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS method. *Cell Res*, 2018, 28: 803–818
- 36 Hama H, Kurokawa H, Kawano H, et al. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 1481–1488

- 37 Ke M T, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 1154–1161
- 38 Susaki E A, Tainaka K, Perrin D, et al. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell*, 2014, 157: 726–739
- 39 Hou B, Zhang D, Zhao S, et al. Scalable and DiI-compatible optical clearance of the mammalian brain. *Front Neuroanat*, 2015, 9: 19
- 40 Yu T, Zhu J, Li Y, et al. RTF: a rapid and versatile tissue optical clearing method. *Sci Rep*, 2018, 8: 1964
- 41 Chung K, Deisseroth K. CLARITY for mapping the nervous system. *Nat Methods*, 2013, 10: 508–513
- 42 Tomer R, Ye L, Hsueh B, et al. Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nat Protoc*, 2014, 9: 1682–1697
- 43 Murray E, Cho J H, Goodwin D, et al. Simple, scalable proteomic imaging for high-dimensional profiling of intact systems. *Cell*, 2015, 163: 1500–1514
- 44 Lee E, Sun W. ACT-PRESTO: biological tissue clearing and immunolabeling methods for volume imaging. *J Vis Exp*, 2016, 118: 54904
- 45 Park Y G, Sohn C H, Chen R, et al. Protection of tissue physicochemical properties using polyfunctional crosslinkers. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 73–83
- 46 Liao J, Lu X, Shao X, et al. Uncovering an organ's molecular architecture at single-cell resolution by spatially resolved transcriptomics. *Trends Biotechnol*, 2021, 39: 43–58
- 47 Alon S, Goodwin D R, Sinha A, et al. Expansion sequencing: Spatially precise *in situ* transcriptomics in intact biological systems. *Science*, 2021, 371: eaax2656
- 48 Ke R, Mignardi M, Pacureanu A, et al. *In situ* sequencing for RNA analysis in preserved tissue and cells. *Nat Methods*, 2013, 10: 857–860
- 49 Zeng H, Huang J, Zhou H, et al. Integrative *in situ* mapping of single-cell transcriptional states and tissue histopathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, 2023, 26: 430–446
- 50 Zeng H, Huang J, Ren J, et al. Spatially resolved single-cell transcriptomics at molecular resolution. *Science*, 2023, 380: eadd3067
- 51 Sui X, Lo J A, Luo S, et al. Scalable spatial single-cell transcriptomics and transcriptomics in 3D thick tissue blocks. *bioRxiv*, 2024, 606553
- 52 Chang T, Zhao S, Deng K, et al. PRISM: multiplexed profiling of RNA *in-situ* through single-round of imaging in three-dimensional tissue. *bioRxiv*, 2024, 601330
- 53 Asami S, Yin C, Garza L A, et al. Deconvolving organogenesis in space and time via spatial transcriptomics in thick tissues. *bioRxiv*, 2024, 614640
- 54 Dirks R M, Pierce N A. Triggered amplification by hybridization chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 15275–15278
- 55 Choi H M T, Chang J Y, Trinh L A, et al. Programmable *in situ* amplification for multiplexed imaging of mRNA expression. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 1208–1212
- 56 Choi H M T, Beck V A, Pierce N A. Next-generation *in situ* hybridization chain reaction: higher gain, lower cost, greater durability. *ACS Nano*, 2014, 8: 4284–4294
- 57 Choi H M T, Schwarzkopf M, Fornace M E, et al. Third-generation *in situ* hybridization chain reaction: multiplexed, quantitative, sensitive, versatile, robust. *Development*, 2018, 145: dev165753
- 58 Shah S, Lubeck E, Schwarzkopf M, et al. Single-molecule RNA detection at depth by hybridization chain reaction and tissue hydrogel embedding and clearing. *Development*, 2016, 143: 2862–2867
- 59 Wang Y, Eddison M, Fleishman G, et al. EASI-FISH for thick tissue defines lateral hypothalamus spatio-molecular organization. *Cell*, 2021, 184: 6361–6377.e24
- 60 Chen F, Wassie A T, Cote A J, et al. Nanoscale imaging of RNA with expansion microscopy. *Nat Methods*, 2016, 13: 679–684
- 61 Tanaka N, Kanatani S, Kaczynska D, et al. Three-dimensional single-cell imaging for the analysis of RNA and protein expression in intact tumour biopsies. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4: 875–888
- 62 Renier N, Adams E L, Kirst C, et al. Mapping of brain activity by automated volume analysis of immediate early genes. *Cell*, 2016, 165: 1789–1802
- 63 Murakami T C, Heintz N. Multiplexed and scalable cellular phenotyping toward the standardized three-dimensional human neuroanatomy. *bioRxiv*, 2022, 517711
- 64 Gandin V, Kim J, Yang L Z, et al. Deep-tissue transcriptomics and subcellular imaging at high spatial resolution. *Science*, 2025, 388: eadq2084
- 65 Kanatani S, Kreutzmann J C, Li Y, et al. Whole-brain spatial transcriptional analysis at cellular resolution. *Science*, 2024, 386: 907–915

Current progress of imaging-based 3D spatial transcriptomics

WANG HaoXian^{1,2}, JIANG FuQing^{1,2}, ZOU ShangJie¹ & PENG GuangDun^{1*}

¹ Center for Cell Lineage Technology and Engineering, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

* Corresponding author, E-mail: peng_guangdun@gibh.ac.cn

Imaging-based 3D spatial transcriptomics integrates spatial transcriptomics imaging with advanced tissue-clearing methods to transcend the inherent limitations of conventional two-dimensional approaches, enabling precise three-dimensional *in situ* mapping of transcripts. In this paper, we systematically review advancements in 3D spatial transcriptomics technologies grounded in rolling circle amplification, hybridization chain reaction, and multiplexed fluorescence *in situ* hybridization. We further summarize technical optimizations addressing challenges in transitioning from 2D to 3D analysis, compare the performance of existing imaging-based three-dimensional spatial transcriptomics platforms, and provide insights into future developments in this field, ultimately aiming to offer guidance for the development of 3D spatial transcriptomics technologies.

3D spatial transcriptomics, tissue-clearing, imaging-based spatial transcriptomics

doi: [10.1360/SSV-2025-0140](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0140)