

特约综述



刘龙奇, 博士, 研究员, 华大生命科学研究院单细胞组学首席科学家, 杭州华大生命科学研究院原院长。中国科学院大学博士研究生导师、郑州大学硕士研究生导师、西北大学兼职教授、南方科技大学业界导师、南开大学硕士研究生校外指导教师。人类细胞图谱(Human Cell Atlas)亚洲联盟成员, 粤港澳大湾区单细胞组学联盟主要发起人之一。曾获广东省自然科学一等奖, 深圳市首届优秀青年基础研究资助, 中国博士后科学基金一等资助, 中国科学院院长优秀奖, 深圳市高层次人才, 深圳市盐田区“梧桐人才”。

时空组学在基因组研究中的革新

冯 静, 夏 骏, 张哲玮, 刘龙奇*, 姜宇佳*

(杭州华大生命科学研究院, 杭州 310030)

摘要: 时空组学技术通过在连续的空间和时间维度内检测器官、组织和细胞内的遗传分子特征, 可以在多个组学水平解析生命现象的调控机制。多组学包括基因组、表观组、转录组和蛋白组等。本文介绍了时空组学技术的技术分类、原理和特点, 简述了时空组学数据的分析策略和方案, 回顾了时空组学技术在发育生物学、癌症生物学、神经科学和植物学领域的研究进展, 并展望了时空组学未来的发展发向。

关键词: 时空组学; 空间转录组学; 发育生物学; 癌症生物学; 神经科学; 植物学

The revolution of spatiotemporal omics in genomic research

FENG Jing, XIA Jun, ZHANG Zhewei, LIU Longqi*, JIANG Yujia*

(BGI Research, Hangzhou 310030, China)

Abstract: Spatiotemporal omics technology facilitates the examination of genetic and molecular characteristics within organs, tissues, and cells across both spatial and temporal dimensions, thereby enabling the elucidation of regulatory mechanisms at multiple omics levels, including the genome, epigenome, transcriptome, and proteome. This work provides an overview of the technical classifications, underlying principles, and distinctive features of spatiotemporal omics technology. Additionally, it delineates the bioinformatics strategies and methodologies for processing spatiotemporal omics data. The work also encompasses recent advancements in the application of spatiotemporal omics technology within the field of developmental biology, cancer biology, neuroscience and botany, and provides an outlook on the future development of spatiotemporal omics.

收稿日期: 2024-07-30

基金项目: 国家重点研发计划-前沿生物技术(2022YFC3400405); 科技创新2030-“脑科学与类脑研究”重大项目(2021ZD0200100); 深圳市优秀科技创新人才培养项目(RCYX20200714114644191)

第一作者: E-mail: fengjing@genomics.cn

*通信作者: 刘龙奇, E-mail: liulongqi@genomics.cn; 姜宇佳, E-mail: jiangyujia@genomics.cn

Key Words: spatiotemporal omics; spatial transcriptomics; developmental biology; cancer biology; neuroscience; botany

测序技术的快速发展为解析生命科学现象及机制提供了新的解决方案。然而,已被广范应用的单细胞测序技术在解析单个细胞异质性的同时丢失了细胞间的相对空间位置信息^[1]。时空组学技术可以在一个连续空间内检测组织细胞内的遗传分子信号,填补了空间维度检测组学信息能力的空白。时空组学技术将空间标签整合到早期发育细胞内,再在发育后期的多个时间点连续检测带有空间标签的宿主细胞的发育轨迹,进而获得时间维度检测组学信息的能力^[2]。基于检测方案和原理的不同,时空组学技术主体上可以分为两类:基于成像的时空组学技术(表1)和基于测序的时空组学技术(表2)。更进一步,基于成像的时空组学技术,通过在组织原位进行荧光探针杂交后拍照的策略可以称为空间原位杂交技术;通过在组织原位进行核酸扩增后测序的策略可以称为空间原位测序技术。基于测序的时空组学技术,通过对组织进行选定区域分割收集后,提取RNA再进行测序的方案称为显微分割测序技术;通过捕获载体上携带空间标签的捕获探针覆盖其上的组织内的RNA进行原位捕获、逆转录后收集产物扩增测序的方案称为空间原位标签技术^[3]。时空组学技术的空间维度解析能力的发展较为迅速,时间维度检测能力的实现多是基于靶向细胞内的空间标签进行多个时间点的连续读出,目前可应用的技术较少。

时空组学技术的多个维度解析能力包括基因组、表观组、转录组和蛋白组等。当下,空间转录组的技术发展较为迅速,其他单个组学技术和多组学联合使用的发展呈现上升趋势^[4]。对时空转录组数据的使用和分析逐渐成为了该领域研究更为重要的一环^[5]。时空组学技术凭借在时间和空间维度可以深度解析器官、组织和细胞的结构和功能之间的关系,已经在发育生物学^[6]、癌症生物学^[7]、神经科学^[8]和植物学^[9]等领域带来了新的见解。未来时空组学领域的发展方向主要包括三维组学技术,更高分辨率和检测效率,数据批次效

应的优化、大数据的整合分析,以及多组学技术在更多应用场景的使用(包括临床应用)。

1 时空组学技术

当前,在时空组学技术中,空间转录组学的发展非常快,时间维度和其他多组学的技术和应用多在空间转录组学技术的基础上进行拓展。因此,本文主要以实现时空组学检测的六个原理分类:空间原位杂交技术、空间原位测序技术、显微分割测序技术、空间原位标签技术、时间维度解析技术、多组学检测技术为核心进行介绍(图1)。

1.1 空间原位杂交技术

空间原位杂交技术和空间原位测序技术属于基于成像的时空组学技术(表1)。单分子荧光原位杂交(single-molecule fluorescence *in situ* hybridization, smFISH)技术通过对细胞内单个RNA分子的靶向序列进行荧光探针杂交后拍照可以实现空间原位核酸分子的定性和定量分析。smFISH为空间原位杂交技术的快速发展提供了底层逻辑和工作框架,其特点是检测效率高但通量低^[10]。后续基于smFISH的空间原位杂交技术主要在检测信号灵敏性和检测通量即多路复用能力方面进行提升。提高检测信号灵敏性的方式可以通过增加单条靶向RNA上结合的荧光探针数量来提升^[11];也可以通过增加单个靶向RNA区域上结合的读出荧光探针的总数量来增加整体荧光信号值,如利用双“Z”探针^[12]、单分子杂交链式反应^[13]、反复多次smFISH^[14]和多重点击化学^[15]等方式。限制提高检测通量的主要原因是对核酸荧光信号进行原位拍照时产生的光学拥挤,使得空间原位杂交技术难以对大批量核酸同时处理。目前,主要通过光谱组合策略规避光学拥挤带来的通量限制。MERFISH(multiplexed error-robust FISH)在靶向核酸的多轮杂交中引入了二进制编码思路,即使不同的转录本在预设的部分轮次中多次发光,发光轮次的组合编制成二进制密码,进而最终可以识别大量的转录本^[16]。目前,MERFISH已经实现了

表 1 主要基于成像的时空组学技术

技术分类	技术名称	多组学领域	样本	靶向	单细胞分辨率
空间原位杂交技术	smFISH	转录组	细胞、组织切片、纯化的RNA	靶向RNA	是
	bDNA ISH	基因组和转录组	细胞	基因组和RNA	是
	RNAscope	转录组	细胞、FFPE	靶向RNA	是
	seqFISH	转录组	细胞	靶向RNA	是
	MERFISH	转录组	细胞、组织切片	靶向RNA	是
	smHCR	转录组	细胞、新鲜冷冻样本	靶向RNA	是
	RNA SPOTs	转录组	细胞	靶向RNA	是
	IMC	转录组和蛋白组	细胞、FFPE	靶向RNA和蛋白质	是
	MERFISH+ExM	转录组	细胞	靶向RNA	是
	intron seqFISH	转录组	细胞	靶向新生转录本	是
	osmFISH	转录组	新鲜冷冻样本	靶向RNA	是
	ClampFISH	转录组	细胞、新鲜冷冻样本	靶向RNA	是
	RollFISH	转录组	细胞、FFPE	靶向RNA	是
	CODEX	蛋白组	细胞、组织切片	蛋白质	是
	Hi-M	基因组和转录组	细胞、组织切片	靶向基因组和RNA	是
	seqFISH+	转录组	细胞、组织切片	靶向RNA	是
	SABER	基因组和转录组	细胞、组织切片	靶向RNA和ssDNA	是
	DNA Microscopy	基因组和转录组	细胞	非靶向DNA或RNA	是
	MERFISH+3D genomics	基因组和转录组	细胞	靶向基因组和RNA	是
	DNA seqFISH+	基因组	细胞	基因组	是
	EASI-FISH	转录组	组织切片	靶向RNA	是
	MOSAICA	转录组和蛋白组	细胞、FFPE	靶向RNA和蛋白质	是
	CAD-HCR	转录组和蛋白组	细胞	靶向RNA和蛋白质	是
	par-seqFISH	转录组	细胞	靶向RNA	是
空间原位测序技术	EEL FISH	转录组	组织切片	靶向RNA	是
	SMI	转录组和蛋白组	新鲜冷冻样本、FFPE	靶向RNA和蛋白质	是
	Epigenomic MERFISH	表观组	细胞、组织切片	表观组	是
	USeqFISH	转录组	细胞、组织切片	靶向RNA和病毒RNA	是
	ISS	转录组	细胞、组织切片	靶向RNA	是
	FISSEQ	转录组	细胞、组织切片	非靶向RNA	是
	STARmap	转录组	组织切片	靶向RNA	是
	BARseq	转录组	组织切片	靶向RNA/标签RNA	是
	OligoFISSEQ	基因组	细胞、组织切片	基因组	否
	HyBISS	转录组	组织切片	靶向RNA	是
	ExSeq	转录组	细胞、组织切片	非靶向/靶向RNA	是
	IGS	基因组	细胞、组织切片	基因组	是
	BOLORAMIS	转录组	细胞、组织切片	靶向RNA	是
	BARseq2	转录组	细胞、组织切片	靶向RNA/标签RNA	是
	IISS	转录组	新鲜冷冻样本、FFPE	靶向RNA	是
	TEMPOmap	转录组	新鲜冷冻样本、FFPE	新生RNA	是
	electro-seq	转录组	细胞	靶向RNA	是
	RIBOmap	转录组	细胞、组织切片	核糖体结合mRNA	是
	STARmap PLUS	转录组和蛋白组	组织切片	靶向RNA和蛋白质	是

表2 主要基于测序的时空组学技术

技术分类	技术名称	多组学领域	样本	靶向	单细胞分辨率
显微分割 测序技术	TIVA	转录组	细胞、组织切片	全转录本	是
	tomo-seq	转录组	新鲜冷冻样本	全转录本	否
	Geo-seq	转录组	新鲜冷冻样本	全转录本	是
	NICHE-seq	转录组	组织切片	全转录本	是
	GaST-seq	转录组	植物	全转录本	否
	DSP	转录组和蛋白组	新鲜冷冻样本、FFPE	全转录组和靶向蛋白	是
	ZipSeq	转录组	新鲜冷冻样本	全转录本	是
	PIC	转录组	新鲜冷冻样本	全转录本	是
	immuno-LCM-RNAseq	转录组	新鲜冷冻样本	全转录本	是
	PuTi-spots	转录组	FFPE	全转录本	否
	Image-seq	转录组	细胞	全转录本	是
空间原位 标签技术	ST	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA	否
	MASC-seq	转录组	细胞	带poly(A)尾RNA	是
	Visium	转录组	新鲜冷冻样本、FFPE	带poly(A)尾RNA和靶向基因	否
	Slide-seq	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA	否
	APEX-seq	转录组	细胞	全转录本	是
	HDST	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA	否
	DBiT-seq	转录组和蛋白组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA和蛋白质	否
	Slide-seq/V2	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA	否
	XYZeq	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA	是
	Seq-Scope	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA	是
	sci-Space	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA	是
	slide-DNA-seq	基因组	新鲜冷冻样本	基因组	是
	Perturb-map	基因组和转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA和靶向基因	是
	Space-TREX	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA和CloneID	否
	Spatial-CUT&Tag	表观组	新鲜冷冻样本	表观组	否
	SM-Omics	转录组和蛋白组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA和蛋白质	否
	Stereo-seq	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA	是
	Spatial-ATAC-seq	表观组	新鲜冷冻样本	表观组	否
	slide-TCR-seq	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA和T细胞受体基因	否
	STRS	转录组	新鲜冷冻样本	全转录本	否
	Pixel-seq	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA	是
	SPOTS	转录组和蛋白组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA和蛋白质	否
	spatial ATAC	表观组	新鲜冷冻样本	表观组	否
	Spatial-ATAC-RNA-seq	转录组和表观组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA和染色质	否
	spatial-CITE-seq	转录组和蛋白组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA和蛋白质	否
	SiT	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA和长读长RNA	否
	xDBiT	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA	否
	MISAR-seq	转录组和表观组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA和染色质	否
	Ex-ST	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA	否
	SMA	转录组和蛋白组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA和蛋白质	否
	Slide-tags	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA	是
	Stereo-CITE-seq	转录组和蛋白组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA和蛋白质	是
	Visium HD	转录组	新鲜冷冻样本、FFPE	全转录本	是
	Open-ST	转录组	新鲜冷冻样本	带poly(A)尾RNA	是

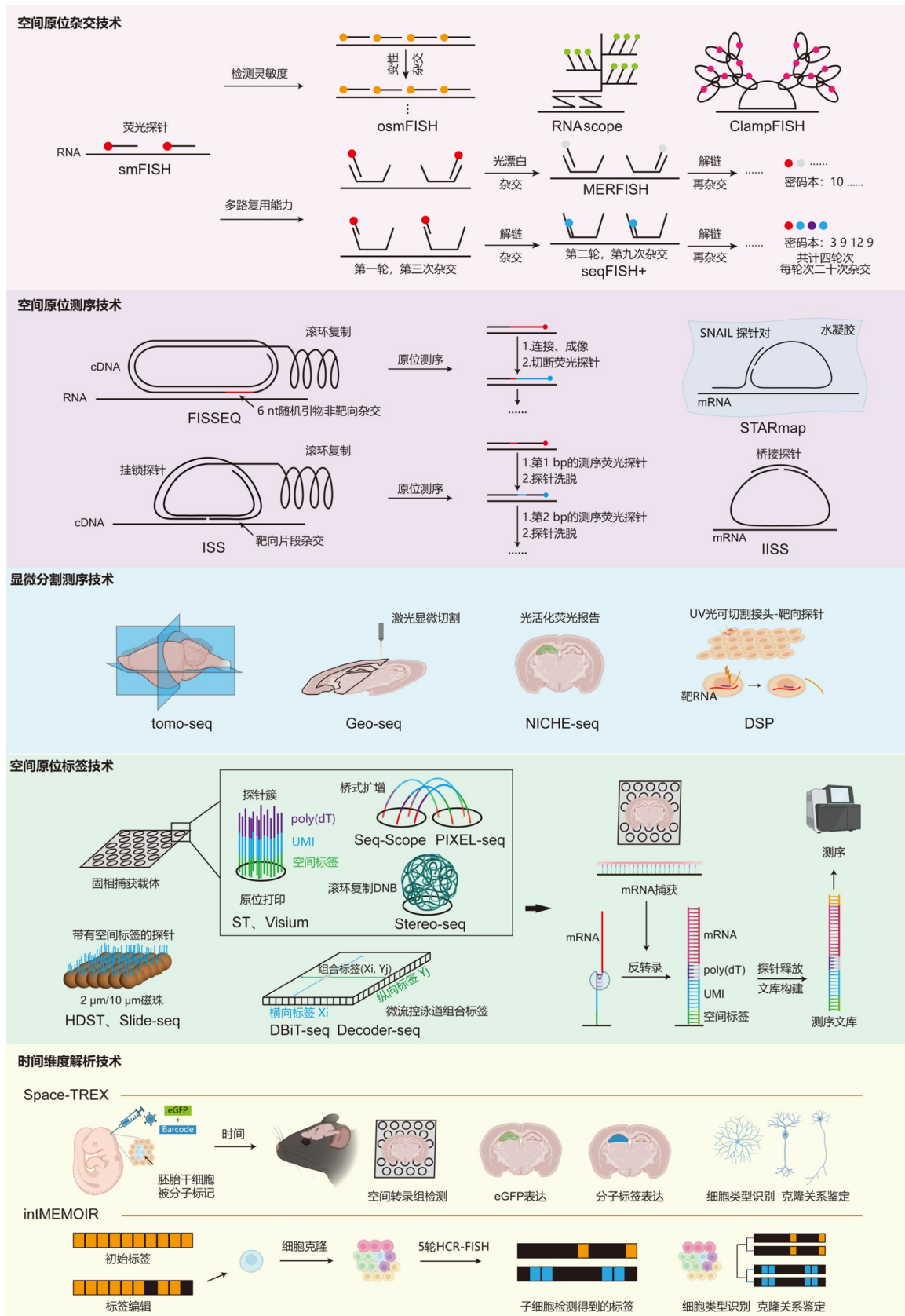


图1 时空组学技术原理

单张组织切片的10 000左右个基因进行检测^[17]。此外, seqFISH(*sequential fluorescence in situ hybridization*)技术^[18], 使每个基因在杂交后被指定一个独特的伪颜色, 在杂交探针被清洗后, 进行反复杂交和拍照。理论上, 4种颜色和8轮扩增的检测池便可以对整个基因组进行编码。RNA SPOTs将检测池的颜色扩展到12个“伪彩色面板”^[19], seqFISH+进一步将其扩展到60种颜色, 通过图像合并和纠错杂交, 最终实现了10 000个基因的同步检测^[20]。

1.2 空间原位测序技术

空间原位测序技术与空间原位杂交技术的区别在于前者最终要在组织切片原位进行核酸序列中的单个或多个碱基的逐一测序工作, 后者是对与靶向核酸序列结合的荧光信号进行拍照识别。实现原位测序和荧光探针杂交检测的方法本质上都是成像, 因此这两种技术都属于基于成像的时空组学技术。

Polony技术提供了对cDNA分子进行原位扩增的环境^[21], FISSEQ(*fluorescent in situ sequencing*)基于Polony原理实现了对cDNA和非靶向RNA的原位测序^[22,23]。由于实现精准的原位测序对荧光信号强度的要求更为严格。因此, 空间原位测序技术的主要提升策略是优化核酸的原位扩增手段, 以及提高原位扩增后核酸聚集体之间的分辨率。ISS(*in situ sequencing*)利用挂锁DNA探针与靶核酸序列结合, 然后进行间隙填充和结扎, 形成完整的圆形结构后进行大量扩增以完成原位测序工作^[24]。IIS(improved *in situ sequencing*)设计了DNA连接探针, 改进了ISS的编码策略和图像分析流程, 提高了信号强度和检测特异性^[25]。STARmap则用“SNAIL”探针简化了ISS的生化反应流程, 并利用水凝胶保持了DNA纳米球的位置和完整性, 增加了原位测序可读空间, 进一步降低了ISS技术的错误率^[26]。水凝胶固定的思路为组织切片空间范围内探针的结合和检测以及更多模态的信息检测技术提供了可靠的基础。Electro-seq(*in situ electrosequencing*)将带有空间标签的网状电极嵌入人工培养的细胞中后, 固定在细胞水凝胶中, 将所记录的电信号与荧光原位测序的信息在原位关联^[27]。同样, 基于水凝胶开发的ExSeq将RNA扩增到

cDNA纳米球中进行非靶向测序, 这种方法展示了在各种组织中实现亚细胞分辨率的前景, 包括小鼠海马神经元、视觉皮层和人类乳腺癌^[28]。

1.3 显微分割测序技术

区别于在组织原位对核酸分子序列进行成像的方案, 基于测序的时空组学技术首先对组织细胞进行区域分割收集或原位捕获RNA后逆转录成cDNA; 然后在非组织原位的环境, 例如收集管中进行测序文库的构建, 再通过二代高通量测序完成检测工作; 最后通过区域分割的位置或者原位捕获探针上携带的空间标签序列还原核酸的空间位置信息。

空间显微分割测序技术基于激光捕获显微切割技术发展而来^[29]。可以在显微镜下选择性地用激光捕获切割组织中的靶向细胞群体, 也可以通过选取目标区域进行物理性的显微切割或添加化学标签后样本分离, 再对靶向的样本进行Bulk测序或单细胞测序。因此, 空间显微切割技术的空间位置信息来源于切割或分离时的位置序列标记, 其空间分辨率也决定于切割精度或者分离精度。空间显微切割技术中, TIVA(*transcriptome in vivo analysis*)技术使用光激活标签靶向活组织中的单个细胞捕获mRNA^[30]; tomo-seq技术将斑马鱼胚胎冷冻切成50-100片薄片, 从各切片中提取RNA测序, 在转录组范围内重建三维空间表达模式^[31]。基于LCM(*laser capture microdissection*)、TIVA、tomo-seq的原理, 空间显微切割技术的发展与应用更加多元。如, Geo-seq(*geographical position sequencing*)通过对单个胚胎特定区域进行激光捕获显微切割采样, 三维空间渲染了超过20 000个基因的空间表达图谱^[32]。利用光激活绿色荧光蛋白标记组织细胞, 结合荧光分选和单细胞测序, 从而达到定位空间生态位细胞组成的NICHE-seq技术^[33]。

1.4 空间原位标签技术

与空间显微切割技术先对区域内的组织或细胞进行分离后再收集测序的方案不同, 空间原位标签技术主要是利用携带空间标签序列的探针原位对细胞内的RNA进行捕获和逆转录, 再对cDNA进行扩增并测序, 并通过测序前后的空间标签序列比对还原每一条RNA的空间位置。因此, 携带空间标签的捕获探针形成的捕获载体的构建是此类

技术的核心, 捕获探针在单位范围内的密度和间距决定了此类技术的捕获效率和空间分辨率。

2016年提出的空间转录组学(spatial transcriptomics, ST)技术, 在载玻片上铺设200 μm 间隔固定直径为100 μm 的带有空间标签的寡核苷酸探针集成捕获载体, 通过探针末端的polyT序列原位捕获组织内通过透化释放出来的包含polyA结构mRNA, 再经过逆转录、探针释放、文库构建和测序, 检测空间探针和转录本序列, 并根据空间标签序列还原转录本的空间位置, 获得基因表达的定性和定量信息^[34]。Slide-seq/V2和HDST (high-definition spatial transcriptomics)技术, 将携带空间标签的捕获探针结合到微磁珠上, 再将微磁珠平铺排列成一个平面形成捕获载体^[35-37]。因此, 单个磁珠的直径决定了空间分辨率, Slide-seq/V2是10 μm , HDST的磁珠直径更小但由于信号密度稀疏还需要组合成更大的区域进行分析。基于微流控技术的DBiT-seq(deterministic barcoding in tissue for spatial omics sequencing)通过在垂直交叉的微流控泳道中分别加入携带空间横坐标和纵坐标的两种探针集, 最终RNA可以携带完整的空间位置信息。微流控泳道直径的物理极限限制了DBiT-seq的分辨率, 其空间分辨率最高为10 μm ^[38]。Stereo-seq(spatial enhanced resolution omics-sequencing)技术通过在测序芯片表面的固定位点上结合携带空间标签和捕获序列的多拷贝DNA纳米球形成捕获芯片, 通过捕获前对整个芯片上的带有空间位置标签的捕获探针以及捕获后所有核酸序列的测序, 通过空间位置标签还原RNA的空间位置^[39]。同理的还有Seq-Scope技术^[40]。有所区别的是为了降低测序成本, PIXEL-seq(polony-indexed library-sequencing)生产可以一次测序, 复制多次使用的捕获芯片, 能较大地节约空间标签测序的成本^[41]。

1.5 时间维度解析技术

当前时空组学技术的时间维度检测主要依靠三种方式实现: 一种是采集不同时间点的样本通过检测、分析遗传分子信息在时间范围内的变化, 完成时间变量的引入; 一种是通过生物体/细胞系的祖细胞或者分化早期的细胞引入特定序列的空间标签, 在随后的分化过程中采集样本进行检

测, 通过空间标签的表达还原宿主细胞的分化、迁移轨迹以及功能行使的改变; 另外一种是通过基因编辑技术对特定细胞内的靶向序列进行重新编辑, 改变其表达的状态, 并在随后的时间内检测其功能效应。例如, Space-TREX技术, 将特定序列的空间标签整合到逆转录病毒核酸序列内, 再将其注射到小鼠胚胎脑区的祖细胞, 随后在发育后的时间点对小鼠大脑进行空间转录组检测, 通过空间标签的比对还原小鼠大脑祖细胞的发育、分化的时间和空间轨迹^[2]。Spatial iTracer通过Cas9 (CRISPR-associated protein 9)系统将空间标签和荧光蛋白序列编辑进入诱导多能性干细胞内, 再使其发育成类器官。通过对类器官切片进行空间转录组检测, 绘制诱导多能性干细胞的分化发育轨迹^[42]。intMEMOIR(integrase-editable memory by engineered mutagenesis with optical *in situ* readout)技术基于整合酶的合成条形码系统编辑引入不可逆的条形码元件, 将其整合到发育早期的胚胎细胞内, 并在成年果蝇大脑中分析其克隆细胞之间的特征, 在时间维度完成对发育事件的解析^[43]。

1.6 时空多组学检测技术

时空组学技术的发展愈发趋向于从单一组学向多组学维度联合使用, 以及从二维组织切片迈向三维组织整体空间的解析。时空多组学中的转录组检测技术促进其他组学技术或者多组学同测序的快速发展。例如, 在转录组学捕获的基础上, MERFISH和seqFISH+通过靶向DNA序列和位点, 通过原位拍照可以检测到细胞内染色质的结构和DNA信息, 实现对基因组学的空间解读^[44,45]。slide-DNA-seq基于磁珠捕获转录本的策略, 将携带空间标签的组织收集后进行核酸打断再实现对DNA序列的识别和扩增^[46]。在表观组学检测领域, Epigenomic MERFISH在原位捕获染色质上的特定表观遗传修饰, 并在修饰位点或附近用T7启动子标记DNA, 对其进行原位转录以生成RNA并通过MERFISH检测实现对组织或细胞内的表观组学的解析^[47]。基于DBiT-seq使用微流控通道的原理, Spatial-CUT&Tag技术首先将靶向组蛋白的抗体添加到组织内, 再结合二抗的Tn5转座体系, 在组蛋白标记抗体识别位点将含有连接子的转接头插入基因组DNA, 最后, 通过对DNA文库的检测完成

对特定表观修饰的检测^[48]。类似的还有spatial-ATAC-seq^[49]、spatial ATAC^[50]以及可以实现ATAC和RNA同测序的Spatial-ATAC-RNA-seq^[51]等。蛋白组检测领域的技术发展相对较为全面，可以对组织内的蛋白进行抗体结合后的成像检测完成蛋白组和转录组的同测序^[52]，也可以通过杂交链式反应检测转录组和蛋白组的表达情况^[53]，还可以通过结合了DNA标签序列的抗体与组织中的蛋白结合后，通过原位捕获DNA标签序列实现对蛋白组和转录组的检测，如spatial-CITE-seq^[54]和StereocITE-seq^[55]。

三维组织学检测的实现方案包括二维组织学检测的连续数据拟合^[56]，或者通过在组织块内部的三维体系内直接检测遗传分子的空间分布和表达，如STARmap PLUS^[57]。Open-ST则开发可以对多张切片进行高精度检测和整合三维数据分析的技术，使三维检测的费用和成本大大降低^[58]。

2 时空组学的分析与算法

时空组学技术正在快速加深对生物学现象的理解，如何深度解析并有效利用时空组学数据成为了更为关键的，也同为制约的一部分。当前，时空组学技术的分析方案主要以不同分辨率尺度下对时空组学数据的分析和解读展开，包括分子水平、细胞水平和区域水平。

2.1 分子水平分析

时空组学通过对遗传分子的精确定位、定性和定量检测，将其空间分布与生物学功能之间建立联系。识别空间高变基因是在分子水平上的重要研究方法，即识别在不同位置存在表达量显著差异的基因^[59]。其在定义组织边界和驱动功能特化方面发挥着重要作用^[60,61]。例如，探索不同基因之间的协同作用，以及与特定细胞类型、区域或功能相关的基因表达特征或基因表达模块。同样也加深了对基因调控网络的研究，为揭示信号和代谢通路中对组织发育、功能和疾病反应至关重要的空间调控相互作用提供了新的视角^[62]。

然而，转录本的捕获效率差异可能会掩盖关键的基因互作关系。基因插补通过统计学方法对表达量进行预测，从而确保对基因表达的空间分布有全面的理解。目前有两种主要的方法：一种是

将单细胞的转录组测序数据映射到空间原位上，而另一种是直接在带有空间信息的表达矩阵中改变基因表达量。对于基于原位成像的时空组学技术，由于无法捕获整个转录组，第一种方案可以实现有效的补充：将单细胞转录组数据映射到一组空间特征基因上^[59]，再应用概率推断^[59]或最优传输理论进行细胞定位^[63]。直接插补则将时空转录组和单细胞转录组数据投射到共有的隐空间中，估算特定空间位置的缺失值。例如，变分推断^[64]和基于马尔可夫相似度的方法^[65,66]能够以统计学上合理的方式插补缺失值。通过上述方法将空间位置信息整合到单细胞多组学数据中，形成时空组学和单细胞组学的协同作用，其有助于更完整和细致地理解基因表达谱的空间分布。

2.2 细胞水平分析

细胞的分割和注释是实现空间单细胞分辨率的关键。因此，亚细胞分辨率的组学信号需要卷积到单个细胞，而多细胞分辨率的信号需要对每个测序位点的混合细胞类型进行分解。基于成像的时空组学技术，细胞染色、成像与分子捕获同时进行，细胞分割通常在染色图像上进行^[67-69]。然而，基于图像的分割方法在高细胞密度数据集中表现欠佳，同时在识别细胞时偏向于细胞核，与完整细胞之间仍有差距。基于测序的时空组学技术，细胞原位成像和RNA分子捕获测序分步进行，这两种模态之间的异步性限制了基于图像的分割方法的应用。

测量邻域构成向量的方法^[70]可以量化不同位置之间基因组成的相似性，为不同类型的时空组学技术提供了普适概念^[71,72]。然而，由于数据稀疏性和背景噪声，该方案在基于成像的时空组学中的实际应用受到了限制。通过transformer模型^[73]确定基因组成相似性的进展可能会在这一领域释放新的潜力。

在多细胞分辨率技术中，首要目的是基于单细胞测序的先验知识推断每个空间测序位点的细胞类型组成。因此，单细胞和时空转录组数据的质量和检测细胞的数量制约着推断的准确性^[74-77]。这些方法基于一个强假设，即单细胞和时空组学之间的技术差异可以通过这些细胞类型去卷积方法来调和。然而，由于细胞类型之间的绝对表达差

异, 往往导致转录本较少的细胞类型(如癌症研究中的T细胞和B细胞)被低估^[75]。此外, 细胞密度是另一个影响性能的生物学因素^[78]。多细胞分辨率下的时空转录组学分析更适合在区域水平进行。

2.3 区域水平分析

细胞行为, 如发育轨迹和组织微环境形成, 形成了空间域的概念, 代表空间组织和功能不同的解剖结构。这种生物学现象类似于自然图像中观察到的原理, 即相邻像素倾向于具有相似的值。在基因表达空间和物理空间中寻找邻域的算法在很大程度上还原了这一现象^[79,80]。例如, 有方法用图神经网络整合苏木精-伊红染色的组织图像和解剖特征, 以提高空间域识别的性能^[81-83]。然而, 因为大多数算法^[81,82,84-88]使用来自人类背外侧前额叶皮层的12个切片数据^[89]来验证其性能, 这一领域存在显著的过拟合问题。因此, 扩大数据库以涵盖多样化的生物学数据, 并重新验证这些算法的泛用能力已成为迫切的需求。

超越了仅验证配体-受体推断的空间邻近关系, 时空组学为研究组织微环境开辟了新途径。这一领域正在迅速发展, 不断开发新的创新策略, 旨在揭示更复杂的细胞通信。其中值得注意的是探索多对配体-受体网络^[90]和分析细胞-细胞依赖性^[91]的方法。其中, 后者涉及基于其邻近细胞的表达谱预测目标细胞的表达谱^[92]。然而, 这一方法仅在特定的空间生态位内有效。此外, 新算法正在拓展细胞间相互作用研究的视野, 从局部生态位视角过渡到更全面的组织水平视角^[92]。当前细胞通信的研究越来越多地整合多细胞模式的空间编程, 其重点在于组织微环境的工程组装^[93]。这种研究方法的进步是朝着更深入理解不同空间背景下细胞相互作用复杂性的重要一步, 对疾病发病机制的突破性发现、改进组织工程和充分的疾病建模具有重要潜力^[94]。

3 时空组学的应用现状

受精卵的发育、癌症的发生等重大生命过程的调控机制存在时间和空间维度等的复杂协同性。时空组学技术可以在多个时间点和连续空间上检测组织细胞内基因的定性和定量表达以及进一步

挖掘时空调控特征, 填补了组学技术中空间信息规模化解析的空白, 迅速成为认识复杂生命活动的重要前沿视角。当前, 时空组学已经为发育生物学、癌症生物学、神经科学和植物学等重要领域带来新的认知和发现(图2)。

3.1 发育生物学

在生物体的发育早期, 细胞会根据其在胚胎中的位置接受特定的信号并在特殊的位置发挥特定的功能, 最终决定细胞和生物体的发育和命运轨迹, 完成组织和器官的发育。在这个过程中, 细胞所处的空间位置的相对性起到了命运调控的作用, 因此从时间和空间双重维度揭示组织细胞结构和功能的联系更为直接和重要^[95]。

首先, 绘制生物体发育系统性的时空发育细胞图谱可以为研究领域提供底层数据支持并促进一些新的发现和理论。Fawcner-Corbett等^[96]绘制了人类肠道发育的单细胞分辨率的时空图谱并描述了不同细胞区室及其祖细胞的发育起源图, 检测到了成纤维细胞在不同结构空间中分布及其功能多样性。Asp等^[97]绘制了人类心脏发育时空全景图谱, 揭示了心脏发育过程的基因表达模式。

其次, 在发育过程中, 存在来自于相同祖细胞的细胞类型或亚型在不同的结构中发挥相似或不同的功能。如何检测到此类的细胞类型表达模式尤为关键, 时空组学提供了很好的视角。Zhang等^[98]在肢体发育的过程中发现了转录组谱相似的三种成纤维细胞亚型(DermFiB, F10⁺ DermFiBP和HOXC5⁺ DermFiBP)分布在不同的空间位置。Fu等^[99]在小鼠胎盘发育的过程中鉴定出分布在迷宫区和交界区的两种糖原细胞亚型。

此外, 横向比较各个物种发育过程中的基因时空和空间表达谱, 挖掘进化保守性和多样性^[100], 对人造类胚胎、类器官或蝶螈等具有再生能力的模式生物等再生医学模型进行分子机理层面的研究, 可以为人类再生医学和临床研究提供机理层面的指导^[101,102]。

3.2 癌症生物学

癌症发生和进展的机理多样且复杂, 近些年聚焦在肿瘤细胞差异和肿瘤微环境方向上的研究逐渐加深了癌症发生和发展机理、肿瘤异质性以及治疗预后差异性的认知^[103]。基于空间表达特征可

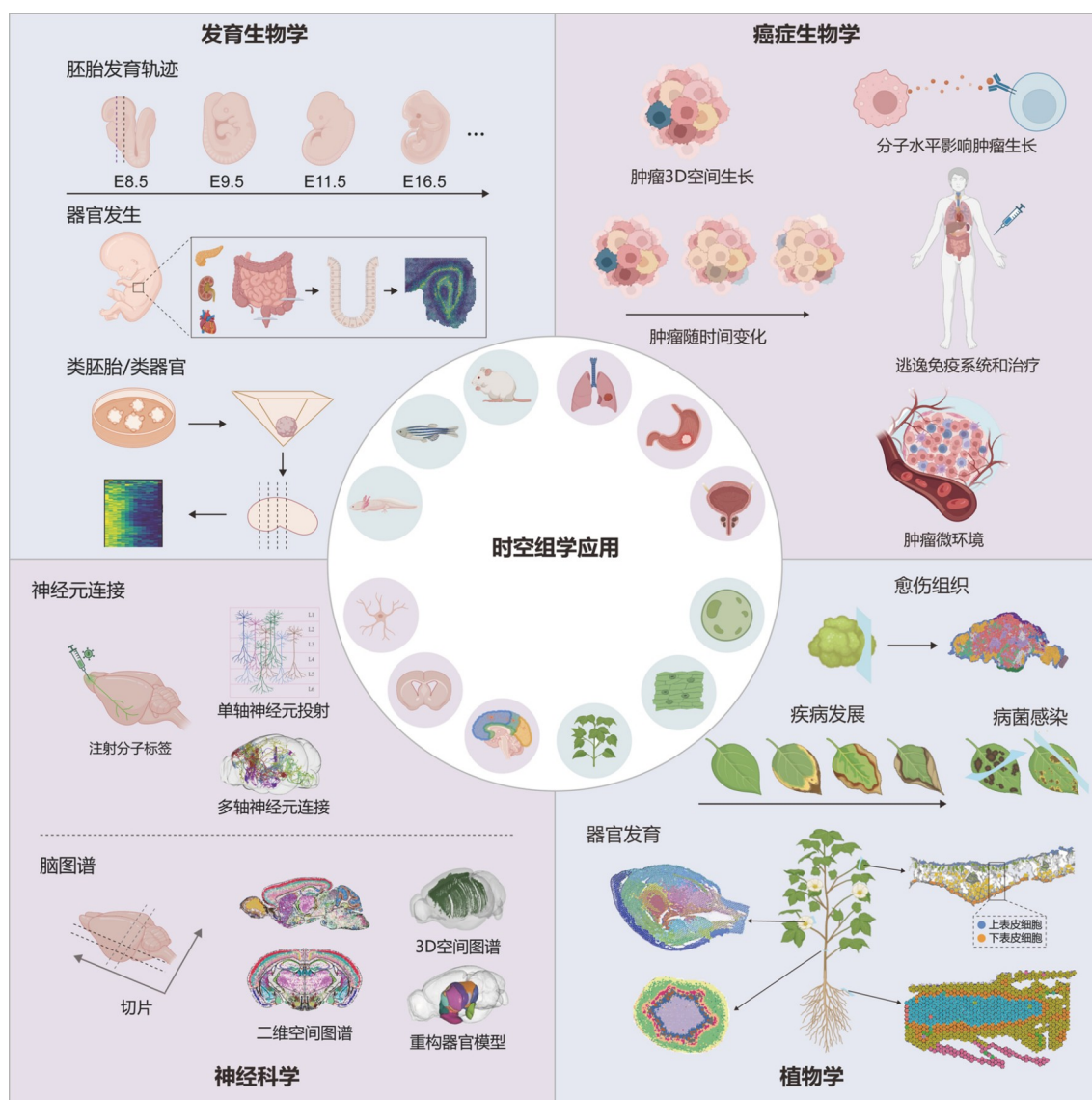


图2 时空组学的应用

以鉴定一些新的肿瘤细胞。Ji等^[104]鉴定了一种癌症特有的肿瘤特异性角质形成细胞群。该细胞群定位于纤维血管微环境。组织病理学判断是肿瘤细胞恶性程度空间分布鉴别的主要手段，时空组学很好地实现了从组织学过渡到分子识别的水平。Erickson等^[105]揭示了肿瘤内和附近良性组织中不同的克隆模式，说明了基因组不稳定性如何在组织学良性组织中出现。肿瘤微环境里不同细胞类型间的空间互作影响癌症的病理性进程，时空组学可以在切片范围内直接检测肿瘤微环境的不同细胞类型的表达特征和细胞间直接通讯，以认知肿瘤环境的塑造偏好性。Ravi等^[106]发现了胶质母细

胞瘤微环境中的T细胞功能障碍是由髓系细胞释放白细胞介素10介导的。Wu等^[107]鉴定了人类肝癌侵袭性区域促进肝细胞-肿瘤细胞串扰、局部免疫抑制和肿瘤进展。Wu等^[108]对人类乳腺癌样本检测后发现，基质免疫微环境在肿瘤中按空间排列，为抗肿瘤免疫调节提供了见解。

3.3 神经科学

在神经科学领域，时空组学可以在脑结构的解析、神经系统疾病的特征分析和分子标志物发掘、神经系统环路研究等领域提供有力的解读视角。借助时空组学技术能够还原转录本空间位置背景映射的优势，联合Allen脑图谱解剖学和分子结构

的权威数据库, 脑组织对应结构和脑区中的分子研究得到了史无前例的推进和加速。Di Bella等^[109]揭示了小鼠大脑皮层细胞多样化的分子逻辑。Fang等^[110]描述了人类和小鼠皮层细胞组织的保守性和分化性。Booeshaghi等^[111]检测到了小鼠初级运动皮层同种型细胞类型特异性。Chen等^[112]确定了食蟹猴皮层区域细胞的种类和空间分布特征, 并绘制了食蟹猴皮层的完整3D单细胞图谱。

神经退行性疾病中, 时空组学技术可以有利的探索疾病发生和发展过程中病变区域内的空间细胞通讯和互作。Maniatis等^[113]确定了小鼠肌萎缩侧索硬化症模型和死后人类肌萎缩侧索硬化症脊髓不同区域在疾病过程中的转录组变化。根据基因表达的变化, 他们确定了与疾病相关的途径, 并确定了肌萎缩侧索硬化症中观察到的运动神经元退化的关键步骤。Chen等^[114]研究了阿尔兹海默症小鼠模型中发生在淀粉样斑块周围直径100 μm 内的组织域中的转录变化, 展示了富含髓鞘和少突胶质细胞的基因共表达网络的早期改变, 而涉及补体系统、氧化应激、溶酶体和炎症的斑块诱导基因的多细胞基因共表达网络在疾病的后期阶段很突出。

3.4 植物学

在植物学研究中, 细胞壁结构阻碍了传统的单细胞测序技术的大规模应用。空间组学技术可以通过切片直接进行对整个组织切片进行检测, 很好地避免了技术应用限制, 同时提供了在时空维度检测的优势, 为植物的生长发育以及特定器官的功能行使机制研究提供了新的策略。

Xia等^[115]成功检测到了拟南芥叶片真正的单细胞空间转录组谱, 并成功区分了上下表皮细胞之间细微但重要的转录组差异。Du等^[116]利用空间转录组的优势成功揭示了杨树茎的次生维管组织中两种类型的分生细胞池。Li等^[117]绘制了分析揭示树木初生和次生生长中形成层分化的动态分子图。Liu等^[118]组建了兰花发育过程中器官发生的时空图谱。

由于植物组织和细胞存在一定的异质性和结构的特殊性, 时空组学技术在不同植物组织器官中的应用还需要进行一些探索和优化。

4 挑战与展望

当前, 多种时空组学正在快速为生命科学的诸多研究领域带来新的解读视角。然而, 如何选择合适的技术进行针对性的研究就成为了进一步的评估重点。当前, 对时空组学技术的评估主要从以下几个方面进行: 空间分辨率、检测效率、分子信号扩散程度和捕获面积。基于拍照的时空组学技术多具有亚细胞/单细胞的空间分辨率, 但基于测序的时空组学技术大部分不具有单细胞的空间识别能力, 如Visium、HDST等, 其中Stereo-seq、SeqScope和PIXEL-seq可以利用细胞分割完成空间单细胞分辨率检测^[119]。未来如何从技术原理以及算法分析上将空间识别分辨率提高到单细胞水平, 以加深领域理解以及统一时空组学数据分析规范性愈发重要。检测效率通常评估在不同细胞内相同基因的检测水平。现在在基于测序的时空组学技术中主要以单位面积或者单个细胞范围内检测到的细胞数为主, 如Stereo-seq可以在小鼠胚胎单个细胞中检测到792个基因, 已经展示出相对良好的捕获能力, 但与单细胞测序相比仍有较大的提升空间^[39]。分子信号扩散程度的评估通常是指在固定区域内特定基因信号的横向分散水平, 大多数技术通常表现较好, 但呈现出不同技术在不同组织中的表现不同的特点^[120]。现有技术在捕获面积方面表现的都不是特别突出, 基于拍照的时空组学技术通常只能覆盖切片或者细胞内几百个基因的范围, 基于测序的时空组学技术相对表现较好, 如Visium可以检测边长为6.5 mm的正方形区域^[89], Stereo-seq最大的检测面积目前已经实现了5 cm和3 cm矩形范围内的检测^[112]。提供更大的捕获面积有助于大面积组织的研究。另一个关键方向是三维组织信息的检测和数据分析。当前, 可以直接进行三维组织检测的技术仍然较少, 多是通过多张切片拟合成三维结构。Open-ST技术为该领域的发展提供了很好的方向^[58]。

时空组学数据的大规模爆发为数据分析带来了前所未有的挑战和难度, 因此如何高效、快速的针对大批量数据进行生物信息学挖掘阐明生物学机理是未来发展关键。最后, 时空组学已经展示出在多个研究领域的革新潜力, 然而一些特殊的

研究领域或者样本仍然存在技术限制。未来时空组学要突破技术和分析能力的有限性,在全面的生命科学研究领域建立底层解决方案,并在临床应用方面展示有力的应用潜能。

参考文献

- [1] Wen L, Tang F. Recent advances in single-cell sequencing technologies. *Precision Clin Med*, 2022, 5(1): pbac002
- [2] Ratz M, von Berlin L, Larsson L, et al. Clonal relations in the mouse brain revealed by single-cell and spatial transcriptomics. *Nat Neurosci*, 2022, 25(3): 285-294
- [3] Bressan D, Battistoni G, Hannon GJ. The dawn of spatial omics. *Science*, 2023, 381(6657): eabq4964
- [4] Schueder F, Bewersdorf J. Omics goes spatial epigenomics. *Cell*, 2022, 185(23): 4253-4255
- [5] Zormpas E, Queen R, Comber A, et al. Mapping the transcriptome: realizing the full potential of spatial data analysis. *Cell*, 2023, 186(26): 5677-5689
- [6] Cheng M, Jiang Y, Xu J, et al. Spatially resolved transcriptomics: a comprehensive review of their technological advances, applications, and challenges. *J Genet Genomics*, 2023, 50(9): 625-640
- [7] Nerurkar SN, Goh D, Cheung CCL, et al. Transcriptional spatial profiling of cancer tissues in the era of immunotherapy: the potential and promise. *Cancers*, 2020, 12(9): 2572
- [8] Asp M, Bergenstr hle J, Lundeberg J. Spatially resolved transcriptomes—next generation tools for tissue exploration. *Bioessays*, 2020, 42(10): e1900221
- [9] Yin R, Xia K, Xu X. Spatial transcriptomics drives a new era in plant research. *Plant J*, 2023, 116(6): 1571-1581
- [10] Femino AM, Fay FS, Fogarty K, et al. Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science*, 1998, 280(5363): 585-590
- [11] Raj A, van den Bogaard P, Rifkin SA, et al. Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nat Methods*, 2008, 5(10): 877-879
- [12] Wang F, Flanagan J, Su N, et al. RNAscope. *J Mol Diagnostics*, 2012, 14(1): 22-29
- [13] 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(15): 2862-2867
- [14] Codeluppi S, Borm LE, Zeisel A, et al. Spatial organization of the somatosensory cortex revealed by osmFISH. *Nat Methods*, 2018, 15(11): 932-935
- [15] Rouhanifard SH, Mellis IA, Dunagin M, et al. Clamp-FISH detects individual nucleic acid molecules using click chemistry-based amplification. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(1): 84-89
- [16] Chen KH, Boettiger AN, Moffitt JR, et al. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science*, 2015, 348(6233): aaa6090
- [17] Xia C, Fan J, Emanuel G, et al. Spatial transcriptome profiling by MERFISH reveals subcellular RNA compartmentalization and cell cycle-dependent gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(39): 19490-19499
- [18] Lubeck E, Cai L. Single-cell systems biology by super-resolution imaging and combinatorial labeling. *Nat Methods*, 2012, 9(7): 743-748
- [19] Eng CHL, Shah S, Thomassie J, et al. Profiling the transcriptome with RNA spots. *Nat Methods*, 2017, 14(12): 1153-1155
- [20] Eng CHL, Lawson M, Zhu Q, et al. Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH⁺. *Nature*, 2019, 568(7751): 235-239
- [21] Mitra R. *In situ* localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(24): 34e-34
- [22] Mitra RD, Butty VL, Shendure J, et al. Digital genotyping and haplotyping with polymerase colonies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(10): 5926-5931
- [23] Lee JH, Daugharthy ER, Scheiman J, et al. Highly multiplexed subcellular RNA sequencing *in situ*. *Science*, 2014, 343(6177): 1360-1363
- [24] Ke R, Mignardi M, Pacureanu A, et al. In situ sequencing for RNA analysis in preserved tissue and cells. *Nat Methods*, 2013, 10(9): 857-860
- [25] Tang X, Chen J, Zhang X, et al. Improved in situ sequencing for high-resolution targeted spatial transcriptomic analysis in tissue sections. *J Genet Genomics*, 2023, 50(9): 652-660
- [26] Wang X, Allen WE, Wright MA, et al. Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science*, 2018, 361(6400): eaat5691
- [27] Li Q, Lin Z, Liu R, et al. Multimodal charting of molecular and functional cell states via in situ electrosequencing. *Cell*, 2023, 186(9): 2002-2017
- [28] Alon S, Goodwin DR, Sinha A, et al. Expansion sequencing: spatially precise in situ transcriptomics in intact biological systems. *Science*, 2021, 371(6528): eaax2656
- [29] Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser capture microdissection. *Science*, 1996, 274(5289): 998-1001
- [30] Lovatt D, Ruble BK, Lee J, et al. Transcriptome *in vivo* analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods*, 2014, 11(2): 190-196
- [31] Junker JP, No l ES, Guryev V, et al. Genome-wide RNA

- tomography in the zebrafish embryo. *Cell*, 2014, 159(3): 662-675
- [32] Peng G, Suo S, Chen J, et al. Spatial transcriptome for the molecular annotation of lineage fates and cell identity in mid-gastrula mouse embryo. *Dev Cell*, 2020, 55(6): 802-804
- [33] Medaglia C, Giladi A, Stoler-Barak L, et al. Spatial reconstruction of immune niches by combining photo-activatable reporters and scRNA-seq. *Science*, 2017, 358(6370): 1622-1626
- [34] Ståhl PL, Salmén F, Vickovic S, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*, 2016, 353(6294): 78-82
- [35] Rodrigues SG, Stickels RR, Goeva A, et al. Slide-seq: a scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution. *Science*, 2019, 363(6434): 1463-1467
- [36] Stickels RR, Murray E, Kumar P, et al. Highly sensitive spatial transcriptomics at near-cellular resolution with Slide-seqV2. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(3): 313-319
- [37] Vickovic S, Eraslan G, Salmén F, et al. High-definition spatial transcriptomics for *in situ* tissue profiling. *Nat Methods*, 2019, 16(10): 987-990
- [38] Liu Y, Yang M, Deng Y, et al. High-spatial-resolution multi-omics sequencing via deterministic barcoding in tissue. *Cell*, 2020, 183(6): 1665-1681
- [39] Chen A, Liao S, Cheng M, et al. Spatiotemporal transcriptomic atlas of mouse organogenesis using DNA nanoball-patterned arrays. *Cell*, 2022, 185(10): 1777-1792
- [40] Cho CS, Xi J, Si Y, et al. Microscopic examination of spatial transcriptome using Seq-Scope. *Cell*, 2021, 184(13): 3559-3572.e22
- [41] Fu X, Sun L, Dong R, et al. Polony gels enable amplifiable DNA stamping and spatial transcriptomics of chronic pain. *Cell*, 2022, 185(24): 4621-4633.e17
- [42] He Z, Maynard A, Jain A, et al. Lineage recording in human cerebral organoids. *Nat Methods*, 2022, 19(1): 90-99
- [43] Chow KHK, Budde MW, Granados AA, et al. Imaging cell lineage with a synthetic digital recording system. *Science*, 2021, 372(6538): eabb3099
- [44] Su JH, Zheng P, Kinrot SS, et al. Genome-scale imaging of the 3D organization and transcriptional activity of chromatin. *Cell*, 2020, 182(6): 1641-1659
- [45] Takei Y, Yun J, Zheng S, et al. Integrated spatial genomics reveals global architecture of single nuclei. *Nature*, 2021, 590(7845): 344-350
- [46] Zhao T, Chiang ZD, Morriss JW, et al. Spatial genomics enables multi-modal study of clonal heterogeneity in tissues. *Nature*, 2022, 601(7891): 85-91
- [47] Lu T, Ang CE, Zhuang X. Spatially resolved epigenomic profiling of single cells in complex tissues. *Cell*, 2023, 186(10): 2275-2279
- [48] Deng Y, Bartosovic M, Kukanja P, et al. Spatial-CUT&Tag: spatially resolved chromatin modification profiling at the cellular level. *Science*, 2022, 375(6581): 681-686
- [49] Deng Y, Bartosovic M, Ma S, et al. Spatial profiling of chromatin accessibility in mouse and human tissues. *Nature*, 2022, 609(7926): 375-383
- [50] Llorens-Bobadilla E, Zamboni M, Marklund M, et al. Solid-phase capture and profiling of open chromatin by spatial ATAC. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(8): 1085-1088
- [51] 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(7): 1048-1057
- [52] 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,
- [53] Liu X, Mao D, Song Y, et al. Computer-aided design of reversible hybridization chain reaction (CAD-HCR) enables multiplexed single-cell spatial proteomics imaging. *Sci Adv*, 2022, 8(2): eabk0133
- [54] Liu Y, DiStasio M, Su G, et al. High-plex protein and whole transcriptome co-mapping at cellular resolution with spatial CITE-seq. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(10): 1405-1409
- [55] Liao S, Heng Y, Liu W, et al. Integrated spatial transcriptomic and proteomic analysis of fresh frozen tissue based on Stereo-seq. *bioRxiv*, 2023. doi: 10.1101/2023.04.28.538364
- [56] Wang M, Hu Q, Lv T, et al. High-resolution 3D spatiotemporal transcriptomic maps of developing *Drosophila* embryos and larvae. *Dev Cell*, 2022, 57(10): 1271-1283
- [57] Shi H, He Y, Zhou Y, et al. Spatial atlas of the mouse central nervous system at molecular resolution. *Nature*, 2023, 622(7983): 552-561
- [58] Schott M, León-Periñán D, Splendiani E, et al. Open-ST: High-resolution spatial transcriptomics in 3D. *Cell*, 2024, 187(15): 3953-3972
- [59] Satija R, Farrell JA, Gennert D, et al. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 495-502
- [60] Sun S, Zhu J, Zhou X. Statistical analysis of spatial expression patterns for spatially resolved transcriptomic studies. *Nat Methods*, 2020, 17(2): 193-200

- [61] Svensson V, Teichmann SA, Stegle O. SpatialDE: identification of spatially variable genes. *Nat Methods*, 2018, 15(5): 343-346
- [62] Yuan Y, Bar-Joseph Z. GCNG: Graph convolutional networks for inferring gene interaction from spatial transcriptomics data. *Genome Biol*, 2020, 21(1): 300
- [63] Nitzan M, Karaïskos N, Friedman N, et al. Gene expression cartography. *Nature*, 2019, 576(7785): 132-137
- [64] Lopez R, Langevin M, Samaran J, et al. A joint model of unpaired data from scRNA-seq and spatial transcriptomics for imputing missing gene expression measurements. *arXiv*, 2019. doi: 10.48550/arXiv.1905.02269
- [65] van Dijk D, Sharma R, Nainys J, et al. Recovering gene interactions from single-cell data using data diffusion. *Cell*, 2018, 174(3): 716-729
- [66] Kuchroo M, Miyagishima DF, Steach HR, et al. spARC recovers human glioma spatial signaling networks with graph filtering. *bioRxiv*, 2022. doi: 10.1101/2022.08.24.505139
- [67] Bannon D, Moen E, Schwartz M, et al. DeepCell Kiosk: scaling deep learning-enabled cellular image analysis with Kubernetes. *Nat Methods*, 2021, 18(1): 43-45
- [68] Stringer C, Wang T, Michaelos M, et al. Cellpose: A generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat Methods*, 2021, 18(1): 100-106
- [69] Schmidt U, Weigert M, Broaddus C, et al. Cell detection with star-convex polygons. *arXiv*, 2018. doi: 10.48550/arXiv.1806.03535
- [70] Petukhov V, Xu RJ, Soldatov RA, et al. Cell segmentation in imaging-based spatial transcriptomics. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(3): 345-354
- [71] He Y, Tang X, Huang J, et al. ClusterMap for multi-scale clustering analysis of spatial gene expression. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5909
- [72] Park J, Choi W, Tiesmeyer S, et al. Cell segmentation-free inference of cell types from in situ transcriptomics data. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3545
- [73] Chen H, Li D, Bar-Joseph Z. SCS: Cell segmentation for high-resolution spatial transcriptomics. *Nat Methods*, 2023, 20(8): 1237-1243
- [74] Biancalani T, Scalia G, Buffoni L, et al. Deep learning and alignment of spatially resolved single-cell transcriptomes with Tangram. *Nat Methods*, 2021, 18(11): 1352-1362
- [75] Cable DM, Murray E, Zou LS, et al. Robust decomposition of cell type mixtures in spatial transcriptomics. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(4): 517-526
- [76] Elosua-Bayes M, Nieto P, Mereu E, et al. SPOTlight: seeded NMF regression to deconvolute spatial transcriptomics spots with single-cell transcriptomes. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(9): e50
- [77] Kleshchevnikov V, Shmatko A, Dann E, et al. Cell2location maps fine-grained cell types in spatial transcriptomics. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(5): 661-671
- [78] Saiselet M, Rodrigues-Vitória J, Tourneur A, et al. Transcriptional output, cell-type densities, and normalization in spatial transcriptomics. *J Mol Cell Biol*, 2020, 12(11): 906-908
- [79] Shang L, Zhou X. Spatially aware dimension reduction for spatial transcriptomics. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7203
- [80] Townes FW, Engelhardt BE. Nonnegative spatial factorization applied to spatial genomics. *Nat Methods*, 2023, 20(2): 229-238
- [81] Dong K, Zhang S. Deciphering spatial domains from spatially resolved transcriptomics with an adaptive graph attention auto-encoder. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1739
- [82] Hu J, Li X, Coleman K, et al. SpaGCN: Integrating gene expression, spatial location and histology to identify spatial domains and spatially variable genes by graph convolutional network. *Nat Methods*, 2021, 18(11): 1342-1351
- [83] Pham D, Tan X, Balderson B, et al. Robust mapping of spatiotemporal trajectories and cell-cell interactions in healthy and diseased tissues. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 7739
- [84] Li Z, Zhou X. BASS: Multi-scale and multi-sample analysis enables accurate cell type clustering and spatial domain detection in spatial transcriptomic studies. *Genome Biol*, 2022, 23(1): 168
- [85] Long Y, Ang KS, Li M, et al. Spatially informed clustering, integration, and deconvolution of spatial transcriptomics with GraphST. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1155
- [86] Ren H, Walker BL, Cang Z, et al. Identifying multicellular spatiotemporal organization of cells with SpaceFlow. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4076
- [87] Varrone M, Tavernari D, Santamaria-Martínez A, et al. CellCharter reveals spatial cell niches associated with tissue remodeling and cell plasticity. *Nat Genet*, 2024, 56(1): 74-84
- [88] Xu C, Jin X, Wei S, et al. DeepST: identifying spatial domains in spatial transcriptomics by deep learning. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(22): e131
- [89] Maynard KR, Collado-Torres L, Weber LM, et al. Transcriptome-scale spatial gene expression in the human dorsolateral prefrontal cortex. *Nat Neurosci*, 2021, 24(3): 425-436
- [90] Cang Z, Zhao Y, Almet AA, et al. Screening cell-cell communication in spatial transcriptomics via collective optimal transport. *Nat Methods*, 2023, 20(2): 218-228
- [91] Fischer DS, Schaar AC, Theis FJ. Modeling intercellular communication in tissues using spatial graphs of cells.

- Nat Biotechnol*, 2023, 41(3): 332-336
- [92] Tanevski J, Flores ROR, Gabor A, et al. Explainable multiview framework for dissecting spatial relationships from highly multiplexed data. *Genome Biol*, 2022, 23(1): 97
- [93] Jerby-Arnon L, Regev A. DIALOGUE maps multi-cellular programs in tissue from single-cell or spatial transcriptomics data. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(10): 1467-1477
- [94] Kuppe C, Ramirez Flores RO, Li Z, et al. Spatial multi-omic map of human myocardial infarction. *Nature*, 2022, 608(7924): 766-777
- [95] Long X, Yuan X, Du J. Single-cell and spatial transcriptomics: advances in heart development and disease applications. *Comput Struct Biotechnol J*, 2023, 21: 2717-2731
- [96] Fawcner-Corbett D, Antanaviciute A, Parikh K, et al. Spatiotemporal analysis of human intestinal development at single-cell resolution. *Cell*, 2021, 184(3): 810-826
- [97] Asp M, Giacomello S, Larsson L, et al. A spatiotemporal organ-wide gene expression and cell atlas of the developing human heart. *Cell*, 2019, 179(7): 1647-1660
- [98] Zhang B, He P, Lawrence JEG, et al. A human embryonic limb cell atlas resolved in space and time. *Nature*, 2023. doi: 10.1038/s41586-023-06806-x
- [99] Fu Y, Zeng X, Liu Y, et al. Spatiotemporally resolved transcriptome atlas of developing mouse placenta reveals mechanisms of embryonic lethality. *bioRxiv*, 2024. doi: 10.1101/2024.05.28.596242
- [100] Guillems M, Bonnardel J, Haest B, et al. Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches. *Cell*, 2022, 185(2): 379-396
- [101] Wei X, Fu S, Li H, et al. Single-cell Stereo-seq reveals induced progenitor cells involved in axolotl brain regeneration. *Science*, 2022, 377(6610): eabp9444
- [102] van den Brink SC, Alemany A, van Batenburg V, et al. Single-cell and spatial transcriptomics reveal somitogenesis in gastruloids. *Nature*, 2020, 582(7812): 405-409
- [103] Wang Q, Zhi Y, Zi M, et al. Spatially resolved transcriptomics technology facilitates cancer research. *Adv Sci*, 2023, 10(30): e2302558
- [104] Ji AL, Rubin AJ, Thrane K, et al. Multimodal analysis of composition and spatial architecture in human squamous cell carcinoma. *Cell*, 2020, 182(2): 497-514
- [105] Erickson A, He M, Berglund E, et al. Spatially resolved clonal copy number alterations in benign and malignant tissue. *Nature*, 2022, 608(7922): 360-367
- [106] Ravi VM, Neidert N, Will P, et al. T-cell dysfunction in the glioblastoma microenvironment is mediated by myeloid cells releasing interleukin-10. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 925
- [107] Wu L, Yan J, Bai Y, et al. An invasive zone in human liver cancer identified by Stereo-seq promotes hepatocyte-tumor cell crosstalk, local immunosuppression and tumor progression. *Cell Res*, 2023, 33(8): 585-603
- [108] Wu SZ, Al-Eryani G, Roden DL, et al. A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers. *Nat Genet*, 2021, 53(9): 1334-1347
- [109] Di Bella DJ, Habibi E, Stickels RR, et al. Molecular logic of cellular diversification in the mouse cerebral cortex. *Nature*, 2021, 595(7868): 554-559
- [110] Fang R, Xia C, Close JL, et al. Conservation and divergence of cortical cell organization in human and mouse revealed by MERFISH. *Science*, 2022, 377(6601): 56-62
- [111] Boeshaghi AS, Yao Z, van Velthoven C, et al. Isoform cell-type specificity in the mouse primary motor cortex. *Nature*, 2021, 598(7879): 195-199
- [112] Chen A, Sun Y, Lei Y, et al. Single-cell spatial transcriptome reveals cell-type organization in the macaque cortex. *Cell*, 2023, 186(17): 3726-3743
- [113] Maniatis S, Äijö T, Vickovic S, et al. Spatiotemporal dynamics of molecular pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 2019, 364(6435): 89-93
- [114] Chen WT, Lu A, Craessaerts K, et al. Spatial transcriptomics and in situ sequencing to study Alzheimer's disease. *Cell*, 2020, 182(4): 976-991
- [115] Xia K, Sun HX, Li J, et al. The single-cell stereo-seq reveals region-specific cell subtypes and transcriptome profiling in Arabidopsis leaves. *Dev Cell*, 2022, 57(10): 1299-1310
- [116] Du J, Wang Y, Chen W, et al. High-resolution anatomical and spatial transcriptome analyses reveal two types of meristematic cell pools within the secondary vascular tissue of poplar stem. *Mol Plant*, 2023, 16(5): 809-828
- [117] Li R, Wang Z, Wang JW, et al. Combining single-cell RNA sequencing with spatial transcriptome analysis reveals dynamic molecular maps of cambium differentiation in the primary and secondary growth of trees. *Plant Commun*, 2023, 4(5): 100665
- [118] Liu C, Leng J, Li Y, et al. A spatiotemporal atlas of organogenesis in the development of orchid flowers. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(17): 9724-9737
- [119] Moses L, Pachter L. Museum of spatial transcriptomics. *Nat Methods*, 2022, 19(5): 534-546
- [120] You Y, Fu Y, Li L, et al. Systematic comparison of sequencing-based spatial transcriptomic methods. *Nat Methods*, 2024, 21(9): 1743-1754