果蝇大脑三维建模与分析以量化神经性状

Quantitatively Analyzing Morphological Phenotypes of Neurons and Neuropils through Three-dimensional Reconstruction of *Drosophila* Brains

蔡国鼎[#], 刘南甫[#], 周雅惠^{*}

细胞与个体生物化学研究所, 中央研究院, 台北, 台湾

*通讯作者邮箱: yhchou@gate.sinica.edu.tw

[#]共同第一作者

引用格式: 蔡国鼎, 刘南甫, 周雅惠. (2019). 果蝇大脑三维建模与分析以量化神经性状. *Bio-101* e1010290. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010290.

How to cite: Tsai, K. T., Liou, N. F. and Chou, Y. H. (2019). Quantitatively analyzing morphological phenotypes of neurons and neuropils through three-dimensional reconstruction of *Drosophila* brains. *Bio-101* e1010290. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010290. (in Chinese)

摘要: 本研究方法是使用软件 Imaris 建立果蝇脑区 (neuropil) 的三维模型, 再根据建模结果, 量化脑区及相关神经细胞的各种特征, 以供后续分析并描述性状。本文以果蝇的嗅觉处理中枢—嗅叶 (antennal lobe) 为例, 将免疫染色后的嗅小球 (glomeruli) 建模, 如此既可量化个别嗅小球在空间分布的改变、沿着不同轴线的位移等, 也能比较实验组与对照组的差异。本研究方法通过对脑区进行建模与量化分析, 所获得分析结果不但可以了解神经细胞在特定脑区的分布情形, 也能了解特定神经细胞发生变异时对于脑区结构的可能影响, 并有助于量化神经组织的细微变化。

关键词: 果蝇 (*Drosophila*), 嗅叶 (antennal lobe), 三维建模 (3D reconstruction), 性状分析 (phenotype analysis), 大脑 (brain), 神经细胞 (neuron)

材料与试剂

1. 500 μ l 微量离心管 (Eppendorf tubes) (Axygen, catalog number: MCT-060-C)
2. 载玻片 (SuperFrostTM Microscope Slides, Ground 45°, 76 × 26 mm) (Thermo ScientificTM, catalog number: 10281711)
3. 盖玻片 (cover glasses thickness No.1, 22 × 22 mm) (Marienfeld Superior, catalog number: 0101050)

4. 果蝇
5. 聚甲醛 (20% paraformaldehyde) (Electron Microscopy Sciences, catalog number: 15713-S)
6. Triton X-100 (Sigma-Aldrich, catalog number: X100)
7. 10×磷酸盐缓冲生理盐水 (Phosphate buffered saline,10× PBS) (UniRegion Bio-Tech, catalog number: UR-PBS001-1L)
8. 二次过滤水 (ddH₂O)
9. 山羊血清 (Normal goat serum) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, catalog number: 005-000-121)
10. Mouse anti-Bruchpilot antibody (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), nc82)
11. CyTM3-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, catalog number: 115-165-166)
12. SlowFadeTM Gold Antifade Mountant (Invitrogen, catalog number: S36936)
13. 透明指甲油 (露华浓经典指甲, Revlon, catalog number: Vernis 771)
14. 1× PBS (磷酸盐缓冲生理盐水) (见溶液配方)
15. 4%聚甲醛/磷酸盐缓冲生理盐水 (见溶液配方)
16. PBST (见溶液配方)
17. 5%山羊血清 (见溶液配方)
18. 第一抗体溶液 (见溶液配方)
19. 第二抗体溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 电脑 (具独立显示卡的高阶电脑, 建议规格如下: 3GHz dual-core CPU, 8GB RAM, 以及 AMD Radeon R7 250 2G 以上等级显示卡)
2. 解剖显微镜 (Nikon, model: N-SMZ745)
3. 3D 旋转震荡器 (Digisystem, model: SR-100)
4. 共轭焦显微镜 (Zeiss, model: LSM780)

软件

1. Imaris 软件 (Bitplane; <http://www.bitplane.com/company>)

实验步骤

免疫荧光染色标定的神经组织样本制备

1. 本实验样本为果蝇成蝇大脑，样本在新鲜制备的4%聚甲醛/磷酸盐缓冲生理盐水中解剖并在室温下进行组织固定。
2. 以PBST (0.3% Triton X-100/1×磷酸盐缓冲液) 清洗样本3次，每次将样本置于3D旋转震荡器20分钟，再以5%的山羊血清 (5% normal goat serum/PBST) 做非专一性抗体进行封闭 (blocking)，并将样本置于3D旋转震荡器30分钟。
3. 将一级抗体mouse anti-Bruchpilot antibody (1:30 in 5% normal goat serum/PBST) 加入样本中，并置于3D旋转震荡器在4 °C反应至少二个隔夜 (2 overnights)。
4. 以PBST (0.3% Triton X-100/1×磷酸盐缓冲液) 清洗样本3次，每次将样本置于3D旋转震荡器20分钟，再加入二级抗体Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) Antibodies (1:500 in PBST) 至样本，并置于3D旋转震荡器于4 °C反应至少一个隔夜以进行荧光标记果蝇脑区 (neuropil)。
5. 标记完成后，样本以PBST (0.3% Triton X-100/1×磷酸盐缓冲液) 清洗样本3次，每次将样本置于3D旋转震荡器20分钟，再将样本浸泡于SlowFade™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen) 并置于4 °C至少一个隔夜。
6. 样本置于玻片上，以SlowFade™ Gold Antifade Mountant填满空隙，再将碎盖玻片置于四个角落以支撑盖玻片，盖玻片边缘以透明指甲油密封，最后用共轭焦显微镜 (Zeiss LSM780) 观察。更详细的实验步骤可参阅Liou等 (2018) 材料与方法章节。

果蝇大脑三维建模及分析

神经细胞的形态 (morphology) 是建构神经网络的基础，因此，了解其轴突 (axons) 及树突 (dendrites) 的分布形态，发育规律及调控方式，有助于了解神经连结网路的形成及讯息传递的途径。为了解神经细胞的发育、形态，及神经回路的形成，研究人员经常在神经细胞中表达荧光蛋白 (fluorescent protein) 来标记其结构，但常见的问题是同时

标记的神经细胞数目太多，且来自不同细胞的神经突 (neurite) 会混杂在一起，难以区分来源。即使重建了个别神经细胞，但要进行个体间的比较，仍须建造标准脑模型 (standard brain)，使来自不同个体的神经细胞及脑区能对应到标准脑的位置 (Chiang 等, 2011; Peng 等, 2011; Ito 等, 2014; Panser 等, 2016; Costa 等, 2016; Dolan 等, 2018)。这些方法的前提是研究者必须收集全脑影像，因此增加了工作量与难度。本研究方法通过直接将脑中的特定脑区建模后，再量化被标记神经细胞的特征，如：树突所分布的区域以及局部密度等。以果蝇的嗅叶 (antennal lobe) 为例，其内部可依据形态与边界划分出 55 个不同的子区域—嗅小球 (glomerulus)，而手动建模后可取得不同的量化特征值，供研究人员进行量化分析。当研究人员欲观察以荧光蛋白标记的区域中介神经元 (local interneurons) 时，只需收集嗅叶和邻近脑区的影像，便可量化描述该群神经细胞和嗅小球在不同果蝇脑中的差异。

一、影像建模

影像建模的目的在于量化我们需要观察的样本特征，后续便能系统化地分析。在此我们以果蝇脑中的嗅叶示范如何建模。为了减少建模过程中所造成的人为判读偏差，我们从实验组与对照组各选 10 个标定的果蝇大脑交给第一位实验者混合并随机排序，之后再由第二位实验者在单盲试验下进行人工建模，建模的结果会再交由第一位实验者解盲以分开实验组与对照组，再行分析。以下为果蝇嗅叶及部分脑区三维建模的技术流程，如果要分析其他脑区或果蝇的其他身体结构，也可参考以下方式建模：

1. 开启 Imaris 软件，确认版本是否含有 Surface 功能，此为建模最主要的模组。以下流程皆是在 Surface 模组之下进行 (图 1A1)。
2. 将共轭焦显微镜获取的大脑影像 (例如 lsm (Zeiss)、lif (Leica) 等原始文件类型) 输入 Imaris，再旋转样品并仔细观察，以确认成功读取。Imaris 可以涵盖的文件类型非常广泛，连续的图片文件 (例如 tif 或 jpg) 也可成功输入。所有相容文件类型及限制可参考 Imaris 官网 (<http://www.bitplane.com/learning>)。
3. 在「编辑」(Edit) 中选择「影像特性」(Image Properties)，调整样品的三维坐标轴使其归零。因显微镜设定不同，有时会有坐标轴未归零的情况发生，此归零的动作可以避免建模后发生坐标轴不一致的情形，防止之后在影像叠图中产生问题。

4. 开启显示设定 (快捷键 **Ctrl + D**), 调整显示设定中所需荧光频道 (**Channel**) 的强度与对比 (图 1A4), 调整至能清楚分出欲建模的脑区边界 (例如单一嗅小球) 再开始进行建模, 建模过程中亦可随时根据需要去做细微调整。
5. 如果样品所需建模部分仅占整体影像的一个特定区域 (例如果蝇脑中的嗅觉区域), 则于编辑中选取「剪取功能」(**Crop**), 将样品影像剪取出特定范围。「剪取功能」只能以 **XYZ** 轴方向去做方形的剪取, 故倘若样品在显微镜撷取过程中歪斜, 建议以大于样本的方型面积去包含所需的建模区域, 同时注意 **Z** 轴是否涵盖建模所需的完整区域, 以避免建模时发生部分区域未被涵盖的情形。
6. 于左方工具栏选择 **Surface** 建模功能, 选择「人工建模」(**Manual**)。「自动建模」(**Automated**) 仅在样品中欲检视的区域可以单纯借由荧光信号分区的情况下才可行。依据我们的经验, 针对果蝇大脑嗅觉区域的建模, 需选择「人工建模」才能涵盖完整的嗅叶, 并明确区分 55 个不同的嗅小球。
7. 于「人工建模」的模式下, 选择「绘图」(**Draw**) 选项下的连续画笔, 调整 **Z** 轴 (**Slice Position**) 并固定到所需的样品共轭焦切面 (**Confocal Sections**), 手动圈选所辨识到的脑组织范围, 于连续切面中的每一 **XY** 平面重复此操作 (图 1A2), 直到整个嗅小球被完整建构出来, 再按下「建立」(**Create Surface**), 并确认整个嗅小球外型正确且没有边缘不平或是破损的情况 (图 1B, 左图)。如果样品本身厚度太大, 实验者可选择每两到三个切面建模一次, 一样可以完成清楚的建模, 但如果欲建模的构造本身非常复杂 (例如每个切面涵盖形状差异极大), 在此建议还是在每个切面都做圈选的动作, 以确保建立的模型能完整反映出样品的真实构造。
8. 重复步骤 6~7 直到整个嗅叶中个别的嗅小球皆被完整建构 (图 1B, 中图)。
9. 如果在实验后续分析中需要比较特定脑区或单一特征 (**feature**) 在不同个体之间的差异, 则须在建模完成后额外标定一组 **XYZ** 坐标轴以作为内部参考坐标 (**internal control**)。本示范实验是以蕈形体 (**mushroom body**) 作为制定坐标轴方向与原点位置的参考坐标, 在此先设定切分整个大脑的平面为 **YZ** 平面, 再于 **YZ** 平面上设定垂直于蕈形体背叶 (**dorsal lobe**) 的方向为 **X** 轴, 并将原点设定在蕈形体中叶 (**medial lobe**) 的梗端点 (**peduncle**) (图 1B, 右图)。
10. 将所有建模 (**Surface**) 拉入一个模组资料夹 (图 1A1), 于资料夹上点选「数据分析」(**Statistics**), 再将个别嗅小球的建模资料输出到 **Excel**, 以利后续的数据分析

。数据分析所包含的参数可在「数据分析」设定中做勾选，实验者可以根据自己的样本与分析需求而输出所需特征，或是全部输出后再于 Excel 中做筛选。本实验所选用特征一共有十项，将会在下列资料分析中详细说明。

图 1. 果蝇嗅叶三维建模图解. A. Imaris 软件使用介面 (中图) 与主要功能模块 (黄色框线区块) 的局部放大图。(A1) 模组选择介面。箭号所指为表面模组功能 (Surface)，箭头所指为模组资料夹。(A2) 表面模组操作介面。箭号所指为绘画功能 (Draw)，箭头所指为「建立」(Create Surface)。(A3) 影像截取及标记操作介面。(A4) 显示操作介面。箭号所指荧光频道在此为神经组织抗体 (nc82) 成像，可由此调整影像信号强度。**B.** 嗅叶完整建模的流程图。从单一嗅小球建模 (左图，箭号) 到全部嗅小球的建模 (中图，箭号所指为左图中的嗅小球)，以及最后的坐标轴制定 (右图)。右图中箭号所指为坐标轴，箭头所指为 YZ 平面。**C.** 两种在建模过程可能遇到的错误。(C1) 误画杂点而造成模组变形。箭头所指为误按所造成的杂点，如此会造成模组变形 (箭号所指白色区域及相连至杂点的直线)。(C2) 因模组切面过少而造成模组形状不完全。白色虚线框出真正的嗅小球范围。由灰色区域可见所建立的模组不完全涵盖样本区域。

二、资料分析

在我们的建模资料中，嗅叶、蕈形体和嗅小球主要有十项特征被用于后续分析，其分别

是表面积 (area)、与原点的距离 (distance from origin reference frame)、二种椭圆率 (oblate ellipticity, prolate ellipticity)、脑区内平均荧光表现强度 (intensity mean)、在 X、Y、Z 轴向上的位置 (position x reference frame, position y reference frame and position z reference frame)、圆率 (sphericity) 以及体积 (volume)。为了让不同果蝇大脑的同一嗅小球可以相互比较,除了椭圆率和圆率,每一果蝇脑的各嗅小球特征必须先做标准化 (standardize),再做后续分析。

1. 嗅小球特征标准化

1.1 算出蕈形体 (内部参考坐标) 各项特征的平均值。以体积为例,平均体积为

$$V_{\text{mean}} = \sum_{i=1}^n V_{i,\text{ref}} / n, \text{ 其中 } V_{i,\text{ref}} \text{ 是 } n \text{ 只果蝇中第 } i \text{ 只的蕈形体体积。}$$

1.2 计算各果蝇的蕈形体特征与蕈形体特征平均值的比例。例如体积特征的比例为

$$R_{V,i} = V_{i,\text{ref}} / V_{\text{mean}}.$$

1.3 标准化计算是以各果蝇的嗅小球 (分析目标) 特征除以蕈形体的对应特征比例,

$$V'_{i,\text{target}} = V_{i,\text{target}} / R_{V,i}, \text{ 但对于各嗅小球在 XYZ 轴上的位置,则是除以蕈形体与原点距离的比例。}$$

1.4 此外,需注意影像来源的色彩深度 (color depth)。色彩深度在取向时常见有 8 位元和 16 位元的选项,若选用 16 位元的色彩深度,平均荧光表现强度是以 16 位元整数呈现。故除了标准化,为了统一色彩深度的数值呈现,当影像采用 16 位元的色彩深度时,各嗅小球内平均荧光表现强度还要多除以 65535。若影像采用 8 位元的色彩深度时,各嗅小球内平均荧光表现强度则是除以 255。藉此使荧光强度值介于 0 到 1 之间。

2. 以主成分分析观察实验组与对照组在整体特征上的差异

2.1 为了了解实验组与对照组的大脑在不同特征上是否存在差异,可利用主成分分析 (Principal Component Analysis) 观察这些特征在特征空间的分布情形。首先,为避免各特征值的范围差异过大而造成特征空间的扭曲,除了已经介于 0 到 1 的椭圆率、圆率和平均荧光强度外,其他特征都除以该特征在所有样本中的最大值,藉此将特征值都缩限到 [0, 1] 的范围。

2.2 各嗅小球在 XYZ 轴上的位置因有正值及负值,故三轴位置的计算改为除以该特征在所有样本中的绝对值的最大值。

- 2.3 缩限范围后,以C++呼叫跨平台的影像处理函式库OpenCV (<https://opencv.org>), 套用其中的PCA 函式 (function), 并将分析结果降维到二维空间, 观察实验组和对照组的分布 (图 2A)。
3. 比较实验组与对照组在特定特征的分布
 - 3.1 在对实验组果蝇和对照组果蝇的嗅小球的各项特征做比较时, 嗅小球在某些特征 (例如 Y 轴位置) 下可能会有相对差异, 但同时嗅叶也存在整体性变化 (例如朝+Y 方向位移) (图 2B, 左图)。为了厘清在嗅叶整体变化中嗅小球间相对差异的程度, 可以将实验组果蝇和对照组果蝇的单一嗅小球特征平均值相减。以某一嗅小球 (target) 在 Y 轴上的位置为例, 实验组果蝇 (EXP) 与对照组果蝇 (CTL) 的特征平均 $\bar{Y}'$ 相减值为 $\bar{Y}'_{\text{EXP, target}} - \bar{Y}'_{\text{CTL, target}}$ 。
 - 3.2 计算单一特征相减值的平均值与标准差后, 找出此特征值差异较大 (大于或小于一倍标准差) 的嗅小球 (图 2B, 中图)。将特征值差异较大的嗅小球标记回三维模型, 借此观察嗅小球的相对变化是否存在于特定区域 (图 2B, 右图)。
4. 除了上述对嗅小球的特征值分析外, 建模所得到的资料还能做其他分析, 像是利用个别嗅小球 j 的几何中心坐标 (centroid) $\vec{x}_{C,j} = (\sum_{k=1}^{p_j} \vec{x}_k)/p_j$, 其中嗅小球 j 涵盖了 p_j 个立体像素 (voxel), $\vec{x}_k$ 则为各立体像素的坐标。将嗅小球的几何中心坐标两两相减, 可得嗅小球间的距离 $|\vec{x}|_{C,ab} = |\vec{x}_{C,a} - \vec{x}_{C,b}|$ (图 2C1)。若将实验组与对照组的嗅小球间距相减 $|\vec{x}|_{\text{EXP, C,ab}} - |\vec{x}|_{\text{CTL, C,ab}}$, 可进一步比较各嗅小球间距在操纵变因下的影响 (图 2C2)。
5. 除了嗅小球的特征值分析, 神经的形态或突触 (synapses) 在各嗅小球的分布亦可藉此模型量化, 但为了统一不同色彩深度的影像来源, 建议采用「资料分析」1.4 处理后的数据来做比较 (图 2D)。

针对脑区影像建模后能得脑区的圆率、椭圆率、几何中心位置、该区的荧光强度等量化参数, 因此能以更精确的分析去比较实验组与对照组的异同, 并可采用多变数类型的分析方式 (例如主成分分析)。再加上计算不同脑区间的相对距离, 这些分析均有助于了解操控的实验条件是否会影响特定脑区 (间) 的结构改变以及标定的神经细胞在该脑区的可能变化。藉由建模以及后续的量化分析, 研究者将能更精确地描述研究的性状。以我们的研究为例 (Liou 等, 2018), 若是单以肉眼判断, 无法有效地客观判断、分析荧光蛋白所标定的区域中介神经元对嗅小球的影响, 相较之下, 嗅小球的几何中心位置分析

能提供量化的差异，这正是本建模方式的特点。本建模方法也适用不同生物体的脑区与其他组织，故可供不同领域的研究者进行性状的量化分析与比较。

图 2. 嗅小球建模后的数据分析图. A. 对嗅小球的量化特征进行主成分分析后，将第一主成分 (Principal Component 1) 和第二主成分 (Principal Component 2) 以视觉化呈现个别嗅小球在主成分分析后的空间分布图。本图中实验组和对照组果蝇的嗅小球分别以绿色和黑色的数据点标示。B. 左图呈现实验组 (绿色) 和对照组 (黑色) 的嗅小球在 Y 轴上的位置。数据点所代表的是平均位置 (mean)，并以误差线标示标准差 (standard deviation) 的范围。其中嗅小球的排序是根据对照组嗅小球在 Y 轴的平均位置由大到小排序。中图呈现实验组与对照组的嗅小球在 Y 轴的平均位置差距 (实验组减去对照组)。黑线代表整体嗅小球在 Y 轴位置差距上的平均值，灰线表示标准差的范围。红色数据点代表该嗅小球的 Y 轴位置差距大于平均值加上一倍标准差，橘色代表该嗅小球的 Y 轴位置差距小于平均值减去一倍标准差，介于其间的嗅小球则标以黑色。此处的嗅小球排序与左图相同。右图将中图的红色和橘色数据点所对应的嗅小球标示到对照组果蝇的嗅叶，以视觉化呈现位置差距较大的嗅小球的位置。C. (C1) 呈现在实验组与对照组中嗅小球之间的平均距离。(C2) 呈现两组的平均距离差值 (实验组减去对照组)。实验组的嗅小球间平均距离大致上远于对照组果蝇的嗅小球 (红色区域)，但仍有部分嗅小球间的距离在实验组中拉近 (蓝色区域)。此处的嗅小球索引与左图相同。D. 左图中，在对照组果蝇的嗅叶标示的三个嗅小球 DA1、VA1d 和 DC3 (绿色区域) 为 Mz19 所标定的神经元树突涵盖的区域。右图呈现 Mz19 所标定的神经元树突在三个嗅小球内的平均荧光表现强度，其中黑色数据点代表对照组，绿色数据点代表实验组。图 2 中实验组与对照

组的分析样本各为 5 个嗅叶，皆取自 Liou 等 (2018) 中的部份样本并重新分析。

失败经验

如果建模过程发生问题，发现建立的脑区模型形状有不完整或变形的情况 (图 1C)，则可能有以下状况：

1. 在手动建模过程中，若在模组以外的地方误画了一些杂线或杂点，这将会导致在建造模组的过程中造成模组变形 (图 1C1)。
2. 一个由大量共轭焦切面组成的样本 (例如 50 切面)，需要足够多的切面建模才能成功描绘出接近实际样本外型的模组。所以当发现模组形状与实际样本不同时 (如图 1C2)，可以增加描绘的共轭焦切面数量来解决这个问题。

溶液配方

1. 1× PBS (磷酸盐缓冲生理盐水)

将二次过滤水以九比一的比例加入 10× PBS 则可稀释成 1× PBS，置于室温可储存数月，如有发霉情况则丢弃

2. 4%聚甲醛/磷酸盐缓冲生理盐水

将 1× PBS 以四比一加入 20%聚甲醛则可稀释成 4%聚甲醛溶液，置于碎冰上降温使用，此溶液须当日现配

3. PBST

0.3% Triton X-100 in 1× PBS

4. 5%山羊血清

5% normal goat serum in PBST

5. 第一抗体溶液

将抗体以 5%山羊血清稀释至特定的浓度

6. 第二抗体溶液

将抗体以 PBST 稀释至特定的浓度

致谢

本研究方法首先于 Liou 和 Lin 等人 (2018) 描述，感谢所有参与此研究工作的人员。感谢杨己任与张颢馨于本文撰写过程所提供的宝贵建议。本研究方法是中央研究院前瞻

计划 (AS-102-CDA-L02) 经费支持。本研究无任何利益冲突或竞争性利益。

参考文献

1. Liou, N. F., Lin, S. H., Chen, Y. J., Tsai, K. T., Yang, C. J., Lin, T. Y., Wu, T. H., Lin, H. J., Chen, Y. T., Gohl, D. M., Silies, M. and Chou, Y. H. (2018). [Diverse populations of local interneurons integrate into the *Drosophila* adult olfactory circuit.](#) *Nat Commun* 9(1): 2232.
2. Chiang, A. S., Lin, C. Y., Chuang, C. C., Chang, H. M., Hsieh, C. H., Yeh, C. W., Shih, C. T., Wu, J. J., Wang, G. T., Chen, Y. C., Wu, C. C., Chen, G. Y., Ching, Y. T., Lee, P. C., Lin, C. Y., Lin, H. H., Wu, C. C., Hsu, H. W., Huang, Y. A., Chen, J. Y., Chiang, H. J., Lu, C. F., Ni, R. F., Yeh, C. Y. and Hwang, J. K. (2011). [Three-dimensional reconstruction of brain-wide wiring networks in *Drosophila* at single-cell resolution.](#) *Curr Biol* 21(1): 1-11.
3. Peng, H., Chung, P., Long, F., Qu, L., Jenett, A., Seeds, A. M., Myers, E. W. and Simpson, J. H. (2011). [BrainAligner: 3D registration atlases of *Drosophila* brains.](#) *Nat Methods* 8(6): 493-500.
4. Ito, K., Shinomiya, K., Ito, M., Armstrong, J. D., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homberg, U., Jenett, A., Keshishian, H., Restifo, L. L., Rossler, W., Simpson, J. H., Strausfeld, N. J., Strauss, R., Vosshall, L. B. and Insect Brain Name Working, G. (2014). [A systematic nomenclature for the insect brain.](#) *Neuron* 81(4): 755-765.
5. Panser, K., Tirian, L., Schulze, F., Villalba, S., Jefferis, G., Buhler, K. and Straw, A. D. (2016). [Automatic segmentation of *Drosophila* neural compartments using GAL4 expression data reveals novel visual pathways.](#) *Curr Biol* 26(15): 1943-1954.
6. Costa, M., Manton, J. D., Ostrovsky, A. D., Prohaska, S. and Jefferis, G. S. (2016). [NBLAST: Rapid, sensitive comparison of neuronal structure and construction of neuron family databases.](#) *Neuron* 91(2): 293-311.
7. Dolan, M. J., Belliart-Guerin, G., Bates, A. S., Frechter, S., Lampin-Saint-Amaux, A., Aso, Y., Roberts, R. J. V., Schlegel, P., Wong, A., Hammad, A., Bock, D., Rubin, G. M., Preat, T., Placais, P. Y. and Jefferis, G. (2018). [Communication](#)

[from learned to Innate olfactory processing centers is required for memory retrieval in *Drosophila*](#). *Neuron* 100(3): 651-668 e658.