

技术与方法

基于II型肺泡上皮细胞RNAscope多通道 荧光检测技术在类器官研究中的应用

孙剑会^{1,2} 刘迪^{1,2} 张华才^{1,2} 张安强^{1,2} 米俊伟^{1,2} 蒋建新^{1,2*} 曾灵^{1,2*}⁽¹陆军军医大学大坪医院战创伤医学中心, 重庆 400042; ²创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

摘要 该文探讨了RNAscope多通道荧光检测技术在类器官中的应用并建立了相应的实验体系, 旨在为类器官的研究提供更多的技术与方法。该研究采用磁珠分选方法从大鼠肺组织中分选II型肺泡上皮细胞(alveolar epithelial type II cells, AEC2s), 并采用免疫荧光鉴定AEC2s细胞的纯度, 对分离的AEC2s细胞进行肺类器官培养, 培养第15天时采用倒置显微镜观察肺类器官的生长规律, HE染色观察肺类器官的形态结构特征, RNAscope多通道荧光检测技术检测肺类器官原位单细胞中*Sftpc*、*Aqp5*、*krt5*、*ki67*等四个RNA的基因表达情况。结果表明, RNAscope多通道荧光检测技术在类器官应用中具有可行性, 该技术能实现类器官单细胞水平同时分析多个RNA的表达水平, 在获得单细胞中拷贝RNA表达数据的同时提供完整的组织形态学信息, 提高对疾病与标志物之间复杂的生物学相关性认识, 因此, RNAscope多通道荧光检测技术为类器官在单细胞水平的研究开辟了新的途径。

关键词 类器官; RNAscope多通道荧光检测技术; AEC2s细胞

Application of RNAscope Multi-Channel Fluorescence Detection in Organoid Studies Based on Alveolar Epithelial Type II Cells

SUN Jianhui^{1,2}, LIU Di^{1,2}, ZHANG Huacai^{1,2}, ZHANG Anqiang^{1,2}, MI Junwei^{1,2}, JIANG Jianxin^{1,2*}, ZENG Ling^{1,2*}⁽¹Department of Trauma Medical Center, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042, China;²State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injuries, Chongqing 400042, China)

Abstract This study aims to investigate the application of RNAscope multi-channel fluorescence detection in organoids research and establish relative experimental system. AEC2s (alveolar epithelial type II cells) were sorted by magnetic beads from SD rat and identified their purity by immunofluorescence. The isolated AEC2s cells were cultured in lung organoids. At 15 days, inverted microscope was detected to study the growth law at 15 days, and HE staining was also performed to show the morphological structure of organoids. RNAscope multi-channel fluorescence detection was performed to determine the expression of *Sftpc*, *Aqp5*, *krt5* and *ki67* in single cells of lung organoids *in situ*. The results showed that RNAscope multichannel fluorescence de-

收稿日期: 2021-05-10 接受日期: 2021-07-27

创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室优秀青年基金(批准号: SKLYQ201901)、陆军特色医学中心军事医学前沿创新能力培养计划(批准号: 2019CXJSB014)和在渝院士牵头科技创新引导专项(批准号: cstc2020yszx-jcyjX0004)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68757777, E-mail: hellojix@126.com; Tel: 023-68757512, E-mail: zengling_1025@tmmn.edu.cn

Received: May 10, 2021 Accepted: July 27, 2021

This work was supported by the Projects of the State Key Laboratory of Trauma, Burns Combined Injury (Grant No.SKLYQ201901), the Chongqing Science and Technology Talents, Training Plan for Innovation Ability on the Frontiers of Military Medical Research (Grant No.2019CXJSB014) and the Chongqing Special Science and Technology Project for Academicians (Grant No.cstc2020yszx-jcyjX0004)

*Corresponding authors. Tel: +86-23-68757777, E-mail: hellojix@126.com; Tel: +86-23-68757512, E-mail: zengling_1025@tmmn.edu.cn

tection could be used to analyse the expression of multiple RNA at the single-cell level in organoids simultaneously, and to provide complete histomorphological information while obtaining RNA database in single cells, which improved the understanding of the complex biological correlation between diseases and markers. Therefore, RNAscope multi-channel fluorescence detection propose a new method for the study of organoids at the single-cell level.

Keywords organoid; RNAscope multi-channel fluorescence detection; AEC2s

类器官(organoid)是应用体外三维(3-dimensional, 3D)培养技术建立的在结构和功能上类似于器官的小型组织^[1], 具有组织自我更新及可长期培养的特点, 在一定程度上能模拟体内器官生理活动和病理变化^[2-3], 可成为精准医疗、器官移植、药物筛选、药物作用机制研究的理想体外载体。类器官培养体系的特殊性^[4-5]导致检测多靶标抗体实验方法存在一定局限性。该研究将RNAscope多通道荧光检测技术^[6]应用于类器官的研究中, 不但实现了在单细胞中同时定量分析多个不同类型的RNA水平, 还可以获得单细胞中不同RNA的拷贝数, 因此RNAscope多通道荧光检测技术对类器官的研究有重要作用。

RNAscope多通道荧光检测技术是一项新颖的用于检测位于完整细胞中目标RNA原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)的检测技术^[7-9]。该技术主要由透化、杂交、信号放大、可视信号形成、量化分析五个部分^[10-11]组成, 为了增强探针的特异性结合力, 采用独特的双“Z”探针设计, 每个Z型探针底部是一段包含18~25个碱基的序列, 该序列能够互补结合到目标RNA上^[12], 中部是一段间隔序列, 连接了探针的上下两端, 顶端是一段包含14个碱基的尾部序列段。信号放大前体序列结合在一对Z形探针顶端的尾部, 当带有荧光标记的分子结合到信号放大序列上时, 就能达到可视化放大信号的效果^[13-14], 在透视光学显微镜或者多光谱成像系统下, 每一个目标RNA分子以一个点状信号的形式呈现。RNAscope多通道荧光检测技术不仅具有高度特异性、敏感性和极高的信噪比等特点^[15-16], 而且在新的尚无可用抗体的生物学标志物以及非编码RNA的检测中也具有一定的应用价值, 可提高对疾病与标志物之间复杂的生物学相关性的认识, 是理想的能够用于下一代测序(next generation sequencing, NGS)和芯片技术后期转化研究的技术平台。

肺泡是肺内气体交换的部位, 即为肺的功能单位。肺泡壁由单层上皮细胞构成, 主要由扁平的I型

肺泡上皮细胞(alveolar epithelial type I cells, AEC1s)和立方形的II型肺泡上皮细胞(AEC2s)组成, AEC2s可能是肺泡上皮修复和再生的兼性祖细胞, 在稳定状态下, 肺泡区内AEC2s细胞很少发生增殖, 但在博来霉素、高氧等所致的急性肺损伤后谱系标记的AEC2s细胞不仅增殖明显增多, 而且可大量分化为AEC1s细胞^[17-19], 因此基于肺表面活性蛋白C(pulmonary surfactant-associated protein C, *Sftpc*)、*Aqp5*、*ki67*、角蛋白5(cytokeratin 5, *krt5*)探针在AEC2s细胞中的研究, 可以系统揭示肺损伤后肺泡上皮细胞的自我修复机制与调控环节。本研究采用磁珠分选后的AEC2s细胞构建肺类器官, 制备冰冻切片, 选*Sftpc*、*Aqp5*、*ki67*、*krt5*四个RNA探针, 进行RNAscope多通道荧光检测, 其中*Sftpc*是AEC2s细胞的标志物, *Aqp5*是AEC1s细胞的靶基因, *ki67*是细胞增殖的靶基因, *krt5*与肺的损伤修复相关, 四个探针共同定位于肺类器官, 以研究肺类器官干细胞的增殖与分化。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3~4周龄健康SD大鼠(120~150 g)购于陆军特色医学中心动物中心, 实验已经过中国人民解放军陆军军医大学学术伦理委员会许可[编号: SCXK-(PLA)20120031]。

1.2 主要试剂和仪器

主要试剂包括: RNA探针 *Sftpc*、*Aqp5*、*ki67*、*krt5*、阴性对照探针和阳性对照探针(美国Bio-Techne公司), 抗体Anti-Prosurfactant(SPC)和EpCAM(英国Abcam公司)、Podoplanin(德国Sigma公司), 磁珠分选二抗anti-Rabbit IgG Microbead和anti-Mouse IgG Microbeads(德国Miltenyi Biotec公司), RNAscope多通道二代荧光检测试剂盒、LysoTracker绿色荧光探针和培养基Mouse Embryonic Fibroblast(美国Bio-Techne公司)。仪器包括: 杂交炉(美国Bio-Techne公司)、激

光共聚焦(德国Leica公司)、电子秤(广州福州富日公司)、体视学分析系统(美国MBF公司)、倒置显微镜(日本尼康公司)、台式离心机(美国Beckman公司)、细胞培养箱和冰冻切片机(德国Thermo公司)。

1.3 磁珠分选AEC2s细胞

采用2%戊巴比妥钠60 mg/kg剂量经腹腔注射,进行动物麻醉,75%酒精、碘酒依次消毒,沿腹中线剪开,生理盐水灌注心脏,沿气管注射3 mL 10 U/mL Dispase酶,游离肺脏,37 °C水浴消化45 min,眼科剪剪碎肺组织,200目过滤筛过滤,收集细胞悬液。1 000 r/min离心5 min,1 mL PBS重悬细胞沉淀,加入2 μ L Podoplanin一抗,4 °C孵育30 min,PBS洗涤2次,加入20 μ L anti-Rabbit IgG Microbeads磁珠二抗,4 °C孵育15 min,PBS洗涤2次,磁珠分选过柱,去掉Podoplanin⁺细胞,收集Podoplanin⁻细胞。1 000 r/min离心5 min,1 mL PBS重悬细胞沉淀,加入2 μ L EpCAM一抗,4 °C孵育30 min,PBS洗涤2次,加入20 μ L anti-Mouse IgG Microbeads磁珠二抗,4 °C孵育15 min,洗涤2次,磁珠过柱分选。选取Podoplanin⁻EpCAM⁺的细胞,按照 1.5×10^5 个/cm²细胞密度与Matrigel混合培养,隔天更换培养基,采用倒置显微镜观察细胞生长状态。

1.4 AEC2s细胞免疫荧光鉴定

将贴壁培养48 h的AEC2s细胞去除培养基,并用PBS洗涤2次,4%多聚甲醛室温固定15 min,PBS洗涤2次,转移至0.1% Triton中穿孔10 min,滴加山羊血清于室温封闭45 min,加入一抗SPC(1:400稀释)于4 °C过夜孵育,PBS洗涤3次,加入二抗(1:400稀释)于室温避光孵育1 h,PBS洗涤3次,滴加DAPI室温染核10 min,PBS洗涤3次,抗荧光淬灭剂封片,激光共聚焦采集图像。

1.5 类器官冰冻切片制备

当AEC2s细胞在基质胶中培养第15天时,去除培养基,PBS洗涤1次,冰甲醇固定20 min,PBS洗3次,小心地取出已经固定的基质胶,放入包埋磨具。加入OCT,液氮速冻10 min,使用冰冻切片机按照15 μ m厚度对类器官样品连续切片。再将制作好的切片贴于多聚赖氨酸包被的载玻片上,-80 °C保存,3个月内均可进行RNAscope多通道荧光检测。

1.6 肺类器官RNAscope多通道荧光检测

类器官冰冻切片,-20 °C干燥30 min,蒸馏水清洗1次;双氧水室温处理10 min,蒸馏水清洗1次,靶标修复液95~100 °C修复5 min,立刻转移到蒸馏水

中清洗2 min,100%乙醇处理3 min,免疫组化笔圈出样本区域,室温过夜干燥切片。滴加蛋白酶III于杂交炉中40 °C孵育30 min,蒸馏水清洗2 min,分组加入阴性对照探针、阳性对照探针和预混合的目的探针(*Sftpc*、*Aqp5*、*krt5*、*ki67*)于杂交炉中40 °C孵育2 h,清洗液清洗2次,每次2 min;依次滴加150 μ L AMP1、AMP2、AMP3,转移至杂交炉中40 °C孵育15~30 min,进行信号扩大,然后进行C1通道探针可视信号标记,加入HRP-C1于杂交炉中40 °C孵育15 min,清洗液清洗2次,每次2 min;滴加ASOP520染料于杂交炉中40 °C孵育30 min,清洗液清洗2次,每次2 min;加入HRP阻断剂于杂交炉中40 °C孵育15 min,清洗液清洗2次,每次2 min,完成C1通道的可视化标记。用同样的步骤依次进行C2、C3、C4三个通道探针荧光分子标记,然后加入DAPI染细胞核,防淬灭封片剂封片,采用激光共聚焦进行图像采集。

1.7 HE染色

肺类器官石蜡切片在60 °C烤箱中烤片10 min,二甲苯脱蜡30 min,乙醇梯度水化,蒸馏水洗5 min,备用。加入苏木素染核10 min,转移至自来水冲洗5 min,盐酸乙醇分化,采用蒸馏水清洗5 min。滴加伊红染色5 min,蒸馏水2 min,吹干切片。最后转移至二甲苯中透明10 min,最后中性树脂封片,体视学显微镜镜检采集图像。

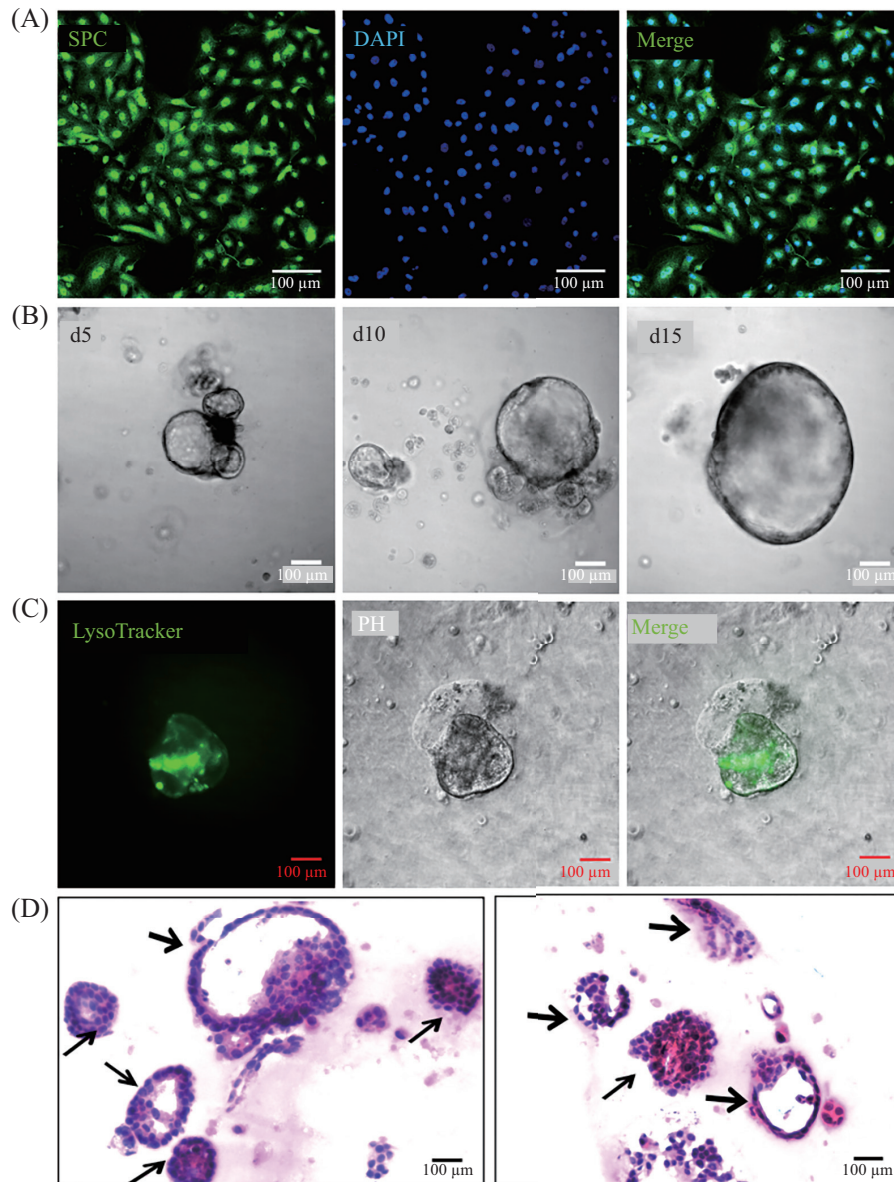
1.8 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行数据分析,数据用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,单因素方差分析比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AEC2s细胞鉴定与肺类器官培养

磁珠分选后AEC2s细胞接种于96孔板中,培养48 h后,免疫荧光染色结果显示,90%以上的细胞均为SPC阳性(图1A),肺类器官培养按照 1.5×10^5 个/cm²细胞密度接种于Matrigel上,培养观察细胞生长规律(图1B),培养第5天时能观察到多个直径为30~80 μ m的细胞球,第10天球体明显增大,第15天时直径可长到200~500 μ m大小。将培养第15天的类器官进行LysoTracker染色,结果显示为阳性(图1C);进一步验证AEC2s细胞三维培养的球体为肺的类器官,HE染色,可以观察到完整细胞球的结构形态,有实心球体和空心球体两类(图1D)。



A: 磁珠分选AEC2s细胞的鉴定; B: 肺类器官培养第5、10、15天的形态; C: LysoTracker染色; D: 肺类器官HE染色。箭头指向完整的细胞球。

A: identification of AEC2s sorted by MACS; B: morphology of lung organoids on the 5th, 10th, 15th days; C: LysoTracker staining; D: HE staining of lung organoids. Arrows indicated the complete cell pellets.

图1 AEC2s细胞鉴定与肺类器官培养

Fig.1 Identification of AEC2s and culture of lung organoids

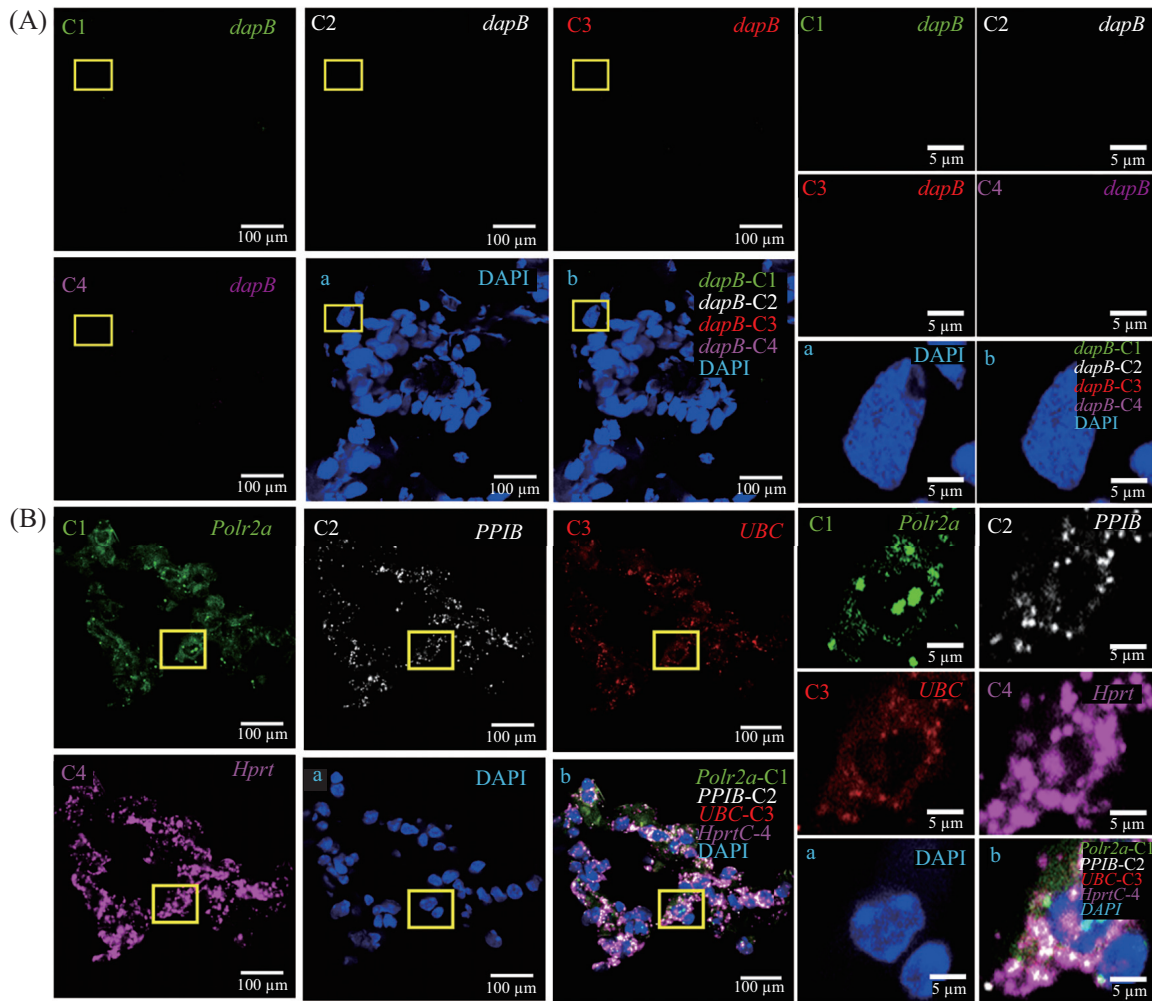
2.2 RNAscope多通道荧光检测类器官阴性探针对照组和阳性探针对照组

将培养第15天的肺类器官进行RNAscope多通道荧光检测, 并将其分为阴性探针对照组、阳性探针对照组、目的探针三个组, 其中阴性探针对照组(图2A)的四个通道采用细菌*dapB*探针标记; 阳性探针对照组(图2B)的四个通道均采用不同的参照探针标记, C1通道为*Polr2a*探针标记(绿色), C2通道为*PP1B*探针标记(白色), C3通道为*UBC*探

针标记(红色), C4通道为*Hprt*探针标记(粉色)。阴性对照组染色结果显示, C1~C4通道均未有*dapB*阳性信号(图2A), 阳性对照组C1~C4通道均检测到多个散点状的阳性信号, 且每个细胞的阳性信号点数量 ≥ 4 。

2.3 类器官目的探针RNAscope多通道荧光检测

将肺类器官目标基因*Sftpc*、*Aqp5*、*krt5*、*ki67*进行RNAscope多通道荧光检测(图3), 其中C1通道*Sftpc*探针标记(绿色), C2通道*Aqp5*探针标记(白色), C3通道



A: C1~C4均为单通道*dapB*染色; a: DAPI细胞核染色; b: 五通道叠加; B: C1单通道*Polr2a*染色; C2单通道*PPIB*染色; C3单通道*UBC*染色; C4单通道*Hprt*染色; a: DAPI细胞核染色; b: 五通道叠加。

A: *dapB* staining of C1-C4 channel; a: DAPI staining of cell nucleus; b: merged picture of five channels; B: *Polr2a* staining of C1 channel; *PPIB* staining of C2 channel; *UBC* staining of C3 channel; *Hprt* staining of C4 channel; a: DAPI staining of cell nucleus; b: merged picture of five channels.

图2 RNAscope多通道荧光检测类器官探针对照组

Fig.2 RNAscope multi-channel fluorescence detection of organoids in the control group

*krt5*探针标记(红色), C4通道*ki67*探针标记(粉色)。目标探针组染色结果显示, C1-*Sftpc*(图3, C1)、C2-*Aqp5*(图3, C2)、C3-*krt5*(图3, C3)、C4-*ki67*(图3, C4)四个通道均能检测出多个散点以及成簇的阳性信号, 选取一个四种探针共表达的细胞, 进行单通道局部截图放大观察, 可见每个通道的信号均处于细胞核和细胞质。

3 讨论

类器官是CLEVER等^[20]在小肠干细胞分离培养中, 发现单个单细胞可以形成肠道的隐窝-绒毛结构而提出的, 近年来, 类器官技术发展迅猛, 先后建立了脑、肺、肝脏、肾脏、肠道、胃等多种类器官, 可应用于精准医疗、器官移植、药物筛选、药物作

用机制研究等多个领域^[21]。类器官的优势在于, 能够模拟多种细胞之间的信号交流以及体内细胞的运动, 可以在培养过程中维持基因稳定性, 还能模拟人体发育和疾病的发展过程, 填补动物实验的缺陷^[22], 并且可实现实时成像。

类器官是由不同的细胞组成的复杂三维结构, 因此鉴定细胞的类别尤为重要^[23-24], 目前的研究主要是从表型和基因型鉴定: 表型鉴定主要通过HE染色、免疫组化和免疫荧光染色等鉴定单细胞种类; 基因型则采用全基因组测序(WGS)、单细胞测序, 以确定类器官细胞身份。无论是表型还是基因型鉴定均可以确定细胞身份。但表型鉴定受限于抗体的类别、种属、特异性等, 很难实现类器官的原

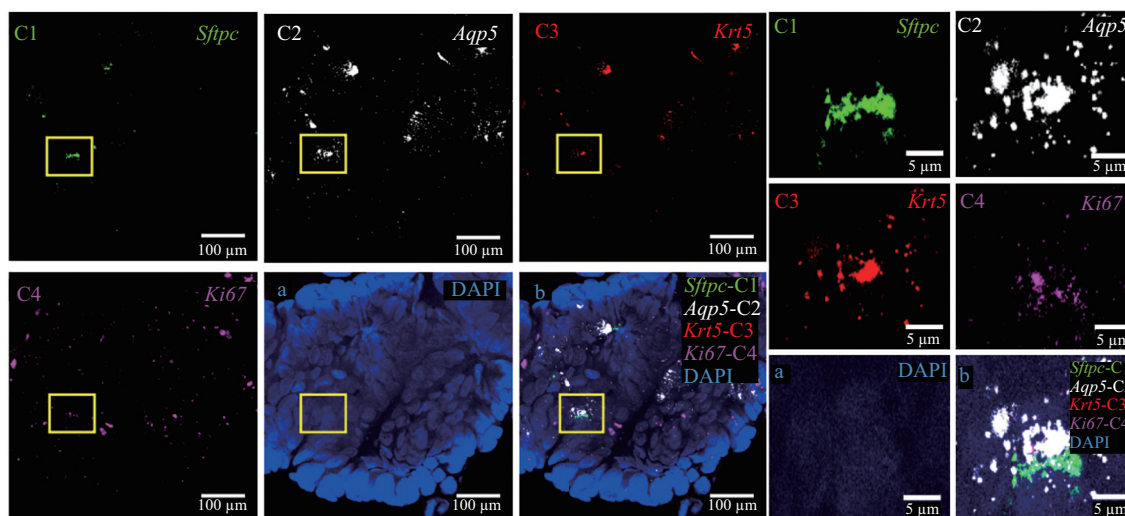


图3 类器官目的探针RNAscope多通道荧光检测
 Fig.3 RNAscope multi-channel fluorescence detection of organoids in the sample group

位多重染色; 而基因型鉴定虽然可以同时鉴定类器官的多种细胞, 但是无法在原位单细胞中同时定量分析多个RNA的表达水平; RNAscope多通道荧光检测技术既能避免表型鉴定中抗体局限性, 又能弥补基因型鉴定无法原位定量多种RNA的表达的缺陷。但是RNAscope多通道荧光检测技术通常应用于组织器官切片^[25-26], 而类器官培养环境与结构特殊, 其相关研究不能直接使用组织器官的实验体系, 因此我们基于AEC2s肺类器官^[27]建立了适用于类器官的RNAscope多通道荧光检测技术实验方案, 该方案能同时测定四个不同靶向探针在原位细胞中的RNA表达情况。该实验主要步骤包括类器官培养、类器官冰冻切片制备、RNAscope多通道荧光染色、激光共聚焦采集图像等四个部分。其中在冰冻切片制备过程中为了防止RNA降解, 我们采用冰甲醇对类器官进行固定, 既不会引起基质胶溶胶, 还能防止RNA降解, 保持RNA的完整性。而在RNAscope多通道荧光染色过程中, 每次实验必须同时设定阳性探针对照组和阴性探针对照组, 主要作用是验证染色过程的操作步骤的准确性, 同时阴性探针对照组还应用于激光共聚焦图像采集时背景荧光扣除。严格把控切片制备和RNAscope多通道荧光染色步骤, 才能确保RNAscope多通道荧光检测在类器官中客观地呈现细胞RNA的表达情况, 实现类器官单细胞水平同

时定量分析多个RNA的表达水平, 且在获得单细胞中的RNA拷贝数据的同时获取完整的组织形态学信息, 因此RNAscope多通道荧光检测技术在类器官中的应用具有重要意义。

参考文献 (References)

- [1] LANCASTER M A, KNOBLICH J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125.
- [2] LI M, IZPISUA BELMONTE J C. Organoids—preclinical models of human disease [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(6): 569-79.
- [3] KRETZSCHMA K, CLEVERSI H. Organoids: modeling development and the stem cell niche in a dish [J]. *Dev Cell*, 2016, 38(6): 590-600.
- [4] EIRAKU M, WATANABE K, MATSUO T M, et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 519-32.
- [5] BARTFELD S, BAYRAM T, VAN D W M, et al. *In vitro* expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1): 126-36.e6.
- [6] KERSIGO J, PAN N, LEDERMAN J D, et al. A RNAscope whole mount approach that can be combined with immunofluorescence to quantify differential distribution of mRNA [J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 374(2): 251-62.
- [7] GRABINSKI T M, KNEYNBERG A, MANFREDSSON F P, et al. A method for combining RNAscope *in situ* hybridization with immunohistochemistry in thick free-floating brain sections and primary neuronal cultures [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120120.
- [8] WANG F, FLANAGAN J, SU N, et al. RNAscope: a novel *in*

- situ* RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues [J]. *J Mol Diagn*, 2012, 14(1): 22-9.
- [9] AMINI C G, RASHNONEJAD A, HARPER S Q. RNAscope *in situ* hybridization-based method for detecting DUX4 RNA expression *in vitro* [J]. *RNA*, 2019, 25(9): 1211-7.
- [10] ANNESE T, TAMMA R, DE G M, et al. RNAscope dual ISH-IHC technology to study angiogenesis in diffuse large B-cell lymphomas [J]. *Histochem Cell Biol*, 2020, 153(3): 185-92.
- [11] MILLAR M, MIXED M S. Automated RNAscope™ and OPAL™ for multiple targets [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2148: 277-98.
- [12] XIA L H, PU X H, FU Y, et al. Using immunohistochemistry, fluorescence *in situ* hybridization and RNAscope to analyze the status of PD-L1 in multiple cancers [J]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2020, 49(11): 1183-6.
- [13] JONES J, ZECCHINI H, NAGARAJAN S. Multiplexed detection and analysis of low-abundance long noncoding RNA using RNAscope™ in cultured cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2148: 111-25.
- [14] DIKSHIT A, ZONG H, ANDERSON C, et al. Simultaneous visualization of RNA and protein expression in tissue using a combined RNAscope™ *in situ* hybridization and immunofluorescence protocol [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2148: 301-12.
- [15] ERBEN L, BUONANNO A. Detection and quantification of multiple RNA sequences using emerging ultrasensitive fluorescent *in situ* hybridization techniques [J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2019, 87(1): e63.
- [16] WANG H, SU N, WANG L C, et al. Quantitative ultrasensitive bright-field RNA *in situ* hybridization with RNAscope [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1211: 201-12.
- [17] DESAI T J, BROWNFIELDRO D G, KRASNOW M A. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer [J]. *Nature*, 2014, 507(7491): 190-4.
- [18] BARKAUSKAS C E, CRONCE M J, RACKLEY C R, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(7): 3025-36.
- [19] ROCK J R, BARKAUSKAS C E, CRONCE M J, et al. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(52): E1475-83.
- [20] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-5.
- [21] RIOS A C, CLEVERS H. Imaging organoids: a bright future ahead [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(1): 24-6.
- [22] CORRQ C, NOVELLASDEMUNT L, LI V S W. A brief history of organoids [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319(1): C151-65.
- [23] LANCASTER M A, RENNER M, MARTIN C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 373-9.
- [24] QIAN X, NGUYEN H N, SONG M M, et al. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure [J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1238-54.
- [25] CAROSSINO M, LP H S, RICHT J A, et al. Detection of SARS-CoV-2 by RNAscope® *in situ* hybridization and immunohistochemistry techniques [J]. *Arch Virol*, 2020, 165(10): 2373-7.
- [26] SHIERS S, KLEIN R M, PRICE T J. Quantitative differences in neuronal subpopulations between mouse and human dorsal root ganglia demonstrated with RNAscope *in situ* hybridization [J]. *Pain*, 2020, 161(10): 2410-24.
- [27] SALAHUDEEN A A, CHOI S S, RUSTAGI A, et al. Progenitor identification and SARS-CoV-2 infection in human distal lung organoids [J]. *Nature*, 2020, 588(7839): 670-5.