

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (8) :943 - 949; 4 August 2014  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.08.013

## 慢性阻塞性肺疾病患者支气管肺泡灌洗液细菌宏基因组 DNA 的制备

王娟<sup>1,3</sup>, 沈宁<sup>1,3</sup>, 杜毅鹏<sup>1,3</sup>, John R Erb-downward<sup>2,3</sup>, Gary B Huffnagle<sup>2,3</sup>, Margaret R Gyetko<sup>2,3</sup>, 贺蓓<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> 北京大学第三医院呼吸科, 北京 100191

<sup>2</sup> 密西根大学医学院内科呼吸与危重症医学科, 美国

<sup>3</sup> 北京大学医学部-密歇根大学医学院转化医学与临床研究联合研究所, 北京 100191

**摘要:**【目的】优化稳定期慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary diseases, COPD) 患者支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluids, BALF) 细菌宏基因组 DNA 的提取方法, 以便于高效提取微量的细菌 DNA 进行后续的 PCR 反应和测序。【方法】取稳定期 COPD 患者的 BALF 5mL, 离心收集细胞。为了有效提取样品中革兰氏阳性菌的基因组, 对 QIAGEN 的 DNA 提取试剂盒的操作步骤进行优化: 加入裂解缓冲液 ATL 后首先运用研磨珠和多功能生物样品匀质器破碎菌壁, 再加入蛋白酶 K 孵育, 然后加入裂解缓冲液 AL 振荡混匀。无水乙醇沉淀 DNA 后, 将全部溶液过柱, 用洗液 AW1 和 AW2 各洗柱一次, 最后加 50 $\mu$ L 洗脱液洗脱 DNA。提取的 DNA 定量后, 运用 PCR 方法检测样本中的细菌 16S rDNA 量, 并按照测序要求构建 DNA 文库进一步验证。【结果】试剂盒优化法提取的 BALF 的 DNA 总量为 467.5 (135.0 - 1697.5) ng, 明显高于按照传统酚-氯仿法提取的 DNA 总量 95.0 (0 - 612.5) ng, 并且所提取的 DNA 可以很好的扩增细菌的 16S rDNA 以及构建 DNA 文库, 改良后的扩增产物明显增多 ( $P = 0.002$ )。【结论】使用 DNA 提取试剂盒结合研磨珠和多功能生物样品匀质器破菌壁的方法能够更高效的提取 BALF 中微量的宏基因组 DNA, 为进一步的测序和菌群分析打下基础。

**关键词:** 慢性阻塞性肺疾病, 支气管肺泡灌洗液, 宏基因组 DNA

**中图分类号:** Q93-3      **文章编号:** 0001-6209 (2014) 08-0943-07

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary diseases, COPD) 是呼吸系统的常见病、多发病。其病理基础和核心环节是慢性气道炎症<sup>[1]</sup>。在 COPD 发展过程中, 反复的急性加重严重影响患者的生活质量, 并且是 COPD 患者发病率和死亡率

升高的主要原因之一。细菌感染被认为是引起 COPD 加重的最重要的危险因素之一。近年来, 细菌在稳定期 COPD 患者的下呼吸道定植已在国内外受到关注, 越来越多的研究发现可能与 COPD 加重相关。因此, 明确患者下呼吸道致病菌群对于认识

**基金项目:** 北京大学医学部-密歇根大学医学院转化医学与临床研究联合研究所, 转化医学-密西根项目 (BMU20110176)

\* 通信作者。Tel: +86-10-82265210; E-mail: puh3\_hb@bjmu.edu.cn

**作者简介:** 王娟 (1980 -), 女, 安徽省庐江人, 助理研究员, 博士, 研究方向为分子生物学和微生物学。E-mail: wangjuand@126.com

**收稿日期:** 2013-11-25; ; **修回日期:** 2014-01-10

COPD 疾病发展具有重要意义。

一直以来,下呼吸道细菌的实验室检查主要依赖于痰和支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluids, BALF) 细菌培养。但由于环境中 99.8% 的微生物不能用常规的培养方法培养,细菌培养的结果未必能真实反映下呼吸道的菌群情况,苛养菌和不常见菌更是难以鉴别。利用非培养依赖的分子生物学方法对环境中的微生物进行研究可突破传统方法的限制。Handelsman 等<sup>[2]</sup>于 1998 年提出的建立未培养微生物宏基因组文库的设想,把对未培养微生物的研究引入到一个新的层次,获取高质量的 DNA 是进行宏基因组研究的先决条件。BALF 可以更好反映小气道细菌定植情况,但相较于其他标本, BALF 中的细菌含量很低,因此如何高效的提取 BALF 中微生物的宏基因组 DNA 并且避免外源细菌的污染是进一步明确菌群组成的关键步骤。本研究以 COPD 患者的支气管肺泡灌洗液为样本,用 DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN) 试剂盒提取 DNA 并对其方法进行优化,可以有效提取 BALF 中微量的细菌 DNA,并能够顺利创建测序所用的 DNA 文库,便于后续的 454 测序反应进行菌群分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 患者情况:**受试者来自于 2012 年北京大学第三医院呼吸科门诊就诊的稳定期 COPD 患者共 10 例,其中男性 9 例,女性 1 例,年龄 40 - 80 岁。诊断符合慢性阻塞性肺病全球倡议慢性阻塞性肺疾病诊治标准。受试者临床稳定,在 2 月内没有改变用药或发生急性加重,支气管扩张剂后 (FEV<sub>1</sub>/FVC) < 70%, 现在吸烟或既往吸烟 > 10 包年。所有患者均签署知情同意书。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN) 试剂盒, UltraClean™ Fecal DNA Bead Tube (MOBIO), Centrifuge 5415D 和 5417R (Eppendorf), 多功能生物样品匀质器 (Bertin® Precellys 24), DNA 浓度检测用 Qubit® dsDNA BR Assay Kit (INVITROGEN) 和 Qubit® 2.0 Fluorometer, PCR 扩增仪为 DNAEngine® Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD) 和 Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), 用 Agilent 2100

生物分析仪 (Agilent Technologies) 进行 DNA 文库质控。

### 1.2 BALF 样本采集

用 1% 的利多卡因对患者进行口咽部局部麻醉,静脉推注咪达唑仑 5 mg。患者取仰卧位,予吸氧、心电血压监测。用支气管镜行支气管肺泡灌洗术,对拟要灌洗肺段经气管镜活检孔注入 1% 利多卡因局部麻醉,将气管镜嵌入右肺中叶或左肺上叶舌段的一个亚段,共注入 120 mL 加热至 37°C 的生理盐水,用 50mL 注射器回收后,4°C 存放并尽快送到实验室。分装后高速离心,15600 × g 4°C 离心 30 min,弃上清,细胞沉淀 -80°C 冻存备用。

### 1.3 宏基因组 DNA 提取

**1.3.1 酚-氯仿法提取 DNA:**每 5mL 细胞沉淀加 500μL 细胞裂解液完全裂解细胞,按照经典的酚-氯仿法<sup>[3]</sup>提取 DNA,所得 DNA 冻存于 -80°C 冰箱。

**1.3.2 试剂盒步骤优化法:**由于革兰氏阳性菌的菌壁较厚不易破碎完全,没有充分破壁会导致最终测序结果不能真实反应菌群情况。为了充分提取 BALF 的宏基因组 DNA,在 QIAGEN 试剂盒常规提取步骤前参考文献 [4 - 5] 用研磨珠结合多功能生物样品匀质器对细胞进行前处理。这种方法利用研磨珠在高速振荡下产生的机械冲力破坏细菌的细胞壁和细胞膜,使细胞内容物包括基因组成分释放出来。具体为:每 5 mL BALF 细胞沉淀加入 360μL Buffer ATL,转至 MOBIO 的研磨珠管内,用多功能生物样品匀质器 5000 r/min 振荡 1 min 后,加入 40 μL 蛋白酶 K,55°C 孵育 1 h 后,将管内液体转至新管,加入 Buffer AL 裂解细胞,其余步骤按照说明书进行。

### 1.4 总 DNA 定量

由于从 BALF 提取的 DNA 浓度通常较低,相较于常用的分光光度法,荧光法对微量 DNA 的检测更灵敏,因此 DNA 浓度检测使用 Qubit® dsDNA BR Assay Kit 试剂盒,按照说明书步骤进行操作。

### 1.5 PCR 扩增细菌 16S rDNA

使用细菌 16S rDNA 通用引物进行扩增。引物 1 序列为: 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 引物 2 序列为: 1496R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 扩增反应体系为 Premix Taq (TaKaRa) 25 μL, 引物各 (10 μmol/L) 2 μL, 模板 DNA 2 μL, 加去离子水至总体积 50 μL。反应参数: 95°C 40 s,

60℃ 30 s (每个循环降 1℃), 72℃ 90 s, 10 个循环; 95℃ 40 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 20 个循环; 72℃ 延伸 10 min。0.5 × TAE 配制 1% 的琼脂糖凝胶检测 16S rDNA 扩增结果。

### 1.6 构建 16S rDNA 文库

为了进行 454 测序, 运用标准化引物 517F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 907R (5'-CCGTCAATTCMTTGTGAGTTT-3')、结合相应的核苷酸条形码和罗氏 A、B 引物构建 16S rDNA 扩增子文库。具体步骤见参考文献 [6]。所建文库纯化后用 Agilent 2100 进行质控。

### 1.7 统计学分析

用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析。偏态分布的计量资料用中位数和四分位数间距表示, 用非参数分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DNA 定量结果

Qubit 试剂盒运用特异性嵌合到双链 DNA 的荧光染料进行定量, 受盐离子、蛋白等干扰小, 定量结果更精确灵敏, 对微量 DNA 样本的定量更准确。通过 DNA 浓度可以初步判断, 2 种方法提取的 DNA 量有很大不同。酚-氯仿法提取 5 mL BALF 得到 DNA 浓度为 1.90 (0 - 12.25)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , DNA 总量为 95.0 (0 - 612.5) ng, 而改良后的方法提取 DNA 浓度为 9.35 (2.70 - 33.95)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , DNA 总量为 467.5

(135.0 - 1697.5) ng。(图 1) 可见应用 QIAGEN DNA 提取试剂盒结合研磨珠和多功能生物样品匀质器破碎菌壁能够提高 BALF 的宏基因组 DNA 提取效率。

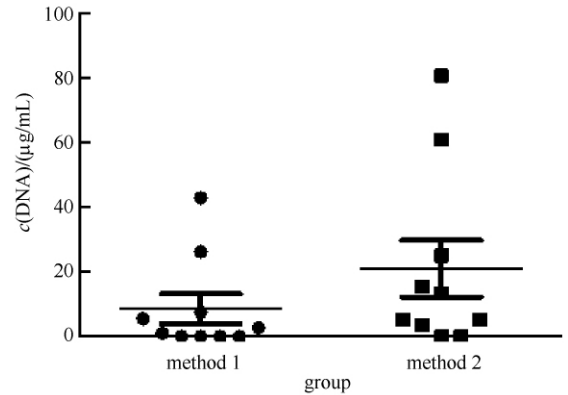


图 1. 两种方法提取的 DNA 浓度比较

Figure 1. Comparison of DNA concentration. Method 1: Phenol-chloroform extraction method. Method 2: The optimized method. DNA concentration of BALF with optimized protocols was significantly higher than those extracted with phenol-chloroform.

### 2.2 细菌 16S rDNA 扩增结果

由于所提取的 DNA 中同时包含人类基因组和微生物基因组, 并且人类基因组占主体, 为了进一步验证 2 种 DNA 提取方法的不同, 对细菌 16S rDNA 进行扩增, 取 5  $\mu\text{L}$  扩增产物行琼脂糖凝胶电泳, 目的条带约 1.5 kb 大小。从图 2 可见同样条件下改良后的试剂盒方法扩增的产物明显多于酚-氯仿法。

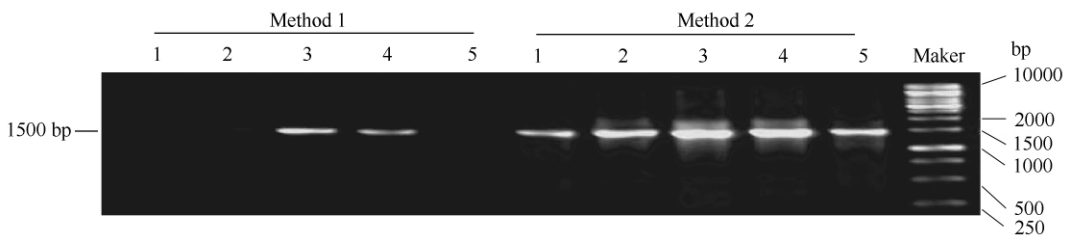


图 2. 两种方法提取的 DNA 进行 16S rDNA 扩增的结果分析

Figure 2. Electrophoresis analysis of 16S DNA amplification. Method 1: Phenol-chloroform extraction method. Method 2: The optimized method. Lane 1 - 5, DNA from BALF sample 1 - 5. PCR products of 16S rDNA extracted with optimized methods were much more than those extracted with phenol-chloroform.

### 2.3 细菌 16S rDNA 建库结果

由于建库所用引物是带有测序条形码的融合引物, 加大了扩增的难度, 因此我们将提取的 DNA 按照 454 测序的标准构建 DNA 文库, 并用 Agilent

2100 检测扩增子浓度。有别于琼脂糖凝胶电泳, Agilent 2100 在检测产物片段大小的同时还能对产物进行定量, 并且通过峰图进行直观的体现。从图 3 可见改良后的试剂盒方法建库得到的扩增子的质

量浓度和摩尔浓度均多于酚-氯仿法 ( $P = 0.002$ ),

并且可以用于进一步测序。

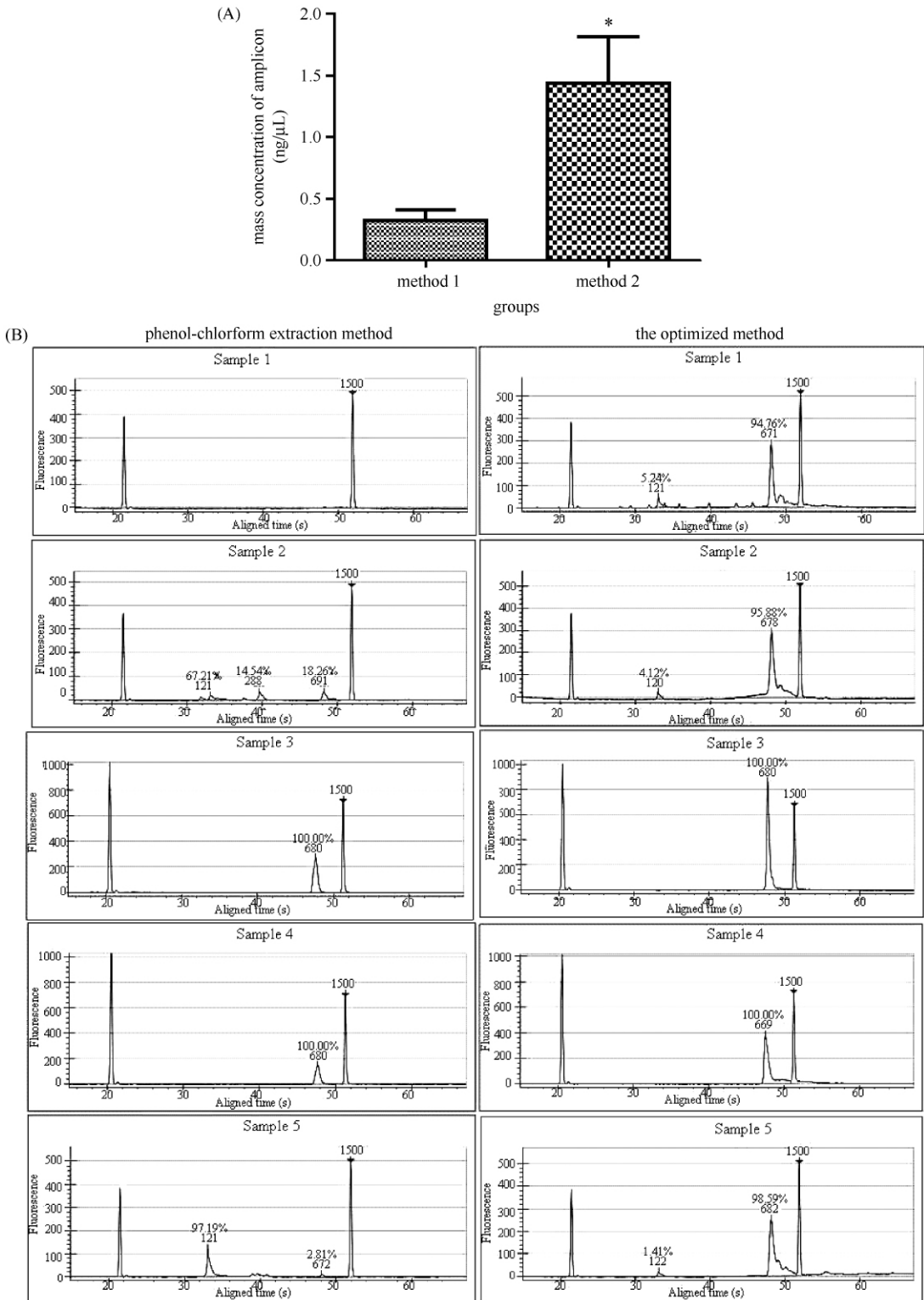


图 3. 16S rDNA 文库建库质量比较

Figure 3. Comparison of 16S rDNA amplicon libraries. A: Mass concentration of amplicon. Method 1: Phenol-chloroform extraction method; Method 2: The optimized method. B: Capillary electrophoretogram. Marker: 15bp and 1500bp. More amplicons can be obtained with optimized methods. \*  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

不同于咳痰标本,在支气管镜应用的基础上发展起来的支气管肺泡灌洗技术可以获得气管镜所不能探及的下气道的细胞和溶质,能更全面的反映肺部的整体情况,有“液性肺活检”之称。因此通过 BALF 明确下呼吸道菌群有重要的临床价值。以往的微生物研究主要基于实验室培养技术。由于培养条件的限制,传统的培养技术难以真实反映样本中细菌的种类和丰度。宏基因组学技术不依赖微生物培养,通过直接提取微生物基因组遗传物质,对微生物群体进行研究分析,更全面真实的反映菌群情况。自 1991 年 Pace 等<sup>[7]</sup>首次提出环境基因组学的概念并构建了海洋浮游微生物 DNA 文库以来,科学家们已经构建了土壤微生物<sup>[8]</sup>,海洋微生物<sup>[9]</sup>,肠道微生物<sup>[10]</sup>,口腔微生物<sup>[11]</sup>等多种宏基因组文库。

进行肺部细菌宏基因组学研究的第一步就是制备总 DNA。有别于肠道微生物研究中的粪便样品和呼吸道中的痰样本,BALF 中的细胞含量较少,而且主要成分是人体细胞,细菌含量非常低,这样导致从 BALF 提取的 DNA 中大部分都是人类基因组。同时由于 COPD 患者自身的肺部状况限制,能得到的 BALF 量明显少于患有其他肺部疾病得到的 BALF 量,因此对于 COPD 患者而言如何高效的提取 BALF 宏基因组 DNA 就显得更为重要。样品总 DNA 的提取方法大体上可分为直接提取法和间接提取法。直接提取法是直接裂解样品中的微生物细胞而使其 DNA 得以释放。间接提取法则先采用物理方法将微生物从样品中分离出来,去除杂质后抽提 DNA,不过此法容易丢失微生物物种信息。由于 BALF 体积较大,细胞含量又太少,所以我们先通过高速离心富集细胞,然后再提取细胞 DNA。提取的总 DNA 中虽然同时含有人类基因组和微生物基因组,通过后期的设计引物扩增特异的细菌基因片段,可以排除人类基因组的干扰。传统的 DNA 制备方法是裂解细胞后,运用酚-氯仿进行抽提。这种方法提取 DNA 操作繁琐、耗时较长,得到的 DNA 量及纯度均较低,同时,自行配制 DNA 提取试剂极易引入环境菌,质量控制不如试剂盒有保证。而用试剂盒提取 DNA 本身比较简便易操作,DNA 得率和纯度比传统的手工提取方法要高,一致性好,而且不易受到

环境细菌的污染。

在对 COPD 患者肺泡灌洗液进行研究时我们发现,大部分标本不能提取出满意的宏基因组 DNA。分析原因是由于细菌的细胞壁比较坚硬不易破碎完全,尤其是革兰氏阳性菌,有效的破碎细胞壁才能获得全部菌群的基因组,特别是对于含有微量细菌的标本就更为重要。常用的破壁方法有 3 种:①物理法:冻融法、超声法、玻璃球珠击打法、液氮碾磨法;②化学法:用 SDS 处理细胞;③酶解法:加入溶菌酶或蜗牛酶,都可使细胞壁破碎。QIAGEN 的试剂盒中建议用溶菌酶配制成酶解液进行前期处理。由于近期有研究显示用蛋白酶 K 以外的其他酶类裂解细菌会导致菌群结果向易被酶裂解的细菌(葡萄球菌)偏移<sup>[12]</sup>,同时考虑到 BALF 样本中细菌含量低,外源菌体污染会对结果产生很大偏差,我们选择了用 MOBIO 公司的研磨珠结合多功能生物样品匀质器械破壁的方法<sup>[4]</sup>。相较于多篇文献中使用传统的可回收的高压灭菌玻璃珠,由于高压灭菌也无法清除残留的菌体 DNA,对于 BALF 这种细菌含量低的样本会影响分析结果。而 MOBIO 的一次性研磨珠可以直接加入样品,通过多功能生物匀质器高速振荡 1min 即可破壁,不但避免了细菌的二次污染,并且有操作简便、快速、高效的优点,在充分提取样品宏基因组 DNA 的步骤中作用非常关键。由于文献中使用的 Roche 公司的全自动核酸提取仪器 MagNA Pure Compact system 及配套试剂盒价格昂贵,无法在普通实验室操作,所以我们使用 Qiagen 试剂盒手动提取 DNA。

实验结果表明,改良后的方法提取 BALF 的 DNA 浓度为 9.35 (2.70 - 33.95)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,明显高于传统酚-氯仿抽提法提取的 DNA 浓度 1.90 (0 - 12.25)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,改良后的 PCR 扩增产物亦明显多于改良前。因此,使用 DNA 提取试剂盒优化法可以有效的提取样本中微量的宏基因组 DNA。由于 COPD 病人个体间的差异较大,因此等量 BALF 中的 DNA 含量明显不同,细菌 DNA 所占的比例也不同。此外,在构建 DNA 文库时,由于融合引物中包含样本条形码,增加了建库的难度。为了验证所提取的 DNA 是否能顺利建库,我们按照测序的要求又对提取的 DNA 进行了 16S rDNA 可变区的扩增。Agilent 2100 检测发现,优化后所得到的 DNA 文库扩增子浓度亦高于酚-氯仿抽提法 ( $P = 0.002$ )。整套实验

所需的相关仪器和试剂购置容易,简单易用,结果稳定可重复性好,方便同时处理多个样品,也适用于其他小量样品的宏基因组 DNA 制备,在普通实验室即可进行。不过与传统方法相比,费用相对较高。细菌宏基因组与疾病的关系还有待于进一步的研究。通过对不同年龄、COPD 不同阶段病人的 BALF 进行高通量测序分析和比对,可能寻找到重要的致病微生物,也能为临床进行合理的抗生素治疗提供依据。

## 参考文献

- [1] Kim V, Rogers TJ, Criner GJ. New concepts in the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2008, 5 (4): 478-485.
- [2] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 1998, 5 (10): R245-R249.
- [3] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 6.4-6.12.
- [4] Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, Young VB, Toews GB, Curtis JL, Sundaram B, Martinez FJ, Huffnagle GB. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PLoS One*, 2011, 6 (2): e16384.
- [5] Borewicz K, Pragman AA, Kim HB, Hertz M, Wendt C, Isaacson RE. Longitudinal analysis of the lung microbiome in lung transplantation. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 339 (1): 57-65.
- [6] Bailey MT, Dowd SE, Parry NM, Galley JD, Schauer DB, Lyte M. Stressor exposure disrupts commensal microbial populations in the intestines and leads to increased colonization by *Citrobacter rodentium*. *Infection and Immunity*, 2010, 78 (4): 1509-1519.
- [7] Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173 (14): 4371-4378.
- [8] Bunterngsook B, Kanokratana P, Thongaram T, Tanapongpipat S, Uengwetwanit T, Rachdawong S, Vichitsoonthonkul T, Eurwilaichitr L. Identification and characterization of lipolytic enzymes from a peat-swamp forest soil metagenome. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2010, 74 (9): 1848-1854.
- [9] Hu Y, Fu C, Huang Y, Yin Y, Cheng G, Lei F, Lu N, Li J, Ashforth EJ, Zhang L, Zhu B. Novel lipolytic genes from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72 (2): 228-237.
- [10] Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464 (7285): 59-65.
- [11] Wang J, Qi J, Zhao H, He S, Zhang Y, Wei S, Zhao F. Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Scientific Reports*, 2013, 15 (3): 1843. doi: 10.1038/srep01843.
- [12] Zhao J, Carmody LA, Kalikin LM, Li J, Petrosino JF, Schloss PD, Young VB, LiPuma JJ. Impact of enhanced staphylococcus DNA extraction on microbial community measures in cystic fibrosis sputum. *PLoS One*, 2012, 7 (3): e33127.

# Preparation of metagenomic DNA from bronchoalveolar lavage fluids of patients with chronic obstructive pulmonary diseases

Juan Wang<sup>1,3\*</sup>, Ning Shen<sup>1,3</sup>, Yipeng Du<sup>1,3</sup>, John R Erb-downward<sup>2,3</sup>, Gary B Huffnagle<sup>2,3</sup>, Margaret R Gyetko<sup>2,3</sup>, Bei He<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

<sup>2</sup>Division of Pulmonary & Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, University of Michigan Health System, Ann Arbor, MI 48109, USA

<sup>3</sup>The Joint Institute of Peking University Health Sciences Center and University of Michigan Health System, Beijing 100191, China

**Abstract:** [Objective] To optimize the method of isolating a small amount of metagenomic DNA efficiently from bronchoalveolar lavage fluids (BALF) of patients with stable chronic obstructive pulmonary diseases (COPD), which will facilitate subsequent PCR and DNA sequencing. [Methods] BALF (5mL) of stable COPD patients was spun down to collect the cells. To extract genomic DNA from Gram-positive bacteria more efficiently, QIAGEN's DNA extraction protocol was optimized as follows: Added Buffer ATL to the pellets and used bead tubes and tissue homogenizers to break cell walls; then added proteinase K and incubated; after adding Buffer AL and ethanol, pipetted the mixture into a DNeasy spin column then centrifuged; washed the column with Buffer AW1 and Buffer AW2, finally added 50 $\mu$ L Buffer AE to elute DNA. After measuring the total DNA concentration, the bacterial 16S rDNA was amplified by PCR and amplicon libraries were created for further determination. [Results] The DNA content of BALF with optimized protocols was 467.5 (135.0-1697.5) ng, which was significantly higher than those extracted with phenol-chloroform 95.0 (0 - 612.5) ng. After optimizing, more 16S rDNA PCR production can be obtained for future analysis ( $P = 0.002$ ). [Conclusion] The optimized DNA extraction methods combining DNA isolation kits with bead-beating were more efficient in isolating tiny metagenomic DNA from BALF.

**Keywords:** chronic obstructive pulmonary diseases, bronchoalveolar lavage fluids, metagenomic DNA

(本文责编:王晋芳)

Supported by the UMHS-PUHSC Joint Institute for Translational and Clinical Research Translational Medicine -Michigan Project (BMU20110176)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-82265210; E-mail: puh3\_hb@bjmu.edu.cn, wangjuand@126.com

Received: 25 November 2013 / Revised: 10 January 2014