

# 无菌小鼠肺部微生物移植 Respiratory Microbiome Transplantation in Germ-free Mice

杨雨婷<sup>1, #</sup>, 冯锐沛<sup>2, #</sup>, 李经强<sup>3</sup>, 吴鹏辉<sup>1</sup>, 王璋<sup>2, \*</sup>, 商海涛<sup>4, \*</sup>, 魏泓<sup>1, 3, \*</sup>

<sup>1</sup>中山大学附属第一医院无菌动物研究平台, 广州, 广东省

<sup>2</sup>华南师范大学生命科学学院, 广州, 广东省

<sup>3</sup>上海第十人民医院, 上海

<sup>4</sup>深圳医学科学院, 深圳, 广东省

\*通讯作者邮箱: [wangz@m.scnu.edu.cn](mailto:wangz@m.scnu.edu.cn); [shanghaitao@smart.org.cn](mailto:shanghaitao@smart.org.cn); [weihong63528@163.com](mailto:weihong63528@163.com)

#共同第一作者/同等贡献

## 摘要

呼吸道微生物组的研究是一个相对较新的领域, 近期研究表明肺部微生物群与哮喘、慢性阻塞性肺疾病、囊性纤维化、肺癌等多种肺部疾病密切相关, 肺部微生物失调被认为是许多慢性肺病的重要诱因或加重因素。无菌小鼠由于其绝对无菌的微生物背景, 可以通过肺泡灌洗液、痰液、肺组织、菌液等获取供体样本, 利用无菌小鼠肺部微生物移植模型研究肺部微生物和人类健康或疾病的因果关系, 是人体微生物组和肺部疾病微生物组研究的有效途径。这里, 我们详细描述如何进行样品采集、处理、移植、评价, 从而实现无菌小鼠肺部微生物移植的整个过程和技术方法。

**关键词:** 无菌小鼠, 肺部微生物移植, 微生物组

## 背景

在过去的十年中，人类对微生物组的研究主要集中于肠道和其他富含微生物的环境，逐渐扩展至先前被认为是无菌的部位例如肺部。早期对肺部细菌的鉴定依赖传统细菌培养技术，但该方法对于细菌种类的检测具有局限性。随着分子生物学技术的发展，通过采集肺泡灌洗液或痰液样本，结合测序技术识别肺部微生物组，至此肺部微生物组研究进入了新的发展阶段。

已有研究揭示肺部微生物群与多种肺部疾病如哮喘、慢性阻塞性肺疾病、囊性纤维化、肺癌的关系。其中肺部微生物失调被认为是许多慢性肺病的重要诱因或加重因素，某些特定微生物的过度增殖或缺乏与疾病的严重程度和进展密切相关。无菌小鼠由于其绝对无菌的微生物背景使其成为人体微生物组研究的理想模式动物和核心技术工具。可通过无菌小鼠肺部微生物移植模型直接研究肺部菌群和人类健康或疾病的因果关系，是人体微生物组和疾病微生物组研究的重要方法。通过该模型的建立，以提高对肺部微生物组在呼吸道疾病中作用的理解，推动呼吸道微生物组的发展。未来也可以开发通过饮食、益生菌或选定的细菌移植来改变呼吸道微生物组，成为呼吸道疾病的新治疗策略。

## 材料与试剂

1. 生理氯化钠溶液（四川科伦药业股份有限公司，货号：B14200853444）
2. 磷酸盐缓冲盐（碧云天生物技术公司，Beyotime，货号：C0221A）
3. 过氧乙酸（广州瑞思特医疗科技有限公司，货号：PD0028）
4. 甘油（Millipore Sigma，货号：G7893）
5. 三溴乙醇（Sigma-Aldrich，货号：75-80-9）
6. 75%酒精（山东利尔康医疗科技股份有限公司）
7. 1 mL 无菌注射器（上海康德莱企业发展集团股份有限公司，货号：60017031）
8. 手术剪（上海医疗器械有限公司手术器械厂，货号：Y00030）
9. 眼科镊（海斯迪克，货号：HKCL-20）
10. 留置针（贝朗梅尔松国际医疗有限公司，货号：4254511-03）
11. 棉线（深圳众石科学仪器有限公司，货号：10203）
12. 1.5 mL 离心管（Thermo Scientific Nunc，货号：32195455321）
13. 脑心浸出液培养基（Thermo Scientific，货号：CM1032B）
14. 胰蛋白胨大都肉汤（Thermo Scientific，货号：CM1016T）
15. 哥伦比亚 CNA 血琼脂平板（9 cm）（青岛海博生物，货号：HBPM0153）
16. 厌氧产气袋（Mitsubishi, 广州科荣生物有限公司，货号：MGC-016）
17. 除菌过滤器（默克，Millipore，货号：SLGP033R）
18. N-乙酰-L-半胱氨酸（Macklin，货号：N800425）
19. 气管插管（南京卡尔文生物科技有限公司，货号：KW-800）

## 仪器设备

1. 离心机（Thermo Fisher Scientific，货号：thermo FRESCO 21）
2. -80 °C超低温冰箱（Thermo Fisher Scientific，货号：902GP-ULTS）
3. 高温高压灭菌器（山东新华医疗器械股份有限公司，实验动物专用型灭菌器，货号：BIST-A-D910-D-B）
4. 实验室匀浆机（YL/友联仪器，货号：FSH-2A）

引用格式：杨雨婷，冯锐冲，李经强，吴鹏辉，王璋，商海涛，魏泓. (2024). 无菌小鼠肺部微生物移植. *Bio-101* e2405566. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405566.

How to cite: Yang, Y. T., Feng, R. P., Li, J. Q., Wu, P. H., Wang, Z., Shang, H. T. and Wei, H. (2024). Respiratory Microbiome Transplantation in Germ-free Mice. *Bio-101* e2405566. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405566. (in Chinese)

5. 洁净工作台（苏净安泰空气技术有限公司，AIRTECH，货号：BCM-1000A）
6. 微生物培养箱（Thermo Fisher，货号：IMH180）
7. PH 计（梅特勒托利多，货号：FE28）
8. 小鼠气管插管辅助台（淮北达斯加尔生物科技有限公司，货号：DS-CGT）

## 实验步骤

### 一、样本采集与处理

可用于无菌小鼠肺部微生物移植的供体样本包括肺泡灌洗液、肺组织、痰液、细菌等。低生物量微生物组的采样方法需要根据其特定的环境和生物背景定制。

当选择人类作为移植供体样本时，可选肺泡灌洗液（Bronchoalveolar Lavage Fluid, BALF）或痰液。建议首选采集 BALF，因与通过活检获得的人体肺组织样本相比，BALF 提供的采样表面积更大，后者通常具有较小的样本量并在解剖学上位于外围位置，因此与活检标本相比，BALF 样本具有更高的细菌活性。痰液样本提供了一种非侵入性的替代方法。痰液样本与支气管肺泡灌洗液的微生物群特征具有一定的一致性但不能准确反映所有下呼吸道微生物群。支气管肺泡灌洗液采样仍应是研究下呼吸道微生物组的黄金标准，在无法获取支气管样本的情况下，痰液样本可作为支气管肺泡灌洗液的有效替代物。

当选择小鼠供体作为移植样本时，可选小鼠肺泡灌洗液或肺组织，由于小鼠肺泡灌洗液采样表面积小，一般建议将小鼠全肺组织作为首选移植样本。

细菌样本适用于需要移植特定单菌、多菌或菌群时可通过传统的培养方法获得移植样本。

#### 1. 人肺泡灌洗液（BALF）收集与处理

人肺泡灌洗液采集应按照临床指示支气管镜检查的标准安全和监测程序进行。上呼吸道、口腔等部位以及下呼吸道是肺部微生物组的潜在来源，支气管镜插入路径对肺泡灌洗液菌群丰度无明显影响，经鼻支气管镜检查可最大限度地减少上呼吸道微生物群污染支气管镜通道的可能性，可根据临床情况选择样本采集方式。

- a. 通过临床经口或经鼻支气管镜检查收集肺泡灌洗液，插入支气管镜时应避免抽吸以防上呼吸道微生物群转移造成污染。将纤支镜楔入右中叶或左舌叶，使用无菌生理氯化钠溶液进行支气管肺泡灌洗，每个病人 3–4 次抽吸每次 50 mL，可收集约 130–300 mL 肺泡灌洗液，从中取出 4 mL 作为移植的供体样本。通常 1 个病人的肺泡灌洗液用于供给 1 只受体小鼠，可根据不同实验需求自行调整用量。
- b. 将收集的 BALF 置于冰上，以  $2,000\times g$ ，4 °C 离心 10 分钟，去除病人宿主细胞沉淀，保留上清液在冰上，建议最多储存 3 小时。
- c. 上清液以  $12,000\times g$ ，4 °C 离心 10 分钟，得到细菌沉淀，用无菌 PBS 5%(w/v) 重悬沉淀，使重悬菌液  $OD_{600} = 0.5$ ，得到最终移植的肺部菌群样本。
- d. 若无法立即使用肺部菌液样本，应将 1c 步骤中的细菌沉淀加入 25% 无菌甘油，在 -80 °C 超低温冰箱中建议保存时长为 2 周。冻存样本在冰上复苏，以  $12,000\times g$ ，4 °C 离心 10 分钟并去除甘油上清液，保留细菌沉淀，将每个样本重新悬于无菌 PBS 中。

注：步骤 1c 中重悬液体体积需根据实验移植小鼠数量而定，以每只小鼠 50  $\mu$ L 计算。

#### 2. 人类痰液样本处理

痰液被认为由下气道衍生的粘液栓组成，通常会被咳出、收集和分析，以深入了解肺部微生物。实验所需的 EP 管、移液枪头、甘油等耗材，需经高温高压灭菌后置于超净工作台中。

- a. 对于稀薄的痰液样本收集后可加入 2 倍体积的无菌 PBS 5%(w/v)，用枪头吹打均匀，加入甘油至终浓度 10%，样本可放置在 -80 °C 超低温冰箱中长期保存，建议可保存到直至使用。

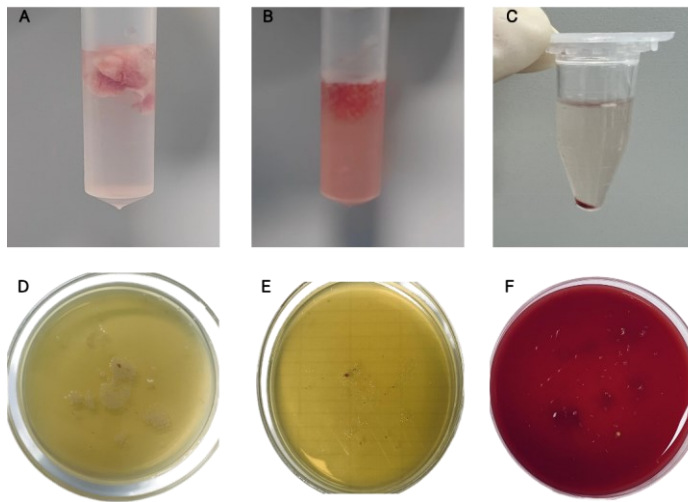
- b. 对于黏稠的痰液样本，收集后加入 1 倍体积的乙酰半胱氨酸进行液化，以  $2,000\times g$  离心 10 分钟，去除沉淀保留上清液。
    - c. 上清液以  $12,000\times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$  离心 10 分钟，保留细菌沉淀。
    - d. 向细菌沉淀中加入 25% 无菌甘油重悬沉淀，在  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中建议保存时长为 2 周。
    - e. 冻存样本在冰上复苏，以  $12,000\times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$  离心 10 分钟并去除甘油，保留细菌沉淀。向细菌沉淀中加入无菌 PBS 5%(w/v) 进行重悬，重悬液体积需根据实验移植小鼠数量而定，以每只小鼠  $50\mu\text{L}$  计算。
  3. 小鼠肺泡灌洗液 (BALF) 收集与处理
    - a. 将取材所需手术剪、镊子、EP 管等器材经灭菌干燥后放入超净工作台，所有小鼠肺泡灌洗液均在超净工作台下收集，以避免外来成分污染。一般 2 只小鼠的肺泡灌洗液作为供体给 1 只受体小鼠，可根据不同实验需求自行调整小鼠用量。
    - b. 取健康成年小鼠作为提供肺泡灌洗液供体，在小鼠中进行肺泡灌洗 (Bronchoalveolar Lavage, BAL) 时，每次灌洗的体积为  $500\text{--}800\mu\text{L}$ 。
    - c. 用 1.25% 三溴乙醇 ( $25\text{ mg / kg}$ ) 通过  $1\text{ mL}$  注射器腹腔注射麻醉小鼠。
    - d. 75% 酒精对小鼠颈部进行常规消毒，用手术剪刀剪开颈部皮肤，将唾液腺剥离，并沿着胸骨舌骨肌纵向切开肌肉，以暴露气管。在气管下面放一根棉线，在气管上切开小口。将滞留针插入气管约  $0.5\text{ 厘米}$ ，不可插入过深以免导致肺结构受损，用棉线固定气管和针。
    - e.  $1\text{ mL}$  注射器中吸入  $800\mu\text{L}$  冰上预冷的生理盐水，接上滞留针头，反复抽吸三次后将回收的灌洗液注入放置在冰上的  $1.5\text{ mL}$  EP 管中。每只动物重复两次抽吸过程，共收集 3 管灌洗液。
    - f. 合并每只小鼠的三次连续肺泡灌洗液用于制备 BALF，合并的 BALF 以  $12,000\times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$  离心 10 分钟，得到细菌沉淀，用无菌 PBS 5%(w/v) 重悬沉淀，使重悬菌液  $\text{OD}_{600}=0.5$ ，得到最终移植的 BALF 样本，该样本建议应现配现用。
    - g. 若无法立即使用 BALF 样本，应向 3f 步骤中获得的细菌沉淀中加入 25% 无菌甘油，在  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中建议保存时长为 2 周。冻存样本在使用之前，需将每个样本重新悬浮在  $2\text{ mL}$  无菌 PBS 中。
  4. 小鼠肺组织样本处理

一般 1 只小鼠的肺组织作为供体给 1 只受体小鼠，可根据不同实验需求自行调整小鼠用量。

    - a. 将取材所需手术剪、镊子、EP 管等器材经灭菌干燥后放入超净工作台。所有小鼠的肺部均在消毒后的超净工作台下收集，以避免外来成分污染。
    - b. 用手术剪刀剪开胸腔，用镊子夹着气管与肺组织连接处，去除气管不留任何上呼吸道部分，用此方法收集左胸腔两片肺叶。
    - c. 将肺叶转移至含有  $500\mu\text{L}$  生理氯化钠溶液的匀浆器中， $500\times g$  均化 20s。均质化后以  $2,000\times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$  离心 7 分钟，去除组织细胞保留上清液以供移植。
    - d. 若无法立即使用样本，应将 4d 步骤中上清液样本以  $12,000\times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$  离心 10 分钟，去除上清并向细菌沉淀中加入 25% 无菌甘油，在  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中建议保存时长为 2 周。

注：采集的菌体沉淀复苏后仅用于 DNA 提取或分析，可经液氮速冻后转移至  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中长期保存，无需添加甘油作为冷冻保护剂。
  5. 细菌样本处理

涉及病原微生物的实验，应按 GB19489 的规定在相应的生物安全防护级别实验室按要求开展实验。可根据实验需求选择多菌、单菌、细菌裂解物进行移植。根据细菌的不同特性，选择合适的培养基，在特定温度和培养条件下进行细菌培养。也可从 BALF 和肺组织样本中（图 1）分离出纯菌落并传代培养以供移植，将分离物在  $37^{\circ}\text{C}$  下新鲜培养过夜，并在无菌 PBS 中洗涤 3 次，最终获菌液浓度约为  $5\times 10^5\text{ CFU}$  的移植样本。细菌样本建议现配现用，样本分装于灭菌离心管内密封，按照无菌传递要求将该样品传递进入隔离器内对动物进行移植。



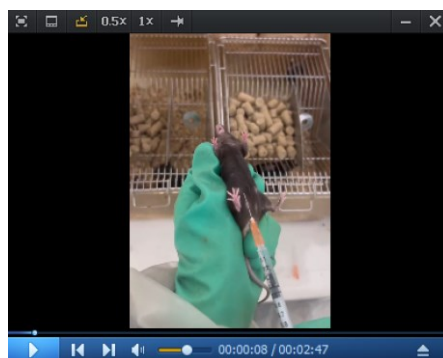
**图1. 肺组织样本中分离菌株样本。** A. 解剖获得小鼠肺叶组织样本。B. 均质化后的样本。C. 离心后得组织沉淀和上清液。D. 上清液接种至BHI平板（厌氧）培养48小时的菌落生长情况。E. 上清液接种至TSA平板（厌氧）培养48小时的菌落生长情况。F. 上清液接种至血琼脂平板（厌氧）培养48小时的菌落生长情况。

## 二、肺部微生物移植方法

滴鼻技术可将菌液输送到小鼠的上呼吸道和下呼吸道，多用于上呼吸道的研究。通过滴鼻给药部分菌液可以定植到肺部，其余部分通过鼻腔粘膜吸收进入全身循环并在其他脏器中定植。气管滴注适用于将菌液直接递送到下呼吸道和肺部的研究，可最大限度地实现局部作用并最小化全身吸收。

### 1. 无菌小鼠滴鼻

- 将 1.25%三溴乙醇（25 mg/kg）提前在超净台内用除菌过滤器无菌化处理后和 1 mL 无菌注射器、菌液样本在外包装无菌消毒后传入隔离包中。
- 腹腔注射麻醉药，麻醉后静置小鼠观察小鼠呼吸，小鼠进入睡眠状态且有心跳则说明麻醉成功。
- 用左手拇指和食指第一、二指节抓住无菌小鼠耳后的颈部皮肤将其拎起，用无名指和小指夹其背部皮肤和尾部将其固定，同时应防止动物窒息。使其头、颈和身体呈直线，使其头部充分暴露。
- 用 1 mL 注射器吸取 50  $\mu$ L 菌液，连接注射器和气管插管（22G）将菌液逐滴滴入小鼠鼻腔，待其自动吸入说明滴注成功，注意滴注速度不可过快（视频 1）。



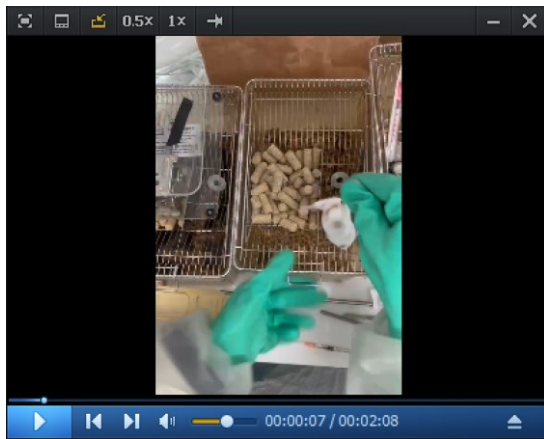
**视频 1. 无菌小鼠滴鼻**

引用格式：杨雨婷，冯锐冲，李经强，吴鹏辉，王璋，商海涛，魏泓. (2024). 无菌小鼠肺部微生物移植. *Bio-101* e2405566. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405566.

How to cite: Yang, Y. T., Feng, R. P., Li, J. Q., Wu, P. H., Wang, Z., Shang, H. T. and Wei, H. (2024). Respiratory Microbiome Transplantation in Germ-free Mice. *Bio-101* e2405566. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405566. (in Chinese)

## 2. 无菌小鼠气管滴注

- 将 1.25% 三溴乙醇提前在超净台内用 0.22  $\mu\text{m}$  除菌过滤器无菌化处理后和 1 mL 注射器、菌液样本在外包装无菌消毒后传入隔离包中。
- 1 mL 注射器提取 50  $\mu\text{L}$  菌液，并更换注射针头为气管插管（22G），将其置于一旁备用。
- 使用 1.25% 三溴乙醇（25 mg/kg）进行腹腔注射，等待小鼠麻醉后将其仰卧固定在啮齿动物工作台上。
- 门齿环将小鼠的门齿固定在操作台上，胶带固定上肢，缓慢将工作台倾斜至 45 度。
- 头灯从隔离包外照射小鼠的口腔，用镊子向上提起舌头，并用压舌板固定舌头，使气管清晰可见。
- 观察小鼠的声门随着呼吸而开启和闭合。在声门开启的瞬间，缓慢将气管插管插入小鼠气管。
- 气管插管成功后，沿气管插管注射 50  $\mu\text{L}$  菌液，确保菌液全部进入小鼠肺部。插管针头拔出时，气管中有气泡冒出则确认滴注成功。
- 小鼠在啮齿动物操作台竖立 1 分钟后，缓慢放平操作台，将小鼠放回饲养笼中（视频 2）。  
注：常规按照 14 天间隔移植方案进行滴鼻和气管滴注。



视频 2. 无菌小鼠气管插管

## 三、肺部菌群定植检测（可选）

在移植后 14 天可通过收集受体小鼠肺泡灌洗液和肺叶组织样本进行微生物培养或分子诊断技术，以确认定植效果。与传统 PCR 技术相比，ddPCR 技术具有更低的检测限度和更大的动态监测范围，细菌载量丰富度较低的样本（基因拷贝数低于  $10^5$ ）可使用该技术进行细菌 DNA 定量分析和菌株差异分析。从移植后的小鼠组织样本中提取细菌 DNA，采用引物进行 PCR 扩增，获得 16S rRNA 基因扩增产物，为避免 DNA 提取过程中造成样本污染，使用无标本 DNA 分离做为阴性对照。所有肺标本和阴性对照均采用两个技术重复。

肺部样品中 16S rRNA 的浓度极低非常接近 qPCR 的检测下限。在微生物组分析中设置阴性和阳性对照，注意杂菌在收集和测序过程中的混淆作用。采用引物进行 PCR 扩增，获得 16S rRNA 基因扩增产物。针对 V3-V4 区的 Illumina MiSeq 测序适配器来生成细菌 16S rRNA 扩增子，大约 150ng 的 BALF DNA 作为模板，用于评估呼吸道微生物多样性，其他样本分析可参照执行。

## 溶液配方

### 1. 无菌处理说明

引用格式：杨雨婷，冯锐沛，李经强，吴鹏辉，王璋，商海涛，魏泓. (2024). 无菌小鼠肺部微生物移植. *Bio-101* e2405566. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405566.

How to cite: Yang, Y. T., Feng, R. P., Li, J. Q., Wu, P. H., Wang, Z., Shang, H. T. and Wei, H. (2024). Respiratory Microbiome Transplantation in Germ-free Mice. *Bio-101* e2405566. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405566. (in Chinese)

手术剪，镊子，留置针，棉线，EP 管，甘油等经 121 °C 15 分钟高压灭菌，所有液体溶剂经 0.22 μm 除菌过滤器过滤后使用。

2. 物品传递时所需 3%过氧乙酸配制液

**原液配制：**将过氧乙酸 A 液和 B 液按 1: 1 体积混合，在室温下静置 24 小时。

**工作液配制：**取原液用灭菌水(纯水经 132 °C，60 分钟高温高压灭菌) 稀释 4 倍，制成为过氧乙酸 3% 的稀释液。

3. 培养基配置

**胰蛋白胨大豆琼脂平板(TSA) 配置：**30 g 胰蛋白胨大豆琼脂(干粉)、琼脂 15 g、水 1 L，121 °C 高压灭菌 15 分钟，调整 PH 值为 pH7.3 ± 0.2 并分装。

**脑心浸出液琼脂平板(BHI)配置：**37 g 脑心浸出液培养基(干粉)、琼脂 20g、水 1 L，121 °C 高压灭菌 15 分钟，调整 PH 值为 pH 6.8–7.2 并分装。

## 致谢

感谢魏泓教授和王璋教授团队全体成员的建议和帮助。

## 参考文献

1. Liang, W., Yang, Y., Gong, S., Wei, M., Ma, Y., Feng, R., Gao, J., Liu, X., Tu, F., Ma, W., et al. (2023). Airway dysbiosis accelerates lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Cell Host Microbe*. 31(6): 1054–1070.e9. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.04.018>
2. Yan, Z., Chen, B., Yang, Y., Yi, X., Wei, M., Ecklu-Mensah, G., Buschmann, M. M., Liu, H., Gao, J., Liang, W., et al. (2022). Multi-omics analyses of airway host–microbe interactions in chronic obstructive pulmonary disease identify potential therapeutic interventions. *Nat Microbiol*. 7(9): 1361–1375. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01196-8>
3. Das, S., Bernasconi, E., Koutsokera, A., Wurlod, D. A., Tripathi, V., Bonilla-Rosso, G., Aubert, J. D., Derkenne, M. F., Mercier, L., Pattaroni, C., et al. (2021). A prevalent and culturable microbiota links ecological balance to clinical stability of the human lung after transplantation. *Nat Commun*. 12(1): e1038/s41467–021–22344–4. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22344-4>
4. Combs, M. P., Wheeler, D. S., Luth, J. E., Falkowski, N. R., Walker, N. M., Erb-Downward, J. R., Lama, V. N. and Dickson, R. P. (2021). Lung microbiota predict chronic rejection in healthy lung transplant recipients: a prospective cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine* 9(6): 601–612. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30405-7](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30405-7)
5. Han, M. K., Zhou, Y., Murray, S., Tayob, N., Noth, I., Lama, V. N., Moore, B. B., White, E. S., Flaherty, K. R., Huffnagle, G. B. et al. (2014). Association between lung microbiome and disease progression in IPF: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2(7): 548. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70069-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70069-4)
6. Helms, M. N., Torres-Gonzalez, E., Goodson, P. and Rojas, M. (2010). Direct Tracheal Instillation of Solutes into Mouse Lung. *J Visualized Exp*. 42: e3791/1941–v. <https://doi.org/10.3791/1941-v>
7. Huffnagle, G., Dickson, R. and Lukacs, N. (2017). The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. *Mucosal Immunol*. 10(2): 299–306. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.108>
8. Carney, S. M., Clemente, J. C., Cox, M. J., Dickson, R. P., Huang, Y. J., Kitsios, G. D., Kloepfer, K. M., Leung, J. M., LeVan, T. D., Molyneaux, P. L., et al. (2020). Methods in Lung Microbiome Research. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 62(3): 283–299. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2019-0273tr>