

MALDI-TOF-MS 鉴定铜绿假单胞菌“虚拟仿真实验平台”的设计与探索*

赵俊清¹,任艳茹¹,陈思含¹,马冰杰¹,黄刚²,马艳侠²,楚曼^{1,2△}

1. 陕西中医药大学医学技术学院,陕西咸阳 712046;2. 陕西中医药大学附属医院检验科,陕西咸阳 712046

摘要:通过撰写脚本、录制视频和软件建模等手段,设计微生物培养前处理、仪器的使用及鉴定原理和实验考核 3 大模块,构建实验教学系统和实验辅助教学平台,阐述临床微生物学检验虚拟仿真实验的建设思路与设计方案。该虚拟仿真实验平台可以帮助学生变抽象为具体,学习全自动快速生物质谱检测系统鉴定铜绿假单胞菌的基本原理和操作流程,为微生物学检验应用型专业人才的培养提供了实践平台,促进了医学检验人才培养质量的提高。

关键词:虚拟仿真; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 铜绿假单胞菌

中图分类号:R37

文献标志码:B

文章编号:1672-9455(2023)03-0423-04

全自动快速生物质谱检测系统简称质谱,在微生物鉴定领域具有广泛应用,其打破了传统微生物鉴定时烦琐的流程,大大缩短了样本的检测时间,在灵敏度、分析速度和鉴定等方面也具有充分的优越性。但是,受仪器设备、经费、场地等多方面因素的限制,大多数高校检验学院/系无法配置与课程相关的所有实体仪器辅助教师理论教学,无法为学生提供“一对一”的实践平台。因此,不仅教师的教学质量会受到影响,学生分析解决问题和动手操作的能力也将大打折扣。

随着计算机电子信息技术的成熟,虚拟仿真实验可以用“平民化”的技术成本发挥虚拟仪器在教学中的重要作用,并且虚拟仿真仪器可以比实体仪器更好地呈现出仪器的内部结构和部件,帮助学生将抽象的内容具体化,更好地理解仪器的原理和操作^[1]。虚拟仿真技术的成熟和普及,推动了虚拟仿真实验在科学研究和实验教学方面的广泛应用,也促使教学和研究更加高效化。快速准确的微生物鉴定是临床重要需求之一。由于微生物具有区别于其他种类的特殊蛋白质,因而拥有独特的蛋白质指纹图谱,质谱鉴定方法是目前最好的技术^[2]。本文旨在通过对质谱原理、结构等的介绍,构建学习和考核于一体的沉浸式虚拟仿真实验平台。通过该平台,学生可以更好地学习并掌握基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)的原理、结构、操作流程及结果判断。

1 铜绿假单胞菌鉴定实验

铜绿假单胞菌俗称绿脓杆菌,是一种抗药性强,

致病率较低的非发酵革兰阴性杆菌,广泛存在于自然界中,主要存在于空气、土壤及水体中^[3]。饮用、食用及使用被铜绿假单胞菌污染的饮用水、食物或化妆品等,在抵抗力较差、长期使用广谱抗菌药物的人群中极易引发感染^[4]。目前,经常使用生化鉴定法、培养法、聚合酶链反应等分子生物学方法对其进行检测,现今,新发展起来的 MALDI-TOF-MS,是通过对微生物蛋白质的分析来鉴定细菌,此方法适用于生物活性物质的大规模、高通量、快速筛选,目前,已经成为临床快速诊断、环境监测和微生物研究的重要方法^[5]。

1.1 实验的目的与原理 本实验的目的是学习质谱鉴定铜绿假单胞菌的方法,掌握 MALDI-TOF-MS 的基本原理和操作方法,能够熟练使用仪器并解决实验中出现的问

题,提高临床实践能力和动手能力。
本实验的原理是将微生物样本与基质溶液滴在样品板上,溶剂挥发后,形成样本与基质的结晶物质,基质从激光中吸收能量,使样本吸附在极高的真空状态下,基质与样本之间发生电荷转移使得样本分子电离,形成离子束^[6]。样本离子束经高压加速和聚焦后导入飞行时间质谱分析器,利用离子在电场和磁场中的运动性质,进行质量分析,检测器收集不同质荷比的离子,并以质荷比为横坐标,以离子相对强度为纵坐标形成特异性的蛋白质组指纹图谱,然后与标准图谱库进行比对,得到鉴定结果^[7]。见图 1。

1.2 实验流程 本实验处理方法采用甲酸裂解法。甲酸裂解法是临床应用较多的一种微生物处理方法,

* 基金项目:教育部高等教育司产学研合作育人项目(202101283009);大学生创新创业训练计划项目(X202110716116);陕西中医药大学《临床检验仪器与技术》线上线下混合式一流课程建设项目。

△ 通信作者,E-mail:2071013@sntcm.edu.cn。

该方法是在菌落涂布后滴加 60%~70% 的甲酸溶液,待晾干后,再滴加基质溶液,这样有助于细胞更好地裂解^[8]。

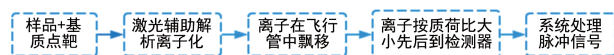


图1 铜绿假单胞菌鉴定实验原理

1.3 MALDI-TOF-MS 鉴定铜绿假单胞菌实验的不足 MALDI-TOF-MS 价格高昂,学校无法批量购买,不能满足学生亲自操作的需求;大型贵重设备的操作需要具备一定的原理知识和操作经验,否则容易造成设备的损坏;仪器较为精密,需要认真维护;质谱数据库亟待完善。目前临床使用的标准数据库主要来自布鲁克和梅里埃两大厂家,其数据库中的菌株大部分来自国际菌株,不能满足国内本土化的微生物鉴定需要^[9]。

2 虚拟仿真实验设计

虚拟仿真实验系统主要由实验教学系统和实验辅助教学平台组成,其中实验教学系统用来帮助学生完成实验,可分为虚拟实验平台、虚拟场景、虚拟仪器功能、教学模式与考核模式介绍 4 个板块;实验辅助教学平台是为了辅助学生更好地理解实验,主要有资料模块、实验模块和问答模块。

2.1 实验教学系统

2.1.1 虚拟实验平台 学生可直接通过用户登录模块登录虚拟仿真实验教学系统,输入用户名和密码登录并选择相应实验项目,便可得到实验指导书,学生应在熟悉流程后进行实验,完成并提交后,系统可在线批改并发布实验成绩^[10]。

2.1.2 虚拟场景 使用 MALDI-TOF-MS 仪器检测临床中的样本主要包括 3 个步骤,分别是对样本进行预处理,仪器检测样本,以及和数据库对比得出结果^[11]。本文的虚拟试验就是通过实际实验的操作步骤基于 3D 技术构建三维交互式的质谱仪虚拟仿真实验系统。在建造场景的过程中要尽量保证虚拟场景与现实比例大致一致,以及考虑不同物体间放置距离是否合理,还原实际情况实验场景的布置,使学生可以沉浸式体验实验,体验真实感^[12]。

学生在进行实验时,可以通过观看仿真动画来了解实验的工作原理,包括基本结构(含透视化的内部构造)、开关机、校准和质控、鉴定、维护及软件结果解读和出报告等功能模块。仪器基本结构,尤其是离子源(基质辅助激光电离源)和飞行时间质量分析器可 360° 观看内外结构并配有详细的解说文字,通过结构解说引出每部分结构的功能,进而通过 3D 动画呈现

出仪器原理,同时学生能够在观看学习视频时,可以快进或快退,甚至对画面效果也可进行改变,便于学生更好地理解^[13]。实验构建了质谱仪、恒温培养箱、移液器、培养皿、接种环等实验所需的虚拟模型,学生通过鼠标点击进行操作实验的进一步执行,可以提高学生的实践能力及逻辑思维能力。

2.1.3 虚拟仪器功能 结合实验需求选取需要实现仪器的主要功能:普通琼脂培养基、1 μL 接种环用于微生物的培养, MALDI-TOF MS 用于微生物鉴定,二级生物安全柜用于保护工作人员和实验环境,显微镜用于观察微生物,微量移液器和枪头用于定量转移液体等。

2.1.4 教学模式与考核模式 建立铜绿假单胞菌质谱鉴定的学习模式和考核模式。学习模式提供实验规范操作步骤题型和操作要领提示,考核模式要求数据库自动记录操作者实际操作情况。在教学中学生通过中文字幕的提示及对实验的了解进行操作,若学生完成当前界面所需的操作,系统则会自动进入下一界面;若学生操作过程中有忽略的步骤,系统将给予提示并计入后台系统中。整个实验完全结束后,系统将根据学生的操作表现及后台所记录的失误进行评分。

2.2 实验辅助教学平台

2.2.1 资料模块 主要包括了质谱仪的结构、原理、操作及注意事项、仪器的发展史、铜绿假单胞菌及考核小知识的资料,方便学生更好地了解实验,完成实验。

2.2.2 实验模块 学生在此模块进行实验,完成后可查询历史实验记录及分值,了解进行实验时的不足,以便下一次更好地完成。每一个步骤是否得分都可以查询到。在实验结束后,学生需要向系统提交一份实验报告,包括实验目的、实验原理、仪器使用、实验操作、实验结果、讨论与反思^[14]。

2.2.3 问答模块 学生如果在实验进行中或结束后,对某一操作或某一结果有疑问,可以在此发布,还可与其他学生交流探讨,解答疑惑^[15]。

3 虚拟仿真项目的实验内容与步骤

3.1 实验内容 实验内容包括标本前处理、仪器的使用及结果判定 2 大模块,标本前处理部分主要包括标本采集和标本处理 2 个步骤,且标本处理需要经过细菌培养、溶液配制和菌株选择 3 个过程;仪器的使用及结果判定部分包括学习实验原理、仪器开关机、质控菌株校准、点样检测、电子图库对比鉴定、仪器的维护与保养。

3.2 实验步骤

3.2.1 铜绿假单胞菌检测的临床适用范围 虚拟实验室以人机对话形式展示临床就诊过程及检验项目的选择。

3.2.2 培养前处理 以选择题的形式从系统所给选项中选择正确标本类型然后进入虚拟实验操作界面选择所需器材进行细菌的分离培养。

3.2.3 微生物培养 在操作台上选择所需的器材,模拟真实接种步骤进行操作,尤其注意无菌操作及平板划线法的正确操作方法,学生需正确完成平板划线的接种步骤才能到达下一步骤的实验操作,选择恒温培养箱温度时需调节到铜绿假单胞菌最合适的生长温度及正确的培养时间,无论选择的温度和时间是否正确都可以得出一个结果提示^[16]。根据所选器材的正确性及操作过程得分。

3.2.4 配制溶液 采用选择题的形式选择实验所需溶液,按系统设定的溶液配制顺序进入相应溶液配制界面进行操作。在操作台上选择所需溶液及器材,模拟真实配制溶液过程操作。注意每种溶液的量及比例。

3.2.5 样品处理及质控菌株校准 以选择题的形式选择所需器材及试剂,正确进行仪器的开机及点样等操作。每个实验步骤均预设指标,依据此指标系统自动判分。首先将标准菌株 ATCC9027 铜绿假单胞菌转种至 MH 平板上 37 °C 孵育过夜,每次检查样品前使用 ATCC9027 铜绿假单胞菌的特征峰校准飞行时间质谱。此步操作注意事项同铜绿假单胞菌的接种相同。点样操作:(1)取出恒温培养箱中培养好的样本平板;(2)在操作台上选择一次性接种环和靶板,挑取单菌落少许菌体,在靶板的靶点内涂布成一个薄层;(3)点击“下一步”,再次选择所需仪器,采用微量移液管吸取 1 μ L 的 α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)溶液并在样品点上覆盖 1 μ L 的 HCCA 溶液,与样品混合;(4)点击“晾干”按钮并得到下一步提示,在室温下自然晾干(约 10 min)^[17]。

3.2.6 鉴定 点击 IN/OUT 按钮启动 MALDI 板的装载和弹出过程,将样品靶板放入装载端口关上盖子,在计算机上设定合适的激光能量、质谱扫描范围等参数,开启质谱数据采集,通过软件调控靶板位置从而选择不同的测量位置。数据采集完成后,将经过自动处理质谱数据自动/手动传入本地微生物指纹图谱库即微生物鉴定系统中鉴定结果。

3.2.7 仪器检测原理及临床相关知识的学习与巩固 学生完成实验后自动弹出仪器原理和临床疾病

相关知识的视频,如临床表现、作用机制、其他实验室检查等,观看之后弹出相应习题。

3.3 考核方式与结果设定 实验的考核选用“通关式”的过程性考核,学生在依次完成前一阶段的所有作答后,即可进入下一作答环节,直至作答完毕^[18]。实验平台设置学习模式和考核模式。学生只有通过学习模式的学习后方可进入考核模式。考核模式下,学生可根据系统提示,进行样本采集、样本处理、仪器操作等^[19]。同时,回答题目过程中学生需根据自身知识储备和实际操作等做出正确解答,回答正确即可进入下一实验操作并获得相应分数。

实验结果由过程考核、题目回答和实验报告体现。实验结束,系统会根据学生实际操作给出各阶段各主要操作步骤得分,以及答题分数。实验完成,学生可获得包括实验原理、实验操作、实验结果等在内的实验报告,以便巩固自查。

4 小 结

MALDI-TOF-MS 不仅在生物鉴定方面具有明显的鉴定优势,在医学鉴定领域的应用也更加广泛,在检验医学中也发挥着尤为重要的作用。与此同时,考虑到数据库中数据量的可能增加,在使用该技术的过程中需不断更新参考数据库,以期其检测准确性和检测性能的进一步提升^[20]。因此,基于 MALDI-TOF-MS 构建的虚拟仿真实验平台,不仅对传统教学有所助力,同时也能够推进实验教学的进一步优化。虚拟和实际的相结合,会在很大程度上提高学生的积极性,从而促进教学高质量化。另外,尽管建设虚拟仿真实验平台已成为教育教学中的一种实际需求,但在这个教育趋势发展的同时,仍存在这样或那样的问题。虽然通过虚拟实验确实可以在一定程度上解决实验教学经费、场地等现实问题,但是虚拟仿真并不能完全代替实际操作的真实体验。因此,教育教学还应以实际操作为主,辅以虚拟实验。“虚拟仿真”能实不虚、虚实结合,实现虚拟仿真实验的使用效果最大化。

参考文献

- [1] 万莉,张红,吴民沪,等.医学检验技术专业虚拟仿真实验室的建设与思考[J].国际检验医学杂志,2020,41(7):889-991.
- [2] 雷冬,朱飞鹏,殷德顺,等.力学虚拟仿真教学实验室建设的探讨[J].实验技术与管理,2014,31(12):95-96.
- [3] 李金玲,李文茹,谢小保,等.铜绿假单胞菌的耐药与异质性耐药研究进展[J].工业微生物,2021,51(5):58.
- [4] 陈松,李红,李德华,等.桶装饮用水中铜绿假单胞菌污染

- 情况分析[J]. 现代预防医学, 2015, 42(6): 1129-1135.
- [5] 谢田刚, 王运铎, 郑秋月, 等. 铜绿假单胞菌的 MALDI-TOF-MS 检测方法的建立[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(10): 938-940.
- [6] 周龙荣, 徐元宏. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 分析在丝状真菌实验诊断中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1): 5-8.
- [7] 陈飞, 胡玢婕, 赵虎. MALDI-TOF MS 在临床微生物样本直接检测中的应用[J]. 检验医学, 2015, 30(7): 750-756.
- [8] 丁进亚. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱应用于临床微生物快速鉴定诊断[J]. 华南国防医学杂志, 2018, 32(4): 286-289.
- [9] ZHU M, LI C, ZHAO S, et al. The role of three-dimensional reconstruction of medical images and virtual reality in nursing experimental teaching [J]. J Health Eng, 2022; 3853193.
- [10] 王作昭, 李薇茹, 王雪松, 等. 食品中沙门氏菌检验虚拟仿真实验研究[J]. 食品安全导刊, 2021, 313(20): 180-182.
- [11] SOLIMAN M E, ADEWUMI A T, AKAWA O B, et al. Simulation models for prediction of bioavailability of medicinal drugs-the interface between experiment and computation[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2022, 23(3): 86.
- [12] 周思洁, 杨泽亮, 董子和, 等. 基于 Unity3D 的气相色谱仪虚拟仿真实验系统的构建[J]. 色谱, 2016, 34(6): 621-624.
- [13] 曾照芳, 安琳. 基于虚拟仿真技术的血细胞分析仪模型构建[J]. 现代医学仪器与应用, 2008, 20(1): 38-40.
- [14] 许飞, 聂志妍, 金磊, 等. “高效价兔抗绵羊红细胞抗体的制备与检测”虚拟仿真实验项目的设计与探索[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(2): 231-234.
- [15] 李鑫怡, 谢伙生, 钱若杨, 等. 流式细胞仪检测细胞凋亡的虚拟仿真实验[J]. 福建电脑, 2020, 36(7): 22-26.
- [16] 薛金方, 邓海云, 黄涌泉. 铜绿假单胞菌耐药性分析[J]. 中国实用医药, 2016, 11(14): 172-173.
- [17] 孙晓霞, 张亦琴, 王旭旭, 等. 基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱法对铜绿假单胞菌的鉴定与聚类分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 6047-6054.
- [18] 付阳, 陈思, 夏君香, 等. 构建外周血细胞分析相关手工检验的虚拟仿真项目[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(16): 2035-2038.
- [19] 杜斌, 赵鹏, 郭辉, 等. 膝关节解剖虚拟仿真实验项目脚本的设计与路径[J]. 解剖学研究, 2018, 40(4): 311-313.
- [20] 左瑞菊. 质谱技术在微生物检测和鉴定中的应用[J]. 医学食疗与健康, 2020, 18(21): 180-181.

(收稿日期: 2022-04-04 修回日期: 2022-10-25)

(上接第 422 页)

- [31] ZINMAN B, ARODA V R, BUSE J B, et al. Efficacy, safety, and tolerability of oral semaglutide versus placebo added to insulin with or without metformin in patients with type 2 diabetes; the PIONEER 8 trial[J]. Diabetes Care, 2019, 42(12): 2262-2271.
- [32] HUSAIN M, BIRKENFELD A L, DONSMARK M, et al. Oral semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes[J]. N Engl J Med, 2019, 381(9): 841-851.
- [33] ALFAYEZ O M, ALMOHAMMED O A, ALKHEZI O S, et al. Indirect comparison of glucagon like peptide-1 receptor agonists regarding cardiovascular safety and mortality in patients with type 2 diabetes mellitus; network meta-analysis[J]. Cardiovasc Diabetol, 2020, 19(1): 96.
- [34] HANSEN B B, NUHOHO S, ALI S N, et al. Oral semaglutide versus injectable glucagon-like peptide-1 receptor agonists; a cost of control analysis[J]. J Med Econ, 2020, 23(6): 650-658.
- [35] BAIN S C, HANSEN B B, MALKIN J P, et al. Oral semaglutide versus empagliflozin, sitagliptin and liraglutide in the UK: long-term cost-effectiveness analyses based on the PIONEER clinical trial programme[J]. Diabetes Ther, 2020, 11(1): 259-277.
- [36] MOSENZON O, BLICHER T M, ROSEN LUND S, et al. Efficacy and safety of oral semaglutide in patients with type 2 diabetes and moderate renal impairment (PIONEER 5): a placebo-controlled, randomised, phase 3a trial[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2019, 7(7): 515-527.
- [37] DAVIES M, PIEBER T R, HARTOFT-NIELSEN M L, et al. Effect of oral semaglutide compared with placebo and subcutaneous semaglutide on glycemic control in patients with type 2 diabetes; a randomized clinical trial[J]. JAMA, 2017, 318(15): 1460-1470.
- [38] AVGERINOS I, MICHAELIDIS T, LIAKOS A, et al. Oral semaglutide for type 2 diabetes; a systematic review and meta-analysis[J]. Diabetes Obes Metab, 2020, 22(3): 335-345.
- [39] NUHOHO S, GUPTA J, HANSEN B B, et al. Orally administered semaglutide versus glp-1 ras in patients with type 2 diabetes previously receiving 1-2 oral antidiabetics; systematic review and network meta-analysis[J]. Diabetes Ther, 2019, 10(6): 2183-2199.

(收稿日期: 2022-04-15 修回日期: 2022-09-26)