



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101982773 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 30

(21) 申请号 201010281374. 7

(22) 申请日 2010. 09. 15

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号

(72) 发明人 彭池方 陈伟 匡华 刘丽强 胥传来

(74) 专利代理机构 北京华夏博通专利事务所 (普通合伙) 11264

代理人 孙东风

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1680407 A, 2005. 10. 12,

CN 1562963 A, 2005. 01. 12,

CN 1945331 A, 2007. 04. 11,

CN 101231293 A, 2008. 07. 30,

US 2006240418 A1, 2006. 10. 26,

CN 1825118 A, 2006. 08. 30,

刘楠. 多农兽药残留检测的高通量悬浮芯片技术研究. 《中国人民解放军军事医学科学院博士学位论文》. 2009,

刘楠等. 高通量悬浮芯片技术检测多农兽药残留. 《分析化学》. 2010, 第 38 卷 (第 5 期),

姚丽等. 液相芯片技术原理及应用简介. 《现代肿瘤医学》. 2008, 第 16 卷 (第 12 期),

Martins 等. Development of a multiplexed fluorescent immunoassay for the quantitation of antibody responses to group A streptococci. 《Journal of Immunological Methods》. 2006, 第 316 卷 (第 1-2 期),

彭娟等. 液相芯片技术定量检测人血清 CEA、AFP 和 NSE. 《热带医学杂志》. 2007, 第 7 卷 (第 1 期),

审查员 寇飞

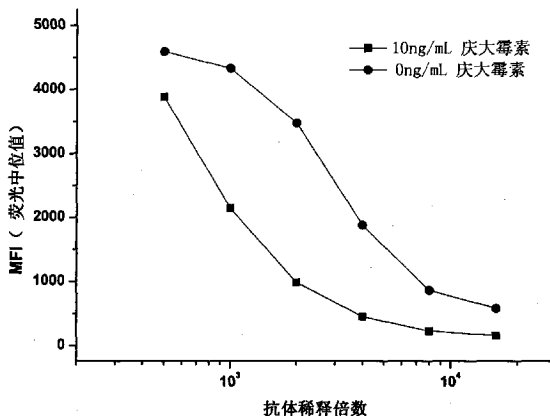
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

庆大霉素液相芯片探针的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及免疫化学技术领域的一种庆大霉素液相芯片探针的制备方法,其通过采用碳化二亚胺法,以甘氨酸、3-氨基丙酸或4-氨基丁酸修饰羧基化聚苯乙烯荧光微球表面,再通过碳化二亚胺法将庆大霉素分子标记到荧光微球表面的方式,制成庆大霉素液相芯片探针。该庆大霉素液相芯片探针的制备方法简便操作,稳定性好,且产物具有优良的庆大霉素靶向性,可为庆大霉素的液相芯片测试技术开发提供了更为方便的途径。



1. 一种庆大霉素液相芯片探针的制备方法,其特征在于,该方法为:

(1) 取羧基化聚苯乙烯荧光微球经过水洗,离心并去除上清液后,加入 pH 值为 6.0 ~ 7.0、浓度为 0.05M ~ 0.2M NaH_2PO_4 溶液中,令该磷酸缓冲盐溶液中所含荧光微球的浓度为 $5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^4$ 个 / μL ,漩涡混合 1min,然后超声 1 ~ 5min,而后加入过量新鲜配置的 50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐水溶液和 50mg/ml 水溶性碳二亚胺水溶液,漩涡混合 10s 后,形成混合反应溶液,而后将该混合反应溶液于室温下暗处震荡孵育 20min,孵育完成后,离心移去上清,将沉淀分散于浓度为 0.01wt% ~ 0.1wt% 的甘氨酸、3-氨基丙酸或 4-氨基丁酸溶液中,并于室温下暗处再次孵育 15 ~ 30min,而后离心移去上清,沉淀以 pH 值为 7.2 ~ 8.0、浓度为 0.05M ~ 0.2M 的 NaH_2PO_4 溶液洗涤两次,制得初次活化后的荧光微球;

(2) 将上述初次活化后的荧光微球加入过量新鲜配制的含 50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐和 50mg/ml 水溶性碳二亚胺的水溶液中,漩涡混合 10s 后,室温下暗处震荡孵育 20min,完成对荧光微球的再次活化,其后加入过量的含 0.01 ~ 1 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的磷酸缓冲盐溶液,室温下暗处震荡孵育 1 ~ 2h,离心移去上清,以 pH 值为 7.2 ~ 8.0、浓度为 0.05M ~ 0.2M 的 NaH_2PO_4 溶液洗涤沉淀物两次,制得目标产物庆大霉素液相芯片探针,该目标产物悬浮于贮存液中保存,所述贮存液采用 pH 值为 7.2 ~ 8.0,浓度为 0.05M ~ 0.2M 的磷酸缓冲盐溶液,其含 0.1 ~ 1.0wt% 牛血清白蛋白、0.01 ~ 0.05wt% 吐温 -20 和 0.05 ~ 0.2wt% 叠氮钠。

2. 根据权利要求 1 所述的庆大霉素液相芯片探针的制备方法,其特征在于:步骤 (1) 中,所述超声的频率为 20KHz。

庆大霉素液相芯片探针的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫化学技术领域的一种庆大霉素检测试剂的制备方法,尤其涉及一种庆大霉素液相芯片探针的制备方法。

背景技术

[0002] 庆大霉素 (Gentamicin) 属氨基糖苷类抗生素药物,对革兰氏阴性菌如大肠杆菌、沙门氏菌、肺炎球菌、变形杆菌属、肠杆菌属、巴斯德氏菌、志贺菌属等具有高度的抗菌活性,在人类及家畜临床中应用广泛。庆大霉素的毒副作用为具有一定的肾毒性和肝毒性。动物治疗中,由于不规范用药等原因,导致在动物组织及食品中残留庆大霉素,从而会带来一定的食品安全风险。因此,许多国家都对庆大霉素在动物组织或动物源食品中规定了最大残留限量。

[0003] 对于动物食品中庆大霉素的残留,国内外多以色谱-质谱联用法、酶联免疫法为主,色谱-质谱联用法检测灵敏度高,但是对实验室仪器和人员要求高,检测方法复杂,检测通量较低,成本较高,实际中难以满足大量样本的检测需求。酶联免疫法检测成本较低,但是一般检测药物种类单一,检测线性范围窄。

[0004] 液相芯片技术是美国 Luminex 公司开发的一种多功能的分析平台。它将流式检测与芯片技术有机地结合在一起,在保持高通量检测的同时,将反应体系由液相-固相反应改变为液相反应体系,对于确保高级结构之上的蛋白质相互作用尤为关键。液相芯片技术的载体是聚苯乙烯所制作的微珠,包覆不同比例的红光及红外光发色剂,可产生 100 种不同比例颜色的微珠,每一种用于标记探针的微珠都带有一个独特的色彩编号。每一种微球采用不同探针标记,并将标记探针的微珠与待测物在液相中反应,反应产物通过液相芯片的检测通道,每次仅允许一个微球通过检测通信道,通过两种激光检测激发,红色激光可定位微球的编码地址,绿色激光则激发待测样本的报告分子 (R- 藻红蛋白) 实现样本目标物的定量分析。液相芯片的检测模式可以实现检测目标物的多样性,对样品利用率高,检测速度快,可根据实际检测对象的需要对不同种类的探针进行组合,灵活性大。

[0005] 近年来,在液相芯片系统中实现了对小分子药物的检测。小分子药物液相芯片探针的制备工艺常见的方法为:首先制备小分子半抗原与载体蛋白的偶联物,然后将这种偶联物与羧基化的荧光微球反应,从而得到该小分子的液相芯片探针。这种工艺采用载体蛋白为连接臂,由于载体蛋白与小分子偶联反应以及偶联物与微球的反应重复性较差,限制了其实际中的应用推广。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提出一种庆大霉素液相芯片探针的制备方法,其采用在液相芯片用的荧光微球表面标记庆大霉素分子的方式,构建出一种可特异性识别庆大霉素抗体的新型免疫分析固相界面,其可进一步开发应用于庆大霉素的液相芯片模式检测,从而克服了现有技术的不足。

[0007] 为实现上述发明目的,本发明采用了如下技术方案:

[0008] 一种庆大霉素液相芯片探针的制备方法,其特征在于,该方法为:

[0009] (1) 取羧基化聚苯乙烯荧光微球均匀分散于 pH 值为 6.0 ~ 7.0, 含 0.05M ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲溶液中,经超声处理后,再加入过量新鲜配置的 50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐和 50mg/ml 水溶性碳二亚胺水溶液,均匀混合后,室温下暗处震荡孵育 15 ~ 30min,而后离心移去上清,加入过量 0.01% ~ 0.1% 的甘氨酸、3-氨基丙酸或 4-氨基丁酸溶液,均匀混合后,室温下暗处孵育 15 ~ 30min 后,离心移去上清,以 pH 值为 7.2 ~ 8.0、浓度为 0.05M ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲溶液洗涤沉淀物,制得初次活化后的荧光微球;

[0010] (2) 将上述初次活化后的荧光微球加入过量新鲜配制的含 50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐和 50mg/ml 水溶性碳二亚胺的水溶液中,均匀混合后,室温下暗处震荡孵育 15 ~ 30min,完成对荧光微球的再次活化,其后加入过量的含 0.01 ~ 1 μ g/mL 庆大霉素的磷酸盐缓冲溶液,室温下暗处震荡孵育 1 ~ 2h,离心移去上清,以 pH 值为 7.2 ~ 8.0、浓度为 0.05M ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲溶液洗涤沉淀物,制得目标产物庆大霉素液相芯片探针。

[0011] 进一步地讲:步骤(1)中,所述羧基化聚苯乙烯荧光微球是经水洗处理后,再被分散于 pH 值为 6.0 ~ 7.0、浓度为 0.05M ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲溶液中的。

[0012] 步骤(1)中,所述超声处理的时间为 1 ~ 5min,超声频率为 20KHz。

[0013] 所述庆大霉素液相芯片探针是被悬浮于贮存液中保藏的,所述贮存液为 pH 值为 7.2 ~ 8.0,浓度为 0.05M ~ 0.2M 的磷酸缓冲盐溶液(PBS),其含 0.1 ~ 1.0wt% 牛血清白蛋白、0.01 ~ 0.05wt% 吐温-20 和 0.1wt% 叠氮钠。

[0014] 所述磷酸缓冲盐溶液为含 0.8% wtNaCl 的磷酸盐缓冲液。

[0015] 该方法具体为:

[0016] (1) 取羧基化聚苯乙烯荧光微球经过水洗,离心并去除上清液后,加入 pH 值为 6.0 ~ 7.0、浓度为 0.05M ~ 0.2M 磷酸盐缓冲溶液中,令该磷酸盐缓冲溶液中所含荧光微球的浓度为 $5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^4$ 个/ μ L,漩涡混合 1min,然后超声 1 ~ 5min,而后加入过量新鲜配置的 50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐水溶液和 50mg/ml 水溶性碳二亚胺水溶液,漩涡混合 10s 后,形成混合反应溶液,而后将该混合反应溶液于室温下暗处震荡孵育 20min,孵育完成后,离心移去上清,将沉淀分散于浓度为 0.01wt% ~ 0.1wt% 的甘氨酸、3-氨基丙酸或 4-氨基丁酸溶液中,并于室温下暗处再次孵育 15 ~ 30min,而后离心移去上清,沉淀以 pH 值为 7.2 ~ 8.0、浓度为 0.05M ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲溶液洗涤两次,制得初次活化后的荧光微球;

[0017] (2) 将上述初次活化后的荧光微球加入过量新鲜配制的含 50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐和 50mg/ml 水溶性碳二亚胺的水溶液中,漩涡混合 10s 后,室温下暗处震荡孵育 20min,完成对荧光微球的再次活化,其后加入过量的含 0.01 ~ 1 μ g/mL 庆大霉素的磷酸盐缓冲溶液,室温下暗处震荡孵育 1 ~ 2h,离心移去上清,以 pH 值为 7.2 ~ 8.0、浓度为 0.05M ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲溶液洗涤沉淀物两次,制得目标产物庆大霉素液相芯片探针,该目标产物悬浮于贮存液中保存,所述贮存液采用 pH 值为 7.2 ~ 8.0,浓度为 0.05M ~ 0.2M 的 PBS 溶液,其含 0.1 ~ 1.0wt% 牛血清白蛋白、0.01 ~ 0.05wt% 吐温-20 和 0.05 ~ 0.2wt% 叠氮钠。

[0018] 本发明采用两步法在荧光微球表面标记庆大霉素,第一步采用水溶性碳化二亚胺

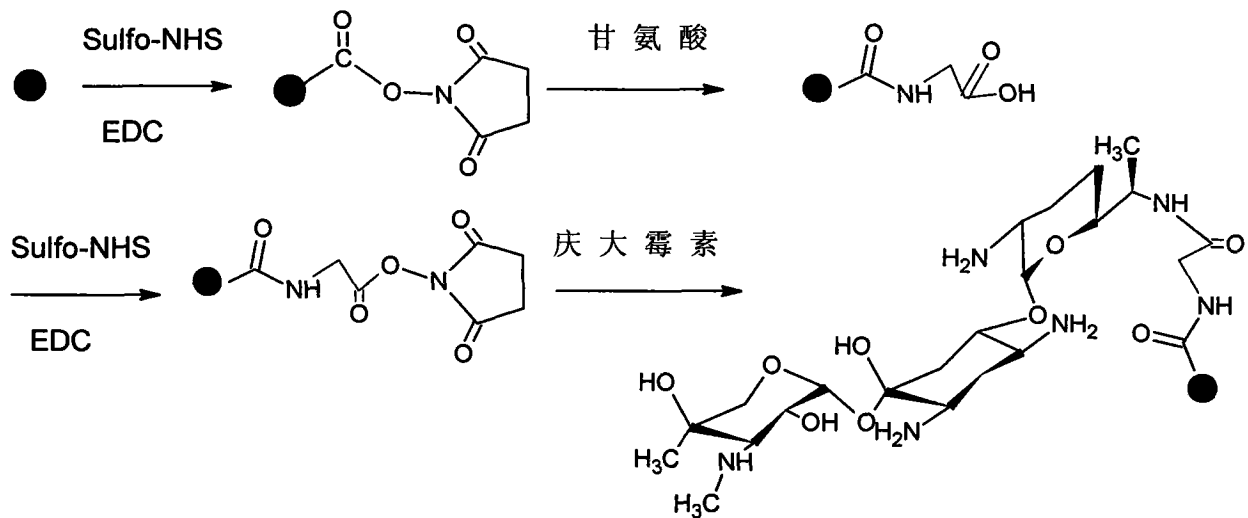
法将微球表面的羧基与连接臂（对位、间位或邻位的氨基苯甲酸）的氨基偶联，第二步再同法将连接臂的羧基与庆大霉素分子的氨基偶联，每一步反应都是定向的，微球表面标记探针的量可以通过调节庆大霉素分子的浓度实现控制和重复。

[0019] 与现有技术，如常见的载体蛋白作为连接臂的方法相比，本发明的有益效果在于：该庆大霉素液相芯片探针的制备方法简便操作，可控性强，重复性好，稳定性好，产率高，纯度高，且产物具有优良的庆大霉素靶向性，可为庆大霉素的液相芯片测试技术开发提供了更为方便的途径。

具体实施方式

[0020] 实施例 1 该庆大霉素液相芯片探针的制备方法原理如下式所示：

[0021]



[0022] 上图中，●为羧基化微球，Sulfo-NHS 为氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐，EDC 为水溶性碳二亚胺。

[0023] 该方法包括如下具体步骤：

[0024] (1) 荧光微球的表面修饰甘氨酸连接臂

[0025] 取 5×10^5 个羧基化聚苯乙烯荧光微球，经过水洗，离心并去除上清液后，加入 $100 \mu\text{L}$ 活化液（ 0.1M 磷酸盐缓冲溶液， $\text{pH} 6.0$ ），漩涡混合 1min ，然后超声 1min ，加入新鲜配置的 50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐（sulfo-NHS）和水溶性碳二亚胺（EDC.HCl）水溶液各 $10 \mu\text{L}$ ，漩涡混合 10s 后，室温下暗处震荡孵育 15min ，将活化后的微球离心移去上清，加入 0.01% 的甘氨酸溶液 0.5mL ，室温下暗处孵育 60min ，离心移除上清，采用 0.5mL 磷酸盐缓冲溶液（ 0.1M ， $\text{pH}7.2$ ）洗涤沉淀两次，制得表面修饰的荧光微球；

[0026] (2) 荧光微球的表面标记庆大霉素分子

[0027] 向上述修饰后的荧光微球中，加入 50mg/ml 的 sulfo-NHS 和 EDC.HCl 水溶液各 $10 \mu\text{L}$ ，漩涡混合 10s 后，室温下暗处震荡孵育 20min ，再次活化后，加入 $450 \mu\text{L}$ 庆大霉素（ $0.01 \mu\text{g/ml}$ ，溶于 0.1M ， $\text{pH}7.2$ ，PBS 溶液），室温下暗处震荡孵育 1h 。离心移除上清，采用 0.5mL 磷酸盐缓冲溶液（ 0.1M ， $\text{pH}7.2$ ）洗涤沉淀两次，形成目标庆大霉素液相芯片探针，该庆大霉素液相芯片探针悬浮于贮存液中保存，该贮存液为 0.1M ， $\text{pH}7.2$ 的 PBS 溶液，其含 $0.1\text{wt}\%$ 牛血清白蛋白， $0.01\text{wt}\%$ Tween，和 $0.2\text{wt}\%$ 叠氮钠）。

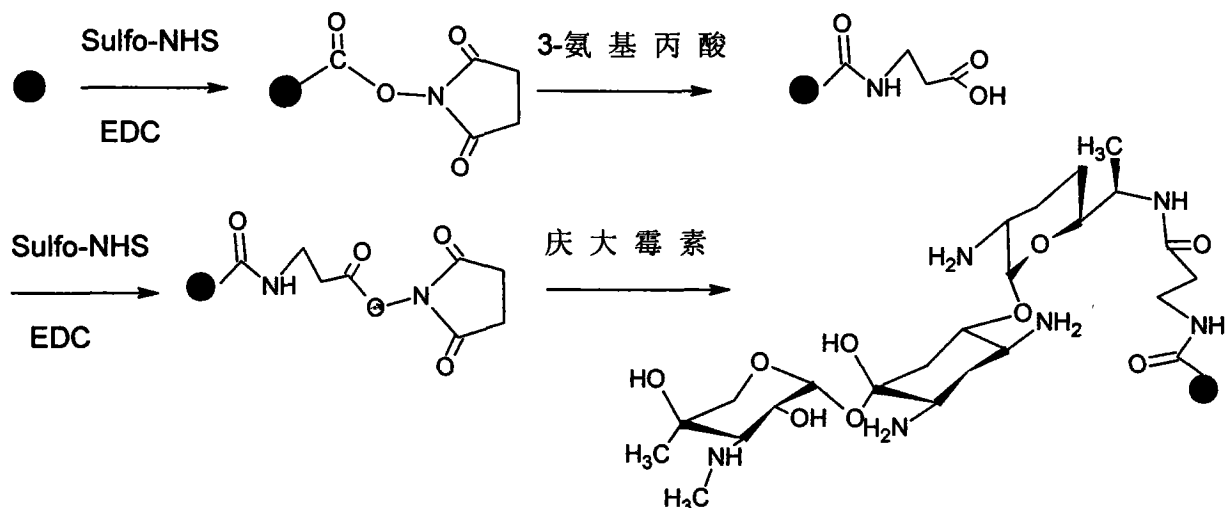
[0028] 以上所采用的各种浓度的磷酸盐缓冲溶液可优选采用含 0.8% wtNaCl 的磷酸盐缓冲溶液。

[0029] 将所制备庆大霉素液相芯片探针稀释一系列浓度,在 Luminex 100IS 2.2 液相芯片系统的微球计数模式下测试浓度,然后将庆大霉素液相芯片探针稀释至约 50 个/ μ l。吸取 200 μ l 洗涤液 (0.01M PBS, pH 7.2 ;含 0.01% Tween-20),加入到 96 孔平底过滤板 (密理博) 中, Multiscreen® 抽滤系统 (密理博公司) 中真空抽干 (或者微孔板离心机中 130 \times g 下离心 20s),然后在 2 列微孔中,分别加入 50 μ l 的庆大霉素零标准溶液和 10ng/mL 的标准溶液,再加入 10 μ l 庆大霉素液相芯片探针 (亦即标记半抗原的荧光微球),以及 40 μ l 的一系列稀释倍数生物素化庆大霉素抗体 (4 μ g/mL,按不同行加入抗体稀释倍数分别为 500、1000、2000、4000、8000 和 16000),置于微孔板振荡器中,37 $^{\circ}$ C 下避光孵育 40min,真空抽干微孔中溶液,加入 200 μ l 洗涤液,振荡 10s,抽干,再重复洗涤两次;其后加入 100 μ l 链亲和素藻红蛋白 (10 μ g/mL),置于微孔板振荡器中,37 $^{\circ}$ C 下避光孵育 15min,而后放置于液相芯片 Luminex 100IS 2.2 系统平台上,系统从每一孔中吸取偶联抗原的微球至少会读取 100 个。以所读取每种荧光微球的荧光中值对标准溶液浓度制作抑制反应曲线,结果显示 10ng/mL 庆大霉素标准溶液对该微球探针和抗体的结合反应抑制水平可高于 70% (见图 1),这表明该庆大霉素液相芯片探针对庆大霉素具有很高的灵敏度。

[0030] 而以该庆大霉素液相芯片探针对庆大霉素结构类似物卡那霉素、链霉素的交叉反应测试显示其较差反应率小于 0.5%,这进一步说明该庆大霉素探针具有很高的特异靶向性。

[0031] 实施例 2 该庆大霉素液相芯片探针的制备方法原理如下式所示:

[0032]



[0033] 上图中,●为羧基化微球, Sulfo-NHS 为氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐, EDC 为水溶性碳二亚胺。

[0034] 该方法具体如下:

[0035] (1) 荧光微球的表面修饰 3-氨基丙酸连接臂

[0036] 取 10^6 个羧基化聚苯乙烯荧光微球,经过水洗,离心并去除上清液后,加入 100 μ l 活化液 (0.05M 磷酸盐缓冲溶液, pH 6.5),漩涡混合 1min,然后超声 3min。加入新鲜配置的 50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐 (sulfo-NHS) 和水溶性碳二亚胺 (EDC.HCl) 水溶液各

10 μ L, 漩涡混合 10s 后, 室温下暗处震荡孵育 30min, 将活化后的微球离心移去上清, 加入 0.05% 的 3-氨基丙酸溶液 0.5mL, 室温下暗处孵育 60min, 离心移除上清, 采用 0.5ml 磷酸盐缓冲溶液 (0.05M, pH7.6) 洗涤两次, 制得表面修饰的荧光微球;

[0037] (2) 荧光微球的表面标记庆大霉素分子

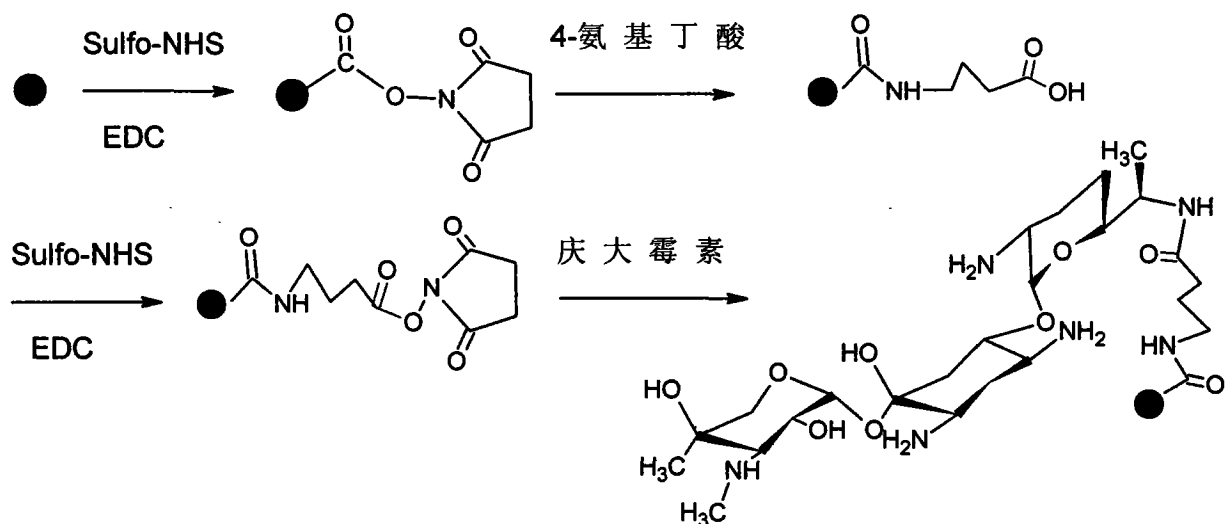
[0038] 向上述修饰后的荧光微球中加入 50mg/mL 的 sulfo-NHS 和 EDC.HCl 水溶液各 10 μ L, 漩涡混合 10s 后, 室温下暗处震荡孵育 20min。再次活化后, 加入 450 μ l 庆大霉素 (0.1 μ g/mL, 溶于 0.05M, pH7.6 的磷酸盐缓冲溶液), 室温下暗处震荡孵育 1.5h。离心移除上清, 采用 0.5ml 磷酸盐缓冲溶液 (0.05M, pH7.6) 洗涤沉淀两次, 形成目标庆大霉素液相芯片探针, 该庆大霉素液相芯片探针悬浮于贮存液中保存, 该贮存液为 0.05M, pH7.5 的 PBS 溶液, 其含 0.5wt% 牛血清白蛋白, 0.02wt% Tween, 和 0.2wt% 叠氮钠)。

[0039] 与实施例 1 相同, 以上所采用的各种浓度的磷酸盐缓冲溶液可优选采用含 0.8% wtNaCl 的磷酸盐缓冲溶液。

[0040] 该庆大霉素液相芯片探针在应用 (其操作与实施例 1 相似) 时, 可检测到浓度在 0.03ng/mL 的庆大霉素分子 (如图 2 所示), 灵敏度高, 靶向性优良。

[0041] 实施例 3 该庆大霉素液相芯片探针的制备方法的原理如下式所示:

[0042]



[0043] 上图中, ● 为羧基化微球, Sulfo-NHS 为氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐, EDC 为水溶性碳二亚胺。

[0044] 该方法包括如下步骤:

[0045] (1) 荧光微球的表面修饰 4-氨基丁酸连接臂

[0046] 取 2.5×10^6 个羧基化聚苯乙烯荧光微球, 经过水洗, 离心并去除上清液后, 加入 100 μ L 活化液 (0.01M 磷酸盐缓冲溶液, pH 7.0), 漩涡混合 1min, 然后超声 5min。加入新鲜配置的 50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐 (sulfo-NHS) 和水溶性碳二亚胺 (EDC.HCl) 水溶液各 10 μ L, 漩涡混合 10s 后, 室温下暗处震荡孵育 60min。将活化后的微球离心移去上清, 加入 0.1% 的 4-氨基丁酸溶液 0.5mL, 室温下暗处孵育 45min。采用 0.5ml 磷酸盐缓冲溶液 (0.01M, pH8.0) 洗涤两次。

[0047] (2) 荧光微球的表面标记庆大霉素分子

[0048] 向上述修饰后的荧光微球中, 加入 50mg/mL 的 sulfo-NHS 和 EDC.HCl 水溶液各

10 μ L, 漩涡混合 10s 后, 室温下暗处震荡孵育 20min, 再次活化后, 加入 450 μ l 庆大霉素 (1 μ g/mL, 溶于 0.01M, pH8.0 磷酸盐缓冲溶液), 室温下暗处震荡孵育 2h。离心移除上清, 采用 0.5ml 磷酸盐缓冲溶液 (0.01M, pH8.0) 洗涤沉淀两次, 该庆大霉素液相芯片探针悬浮于贮存液中保存, 该贮存液为 0.01M, pH8.0 的 PBS 溶液, 其含 1wt% 牛血清白蛋白, 0.05wt% Tween, 和 0.2wt% 叠氮钠)。该庆大霉素液相芯片探针的应用效果与实施例 1、2 相近。附及, 与实施例 1、2 相同, 以上所采用的各种浓度的磷酸盐缓冲溶液可优选采用含 0.8% wtNaCl 的磷酸盐缓冲溶液。

[0049] 以上实施例仅用于说明本发明的内容, 除此之外, 本发明还有其他实施方式, 但凡本领域技术人员因本发明所涉及之技术启示, 而采用等同替换或等效变形方式形成的技术方案均落在本发明的保护范围内。

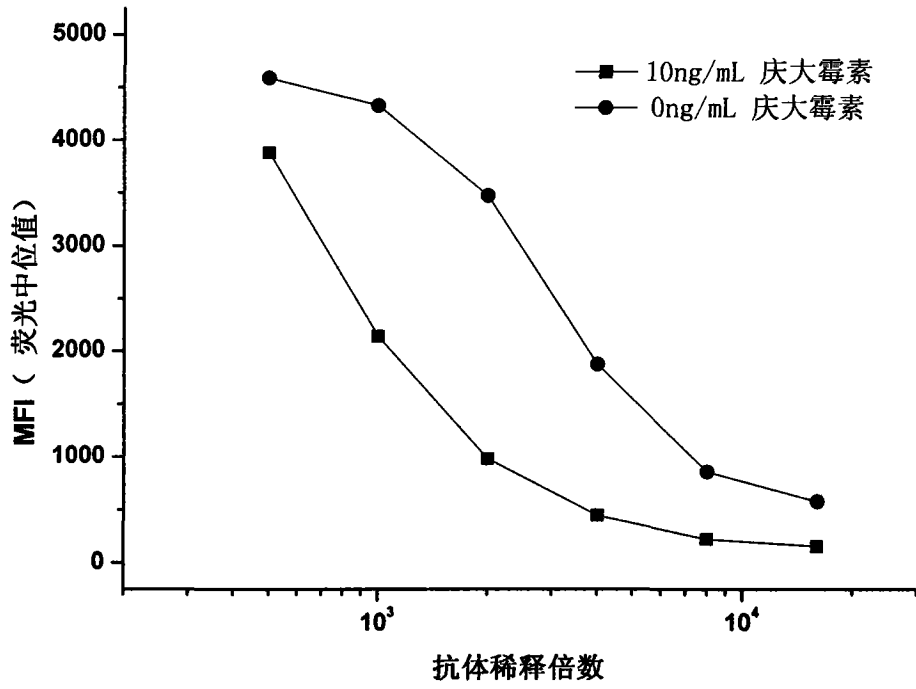


图 1

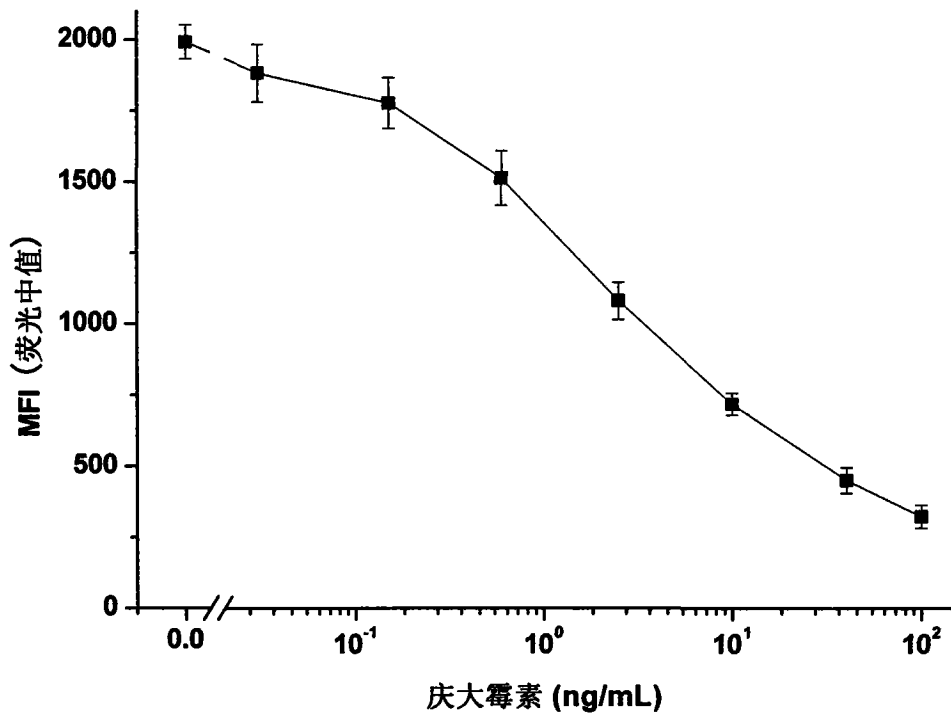


图 2

专利名称(译)	庆大霉素液相芯片探针的制备方法		
公开(公告)号	CN101982773B	公开(公告)日	2013-10-30
申请号	CN201010281374.7	申请日	2010-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	彭池方 陈伟 匡华 刘丽强 胥传来		
发明人	彭池方 陈伟 匡华 刘丽强 胥传来		
IPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	孙东风		
审查员(译)	寇飞		
其他公开文献	CN101982773A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫化学技术领域的一种庆大霉素液相芯片探针的制备方法，其通过采用碳化二亚胺法，以甘氨酸、3-氨基丙酸或4-氨基丁酸修饰羧基化聚苯乙烯荧光微球表面，再通过碳化二亚胺法将庆大霉素分子标记到荧光微球表面的方式，制成庆大霉素液相芯片探针。该庆大霉素液相芯片探针的制备方法简便操作，稳定性好，且产物具有优良的庆大霉素靶向性，可为庆大霉素的液相芯片测试技术开发提供了更为方便的途径。

