



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110819597 A

(43)申请公布日 2020.02.21

(21)申请号 201910961107.5

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2019.10.11

C12N 5/20(2006.01)

(83)生物保藏信息

C07K 16/44(2006.01)

CGMCC No.17401 2019.03.07

C07K 14/795(2006.01)

(71)申请人 江苏权正检验检测有限公司

C07D 209/48(2006.01)

地址 226371 江苏省南通市通州区兴东街
道南通空港产业园内

G01N 33/53(2006.01)

申请人 江南大学

G01N 33/577(2006.01)

(72)发明人 胥传来 张荣荣 章晓萍 匡华
徐丽广 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲
胡拥明 曹玉朋

(74)专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 张仕婷

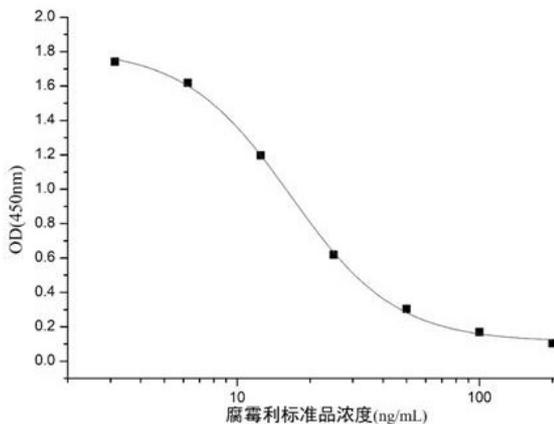
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一株分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用

(57)摘要

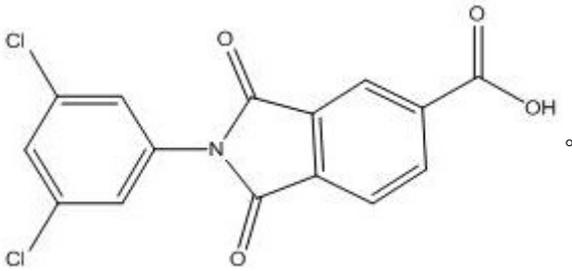
一种分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用,属于食品安全免疫检测领域。本发明分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株YBW1D6,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心CGMCC,保藏编号CGMCC No.17401。利用该菌株分泌获得的腐霉利单克隆抗体用于进行食品安全检测中腐霉利残留的分析检测。本发明获得的腐霉利单克隆抗体细胞株可以用于免疫分析检测,其对腐霉利有较好的检测灵敏度和特异性(IC₅₀值为16.58ng/mL、对腐霉利类似物交叉小于10%,交叉率=(腐霉利的IC₅₀/类似物的IC₅₀)×100%)。



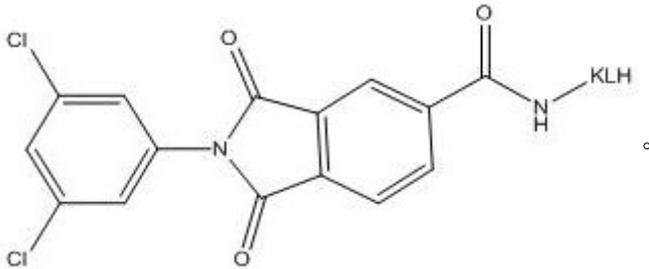
1. 一株分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株YBW 1D6,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心CGMCC,地址北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,分类命名为单克隆细胞株,保藏日期2019年3月7日,保藏编号CGMCC No.17401。

2. 腐霉利单克隆抗体,其特征在于:它由权利要求1所述保藏编号为CGMCC No.17401的杂交瘤细胞株YBW 1D6分泌产生。

3. 一种腐霉利半抗原,其特征在于:记作PRM-COOH,其分子式如下:



4. 一种腐霉利完全抗原,其特征在于:记作PRM-COOH-KLH,分子式如下:



5. 权利要求4所述腐霉利完全抗原的制备方法,其特征在于步骤如下:将权利要求3所述腐霉利半抗原PRM-COOH、N-羟基琥珀酰亚胺NHS溶解于无水N,N-二甲基甲酰胺DMF中,搅拌进行反应,得到腐霉利半抗原PRM-COOH溶液;将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐EDC溶解于无水DMF后,加入到PRM-COOH溶液中,搅拌进行反应,得到A液;将钥孔血蓝蛋白KLH用碳酸盐缓冲溶液CBS稀释,得到B液;将A液加入到B液中进行反应,得到反应液;用磷酸盐缓冲液PBS透析反应液,得到完全抗原PRM-COOH-KLH。

6. 权利要求2所述腐霉利单克隆抗体的应用,其特征在于:将其应用于食品安全检测中腐霉利残留的分析检测。

一株分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用,属于食品安全免疫检测领域。

背景技术

[0002] 腐霉利(Procymidone, PRM)是一种新型杀菌剂,具有低毒性,在农业生产中使用广泛。它主要抑制菌体内甘油三酯的合成,对葡萄孢属和核盘菌属真菌有特效。在植物开花初期、盛花期、结果期喷洒腐霉利,可防治果树、蔬菜的灰霉病、菌核病等。然而,腐霉利在施药过程中可能存在使用不当等问题,而且在喷洒的过程中容易残留环境,从而聚集在植物和动物上,再通过人的食用进入人体,对人类的健康产生不利影响,甚至威胁人类的生命。基于对环境土壤的保护以及人们身体健康的重视,欧盟、美国、日本等发达国家或地区,相继对进口食品中的腐霉利残留量提出了愈加严格的限量标准。如欧盟规定果蔬中腐霉利的最大残留限量(maximum residue limit, MRL)值为0.02 mg/kg,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)和加拿大规定葡萄酒中腐霉利的MRL值分别为0.2 mg/kg和1.0 mg/kg,日本实行的“肯列表制度”中有关食品限量的暂定标准规定腐霉利的MRL值是0.02 mg/kg,而对于其他在暂定标准以外的农业品实行“一律标准”,即0.01mg/kg。我国制定了果菜和菜籽油中腐霉利残留的限量标准分别为2.0 mg/kg和1.0mg/kg。

[0003] 对于腐霉利农药残留的检测,常采用高效液相色谱法、气相色谱法、气相或液相色谱质谱联用法。但这些方法存在样品前处理复杂和检测时间长等不足,不适用于大量样品的快速检测,为了维护广大消费者的利益,有必要建立一种针对腐霉利的高效、快速的检测方法。酶联免疫法(ELISA)是一种极为高效、敏感、快速的检测方法,检测时对样本的前处理简单、纯化步骤少、分析容量大、检测成本低而且操作简便,适用于大量样本的现场快速检测,因此在农药残留分析中得到了广泛应用。而使用酶联免疫法检测腐霉利的前提是得到对腐霉利具有高特异性和高灵敏度的单克隆抗体,因此,找到一种制备对腐霉利具有高特异性和高灵敏度的单克隆抗体的方法十分关键。

发明内容

[0004] 本发明的目的是克服上述不足之处,提供一株分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株YBW 1D6及其应用。此杂交瘤细胞株分泌的腐霉利单克隆抗体对腐霉利具有较好的特异性和检测灵敏度(IC₅₀值为16.58ng/mL),可以用于建立腐霉利的免疫学检测方法,检测食品中腐霉利的残留。

[0005] 本发明的技术方案,一株分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株YBW 1D6,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心CGMCC,地址北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,分类命名为单克隆细胞株,保藏日期2019年3月7日,保藏编号CGMCC No.17401。

[0006] 本发明提供了上述一株分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法,包含如下步骤:

(1) 使用腐霉利半抗原制备腐霉利完全抗原,将获得的腐霉利完全抗原制备成含抗原弗氏佐剂与含抗原不完全弗氏佐剂;

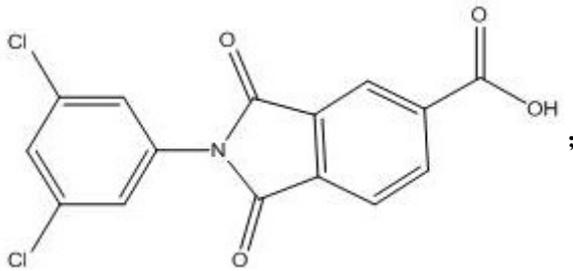
(2) 将得到的弗氏佐剂通过背部皮下注射,注射进入BALB/c小鼠体内进行多次免疫,首次免疫采用完全弗氏佐剂,加强免疫采用不完全弗氏佐剂;

(3) 将经过上述免疫过程的小鼠进行采血,通过间接ELISA检测小鼠血清免疫效价和免疫抑制能力,筛选出血清中腐霉利抗体含量高的获得免疫的小鼠;

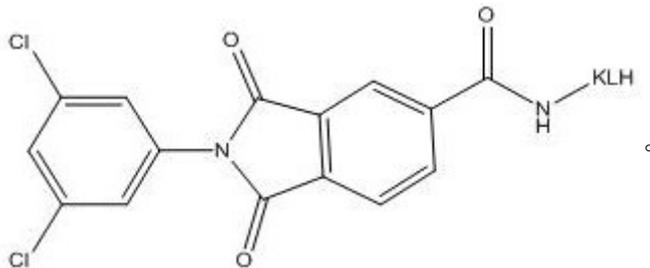
(4) 将筛选出的小鼠用不完全弗氏佐剂再进行最后一次加强免疫,然后通过腹腔注射进行冲刺免疫,冲刺免疫采用不含弗氏佐剂的腐霉利完全抗原进行;

(5) 将进行冲刺免疫后的BALB/c小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞融合,将融合的细胞通过培养基培养,利用间接ELISA检测阳性细胞孔,并进一步利用间接竞争ELISA法测定阳性细胞孔的抑制效果,通过有限稀释法对有最好抑制的阳性细胞孔进行亚克隆,最终筛选出获得能分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

步骤(1)中所述腐霉利半抗原的分子式如下,记作PRM-COOH:



步骤(1)中所述腐霉利完全抗原的分子式如下,记作PRM-COOH-KLH:



[0007] 在本发明的一种实施方式中,所述步骤(2)、(4)首次免疫与加强免疫之间间隔一个月,加强免疫之间间隔21天,加强免疫与冲刺免疫之间间隔18~21天。

[0008] 在本发明的一种实施方式中,所述步骤(2)、(4)首次免疫剂量为100 μ g/只,加强免疫剂量为50 μ g/只,冲刺免疫剂量为25 μ g/只。

[0009] 在本发明的一种实施方式中,所述步骤(2)、(4)的免疫过程,包含1次首次免疫、4次加强免疫和1次冲刺免疫;

在本发明的一种实施方式中,所述步骤(3)中的采血为第3次免疫过程结束后第7天进行采血。

[0010] 在本发明的一种实施方式中,所述步骤(5)中的细胞融合是在冲刺免疫结束3天后进行。

[0011] 在本发明的一种实施方式中,所述步骤(5)中的细胞融合是通过聚乙二醇

(PEG4000)法进行的。

[0012] 在本发明的一种实施方式中,所述步骤(5)中的培养基为RPMI-1640培养基。

[0013] 在本发明的一种实施方式中,所述步骤(5)中的亚克隆次数为3次。

[0014] 本发明还提供了上述一种分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株YBW 1D6或上述一种分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株YBW 1D6的制备方法在制备腐霉利单克隆抗体方面的应用。

[0015] 本发明提供了一种腐霉利单克隆抗体,它由所述保藏编号为CGMCC No.17401的杂交瘤细胞株YBW 1D6分泌产生。

[0016] 本发明提供了上述腐霉利单克隆抗体的制备方法,所述方法为取BALB/c小鼠,腹腔注射石蜡油,再腹腔注射保藏编号为CGMCC No.17401的杂交瘤细胞株YBW 1D6,注射后收集腹水,将腹水纯化,将获得的单抗低温保存。

[0017] 在本发明的一种实施方式中,所述方法为取8-10周龄BALB/c小鼠,每只小鼠腹腔注射石蜡油1mL,7天后每只小鼠腹腔注射 1×10^6 保藏编号为CGMCC No.17401的杂交瘤细胞株,从第7天开始收集腹水,将腹水通过辛酸-硫酸铵法纯化,获得的单抗置于-20℃保存。

[0018] 本发明提供了上述一种腐霉利单克隆抗体或上述一种腐霉利单克隆抗体的制备方法在识别腐霉利方面的应用,将其应用于食品安全检测中腐霉利残留的分析检测。

[0019] 本发明的有益效果:本发明获得的腐霉利单克隆抗体细胞株可以用于免疫分析检测,其对腐霉利有较好的检测灵敏度和特异性(IC_{50} 值为16.58ng/mL、对腐霉利类似物交叉小于10%,交叉率= $(\text{腐霉利的} IC_{50} / \text{类似物的} IC_{50}) \times 100\%$)。

[0020] 生物材料样品保藏:一株分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株YBW 1D6,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,保藏编号为CGMCC No.17401,分类命名为单克隆细胞株,保藏日期为2019年3月7日。

附图说明

[0021] 图1是本发明腐霉利单克隆抗体对腐霉利的抑制标准曲线。

具体实施方式

[0022] 本发明下面的实施例仅作为本发明内容的进一步说明,不能作为本发明的限定内容或范围。下面通过实施例对本发明作进一步说明。

[0023] 下述实施例中涉及的培养基如下:

RPMI-1640培养基(mg/L):L-精氨酸290、L-门冬酰胺50、L-门冬氨酸20、L-胱氨酸二盐酸盐65.15、L-谷氨酸20、甘氨酸10、L-组氨酸15、L-羟脯氨酸20、L-异亮氨酸50、L-亮氨酸50、L-赖氨酸盐酸盐40、L-甲硫氨酸15、L-苯丙氨酸15、L-脯氨酸20、L-丝氨酸30、L-苏氨酸20、L-色氨酸5、L-酪氨酸23.19、L-缬氨酸20、对氨基苯甲酸1、硝酸钙100、无水硫酸镁48.84、无水磷酸二氢钠676.13、氯化钾400、氯化钠6000、葡萄糖2000、还原谷胱甘肽1、酚红5、L-谷氨酰胺300、生物素0.2、D-泛酸钙0.25、叶酸1、i-肌醇35、烟酰胺1、氯化胆碱3、盐酸吡哆醇1、核黄素0.2、盐酸硫胺素1、维生素B12 0.005、碳酸氢钠2000。

[0024] 下述实施例中涉及的试剂如下:

碳酸盐缓冲液(CBS):称取 Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g,分别溶于少量双蒸水后混合,加双蒸水至约800mL混匀,调pH值至9.6,加双蒸水定容至1000mL,4℃贮存备用。

[0025] 磷酸盐缓冲液(PBS):8.00g NaCl ,0.2g KCl ,0.2g KH_2PO_4 ,2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$,溶于800mL纯水中,用 NaOH 或 HCl 调pH到7.2~7.4,定容至1000mL;

PBST:含0.05%吐温20的PBS;

抗体稀释液:PBS 加入 0.1%明胶。

[0026] TMB显色液:A液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 18.43g,柠檬酸 9.33g,纯水定容至1000mL;B液:60mg TMB 溶于100mL乙二醇中。A、B液按5:1混合即为TMB显色液,现用现混。

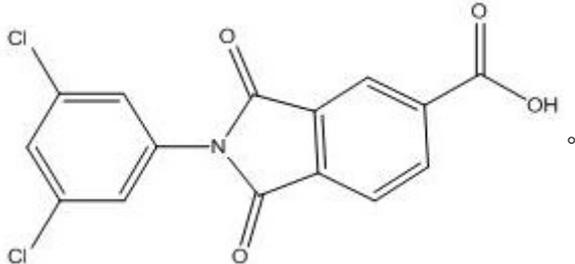
[0027] 下述实施例中涉及的检测方法如下:

腐霉利抑制率检测方法:通过棋盘试验选择ic-ELISA中最合适的抗原和抗体浓度。用碳酸盐缓冲液(CBS)将抗原稀释至0.03,0.1,0.3和 $1\mu\text{g}/\text{mL}$,并用抗体稀释液将抗体稀释至0.03,0.1,0.3和 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 。选择最佳工作点后,将腐霉利标准品稀释为8个浓度(0,3,6,12,24,48,96,192ng/mL),按照ic-ELISA操作步骤,最后用OriginPro 8.5做图(结果如图1所示),获得腐霉利标准抑制曲线,计算 IC_{50} 。

[0028] 实施例1:腐霉利半抗原的合成

由于腐霉利小分子不具有免疫原性,不能刺激小鼠产生免疫应答,进而产生抗体,因此需通过蛋白连接技术将腐霉利偶联到蛋白上,使其获得免疫原性;蛋白偶联技术中常用的活泼基团有氨基,羧基,羟基,巯基等,鉴于腐霉利分子结构式中不含有这些活泼基团,因此需要衍生。

[0029] 本发明衍生后的腐霉利半抗原结构如下:



[0030] 实施例2:腐霉利完全抗原的合成

称取2.0mg 腐霉利半抗原(PRM-COOH),2.1mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),溶解于300 μL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温搅拌反应10min;再称取3.4mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),用100 μL DMF充分溶解后,加入到PRM-COOH溶液中,室温搅拌反应6-8 h(称为A液)。取8mg KLH,用0.01M碳酸盐缓冲液(CBS)稀释至4mg/mL(称为B液),再逐滴将A液缓慢加入到B液中,室温反应过夜;然后用0.01M PBS溶液透析,除去未反应的小分子半抗原,得到完全抗原PRM-COOH-KLH,并通过紫外吸收扫描方法进行鉴定。

[0031] 实施例3:腐霉利包被原的合成

将2.2mg腐霉利半抗原(PRM-COOH)、2.3mgN-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶解于300 μL 无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温搅拌反应10min,得到腐霉利半抗原(PRM-COOH)溶液;将3.8mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶解于100 μL 无水DMF后,加入到PRM-COOH溶液中,室温搅拌进行反应6-8h,得到A液;将10mg鸡卵白蛋白(OVA)用1mL浓度为0.01mmol/L的碳酸盐缓冲液(CBS)稀释,得到B液;逐滴将A液缓慢加入到B液中进行反应,得

到反应液；用PBS溶液透析反应液，除去未反应的小分子半抗原，得到包被原（PRM-COOH-OVA）。

[0032] 实施例4：分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备

1、动物免疫的获得：将腐霉利完全抗原与等量弗氏佐剂混合乳化后，对BALB/c小鼠进行颈背部皮下多点注射免疫（冲刺免疫除外）；首次免疫用完全弗氏佐剂，剂量为100 μ g/只；多次加强免疫用不完全弗氏佐剂且剂量减半即为50 μ g/只；冲刺免疫不用佐剂，直接用生理盐水稀释后腹腔注射，剂量再减半即为25 μ g/只；首次免疫与第二次加强免疫之间间隔一个月，多次加强免疫之间间隔21天，冲刺免疫与最后一次加强免疫之间间隔18-21天；通过间接竞争酶联免疫法（ic-ELISA）观测小鼠免疫效果即检测小鼠血清的效价和抑制；

2、细胞融合：在冲刺免疫三天后，按照常规PEG（聚乙二醇，分子量为4000）方法进行细胞融合，具体步骤如下：

a、断尾取血，颈椎脱臼法处死小鼠后，立即放入75%酒精中消毒，浸泡5min左右，无菌操作取出小鼠的脾脏，用注射器的胶头适度研磨并通过200目细胞筛网得到脾细胞悬液，收集，离心（1200rpm，8min），用RPMI-1640培养基洗涤脾细胞三次，最后一次离心后，将脾细胞稀释到一定体积，计数，备用；

b、收集SP2/0细胞：融合前7-10天，将SP2/0瘤细胞用含10% FBS（胎牛血清）RPMI-1640培养基在5% CO₂培养箱中培养，融合前要求SP2/0瘤细胞数量达到 $(1\sim 4) \times 10^7$ ，保证融合前SP2/0瘤细胞处于对数生长期，融合时，收集瘤细胞，悬浮于RPMI-1640基础培养液中，进行细胞计数；

c、融合过程7min：第1min，将1mL的PEG由慢到快滴加到细胞中；第2min，静置；第3min和第4min，在1min内滴加1mL RPMI-1640培养基；第5min和第6min，在1min内滴加2mL RPMI-1640培养基；第7min，每10s滴加1mL的RPMI-1640培养基；然后37 $^{\circ}$ C温浴5min；离心（800rpm，8min），弃上清，重悬入含20%胎牛血清，2%的50 \times HAT的RPMI-1640筛选培养液中，按照200 μ L/孔加到96孔细胞板，置于37 $^{\circ}$ C，5% CO₂培养箱中培养；

3、细胞筛选与细胞株建立：在细胞融合的第3天对融合细胞进行RPMI-1640筛选培养液半换液，第5天进行用含20%胎牛血清，1%的100 \times HT的RPMI-1640过渡培养液进行全换液，在第7天取细胞上清进行筛选。

[0033] 筛选分两步：第一步先用ic-ELISA法筛选出阳性细胞孔，第二步选用腐霉利为标准品，用ic-ELISA法对阳性细胞进行抑制效果测定；

选择对腐霉利标准品有较好抑制的细胞孔，采用有限稀释法进行亚克隆，七天后用同样的方法进行筛选；

按上述方法进行三次亚克隆，最终获得腐霉利单克隆抗体细胞株YBW 1D6。

[0034] 实施例5：腐霉利单克隆抗体的制备与鉴定

取8-10周龄BALB/c小鼠，每只小鼠腹腔注射无菌石蜡油1mL；7天后每只小鼠腹腔注射 1×10^6 腐霉利杂交瘤细胞，从第七天开始收集腹水，将腹水通过辛酸-饱和硫酸铵法进行抗体纯化。

[0035] 在偏酸条件下，正辛酸可以沉淀腹水中除IgG免疫球蛋白外的其他杂蛋白，然后离心，弃沉淀；再用等量饱和度的硫酸铵溶液沉淀IgG型的单克隆抗体，离心，弃上清，用0.01M的PBS溶液（pH7.4）溶解后，透析脱盐，最终得到纯化后的单克隆抗体置于-20 $^{\circ}$ C保存。

[0036] 使用间接竞争ELISA,测得腐霉利单克隆抗体的IC₅₀值为16.58ng/mL、对腐霉利类似物交叉率小于10%,说明对腐霉利有很好的灵敏度,可用于腐霉利免疫分析检测。

[0037] (交叉率=(腐霉利的IC₅₀/类似物的IC₅₀)×100%)。

[0038] 实施例6:腐霉利单克隆抗体的应用

将杂交瘤细胞株通过体内腹水制备的单克隆抗体应用于腐霉利的ELISA添加回收试验,具体步骤如下:

(1)将用碳酸盐缓冲液(CBS)稀释好的浓度为0.3μg/mL的包被原包被96孔酶标板,每孔100μL,37℃包被2h后,用PBST洗液洗板三次,每次每孔200μL,每次3min,拍干;

(2)用含0.2%明胶的CBS进行封闭,每孔200μL,37℃封闭2h,用PBST洗液洗板三次,每次每孔200μL,每次3min,拍干;

(3)用磷酸盐缓冲液(PBS)分别配置0,3,6,12,24,48,96和192ng/mL的腐霉利标准溶液,将标准溶液以及待检测样品提取液,分别加入到已经封闭好的酶标板中,每孔50μL,每个样品重复3个孔,再每孔加入50μL以1:32000稀释的抗腐霉利单克隆抗体,37℃反应0.5h后,洗板拍干;

(4)每孔加入100μL用含0.1%明胶的PBS以1:3000稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG二抗,37℃反应0.5h后,洗板拍干;

(5)每孔加入100μL的TMB显色液,37℃显色15min后,每孔加入50μL 2M的H₂SO₄终止液,450nm测吸光值;

腐霉利单克隆抗体对腐霉利的抑制标准曲线如图1所示,用ic-ELISA测定腐霉利单克隆抗体的IC₅₀值为16.58ng/mL,说明该抗体对腐霉利有较好的灵敏度,可用于腐霉利的免疫分析检测。

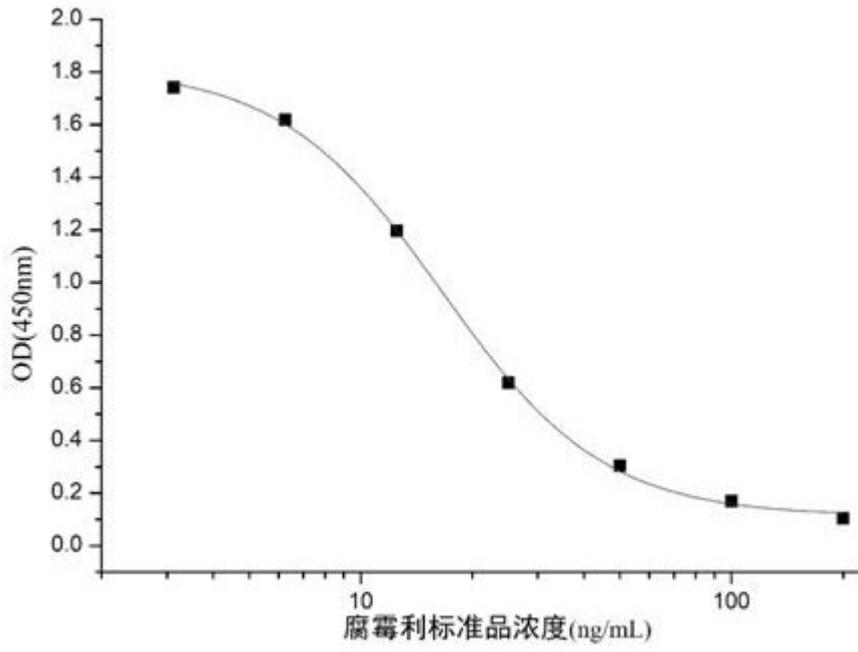


图1

专利名称(译)	一株分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用		
公开(公告)号	CN110819597A	公开(公告)日	2020-02-21
申请号	CN201910961107.5	申请日	2019-10-11
[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	胥传来 张荣荣 章晓萍 匡华 徐丽广 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲 胡拥明 曹玉朋		
发明人	胥传来 张荣荣 章晓萍 匡华 徐丽广 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲 胡拥明 曹玉朋		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/44 C07K14/795 C07D209/48 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C07D209/48 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/5308 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用，属于食品安全免疫检测领域。本发明分泌腐霉利单克隆抗体的杂交瘤细胞株YBW 1D6，已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心CGMCC，保藏编号CGMCC No.17401。利用该菌株分泌获得的腐霉利单克隆抗体用于进行食品安全检测中腐霉利残留的分析检测。本发明获得的腐霉利单克隆抗体细胞株可以用于免疫分析检测，其对腐霉利有较好的检测灵敏度和特异性（IC50值为16.58ng/mL、对腐霉利类似物交叉小于10%，交叉率=（腐霉利的IC50/类似物的IC50）×100%）。

