

血清铁蛋白化学发光免疫分析方法的建立及临床应用

孙姗姗^{1,2,3}, 李昕^{1,2,3}, 宋翠翠^{1,2,3}, 杨艳坤^{1,2,3}, 白仲虎^{*1,2,3}

(1. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用链霉亲和素-生物素放大系统及双抗夹心法, 建立检测血清铁蛋白的化学发光免疫分析方法。将生物素、辣根过氧化物酶分别标记铁蛋白的一对抗体, 以链霉亲和素包被 96 孔发光板, 铁蛋白标准品与国际标准品进行溯源, 并对本法的各项性能指标进行评价。收集 300 份临床血清样本, 使用本法与进口试剂盒同时检测, 检测结果显示: 相关系数 r 为 0.97, 本法的线性测量范围为 10~800 ng/mL, 灵敏度为 0.2 ng/mL, 批内、批间的变异系数(CV%)分别为 3.4%~5.5%及 5.0%~7.3%, 与癌胚抗原、人白蛋白、人类心脏铁蛋白以及血红蛋白交叉反应率均小于 1%。本法 37 °C、9 d 热稳定性良好。表明所建立的方法各项指标均满足临床检测要求, 抗体及样本用量少, 操作简便, 反应迅速, 便于临床应用, 可替代国外同类试剂盒。

关键词: 血清铁蛋白; 化学发光免疫分析; 生物素; 亲和素; 双抗夹心

中图分类号: R 44 文章编号: 1673-1689(2019)03-0118-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.03.017

Construction and Clinical Application of Chemiluminescent Immunoassay for Human Serum Ferritin

SUN Shanshan^{1,2,3}, LI Xin^{1,2,3}, SONG Cuicui^{1,2,3}, YANG Yankun^{1,2,3}, BAI Zhonghu^{*1,2,3}

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To develop a chemiluminescent immunoassay method for detecting serum ferritin with biotin-avidin amplified system and a sandwich way. A pair of antibodies were labeled with biotin and horseradish peroxidase respectively. The 96 well microplate was coated with streptavidin. The serum ferritin standard and international standard was evaluated. 300 clinical serum specimens were detected with this method and a foreign serum ferritin kit (Roche), the correlation coefficient was 0.97. The linear measurement range of this method was 10~800 ng/mL. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 3.4~5.5%, and 5.0~7.3%. The cross-reactivity rate with CEA

收稿日期: 2016-01-24

基金项目: 江苏省产学研项目(BY2015019-17)。

* 通信作者: 白仲虎(1965—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程方面的研究。E-mail: baizhonghu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 孙姗姗, 李昕, 宋翠翠, 等. 血清铁蛋白化学发光免疫分析方法的建立及临床应用[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(03): 118-123.

(carcinoembryonic antigen), human albumin, human heart ferritin, and hemoglobin were all less than 1%. The developed method was stable 9 days at 37 °C. This assay was easily operable, small amount of specimens needed and the reaction was quick, so it was suitable for clinical application.

Keywords: serum ferritin, chemiluminescent immunoassay, biotin, avidin, sandwich immunoassay

铁蛋白(Ferritin, FER)广泛存在于动、植物及微生物体内,在肝脏、脾脏、骨髓中含量较高。1972年, Addison 等人证实了可以在人的血清中利用放射免疫分析法检测到铁蛋白的存在^[1]。血清铁蛋白可结合一定量的铁,在临床上作为检测体内铁储存状况及多种疾病判断的常用指标。铁蛋白的含量可以作为判断铁缺乏^[2]、成人 Still 病的指征^[3],可以作为反映慢性肝病的严重程度的临床指标^[4],血清铁蛋白升高有助于乳腺癌^[5]、肺癌^[6]等恶性肿瘤^[7]的临床诊断,可作为预测动脉粥样硬化的危险因素^[8],能够反映 2 型糖尿病患者的患病情况^[9],并用于预测体内白血病残留病灶^[10]的辅助检查,血清铁蛋白的升高还可以作为女性骨密度降低的指标^[11]。

化学发光免疫分析技术(chemiluminescent immunoassay, CLIA)具有标本用量少、稳定性高、标记物制备容易、不污染环境、操作简便等优点,广泛应用在免疫诊断检测中^[12]。

作者使用链霉亲和素包被微孔板,将一对抗体分别用生物素和辣根过氧化物酶(Horse Reddish Peroxidase, HRP)标记,利用生物素和亲和素之间的高亲和力,采用双抗体夹心法,建立了快速简便的化学发光定量检测方法^[13]。

1 材料与方法

1.1 原料

两株抗 FER 单克隆抗体(包被抗体、标记抗体):购自罗氏;96 微孔板:购自 costar;生物素标记试剂盒、生物素化 HRP:购自 Thermo;BSA、链霉亲和素、HRP 标记试剂盒:购自 Sigma;FER 抗原为国际标准品(WHO IS 94/572);质控血清为中国药品生物制品检定所产品;阻断剂套装:购自 Meridian;HABA 试剂:购自 Thermo;底物:盐城拜明生物技术有限公司产品;进口试剂盒:罗氏(Roche)对照;NaIO₄、醋酸钠、NaBH₄、乙二醇等:上海沪试产品;临床检测用血清样本 300 份:来自北京解放军 301 总医院、山东省立医院;健康人血清样本 400 份:来

自上海市仁济医院体检人群。

1.2 仪器

化学发光免疫分析仪 TZD-CL-200S:厦门天中达;电热恒温培养箱:上海三发;Mix-1500 微孔板振荡器:上海汉林;超微量紫外分光光度计 Q5000:美国 Quawell;ST16R 离心机:Thermo Sorvall。

1.3 方法

1.3.1 链霉亲和素包被(SAC, streptavidin coated)板的制备 取 10 mg BSA, 加入到 1 mL 的磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)中,加入 1.69 mg 生物素(相对分子质量为 556.59, 间隔臂为 22.4 Å),充分混匀,室温偶联 1 h。将标记好的生物素化牛血清白蛋白加入到 Thermo 脱盐柱中纯化脱盐,用磷酸缓冲液作为洗脱液,去除游离的生物素。用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液将上述 Biotin-BSA 稀释成 3 μg/mL 的包被液,每孔 200 μL,4 °C 过夜。将包被液倾去,洗液(含 5 g/L 的 Tween-20)洗板。加入 10 μg/mL 的链霉亲和素,每孔 200 μL。加入封闭液(含 2% BSA 的磷酸缓冲液),200 μL 每孔,4 °C 过夜。将封闭液倾去,板子晾干。

1.3.2 生物素化抗体的制备与纯化 取 1 mg 的罗氏包被抗体,用超滤管超滤更换缓冲液为磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0),最后收集到 1 mL 的体积。加入约 0.07 mg 的生物素,充分混匀状态下室温偶联 1 h。

将上述标记好生物素的抗体加入到 Thermo 的脱盐柱中纯化脱盐,洗脱缓冲液为磷酸缓冲液。收集纯化后的生物素抗体,通过 Quawell 的 Q5000 超微量紫外分光光度计测量生物素抗体的在 280 nm 处的吸光度。蛋白质回收率为 95%,以 HABA 试剂检验偶联率为 14.89。

1.3.3 HRP 标记抗体的制备 称取 4 mg HRP 溶于 1 mL 去离子水中,加入 200 μL NaIO₄(0.1 mol/L)溶液,室温避光搅拌 20 min,将反应物置于醋酸钠溶液(1 mmol/L, pH 4.4)中,4 °C 透析过夜,加入 4 μL 乙二醇,室温避光反应 30 min。加入 8 mg 罗氏标记抗体,于碳酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 9.5)中 4 °C 避

光透析过夜,结合物加入 0.1 mL NaBH_4 ,混匀,4 ℃避光反应 2 h,搅拌状态下加入等体积的饱和硫酸铵,4 ℃放置 1 h,5 000 r/min 离心 15 min,弃上清液。沉淀用 PBS 溶解,加入等体积甘油于-20 ℃保存^[14]。

1.3.4 标准品的制备 用标准品稀释液(含 2% HSA(Human serum albumin),2%的 2-氯乙酰胺,pH 7.6 的磷酸缓冲液)将铁蛋白(FER)国际标准品稀释成质量浓度分别为 800、400、150、50、10、0 ng/mL 的标准品溶液,分装,-20 ℃冻存。

1.3.5 化学发光免疫分析实验原理与步骤 采用 CLIA 双抗体夹心法体外定量检测血清中的铁蛋白的质量浓度。在预包被了链霉亲和素的微孔板中,加入标准品、血清样品后,再加入生物素化铁蛋白抗体,混合后孵育,使生物素化的铁蛋白抗体与铁蛋白形成免疫复合物并与包被板上的链霉亲和素结合,洗涤去除未结合的物质;再加入 HRP 酶标抗体结合物,使之与前面形成的免疫复合物结合,再洗涤去除未结合的物质,加入化学发光底物后,使用化学发光免疫分析仪读取相对发光强度(Relative Light Unit,RLU)。

取 SAC 板,在孔中加入 25 μL 的标准品、样品或质控品,再加入 100 μL 的生物素标记的 FER 抗体,混匀 20 s,室温孵育 30 min。倾去液体,用洗液将板子洗 5 次,拍干。每孔加入 100 μL 的酶标抗体,室温孵育 30 min 后洗掉。加入含鲁米诺的底物,每孔 100 μL ,化学发光免疫分析仪进行检测。

1.3.6 数据分析 应用 3 次曲线模型对结果进行分析,根据已知不同质量浓度的铁蛋白标准品的 RLU 值绘制标准曲线,通过曲线计算样品中的铁蛋白质量浓度。

1.3.7 本法准确度指标 使用质量浓度为 50 ng/mL 和 200 ng/mL 的铁蛋白质控品作为样本,按照上述实验方法进行检测,各重复测定 3 次,利用 3 次曲线模型拟合标准曲线,测量各质量浓度结果的平均值记为(M_i),根据公式(1)分别计算相对偏差(B_i)

$$B_i = (M_i - T) / T \times 100\%$$

式中: B_i 为相对偏差; M_i 为测量质量浓度的平均值; T 为标定质量浓度。

2 结果与讨论

2.1 抗体质量浓度的确定

首先收集纯化后的生物素化牛血清白蛋白,利

用 HABA 试剂检验生物素偶联率为 18.31。按照 SAC 板的制备方法制备 SAC 板。通过 SAC 板的生物素结合量测试来确定生物素化抗体的结合量。在 SAC 板上分别加入不同质量浓度(0.5~10 $\mu\text{g/mL}$)生物素化抗体后,室温孵育 30 min,再加入生物素化 HRP,室温孵育 30 min,洗板,加入底物并检测。实验结果见图 1。表明在 2 $\mu\text{g/mL}$ 时生物素抗体在 SAC 板上的结合量已经达到饱和。后续实验即选用 2 $\mu\text{g/mL}$ 作为生物素化抗体的质量浓度。确定生物素化抗体质量浓度后,通过检测标准曲线上不同质量浓度点的 RLU,考察酶标抗体在 1:500~1:40 000 倍稀释度间合适的稀释度。实验结果显示,在 1:2 000 的稀释倍数时,800 ng/mL 的标准品的光子数在十万到百万之间,零值和低值能较好的拉开梯度。故本实验抗体对最佳反应质量浓度为:生物素抗体质量浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$,酶标抗体稀释倍数为 1:2 000。

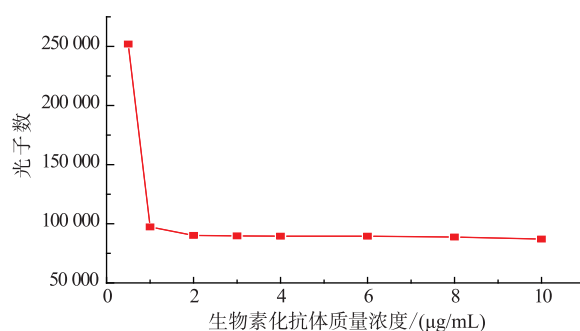


图 1 生物素化抗体在 SAC 板上的结合量测试

Fig. 1 Binding capacity of biotinylated antibody on SAC microplate

2.2 阻断嗜异性抗体

嗜异性抗体(heterophile antibody,HA)是由已知或未知抗原物质刺激人体产生的一类能与多个物种免疫球蛋白发生相对弱结合的多重特异性免疫球蛋白^[15]。目前免疫试剂所使用的抗体大多来自于实验动物,HA 由于能与许多动物来源的抗体相结合而干扰测定结果,影响临床判断,容易产生假阳性假阴性或其他干扰,导致误诊。研究证实,在健康人群中,约 3%~15%的人体内含有 HA^[16]。目前消除嗜异性抗体干扰的方法主要有使用阻断剂、热处理及其他吸附等。热处理由于可能同时破坏分析物质而不被广泛使用,吸附处理有一定的效果。而使用阻断封闭剂能降低大部分的嗜异性抗体干扰。阻断封闭剂是一类旨在消除干扰抗体对于免疫检测

结果不利影响的专门试剂,分为非特异性和特异性两类。非特异性阻断剂主要为正常动物的免疫球蛋白,特异性阻断剂主要为针对人嗜异性抗体设计的结合剂。目前两种阻断剂都有商品化的试剂如 Meridian 公司的主动型阻断剂 TRU Block 和被动型阻断剂。

通过临床样本检测来筛选阻断剂及其加入量。取经临床监测鉴定含有 HA 的的临床样本,分别加入不同剂量的 TRU Block 或血清,见图 2。

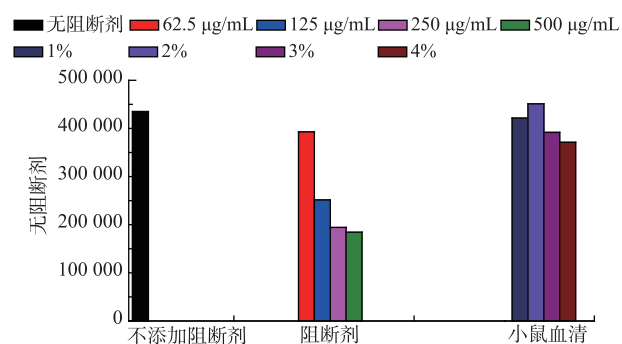


图 2 不同量的 TRU Block ($\mu\text{g/mL}$) 和小鼠血清 (%) 对干扰的排除情况

Fig. 2 Elimination of HA with various Blockers concentration

结果显示,小鼠血清在量足够多(4%)的时候能够排除部分干扰物如人抗鼠抗体(HAMA, human anti-mouse antibody),但排除干扰物能力有限,原因可能是因为不能排除其他动物源性的嗜异性抗体。TRU Block 中含有能够阻断人抗鼠抗体及其他嗜异性抗体的成分,在本实验中在 250 $\mu\text{g/mL}$ 时已能较好的排除干扰。后续临床实验中,将 TRU Block 统一直接加入到生物素化抗体中使用,以排除部分样本中的 HA 干扰。

2.3 本法主要技术参数

2.3.1 准确度 根据准确度的指标,将标准品与质控品同时测定,计算实测质控品的质量浓度与标示质量浓度的差值,结果见表 1。

说明本法采用链霉亲和素-生物素系统,重现性好,准确度高。

表 1 本法准确度检测

Table 1 Test of accuracy of the prepared FER detection method

质控品(理论值)质量浓度/(ng/mL)	实测值/(ng/mL)	平均值/(ng/mL)	相对偏差/%
50.0	49.7	49.8	-0.2
	49.5		-0.6
	50.3		1.0
200.0	201.2	200.7	0.3
	201.5		0.4
	199.6		0.6

2.3.2 线性范围 在 10~800 ng/mL 范围内测定不同质量浓度的标准品,检测的结果用三次曲线模型进行拟合,计算相关系数(r)值为 0.999 4。

2.3.3 灵敏度 平行测定 10 孔 0 ng/mL 标准品(标准品稀释液)的相对发光强度(RLU),计算 RLU 的平均值(M)与 RLU 标准差(SD)。利用标准曲线计算出($M+2SD$)对应的质量浓度值即为灵敏度 0.2 ng/mL。

2.3.4 精密度 对中国食品药品检定研究院提供的高、中、低(200、100、50 ng/mL)三个水平的质控品进行测定,各重复检测 10 次,计算各质控品的检测值,并计算各质控的平均数、标准差及变异系数($CV\%$)。批内变异系数、三批试剂盒间的批间变异系数见表 2。试剂盒批内精密度皆小于 10%,批间精密度皆小于 15%,满足 2010 版药典中生物制品检定要求。

表 2 批内及批间精密度

Table 2 Test of precision of the prepared FER detection method

质控品测值	批内精密度						批间精密度	
	20150702 批/(ng/mL)	CV/%	20150801 批/(ng/mL)	CV/%	20150802 批/(ng/mL)	CV/%	3 批/(ng/mL)	CV/%
低	49.4±2.26	4.6	52.1±2.84	5.5	53.3±3.06	5.7	51.9±3.79	7.3
中	103.2±3.57	3.4	111.2±4.72	4.2	107.5±5.21	4.8	106.8±7.41	6.9
高	198.3±10.02	5.1	202.9±8.98	4.4	205.8±11.54	5.6	203.7±10.23	5.0

2.3.5 特异性 向血清样本中加入不同质量浓度的干扰物质:癌胚抗原(CEA)、人白蛋白、肝铁蛋白、

脾铁蛋白、人类心脏铁蛋白、以及血红蛋白。交叉反应结果用达到相同的光强度时干扰物质量和铁蛋

白量的比值来表示,交叉反应结果见表3。结果表明,试剂盒特异性良好,非铁蛋白类的蛋白质基本不可检出,肝脏、脾脏铁蛋白可完全检出,与铁蛋白的水平能够辅助诊断乙型肝炎、脂肪肝等肝脏疾病一致。

表3 交叉反应考察结果

Table 3 Results of cross-reaction

物质	质量浓度	交叉反应结果
甲胎蛋白	800 ng/mL	<0.1%
人白蛋白	3 μg/mL	<1%
人心脏铁蛋白	300 ng/mL	<1%
血红蛋白	200 mg/mL	<0.1%
肝铁蛋白	600 ng/mL	100%
脾铁蛋白	600 ng/mL	100%

2.3.6 稳定性 对试剂盒各组分进行 37 °C、9 d 热稳定性考察,结果见表4。热稳定性结果与 4 °C 保存的试剂盒相比,标准品的 RLU 下降幅度低于 10%,灵敏度为 0.2 ng/mL,标准曲线相关系数 r 为 0.998 0,批内及批间精密度分别为 3.21%~4.68%,4.27%~7.39%。

加速稳定性试验中,于 37 °C 存放的试剂盒各组分在 9 d 后下降幅度低于 10%,说明本法热稳定性各项指标符合要求,此有效期可以满足正常实验室及临床需求。

表4 稳定性考察结果

Table 4 Results of heat stability test

标准品质量浓度/(ng/mL)	标准品稳定性		RLU 下降幅度/%	其他组分稳定性		RLU 下降幅度/%
	0 d	9 d		0 d	9 d	
800	210 665	199 625	5.2	217 145	201 020	7.4
400	137 345	130 205	5.2	142 490	130 670	8.3
150	73 420	68 725	6.4	75 650	69 225	8.4
50	28 520	26 720	6.3	29 405	27 020	8.1
0	5 035	4 705	6.6	4 040	3 900	3.5

2.3.7 参考范围的测定 对 400 例正常人临床血清样本进行检测,其中男性 245 人(16~82 岁),女性

155 人(19~76 岁),根据美国临床实验室标准化协会 C28-A2^[7]要求,建立自制试剂盒的正常参考范围为:男性 30~400 ng/mL,女性 15~300 ng/mL。该参考范围是基于一定数量的正常人血清样本确定的,由于地理、人种、性别及年龄等差异,建议各实验室建立自己的正常参考范围。

2.4 与其他试剂盒及检测方法的比较

同时用本法与罗氏试剂盒检测临床已确诊的 300 份血清样本,分析计算相关系数,对比结果见图3。

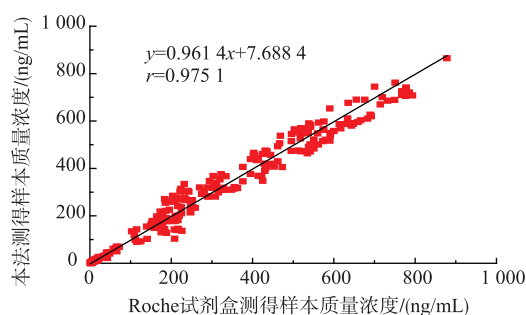


图3 本法与罗氏进口试剂盒相关性

Fig. 3 Linear correlation between the prepared method and Roche kit

3 结语

作者采用了链霉亲和素-生物素化学发光反应系统,先将链霉亲和素包被在 96 孔发光板孔中,使其主动吸附生物素化捕获抗体。这种通过链霉亲和素-生物素系统的间接包被法,吸附的抗体比较牢固和均一,不仅使包被的抗体量增加,单位面积的抗体增多,而且可以使其与抗原的结合位点充分暴露,可明显减少非特异性吸附,大大提高了灵敏度及测定结果的可靠性、重复性。

本法测定铁蛋白含量采用双抗夹心二步法,所需样本量少(25 μL),反应时间短,操作简便,重复性好,结果稳定,测量范围满足临床要求,适用于大批量检测,可替代国外同类试剂盒。

参考文献:

- [1] ADDISON G M, BEAMISH M R, HALES C N, et al. An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 1972, 25(4): 326-329.
- [2] AROSIO P, INGRASSIA R, CAVADINI P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2009, 1790(7): 589-599.

- [3] JAMILLOUX Y, GERFAUD V M, HENRY T, et al. Treatment of adult-onset Still's disease: a review[J]. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, 2015, 11:33.
- [4] HUANG Congwu, BAI Lan, CAI Junjie, et al. Relationship of serum iron and ferritin with the indicators for hepatic fibrosis[J]. **Journal of First Military Medical University**, 2003, 23(5):466-468. (in Chinese)
- [5] WU Yaozhong, LI Liqun, HUANG Chao, et al. Accuracy of serum ferritin for breast cancer: a meta-analysis[J]. **Chinese Journal of Evidence-Based Medicine**, 2014, 12:7. (in Chinese)
- [6] LI Liqing, DONG Zhennan, TIAN Yaping. Assessment of serum ferritin and other four tumor markers in lung cancer[J]. **Labeled Immunoassays and Clinical Medicine**, 2009, 16(2):68-70. (in Chinese)
- [7] ZHANG Jing, LIU Yuanming, ZHANG Wei et al. Evaluation of serum ferritin determination in diagnosis of malignant tumors[J]. **Medical Journal of the Chinese Peoples Armed Police Forces**, 2007, 18(1):74-75. (in Chinese)
- [8] TUOMAINEN T P, DICZFALUSY U, KAIKKONEN J, et al. Serum ferritin concentration is associated with plasma levels of cholesterol oxidation products in man[J]. **Free Radical Biology and Medicine**, 2003, 35(8):922-928.
- [9] CHEN Min, TIAN Haoming. Advances in relationships between abnormal iron metabolism and diabetes[J]. **Section of Endocrinology Foreign Medical Science**, 2004, 24(B05):43-46. (in Chinese)
- [10] LIU Yan, LIU Xiping, CAO Xiangshan, et al. Variation of serum ferritin, folic acid and vitamin B12 levels in patients with acute promyelocytic leukemia[J]. **Tumor**, 2010, 30(3):239-242. (in Chinese)
- [11] KIM B J, AHN S H, BAE S J, et al. Iron overload accelerates bone loss in healthy postmenopausal women and middle-aged men: A 3-year retrospective longitudinal study[J]. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2012, 27(11):2279-2290.
- [12] LIN Z, WANG X, LI Z J, et al. Development of a sensitive, rapid, biotin-streptavidin based chemiluminescent enzyme immunoassay for human thyroid stimulating hormone[J]. **Talanta**, 2008, 75(4):965-972.
- [13] NARA S, TRIPATHI V, CHAUBE S K, et al. Use of biotin-streptavidin system for developing a viable, sensitive and specific antigen heterologous assay for hapten[J]. **Talanta**, 2008, 77(1):210-216.
- [14] LIU Yali, LIU Fang, LIU Qing, et al. Comparison of two methods in preparation of enzyme conjugates and optimization of *Listeria monocytogenes* TAS-ELISA KIT[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 33(15):301-306. (in Chinese)
- [15] BOLSTAD N, WARREN D J, NUSTAD K. Heterophilic antibody interference in immunometric assays[J]. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, 2013, 27(5):647-661.
- [16] KNIGHT A K, BINGEMANN T, COLE L, et al. Frequent false positive beta human chorionic gonadotropin tests in immunoglobulin A deficiency[J]. **Clinical & Experimental Immunology**, 2005, 141(2):333-337.

科 技 信 息

加拿大批准一种麦芽糖淀粉酶用于全麦面粉等产品

2019年2月26日,加拿大卫生部发布NOM/ADM-0127号文件,修订允许使用的食物酶列表,批准来自地衣芽孢杆菌MDT06-221菌株(*Bacillus licheniformis* MDT06-221)的麦芽糖淀粉酶(Maltogenic alpha-Amylase)作为食品酶用于以下三类产品:

- (1)面包、面粉、全麦面粉;
- (2)意大利面食;
- (3)非标准化烘焙产品,限量标准均为按照良好生产规范适量使用。

自发布之日起生效。

[信息来源] 厦门WTO/TBT-SPS通报咨询工作站. 加拿大批准一种麦芽糖淀粉酶用于全麦面粉等产品 [EB/OL]. (2019-3-4). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/show.asp?id=59107>