DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250729003
引用格式: 李昀怡, 李桐, 刘婷, 等. 玉米种子不同部位基因组提取效率对 CRISPR/Cas12a 检测体系的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 187–194.
LI YY, LI T, LIU T, *et al*. Effects of genomic extraction efficiency from different parts of maize seeds on CRISPR/Cas12a-based detection system [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 187–194. (in Chinese with English abstract).

玉米种子不同部位基因组提取效率对 CRISPR/Cas12a 检测体系的影响

李昀怡[1], 李　桐[1], 刘　婷[1], 张　倩[2], 黄昆仑[1], 罗云波[3], 程　楠[1*]

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京　100083; 2. 深圳市计量质量检测研究院, 深圳　518100; 3. 北京工商大学食品与健康学院, 北京　100048)

摘　要: 目的　探究玉米种子不同部位在基因组提取和核酸检测中的表现差异, 明确最优选择和对成簇规律间隔短回文重复序列及相关蛋白 12a (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated protein 12a, CRISPR/Cas12a)检测体系结果的影响。**方法**　本研究比较了玉米种子胚、胚乳和全籽粒的基因组提取效率; 通过常规聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)级联 CRISPR/Cas12a 系统, 对各部位提取产物进行靶标扩增和识别, 评估所提取基因组对后续核酸检测的影响; 通过对比 DNA 提取效率、扩增效果和荧光信号强度, 验证各部位样本在检测中的适应性。**结果**　玉米种子不同组织部位的 DNA 提取效率存在差异, 胚部基因组含量最高、全籽粒次之, 胚乳相对较低, 符合玉米种子生物学结构特征; 各部位基因组均能成功扩增, 级联 CRISPR/Cas12a 系统检测产生明确阳性信号; 本研究构建的方法定性检出限为 0.1 wt%, 符合大多数国家和地区对转基因成分的检测要求。**结论**　玉米种子不同部位基因组提取效率存在差异, 但均具备良好的核酸扩增和 CRISPR/Cas12a 检测适应性, 在实际检测中全籽粒取样即可满足检测灵敏度且操作更便捷。本研究开发的方法无需大型仪器设备, 能够满足对转基因玉米种子现场检测的需求, 具备转基因食品安全筛查的应用价值。

关键词: 转基因玉米种子; 基因组提取; 核酸检测; 成簇规律间隔短回文重复序列及相关蛋白 12a

Effects of genomic extraction efficiency from different parts of maize seeds on CRISPR/Cas12a-based detection system

LI Yun-Yi[1], LI Tong[1], LIU Ting[1], ZHANG Qian[2], HUANG Kun-Lun[1], LUO Yun-Bo[3], CHENG Nan[1*]

(1. *College of Food Science and Nutritional Engineering*, *China Agricultural University*, *Beijing* 100083, *China*; 2. *Shenzhen Institute of Metrology and Quality Inspection*, *Shenzhen* 518100, *China*; 3. *College of Food and Health*, *Beijing Technology and Business University*, *Beijing* 100048, *China*)

收稿日期: 2025-07-29
基金项目: 农业生物育种重大专项(2022ZD0401901)
第一作者: 李昀怡(1999—), 女, 博士研究生, 主要研究方向为食品安全快速检测。E-mail: liyunyi9905@163.com
***通信作者:** 程楠(1991—), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全快速检测。E-mail: goodluchchengnan@163.com

ABSTRACT: Objective To explore the performance differences of various maize seed tissues in genome extraction and nucleic acid testing to clarify the optimal choice and its impact on clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated protein 12a (CRISPR/Cas12a)-based detection system. **Methods** In this study, the genome extraction efficiencies of maize seed embryo, endosperm and whole kernel were compared. Through the conventional polymerase chain reaction (PCR) cascade CRISPR/Cas12a system, the extracted products from each part were amplified and identified, and the impact of the extracted genome on subsequent nucleic acid detection was evaluated. By comparing the DNA extraction efficiency, amplification effect and fluorescence signal intensity, the adaptability of samples from various parts in the test was verified. **Results** There were differences in the efficiency of DNA extraction from different tissues of corn seeds. The genome concentration in the embryo was the highest, followed by the whole kernel, and the endosperm was relatively low, which was in line with the biological structural characteristics of corn seeds. The genomes in each part could be successfully amplified, and the cascade CRISPR/Cas12a system produced a clear positive signal. The qualitative detection limit of the method constructed in this study was 0.1 wt%, which met the detection requirements of genetically modified ingredients in most countries and regions. **Conclusion** Differences in extraction efficiency are found among maize seed tissues, but all parts supports effective nucleic acid amplification and CRISPR/Cas12a detection. In practical applications, tissue separation is not required; efficient and specific detection can be achieved using whole seeds or randomly selected samples. The method developed in this study does not require large-scale instrumentation and is suitable for on-site detection of genetically modified maize seeds, demonstrating potential for application in the safety screening of genetically modified food.

KEY WORDS: genetically modified maize; genomic extraction; nucleic acid testing; clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated protein 12a

0 引 言

转基因玉米因优异的抗虫、抗除草剂等农艺性状[1−3]，成为推广面积最大的转基因作物之一。伴随其商业化进程的推进，如何实现对转基因成分的快速、准确检测，是安全监管和品种纯度控制不可忽视的重要环节[4−5]。在实际生产与监管场景中，尤其是种企在进行品种纯度检测或政府部门开展市场抽检时，往往需对数百粒种子进行核酸检测，以评价种子中是否掺杂转基因成分，不仅工作量大，而且对检测效率构成限制，难以适应高通量与现场化监管需求。因此，需建立一种无需组织分离、适用于整粒种子或随机取样部位的核酸提取与检测方法，针对单籽粒水平的转基因成分进行检测[6−7]，对于保障种子质量、推动规范化育种体系建设具有重要意义。

目前转基因成分检测多依赖于核酸靶标[8−11]，检测灵敏度和准确性在很大程度上取决于 DNA 提取效率和质量[12]。单籽粒检测样本量极小，对基因组提取效率和质量提出更高要求。然而，玉米种子由胚、胚乳等多种组织构成，不同部位在细胞结构和成分、含水量、DNA 分布密度等方面存在显著差异[13]，可能导致提取效率和后续核酸检测灵敏度产生波动。例如，在相同取样条件下，胚组织富含活性细胞核和核酸，胚乳则主要为储藏组织，细胞核相对稀少且淀粉含量高[13−14]，易影响 DNA 提取纯度。因此，厘清不同组织部位的基因组提取效率及其对检测能力的影响，对于优化检测流程、提升灵敏度和实现特异识别具有重要意义。

近年来，成簇规律间隔短回文重复序列/CRISPR 相关蛋白 12a (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 12a, CRISPR/Cas12a)系统作为一种革命性的基因编辑工具[15−16]，已逐步扩展到分子诊断领域[17−19]。其中，利用 Cas12a 蛋白酶的反式切割活性，即在靶序列识别后激活非特异性单链 DNA 切割[17,20−21]，已在核酸快速检测中展现出巨大潜力[22−23]。核酸扩增结合 CRISPR/Cas12a 和荧光探针的可视化检测策略已被应用于食品安全[24−25]、环境诊断[26−27]和疾病检测[24−29]等领域，例如应用反转录重组酶介导等温核酸扩增技术和 CRISPR/Cas12a 系统构建针对玉米矮花叶病毒的快速检测方法[30]。该方法不依赖昂贵设备，检测速度快、操作简便，适合于农产品或转基因作物的快速现场检测[31]，推动检测方法向快速、便携化发展。

本研究优化并建立了一种 5 min 快速提取方法，基于玉米种子不同组织部位，比较胚、胚乳和全籽粒的基因组提取效率和质量，结合聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)和 CRISPR/Cas12a 平台分析检测能力差异。

通过系统评估不同部位的检测表现, 为优化单籽粒转基因成分检测流程, 提升纯度检测准确性提供技术支持。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

转基因玉米双抗 12-5、ND207、Bt11、DBN9858, 转基因大豆 MON87705 均由农业农村部农产品质量监督检验测试中心(北京)提供; 普通玉米购于当地超市。

植物基因组 DNA 提取试剂盒[DP342-01, 天根生化科技(北京)有限公司]; 耐热 DNA 聚合酶(5 U/μL)、2000 bp DNA 分子量标准、DNA 上样缓冲液(6×)[宝日医生物技术(北京)有限公司]; 琼脂糖(BY-R0100, 上海贝晶生物技术有限公司); EnGen Lba Cas12a (Cpf1) (M0653T, 美国 New England Biolabs 公司)。

引物及 crRNA 均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 参考《农业部 2259 号公告-12-2015 转基因植物及其产品成分检测 抗虫耐除草剂玉米双抗 12-5 及其衍生品种定性 PCR 方法》所用序列如表 1。

表 1　实验所用核酸序列
Table 1　Nucleotide sequences used in the experiment

名称	引物序列(5'→3')
SK12-5F	CAACGTCGTGACTGGGAAAA
SK12-5R	TGGAAGACAAGTTCTACGGGCT
Target	CGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAACTATCAGTCT CGTTGTAGCGTCGGGCGATGT GGTTGAGCTCGAGCCCG
crRNA	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUCUACAACG AGACUGAUAGUU
ssDNA	/FAM/-AGTACCGATAGATACAGAC-/BHQ1/
qSK12-5F	GTCGTTTCCCGCCTTCAGTT
qSK12-5R	GGTGCCTGGAAGACAAGTTCTA
qSK12-5P	FAM-AGCTCAACCACATCGCCCGACGC-BHQ1

1.2　仪器与设备

ME204E 分析天平[精度 0.0001 g, 梅特勒托利多科技(中国)有限公司]; FSJ-A05 研磨仪(广州麦景图家用电器有限公司); HH-1 恒温水浴锅(杭州旌斐仪器科技有限公司); DNA ENGINE peltimer 聚合酶链反应仪(美国 Biodot 公司); DYY-6C 电泳仪(北京六一生物科技有限公司); GenoSens2150 凝胶成像分析仪(上海勤翔科学仪器有限公司); VORTEX-6 漩涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造公司); Nano-300 微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司); CFX96 Touch 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); D3024 台式离心机(美国 Scilogex 公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　转基因玉米种子的解剖与研磨

玉米种子浸泡 2 h, 使用刀片纵剖玉米种子, 沿胚与胚乳之间的界线分离。将分离过后的胚与胚乳烘干。使用研磨仪将胚、胚乳与全籽粒均研磨成细粉, 分别收集。

1.3.2　转基因玉米种子基因组 DNA 提取与验证

对玉米种子的胚、胚乳、全籽粒进行基因组提取, 参考天根植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行[32]。根据磁珠法进行改良, 将涡旋混合过程使用手动剧烈振荡, 持续 10 s, 将离心机离心沉淀优化为静置沉淀, 以省去仪器操作。提取的基因组用 1% (*m*/*V*)琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 质量, 微量分光光度计评估提取产量和纯度。

1.3.3　转基因玉米外源转入序列的 PCR 扩增

PCR 扩增体系 25 μL: DNA 模板 2 μL、正反向引物 (10 μmol/L) 0.5 μL、dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL、Taq 酶(5 U/μL) 1 μL、缓冲液(10×) 2.5 μL, ddH_2O 补足体积。PCR 扩增程序包括: 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s, 58 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 循环 35 次; 72 ℃延伸 7 min。使用 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增效果。

1.3.4　CRISPR/Cas12a 反式切割检测

CRISPR/Cas12a 荧光报告反应体系(20 μL): PCR 扩增产物 2 μL、Cas12a (1 μmol/L) 1 μL、crRNA (1 μmol/L) 1 μL、ssDNA (1 μmol/L) 2 μL、NEB buffer r2.1 (10×) 2 μL、ddH_2O 补足体积, 通过实时荧光定量 PCR 仪在 37 ℃下每隔 30 s 监测反应体系荧光值强度, 评估 CRISPR/Cas12a 系统反应情况。

1.3.5　特异性分析

以转基因玉米双抗 12-5 作为阳性对照, 选择商场购入的普通玉米、转基因玉米 ND207、转基因杂交玉米 Bt11、进行方法特异性分析。

1.3.6　灵敏度分析

对提取转基因玉米基因组与非转基因玉米基因组混合, 获得 100.0wt%、50.0wt%、25.0wt%、10.0wt%、1.0wt%、0.1wt%的转基因玉米基因组样品, 用于方法灵敏度检测。

1.4　数据处理

实验结果均以平均值±标准偏差表示。琼脂糖凝胶电泳图片灰度由 Image J 软件分析。所有实验数据分析使用 SPSS 26.0 软件进行, 显著性水平 P 取 0.05。实验图片均使用 GraphPad Prism 10 绘制。

2　结果与分析

2.1　检测原理

提取转基因玉米种子胚、胚乳与全籽粒粉末中的基因组并进行提取效率比较, 对所得基因组进行目标基因 PCR 扩增; 得到的大量靶标片段与 crRNA 结合, 激活 Cas12a

的反式切割活性，非特异性切割体系中游离的荧光基团 FAM 与淬灭集团 BHQ 标记的 ssDNA，使荧光信号恢复(图 1)。因此，检测到荧光信号即代表体系中有转基因玉米存在。

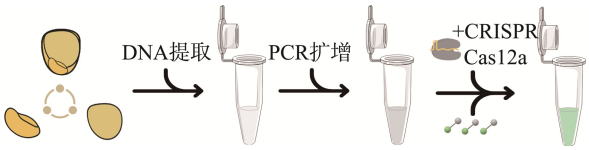


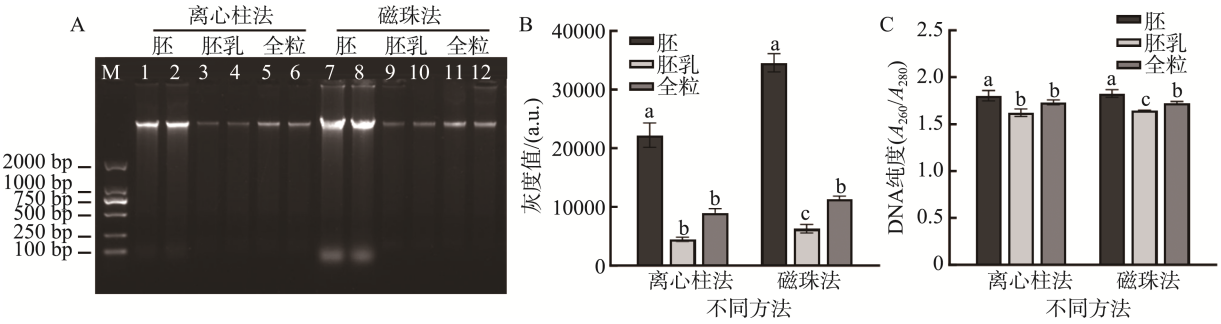
图 1 转基因玉米种子检测原理图

Fig.1 Schematic diagram of genetically modified maize seed detection

2.2 转基因玉米种子基因组提取效果比较

影响玉米种子 DNA 提取效果的主要因素为：(1)玉米种子胚与胚乳的组分差异较大，在细胞结构和功能上有显著差异[33–34]。胚是种子发育成幼苗的关键部位，含有较多的分生组织，具有高度的细胞分裂与代谢活性。在胚细胞中细胞核密度较高，基因组 DNA 含量丰富，因而在 DNA 提取过程中往往表现出较高的提取效率和浓度。相比之下，胚乳主要功能是为种子萌发提供碳源、氮源和无机盐等营养物质，含有大量的多糖、蛋白、脂质类营养物质[35]。胚乳细胞结构相对疏松，核密度低，导致从胚乳中提取得到的 DNA 浓度和质量普遍低于胚。因此，从玉米种子的不同部位进行提取可能会显著影响基因组 DNA 的提取效率。(2)由于细胞裂解、除杂、富集 DNA 等步骤使用的原理不同，不同的提取方法也会造成玉米种子基因组 DNA 提取效率的差异[12,36]。本研究使用离心柱法和磁珠法提取了玉米种子胚、胚乳、全籽粒的基因组 DNA，并使用 1%琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 验证 DNA 提取效率和质量。结果如图 2 所示，就 DNA 提取部位而言，胚中基因组 DNA 含量最高、全籽粒其次、胚乳最低；磁珠法提取效果较离心柱法更好，其原因可能在于玉米种子样品硬度较高、多糖和淀粉含量高，离心柱法在离心时易堵塞柱孔影响洗脱。综合提取效率和提取质量两方面，后续实验使用磁珠法进行优化。

避免大规模仪器的使用是构建快速检测方法的一项重要要求[37]，对此在磁珠法基础上进行改进，省略涡旋和离心步骤，改以手动摇晃和静置沉淀，避免仪器设备的使用。电泳结果和核酸浓度如图 3 所示，尽管快速提取法在静置沉淀后吸取上清液时存在部分未沉淀杂质，但在琼脂糖凝胶电泳中依然可形成清晰明亮的条带，证明后续洗涤过程可以将杂质蛋白去除，获得较高浓度 DNA；经 Nanodrop 测定 DNA 纯度，两种方法均具有较高纯度。



注：A. 琼脂糖凝胶电泳结果图；B. 灰度值对比图；C. DNA 纯度(A_{260}/A_{280})；图 3 同。M. Marker，图 4~5 同。不同字母表示组间具有显著性差异，$P<0.05$，图 6 同。

图 2 不同方法提取玉米种子不同部位基因组效果对比

Fig.2 Comparison of different methods for extracting genomes from different parts of maize seeds

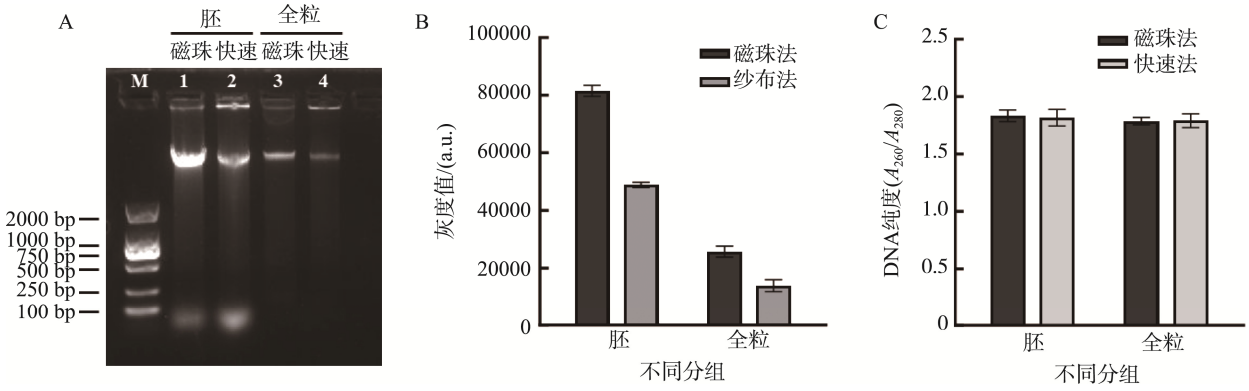


图 3 快速提取法与磁珠试剂盒法提取基因组效果对比

Fig.3 Comparison of genome extraction efficiency between the rapid extraction method and the magnetic bead kit method

2.3　转基因玉米靶标检测的扩增必要性

分别对上述提取基因组直接进行 CRISPR/Cas12a 系统检测, 并以直接合成的特异性靶标序列 Target 作为阳性对照, 结果如图 4A 所示, 合成的阳性 Target 序列可以成功激活 Cas12a 蛋白酶的反式切割活性, 实现荧光信号的输出; 而对提取基因组的检测呈现阴性结果, 即无论是快速提取法或磁珠试剂盒法提取的玉米种子胚或全籽粒的基因组, 均无法成功激活 Cas12a 蛋白酶的切割活性。这是由于 Cas12a 蛋白酶的激活依赖和其 crRNA 完全互补的靶标 DNA 序列[38], 在未经扩增的原始 DNA 状态下, 靶标序列占总 DNA 比例极低, 不能有效结合并激活 Cas12a 蛋白酶; 且基因组 DNA 是双链高分子, 可以形成超螺旋或局部折叠的复杂结构, 阻碍 crRNA 与靶序列结合[39], 因此需要对玉米基因组靶标序列进行特异性扩增。

参考《农业部 2259 号公告-12-2015 转基因植物及其产品成分检测 抗虫耐除草剂玉米双抗 12-5 及其衍生品种定性 PCR 方法》设计引物, 扩增产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳验证, 结果如图 4B 所示, 普通玉米和空白对照呈现阴性, 所有转基因玉米基因组均扩增产生了明亮条带, 可用于后续检测。

2.4　级联 CRISPR/Cas12a 体系验证和系统优化

应用快速提取法转基因玉米种子胚和全粒基因组, 对扩增所获产物进行 CRISPR/Cas12a 识别检测, 结果如图 5A 所示, 阳性样品的荧光信号在 20 min 后到达平台期, 证明实现了有效检测; 尽管经快速提取的转基因玉米全籽粒基因组浓度较低, 但足以进行 PCR 扩增并激活 CRISPR/Cas12a 系统, 完成特异性检测, 故后续研究采用全籽粒基因组。

对 CRISPR/Cas12a 检测系统分别进行 Cas12a 浓度(图 5B)和 Cas12a 与 crRNA 比例(图 5C)的优化, 获得最佳实验条件: 扩增产物 2 μL、Cas12a (1 μmol/L) 1 μL、crRNA (1 μmol/L) 1 μL、ssDNA (10 μmol/L) 2 μL、NEB buffer r2.1 (10×) 2 μL、以 ddH_2O 补足 20 μL 体积, 反应时间 20 min。

2.5　方法特异性分析

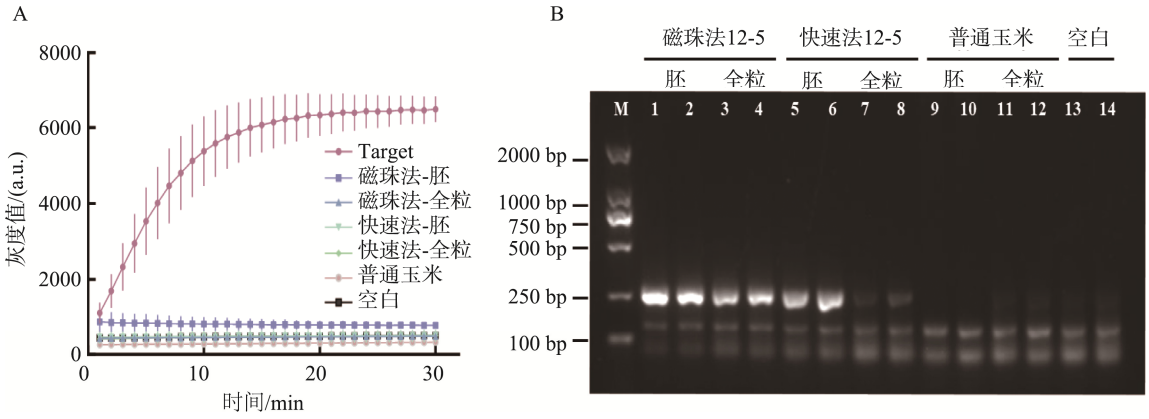
应用本研究建立的方法, 在最佳实验条件下, 选择转基因玉米双抗 12-5、ND207、Bt11、DBN9858 和转基因大豆 MON87705 和普通玉米进行特异性分析。结果如图 6A 所示, 只有在转基因玉米双抗 12-5 样品呈现阳性结果, 表明本方法具有良好的特异性。

2.6　方法灵敏度分析

将转基因玉米双抗 12-5 基因组和普通玉米基因组进行混合, 获得 100.0wt%、50.0wt%、25.0wt%、10.0wt%、1.0wt%、0.1wt%的转基因玉米基因组样品, 用于灵敏度测定。结果如图 6B、6C 所示, 随双抗 12-5 质量分数的增加, 荧光值逐渐上升, 本研究建立的方法的定性检出限为 0.1wt%, 符合世界上大多数国家和地区对转基因成分检测的要求, 具有较高灵敏度。

2.7　方法准确性验证

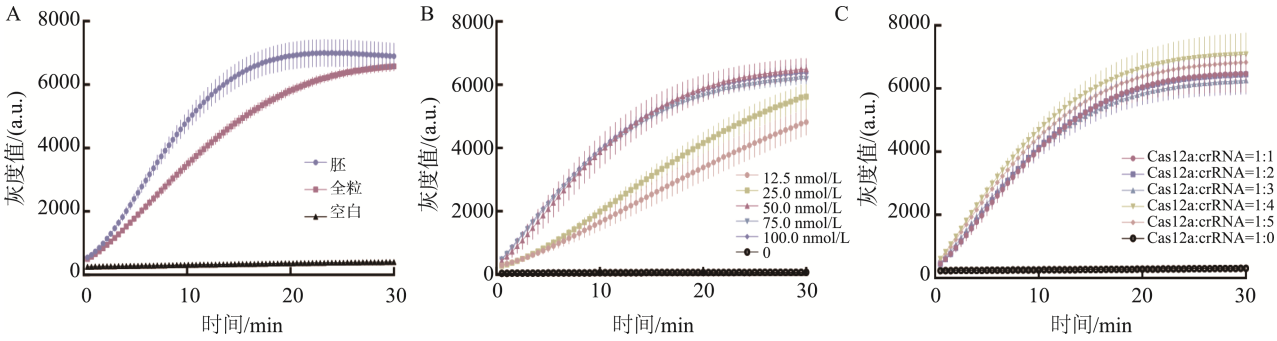
为验证本研究构建的 PCR-CRISPR/Cas12a 检测方法的准确性与可靠性, 将该方法与《农业部 2259 号公告-12-2015 转基因植物及其产品成分检测 抗虫耐除草剂玉米双抗 12-5 及其衍生品种定性 PCR 方法》中实时荧光 PCR 方法进行对比验证。选取相同批次转基因玉米双抗 12-5、ND207、Bt11、DBN9858, 转基因大豆 MON87705 和普通玉米种子样本提取基因组并进行检测, 结果如表 2 所示, 只有双抗 12-5 样本被检测出阳性, 且与标准方法结果一致, 表明本研究方法准确可靠。



注: A. 未扩增基因组的 CRISPR/Cas12a 系统检测结果; B. 基因组扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图。

图 4　CRISPR/Cas12a 检测时基因组扩增的必要性验证

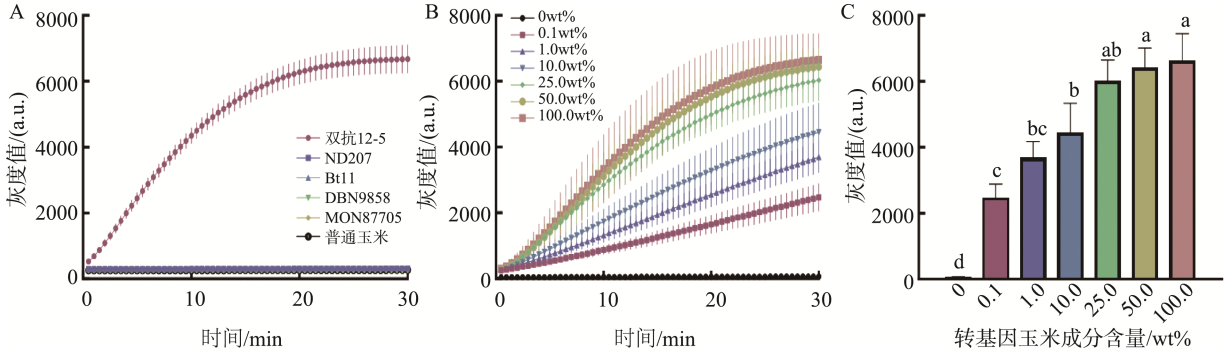
Fig.4　Validation of the necessity of genome amplification for CRISPR/Cas12a detection



注: A. 阳性样品实时荧光信号图; B. Cas12a 浓度; C. Cas12a 与 crRNA 比例。

图 5 级联 CRISPR/Cas12a 体系验证和条件优化

Fig.5 System validation and condition optimization of cascade CRISPR/Cas12a



注: A. 特异性分析; B. 灵敏度分析; C. 反应 20 min 时各样品荧光值。

图 6 方法特异性和灵敏度分析

Fig.6 Analysis of method specificity and sensitivity

表 2 本研究方法与标准方法对比验证结果

Table 2 Comparative validation results between the proposed method and the standard method

方法	双抗 12-5			ND207			Bt11			DBN9858			MON87705			普通玉米		
本研究方法	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
标准方法	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: +表示检测结果呈阳性; -表示检测结果呈阴性。每个样本进行 3 次平行检测。

3 结 论

本研究成功构建了一种基因组快速提取方法，并级联 PCR 扩增和 Cas12a 实现双抗 12-5 转基因玉米种子快速、特异检测。实验结果表明，该方法在不依赖动力仪器的条件下即可从玉米种子多个部位获得可扩增的基因组，仅管提取效率略有差异，但在后续核酸扩增和 CRISPR/Cas12a 检测中不影响灵敏度和特异性，说明该提取方法具有较强的适应性和操作容忍度，在条件不发达地区的现场即时检测场景中具有实用价值。

然而，现有方法仍受限于扩增反应的热循环步骤和时间，为进一步提升检测效率，可结合快速 PCR 技术，在 10~15 min 即可完成高保证扩增，以显著压缩检测流程；或是引入等温扩增技术，如重组酶聚合酶扩增技术和环介导等温扩增技术，不仅可以缩短扩增时间，还可以在不依赖昂贵热循环设备的条件下运行；同时，开发基于 3D 打印的便携化检测平台，将田间现场检测、口岸快速筛查及食品安全监管等场景提供更为高效、经济的技术方案。总之，通过不断优化样本前处理流程与微型检测系统，本研究提出的方法可望推动转基因检测从实验室走向实地应用，构建更加智能、快速和普适的农业生物安全监测体系。

参考文献

[1] 王江, 武奉慈, 刘新颖, 等. 转基因抗虫耐除草剂复合性状玉米‘双抗 12-5’对亚洲玉米螟的抗性及对草甘膦的耐受性研究[J]. 植物保护,

2016, 42(1): 45–50.
WANG J, WU FC, LIU XY, *et al*. Study on the resistance of transgenic corn variety ‘Shuangkang 12-5’ to Asian corn borer and tolerance to glyphosate [J]. Plant Protection, 2016, 42(1): 45–50.

[2] 孙红炜, 徐晓辉, 李凡, 等. 转基因玉米双抗 12-5-21 的抗虫性及对草甘膦的耐受性[J]. 生物安全学报, 2021, 30(1): 43–49.
SUN HW, XU XH, LI F, *et al*. Insect resistance and glyphosate tolerance of transgenic maize 12-5-21 [J]. Journal of Biosafety, 2021, 30(1): 43–49.

[3] 高越. 转 *cry1Ab* 基因玉米对非靶标节肢动物多样性的影响及抗虫性的评价[D]. 保定: 河北农业大学, 2020.
GAO Y. Effects of *cry1Ab* transgenic corn on non-target arthropod diversity and evaluation of insect resistance [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2020.

[4] 陈柳. 转基因产业发展的国际法规制问题研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2020.
CHEN L. Research on the international legal regulation of the development of the transgenic industry [D]. Wuhan: Wuhan University, 2020.

[5] 周田田, 张弯弯, 王立平. 转基因食品的安全监管[J]. 食品工业, 2019, 40(11): 271–275.
ZHOU TT, ZHANG WW, WANG LP. Safety supervision of genetically modified foods [J]. The Food Industry, 2019, 40(11): 271–275.

[6] 张琥瑛. 种子检验与提高玉米种子质量的探究[J]. 农业开发与装备, 2024(7): 229–231.
ZHANG HY. Research on seed inspection and improvement of corn seed quality [J]. Agricultural Development & Equipments, 2024(7): 229–231.

[7] 赵兵. 农作物种子检验与提高玉米种子质量的研究[J]. 种子科技, 2024, 42(19): 143–145.
ZHAO B. Research on crop seed inspection and improvement of corn seed quality [J]. Seed Science & Technology, 2024, 42(19): 143–145.

[8] 任星旭, 易红梅, 葛建镕, 等. 玉米种子转基因成分新型分子检测体系的建立[J]. 分子植物育种, 2025, 23(9): 2975–2981.
REN XX, YI HM, GE JR, *et al*. Establishment of a new molecular detection system for transgenic components in maize seeds [J]. Molecular Plant Breeding, 2025, 23(9): 2975–2981.

[9] 咸若彤, 缪青梅, 彭城, 等. 转基因玉米 WYN17132 转化体特异性实时荧光 PCR 检测方法的建立与应用[J/OL]. 浙江农业学报: 1–13. [2025-09-01]. https://link.cnki.net/urlid/33.1151.S.20250627.1030.002
XIAN RT, LIAO QM, PENG C, *et al*. Establishment and application of real-time fluorescence PCR detection method for specificity of transgenic maize WYN17132 transformants [J/OL]. Journal of Zhejiang Agriculture, 1–13. [2025-09-01]. https://link.cnki.net/urlid/33.1151.S.20250627. 1030.002

[10] 陆佳雨, 王沛然, 许学, 等. 转基因抗虫大豆转化体 CAL16 定性 PCR 检测方法[J]. 生物安全学报, 2025, 34(2): 137–144.
LU JY, WANG PR, XU X, *et al*. Qualitative PCR detection method for transgenic insect-resistant soybean transformant CAL16 [J]. Journal of Biosafety, 2025, 34(2): 137–144.

[11] AHMED B, RAUT B, PAULEY A, *et al*. Development of a portable paper-based biosensor for the identification of genetically modified corn (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*) [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2025. DOI: 10.1016/j.bios.2025.117690

[12] ZHANG Q, WANG W, YANG Z, *et al*. A portable 3D-printed biosensing device for rapid detection of genetically modified maize MON810 [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 349: 130748.

[13] TRIFA Y, ZHANG D. DNA content in embryo and endosperm of maize kernel (*Zea mays* L.): Impact on GMO quantification [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(5): 1044–1048.

[14] LENDING CR, LARKINS BA. Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development [J]. The Plant Cell, 1989, 1(10): 1011–1023.

[15] LI Y, LI S, WANG J, *et al*. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing [J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(7): 730–743.

[16] MAKAROVA KS, WOLF YI, IRANZO J, *et al*. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: A burst of class 2 and derived variants [J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(2): 67–83.

[17] CHEN JS, MA E, HARRINGTON LB, *et al*. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. Science, 2018, 360(6387): 436–439.

[18] WANG Y, YANG T, LIU G, *et al*. Application of CRISPR/Cas12a in the rapid detection of pathogens [J]. Clinica Chimica Acta, 2023, 548: 117520.

[19] LI Z, DING X, YIN K, *et al*. Instrument-free, CRISPR-based diagnostics of SARS-CoV-2 using self-contained microfluidic system [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 199: 113865.

[20] CHEN Y, XU X, WANG J, *et al*. Photoactivatable CRISPR/Cas12a strategy for one-pot DETECTR molecular diagnosis [J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(27): 9724–9731.

[21] SWARTS DC, JINEK M. Mechanistic insights into the *cis*-and *trans*-acting DNase activities of Cas12a [J]. Molecular Cell, 2019, 73(3): 589–600.

[22] ZHAO Y, WU W, TANG X, *et al*. A universal CRISPR/Cas12a-powered intelligent point-of-care testing platform for multiple small molecules in the healthcare, environment, and food [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2023, 225: 115102.

[23] LI SY, CHENG QX, WANG JM, *et al*. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection [J]. Cell Discovery, 2018, 4(1): 20.

[24] MAO Z, CHEN R, WANG X, *et al*. CRISPR/Cas12a-based technology: A powerful tool for biosensing in food safety [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 122: 211–222.

[25] WEN J, DENG H, HE D, *et al*. Dual-functional DNAzyme powered CRISPR-Cas12a sensor for ultrasensitive and high-throughput detection of Pb^{2+} in freshwater [J]. Science of the Total Environment, 2024, 911: 168708.

[26] KANG Y, SU G, YU Y, *et al*. CRISPR-Cas12a-based aptasensor for on-site and highly sensitive detection of microcystin-LR in freshwater [J]. Environmental Science & Technology, 2022, 56(7): 4101–4110.

[27] WANI AK, AKHTAR N, CHOPRA C, *et al*. CRISPR/Cas12a-based biosensors for environmental monitoring and diagnostics [J]. Environmental Technology & Innovation, 2024, 34: 103625.

[28] LIU H, WANG J, ZENG H, *et al*. RPA-Cas12a-FS: A frontline nucleic acid rapid detection system for food safety based on CRISPR-Cas12a combined with recombinase polymerase amplification [J]. Food Chemistry, 2021, 334: 127608.

[29] LIU H, HU X, ZENG H, *et al*. A rapid and high-throughput system for the detection of transgenic products based on LAMP-CRISPR-Cas12a [J]. Current Research in Food Science, 2023, 7: 100605.

[30] 侯雨萌, 赵振兴, 王思元, 等. 基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(2): 268–275.
HOU YM, ZHAO ZX, WANG SY, *et al*. A one-tube rapid detection method for maizedwarf mosaic virus based on RT-RAA andCRISPR/Cas12a [J]. Journal of Jiangsu Agricultural Sciences, 2025, 41(2): 268–275.

[31] SHAIZADINOVA A, AMANZHOLOVA M, KIRILLOV S, *et al*. Rapid and highly sensitive LAMP-CRISPR/Cas12a-based identification of bovine mastitis milk samples contaminated by *Escherichia coli* [J]. Journal of Agriculture and Food Research, 2023, 14: 100721.

[32] 天根生化科技(北京)有限公司. 磁珠法植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP342-01)说明书[EB/OL]. (2023-04-23) [2025-08-31]. https://www.tiangen. com/content/details_40_23323.html
Tiangen Biotech (Beijing) Co., Ltd. Manual of magnetic plant genomic DNA kit (DP342-01) [EB/OL]. (2023-04-23) [2025-08-31]. https://www.tiangen. com/ content/details_40_23323.html

[33] TAVERNIERS I, DE-MEYER L, VAN-DROOGENBROECK B, *et al*. Influence of plant developmental stage on DNA yield and extractability in MON810 maize [J]. Agricultural and Food Science, 2015, 24(2): 128–138.

[34] LAFON-PLACETTE C, KÖHLER C. Embryo and endosperm, partners in seed development [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2014, 17: 64–69.

[35] LOPES MA, LARKINS BA. Endosperm origin, development, and function [J]. The Plant Cell, 1993, 5(10): 1383.

[36] WANERE SS, PHAD AP, JAGTAP RK, *et al*. Cost-effective and reliable genomic DNA extraction from plant seedlings for high-throughput genotyping in seed industries [J]. Analytical Biochemistry, 2023, 676: 115245.

[37] ZHU Y, XU Y, DU J, *et al*. Field detection of genetically modified crops: Simple DNA extraction, rapid assay and automatic output on smartphone [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2024, 418: 136339.

[38] DU K, ZENG Q, JIANG M, *et al*. CRISPR/Cas12a-based biosensing: Advances in mechanisms and applications for nucleic acid detection [J]. Biosensors, 2025, 15(6): 360.

[39] NALEFSKI EA, KOOISTRA RM, PARIKH I, *et al*. Determinants of CRISPR Cas12a nuclease activation by DNA and RNA targets [J]. Nucleic Acids Research, 2024, 52(8): 4502–4522.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)