

574

OPPDRAKSMELDING

Overvåking og detektering av
genetisk materiale fra GMOer
og GMO-baserte produkter

Kirsti Kvaløy



NINA • NIKU

NINA Norsk institutt for naturforskning

Overvåking og detektering av genetisk materiale fra GMOer og GMO-baserte produkter

Kirsti Kvaløy

NINA•NIKUs publikasjoner

NINA•NIKU utgir følgende faste publikasjoner:

NINA Fagrapport

NIKU Fagrapport

Her publiseres resultater av NINAs og NIKUs eget forskningsarbeid, problemoversikter, kartlegging av kunnskapsnivået innen et emne, og litteraturstudier. Rapporter utgis også som et alternativ eller et supplement til internasjonal publisering, der tidsaspekt, materialets art, målgruppe m.m. gjør dette nødvendig.

Opplag: Normalt 300-500

NINA Oppdragsmelding

NIKU Oppdragsmelding

Dette er det minimum av rapportering som NINA og NIKU gir til oppdragsgiver etter fullført forsknings- eller utredningsprosjekt. I tillegg til de emner som dekkes av fagrapportene, vil oppdragsmeldingene også omfatte befæringsrapporter, seminar- og konferanseforedrag, årsrapporter fra overvåkningsprogrammer, o.a.

Opplaget er begrenset. (Normalt 50-100)

NINA•NIKU Project Report

Serien presenterer resultater fra begge instituttenes prosjekter når resultatene må gjøres tilgjengelig på engelsk. Serien omfatter original egenforskning, litteraturstudier, analyser av spesielle problemer eller tema, etc.

Opplaget varierer avhengig av behov og målgrupper.

Temahefter

Disse behandler spesielle tema og utarbeides etter behov bl.a. for å informere om viktige problemstillinger i samfunnet. Målgruppen er "almenheten" eller særskilte grupper, f.eks. landbruket, fylkesmennenes miljøvern-avdelinger, turist- og friluftlivskretser o.l. De gis derfor en mer populærfaglig form og med mer bruk av illustrasjoner enn ovennevnte publikasjoner.

Opplag: Varierer

Fakta-ark

Hensikten med disse er å gjøre de viktigste resultatene av NINA og NIKUs faglige virksomhet, og som er publisert andre steder, tilgjengelig for et større publikum (presse, ideelle organisasjoner, naturforvaltningen på ulike nivåer, politikere og interesserte enkeltpersoner).

Opplag: 1200-1800

I tillegg publiserer NINA og NIKU-ansatte sine forskningsresultater i internasjonale vitenskapelige journaler, gjennom populærfaglige tidsskrifter og aviser.

Kvaløy, K. 1998. Overvåking og detektering av genetisk materiale fra GMOer og GMO-baserte produkter. - NINA Oppdragsmelding 574: 1-39.

Trondheim, desember 1998

ISSN 0802-4103

ISBN 82-426-0999-3

Forvaltningsområde:

Rettighetshaver ©:

Stiftelsen for naturforskning og kulturminneforskning
NINA•NIKU

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

Redaksjon:

Bjørn Åge Tømmerås
NINA•NIKU, Trondheim

Design og layout:

Synnøve Vanvik

Sats: NINA•NIKU

Kopiering: Norservice

Opplag: 200

Kontaktadresse:

NINA•NIKU
Tungasletta 2
7005 Trondheim
Tel: 73 58 05 00
Fax: 73 91 54 33

Tilgjengelighet: Åpen

Prosjekt nr.: 16265 Overvåking og detektering av GMO

Ansvarlig signatur:

Bjørn Åge Tømmerås

Oppdragsgiver:

Direktoratet for naturforvaltning

Referat

Kvaløy, K. 1998. Overvåking og detektering av genetisk materiale fra GMOer og GMO-baserte produkter. - NINA Oppdragsmelding 574: 1-39.

I forbindelse med eventuell utsetting, import og bruk av genmodifiserte organismer (GMOer) både i forsknings- og kommersiell sammenheng, vil det være nødvendig med overvåking av utilsiktede negative konsekvenser. Forvaltningens ansvar er å se til at kontroll og overvåking foretas på best mulig måte ved at kompetanse foreligger både på det teoretiske og praktiske plan. De negative konsekvenser det her kan være snakk om, avhenger av hvilken form GMOen eller materialet som stammer fra GMOen foreligger i, i tillegg til hvilket formål og bruksområde denne eller dette materiale er tiltenkt.

Prosjektet er todelt hvor første del er en vurdering av emnet rent teoretisk (del I), mens den andre delen er en praktisk laboratoriedel (del II) hvor målet var å opparbeide kompetanse for metodikk til bruk ved overvåking og påvisning av GMOer og genetisk materiale som har sitt opphav i denne type organismer. Det er i begge delene lagt størst vekt på plantemateriale.

Del I tar for seg både generelle aspekter ved overvåking av GMOer og rundt spesifikk påvisning av enkelte genmodifiserte plantetyper som finnes på markedet i dag. Utredningen tar for seg temaer som regulering, kommersialisering og merking av produkter som stammer fra genmodifiserte planter. Ulike typer metodikk for påvisning av GMO-baserte produkter vurderes, med hensyn til analytiske egenskaper.

I del II er det fokusert på metodikk for kvalitativ påvisning av genetisk plantemateriale, med ulikt utgangspunkt. Plantemateriale som blir analysert er transgent potet-, tomat- og soya-materiale i tillegg til materiale fra ikke-transgene planter. Flere typer matprodukter ble også analysert for å kunne se om metoden fungerte på slike prøver. Påvisningen tok utgangspunkt i både naturlig tilstedeværende og innsatte "transgene" genetiske elementer.

Oppsiktsvekkende resultater ble oppnådd under screeningsprosedyren utført i del II da fire av prøvene (to varianter av to ulike produkter) på markedet i norske butikker viste seg å inneholde materiale som stammet fra den genmodifiserte soyabønnen Roundup Ready™ Soya produsert av det amerikanske selskapet Monsanto. Påvisningen foretatt i juni 1998 var den første av sitt slag i Norge. Det ene produktet var merket med "Soyabønnene er ikke genmodifisert". Det andre produktet var umerket.

Metoden som ble brukt i det praktiske arbeidet var den såkalte PCR-teknikken. Denne følsomme teknikken kan teoretisk sett påvise genetisk materiale som er tilsetede i en enkelt kopi. Det kan imidlertid foreligge begrensninger for en slik sensitivitet både metodisk og i forhold til hvilken type materiale en har som utgangspunkt for analysen. I enkelte

bearbejdede produkter kan begrensningen være enten at DNAet er sterkt nedbrutt eller at det finnes andre stoffer i utgangsmaterialet som kan hemme PCR-teknikken. Uten spesialapparatatur er nøyaktig kvantifisering av andel transgent versus ikke-transgent materiale vanskelig å bestemme.

I forventning om at genetisk informasjon nødvendig for påvisning av GMOer og genetisk materiale som stammer fra disse vil bli vanskeligere tilgjengelig i framtiden enn den er i dag, foreslåes det opprettelse av en database hvor slik type informasjon kan samles.

Emneord: GMO - GMO-baserte produkter - påvisningsmetoder - PCR-teknikk - Roundup Ready Soya.

Kirsti Kvaløy, Norsk institutt for naturforskning, Tungasletta 2, 7005 Trondheim

Abstract

Kvaløy, K. 1998. Monitoring and detection of genetic material derived from GMOs and GMO-derived products. - NINA Oppdragsmelding 574: 1-39.

The release, import and use of genetically modified organisms (GMOs) both related to research- and commercial trade might have unforeseen negative effects on health and environment. These potential negative effects are necessary to monitor. The regulatory authority's responsibility is to see that control and monitoring is undertaken in the best possible way by insuring that knowledge is present both at the theoretical and practical level. The negative consequences related to this topic depend upon the GMO or the material derived from it in question, the condition of the GMO-material, in addition to what purpose and area of use this organism or material might be intended for.

The project was divided into two parts where one part is an evaluation of the topic on a theoretical basis (part I), while the second part is a practical one performed in a laboratory (part II). The purpose of the second part was to build up practical knowledge on how to monitor and detect GMOs and material derived from these types of organisms. In both parts plant material is strongly emphasised.

Part I include both general aspects around monitoring of GMOs and more specific description on the detection of certain types of genetically modified plants on the market today. The report entails topics such as regulation; commercialism and labelling of products which are derived from genetically modified plants. Various methods for detecting GMO-based products are evaluated in relation to their analytical abilities.

In part II methods for qualitative detection of genetically modified material from various sources is emphasised. Plant material that is analysed is derived from transgenic potato-, tomato- and soya- in addition to material from non-transgenic plants. In addition several types of food products were also analysed to test the method on different sources of material. The basis for the detection was to be able to identify naturally occurring and transgenic genetic elements.

Astonishing results were obtained during the screening procedure performed in part II when it was discovered that four samples (two varieties of two different products) on the market in Norwegian stores contained material derived from the genetically modified soybean Roundup Ready™ Soya produced by the American company Monsanto. The discovery was done in June 1998 and was the first of its kind in Norway. One of the products were labelled with "The soybeans are not genetically modified", the other one was not labelled.

The method that was focused on in the practical work that was performed was the PCR-technique. This sensitive technique can theoretically enable the detection of genetic material that is present only in one copy. However, there might be limitations to this sensitivity both methodically and dependent on what type of source the DNA is derived from. In some of the processed products the limitations might be that the DNA is heavily degraded or that there are other compounds present in the sample that might inhibit the PCR-reaction. Without special apparatus the exact quantification of the portion of transgenic material versus non-transgenic is difficult to determine.

In the anticipation of genetic information necessary for detection of GMOs and GMO-derived material being less available in the future than it is today, I suggest the establishment of a database where such information is gathered.

Key words: GMO - GMO-based products - detection methods - PCR technique - Roundup Ready Soya.

Kirsti Kvaløy, Norwegian Institute for Nature Research, Tugassetta 2, N-7005 Trondheim, Norway.

Forord

Dette prosjektet er utført på oppdrag fra Direktoratet for naturforvaltning (DN) som et ledd i forvaltningens behov for oppbygging av kompetanse rundt overvåking av genmodifiserte organismer. Prosjektet er oppfølging av NINA Oppdragsmelding nr. 476 "Overvåking av genmodifiserte planter og dyr" som ble utarbeidet i 1997.

Prosjektet beskrevet her tar i hovedsak for seg metodikk for påvisning av genetisk materiale som et ledd i opparbeidelse av kompetanse for påvisning av GMOer eller materiale med opprinnelse i disse spredt ut i miljøet. Prosjektet er delt inn i en teoretisk og en praktisk del hvor den praktiske delen er sterkt fokusert på genetisk påvisningsmetodikk basert på plantemateriale og i bearbejdede produkter som inneholder plantemateriale. Pga denne fokuseringen i den praktiske delen, har det derfor vært naturlig også å fokusere på genmodifiserte planter i den teoretiske delen av prosjektet. Denne vektleggingen har også vært naturlig fordi det foreløpig i miljøforvaltningssammenheng knyttes størst utfordring til eventuell miljøovervåking av genmodifiserte planter framfor andre genmodifiserte organismer.

Prosjektet ble startet med et opphold i Helen Parkes laboratorium, LGC - Laboratory of Government Chemist, England. Det rettes en stor takk til Helen Parkes og Jason Saywer for god hjelp og gjestfrihet i forbindelse med arbeidet foretatt i deres laboratorium. Det rettes en takk til Atle Bones og hans kollegaer (UNIGEN, NTNU) for donasjon av transgent potetmateriale og *Agrobacterium*-primere. Det rettes også en stor takk til Bjørn Åge Tømmerås (NINA) og Jan Husby (DN) for hjelp til initiering av prosjektet og kommentarer til manuskriptet.

Den teoretiske delen, planlegging og delvis utføring av det praktiske arbeidet ble utført av forsker Kirsti Kvaløy. Store deler av det praktiske arbeidet som ble utført ved genetikklaboratoriet på NINA ble utført i samarbeid med overingeniør Torveig Balstad.

Trondheim, desember 1998

Kirsti Kvaløy
prosjektleder

Innhold

| | |
|--|----|
| Referat..... | 3 |
| Abstract | 4 |
| Forord | 5 |
| Del I: Teoretisk del - Kirsti Kvaløy | 6 |
| 1 Innledning til del I | 6 |
| 1.1 Bruk og risikovurdering av genmodifiserte organismer (GMOer) | 6 |
| 1.2 Bruk og risikovurdering av genmodifiserte dyr | 9 |
| 1.3 Bruk og risikovurdering av genmodifiserte mikroorganismer | 10 |
| 2 Overvåking av GMOer | 11 |
| 2.1 Genmodifiserte planter (GMPer) | 12 |
| 2.1.1 Roundup Ready soya..... | 13 |
| 2.1.2 Flavr Savr™-tomaten..... | 13 |
| 2.1.3 Bt-mais | 14 |
| 2.2 Påvisning av GMP-materiale | 14 |
| 3 Produkter basert på materiale fra GMOer..... | 15 |
| 3.1 Kommersialisering | 15 |
| 3.2 Regulering relatert til genmodifiserte matprodukter | 15 |
| 4 Metoder for identifisering av GMO-baserte produkter..... | 16 |
| 4.1 PCR-baserte metoder..... | 16 |
| 4.1.1 Falske positive og falske negative | 17 |
| resultater | 17 |
| 4.1.2 Sensitivitet..... | 17 |
| 4.1.3 DNA-kvalitet | 17 |
| 4.1.4 Hemming av PCR-reaksjonen..... | 17 |
| 4.1.5 Verifisering av PCR-resultater..... | 17 |
| 4.2 Andre metoder basert på oppformering av nukleinsyrer | 18 |
| 4.3 Metoder basert på proteiner | 18 |
| 4.4 Deteksjon ved enzymatisk aktivitet | 18 |
| 5 Kvantitative undersøkelser | 19 |
| 5.1 Kvantitativ PCR | 19 |
| Del II: Praktisk del - Kirsti Kvaløy og Torveig Balstad | 20 |
| 6 Innledning til del II | 20 |
| 7 Materialer og Metoder | 21 |
| 7.1 Plantemateriale..... | 21 |
| 7.1.1 Transgent potetmateriale | 21 |
| 7.1.2 Transgene tomater | 21 |
| 7.1.3 Transgene soyabønner | 21 |
| 7.1.4 Ikke-transgene planter | 21 |
| 7.2 Matprodukter | 21 |
| 7.2.1 Matprodukter, ukjent om innhold av transgent materiale | 21 |
| 7.2.2 Transgene matprodukter..... | 21 |
| 7.3 DNA-isoleringsprosedyrer | 21 |
| 7.4 PCR-strategi | 22 |

| | | |
|-------|--|----|
| 8 | Resultater | 24 |
| 8.1 | Resultater fra analyse av plantemateriale..... | 24 |
| 8.1.1 | Transgent potetmateriale..... | 24 |
| 8.1.2 | Transgene tomater | 25 |
| 8.1.3 | Transgene soyabønner | 25 |
| 8.1.4 | Ikke-transgene planter..... | 26 |
| 8.2 | Resultater fra analyse av matprodukter | 28 |
| 8.2.1 | Kvalitative undersøkelser av matprodukter | 28 |
| 8.2.2 | Kvantitative undersøkelser av matprodukter | 32 |
| 9 | Diskusjon..... | 33 |
| 10 | Konklusjon..... | 34 |
| 11 | Forslag til videre satsning..... | 34 |
| 12 | Litteratur | 35 |
| 13 | Ordforklaringer..... | 37 |
| 14 | Appendix..... | 38 |

Del I: Teoretisk del - Kirsti Kvaløy

1 Innledning til del I

I forbindelse med eventuell utsetting, import og bruk av genmodifiserte organismer (GMOer) både i forsknings- og kommersiell sammenheng, vil det være nødvendig med overvåking for å kunne oppdage utilsiktede konsekvenser. Forvaltningens ansvar er å se til at kontroll og overvåking foretaes på best mulig måte ved at kompetanse foreligger både på det teoretiske og praktiske plan.

Denne teoretiske delen starter med litt generelle betraktninger rundt bruk og risikovurdering av forskjellige typer GMOer. Det er fokusert på planter fordi dette er typen organismer med størst relevans mhp. forvaltning på det nåværende tidspunkt. Rapporten tar for seg generelle aspekter ved overvåking av GMOer og fokuserer så mer spesifikt på enkelte typer av genmodifiserte planter som er kommersielt tilgjengelig i dag.

Store deler av rapporten dreier seg om temaer relevante ved kommersialisering og analyse av materiale som er basert på genmodifiserte planter. Grunnen til denne fokuseringen er delvis at den praktiske delen av prosjektet ble startet i et laboratorium i London, England hvor de holder på med analyse av genmodifiserte matprodukter, men også fordi det kanskje er denne typen genmodifisert materiale som i dag er viktigst for forvaltningen å kunne kontrollere / påvise.

1.1 Bruk og risikovurdering av genmodifiserte organismer (GMOer)

Økt kunnskap om organisering av genetisk materiale i organismer og bruk av genteknologiske teknikker har spesielt i løpet av de siste fem til ti årene ført til en drastisk økning i antall genmodifiserte landbruksplanter. Typene genmodifiseringer som har vært foretatt av planter kan grovt sett inndeles i følgende:

- Resistens overfor sykdom, ugrasmiddel, skadeorganismer
- Resistens overfor stress (høy saltkonsentrasjon, tørke, høy temperatur, kulde)
- Forbedring av kvalitet (stivelsesinnhold, næringsinnhold, forbedret holdbarhet)
- Bruk i farmasøytisk industri

Tabell 1 viser en oversikt over egenskaper som er satt inn i GMPer.

Genetisk manipulasjon av landbruksplanter har etter hvert blitt et av hovedsatsingsområdene innen landbrukssektoren. I dag er minst 27 ulike typer genmodifiserte landbruksplanter testet i felt i EU (se tabell 2). De fleste felt-

Tabell 1. Oversikt over egenskaper satt inn i GMPer (Madsen & Poulsen 1997).

| Egenskap | |
|-------------------------------------|--|
| Herbicidtoleranse | Glyfosat-toleranse Glufosinat-toleranse Bromoksynil-toleranse Toleranse overfor ALS-inhibitorer |
| Insekttoleranse | Bt-toksin Protease inhibitorer -amylase inhibitorer Lectin proteiner |
| Virustoleranse | Virus-kappeproteiner Satellitt RNAer Replikase Antisens Defekt |
| Sopptoleranse | |
| Bakterietoleranse | |
| Blomsterfarge | |
| Endrede metabolitter | |
| Tørketoleranse | |
| Toleranse overfor oksydativt stress | |
| Kuldetoleranse | |
| Salttoleranse | |

Tabell 2. GM-planter søkt om utsetting innen EU (mai 1998): viktigste kultiverte planter (SNIFS- Summary Notification Information of Format)

| Viktigste kulturer | Totalt* | Herbicid-resistens | Metabolisme modifikasjon | Insekt-resistens | Hann-sterilitet | Virus-resistens | Sopp-resistens | Bakterie-resistens | Nematode-resistens | Bare markørgen |
|--|---------|--------------------|--------------------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------|--------------------|--------------------|----------------|
| Mais | 314 | 286 | 8 | 141 | 25 | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Raps | 267 | 198 | 44 | 2 | 78 | 1 | 19 | 1 | 0 | 3 |
| Sukkerbete | 200 | 178 | 13 | 0 | 0 | 41 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Potet | 127 | 10 | 75 | 18 | 5 | 17 | 19 | 9 | 4 | 1 |
| Tomat | 67 | 5 | 30 | 4 | 2 | 27 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Tobakk | 47 | 11 | 27 | 0 | 0 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 |
| Sikori | 37 | 39 | 0 | 1 | 31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Trær** | 17 | 2 | 6 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| Grønnsaker*** | 16 | 4 | 4 | 5 | 4 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Melon/squash | 14 | 0 | 1 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hvete/bygg | 13 | 8 | 5 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 | 0 | 4 |
| Soyabønne | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Bomull | 14 | 8 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Frukt**** | 16 | 0 | 7 | 2 | 0 | 3 | 4 | 0 | 0 | 1 |
| Antall forespørsler totalt forGM-planter | 1193 | | | | | | | | | |

* Grunnen til at det totale antallet er lavere enn egenskapene lagt sammen, er at det i enkelte av plantene er tilført mer enn en egenskap

** Poppel, osp, bjørk, eukalyptus, gran, furu

*** Blomkål, salat, aubergine, gulrot

**** Drue, eple, plomme, sitrus, jordbær, kirsebær, kiwi, oliven

utsettinger i EU ble foretatt i Belgia, Frankrike, Italia, Nederland og England.

Antall og typer av genmodifiserte planter testet i felt i USA er mye mer omfattende enn i EU, noe som bl.a har ført til forenklete reguleringsprosedyrer. I USA må planter som er regulerte (slik som genmodifiserte planter) og som skal settes ut i naturen gies godkjenning av APHIS, "Animal and Plant Health Inspection Service". Hvis APHIS oppnår "Finding Of No Significant Impact" ("FONSI"), blir en godkjenning utstedt. "Notifiseringer" er en type forenklet godkjenning for utsetting hvor godkjenningsprosedyren framskyndes (effektiv fra 30. April 1993). Det er bare enkelte planter slik som tomat, mais, tobakk, soyabønne, bomull og potet som oppfyller kravene til slik forenklet reguleringsprosedyre. I tillegg til slike forenklete prosedyrer, har APHIS deregulert enkelte typer GM-planter. Dette er vanligvis et skritt mot kommersialisering av produktet. **Tabell 3** viser antall feltutsettinger i USA av de mest vanlige landbruksplantene fra 1987 til 30.11 1997 og **tabell 4** viser en oversikt over antall tillatelser og "notifiseringer" årlig i det samme tidsrommet.

Tabell 3. Feltutsettinger*: Mest vanlige landbruksplanter i USA (APHIS) fra 1987 til 3.11.1997.

| Plante | Antall |
|----------------|--------|
| Mais | 1420 |
| Tomat | 369 |
| Soyabønne | 329 |
| Potet | 332 |
| Bomull | 237 |
| Melon & squash | 120 |
| Tobakk | 114 |
| Raps | 81 |
| Sukkerbete | 39 |
| Ris | 22 |
| Hvete | 28 |
| Alfalfa | 19 |
| Agurk | 16 |
| Krypkvein | 11 |
| Solsikke | 10 |
| Salat | 8 |
| Eple | 8 |
| Peanøtt | 6 |

* Tillatelser og notifiseringer

Spesiell bekymring har vært knyttet til potensielle negative konsekvenser av stor-skala utsettinger av enkelte av de genmodifiserte kulturplantene. Av spesiell relevans er de typer planter som involverer resistens overfor sykdom, ugrasmidler, skadeorganismer og planter med økt toleranse overfor stress. De sistnevnte plantene vil ha spesiell risiko

knyttet direkte til egenskapen de er genmodifisert for, men om risikoen er stor eller liten vil ofte avhenge av hvilken type plante det gjelder og i hvilket miljø utsettingen skal foregå.

Tabell 4. Oversikt over årlige tillatelser og "notifiseringer" i USA (APHIS) fra 1987 til 3.11.1997.

| År | Tillatelser | "Notifiseringer" | Tillatelser + "Notifiseringer" |
|------|-------------|------------------|-----------------------------------|
| 1987 | 5 | - | |
| 1988 | 16 | - | |
| 1989 | 30 | - | |
| 1990 | 51 | - | |
| 1991 | 90 | - | |
| 1992 | 160 | - | |
| 1993 | 117 | 189 | 306 |
| 1994 | 69 | 515 | 584 |
| 1995 | 87 | 620 | 707 |
| 1996 | 114 | 490 | 604 |
| 1997 | 104 | 643 | 747 |

Problemer med oppbygging av resistens overfor ulike typer pest har vært et konstant problem. Erfaring har vist at minst 447 arter av leddyr har utviklet resistens overfor ulike pesticider (Georghiou, 1990; Roush & McKenzie, 1987). Bekymringene i forbindelse med GMPer gjort resistente overfor ulike typer angrep har vært knyttet til den samme problemstillingen, nemlig faren for oppbygging av resistens målorganismen mot GMPene. En slik utvikling vil forverre den opprinnelige situasjonen slik at nye tiltak mot den aktuelle pesten eller skadeorganismen hele tiden må utvikles. Bruk av GMPer modifisert for høyere toleranse overfor angrep av sopp og bakterier er også omdiskutert mhp. hvor lang tid en slik toleranse kan opprettholdes.

Herbicidresistens i GMPer kan enten oppnås ved overproduksjon av målsetet for herbicidet, degradering av herbicidet eller ved å senke affiniteten for herbicidet (se f.eks. Kvaløy et al. 1998). Den viktigste potensielle problemet ved bruk av herbicidresistente GMP er utvikling av herbicidresistent ugras. Dette problemet kan oppstå under selektivt press om den transgene planten har potensiale for dannelse av hybrider med beslektede ugrasarter eller om den selv kan forville seg til miljøet og danne ville populasjoner. Om ulike herbicidresistens gener brukes i samme type landbruksplante, kan dette føre til multiresistente kulturer.

Planter modifisert til å tåle stress bedre enn de opprinnelige ikke-modifiserte variantene har potensiale for økt "fitness" under gitte betingelser og representerer trolig derfor den største risikoen for uforutsett etablering og invasjonsevne enn mange av de andre genmodifiserte variantene. Dette gjør at denne type planter har stort potensiale for å føre

til negative konsekvenser både i landbruks- og økologisk sammenheng.

Planter er blitt gjort virusresistente ved at de er blitt tilført viruskappe-protein. Metoden har vist seg å være brukbar for mange typer virus og for ulike typer vertsplanter som f.eks. tomat som uttrykker TMV-kappeprotein og potet som uttrykker resistens overfor PVX- og PVY-virus. Stor-skala bruk av virusresistente planter hvor plantene har fått tilført et virus-kappeprotein, har imidlertid vært et svært kontroversielt tema pga to mulige farer; Den første er at et annet virus enn den som planten er gjort resistent overfor, kan infisere den transgene planten og at nukleinsyren båret i dette viruset kan bruke kappe-proteinet allerede tilstede i planten for så å få endret vertsspekter eller virusfunksjoner. En annen type fare er at det skjer en rekombinasjon mellom kappe-protein RNAet produsert av den transgene planten og et sekundært virus som infiserer planten, og at disse tilsammen danner en ny type virus. Det foreligger dokumentasjon fra laboratorieforskning over at slike hendelser kan forekomme (Lecoq et al. 1993; Greene & Allison, 1994).

Metodikk for så tidlig som mulig å kunne påvise genspredning er viktig fordi egenskaper ved eventuelle hybrider mellom den genmodifiserte planten og planten den eventuelt har hybridisert seg med vil være ukjente. At det er muligheter for at transgener skal spres fra kulturplanter til ugras er de fleste enige om fordi erfaring har vist at planter ofte krysser seg med hverandre, utveksler gener og av og til produserer fertilt avkom. For eksempel er oljeraps og havre selv planter som er et resultat av en hybriddannelse. Hvis en genmodifisert kulturplante ikke har noen ville slektninger å krysse seg med, er det liten sannsynlighet for at transgenet blir spredt. Imidlertid er det mange landbruksplanter som dyrkes der det finnes ville slektninger, inkludert oljeraps, ris, mais og bete. Sweet uttalte nylig "da vi starter med stor-skala dyrking av genmodifisert oljeraps gjennomført i England, vil plantene være overalt" (Brookes, 1998) og dette er nok tilfelle med enkelte typer planter i visse miljøer.

I likhet med GMPer kan konvensjonelle kulturplanter også selvsagt overføre genetisk materiale til ugras. Representerer da genmodifiserte planter en større trussel for miljøet rundt enn konvensjonelle landbruksplanter av samme opprinnelse? Om transgener vil opprettholdes i plantepopulasjoner over tid avhenger av selektivt press for opprettholdelse av disse i miljøet. Planter med resistensgener overfor spesifikke insekter eller virus som f.eks. Bt-mais eller Bt-bomull som inneholder resistens overfor insektlarver, kunne teoretisk sett gi disse plantene et konkurransefortrinn både innenfor og utenfor dyrkingsområdet. Om dette ville være av betydning i økologisk eller landbrukssammenheng avhenger av om det spesielle insektet eller pesten som planten er gjort resistent overfor er en viktig faktor for kontroll av plantens overlevelse og konkurranseedyktighet.

Enkelte mener at genmodifiserte planter er mindre risikable mhp uforutsette konsekvenser enn konvensjonelt fram-

avlede kulturplanter fordi det her er snakk om overføring av få gener i forhold til tusenvis av gener ved konvensjonell avl. Dette kan være en sannhet med modifikasjoner hovedsakelig pga at metoden for innsetting av genetisk materiale i planter ved genteknologiske metoder fører til ukontrollert innsetting i plantens eget genom noe som kan føre til endret genetisk uttrykk i planten. Bergelson (1998) viste nylig at en type herbicidresistente transgene sennepsplanter var tjuv ganger mer promiskuøse enn andre konvensjonelle sennepsplanter trolig fordi det introduserte genet hadde avbrutt andre gener som hadde med pollinering og / eller fertilitet å gjøre.

1.2 Bruk og risikovurdering av genmodifiserte dyr

Det kommersielle omfanget for bruk av genmodifiserte dyr er fremdeles veldig lavt i forhold til genmodifiserte planter. I NINA-oppdragsmelding nr. 476 (Kvaløy, 1997) er eksempler på genmodifiserte dyr som allerede er tatt i bruk eller som en teoretisk sett kan tenke seg vil bli tatt i bruk i framtiden, kort omtalt. Eksempler på dyr en har genmodifisert er følgende; insekter, orm/mark/nematode, frosk, fisk, kylling, mus, kanin, geit, sau, ku og gris.

Insekter som i artstall overstiger fem sjettedel av alle dyr på jorda, har så langt vist seg å være forholdsvis vanskelig å genmodifisere. Bare banaflua (*Drosophila melanogaster*) blir genmodifisert i forskningssammenheng på en rutinemessig basis. Tatt i betraktning den store innflytelsen denne dyregruppen har på både global matproduksjon og som vektor i noen av de mest dødelige sykdommene som finnes, tror mange at å utvide spekteret av insekter som kan genmodifiseres vil være en viktig strategi både for å nyttegjøre seg av insekter relatert til biologisk kontroll og i å konstruere pest-kontroll strategier. Nylig er det rapportert stabil transformasjon av Middelhavs banaflua (Loukeris et al. 1995) og dengue/gulfebermyggen (Jasinskiene et al. 1998; Coates et al. 1998). Dette kan tyde på at genmanipulering av andre økonomiske og medisinske viktige insektarter kan forventes i nær framtid (Marshall 1998). Det knytter seg imidlertid stor bekymring til utsetting av genmodifiserte insekter. Potensiell effekt av utsetting kan være knyttet direkte til den transgene egenskapen eller til det faktum at det foretaes en introduksjon av en fremmed art. Vurdering av potensielle effekter knyttet til det sistnevnte kan relateres til klassisk biologisk bekjempelse ved bruk av insekter og risiko ved dette (Hindar et al. 1992).

Relatert til utsetting av genmodifiserte dyr miljøet, har det ikke skjedd mye de siste par årene, men målet ved dannelse av transgene dyr har vel i de fleste sammenhenger heller ikke vært utsetting av dyrene i naturlige miljøer. Når det gjelder utvikling av transgen fisk har antall arter som har blitt gjort transgene økt kraftig de siste årene. Følgende er eksempler på arter som er blitt genmodifisert: reinbueørret, Medaka, gullfisk, laks, Tilapia, zebrafisk, gjedde, karpe. Det har vært fokusert på utvikling av fisk

med akselerert vekst, toleranse til lave temperaturer og sykdomsresistens. Fremdeles er utsetting av transgen fisk et kontroversielt tema pga den forventede negative innvirkningen en slik aktivitet vil ha på økosystemet.

deteksjon av enzymatisk aktivitet av "reporter"gener som mål på uttrykk av genen av interesse. For videre beskrivelse av deteksjon av mikroorganismer se f.eks. rapport utgitt av NordTest (Winding et al. 1997).

1.3 Bruk og risikovurdering av genmodifiserte mikroorganismer

Forskning, utvikling og bruk av genmodifiserte mikroorganismer (GMM) i verden i dag er i rask utvikling. Fra å være fokusert på manipulering og bruk av GMM i laboratorier for studier knyttet til biologiske og medisinske problemstillinger, har nå mer oppmerksomhet blitt viet til problemstillinger knyttet til interaksjoner mellom GMM og de ulike miljøer som de er i kontakt med.

GMMer blir benyttet i ulike henseender. De kan benyttes for å produsere kompliserte molekyler som f.eks. insulin og veksthormon. De kan også benyttes til produksjon av vaksiner, tilsetningsstoffer i mat, aktive stoffer i vaskepulver. De kan inkorporeres som "biosensorer" som kan gi mål på tilstedeværelse av ørsmå mengder av gitte substanser eller de kan tilsettes til vann slik at det ikke fryser. Annen bruk er f.eks. ved opprensning av oljesøl.

Et meget omdiskutert tema innenfor problematikken rundt utsetting av GMM er knyttet til muligheten for horisontal genoverføring. Foreløpig er kunnskapen mangelfull mht både frekvens og utstrekning av slike hendelser. Det eksisterer noe kunnskap om de biologiske mekanismene ansvarlige for horisontal genoverføring, men kunnskap spesielt rundt overføring i naturlige stammer og de evolusjonsmessige konsekvensene slike overføringer har, er fortsatt svært mangelfull.

Risikovurdering relatert til GMM avhenger av om metodene som brukes er egnet for deteksjon av disse i miljøet, og en evaluering av effekten GMMen eventuelt har på utsettingsmiljøet. Ulike deteksjonsmetoder, både generelle og spesifikke, kan taes i bruk for deteksjon og overvåking av GMM. Et problem ved deteksjon av bakterier i deres naturlige miljø kan være å skille mellom levende og døde bakterier eller de som er i et slags hvilestadium. Bakterier som er levende, men ikke dyrkbare (VBNC "viable but non-culturable") kan også by på et problem. Aktivt delende bakterier antas å representere en større risiko enn døde bakterier fordi de på en annen måte kan ha interaksjon med miljøet ved konkurranse med naturlig forekommende mikroorganismer, produksjon av metabolitter, utnyttning av ulike substrat, næringsstoffer, gasser osv.

Detektering av GMM kan skje på flere måter; 1) enten direkte ved påvisning av spesifikke nukleinsyrer unike for organismen eller det genetiske materialet som er satt inn f.eks. ved bruk av PCR-teknikken, 2) påvisning av fenotypiske uttrykk av det innsatte genetiske materialet ved immunologiske metoder eller ved seleksjon av f.eks. innsatte antibiotikaresistens-markører eller 3) påvisning av

2 Overvåking av GMOer

Å overvåke er å observere eller å følge utvikling eller prosesser innen et interesseområde. Relatert til GMOer kan en slik overvåking skje på forskjellige nivåer fra langsiktig natur- eller miljøovervåking, til mer kortsiktig overvåking av miljøeffekter direkte relatert til forsøksutsetting. Relevante metoder i sammenheng med overvåking i felt kan også være de benyttet ved kontroll og inspeksjon av innhold av GMO-derivert materiale i grønnsaker, frø, fôr eller menneskemat bl.a. fordi det ofte er de samme organismene det fokuseres på med samme genetiske materiale satt inn. I et langsiktig perspektiv bør det også inngå overvåking knyttet til GMOens nye egenskaper og dennes stabilitet over tid.

I en overvåkingsprosedyre kan en påvise miljøpåvirkning som kan være fordelaktig, nøytral eller skadelig. Om overvåking vil være av nytte for vurdering av miljøpåvirkning eller for vurdering av risiko, vil avhenge av informasjon som allerede eksisterer rundt GMOen og miljøet den settes ut i. Den eventuelle innvirkningen GMOer har på miljøet er en konsekvens av tilsiktede og utilsiktede effekter hvor de tilsiktede effektene bestemmes ved den planlagte bruken av organismen. Uforutsigbare miljøpåvirkninger kan imidlertid også oppstå, men siden disse innvirkningene ikke er forutsett, kan de ikke bli systematisk overvåket før de er oppdaget (Kvaløy, 1997). Dette er trolig det viktigste argumentet for en "føre-var"-holdning til denne typen problematikk.

Overvåking av en GMO innebærer en prosess hvor målet er å følge effekter av en utsetting over tid ved bruk av kjente metoder. Et program med lange, uavbrutte dataserier med jevn frekvens fra bestemte områder, bør være rammen rundt et overvåkingssystem. Samtidig må en slik prosess inneha muligheten til fleksibilitet hvis en ny, uforutsett situasjon skulle dukke opp. Et mål her vil være at en ved overvåkingen klarer å påvise effekter av en utsatt GMO så tidlig som mulig slik at rammene for overvåkingen eventuelt kan forandres undervegs. For at en slik påvisning skal være mulig, forutsettes det at en vet hvor, når og hvordan en må ta prøver. Ut ifra type GMO og kunnskapen som eksisterer om denne vil målet være å kunne forutse hvilke parametre en er nødt til å undersøke. Her kan det antas at praktiske og økonomiske begrensninger i stor grad vil legge rammen rundt overvåkingsprosedyren.

Overvåking av en GMO bør bygge på både økologiske, molekylærbiologiske og populasjonsgenetiske metoder. Metodevalget må i stor grad baseres på hvilken type GMO en har som utgangspunkt. Bestemmelse av hva en skal ta prøver av, hvor mange prøver som er nødvendig for å oppnå tilfredsstillende sannsynlighetsnivå for påvisning av endringer over tid og hvilke metoder en skal bruke for innsamling av materiale, bør bygge på økologisk metodologi. Selve den detaljerte analysen av innsamlet materiale må i stor grad foregå ved hjelp av molekylærbiologiske og populasjonsgenetiske metoder. Her kan generelle metoder for påvisning av genetisk materiale og genprodukt benyttes

for alle typer GMO. At det på forhånd foreligger god kunnskap relatert til det innsatte genetiske materialet er en forutsetning for slik type påvisning. Forutsatt at slik type informasjon er tilgjengelig, gjør at sannsynligheten for påvisning av eventuell spredning av GMOen eller transgener er stor idet det genetisk modifiserte DNAet selv kan egne seg som målsekvens for deteksjon ved genteknologiske teknikker. Dette betyr at hovedbegrensningene i en overvåkingsprosedyre i stor grad avhenger av følsomheten til prøvetakingsprosessen.

Økologer samler data for å teste framsatte hypoteser. Disse hypotesene er ofte like viktige som dataene. I mange økologiske studier stilles spørsmål relatert til populasjonsdynamikk; Hvor mange individer finnes i populasjonen? Endres dette antallet over tid? Hvilke faktorer har innflytelse på den observerte variasjonen? Dette er spørsmål som også er viktige ved overvåking av genmodifiserte organismer. Estimering av populasjonstetthet og populasjonsstørrelse spiller en sentral rolle i slike studier for å kunne estimere tilstanden til GMOen selv og populasjoner som kunne antas å variere som følge av at en organisme er satt ut.

Et sentralt spørsmål i overvåkingsprosedyren er hvor stort antall prøver en må ta for å oppnå at de innsamlede data i størst mulig grad representerer virkeligheten. Dette beregnes ved statistisk analyse som baseres på enkelte kjente faktorer og godkjente feilmarginer (se f.eks. Krebs, 1989).

Overvåkingsprosedyrer bygger ofte på vurdering av risiko forbundet med en aktivitet - her f.eks. selve utsettingen av en GMO. Definisjon av risiko kan uttrykkes som:

Risiko = Hendelse x Fare

En kort definisjon på "risiko" vil være "potensialet for skade som et resultat av at en fare blir realisert". Sentrale spørsmål i forbindelse med økologisk risikovurdering av GMOer er:

- At transgene organismer kan forville seg eller være invasionsdyktige i naturlige habitater
- At deres genetiske materiale vil kunne overføres til ville slektninger og at hybridavkommet blir mer forvillet eller mer invasionsdyktig
- At transgene organismer vil kunne gi direkte skade på mennesker, husdyr eller andre naturlig forekommende organismer (inkludert eventuelt at genene kan overføres til mikroorganismer ved horisontal genoverføring).

Potensielle skader på økosystemet ved introduksjon av en ny organisme er ikke alltid lett å identifisere. Det er kompleksiteten av de biologiske og miljørelaterte prosessene som gjør at utviklinger eller hendelser er vanskelig å forutsi. I enkelte tilfeller kan likevel tidligere erfaringer med introduserte organismer i gitte miljø være av hjelp.

Bakgrunnen for all type analyse er det å kunne påvise organismen selv, hybrider av denne, eller genetisk materiale fra denne overført til ulike typer miljø. Ellers er det

viktig med en nøye planlagt overvåkingsstrategi basert på kunnskap om GMOen, miljøet hvor organismen er planlagt satt ut og interaksjon mellom de to. Det eksisterer mye erfaring og kunnskap rundt overvåking av miljøeffekter som følge av menneskelig aktivitet. Det er relevant å benytte slik type metodologi og kunnskap ved overvåking av GMOer. Erfaringer ved slike typer studier har imidlertid vist at det er vanskelig å evaluere effekter på biologiske systemer pga vanskeligheten ved å estimere økologiske endringer og mangel på kunnskap om den faktiske effekten. Ingen risikovurderingsmodell har evne til med absolutt nøyaktighet å kunne forutsi økologisk endring som følge av menneskelig aktivitet fordi det hersker usikkerhet rundt en rekke faktorer. Disse kan relateres til 1) usikkerhet mht. de estimerte verdier som danner grunnlaget for risikovurderingen, 2) usikkerhet mht selve modellen som er valgt og miljøeffekter på denne og 3) usikkerhet mht om modellen som er valgt innehar dynamikken som reflekterer virkeligheten (Osenberg & Schmitt, 1996). Den beste måten å kunne forutsi effekten av en hendelse på er å integrere felt data, laboratoriedata og risikovurderingsmodeller. Data fra slike studier må så sammenliknes med den faktisk responsen den spesifikke aktiviteten har på miljøet.

For effektiv overvåking av spredning av transgener fra GMOer ved en storskala- felt-utsetting, er det nødvendig med metoder som er raske, presise og med et potensiale for kvantifisering. At metoden er presis er spesielt viktig ved måling av hendelser som forventetes å skje sjelden, fordi falske positive kan ha meget stor innvirkning på det endelige resultatet (Rogers, 1996). For eksempel fant Kareiva og kollegaer (1994) at deteksjon av falske positive (dvs å definere en prøve som positiv når den egentlig er negativ) i en størrelsesorden fra 1 til 10 000 førte til betydelig overestimering av transgen spredning. At påvisningsmetoden er rask er også veldig viktig fordi prøvetakingsantallet må være stort for at spredning skal kunne detekteres (Rogers, 1996).

2.1 Genmodifiserte planter (GMPer)

Forskjellige metoder er utviklet for innsetting av "fremmed" DNA i planteceller som fører til en transformert plante. Metodene baserer seg på 1) biologiske vektorer, 2) fysiske eller 3) kjemiske metoder. For mer detaljert beskrivelse av metodene se f.eks. Potrykus og Sprangenberg (1995). Av et transformasjonssystem burde det kreves følgende (gjengitt i Hemmer, 1997) for at eventuelle endringer i fenotypiske egenskapene til en transgen på best mulig måte skal kunne forutsees over tid:

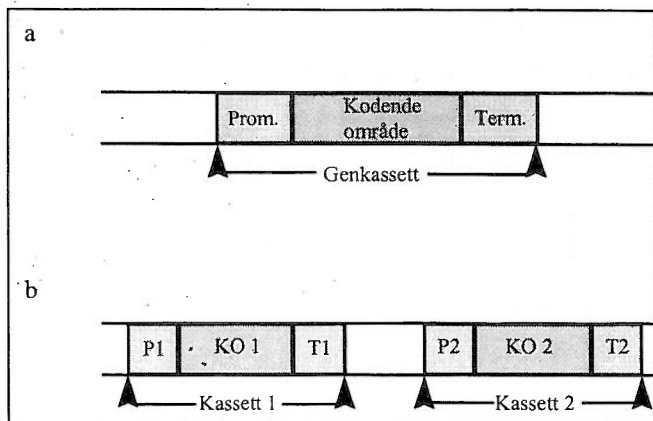
- 1 Stabil integrasjon inn i vertsgenomet uten strukturelle forandringer av det innsatte DNAet
- 2 Integrering av et gitt antall kopier av det transformerende DNAet (vanligvis ≥ 1)
- 3 Stabilitet av den nye fenotypen over flere generasjoner
- 4 Eventuelle vevs- og utviklings-spesifikke reguleringer av det introduserte genet

Blant alle GM-plantene som har blitt godkjent til nå, har den mest brukte transformasjonsmetoden vært bruk av et modifisert plasmid fra batsteinen *Agrobacterium tumefaciens*. Metoden omfatter ofte et todelt vektorsystem hvor en vektor inneholder genene som skal overføres til planten og det andre inneholder gener nødvendige for at selve overføringen skal kunne finne sted (McBride & Summerfelt, 1990). Systemet baseres på et modifisert Ti-plasmid hvor gener ansvarlig for sykdom i planten er fjernet. DNAet som skal settes inn i den genmodifiserte planten er flankert av en DNA-sekvens på begge sider (~25 basepar hver). Disse DNA-flankene er de eneste elementene fra *Agrobacterium* som overføres sammen med DNAet. Ved hjelp av denne metoden overføres et veldefinert DNA-fragment til vertsplanten. Flere kopier av DNAet som overføres kan imidlertid settes inn på samme sted eller på forskjellige steder i motakerplantens kromosomer.

Andre transformasjonsmetoder er basert på kjemiske eller fysiske prinsipper. Dette gjelder DNA-opptak ved plante-protoplaster som gjøres ved at DNA overføres til planteceller hvor celleveggen er fjernet (protoplast) enten ved polyethylene glycol (PEG) eller elektrisk sjokkbehandling (elektroporering). Partikkelbombardement; er en metode som ofte blir brukt for transformasjon av kornplanter. Partiklene består av metall dekket av DNA som blir "skutt" inn i plantecellen. I enkelte av cellene blir det tilførte DNAet integrert i plantegenomet. Plastidtransformasjon foretatt på denne måten har vist å kunne øke uttrykket av de innsatte genene (Maliga, 1993; McBride et al. 1995).

Det innsatte genetiske materialet i de transgene plantene som er tilgjengelige i dag koder oftest for enzymer. Uttrykk av disse enzymene gir så planten de ønskede karakteristika. Proteiner uten enzymaktivitet, slik som virale kappeproteiner, Bt-toksin (δ -endotoksin fra *Bacillus thuringiensis*) eller antisense-konstrukter har også blitt uttrykt. Effektiv uttrykkelse av strukturelle gener gjøres under kontroll av en promoter enten med planteopprinnelse som nopaline syntase (NOS; An et al. 1985) eller en med opprinnelse fra en annen organisme som har vist seg å kunne fungere i planteceller. Eksempel på den sistnevnte typen promoter er blomkål-mosaikk virus 35S-promoter (CaMV35S; Sanders et al. 1987). Terminator DNA-sekvenser må også stamme fra planter eller fra planterelaterte sykdomsorganismer som blomkål-mosaikk virus eller *Agrobacterium*. I dag inneholder faktisk alle godkjente genmodifiserte planter enten blomkål-mosaikk virus 35S-promoter (P-35S) eller derivativer av denne, nos-terminator (nos 3') eller begge disse elementene.

Under dannelse av de transgene plantene må genetiske markører være tilstede som gjør det mulig å skille de transformerte plantene fra foreldreplanten. Slike selekterbare markørgener kan f.eks. være antibiotikaresistens- eller herbicidresistens-gener som gjør det mulig for den transgene planten å vokse ved tilstedeværelse av et spesifikt antibiotika eller herbicid. Transgenet som ønskes uttrykt, den selekterbare markøren og de regulatoriske elementene blir ofte transformert sammen inn i planten (figur 1). Antall



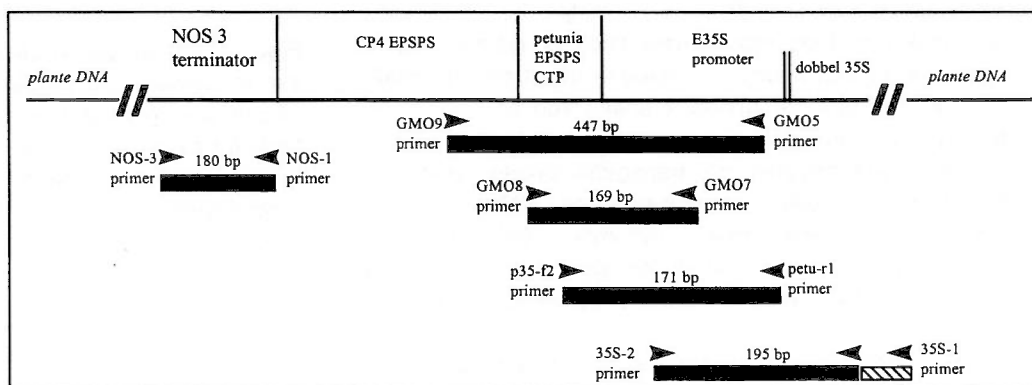
Figur 1. Illustrasjon av generell organisering av genetisk materiale satt inn i genmodifiserte planter. P1 og P2 = promoter 1 og 2, T1 og T2 = terminator 1 og 2, KO1 og KO2 kodende område 1 og 2.

“fremmede genkassetter” som til slutt er tilstede i den transgene planten kan være fire eller fem pga at gener for flere egenskaper er satt inn.

2.1.1 Roundup Ready™ soya

Den herbicidresistente Roundup Ready™ soyabønningen er laget av det amerikanske selskapet Monsanto. I USA hvor soya er en av hovedeksportproduktene hadde enkelte selskap slik som Central Soya Co. (Fort Wayne, Indiana) til hensikt å skille GM-soya fra konvensjonell soya, men dette ble likevel ikke gjort i 1996 da nivået av GM-soya var 1-2 % av den totale soyaproduksjonen (Hemmer, 1997). I 1998 var andelen av GM-soya steget til 35 % (The Economist, 13 juni 1998). Siden amerikanske soyaprodusenter har nektet å separere GM-soya fra konvensjonell soya (Arthur, 1998) kan andelen av genmodifisert soya nå være alt mellom 0 % og 100 % i enkelte produkter.

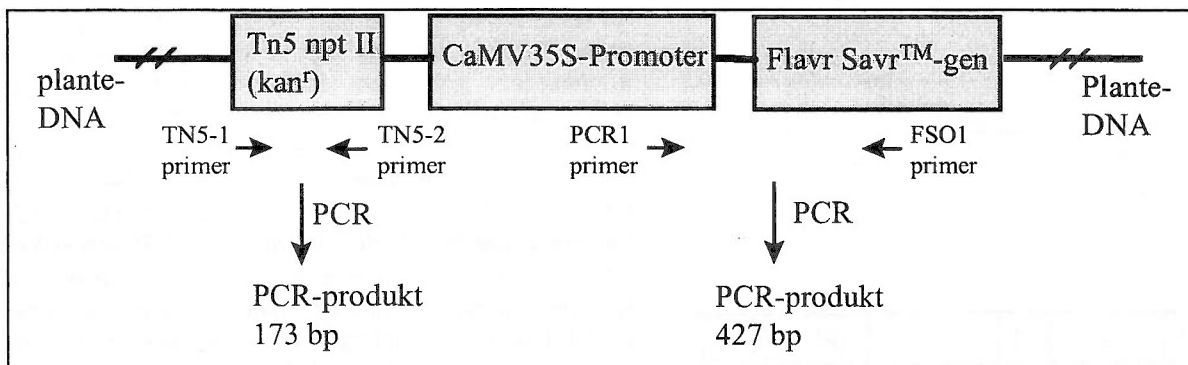
Figur 2. Illustrasjon av organisering av gener satt inn i Monsanto soyabønningen Roundup Ready Soya™ (RR) med tilhørende primere og PCR-produkter (Meyer & Jaccaud, 1997).



Roundup Ready (RR) Soya produsert av Monsanto inneholder følgende tre typer elementer: *Agrobacterium* CP4 synthase gen for å gjøre planten resistent overfor herbicidet glyfosat (Roundup), blomkål-mosaikk virusgen og et petuniagen for å regulere genuttrykk av CP4 synthase gen. For å kunne demonstrere tilstedeværelse av transgen soya-DNA er det utviklet ulike primer-sett for oppformering spesifikt av RR-soya ved bruk av PCR-teknikken (om PCR-teknikken, se appendix). Primerene oppformerer et DNA-fragment som omfatter både en del av *Agrobacterium* CP4 synthase gen og en del av regulator-genet. Dette gjør at prøver som ikke inneholder transgene soyabønner, men som er kontaminert med *Agrobacterium* ikke bestemmes ved feil som positive (Van Duijn et al. 1997). Organisering av genetiske elementer og primere brukt for å påvise disse i Roundup Ready Soya er illustrert i figur 2.

2.1.2 Flavr Savr™-tomaten

Den første godkjente genmodifiserte planten brukt til menneskeføde var Flavr Savr™-tomaten fra det amerikanske selskapet Calgene. Denne ble godkjent av USDA/APHIS og FDA i hhv. 1992 og 1994. Denne tomaten tilhører gruppen av GMP hvor kvaliteten til grønnsaken er forandret. Konstitutivt uttrykk av Flavr Savr™ gen, dvs. antisense-konstruktet derivert fra polygalacturonase (PG) gen fra tomat resulterer i en dramatisk reduksjon av PG-aktiviteten i tomaten. Enzymet PG bryter ned pectin som er en av hovedkomponentene av celleveggen i tomaten. Denne genmodifiseringen medfører at Flavr Savr™-tomaten kan modne på tomatplanten lengre og kan høstes lenge etter at de blir røde uten at det er risiko for at tomaten skal bli bløt under høstingen. Organisering av genetiske elementer satt inn i Flavr Savr™-tomaten og primere for påvisning av disse er vist i figur 3.



Figur 3. Organisering av innsatte gener i Flavr Savr™-tomaten og posisjonen til primere for nptII-genet (kanamycinresistens) - og FS-genet (Meyer, 1995). Primerene TN5-1 og TN5-2 amplifiserer et 173 bp DNA-fragment innen nptII-genet (nptII-PCR). Primeren PCR1 er homolog til DNA-sekvens innen promotersekvensen og benyttes i PCR med primeren FSO1 som ligger i Flavr Savr™-genet (= Antisense-Polygalacturonase). Disse danner et PCR-produkt på 427 bp (FS-PCR).

2.1.3 Bt-mais

Av mais som er genmodifisert er den som er insektresistent den mest vanlige typen. Maisplanten er gjort insektresistent ved at den uttrykker et syntetisk gen som koder for en forkortet versjon av krystallproteinene med opprinnelse fra den sporedannende jordbakterien *Bacillus thuringiensis* (Bt).

Bt-mais har vist seg å lett kunne la seg skille fra ikke-modifisert mais ved bruk av PCR-teknikken. Dette har blitt gjort ved to alternative PCR-reaksjoner: enten ved oppformering av hele det kodende området for det syntetiske cryIA(b)-genet eller ved oppformering av et internt segment av genet og av det innsatte markørgenet (Hupfer et al. 1998). Organisering av det innsatte genetiske materialet er illustrert i figur 4.

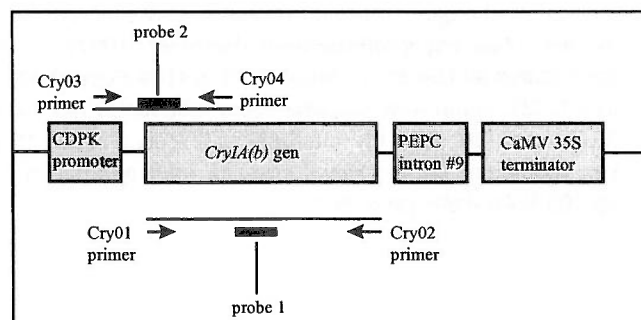
2.2 Påvisning av GMP-materiale

Rekkevidden og begrensningene for deteksjon av genetisk modifisert materiale, og da spesielt i matprodukter, har vært mye diskutert. Hvis rekombinant DNA er tilstede i sluttproduktet, er den foretrukne metoden oftest direkte deteksjon av den innsatte DNA-sekvensen ved bruk av PCR-teknikken. Denne påvisningsmetoden har bl.a. med stor suksess vært benyttet på transgene poteter (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren, 1996), på Flavr Savr™-tomaten (referanse i Hemmer, 1997), på soya bønner (Müller, 1997), herbicidresistent mais (Pietsch & Waiblinger, 1997) og på Bt-mais (Hupfer et al. 1997).

Viktige faktorer som vil påvirke resultatet av metoden er:

- Hvor effektiv metoden for DNA-isolering er
- Hvordan metoden er relatert til ekstraksjon av uønskede faktorer som hemmer PCR-reaksjonen
- Optimalisering av primerene for oppformering av den riktige målsekvensen

Spesifisiteten ved PCR-teknikken kan verifiseres på ulike måter. F. eks. kan en benytte Southern hybridisering (se appendix) hvor proben stammer fra en DNA-sekvens som en vet ligger internt i det oppformerte området. En annen måte å verifisere at det PCR-produktet en har fått er det rette, er ved DNA-sekvensering. En tredje måte å sjekke riktig opprinnelse av PCR-produktet på kunne være ved bruk av restriksjonsanalyse (se appendix) av selve PCR-produktet. I alle disse tilfellene må DNA-sekvensen eller annen detaljert kunnskap om PCR-produktet en søker spesifikt etter, være kjent.



Figur 4. Del av genomisk område av Bt-mais hvor det er satt inn genetisk materiale. Illustrasjonen viser plassering av primere og hybridiseringsprober (probe 1 og probe 2) brukt for påvisning (Hupfer et al. 1998). CDPK = Calcium-avhengig protein kinase, PEPC = phosphoenolpyruvat carboxylase, Cry01-Cry04 primere spesifikke for påvisning av Bt-mais konstruktet.

3 Produkter basert på materiale fra GMOer

Rekombinante DNA-teknikker i produksjon av mat og matingredienser har utviklet seg fra å være et verktøy innen kommersiell forretning. Etter at pioner-produktet Flavr Savr™-tomaten laget i USA kom på markedet, har et stort antall kulturplanter som nevnt før, etter hvert blitt genmodifisert på ulike måter. På det nåværende tidspunkt er transgen soyabønne, mais og tomat og matprodukter som inneholder disse komponentene tilgjengelige i Europa. Mens genmodifisert tomat avles og selges separat fra den ikke-modifiserte tomaten, blir transgene og ikke-transgene soyabønner og mais distribuert i blandet tilstand (Van Duijn et al. 1997).

Framtidig utvikling innen genteknologi og matproduksjon, dvs også innen utvikling av genmodifiserte landbruksplanter, vil trolig avhenge av forbrukerens holdning. Mange undersøkelser om forbrukerens holdning til temaet, har bygd på antakelsen om deres oppfattelse av genteknologi generelt. Det er viktig med åpenhet rundt hva som foregår på feltet og å utvikle kommunikasjonsmetoder slik at forbrukeren skal ha en mulighet til på en fornuftig måte være med i debatten om temaet.

3.1 Kommersialisering

Det er forventet at de fleste kulturplanter vil forekomme i genmodifisert utgave i nær framtid. Et resultat av dette vil selvfølgelig være at GM-produkter i stor grad vil være tilgjengelig på markedet enten i ren form eller blandet med andre produkter. I hvilken grad og hvordan produktene vil være merket framover er ennå et åpent spørsmål. En omfattende screeningsprosedyrefor å stadfeste innhold av genmodifisert materiale, kan bli for omfattende både arbeidsmessig og økonomisk dersom de fleste produkter etter hvert kan inneholde blandinger i ulike forhold av genmodifiserte og ikke-genmodifiserte varianter. Et eksempel på en slik utvikling er at soya-produsenter i USA som nevnt tidligere har nektet å separere den genmodifiserte soyabønne utviklet av Monsanto fra konvensjonelt dyrkede soyabønner. I stedet er GM-soyaen blandet med resten av soya-avlingen med den konsekvens at soya-produkter inkludert brød, kjeks, kaker, soyamelk og dyrefôr kan inneholde GM-soya i varierende mengde.

Selv om myndigheter og forskere i de land det gjelder, har hevdet at GM-mat ikke er skadelig i helsesammenheng, har flere undersøkelser vist at forbrukeren vil vite om de tilgjengelige matproduktene inneholder GM-materiale. Som en respons på dette, tilbys nå i flere land tester for GM-deteksjon av ulike produkter.

3.2 Regulering relatert til genmodifiserte matprodukter

Det finnes både nasjonale og internasjonale regelverk vedrørende genmodifisert mat. Av norske lover som er viktige, kan nevnes: næringsmiddeloven, genteknologiloven, stortingsvedtak fra 1995 om merking og stortingsvedtak av 1997 om forbud mot antibiotikaresistens. Merking av mat som inneholder genmodifisert materiale er et svært omdiskutert tema både i Norge og EU.

Med hjemmel i § 5 i forskrift om merking av næringsmidler under næringsmiddeloven har Statens næringsmiddeltilsyn (SNT) utarbeidet et rundskriv med midlertidige retningslinjer for merking. Rundskrivet foreslår bruk av uttrykket "genmodifisert", men fraråder negativ merking, "ikke genmodifisert". Rundskrivet er gjort gjeldende fra 04.10.1997, og er en oppfølging av stortingsvedtaket av 31.10.1995 hvor regjeringen ble bedt om å sørge for at alle genmodifiserte matvarer som omsettes i Norge blir merket. For produkter som inneholder genmodifisert materiale inntreer merkeplikten når den genmodifiserte andelen utgjør mer enn 2 % av den enkelte ingrediens. Det er imidlertid omdiskutert om denne grensen er for høy og også om Norge burde implementere endringen foretatt i EU av direktiv 90/220 (EC/97/35) som åpner for merking med "kan inneholde GMO" av produkter hvor innhold av GMO verken kan fastslås eller avkrefte.

Innen EU har merking av genetisk modifisert mat blitt et tema som dominerer den offentlige diskusjonen rundt GMOer. Som oppfølging av reguleringsforskrifter i de enkelte land kreves utvikling av analytiske metoder for deteksjon av mat modifisert ved rekombinante DNA-teknikker. 15 mai 1997 ble EC Novel Foods Regulation effektivisert ved at det ble introdusert et lovfestet system innen EU hvor "novel food" produkter må godkjennes før de kommer på markedet. "Novel food" defineres her som mat som til en viss grad ikke er nedbrutt og inkluderer mat som inneholder eller helt er basert på genmodifiserte organismer (Tomlinson, 1998). Det mest kontroversielle aspektet av denne reguleringsprosedyren relateres til merkingsforskriftene. Innen regelverket er det spillerom for vurdering av merkingen av hvert individuelle produkt. England presser imidlertid på for at all mat som inneholder genetisk materiale skal klart merkes. For at alle EU-medlemslandene samordner sin tilnæringsmåte til regelverket har Kommissjonen publisert en serie av retningslinjer. Selv, har England et system for å vurdere sikkerheten av GM-mat som dateres tilbake til den første godkjenningen i 1983 (Tomlinson, 1998).

Ifølge European Novel Food Regulation kreves det merking av varer som inneholder protein fra transgene soyabønner, mens det ikke kreves merking av produkter som inneholder transgen soyabønneolje. Dette kommer av at soyabønne-DNA og proteiner er antatt å ikke være tilstede i et oljeprodukt. Alle GMOer som er benyttet i matprodukter i England må godkjennes av ACNFP (Advisory Committee on Novel Foods and Processes), og det britiske FAC (Food

Advisory Committee) har utviklet et klassifiseringssystem til hjelp for å avgjøre om merking av et produkt er nødvendig eller ønskelig (Hemmer 1997):

- Matprodukter fra genmodifiserte organismer identiske til de naturlige: mat som er produkt av, eller som inneholder produkter av en GMO (men ikke organismen selv, dennes celler eller DNA) og er identisk til produktet fra den konvensjonelle organismen, f.eks. kymosin. FAC konkluderer med at disse produkter ikke trengs å merkes.
- Mat som inneholder rekombinant DNA som ble produsert ved å introdusere gener bare fra samme organisme som produktet inneholder; f.eks. bakegjær. Komiteen konkluderer med at merking ikke er nødvendig, men anbefalt brukt på en sak-til-sak måte.
- "Novel" mat avledet fra GMOer, men som verken inneholder GMOen selv, celler fra denne eller dennes DNA og som er forskjellig fra produkter som tradisjonelt har blitt konsumert i Vest Europa. Merking av slike produkter er anbefalt.
- Mat som inneholder rekombinant DNA (eller GMOen eller dennes celler) som ble produsert ved å introdusere gener fra en annen art. Merking av et slikt produkt kan bli påkrevd, men komiteen anbefaler en sak-til-sak undersøkelse.

Naturlig nok og også påpekt av Hemmer (1997) vil den økende globaliseringen innen handel påvirke spredning av produkter som inneholder genmodifisert materiale fra land hvor dette produktet er godkjent til andre lands lokale markeder. Dette vil spesielt skje når eksportøren er en av verdens ledende nasjoner mht produksjon av en spesiell landbruksplante som er tilfelle med f.eks. den herbicid-resistente soyabønnen Roundup Ready™ fra Monsanto og produkter fra insektresistent mais produsert av CIBA-GEIGY. Soyabønnen er nå godkjent i følgende land: USA, Japan, Sveits, England, Mexico og Argentina. I USA som er verdens største eksportør av soya kreves det ingen merking av genmodifiserte soyabønner eller produkter derivert fra disse.

4 Metoder for identifisering av GMO-baserte produkter

Implementering av lovverk hvor merking avhenger av et produkt's innhold av genmodifisert materiale, krever analytiske metoder for spesifikke kvantitative målinger. Kontrollapparatet for slike kvantitative målinger er ennå under utvikling og omdiskutert i de fleste berørte land. Det har også vært diskutert i EU om slike tester skulle omfatte både protein- og DNA-basert teknologi (Hodgson, 1997).

De fleste metodene benyttet for deteksjon av GM-produkter innebærer bruk av PCR-teknikken. Selv om andre metoder har vist seg å være brukbare i spesielle tilfeller, har omfanget av slike metoder vist seg å være mer begrenset.

4.1 PCR-baserte metoder

PCR-teknikken har på mange måter revolusjonert molekylærbiologi samt mange andre felter innen biologi og medisin. Metoden har mange fordeler som deteksjonsmetode; den tar utgangspunkt i DNA-molekylet som i forhold til andre makromolekyler har høy kjemisk og termisk stabilitet. Dette gjør at den kan benyttes på materiale som er sterkt nedbrutt. I tillegg er metoden svært sensitiv og teknisk enkel å utføre.

Foreløpig er det få metoder som spesifikt er utviklet for påvisning av transgener i mat. Det økende antall godkjente produkter har imidlertid ført til økt etterspørsel etter pålitelige metoder for både kvalitativ og kvantitativ påvisning. Tre offisielle metoder var godkjente i februar 1997, alle utviklet av BgVV-arbeidsgruppen ("Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin", Berlin) (beskrevet i Hemmer, 1997). To av metodene var i februar 1997 inkludert i en liste over offisielle metoder ifølge § 35 i det tyske organet som kontrollerer matvarer (LMBG, Lebensmittel- und Bedarfsgegenstandsgesetz). Alle metodene er PCR-basert. Den første metoden går ut på å identifisere genmodifisert potet ved PCR etterfulgt av probe-hybridisering av PCR-produktet. I den andre metoden blir genmodifisert *Lactobacillus curvatus* i rå pølse påvist. Denne metoden baseres også på PCR etterfulgt av hybridisering. PCR-produktet representerer deler av to genetiske elementer for å gjøre reaksjonen mer spesifikk. Den tredje metoden tar for seg påvisning av genmodifisert *Streptococcus thermophilus* i yoghurt startkultur. Denne metoden baseres også på PCR mellom to genetiske elementer.

Hovedkriteriet for at en PCR-oppformering skal virke optimal mht spesifisitet, er valg av PCR-primerene. DNA-sekvensen i disse skal være unike i tillegg til at de bør ha en lengde på omtrent 20 nukleotider med høy smeltetemperatur. Det eksisterer etter hvert primere som spesifikt

gjenkjenner ulike typer genmodifiseringer. Det kan være viktig for spesifikk deteksjon av en GMO å velge primere som er lokalisert innen ulike genetiske elementer (f.eks. promoter, strukturelt gen, terminator, vektor-sekvens) som er gjort i flere av påvisningsprosedyrene utviklet til nå. Primerene bør være helt spesifikke for målsekvenser som ikke naturlig forekommer i prøvematerialet eller i hvert fall ikke er organisert på samme måte som i prøvematerialet.

4.1.1 Falske positive og falske negative resultater

For at en test skal være pålitelig er det viktig å unngå falske positive og falske negative resultater. Falske positive resultater kan ved PCR lett oppstå fordi metoden er svært sensitiv slik at svært små mengder forurensende DNA tilstede i løsningen hvor PCR-reaksjonen utføres, kan gi PCR-produkt. Falske negative resultater kan oppstå ved at enten PCR-betingelsene ikke er tilstrekkelig optimalisert eller ved at det foreligger faktorer som hemmer PCR-reaksjonen.

Der er flere ting som kan gjøres for å unngå falske positive resultater (for oversikt, se Carrino & Lee, 1995). Det viktigste er selvfølgelig å arbeide så sterilt som mulig og i tillegg inkludere kontroller som en vet vil gi positiv og negativ oppformering ved PCR-betingelsene som foreligger. Det er også viktig å inkludere flere paralleller av utgangsmaterialet.

Falske negative resultater kan vurderes ved å inkludere en positiv kontroll hvor en vet at PCR-produktet skal kunne oppformes. Det kan være snakk om faktorer som hemmer reaksjonen slik at den ikke blir sensitiv nok for deteksjonen. I slike tilfeller er det mulig å tilsette DNA med kjent konsentrasjon til prøvematerialet og utføre en PCR-reaksjon under betingelser en på forhånd vet fungerer optimalt.

4.1.2 Sensitivitet

Sensitiviteten til en gitt PCR-reaksjon avhenger sterkt av om betingelsene for reaksjonen er optimalisert. Sensitiviteten kan økes ved å øke antall PCR-sykler, men for mange sykler kan også føre til oppformering av ikke-spesifikke PCR-produkter. Bruk av hybridiseringsteknikker hvor DNA festes på magnetiske kuler, kan ofte benyttes for å øke sensitiviteten (Kirchhof et al. 1996). Det kan også benyttes "nested"-PCR som i prinsippet går ut på å utføre PCR på et utgangsmaterialet som allerede har vært "igjennom" en runde med PCR. I "nested"-PCR benyttes ofte to sett med PCR-primere hvor primerene som benyttes i andre runde er lokalisert innenfor de benyttet i første runde. Sensitiviteten kan også av og til økes ved å fortynne prøvematerialet. Dette vil også "fortynne" eventuelle hemmende faktorer i løsningen (Jason Saywer, pers. medd.).

4.1.3 DNA-kvalitet

DNA-kvaliteten er spesielt viktig for PCR-deteksjon i matvarer hvor DNAet kan være sterkt nedbrutt. Det er selvfølgelig viktig at ikke den gjennomsnittlige lengden på DNA-fragmentene i prøven er lavere enn størrelsen på PCR-produktet en ønsker å oppformere. Derfor bør det diagnostiske PCR-produktet ikke overstige en viss størrelse, f.eks. 300 bp (Hemmer, 1997).

Skader på DNAet kan også være en grunn til at DNA enkelte ganger ikke lar seg oppformere. Slike skader kan være skapt av fysiske, kjemiske eller enzymatiske prosesser som f.eks. depurinerings og UV-skader. Måten matvarerne er bearbeidet eller oppbevart på kan påvirke stabiliteten til DNAet. Slike prosesser kan være at DNAet utsettes for sterk varme eller lav pH som f.eks. er tilfelle i tomatprodukter og soyasaus.

I kontrast til resultater fra litteraturen, har Hellebrand og kollegaer (1998) lyktes i å isolere DNA fra rapsolje hvor transgener lot seg påvise ved PCR. DNA-fragmenter lot seg identifisere både i kaldpresset olje og raffinert olje. Denne muligheten for bruk av DNA-analyse gjør det mulig ikke bare å identifisere genetiske modifikasjoner, men kan også benyttes for å skille mellom ulike arter og varianter. For eksempel kan slik analyse være et verdifullt verktøy for å påvise opphavet til planteoljer sammensatt fra ulike arter.

4.1.4 Hemming av PCR-reaksjonen

PCR-reaksjonen kan hemmes av mange typer stoffer / faktorer tilstede i reaksjonsblandingen. Spesielt når DNA er isolert fra mat kan slike stoffer medføre falske negative resultater. I matprodukter kan disse være bl.a. hemoglobin, nitrilsalter, og melkeprodukter (Hemmer, 1997). Ellers kan salter av forskjellig slag, karbohydrater og andre stoffer ha innvirkning på reaksjonen. For å motvirke hemming av PCR-reaksjonen er det viktig å ha en effektiv måte å rense DNA-prøven på. Deretter kan det være lurt å fortynne prøven. Å utføre "nested" PCR har også vist seg å ha heldig virkning på tomatprodukter (J. Saywer, LGC). Andre måter å unngå problemet på kan være å inkludere fryse-tine trinn i DNA-isoleringsprosedyren eller tilsette enkeltrådet DNA-bindende proteiner (Hemmer, 1997).

4.1.5 Verifisering av PCR-resultater

Ved utføring av en PCR-reaksjon oppnås et PCR-produkt som stort sett gir et svar på om målsekvensen som PCR-primere kan binde seg til, er tilstede i prøvematerialet eller ikke. At PCR-produktet har den forventede størrelsen vil stort sett overbevise om at PCR-produktet som har framkommet er det riktige. Det er også nyttig å inkludere i et PCR-oppsett både prøver som en vet inneholder målsekvensen, og i tilfelle med påvisning av en GMO, inkludere en prøve isolert fra den tilsvarende ikke-transgene orga-

nismen. Hvis hele målsekvensen er kjent kan det utføres restriksjonskuttinger av PCR-produktet, som da vil gi et spesifikt forventet "fingerprint"-mønster hvis PCR-produktet er det forventede. Verifisering av PCR-produktet kan også foretaes ved å utføre en Southern blot med påfølgende hybridisering. I dette tilfelle må en intern probe innen PCR-produktet være tilgjengelig. PCR-produktet kan også DNA-sekvenseres og verifiseres på den måten. Andre omfattende metoder for verifisering av PCR-produkt, omfatter immunologiske metoder hvor det er laget antistoffer mot det spesifikke PCR-produktet (Müller et al. 1996).

4.2 Andre metoder basert på oppformering av nukleinsyrer

Det finnes ulike nukleotid-basert amplifikasjonsmetoder benyttet til ulike formål. De fleste av disse er ikke ofte benyttet og vil ikke beskrives i detalj her, men kan være følgende; "Ligase chain reaction", LCR, "Nucleic Acid Sequence-Based Amplification", NASBA, "Self-sustained sequence replication", 3SR, og "Q β replicase amplification" (Carrino & Lee, 1995).

En annen metode som ofte benyttes i populasjonsgenetiske studier av organismer hvor DNA-sekvensen er lite kjent eller ved rettsmedisinske problemstillinger, er "fingerprint"-teknikkene RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) og RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Alle disse metodene kan benyttes ved deteksjon av GMOer, fordi disse da kan ha forskjellig "fingerprint" fra opphavsorganismen. Slike metoder benyttet for det formål å kunne skille genmodifiserte fra ikke-modifiserte organismer, har stort sett vært benyttet innen mikrobiologiske studier. Metoden kan være vanskelig å bruke for deteksjon av GM-planter dersom de genetiske linjene benyttet har stor genetisk variasjon. Den genetiske variasjonen kan da medføre et komplisert "fingerprint"-mønster hvor det blir umulig å skille GM-planter fra andre planter som ikke stammer fra samme opphavslinje.

En mye brukt metode for identifisering av genetisk materiale er selvfølgelig benyttelse av en merket probe som representerer det innsatte materialet ved utføring av en Southern hybridisering. I eukaryote genmodifiserte organismer foreligger ofte det innsatte materialet i få kopier. For at det transgene materialet skal la seg påvise ved hybridiseringssignalet som proben gir, må derfor DNA-konsentrasjonen av prøvematerialet være ganske stor. At en slik høy DNA-konsentrasjon kan være vanskelig å oppnå i enkelte tilfeller vil påvirke sensitiviteten til metoden.

4.3 Metoder basert på proteiner

En genmodifisert organisme er modifisert slik at det ofte uttrykkes protein/er i organismen som gjør den forskjellig fra den opprinnelige organismen. Det er uttrykk av protein som gjør at organismen får den ønskede fenotypen. Metoder for å skille GMOen fra den opprinnelige umodifiserte organismen kan i så måte baseres på deteksjon av dette unike proteinet/ene. Overvåking av uttrykket av disse proteinene som et mål på genetisk stabilitet over tid kan også være viktig i overvåkingsstudier av GMOer satt ut i naturen (Kvaløy, 1997).

Protein-baserte metoder kan ta utgangspunkt i immunologiske metoder eller i sammenlikning av proteinmønster observert ved en- eller to-dimensjonal gelelektroforese. Ofte kan en kombinasjon av disse være det som fungerer best, f.eks. som ved Western blot (se appendix). Ulempen ved denne type metodikk er at den bare kan benyttes på materiale som ikke er sterkt nedbrutt slik som tilfelle kan være ved bearbejdede matprodukter. Ulempen er også at spesifikke antistoff for påvisningen må foreligge.

4.4 Deteksjon ved enzymatisk aktivitet

Deteksjonsmetoder hvor deteksjon av enzymatisk aktivitet inngår, er avhengig av at transgenet er et enzym og at dette har aktivitet i påvisningsøyeblikket. I tillegg må det eksistere et spesifikt assay-system akkurat for dette enzymet. Her er det enda mer prekært enn for andre proteinbaserte systemer som de beskrevet over, at enzymet har opprettholdt sin aktivitet i prøvematerialet. På grunn av dette er det ikke sannsynlig at slike metoder i stor grad vil kunne brukes for deteksjon av transgener i matprodukter.

5 Kvantitative undersøkelser

I mange ulike sammenhenger er det viktig å kunne kvantifisere i hvor stor grad en prøve inneholder GMO-materiale. For eksempel ved overvåking av genspredning fra et felt med utsatte GM-planter vil det være aktuelt for å lette arbeidsmengden å kunne analysere mange prøver samtidig, men likevel kunne si noe om sammensetningen i utgangsmateriale mhp hvor mange av individene som var genmodifisert. I sammenheng med forvaltningsansvar mhp kontrollering og merking av matprodukter vil det være viktig å kunne kvantifisere mengde GMO i forhold til tilsvarende ikke-genmodifisert.

Meyer & Jaccaud (1997) har beskrevet PCR-baserte forsøk for deteksjon og kvantifisering av transgent materiale i soya. De fant at DNA kunne amplifiseres fra et bredt spekter av soya deriverte og soya-inneholdende produkter. Produkter de ikke klarte å amplifisere DNA fra derimot var soyasaus, soyasaus-pulver, raffinert olje og i enkelte typer lecitiner. I en blanding av konvensjonell og transgen soya ble det vist at en andel av transgen soya på 0.1 % (vektvolum) RRS lecithin og 0.5 % RRS uforedlet olje lot seg påvise ved nested-PCR.

Hupfer og kollegaer (1997) har utarbeidet PCR-baserte prosedyrer for påvisning av genetisk modifisert Bt-mais. Ved sine påvisningsprosedyrer påviste Hupfer og kollegaer transgener som var tilstede i mengder ned til 4 %, men de hadde indisier om at nivåer så lave som 0.001 % lot seg påvise. Ved deteksjon av så små mengder hevder de forøvrig at deteksjonsnivået er avhengig av betingelsene under prøvetakingen og homogeniteten til materialet mer enn selve PCR-analysen.

"Genetic ID" er et selskap fra Fairfield Iowa som tester om mat inneholder genmodifisert materiale. Selskapets test er PCR-basert og kjent for å være blant de mest stringente og også blant de dyreste (Steinberg, 1997). DNA ekstraheres fra mat-produktet ved en metode basert på guanidin isocyanat som denaturerer DNAs. Fire PCR-reaksjoner utføres med ulike primersett hvorav tre er spesifikke for det innsatte DNAet og ett sett spesifikt for den aktuelle planten en forventer skal finnes i mat-produktet. Selv om selskapet hevder å kunne detektere 1 transgen soyabønne i blanding med 10 000 ikke-modifiserte, har de nå kalibrert testen til å kunne påvise 1 i 1000. Det antas at mer komplekse matprodukter må inneholde minst 5 % av produktets totalvekt for at transgener vil la seg kunne påvise ved metoden (Steinberg, 1997).

5.1 Kvantitativ PCR

Siden PCR-teknikken kanskje er den mest følsomme metoden vi har for påvisning av små mengder DNA (og RNA), er det lagt mer og mer vekt på utvikling av metoden

for kvantitering. Et utgangspunkt for slik kvantitativ PCR har vært basert på oppformering av en kjent DNA-mengde tilstede i samme blandingen som DNA-templatet av interesse, en såkalt "kompetitiv"-PCR reaksjon. Prinsippet bak en slik reaksjon kan være at det tilsettes et DNA-templat med en detekterbar markør som kan fungere som en intern standard under PCR-reaksjonen. En fortynningsrekke (mellom 1:2 til 1:10) lages så av en kjent mengde av denne "kompetitive" DNA-templatet samtidig som en gitt mengde av DNAet av interesse tilsettes til hvert rør (samme volum av denne tilsettes til hvert rør). Hvis en antar at PCR-reaksjonen fungerer like effektivt på mål-DNAet som på det "kompetitive" DNA-templatet vil oppformering av disse tilsvare hverandre og være målbare.

Et annet system utviklet i det senere kalles PCR-light™ og er basert på en kjemisk påvisbar luminisens fra PCR-produktet. PCR-oppformering utføres med en merket biotinyler primær og en ikke-merket primær. DNA-tråden hekket til biotinen separeres fra den ikke-biotinylerte og hybridiseres mot en intern fluorescein-merket probe. Mengde probe bundet vil være direkte proporsjonalt med konsentrasjonen til PCR-produktet.

Et liknende system er TaqMan Probe PCR-deteksjon. Dette er en metode som er konstruert og optimalisert for bruk vha. maskinen ABI Prism 7700 Sequence Detector (Perkin Elmer Corp./Applied Biosystems) hvor en kan måle tilstedeværelse av et PCR-produkt mens oppformering av PCR-produkt pågår. Prinsippet bak metoden går ut på at det under utføringen av PCR-teknikken også er tilstede i reaksjonsblandingen en probe som kan produsere et fluoriserende signal som mål på tilstedeværelse av PCR-produkt i reaksjonsblandingen. Proben inneholder en oligonukleotid merket både med "reporter"- og "quencher"-farge. Det avgis fluoriserende signal når "reporter"-fargen spaltes av vha 5' nuklease aktiviteten til Taq-polymerasen tilstede i reaksjonsblandingen. Ved hver PCR-syklus, skjer denne kløyvingen og fluoriserings-signalet blir derved et mål på hvor mye PCR-produkt som er dannet i reaksjonsblandingen.

Del II: Praktisk del - Kirsti Kvaløy og Torveig Balstad

6 Innledning til del II

Både nasjonalt og internasjonalt har utvikling og bruk av genmodifiserte organismer (GMOer) vært viet stor oppmerksomhet i de senere år og det er antatt at det i nær framtid vil produseres mat og produkter med opphav i GMOer som vil være kommersielt tilgjengelige også her i Norge. Ulike betenkeligheter både av økologisk, helsemessig og etisk karakter har bl.a. medført utforming av regler hvor diverse offentlige instanser på forskjellig plan har forvaltningsmessig ansvar.

Med økende kommersielt press for markedsføring og bruk av GMOer eller GMO-baserte produkter, vil en del av overvåkingen være å påvise tilstedeværelse av genmodifisert materiale enten direkte i GMOen, i bearbeidede GMO-baserte produkter eller som et resultat av genspredning fra slik type organismer. Et av aspektene vil være eventuelt å påvise tilstedeværelse av gener som stammer fra genmodifiserte organismer i ikke-merkede, bearbeidede produkter som f.eks. importeres fra land med mindre restriktive holdninger til bruk av varer bearbeidet fra GMO-materiale. Aktuelle varer dette vil gjelde i første omgang, er produkter laget av f.eks. mais, soyabønne, tomat, potet og raps. Enten det gjelder påvisning av transgener i mat, fôr, i utsatte GMOer eller genspredning fra disse, vil opphavsorganismen være den samme og metoder som utvikles og optimaliseres i forbindelse med en av problemstillingene vil også kunne benyttes i de andre.

I de fleste tilfeller hvor en GMO er benyttet, vil ikke GMOen atskille seg fra det ikke-modifiserte opphavet ved lett gjenkjennbare fenotypiske karakteristika. Oftest vil den genetiske modifikasjonen være detekterbar bare ved bruk av molekylærbiologiske teknikker. Ulike teknikker vil være aktuelt å benytte ved deteksjon av transgent materiale eller ved overvåkingsstudier av GMOer. En del av teknikkene som vil være aktuelle er beskrevet i NINA Oppdragsmelding nr. 476 (Kvaløy, 1997) og også i den teoretiske delen av denne NINA Oppdragsmeldingen. Det kan benyttes DNA-baserte eller proteinbaserte metoder for denne påvisningen. Anvendbarhet av proteinbaserte metoder er noe begrenset fordi de avhenger av at DNA-materialet som er satt inn koder for et protein som lar seg påvise. Slik påvisning er basert enten på proteinets struktur eller aktivitet. For denne type påvisning er det således viktig at proteinets struktur og / eller funksjon er intakt i prøvematerialet.

Ved deteksjon av genmodifisert materiale i matprodukter eller bearbeidet materiale, vil kravene for proteinbasert deteksjon oftest være vanskelig å oppfylle. Det endelige beviset for om en organisme er genmodifisert eller ikke avhenger således av påvisning av tilstedeværelse av det modifiserte DNAet i organismen. Av DNA-baserte påvisningsmetoder, er nok metoder hvor PCR (polymerase

chain reaction)-teknikken (Queller et al. 1993) inngår veldig viktig spesielt fordi metoden er meget sensitiv og gjør det mulig på en forholdsmessig rask og billig måte å påvise det genetiske materialet som er satt inn i en GMO. Dette krever forhåndsinformasjon om DNA-sammensetningen til en organisme. Tilgjengeligheten av genetisk informasjon om den enkelte organisme kan være svært varierende. Det sistnevnte vil være en avgjørende begrensning for om transgenet lar seg påvise eller ikke. Imidlertid er ikke dette foreløpig noe stort problem da detaljert informasjon om transgenet ofte er kjent for offentligheten. Det kan også i mange tilfeller benyttes primere (for PCR), eller prober (for hybridisering) spesifikt for Ti-plasmidet fra *Agrobacterium tumefaciens* som ofte benyttes ved genmodifisering av planter.

I framtiden kan dette imidlertid bli et større problem enn det er i dag fordi hvilke DNA-sekvenser som er satt inn i GMOen kan bli holdt hemmelig som følge av kommersielle interesser. At det i framtiden også forventes en stor økning i type genmodifiserte produkter/organismer, vil kunne gjøre det for omfattende å holde rede på alle mulige sammensetninger av gener satt inn i de ulike typer organismer, eller også å uttesting av alle disse mulige typene vil gjøre deteksjonsprosedyrer for arbeidskrevende og kostbare.

Prosjektet her er delt inn i en teoretisk og en praktisk del hvor den teoretiske delen er en utredning basert på litteratur om detektering av gener i produkter som består av levende GMOer, eller i bearbeidet produkter. Den praktiske delen består av en beskrivelse av forsøk som ble utført i laboratoriet mht. utvikling og optimalisering av teknikker for best mulig å kunne påvise transgent materiale. Det fokuseres her på optimalisering av PCR-baserte teknikker passende for problemstillingen. Det er lagt størst vekt på kvalitativ deteksjon av spesifikke DNA-sekvenser i ulike typer materiale.

Arbeidet beskrevet ble i størst grad gjennomført på NINAs laboratorium. Delen som beskriver analyse av mtprodukter ble forøvrig initiert ved LGC- Laboratory of the Government Chemist, London, England i samarbeid med forskere i gruppen ledet av Dr. Helen Parkes.

7 Materialer og Metoder

I prosjektet ble det benyttet forskjellige typer materiale både fra planter og mer eller mindre bearbejdede matprodukter med kjent og ukjent opprinnelse mht om de inneholdt transgent materiale eller ikke.

7.1 Plantemateriale

7.1.1 Transgent potetmateriale

De transgene potetplantene var transformanter av potet-sorten "Laila" framstilt av det tidligere firmaet ScanPlant A/S og UNIGEN. Det aktuelle transgene plantematerialet ble gitt av professor Atle Bones ved UNIGEN (Molekylærbiologisk Felleslaboratorium, Norges tekniske og naturvitenskapelige universitet - NTNU) (Bones et al. 1997). De transgene potetplantene var transformert i 1989 ved hjelp av et plasmid fra *Agrobacterium tumefaciens* (Buchanan-Wollaston et al. 1987). Disse potetplantene, ni linjer i alt, i tillegg til en negativ kontroll (dvs en ikke-transformert potetplante), hadde siden de ble konstruert i 1989 blitt holdt i live i veksthus på UNIGEN. Dette var blitt gjort ved at plantene med jevne mellomrom ble plantet om og formert via vegetativ vekst. Innsatte gener var struktorgenet *nptII* (neomycinfosfotransferase) som gir økt resistens overfor antibiotika av neomycingruppen som f.eks. kanamycin, og *lacZ* (β -galactosidase) hvis aktivitet kan måles ved hjelp av vanlige spektrofotometriske teknikker eller ved immunologiske metoder som f.eks. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Bones et al. 1997). Genet *nptII* stammer fra bakterien *Klebsiella pneumonia* og *lacZ* fra bakterien *Escherichia coli*. Genene var integrert i genomet til potetplanten ved overføring av modifisert Ti-plasmid fra *Agrobacterium tumefaciens* betegnet pGV3850 med cointegratet pHTT27 til planteceller. Stengelbiter av potet dyrket *in vitro* infisert med *A. tumefaciens*, ble selektert for ved tilsetning av antibiotikumet kanamycin til vekstmediet.

7.1.2 Transgene tomater

Knust transgent tomatmateriale kom fra EU og er kalt 282 f-positiv. Desverre var videre opplysninger om materialet umulig å oppdrive.

7.1.3 Transgene soyabønner

Materiale som inneholdt transgene soyabønner var soyamel som inneholdt en kjent bestanddel transgen soya i forhold til ikke-transgen soya. Det transgene soyamaterialet hadde sin opprinnelse i Monsanto's Roundup Ready™ Soya (beskrevet i teoretisk del). Materialet er tilgjengelig fra firmaet Fluka og fungerer som referansmateriale både ved kvalitativ og kvantitativ påvisning av slik type materiale. Referanser til materialet: 2 % transgent soyamateriale - Biochemica 85478 - "Soya Bean Powder" -SB2 - "IRMM

Certified Reference Material"; 0,5 % - 85 477 - SB0.5; 0,1 % - 85 476 - SB0.1; Ikke-transgent soyamateriale - 85 474 - SB0.

7.1.4 Ikke-transgene planter

Ikke transgene planter som ble brukt i prosjektet hadde varierende opprinnelse. Ikke-transgent potetmateriale av samme type potetplante som den transgene fungerte som negativ kontroll for disse. Annet materiale var knopper og blader fra ulike trær og planter som vokser i Norge. Av blomsterplanter ble det fokusert på de som er beslektet med raps (*Brassica napus*). Tabell 5 viser plantene som ble brukt.

Tabell 5. Plantemateriale

| Plante, norsk navn | latinsk navn |
|-----------------------------|--------------------------|
| Vanlig bjørk | <i>Bétula pubéscens</i> |
| Hengebjørk (med flika blad) | <i>Bétula péndula</i> |
| Osp | <i>Pópulus trémula</i> |
| Svensk asal | <i>Sorbus intermédia</i> |
| Lønn | <i>Acer platanoides</i> |
| Pil / vier | <i>Salix</i> |
| Vinterkarse | <i>Barbaréa vulgáris</i> |
| Åkerkål | <i>Brássica rapa</i> |

7.2 Matprodukter

7.2.1 Matprodukter, ukjent om innhold av transgent materiale

Matprodukter som ble testet ved PCR er satt opp i tabell 6-9.

7.2.2 Transgene matprodukter

Matprodukter som ble testet ved PCR og som inneholdt transgent materiale er satt opp i tabell 10.

7.3 DNA-isoleringsprosedyrer

DNA fra potetplantematerialet ble isolert ved en modifisert metode gitt av Per Winge (UNIGEN). Metoden er basert på frystørking av plantematerialet ved flytende nitrogen med påfølgende ekstraksjon vha ekstraksjonsbuffer tilsatt 2-merkaptoetanol og SDS (Sodium Dodecyl Sulfat). DNAet ble videre rensset ved bruk av et DNA-isolerings-"kit" fra Kebo Lab (metoden er kalt SDS-metode videre).

Tabell 6. Soya-produkter.

 Produkt

Ascot gullvafler, Sætre kjeks
 Dobbelv vafler, Sætre kjeks
 Sojaflager, Nutana
 Soyabiter, Rimax (variant 1)
 Soyabiter, Rimax (variant 2)
 Vegebürger mix, Realeat
 Menu mix, Realeat
 Sojamel, Nutana
 Sojamjöl, Risenta
 Avfettet soyamel, Joco, Jonassen & Co
 Frosset soya-burger, Hälsans kök (Israel)
 "Soja Choco Calcium"- soyakjeks, Gerblé³
 "Goûter aux pommes" - soyakjeks, Céréal³

³ Franske produkter, ikke-merket som genmodifisert.

Tabell 7. Tomat-produkter.

 Produkt

Pastasaus - Verona, Maggi, Nestlé
 Pastasaus - Napoli, Maggi, Nestlé
 Hermetiserte tomater - skinnfrie, Landlord
 Hermetiserte tomater - grovhakket, Landlord
 Chili con carne, Colman`s²

² Engelsk produkt, ikke-merket som genmodifisert.

Tabell 8. Mais-produkter.

 Produkt

Maismel, Maizena
 Majsgrøn, Nutana
 Hermetisert mais, Landlord
 Frosset maiskolbe, Findus
 (pakket i USA for svensk Nestlé)
 Cornflakes, Kellogg`s²

² Engelsk produkt, ikke-merket som genmodifisert.

Tabell 9. Andre produkter.

 Produkt

Potetmel, Hoff
 Buljongterning -Herbs & Spices, OXO-
 buljongterning²
 Skjokoladekjeks²
 Ingefærkjeks²
 Ris²
 Nudler (3 min.)²
 Potetgull²

² Engelske produkter, ikke-merket som genmodifisert.

Annet plantemateriale ble isolert ved en metode hvor CTAB (hexadecyltrimethyl-ammonium bromide)-buffer inngikk. Dette er en standardprosedyre for isolering av DNA fra plantemateriale (se f.eks. Meyer & Jaccaud, 1997). Renseprosedyren som ble utført var modifisert av LGC og kjemikaliene som inngikk var CL6B (fra Pharmacia) som her ble brukt til å lage rensekolonner. Metoden er basert på en samling av offisielle metoder under "Article 35 of the German Federal Food Act. Method 24.01.1". Denne metoden ble brukt på prøvene hvis ikke det er indikert at SDS-metoden ble brukt.

7.4 PCR-strategi

Det ble benyttet to ulike enzymer i PCR-reaksjonene som ble utført, AmpliTaq Gold, eller AmpliTaq (Perkin Elmer). Primerene som ble benyttet var både de som oppformerer universelle DNA-sekvenser fra plantegener og spesifikke fra transgene organismer. **Tabell 11** gir en oversikt over navn og referanser på primere som ble benyttet og forventet størrelse på PCR-produktene.

Tabell 10. Engelske produkter merket genmodifisert.

| Produkt | Merking |
|---|---|
| Beanfeast - Mexican chili, Batchelors | Med svært liten skrift bakpå som del av ingrediensene, - "contains genetically modified material" |
| Beanfeast - Savory Mince, Batchelors | |
| Beanfeast - Bolognese Style, Batchelors | |
| Beanfeast - Medium Curry, Batchelors | |
| Tomatpurré | Innen stor gult felt på framsiden- "made with genetically modified tomatoes" |

Tabell 11. PCR-produkter.

| Primernavn | Genetisk opphav | PCR-produkt-størrelse | Referanse |
|-----------------------------------|--|-----------------------|------------------------|
| Transgene: | | | |
| 293 + 526 | Ti-plasmid | 233 bp | Bones et al. 1997 |
| TN5-1 + TN5-2 | Kanamycin ^R (nptII) | 173 bp | LGC |
| nptIIA + nptIIB | Kanamycin ^R (nptII) | | Beck et al. 1992 |
| 35S1 + 35S2 | CaMV35S-promoter | 195 bp | Kay et al. 1987 |
| 35SA + 35SB | CaMV35S-promoter | 208 bp | LGC |
| NOS1 + NOS2 | NOS 3' terminator | 180 bp | Kay et al. 1987 |
| p35s-f2 + petu-r1 | Petunia hybrid "ledersekvens" og blomkål mosaikk virus (CaMV) 35S promoter | 172 bp | Wurze & Willmund, 1997 |
| RRO4 + RRO5 | CP4 EPSPS gen og N-terminal kloroplast-transit peptid (CTP) sekvens fra Petunia hybrida EPSPS CPS-gen. | 180 bp | Köppel et al. 1997 |
| Universelle planteprimere: | | | |
| PUV1 + PUV2 | Universell 18S rRNA (PUV) | 226 bp | LGC |
| PUV3 + PUV4 | Universell 18S rRNA (PUV) | 1303 bp | LGC |
| PUV1 + PUV3 | Universell 18S rRNA (PUV) | 1070 bp | LGC |
| PUV2 + PUV4 | Universell 18S rRNA (PUV) | 459 bp | LGC |
| Maisspesifikke: | | | |
| maize1 + maize2 | Mais "high mobility protein" | 175 bp | LGC |
| Soyaspesifikke: | | | |
| GMO3 + GMO4 | Lectin | 118 bp | Meyer et al. 1996 |

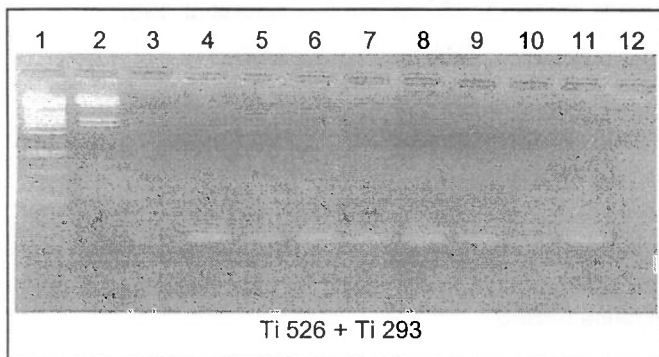
8 Resultater

8.1 Resultater fra analyse av plantemateriale

8.1.1 Transgent potetmateriale

Formålet med laboratorieforsøket beskrevet her var å isolere DNA fra de transgene potetplantene, for så å prøve ut og optimalisere sensitiv påvisning av det transgene materialet ved PCR-metoden. Et mål var også å se om det genetiske materialet som var innsatt i plantene hadde forandret seg i løpet av de åtte årene som har gått siden de ble konstruert, dvs om det transgene DNAet var stabilt nedarvet.

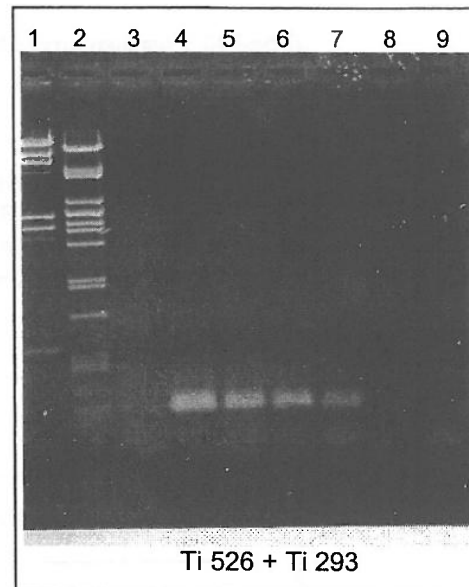
DNA fra plantematerialet ble isolert og PCR ble utført på hver av prøvene ved bruk av primerene komplementære til sekvenser i Ti-plasmidet (Ti 526, Ti 293). Resultatet var et ca. 230 bp PCR-produkt (233bp var forventet størrelse) på alle prøvene som stammet fra transgent materiale. Det ble ikke sett noe PCR-produkt på den negative kontrollen (ikke-transgen potetplante). Se figur 5.



Figur 5. PCR-produkter fra transgent potetplante-DNA oppformert ved hjelp av Ti-primere som er komplementær til det transgene materialet. 1- λ Pst I; 2 - λ Hind III; 3 - transgen 1.02; 4 - transgen 1.65; 5 - transgen 2.01; 6 - transgen 2.02; 7 - transgen 2.72; 8 - transgen 3.02; 9 - transgen 3.36; 10 - transgen 17; 11 - transgen 22; 12 - ikke-transgen.

For å få bedre innblikk i hvor sensitivt reaksjonsoppsettet var, ble det laget en fortynningsrekke av DNA fra transgent potetmateriale. Fortynningene var 1/5, 1/10, 1/50 og 1/100, dvs. omtrent 20 ng, 10 ng, 2 ng og 1 ng DNA. PCR ble utført som beskrevet over og PCR-produktene separert ved gelelektroforese, se figur 6.

Resultatet viser at da omtrent 2 ng DNA fra den transgene potetplanten var tilstede, kunne en spesifikk DNA-sekvens oppformes og påvises ved konvensjonell gelelektroforese under de PCR-betingelsene som er beskrevet.

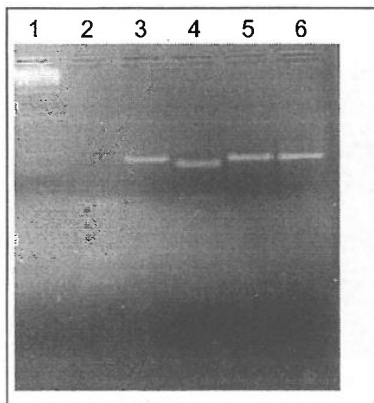


Figur 6. Gelelektroforese av PCR-produkt fra fortynnet DNA fra transgen potetplante. 1 - λ Hind III; 2 - λ Pst I; 3 - ikke-transgent DNA; 4 - ufortynnet transgent DNA; 5 - 1/5 fortynning; 6 - 1/10 fortynning; 7 - 1/50 fortynning; 8 - 1/100 fortynning; 9 - dH₂O.

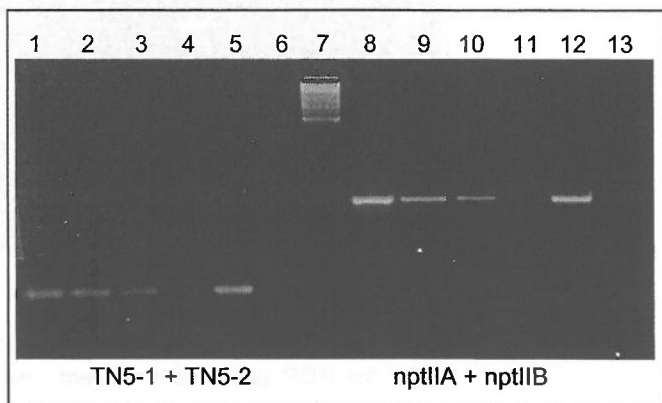
Det finnes flere metoder for undersøkelse av genetisk variasjon. En av metodene som er basert på PCR-teknikken består i å kutte PCR-produkter med restriksjonsenzymmer for om mulig å påvise variasjoner i kuttemønsteret. Dette vil i prinsippet være det samme som en RFLP beskrevet i appendix. Det ble valgt restriksjonsenzymmer her som gjenkjenner sekvenser på fire nukleotider. I motsetning til restriksjonsenzymmer som gjenkjenner seks nukleotider, vil disse kutte DNA-fragmenter i mindre biter fordi de har flere gjenkjenningsseter i DNA-sekvensen. Analyse vha "fire-kuttere" vil derfor gi et mer detaljert bilde enn "seks-kuttere" og øke sannsynligheten for å vise genetisk variasjon. Enzymene som her ble valgt var følgende: *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Mbo* I og *Rsa* I. For å analysere kuttemønsteret for de ulike enzymene, ble PCR-produktet fra en av de transgene plantene kuttet med disse enzymene og DNA-fragmentene ble separert ved gelelektroforese, se figur 7.

Resultatet av dette forsøket viste at PCR-produktet inneholdt to restriksjonsseter for *Alu* I og *Hinf* I, mens ingen for *Hae* III, *Mbo* I og *Rsa* I. Tilsvarende restriksjonsenzymkuttinger ble utført på PCR-produkter fra alle de transgene potetlinjene, men ingen genetisk variasjon ble observert.

De transgene potetplantene var konstruert slik at de var kanamycin resistente. Enkelte av prøvene ble testet for dette vha de to primersettene spesifikke for denne markøren. Resultatet er vist i figur 8.



Figur 7. PCR-produkt fra transgent potet-DNA kuttet med ulike restriksjonsenzymmer for om mulig å kunne påvise genetisk variasjon. 1 - λ *Pst* I; 2 - *Alu* I; 3 - *Hae* III; 4 - *Hinf* I; 5 - *Mbo* I; 6 - *Rsa* I.



Figur 8. Gelelektroforese av PCR-produkter fra transgene potetplanter hvor to sett PCR-primere for kanamycin-resistensmarkør ble brukt. 1 - transgen 1.65; 2 - transgen 2.02; 3 - transgen 2.72; 4 - ikke-transgen 14.05 (negativ kontroll); 5 - GM-tomat (positiv kontroll); 6 - dH_2O ; 7 - 123bp-ladder; 8 - transgen 1.65; 9 - transgen 2.02; 10 - transgen 2.72; 11 - ikke-transgen 14.05 (negativ kontroll); 12 - GM-tomat (positiv kontroll); 13 - dH_2O .

Forsøket viste at kanamycinresistensmarkøren fremdeles var tilstede i de transgene potetplantene selv etter ni års kontinuerlig vekst selv om kanamycin ikke var tilsatt vekstmediet.

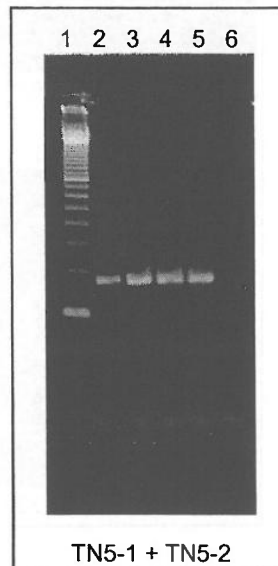
8.1.2 Transgene tomater

DNA ble isolert fra to kilder; fra knust frosset materiale fra selve tomaten (frukt) og fra blader plukket fra transgen tomatplante i LGC-laboratoriet. Det ble isolert DNA fra to paralleller av hver og PCR ble utført først vha de universelle planteprimerene PUV1 + PUV2 som ga positivt signal i alle prøvene. Deretter ble ulike transgene primer sett testet på materialet og resultatet av disse PCR-reaksjonene er vist i figur 9 og 10.

Resultatene viste at DNAet isolert fra tomatmaterialet lot seg oppformere ved de PCR-betingelsene som ble valgt. Det transgene materialet viste tilstedeværelse av kanamycinresistensmarkør i tillegg til blomkål-mosaikk promoter og

terminator-sekvenser som er tilstede i de fleste transgene planter foreløpig på markedet. PCR-reaksjonen utført med primersetet 3 5S1 og 3 5S2 ga dannelse av primerdimer (sees som et sekundært bånd med liten størrelse på gelen). DNA isolert fra "Beanfeast"-materialet lot seg ved 10x fortykning oppformere ved bruk av NOS-primere. Mengden PCR-produkt som ble oppnådd i reaksjonen var imidlertid lav.

Figur 9. Gelelektroforese av PCR-produkter fra transgent tomatmateriale vha kanamycin-resistensprimere. 1 - 123 bp-ladder; 2 - frukt, parallell 1; 3 - frukt, parallell 2; 4 - blad, parallell 1; 5 - blad, parallell 2; 6 - dH_2O .

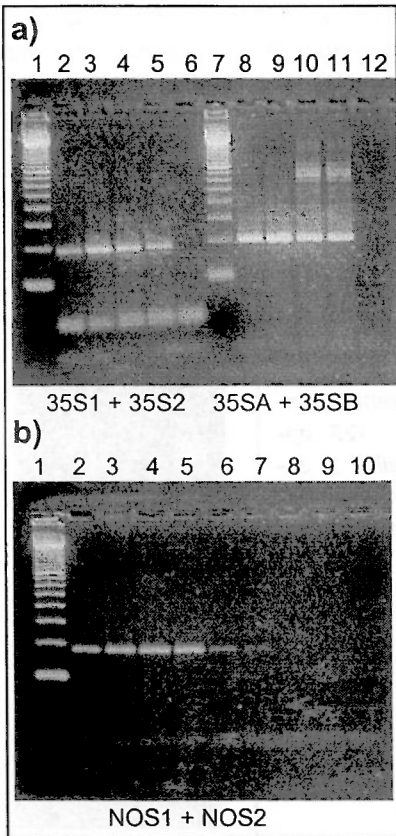


8.1.3 Transgene soyabønner

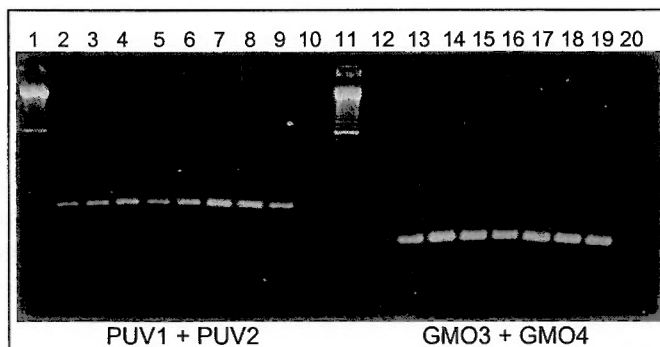
Transgent soyamateriale som ble benyttet i prosjektet stammet fra soyamel. DNA ble isolert ved CTAB-metoden. Det ble isolert to paralleller av hver prøve. Ulike primere ble testet ut på materialet. Først de universelle planteprimerene PUV1 + PUV2, deretter de spesifikke soya-primere GMO3 + GMO4 (figur 11).

Forsøket viste at materialet lett lot seg oppformere ved PCR og at primere var spesifikke og ga riktig størrelse på PCR-produktet. For å stadfeste at soyamaterialet inneholdt materiale fra genmodifiserte soyabønner, ble ulike transgene primer sett utprøvd (figur 12). Ved at soya-referansematerialet inneholdt ulike mengder transgen soya (0.1 %, 0.5 % og 2.0 %), ga dette forsøket en indikasjon på hvor sensitiv PCR-reaksjonen var.

Forsøkene viste at referansematerialet inneholdt Roundup Ready™ soya, PCR-betingelsene som ble valgt fungerte optimalt og prøvematerialet som inneholdt minst ned til 0,1 % transgen soya kunne la seg påvise ved bruk av alle de fire primere spesifikke for genmodifisert soya-materiale.



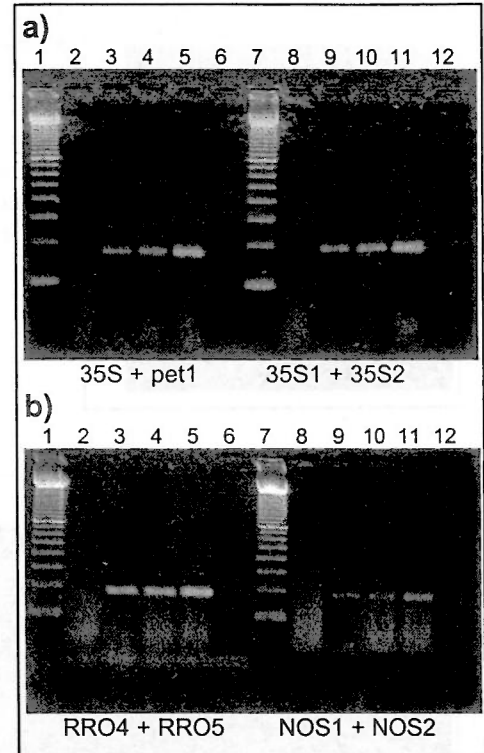
Figur 10. Gelelektroforese av PCR-produkter fra transgent tomatmateriale vha tre primersett spesi- fikke for transgene planter. a) 1 - 123bp-ladder; 2 - frukt1; 3 - frukt2; 4 - blad1; 5 - blad2; 6 - dH₂O, 7 - 123bp-ladder; 8 - frukt1; 9 - frukt2; 10 - blad1; 11 - blad2; 12 - dH₂O b) 1 - 123bp-ladder; 2 - frukt1; 3 - frukt2; 4 - blad1; 5 - blad2; 6 - 9 PCR på DNA isolert fra ulike varianter av matpro- duktet "Beanfeast" hvor prøven var for- tynnet 10 ganger for å optimalisere beting- elsene; 10 - dH₂O.



Figur 11. Gelelektroforese av PCR-produkter fra oppform- ring av transgent soyabønne materiale. Primerene som ble brukt var universelle planteprimere (PUV1 + PUV2) og soya-spesifikke (GMO3 + GMO4), 1 - 123bp-ladder; 2 - soya1; 3 - soya2; 4 - 0,1% GM-soya1; 5 - 0,1% GM-soya2; 6 - 0,5% GM-soya1; 7 - 0,5% GM-soya2; 8 - 2,0% GM-soya1; 9 - 2,0% GM-soya2; 10 - dH₂O; 11 - 123bp-ladder; 12 - soya1; 13 - soya2; 14 - 0,1% GM-soya1; 15 - 0,1% GM-soya2; 16 - 0,5% GM-soya1; 17 - 0,5% GM-soya2; 18 - 2,0% GM-soya1; 19 - 2,0% GM-soya2; 20 - dH₂O.

8.1.4 Ikke-transgene planter

Det ble isolert DNA fra mange ulike typer plantemateriale med det formål å undersøke om isoleringsprosedyren fungerte tilfredsstillende på ulike typer materiale mht bl.a. hvor store fragmenter som kunne amplifiseres og for å gjøre en liten undersøkelse mhp genetisk variasjon.

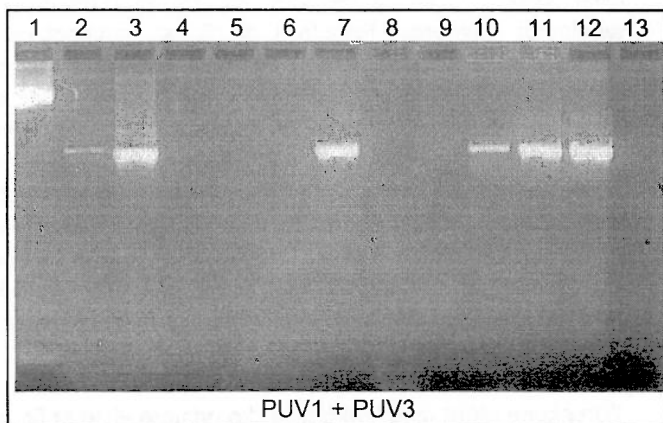
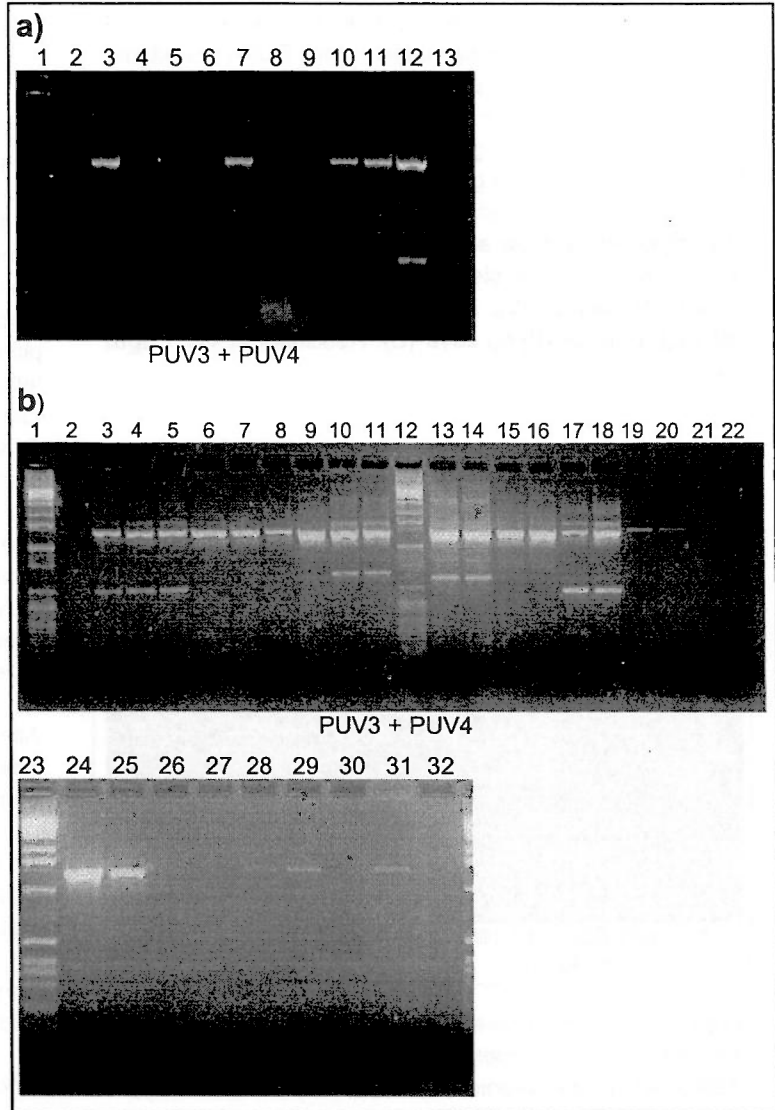


Figur 12. Gelelektroforese av PCR-pro- dukter fra PCR utført på transgent soya- materiale, Primerene som ble brukt er homologe til de genetiske elementene satt inn i de fleste transgene planter i dag (35S1 + 35S2 og NOS1 + NOS2) og to sett spesifikke for Roundup Ready™ soya (p35s-f2 + petu-r1 og RRO4 + RRO5), a) og b) 1 - 123bp-ladder; 2 - soya; 3 - 0,1 % GM-soya; 4 - 0,5 % GM-soya; 5 - 2,0 % GM-soya; 6 - dH₂O; 7 - 123bp-ladder; 8 - soya; 9 - 0,1 % GM-soya; 10 - 0,5 % GM-soya; 11 - 2,0 % GM-soya; 12 - dH₂O.

De fleste av prøvene som det ble isolert DNA fra er satt opp i tabell 5 under 7.1.4. I enkelte tilfeller, ble det prøvd å isolere DNA fra ulike deler av plantene. Det ble prøvd oppformering av DNA med ulike primersett komplementære til universelle plantegen-er (figur 13 og 14). Enkelte av matprøvene er tatt med for å undersøke DNA-fragmentstørrelse tilstede i produktet.

Resultatet fra dette forsøket viste at det var varierende hvor lett det var å få oppformert dette store PCR-produktet. At PCR-produkt i enkelte av prøvene ikke lot seg oppformere kan være en indikasjon på at så store DNA-fragmenter ikke er tilstede i løsningen. Prøvene hvor PCR-produkt ikke lot seg påvise og hvor DNA da antas å være sterkt degradert eller at det finnes faktorer som inhiberer PCR-reaksjonen er: Soyabiter, Rimax; hermetisert mais og tomat; blomst fra svensk asal, frø fra lønn. Det ser ut til å variere hvor godt DNA fra rakler lar seg oppformere (bjørk og pil). Imidlertid lot dette forholdsvis store PCR-produktet seg oppformere i de fleste av DNA-prøvene som stammet fra ikke-bearbeidet plantemateriale. Det var svært påfallende at så store DNA-

Figur 13. Gelelektroforese av PCR-produkter oppformert fra forskjellig type plantemateriale. Primerene som ble benyttet var universelle planteprimere som gir stort PCR-produkt (1303 bp). **a)** 1-123bp-ladder; 2 - Soyabiter1, Rimax; 3 - "Vege burger mix", Releart; 4 - skinnfrie hermetiserte tomater, Landlord; 5 - grovhakkede hermetiserte tomater, Landlord; 6 - hermetisert mais; 7 - frosset mais; 8 - hermetisert tomat (SDS-metode); 9 - hermetisert mais; 10 - bjørk (SDS-metode); 11 - potetplante (SDS-metode); 12 - soya; 13 - dH₂O. **b)** 1-123bp-ladder; 2 - Bjørk, rakle; 3 - Bjørk, rakle; 4 - Bjørk, blad; 5 - Bjørk, blad; 6 - Hengebjørk, blad; 7 - Hengebjørk, blad; 8 - Vinterkarse, blomst; 9 - Vinterkarse, blomst; 10 - Vinterkarse, blad; 11 - Vinterkarse, blad; 12 -123bp-ladder; 13 - Åkerkål, blomst; 14 - Åkerkål, blomst; 15 - Åkerkål, blad; 16 -Åkerkål, blad; 17 - Osp, blad; 18 - Osp, blad; 19 - Svensk asal, blad; 20 - Svensk asal, blad; 21 - Svensk asal, blomst; 22 - Svensk asal, blomst; 23 -123bp-ladder; 24 - Lønn, blad; 25 - Lønn, blad; 26 - Lønn, frø; 27 - Lønn, frø; 28 - Pil, blad; 29 -Pil, blad; 30 - Pil, rakle; 31 - Pil, rakle; 32 - dH₂O.



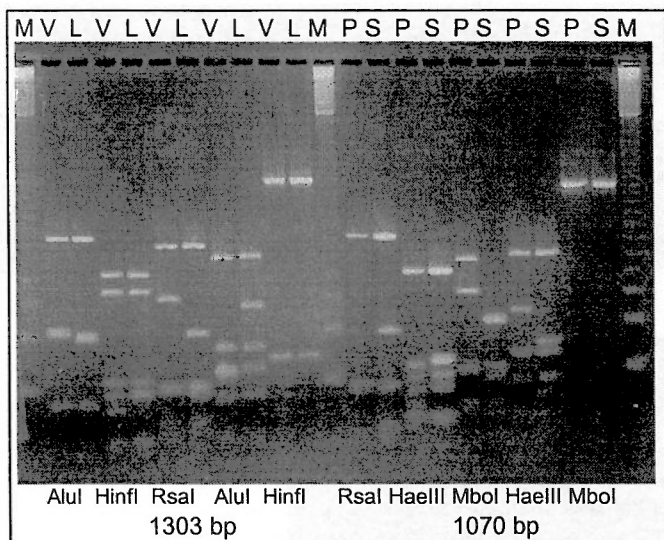
Figur 14. Gelelektroforese av PCR-produkter oppformert fra forskjellig type plantemateriale. Primerene som ble benyttet var universelle planteprimere som gir stort PCR-produkt (1070 bp). **a)** 1-123bp-ladder; 2 - Soyabiter1, Rimax; 3 - "Vege burger mix" Releart; 4 - skinnfrie hermetiserte tomater, Landlord; 5 - grovhakkede hermetiserte tomater, Landlord; 6 - hermetisert mais; 7 - frosset mais; 8 - hermetisert tomat (SDS-metode); 9 - hermetisert mais (SDS-metode); 10 - bjørk (SDS-metode); 11 - potetplante (SDS-metode); 12 - soya; 13 - dH₂O.

fragmenter er tilstede i f.eks. DNA isolert fra "vege burger mix"-gryteretten som er et produkt som både er bearbeidet og hvor DNAet derfor var forventet å være sterkt degradert. Produktet inneholder også krydre og tilsetningsstoffer som kan tenkes å hemme PCR-reaksjonen. Store DNA-fragmenter lot også til å være til stede i frossen mais og soyamel. Resultatene viste at det i enkelte prøver ble oppformert også andre området av plantegenomet noe som trolig tyder på at disse PCR-primerene ikke er spesifikke nok under betingelsene som ble valgt, eller at betingelsene ikke er stringente nok.

PCR utført med de universelle planteprimere PUV1 + PUV3 som gir et PCR-produkt på 1070 bp ble også utført på enkelte DNA-prøver. Resultatene sees i figur 14.

PCR vha dette primersettet ga liknende resultat som det oppnådd for primersett PUV3 + PUV4. Forskjellen var at mengde PCR-produkt produsert i de fleste prøvene var høyere i tillegg til at reaksjonen synes mer spesifikk. Her ble PCR-produkt amplifisert fra Soyabiterne fra Rimax hvilket betyr at det også i dette bearbeidede produktet også foreligger relativt store DNA-fragmenter.

For å se om genetisk variasjon kunne detekteres ved restriksjonskutting av disse relativt store PCR-produktene, ble to prøver med ulik planteopprinnelse kuttet med fem ulike restriksjonsenzymene som har gjenkjenningssete på fire bp og derfor kutter ofte i genomisk DNA. Enzymene var: *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Mbo* I og *Rsa* I. Det ble valgt prøver som i forrige eksperiment hadde gitt PCR-produkt som hadde gitt bra utbytte og som ga entydige bånd på gelen. For PCR-produkt på 1303 bp ble det valgt ut lønn, blad (L) og vinterkarse, blomst (V). For PCR-produkt på 1070 bp ble det valgt ut potet (P) og soya (S). Resultatet er vist i figur 15.



Figur 15. Gelelektroforese av restriksjonskuttende PCR-produkter for å undersøke genetisk variasjon. M - markør, 123bp-ladder; V - vinterkarse; L - lønn; P - potet; S - soya.

Resultatet viste at alle restriksjonsezymene unntatt *Rsa* I ga forskjellig "fingerprint" i de to prøvene som ble sammenliknet. Dette gir et bra utgangspunkt for bruk av disse PCR-produktene og enzymene i videre studier av genetisk variasjon.

8.2 Resultater fra analyse av matprodukter

I denne delen av prosjektet var hensikten å undersøke potensialet for DNA-ekstraksjon og deteksjon av plante-markører og GM-markører på ulike typer mer eller mindre bearbejdede matprodukter. PCR ved bruk av enzymet AmpliTaq Gold var den metoden som var valgt for amplifikasjon av DNA isolert ved CTAB-metoden. Det er fokusert på kvalitativ analyse, men det er også tatt med noen små eksperimenter for å initiere kompetanseoppbygging på den kvantitative påvisningen av transgener.

8.2.1 Kvalitative undersøkelser av matprodukter

Av matprodukter som ble valgt ut i analysen ble det fokusert på produkter som inneholdt enten soya, tomat eller mais. De ulike produktene som ble testet er nevnt i tabell 12, 13 og 14. Produkter som er tatt med i analysen hvor innhold av transgent materiale var kjent er summert i tabell 15. DNA ble isolert fra produktene vha CTAB-metoden (alltid minst to paralleller av hver) og DNAet ble testet ut vha PCR med plantespesifikke primere, både universelle og i enkelte tilfeller artsspesifikke primere og transgene primere. Resultatet av disse undersøkelsene er summert i tabellene. Figurene 16-22 illustrerer enkelte av PCR-produktene separert ved gelelektroforese.

Alle DNA-prøvene fra matproduktene vist i figur 16 lot seg oppformere med de universelle plantepriemerene PUV1 + PUV2. De som inneholdt soya ble testet med de soya-spesifikke primerene GMO3 + GMO4 som oppformerer området innen genet som koder for lecitin (se figur 17).

Alle DNA-prøvene unntatt den isolert fra Dobbeltvafler, Sætre kjeks, lot seg oppformere med de soyaspesifikke primerene GMO3 + GMO4.

De maisspesifikke primerene maize1 + maize2 ble testet på DNA fra enkelte av DNA-prøvene isolert fra maisprodukter. Resultatet er vist i figur 18.

Forsøket viste at PCR-produkter spesifikke for mais lot seg oppformere i DNA isolert fra mais preparert på ulike måter.

Ulike primersett spesifikke for kjente transgener ble testet ut på de ulike matproduktene. Av slike primersett finnes det ulike typer. Det finnes de som amplifiserer promoter og terminator elementer tilstede i de fleste genmodifiserte plantene som foreløpig finnes på markedet, og så finnes det de som oppformerer spesifikke sammensetninger av genetiske elementer (nevnt i den teoretiske delen av denne utredningen). Alle matvarene ble testet med de førstnevnte. Av de som ga positive signaler med disse ble enkelte testet med primere spesifikke for enkelte konstruksjoner som f.eks. den i Roundup Ready™ soyabønne. Figur 19 viser PCR-produkter fra amplifikasjon med promoterspesifikke primere og figur 20 viser oppformering med terminator-spesifikke primere.

Forsøkene utført med GM-spesifikke primere viste at fire av matvarene som inneholdt soya (to varianter av hver av de to typene) sannsynligvis inneholdt genmodifisert materiale. Utbyttet av PCR-produkt vist i nr. 4 var lavt, men var tilstede. Forsøket viste at de fire produktene positive for promoter-elementet, også var positive for terminator-elementet. Siden de fire matvarene inneholdt soya, ble det satt opp et forsøk hvor PCR-primere spesifikke oppformert DNA-sekvens fra Monsanto's Roundup Ready™ soyabønne materiale (se 2.1.1 for anvisning). Dette PCR-produktet

Tabell 12. Soya-produkter som er testet.

| Produkt | Plante- spesifikk PCR | Soya- spesifikk PCR | Transgen- spesifikk PCR |
|--|-----------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Ascot gullvafler, Sætre kjeks | + | +(svakt) | - |
| Dobbelt vafler, Sætre kjeks | + | - | - |
| Sojaflager, Nutana | + | + | - |
| Soyabiter, Rimax (variant 1) | + | + | + |
| Soyabiter, Rimax (variant 2) | + | + | + |
| Vegeburger mix, Realeat | + | + | + |
| Menu mix, Realeat | + | + | + |
| Sojamel, Nutana | + | + | - |
| Sojamjöl, Risenta | + | + | - |
| Avfettet soyamel, Joco, Jonassen & Co | + | it | - |
| Frosset soya-burger, Hälsans kök (Israel) | + | + | + |
| Beanfeast - Mexican chili, Batchelors ¹ | + | + | + |
| Beanfeast - Savory Mince, Batchelors ¹ | + | + | + |
| Beanfeast - Bolognese Style, Batchelors ¹ | + | + | + |
| Beanfeast - Medium Curry, Batchelors ¹ | + | + | + |
| "Soja Choco Calcium"- soya-kjeks, Gerblé ³ | + | +(svak) | it |
| "Goûter aux pommes" - soya-kjeks, Cérééal ³ | + | + | it |

it = ikke testet

¹ Engelske produkter merket genmodifisert² Engelske produkter, ikke-merket som genmodifisert³ Franske produkter, ikke-merket som genmodifisert**Tabell 13. Tomat-produkter som er testet.**

| Produkt | Plante- spesifikk PCR | Tomat- spesifikk PCR | Transgen- spesifikk PCR |
|---|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Pastasaus - Verona, Maggi, Nestlé | +(svak) | it | - |
| Pastasaus - Napoli, Maggi, Nestlé | +(svak) | it | - |
| Hermetiserte tomater - skinnfrie, Landlord | +(svak) | it | - |
| Hermetiserte tomater - grovhakket, Landlord | +(svak) | it | - |
| Chili con carne, Colman`s ² | + | it | - |
| Tomatpurré ¹ | - | it | - |

it = ikke testet

¹ Engelske produkter merket genmodifisert² Engelske produkter, ikke-merket som genmodifisert

Tabell 14. Mais-produkter som er testet.

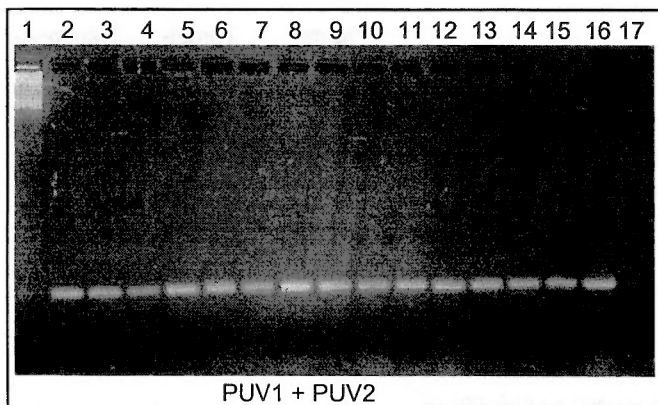
| Produkt | Plante-spesifikk PCR | Mais-spesifikk PCR | Transgen-spesifikk PCR |
|------------------------------------|----------------------|--------------------|------------------------|
| Maismel, Maizena | + | + | - |
| Majsgryn, Nutana | + | + | - |
| Tørkede maiskorn, Nova | + | it | - |
| Hermetisert mais, Landlord | + | + | - |
| Frosset maiskolbe, Findus | + | + | - |
| (pakket i USA for svensk Nestlé) | | | |
| Cornflakes, Kellogg`s ² | - | it | - |

it = ikke testet
² Engelske produkter, ikke-merket som genmodifisert

Tabell 15. Andre produkter som er testet.

| Produkt | Plante-spesifikk PCR | Annen spesifikk PCR | Transgen-spesifikk PCR |
|--|----------------------|---------------------|------------------------|
| Potetmel, Hoff | - | it | it |
| Buljongterning -Herbs & Spices, OXO ² | + | it | - |
| Skjokoladekjeks ² | + | it | - |
| Ingefærkjeks ² | + | it | - |
| Ris ² | + | it | - |
| Nudler (3 min.) ² | + | it | - |
| Potetgull ² | + | it | - |

it = ikke testet
² Engelske produkter, ikke-merket som genmodifisert

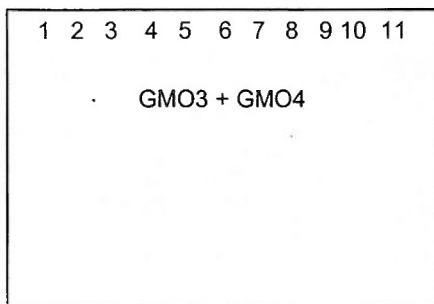


Figur 16. Gelelektroforese av PCR-produkter amplifisert fra DNA fra forskjellige matprodukter. 1 -123bp-ladder; 2 - Soyabiter, Rimax (variant 1); 3 - Soyabiter, Rimax (variant 1); 4 - "Vege burger mix", Realeat; 5 - "Vege burger mix", Realeat; 6 - "Vege Menu mix", Realeat; 7 - "Vege Menu mix", Realeat; 8 - "Vege burger mix", Realeat; 9 - "Vege burger mix", Realeat; 10 - Soyabiter, Rimax (variant 1); 11 - Soyabiter, Rimax (variant 1, pakke 2); 12 - Soyabiter, Rimax (variant 2); 13 - Soyabiter, Rimax (variant 2); 14 - tørkede maiskorn, Nova; 15 - tørkede maiskorn, Nova; 16 - soya; 17 - dH₂O.

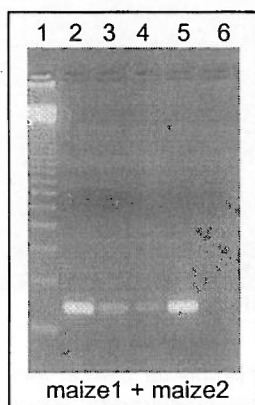
spenner over to genetiske elementer, nemlig mellom petunia hybrid "leder-sekvens" og blomkål mosaikk virus (CaMV) 35S promoter, som ikke finnes i ikke-modifiserte planter. Resultatet er vist i figur 21.

Forsøket viste at matproduktene Soyabiter, Rimax (variant 1), Soyabiter, Rimax (variant 2), Vegeburger mix, Realeat og Menu mix, Realeat, mistenkt for å inneholde genmodifisert soyamateriale inneholder materiale fra Monsanto Roundup Ready™ soyabønner. På forespørsel ble prøvene som ble funnet positive for genmodifisert materiale videre-sendt til Matforsk (Norges landbrukshøgskole)/Veterinær-instituttet i Oslo for verifisering av funnet og for at disse institusjonene kunne bruke materialet for opparbeidelse av kompetanse mht kvantitativ påvisning av andelen av genmodifisert materiale i prøven.

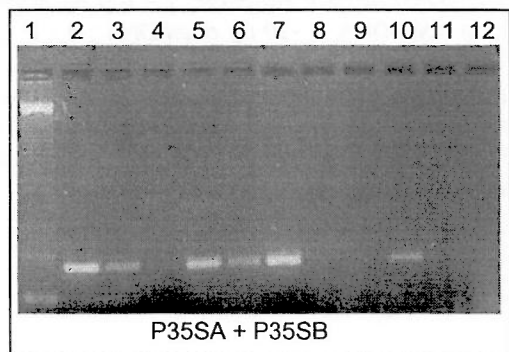
At det ikke ble observert PCR-produkt ved bruk av denne sammensetningen av primere i GM-tomat som jo ikke inneholder samme organisering av genetiske elementer, viser at denne PCR-reaksjonen er spesifikk for GM-soya konstruksjonen.



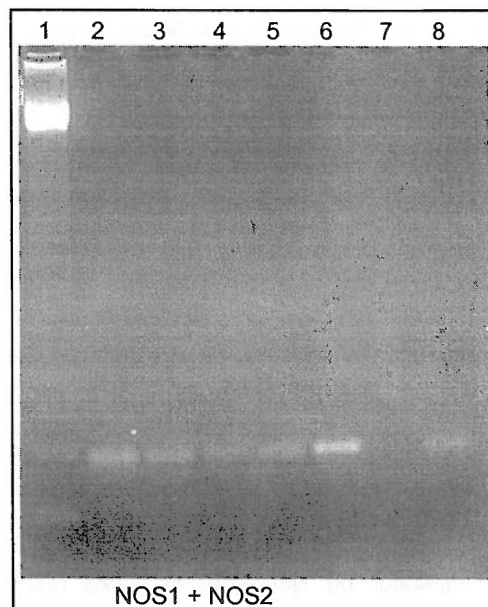
Figur 17. Gelelektroforese av PCR-produkter amplifisert fra matprodukter som inneholder soya. 1 - 123bp-ladder; 2 - Soyamel, Joco; 3 - Sojafflager, Nutana; 4 - Soyabiter, Rimax (variant 1); 5 - «Vege burger mix», Realeat; 6 - Soyamel, Nutana; 7 - Sojamjøl, Risenta; 8 - Dobbeltvafler, Sætre kjeks; 9 - Gullvafler Ascot, Sætre kjeks; 10 - dH₂O; 11 - soya (positiv kontroll).



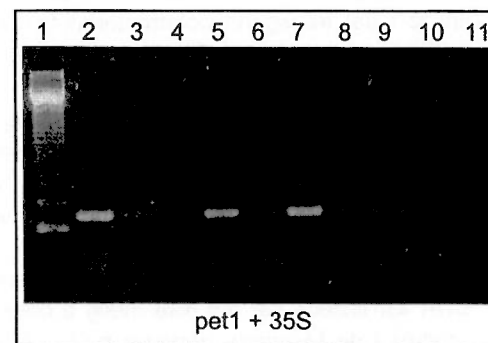
Figur 18. Gelelektroforese av maisspesifikke PCR-produkter amplifisert fra matprodukter som inneholder mais. 1 - 123bp-ladder; 2 - majsgryn, Nutana; 3 - maismel, Maizena; 4 - hermetisert mais, Landlord; 5 - frosset mais, Findus; 6 - dH₂O.



Figur 19. Gelelektroforese av PCR-produkter oppformert med GM-spesifikke primere for promoter-element. 1 - 123bp-ladder; 2 - Soyabiter, Rimax (variant 1, prøve 1); 3 - «Vege burger», Realeat (prøve 1); 4 - «Vege menu mix», Realeat (prøve 1); 5 - «Vege burger mix, Realeat » (prøve 2); 6 - Soyabiter, Rimax (variant 2, prøve 1); 7 - Soyabiter, Rimax (variant 2, prøve 2); 8 - tørkede maiskorn, Nova; 9 - tørkede maiskorn; 10 - 0.5 % GM-soya; 11 - soya; 12 - dH₂O.



Figur 20. Gelelektroforese av PCR-produkter amplifisert fra matvarer som inneholdt GM-materiale. 1 - 123bp-ladder; 2 - Soyabiter, Rimax (variant 1, parallell 1); 3 - Soyabiter, Rimax (variant 1, parallell 2); 4 - «Vege burger mix», Realeat (parallell 1); 5 - «Vege burger mix», Realeat (parallell 2); 6 - GM-tomat; 7 - dH₂O; 8 - 0.5% GM-soya.



Figur 21. Gelelektroforese av PCR-produkter spesifikke for Roundup Ready™ Soya. 1 - 123bp-ladder; 2 - Soyabiter, Rimax (variant 1, prøve 1); 3 - «Vege burger», Realeat (prøve 1); 4 - «Vege menu mix», Realeat (prøve 1); 5 - «Vege burger mix», Realeat (prøve 2); 6 - Soyabiter, Rimax (variant 2, prøve 1); 7 - Soyabiter, Rimax (variant 2, prøve 2); 8 - GM-tomat; 9 - 0.5% GM-soya; 10 - soya; 11 - dH₂O.

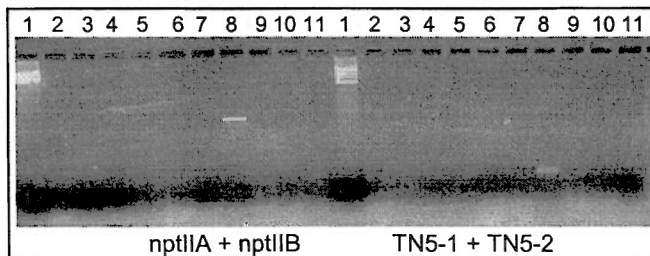
Flere av DNA-prøvene ble testet for innhold av kanamycin-resistens-markør ved PCR med primere spesifikke for dette genet. Resultatet er vist i figur 22.

Forsøket viste at DNA fra GM-tomaten var den eneste av DNA-prøvene testet her som inneholdt markøren for kanamycinresistens. Dette var hva som var forventet ut i fra hva som er kjent ved de ulike genmodifiserte konstruktene.

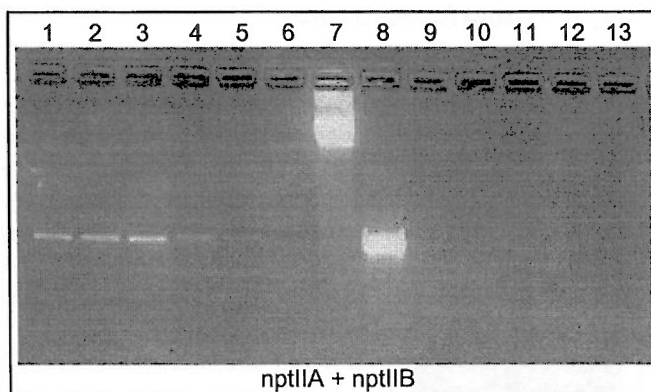
8.2.2 Kvantitative undersøkelser av matprodukter

I mange ulike sammenhenger er det viktig å kunne kvantifisere i hvor stor grad en prøve inneholder GMO-materiale. Det er ikke her lagt stor vekt på den kvantitative analysen vha PCR fordi denne er vanskelig å utvikle uten spesifikk apparatur og kjennskap til hvilke faktorer i ulike matprodukter som kan inhibere oppformeringen av PCR-produkt. Det ble imidlertid utført et lite eksperiment her i et forsøk på å teste ut mulige inhiberende faktorer i Soyabitenene fra Rimax. Eksperimentet ble gjort ved at det ble satt opp en fortynningsrekke av DNA fra en transgen potet-plante med kjent konsentrasjon og utført PCR på disse for seg i tillegg til at samme mengde potet-DNA ble oppformert i blanding med DNA isolert fra Soyabitenene fra Rimax. Mengde av DNA fra soyabitenene var samme mengde som ble brukt under normale PCR-betingelser. PCR-produktet som ble oppformert var fra kanamycinresistensgenet som finnes i det transgene potetmaterialet, men ikke i DNAet isolert fra matproduktet. Resultatet kan sees i figur 23.

Resultatene fra dette forsøket viste at 1 ng var mulig å påvise ved denne PCR-reaksjonen. Resultatene hvor samme mengde potet-DNA var blandet med DNA isolert fra matprodukt var uventede ved at det i prøven hvor 100 ng potet-DNA var tilstede synes som om reaksjonen var fremmet. I reaksjonene hvor mindre konsentrasjon av potet-DNA var tilstede var det ikke mulig å observere noe PCR-produkt i de blandede prøvene hvilket indikerer at det er hemmende agens tilstede. Disse kan være stoffer som f.eks. ulike salter og karbohydrater (Hemmer, 1997). Måter å fjerne slike hemmende faktorer på er f.eks. å optimalisere PCR-reaksjonen, fortynne prøven (som utført i mange av forsøkene her) og utføre "nested PCR".



Figur 22. Gelelektroforese av PCR utført med kanamycin-resistens-spesifikke primere på DNA fra ulike typer matprodukter. 1 - 123bp-ladder; 2 - Soyabiten, Rimax (variant 1, prøve 1); 3 - "Vege burger", Realeat (prøve 1); 4 - "Vege menu mix", Realeat; 5 - "Vege burger mix", Realeat (prøve 2); 6 - Soyabiten, Rimax (variant 1, prøve 2)); 7 - Soyabiten, Rimax, (variant 2, prøve 1); 8 - GM-tomat; 9 - 0.5 % GM-soya; 10 - soya; 11 - dH₂O.



Figur 23. Gelelektroforese av PCR-produkter som et ledd i å kunne kvantifisere og si noe om inhiberende agens i DNA-materialet isolert fra et matprodukt. 1 - 100 ng potet-DNA; 2 - 50 ng potet-DNA; 3 - 10 ng potet-DNA ; 4 - 5 ng potet-DNA; 5 - 1 ng potet-DNA; 6 - dH₂O; 7 - 123bp-ladder; 8 - 100 ng potet-DNA + Soyabiten-DNA; 9 - 50 ng potet-DNA+ Soyabiten-DNA; 10 - 10 ng potet-DNA+ Soyabiten-DNA; 11 - 5 ng potet-DNA+ Soyabiten-DNA; 12 - 1 ng potet-DNA+ Soyabiten-DNA; 13 - dH₂O.

9 Diskusjon

PCR-teknikken som er en metode for amplifisering av utvalgte nukleinsyresekvenser er den mest vanlig og anvendbare metoden for påvisning av spesifikt DNA. Spesielt ved genetisk påvisning i materialer som inneholder sterkt nedbrutt materiale slik som i f.eks. bearbeidede matprodukter, er PCR trolig den mest funksjonelle metoden å ta i bruk.

Arbeidet som ble foretatt i prosjektet her ble fokusert rundt opparbeidelse av kompetanse mhp bruk av PCR-teknikken til oppformering av spesifikke DNA-sekvenser i forskjellige typer plantemateriale. I materiale hvor DNAet forventes å være sterkt nedbrutt som f.eks. i bearbeidede matprodukter, kan det å påvise spesifikke DNA-sekvenser være en stor utfordring.

Som del av den kvalitative testingen av materiale ble mange ulike typer bearbeidede matprodukter testet både mhp hvor sterkt nedbrutt DNAet som var tilstede var, og om produktene inneholdt genmodifisert materiale. En slike type screeningsprosedyre vil også være et naturlig sted å starte ved en rutinemessig kontroll av både matprodukter, landbruksprodukter og biologiske forsendelser som kan inneholde genmodifiserte materiale.

Teoretisk sett skulle det være mulig å anvende PCR som en kvantitativ metode som kunne gi informasjon om mengden templat-DNA som var tilstede i utgangspunktet, f.eks. ved bruk til påvisning av en transgen plante blant 1000 ikke-transgene. Imidlertid kan dette kreve mye arbeid ved tilrettelegging av reaksjonsbetingelsene. Flere teknikker for kvantitativ bestemmelse av DNA ved bruk av PCR er dokumentert, av disse er bl.a. en metode hvor en intern DNA-standard med kjent konsentrasjon mye brukt ("competitive PCR") for genmodifiserte mikroorganismer (Lesser et al. 1995).

Det var vanskelig her å avgjøre eksakt hvilken nedre grense av DNA som måtte være tilstede for at en spesifikk PCR-oppformering kunne foretaes. Ett forsøk utført her viste at PCR-produkt kunne detekteres ved konvensjonell gelelektroforese da DNA-templatet var fortynt 50 ganger, omtrent 2 ng var da tilstede i utgangspunktet. For å se reaksjonsproduktet på en gel farget med etidium bromid kreves det ca. 100 pg av et DNA-fragment (Prydz & Kolstø, 1994), dvs. at hvis en antar en 10^5 oppformering (antatt oppformeringssnivå for 25 syklar) tilsvarer dette 100 pg / $10^5 = 0.001$ pg i utgangspunktet. Det er imidlertid vanskelig å beregne nøyaktige verdier selv om PCR i teorien er en prosess hvor antall amplifiseringer nøyaktig kan beregnes. Dette kommer bl.a. av at enkelte av bestanddelene i PCR-reaksjonen kan "utmattes" undervegs og redusere utbyttet.

To av matproduktene kjøpt i norske butikker hvor ingen av produktene var merket som genmodifiserte og ett var "negativt" merket med "Soyabønnene er ikke genmodifisert!" ble funnet å inneholde genmodifisert soyamaterialet. Funnet var den første påvisningen av genmodifisert mat i

norske butikker og vekte store mediaoppslag i midten av juni 1998. Påvisningen ble utført ved PCR-oppformering av tre ulike områder innen det innsatte genmodifiserte materialet. To oppformerte områder representerer genetiske elementer tilstede i de fleste genmodifiserte planter tilgjengelige på markedet i dag (promoter og terminator). Det tredje oppformerte området er spesifikt for den genetiske sammensetningen i Monsanto's Roundup Ready™ soya-bønne.

At disse produktene var å finne i norske butikker var trolig hva en kunne forvente ut ifra flere fakta; 1) Andelen av transgene planter kommersielt tilgjengelig har økt betydelig de siste årene og dette spesielt i USA, 2) Produktene GM-soya materialet ble påvist i, stammer trolig fra USA og 3) soyaprodusenter i USA nekter å skille GM-soyabønner fra konvensjonelle soyabønner (Arthur, 1998). Da en vet at GM-soyabønnenes andel av den totale produksjonen i dag av soyabønner i USA er 35% (The Economist, 13. Juni 1998), kan dette bety at enkelte matprodukter kan inneholde soya hvor 35% stammer fra genmodifisert materiale. Imidlertid kan det jo også tenkes at enkelte forsyninger kan inneholde 100% avhengig av transport/lagring og utskipingssystemene i USA.

En metode hvor PCR inngikk etterfulgt med restriksjonskuttinger av PCR-produktet ble i dette prosjektet benyttet for å påvise eventuell genetisk variasjon eller eventuelt hvor stabilt et spesifikt område av det genetiske materialet er over tid. Vi var her interessert i å undersøke hvordan denne metoden egnet seg for denne type analyse og kunne konkludere med at metoden var velegnet til et slikt formål.

Transgent potetmateriale som stammet fra ulike transformerte plantelinjer ble undersøkt innen to ulike områder av det transgene materialet som var satt inn i plantene. Områdene som ble undersøkt var innen *Agrobacterium* Ti-plasmidet og kanamycinresistensmarkøren (se 8.1). Ingen genetisk variasjon ble observert i det amplifiserte materialet. Dette var heller ikke å forvente av flere grunner; 1) Områdene som ble undersøkt var relativt små (233 bp og ca. 800 bp), 2) bare fem ulike restriksjonsenzymmer ble testet, dvs. at ikke hele sekvensen i området ble undersøkt, 3) åtte år er trolig ikke tilstrekkelig tid for akkumulering av mutasjoner.

Det ble også foretatt et forsøk hvor noen av de største PCR-produktene fra forskjellige typer plantemateriale ble testet (se 8.1.4). Forsøket viste at disse relativt store produktene (1303 og 1070 bp) kan egne seg for undersøkelser av genetisk variasjon mellom arter. Før flere studier utføres, er det imidlertid uvisst om metoden viser stor nok grad av variasjon til å kunne egne seg på materiale fra individer innen samme art eller mellom nært beslektede arter.

10 Konklusjon

Målsetningen med dette prosjektet var å bygge opp kompetanse og metodikk for å bistå forvaltningen ved eventuell overvåking av GMOer og analyse av GMO-relatert materiale. I prosjektet er det lagt vekt på metodikk for å kunne detektere spesifikt genetisk materiale fra forskjellig type plantemateriale og i enkelte tilfeller utføre teknikker benyttet i populasjonsgenetiske studier.

I prosjektet har vi fått erfaring med DNA-isolasjonsmetoder fra plantemateriale og bearbeidede produkter inneholdende plantemateriale. DNAet har vært utgangspunkt for oppformering ved hjelp av PCR-teknikken av genetiske elementer tilstede i ikke-modifisert plantemateriale og i bare genmodifiserte planter. DNA-isoleringsmetoden som ble mest benyttet i prosjektet egner seg både for ulike typer plantemateriale og bearbeidede matprodukter av ulike slag.

Screening av ulike matvarer inneholdende soya, mais og tomat kjøpt i norske butikker viste at vi allerede har matvarer i Norge som inneholder genmodifisert materiale. Fire av soyaproduktene ble vist å inneholde materiale fra den såkalte Roundup Ready™ soyabønnen produsert av det amerikanske selskapet Monsanto. Påvisningen var den første påvisningen av genmodifisert mat i Norge og vakte stor oppsikt i media rundt midten av juni 1998.

11 Forslag til videre satsning

Arbeidet utført i dette prosjektet har bidratt til å klargjøre på hvilke felter det kan bli viktig å bygge opp videre kompetanse på. Et av disse feltene gjelder sensitiviteten til selve påvisningssystemet og det å kunne utvikle metodikk for bedre å kunne kvantifisere mengden av transgener tilstede i et miljø med ikke-transgent materiale. Er det f.eks. mulig å kunne kvantifisere antall transgene organismer blant ikke-transgene organismer hvis antallet er 1 : 1 000 eller 1 : 10 000? Slik metodikk vil være viktig i vurdering av GMOens evne til spredning, etablering og overlevelsessevne i tillegg til å kunne påvise eventuelt antall hybrider mellom transgene og ikke-transgene individer. I tillegg vil slik type påvisning være viktig for å kunne anslå forholdet mellom genmodifisert/ ikke-genmodifisert materiale i forsøkinger av grønnsaker og frukt i tillegg til at prosentandelen i mer eller mindre sammensatt mat og landbruksprodukter kan bestemmes.

Utgangspunktet for de fleste metodene for påvisning av genmodifisert materiale er at informasjon om hva som er satt inn i organismen er tilgjengelig. Den type informasjon det her er snakk om er foreløpig forholdsvis lett tilgjengelig, men med forventet økning i antall og typer genmodifiserte organismer kan denne informasjonen bli vanskelig å ha full oversikt over. Et krav fra forvaltningsmyndighetene til instansen ansvarlig for produksjon eller markedsføring av slik type organismer, bør derfor være at slik type informasjon i framtiden også er tilgjengelig. Informasjon det her er tenkt på er hvilke genetiske elementer som er satt inn i organismen og om de er aktive i organismen eller ikke, hvordan disse elementene er organisert i organismen (kopitall hvis mulig) og i forhold til hverandre, informasjon om DNA-sekvenssammensetning i det genetiske materialet som er satt inn. For å lette arbeidsbyrden for myndigheten ansvarlig for påvisning, bør også standardisert metode for hver enkelt påvisning, f.eks. DNA-sekvens på primere, betingelser for reaksjonsoppsett i tilfelle med påvisning vha. PCR-teknikken. Jeg foreslår opprettelse av databaser for slik type informasjon hvor forskningsinstitusjoner eller andre med interesse for feltet kan få den informasjonen de trenger.

12 Litteratur

- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach. 1996. § 35 LMBG, L 24.01-1BgVV.
- An, G., Watson, B.D., Stachel, S., Gordon, M.P. & Nester, E.W. 1985. New cloning vehicles for transformation of higher plants. - EMBO J. 4: 277-284.
- Arthur, 1998. Test to spot genetically modified food. - The Independent 7nd juni.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B., Schaller, H. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene, 19: 327-336.
- Bergelson, J., Purrington, C.B. & Wichmann, G. 1998. Promiscuity in transgenic plants. - Nature 395: 25.
- Bones, A. M., Honne, B.I., Nielsen, K.M., Visvalingam, S., Ponnampalam, S., Winge, P. & Tangstad, O.P. 1997. Performance of transgenic plants of potato (*Solanum tuberosum* cv. Laila) grown in vitro, in greenhouse and in a field trial. - Acta Agric. Scand., Sect. B. Soil and Plant Sci. 47: 156-167.
- Brookes, M. 1998. Living in a GM world - Running wild - Some plants just can't keep their genes to themselves. But does it really matter? - New Scientist, 31st October: 38-41.
- Buchanan-Wollaston, V., Passiatore, J.E. & Cannon, F. 1987. The mob and oriT mobilization functions of a bacterial plasmid promote its transfer to plants. - Nature 328: 172-175.
- Carrino, J.J. & Lee, H.H. 1995. Nucleic acid amplification methods. - J. Microbiol. Methods, 23: 3-20.
- Coates, C., Jasinskiene, N., Miyashiro, L. & James, A. 1998. Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3748-3751.
- Davies, K.E. 1998. Genome analysis - A practical approach, IRL Press, Oxford, England.
- Georghiou, G.P. 1990. Overview of insecticide resistance. Green M.B. et al. (ed.). Managing resistance to agrochemicals: from fundamental research to practical strategies. Washington DC: - American Chemical Society. 18-41.
- Greene, A.E. & Allison, R.F. 1994. Recombination between viral and transgenic plant transcripts. - Science 263: 1423-1425.
- Hellebrand, M., Nagy, M. & Mörsel, J-T. 1998. Determination of DNA traces in rapeseed oil. Z. Lebensm. - Unters. Forsch. A. 206: 237-242.
- Hemmer, W. 1997. Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. BATS - Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss National Science Foundation.
- Hindar, K., Jonsson, N. & Agaard, K. 1992. Genmodifiserte organismer i biologisk kontroll av insekter og andre virvelløse dyr. - NINA utredning 37: 1-24.
- Hodgson, J. 1997. Euro indecision triggers food anarchy. - Nat. Biotch. 15: 1331.
- Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K. & Engel, K-H. 1997. Detection of genetically modified insect-resistant Bt maize by means of polymerase chain reaction. - Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. 205: 442-445.
- Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K. & Engel, K-H. 1998. Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. - Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. 206: 203-207.
- Jasinskiene, N., Coates, C., Benedict, M., Cornel, A., Rafferty, C., James, A. & Collins, F. 1998. Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the Hermes element from the fruit fly. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3743-3747.
- Kareiva, P., Morris, W. & Jacobi, C.M. 1994. Studying and managing the risk of cross fertilisation between transgenic crops and wild relatives. - Mol. Ecol. 3: 15-21.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M. & McPherson, J. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. - Science, 236: 1299-1302.
- Kirchhof, G., Eckert, B., Ruth, B. & Hartmann, A. 1996. Bodenmikrobiologische Untersuchungen zum Anbau von Glufosinat-resistenten transgenen Mais- und Rapspflanzen. Poster ved: Transgenic plants - from Lab to the Field; 3. - GPZ-Tagung, 28-29. Februar 1996 i Köln; ISSN 0723-7812, Votr. Pflanzenzüchtg. 32: 61-63.
- Kjellson, G., Simonsen, V. & Ammann, K. 1997. Methods for risk assessment of transgenic plants. II. Pollination, gene-transfer and population impacts. Birkhäuser Verlag, Basel, Sveits.
- Köppel, E., Stadler, M., Lüthy, J. & Hübner, P. 1997. Sensitive Nachweismethode für die gentechnisch veränderte Sojabohne "Roundup Ready™", Mitt. Gebiete Lebensm. - Hyg. 88: 164-175.
- Krebs, C.J. 1989. Ecological methodology. - Harper Collins Publisher, New York, USA
- Kvaløy, K. 1997. Overvåking av genmodifiserte planter og dyr. - NINA Oppdragsmelding 476: 1-41.
- Kvaløy, K., Klemsdal, S.S., Eklo, O.M., Netland, J., Schanke, T. & Tømmerås, B.Å. 1998. Konsekvenser ved bruk av herbicidresistente genmodifiserte jordbruksplanter. - NINA Oppdragsmelding 536: 1-62.
- Lecoq, H., Ravelonandro, M., Wipf-Scheibel, C., Monsion, M., Raccach, B. & Dunez, J. 1993. Aphid transmission of an aphid nontransmissible strain of zucchini yellow mosaic potyvirus from transgenic plants expressing the capsid protein of plum pox potyvirus. - Mol. Plant. Microb. Interact. 6: 403-406.
- Lesser, T.D., Boye, M & Hendriksen, N.B. 1995. Survival and activity of *Pseudomonas* sp. Strain B13 (FR1) in a marine microcosm determined by quantitative PCR and an rRNA-targeting probe and its effect on the indigenous bacterioplankton. - Appl. Environ. Microbiol. 61: 1201-1207.
- Loukeris, T.G., Livadaras, I., Area, B., Zabalou, S. & Savakis, C. 1995. Gene transfer into the medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable element. Science 270: 2002-2005.

- Maliga, P. 1993. Towards plastid transformation in flowering plants. - *Trends Biotechnol.* 11: 101-107.
- Marshall, A. 1998. The insects are coming. - *Nature Biotechnology* 16: 530-533.
- McBride, K.E. & Summerfelt, K.R. 1990. Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. - *Plant. Mol. Biol.* 14: 269-276.
- McBride, K.E. et al. 1995. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. - *Biotechnology* 13: 362-365.
- Meyer, R. 1995. Detection of genetically engineered plants by polymerase chain reaction (PCR) using the Flavr Savr tomato as an example. *Z Lebensm Unters Forsch (GERMANY)*, 201:583-6 IS.
- Meyer, R., Chardonnes, F., Hübner, F. & Lüthy, J. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: Detection of soya in processed meat products. - *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 203: 339-344.
- Meyer, R. & Jaccaud, E. 1997. Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of Glyphosate-Tolerant Soybeans. I "Authenticity and Adulteration of Food – the Analytical Approach." - *Proceedings of Euro Food Chem IX, Swiss Society of Food and Environmental Chemistry, FECS-Event No. 220.*
- Müller, M. 1997. Gentechnisch veränderte pflanzliche Lebensmittel. - *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 45: 28-31.
- Müller, N., Zimmermann, V., Henrich, B. & Gottstein, B. 1996. Diagnosis of *Neospora canium* and *Toxoplasma gondii* by PCR and DNA-Hybridization Immunoassay. - *J. Clin. Microbiol.* 34: 2850-2852.
- Osenberg, C.W. & Schmitt, R.J. 1996. Detecting ecological impact caused by human activities. - *Academic Press, Inc. USA.*
- Pietch, K. & Waiblinger, H.U. 1996. Nachweis "gentechnisch veränderter" Lebensmittel. - *Poster, Internationaler Lebensmittelchemikertag 1996, Freiburg im Breisgau, 23-25, 23-25.*
- Potrykus, I. & Spangenberg, G. 1995. *Gene Transfer to Plants*-Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Tyskland, ISBN 3-540 58406-4.
- Prydz, H. & Kolstø, A-B. 1994. Deteksjon av genspredning ved hjelp av PCR-teknikken. - *DN-utredning*
- Queller, D.C., Strassman, J.E. & Hughes, C.R. 1993. Microsatellites and kinship. - *Trends Ecol. Evol.* 8: 85-288.
- Rogers, H.P. 1996. Monitoring releases of transgenic plants: Theoretical and practical considerations. - *BCPC symposium proceedings No. 65: Diagnostics in crop production.*
- Roush, R.T. & McKenzie, J.A. 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. - *Ann. Rev. Entomol.* 32: 361-380.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1987. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition. - Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA.
- Sanders, P.R., Winter, J.A., Barnason, A.R., Rogers, S.G. & Fraley, R.T. 1987. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. - *Nucleic Acids Research*, 15: 1543-1558.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. - *J. Mol. Biol.* 98: 503.
- Steinberg, D. 1997. Firms sleuth out transgenic foods. - *Nat. Biotech.* 15: 1331-1332.
- Tomlinson, N. 1998. The EC novel foods regulation: A UK perspective. - *Food Additives and Contaminants* 15: 1-9.
- Van Duijn, G., Helsing, M. & Van Der Kamp, J.W. 1997. Identification of transgenic plants in foods. - *Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France*: 83: 153-157.
- Winding, A., Kvaløy, K., Hendriksen, N.B., Gustafsson, K., Iversen, T-G., Helgsason, E. & Kolstø, A-B. 1997. Procedures for risk identification and assessment of genetically modified microorganisms. - *NordTest Project report.*
- Wurz, A. & Willmund, R. 1997. Identification of transgenic glyphosate-resistant soybeans. - s. 115-117 i Schreiber, G.A., Bögl, K.W., ed. *Foods produced by means of genetic engineering. 2nd Status Report.* Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. - Bg VV-Heft 1/1997.

13 Ordforklaringer

Antisense – En nukleotidsekvens (RNA eller DNA) som er komplementær til en gitt mRNA og kan blokkere denne for avlesning til dannelse av protein.

APHIS – Animal and Plant Health Inspection Service

Biotinylert – Et molekyl hvor et biotinmolekyl er heftet på kalles biotinylert. Dette er en form for merking hvor biotinmolekylet f.eks. kan bindes til streptavidin festet på magnetiske kuler for at merkede enkeltrådede DNA-molekyler kan skilles fra ikke-merkede.

Derivater – noe som er avledet fra noe annet som da er det opprinnelige.

DNA – deoksynukleinsyre – Den bestanddel av kromosomene som bærer arveanlegg.

DNase – Enzym som bryter ned DNA.

Enzym – Et protein som oppfører seg som en katalysator i et biologisk system.

FDA – Food and Drug Administration.

Fenotype – Observerte egenskaper til en organisme.

“Fingerprint” mønster – Et mønster som framkommer ved gelelektroforese av fragmenter (enten protein eller DNA).

Funksjonelt gen – Et gen som koder for et protein med funksjon i cella.

Gel – Geléaktig substans som brukes til separasjon av ulike molekyler (DNA, proteiner).

Gelelektroforese – En teknikk hvor molekyler separeres vha en gel ved at molekylene har ulik mobilitet i et elektrisk felt.

Genom – Det genetiske innholdet i et komplett (haploid) kromosomsett.

Genuttrykk – Utrykk av et gen gjennom dannelse av et protein.

GMO – Genmodifisert organisme.

GMP – Genmodifisert plante.

Herbicider - Ugrasmiddel.

Horisontal genoverføring – Ikke-seksuell bevegelse av gener mellom voksne individer.

Hybridisering – Seksuell reproduksjon mellom individer som tilhører forskjellige arter, eller paring av RNA og DNA-tråder som er helt eller delvis komplementære

Hybridiseringsprober – Prober som brukes ved hybridisering til komplementære RNA eller

Kodende område – Et område av DNAet som ved avlesning kan gi opphav til dannelse av protein.

Komplementær – I DNA sammenheng er to nukleinsyrer komplementære når A i den ene tråden svarer til T i den andre tråden, og tilsvarende G i den ene til C i den andre.

Konstitutiv – I denne sammenheng ofte brukt om et gen som uttrykkes i alle celler og ikke bare i celler som er spesifikt differensiert.

Konstrukter – Brukes her ofte om genetiske elementer eller vektormolekyler som er satt sammen ved genmanipulering som da har spesielle genetiske egenskaper som kan tilføres en organisme.

“Nested” PCR – En PCR-reaksjon som settes opp med produktet av en annen PCR-reaksjon som templat.

Nukleotid – Byggesten i DNA eller RNA.

PCR- polymerase chain reaction – Metode for å oppformere spesifikke, korte områder av DNA ved bruk av en varmestabil polymerase. Når mange kopier av et DNA-fragment av interesse er produsert, kan det analyseres ved andre teknikker som f.eks. gelelektroforese.

Primer – Kjede av nukleotider med sekvens komplementær til et bestemt område av DNA-templaten. Primeren er ofte framstilt syntetisk.

Primerdimer – To primere som sitter sammen.

Primer-sett – Et sett av primere som er komplementær til motsatt DNA-tråd og som festes til DNA-templaten slik at de under gitte reaksjonsbetingelser kan gi dannelse av et PCR-produkt.

Probe – Fragment av DNA med kjent opprinnelsessted i genomet og/eller kjent DNA-sekvens. Anvendes til å oppdage/påvise komplementære sekvenser i blanding av DNA-molekyler.

Promoter – Den sekvensen i DNA-molekylet som gjør at RNA-polymerasen kan gjenkjenne hvor et gen starter.

Regulator gen – Et gen som regulerer en gitt prosess.

“Reporter” gen – Ofte brukt om et gen som er satt i et konstrukt som ved fusjon til et annet gen av interesse kan si om dette er tilsetede og i hvor mengde det uttrykkes.

Restriksjonsenzym/endonukleaser – En endonuklease som gjenkjenner spesifikke nukleotidsekvenser i DNA og så foretar et dobbeltrådkutt i DNA-molekylet.

Southern blotting – Teknikk hvor DNA overføres fra agarosegel til en membran hvor DNAet kan hybridisere til komplementært DNA.

Strukturelt gen – Et gen som koder for et protein som har en strukturell rolle i cella,

Templat – DNAet i en enkeltråd som fungerer som en mal for dannelse av komplementærtråden, eller for et RNA-molekyl,

Terminator – Et genetisk element som er satt inn i den transgene organismen for å terminere transkripsjon (avlesning) av transgenet,

Transgen – Gen fra en forskjellig organisme eller et kunstig konstruert gen som tilføres en annen organisme ved genteknologiske metoder,

USDA - US Department of Agriculture.

VBNC – “Viable but non-culturable” – brukes om bakterier som lever, men ikke kan kultiveres

Vektor – Plasmid, kosmid, bakteriofag, virus etc. som anvendes for å overføre stedfremmed DNA til en vertsorganisme.

Vektor-sekvens – DNA eller RNA-sekvens i en vektor.

Viruskappe – Ytre “kapsel” av proteiner rundt en nukleinsyrekerne av et virus.

Western blotting – Teknikk hvor proteiner overføres fra gel til membran hvor de kan gjenkjennes av reagenser (ofte antistoffer) spesifikke for spesielle aminosyresekvenser.

14 Appendix

PCR - Polymerase chain reaction (Sambrook et al. 1989)

Ved metoden amplifiseres en spesifikk del av DNA som så kan belyse komposisjonen av et spesifikt gen eller et område av genomet. I metoden brukes spesifikke syntetiske primere som under bestemte betingelser bindes til homologe DNA-sekvenser på en komplementær DNA-tråd. Prosedyren er en trinnvis prosess som omfatter denaturering av den dobbelte DNA-tråden, festing av primer og syntese av DNA. Trinnene gjentas og resultatet er amplifisering av spesifikke DNA-fragmenter som kan analyseres ved gelelektroforese og visualiseres ved etidium bromid. Det amplifiserte DNA-fragmentet kan analyseres videre ved f.eks. sekvensering og kan brukes ved *in situ* hybridisering av kromosomer for bruk i koblingsanalyse (Davies, 1988), for analyse av restriksjonssteder eller ved identifikasjon av innsatt DNA i en genmodifisert organisme.

Ulempe ved metoden i de fleste sammenhenger, er at kjennskap til deler av nukleinsyre-sekvensen er nødvendig for konstruksjon av primer, og dette er den mest tidkrevende delen av prosedyren. For å oppnå spesifikk binding av primere må ofte reaksjonen optimaliseres på forhånd. Fordeler ved prosedyren er at veldig små mengder DNA kreves og at spesifikke områder av det genetiske materialet kan analyseres. I tillegg, kan den utstrakte automatikken i amplifikasjonsprosedyren gjør at mange prøver kan studeres på kort tid.

Southern blot analyse (Southern, 1975)

Metoden er en kombinasjon av elektroforese, separasjon av DNA-molekyler på en gel, og overføring av DNA-molekylene fra gelen til en membran. Merkede DNA-molekyler blir så tilført membranen og eventuell binding til komplementære DNA-molekyler bundet til membranen visualiseres. Formålet kan være både å finne ut om et spesifikt DNA-molekyl eller en spesifikk DNA-sammensetning er tilstede i en prøve som ønskes analysert eller hvor stort dette DNA-fragmentet/molekylet er.

Western blot (Sambrook et al. 1989)

Metoden er en kombinasjon av elektroforese, separasjon av proteiner på en gel, og overføring av proteinene fra gel til en membran. Overføringen fra gel til membran er en elektroforetisk overføringsprosess som tvinger proteinene ut av gelen og over på membranen. Spesifikke antistoff blir så tilført membranen og antigen-antistoff kompleks visualisert enten ved å tilføre spesifikke antistoff bundet til konjugative enzymer som utvikler farge etter tilføring av enzym-spesifikt substrat, eller ved tilsetning av radioaktive proteiner med høy affinitet mot antistoff-antigen komplekset.

Denne metoden gir mulighet for gjenkjenning av ulike alleformer av antigenet. Flere prøver kan analyseres per dag.

Ulempene er de samme som ved immuno-assay, som f.eks. at spesifikt antistoff må lages på forhånd.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Davies, 1988)

RFLP brukes til analyse av struktur og komposisjon av DNA i organismer. Metoden baseres på ekstrahert DNA som er kuttet av base-spesifikke restriksjonsendonukleaser. DNA-fragmentene separeres i et elektrisk felt og gjenkjennes, etter overføring til membran, ved bruk av spesifikke DNA- eller RNA-prober; i dette tilfelle kalles prosedyren Southern blotting. Hvis RNA-fragmenter separeres og visualiseres ved bruk av DNA- eller RNA-prober, kalles prosedyren Northern blotting. Et DNA- eller RNA- "fingerprint" er den visualiserte DNA- eller RNA-profilen dokumentert ved fotografisk film. Metoden kan brukes i kombinasjon med PCR.

Ulempen ved metoden er at ganske store mengder DNA kreves (5-10 µg for hver prøve for hver restriksjonsendonuklease) En annen ulempe ved metoden er at restriksjonsenzymer som gjenkjenner polymorfismer, er begrenset og at variasjon bare detekteres ved disse restriksjonssetene. Fordelene ved metoden er at det genetiske materialet analyseres direkte i motsetning til enkelte av metodene nevnt ovenfor hvor bare genproduktet analyseres. Metoden kan brukes for detektering av innsatt DNA i genmodifiserte organismer.

Størrelsesmarkører**Bakteriofag λ HindIII**

| Fragmenter: | Basepar: |
|-------------|----------|
| 1 | 23130 |
| 2 | 9416 |
| 3 | 6557 |
| 4 | 4361 |
| 5 | 2322 |
| 6 | 2027 |
| 7 | 564 |
| 8 | 125 |

Bakteriofag λ PstI

| Fragmenter: | Basepar: | Fragmenter: | Basepar: |
|-------------|----------|-------------|----------|
| 1 | 14057 | 15 | 468 |
| 2 | 5077 | 16 | 448 |
| 3 | 4749 | 17 | 339 |
| 4 | 4507 | 18 | 264 |
| 5 | 2838 | 19 | 247 |
| 6 | 2459 | 20 | 216 |
| 7 | 2443 | 21 | 211 |
| 8 | 2140 | 22 | 206 |
| 9 | 1986 | 23 | 164 |
| 10 | 1700 | 24 | 150 |
| 11 | 1159 | 25 | 94 |
| 12 | 1093 | 26 | 87 |
| 13 | 775 | 27 | 72 |
| 14 | 514 | 28 | 15 |

123 bp ladder

| Fragmenter: | Basepar: | Fragmenter: | Basepar: |
|-------------|----------|-------------|----------|
| 1 | 4182 | 18 | 2091 |
| 2 | 4059 | 19 | 1968 |
| 3 | 3936 | 20 | 1845 |
| 4 | 3813 | 21 | 1722 |
| 5 | 3690 | 22 | 1599 |
| 6 | 3567 | 23 | 1476 |
| 7 | 3444 | 24 | 1353 |
| 8 | 3321 | 25 | 1230 |
| 9 | 3198 | 26 | 1107 |
| 10 | 3075 | 27 | 984 |
| 11 | 2952 | 28 | 861 |
| 12 | 2829 | 29 | 738 |
| 13 | 2706 | 30 | 615 |
| 14 | 2583 | 31 | 492 |
| 15 | 2460 | 32 | 369 |
| 16 | 2337 | 33 | 246 |
| 17 | 2214 | 34 | 123 |

ISSN 0802-4103
ISBN 82-426-0999-3

574

NINA
OPPDRAGS-
MELDING

NINA Hovedkontor
Tungasletta 2
7005 TRONDHEIM
Telefon: 73 80 14 00
Telefax: 73 80 14 01

NINA
Norsk institutt
for naturforskning