Archive of SID

J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 32, pp. 35-42, 2005

مجله علوم و فنون هسته‌ای
شماره ۳۲، صفحات ۴۲-۳۵، ۱۳۸۳

بررسی دنبالهٔ DNA با روش SCGE در نمونه‌های مرغ و میگوی پرتودیده

رسا رجایی*، سیده لیلا حسینی
مرکز تابش گاما، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۳۴۸۶ - ۱۱۳۶۵، تهران - ایران

چکیده: DNA یاخته‌های مواد غذایی در اثر پرتودهی گاما شکسته می‌شوند. این شکستگی را می‌توان با روش الکتروفورز یاختهٔ منفرد مورد شناسایی قرار داد. ویژگی این روش، سادگی و مقرون به صرفه بودن آن برای شناسایی سریع موادغذایی پرتودیدهٔ یاخته‌دار می‌باشد. در این کار پژوهشی، نمونه‌های گوشت مرغ و میگو به وسیلهٔ کبالت ۶۰ پرتودهی شده‌اند. دُزهای بکار رفته در نمونه‌های مرغ ۲، ۵ و ۷ کیلوگری و در نمونهٔ میگو ۳ و ۷ کیلوگری بوده است. پس از پرتودهی، نمونه‌های پرتودیده با نمونهٔ کنترل (پرتوندیده) مقایسه شده‌اند. علاوه بر این اثرهای مدّت نگهداری و دما فقط بر روی نمونه‌ها ی مرغ مورد بررسی قرارگرفته‌اند. نتایج بدست آمده از آزمایشهای مکرّر نشان داده‌اند که در دُزهای متفاوت، حتی در دُزهای ضعیف، تشخیص نمونه‌های پرتودیده از نمونهٔ کنترل به وسیلهٔ این روش به سهولت امکان‌پذیر است. همچنین هرگونه تغییر، از جمله دما که باعث شکستگی DNA می‌شود با این روش نیز قابل بررسی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *مرغ، میگو، پرتودهی، کبالت ۶۰، دُز پرتودهی، سنجش دنباله DNA الکتروفورز یاختهٔ منفرد*

Use of SCGE Method for Detection of DNA Comet in Irradiated Samples of Poultry and Shrimp

R. Rajaie*, S.L. Hosseini
Gamma Irradiation Center, AEOI, P.O. Box: 11365-3486, Tehran - Iran

Abstract: DNA in food may sustain damage by gamma irradiation. This damage can be detected by a sensitive technique, called single cell gel electrophoresis. This is a simple and low-cost technique for rapid screening of the cells of irradiated foodstuffs. For this purpose, poultry and shrimp samples were irradiated by the ^{60}Co gamma radiation. The radiation doses for poultry were 2, 5 and 7 kGy and for shrimp were 3 and 7 kGy, respectively. The irradiated samples were compared with those of unirradiated types (control). In addition, the effects of shelf-life and temperature were considered on the poultry samples only. We have found that this technique is easily applicable for identification of irradiated from unirradiated samples and it is found to be irrespective of the applied dose. It is worth mentioning that any DNA change arising from any source, for example temperature fluctuation, may be detected by the SCGE technique.

Keywords: *poultry, shrimp, irradiation, cobalt 60, radiation dose, DNA comet assay, single cell gel electrophoresis*

*e-mail: rsrajaei@aeoi.org.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۲/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۳/۳/۱۲

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

امروزه در بسیاری از کشورها، برای افزودن مدّت نگهداری مواد غذایی و جلوگیری کردن از فساد یا کاستن آنها، از پرتوهای یون‌ساز استفاده می‌شود. هرچند مواد غذایی پرتودیده مطمئن و بی‌خطر به نظر می‌رسند، ولی مصرف‌کننده حق انتخاب آزادانهٔ مادّهٔ غذایی پرتودیده یا پرتوندیده را خواهد داشت [۱ تا ۳].

روشهای متعدّد فیزیکی، زیست‌شناختی و بیوشیمیایی برای شناسایی موادغذایی پرتودیده پیشنهاد شده است. یکی از روش‌های بیوشیمیایی که بر اساس شناخت شکستن مولکول DNA می‌باشد، به دلیل سهولت عمل و کم‌هزینه بودن، توجّه بسیاری از محقّقان را به خود جلب کرده است [٤]. در این روش، با استفاده از عمل الکتروفورز یاختهٔ منفرد (SCGE)[۱] یاخته‌هایی را که پرتودهی شده‌اند، می‌توان شناخت. به عبارت دیگر، پرتو وارد شده به یاخته باعث شکسته شدن مولکولهایی از جمله DNA که دارای بار منفی است می‌شود. بنابراین، در میدان الکتریکی (دستگاه الکتروفورز) مولکولهای DNA به طرف قطب مثبت (آند) دستگاه کشیده می‌شوند و بسته به میزان شکستگی، دنباله‌ای را تشکیل می‌دهند که "دنبالهٔ DNA"[۲] نامیده می‌شود. طول این دنباله، با اندازهٔ شکستگی DNA و در نتیجه با مقدار انرژی (پرتو) وارد شده به یاخته، نسبت مستقیم دارد [٥ و ٦].

برای سنجش دنبالهٔ DNA از دو روش خنثی و قلیایی استفاده میشود[۷ تا ۱۰]. در روش خنثی، که pH محیط در حدّ خنثی است، هرگونه شکست که در رشتهٔ دوگانهٔ DNA[۳] ایجاد شود، قابل شناسایی است؛ در صورتیکه در روش قلیایی که pH محیط قلیایی است، روش، علاوه بر این شناسایی، قادر است که شکستگی را حتّی در رشتهٔ منفرد DNA[٤] مشخّص کند. در نتیجه، نسبت به روش خنثی ازحساسیت بیشتری برخوردار است [۸ و ۱۱].

در این آزمایشها سعی شده است با روش SCGE، دنبالهٔ DNA در یاخته‌های پرتودیدهٔ مرغ و میگو، با روش خنثی شناسایی شود و تأثیر دما و مدّت نگهداری در انبار صرفاً روی نمونه‌های مرغ (کنترل و پرتودیده) مورد بررسی قرار گیرد.

۲- روش کار

مرغ تازه برای هر نوبت پرتودهی و آزمایش از فروشگاه تعاونی صدا و سیما خیابان شهید مطهری و میگوی زنده با نام تجاری ببر سبز و نام علمی *Penaeus semisulcatus* از مرکز تحقیقات شیلات بوشهر تهیّه و مواد شیمیایی لازم، از شرکتهای Merck و Pharmacia خریداری شدند. همچنین از دستگاه الکتروفورز Submarine دست ساخت مرکز تابش گاما و برای پرتودهی نمونه‌ها از کبالت ٦۰ (Gammacell 220) استفاده شد.

دُزهای انتخابی که در اغلب کشورهای جهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند، برای گوشت سینهٔ مرغ صفر، ۲، ٥ و۷ کیلوگری و برای تمامی گوشت میگو صفر، ۳ و۷ کیلوگری بوده است [۱۲ و ۱۳].

- ***آماده‌سازی نمونه:*** پس از پرتودهی نمونه، بلافاصله ۲ گرم از هر نمونه (کنترل و پرتودیده)، بدون مواد زائدی مانند پوست و چربی، جدا و به قطعات ریز خُرد و به آن ۲ میلی‌لیتر PBS[٥] با pH=۷/٤ اضافه شد. مخلوط حاصل به آرامی با پارچه تنزیب تمیز، صاف و برای رسوب دادن ذرّات بزرگ معلّق (سوسپانسیون) مدّتی در یخ نگهداری شد.

- ***آماده‌سازی میکروژل:*** تهیه میکروژل به روش خنثی به صورت سه لایه در سه مرحله انجام گرفته است:

لایه اوّل: برای بهتر چسبیدن ژل به شیشهٔ لام میکروسکوپ است. برای این منظور، لامهای تمیز را، در ۰/٥ ٪ آگارز دارای نقطهٔ ذوب نرمال، که در PBS حل شده بود، قرار داده و پس از خشک شدن در جای خشک و خنک بدور از غبار، نگهداری شدند. لامهایی که بدین صورت تهیه می‌شوند حتی تا چند ماه قابل استفاده‌اند.

لایهٔ دوم یا لایهٔ میانی: که لایهٔ اصلی کار بوده و حاوی نمونه است. این لایه شامل ۰/۸٪ آگارز با نقطهٔ ذوب پایین و محلول در PBS است که در دمایی حدود $38^{\circ}C$ به نسبت ۱ به ۱۰ با تعلیق یاخته‌ای کاملاً مخلوط شده است. مخلوط به صورت یکنواخت روی لایه اول ریخته شد و لامل به سرعت، به طوری که ژل حباب نگیرد، روی آن قرار گرفت

www.SID.ir

Archive of SID

و لامها به مدّت ۳۰ دقیقه، به منظور سفت شدن (به اصطلاح بستن ژل)، در یخچال نگهداری شدند. سپس برای تهیه لایهٔ سوم لامل‌ها برداشته شدند.

لایهٔ سوم یا لایهٔ آخر: تهیه این لایه همانند لایهٔ میانی، امّا بدون تعلیق یاخته‌ای است. بنابراین لام، شامل سه لایه است که به دلیل طرز قرارگرفتن لایه‌ها به مدل "ساندویچ" معروف است [۱۰ و ۱٤].

- ***فروکافتی یاخته‌ها:*** لامهای حاوی نمونه به طور کامل به مدّت ۱۵ دقیقه در محلول تثبیت‌کنندهٔ (بافر) فروکافت SDS-TBE (۲/۵ درصد SDS در TBE)، سپس در محلول الکتروفورز تازه و خنک TBE (pH=۸/٤، ۱mM EDTA، ٤۵ mM Tris-borate) به مدّت ۱۰- ۵ دقیقه قرار داده شدند [۱۰].

- ***الکتروفورز خنثی:*** لامها کنار هم در دستگاه افقی الکترفورز که با محلول تثبیت‌کنندهٔ تازه و خنک TBE پر شده بود، به مدّت ۲ دقیقه در پتانسیل ۲ V/cm الکتروفورز شدند [٤].

- ***تثبیت ژل:*** بعد از عمل الکترفورز، لامهای حاوی نمونه با یکی از دو روش زیر تثبیت شدند:
  - با محلول TCA، در مدّتی که برای رنگ‌آمیزی با نیترات نقره در نظر گرفته شد [۱۵]،
  - با متانول خالص، در موقعی که رنگ‌آمیزی فلورسنتی با اتیدیوم بروماید مورد نظر بود [۱٦].

- ***رنگ‌آمیزی ژل:***
  - در رنگ‌آمیزی با نیترات نقره[٦] مرحله به مرحله از روش Delincee (۱۹۹۵) استفاده شد [۱۵].
  - در رنگ‌آمیزی فلورسنتی، پس از تثبیت نمونه، ۱۰۰ µl محلول اتیدیوم بروماید (۲۰ µg/ml dH_2O) روی آن ریخته و پس از ۱۰ دقیقه با آب مقطر شسته شد. سپس لامها، برای بررسی با میکروسکوپ فلورسنت خشک و آماده شدند [۱٦].

- ***میکروسکوپی:*** در مورد لامهایی که رنگ‌آمیزی آنها با نیترات نقره بود، از میکروسکوپ نوری نیکون استفاده شد. یاخته‌ها در زیر میکروسکوپ، به رنگ قهوه‌ای ـ سیاه در زمینهٔ خاکستری روشن پدیدار بودند. در رنگ‌آمیزی فلورسنتی، از میکروسکوپ فلورسنت زایس که DNA و ضمایم مربوط به آن را به رنگ سرخ در زمینهٔ سیاه نشان می‌داد، استفاده شد.

- ***اندازه‌گیری مهاجرت DNA:*** در هر لام، ۱۰۰ یاخته بطور اتّفاقی انتخاب، و طول یاخته از رأس تا انتهای دنباله، با میکروسکوپ نوری نیکون اندازه‌گیری شد.

۲ـ۱ بررسی تأثیر دما و مدّت نگهداری بر دنبالهٔ DNA

چهار قطعه از گوشت تازهٔ سینه یک مرغ را جدا کرده و یکی را به عنوان شاهد (پرتوندیده) و سه قطعه را بعد از پرتودهی ۲، ۵ و ۷ کیلوگری، به مدّت یک هفته در دمای ٤ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری و با روش خنثی آماده‌سازی و الکتروفورز شدند و در آخر پس از تعیین نوع با نمونهٔ شاهد مقایسه شدند.

به همین ترتیب، یک رشته نمونهٔ مشابه، به مدّت ۳ ماه در دمای ۱۸- درجهٔ سانتی‌گراد درون فریزر نگهداری و پس از طیّ این مراحل با نمونهٔ کنترل مقایسه شدند.

۲ـ۲ سنجش دنبالهٔ DNA

در این سنجش، دسته‌بندی یاخته‌های کنترل و پرتودیده براساس شکل و اندازهٔ دنبالهٔ آنها انجام گرفته و در واقع مقدار کشیدگی (مهاجرت) دنبالهٔ DNA نشاندهندهٔ درجهٔ شکستگی و بزرگی آسیب‌دیدگی آن است. در جریان این کار، دنبالهٔ DNA به دو روش شناسایی و اندازه‌گیری شده است:

- طول یاخته یعنی فاصلهٔ رأس تا انتهای دنباله به وسیلهٔ چشمی میکروسکوپ، اندازه‌گیری و درجه‌بندی شده است [۱۷].

تعیین نوع یاخته و دسته‌بندی آن بر اساس شکل یاخته و مقدار کشیدگی دنبالهٔ DNA آن صورت گرفته است و چهار نوع را شامل می‌شود: ۱) یاخته‌هایی که شکل آنها تغییر نکرده و یا تغییر شکل آنها اندک است. ۲) دنباله از یک طرف یاخته بیرون زده

www.SID.ir

Archive of SID

است. ۳) کشیدگی دنباله که بطور واضح نمایان است. ٤) جدا بودن سر از دنباله و در بعضی موارد فاصله گرفتن آنها به وضوح مشاهده می‌شود [۱۷ و ۱۸].

۳ـ یافته‌ها و بحث

برای تعیین مقدار دُز و تشخیص نوع دنبالهٔ DNA در یاخته‌های نمونهٔ مرغ، اکثریت قریب به اتّفاقی که به لحاظ شکل و اندازه یکسان بودند در نظر گرفته شدند. در شکل ۱، حالت (a) نمونهٔ کنترل است که یاخته‌های پرتوندیده را بدون تغییر یا با دنبالهٔ بیضوی نشان می‌دهد. با توجّه به اینکه یاخته‌ها تحت عملهای متعدّد، از جمله همزدن در محلول تثبیت‌کننده، صاف‌کردن و جابجایی حرارتی قرار گرفته‌اند، وجود تعدادی دنباله بدیهی به نظر می‌رسد. درحالت (b) همان نمونهٔ مرغ نشان داده شده است که ۲ کیلوگری پرتو دیده و دنباله کشیده شده است. در حالت (c) با ۵ کیلوگری پرتوگیری، سر بسیار متراکم و دنباله کشیده‌تر شده، امّا هنوز به سر متصّل است. در ۷ کیلوگری پرتودهی (حالت d)، دنباله طویلتر و سر از دنباله تقریباً جدا شده است. از مقایسه تصاویر استنباط می‌شود که با افزایش مقدار دُز پرتودهی به نمونه‌ها، شکل سر و دنبالهٔ آنها تغییر می‌کند و این تغییرات در جهتی است که سر متمرکزتر و دنباله کشیده‌تر می‌شود. بنابراین چهار نوع دسته‌بندی پیش‌گفته در تعیین نوع یاخته منطبق برحالت‌های a، b، c و d است.

شکل ۲، حالتهای a، b و c را در مورد نمونهٔ میگو، به ترتیب با پرتودهی صفر، ۳ و ۷ کیلوگری نشان می‌دهد، با این تفاوت که، یاخته‌های میگو اندکی درشت تر از یاخته‌های مرغ هستند.

شکل ۳ نشان می‌دهد که در شرایط یکسان، افزایش طول مهاجرت DNA با افزودن مقدار دُز پرتودهی به نمونهٔ تازهٔ مرغ (اعم از کنترل یا پرتودیده) نسبت مستقیم داشته و حدود نشانه‌ها (بارها) نشاندهندهٔ انحراف از معیار[۷] است که در مقایسه با کنترل تفاوت چندانی ندارد.

از مقایسهٔ نمودارها در شکل ٤ مشاهده می‌شود که این نمودارها از پایین به بالا و از چپ به راست جابجایی دارند، و نزدیک بودن مقدار دُزها به هم نشان می‌دهد که این جابجایی تدریجاً صورت گرفته است. نمودار کنترل، معرّف یاخته‌های نوع ۱ و نمودارهای ۲، ۵ و ۷ کیلوگری به ترتیب معرّف یاخته‌های نوع ۲، ۳ و ٤ می‌باشند. بنابراین، اوّلاً هر نوع یاخته مشخصاً در دُز معیّنی بیشترین تعداد را دربردارد، ثانیاً در دُزهای بالاتر، مانند ۵ و ۷ کیلوگری، تعداد اندکی از یاخته‌های نوع یک بازهم وجود دارند و دلیل آن هم ممکن است یکسان نبودن تأثیر پرتو بر یاخته‌ها باشد. زیرا همراه با یاخته‌های عضلهٔ سینه مرغ، تعدادی از انواع یاخته‌های خونی هم وجود داردکه در جریان آزمایش در بافت باقی می ماند.

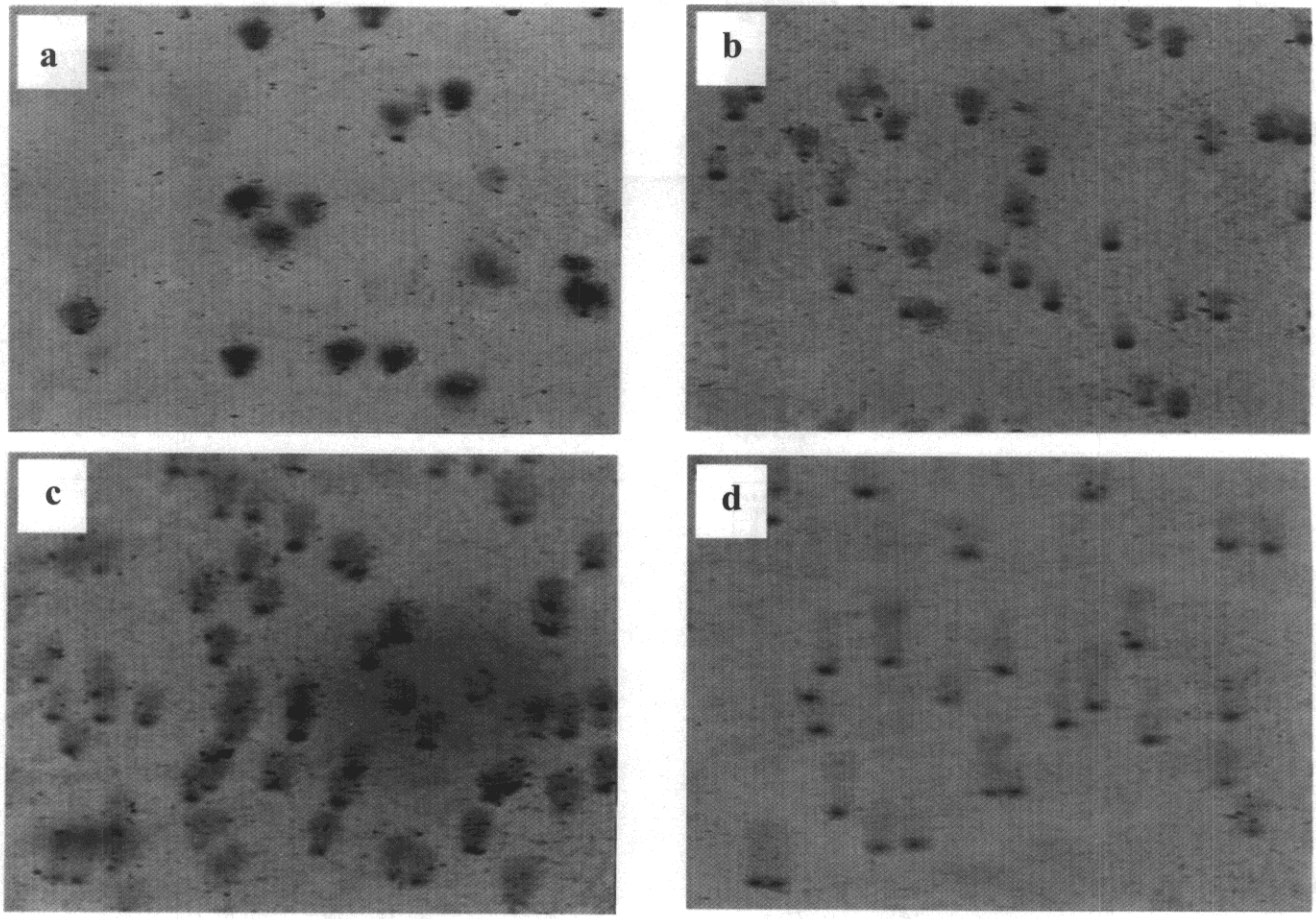
شکل ۵، مقایسهٔ افزایش طول مهاجرت DNA با افزایش دُز در نمونهٔ تازهٔ میگو (کنترل تا پرتودیده) را نشان می‌دهد.

شکل ٦، مقایسهٔ نمونهٔ گوشت تازهٔ مرغ و نمونهٔ نگهداری شده به مدّت یک هفته در یخچال را نشان می‌دهد. به علّت نابودی یاخته‌های پرتوندیده، مهاجرت DNA وجود نداشت ولی این مهاجرت در یاخته‌های نمونهٔ پرتودیده، که از بین نرفته بودند، دیده شد. نابودی یاخته‌های نمونهٔ کنترل ممکن است به علّت فعّال بودن سیستم خودکافت[۸] یاخته‌ای باشد که در دمای یخچال ($4\ ^{\circ}C$) همچنان فعّالیت خود را حفظ کرده بود. فعّالیت این سیستم در اثر پرتودهی کم می‌شود و با افزایش مقدار دُز بیشتر کاهش می‌یابد. امّا به طوری که شکل ۷ نشان می‌دهد، نمونهٔ نگهداری شده در فریزر در مقایسه با نمودار نمونهٔ تازهٔ مرغ، تفاوت قابل توجّهی مشاهده نمی‌شود و این ممکن است به علّت کاهش فعّالیت یاخته در دمای $-18\ ^{\circ}C$ باشد.

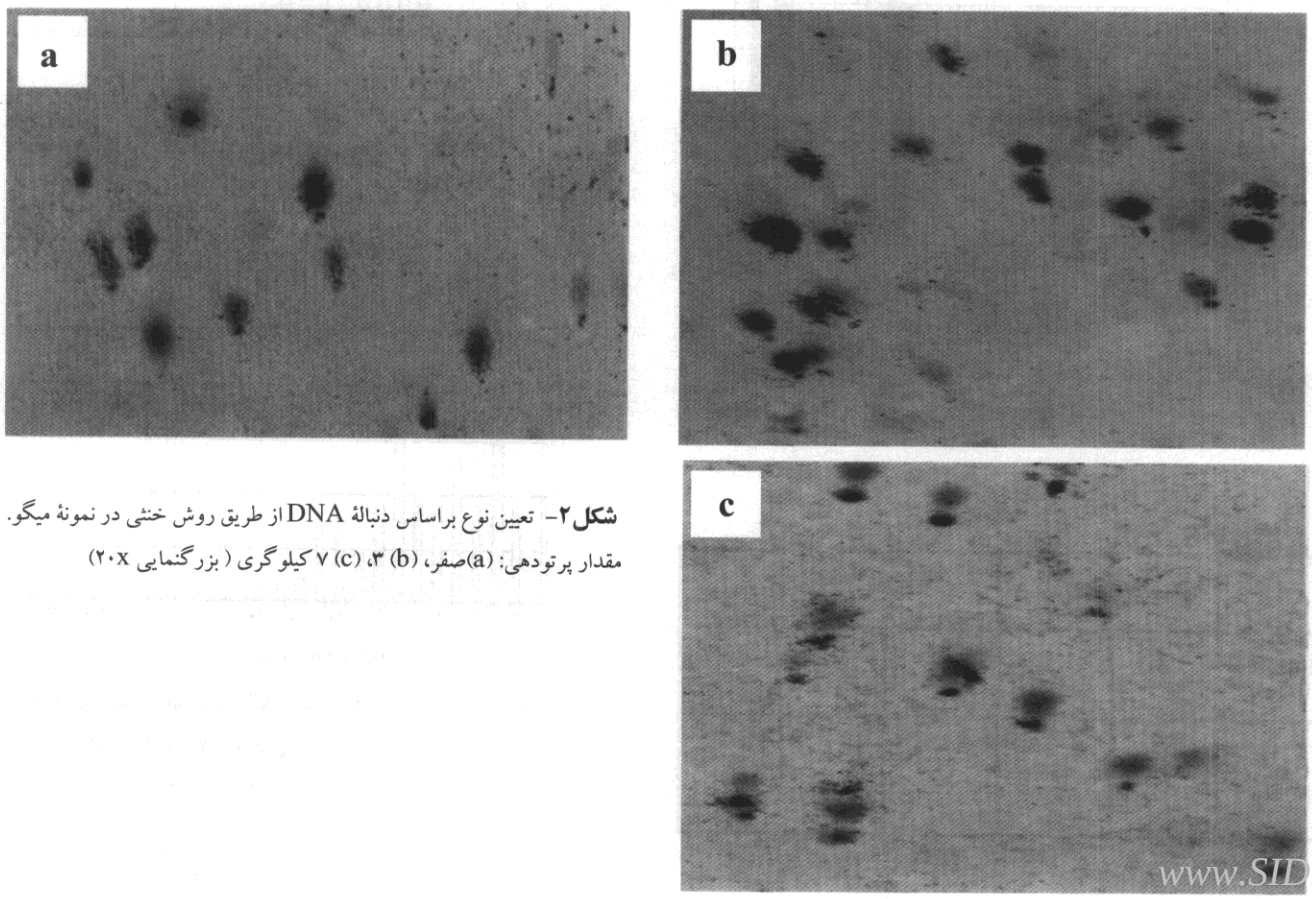
قابل ذکر است که در طی رنگ‌آمیزیهای متعدّد با نیترات نقره و اتیدیوم بromید، نتایج زیر حاصل شد: به طوری که جدول ۱ نشان می‌دهد، تهیه محلول و مراحل رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بromید بسیار کمتر از مراحل رنگ‌آمیزی با نیترات نقره است، در نتیجه لامها برای بررسی با میکروسکوپ سریعتر آماده می‌شوند. علاوه بر این، سرخ رنگ بودن یاخته‌ها و دنبالهٔ آنها وجه تمایز را در زمینهٔ تیره ژل بالا می‌برد. امّا رنگ‌آمیزی با نیترات نقره به دلیل قابل دسترس بودن میکروسکوپ نوری و کم خطر بودن این مادّه شیمیایی نسبت به اتیدیوم بromید و همچنین نگهداری طولانی مدّت لامها پس از رنگ‌آمیزی، در اولویت قرار دارد. شکلهای ۸ و ۹ نمونهٔ پرتوندیده مرغ را با دو نوع رنگ‌آمیزی نشان می‌دهند.

www.SID.ir

Archive of SID



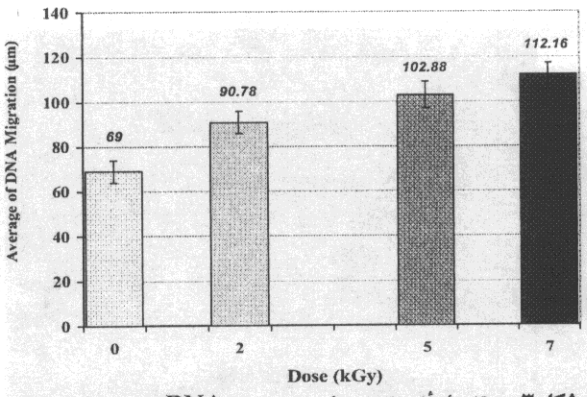
شکل ۱- تعیین نوع بر اساس دنبالهٔ DNA به روش خنثی در نمونهٔ مرغ. مقدار پرتودهی: (a)صفر، (b) ۲، (c) ۵، (d) ۷ کیلوگری (بزرگنمایی ۲۰x)



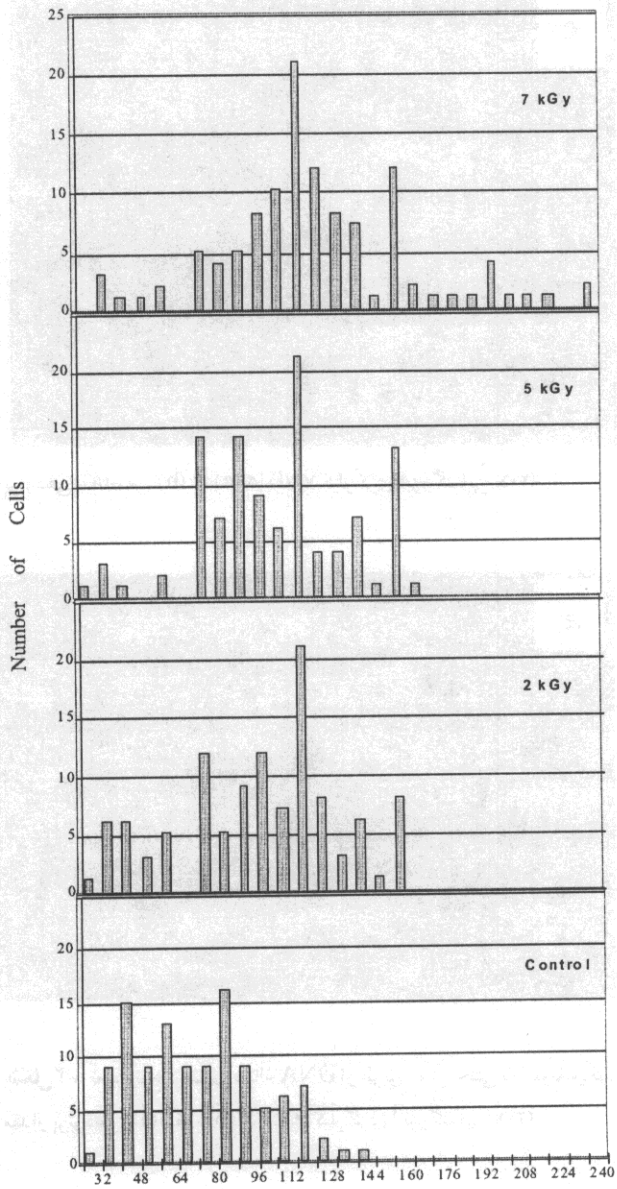
شکل ۲- تعیین نوع براساس دنبالهٔ DNA از طریق روش خنثی در نمونهٔ میگو. مقدار پرتودهی: (a)صفر، (b) ۳، (c) ۷ کیلوگری (بزرگنمایی ۲۰x)

www.SID.ir

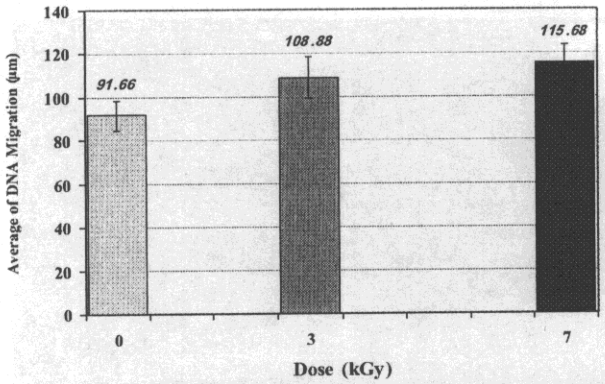
Archive of SID



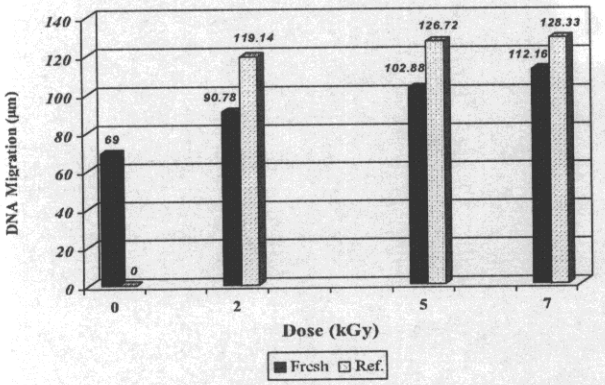
شکل۳- مقایسهٔ تأثیر افزایش دُز با مهاجرت DNA همراه با انحراف معیار در نمونهٔ مرغ تازه



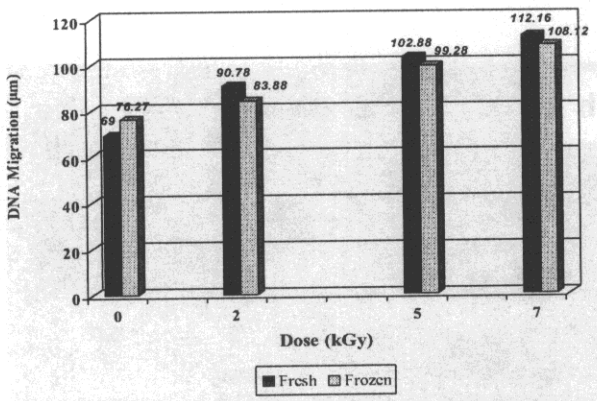
شکل٤- مقایسهٔ مهاجرت DNA در ٤٠٠ یاختهٔ نمونهٔ مرغ از دُز صفر (کنترل)، ۲، ۵ و ۷ کیلوگری



شکل۵- مقایسه تاثیرافزایش دز با مهاجرت DNA همراه با انحراف معیاردر نمونه میگو



شکل٦- مقایسه نمونه تازه گوشت مرغ و همان نمونه نگهداری شده در یخچال(٤ °C) پس از گذشت یک هفته



شکل۷- مقایسه نمونه تازه گوشت مرغ و همان نمونه نگهداری شده در فریزر (-۱۸ °C) پس از گذشت سه ماه

جدول۱- مقایسهٔ مراحل رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید و نیترات نقره

	# of Solution (s)	# of Staining Stages	Storage after Fixing	Storage after Staining	Contrast
Ethidium Bromide	1	1	+	–	Good
Silver Nitrate	3	4	+	+	Fair

www.SID.ir

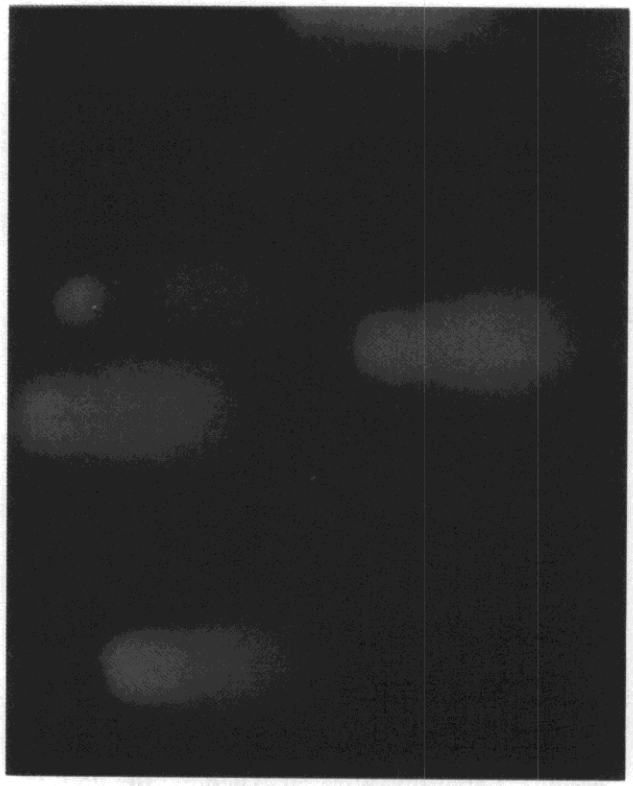
Archive of SID

٤ـ نتیجه‌گیری

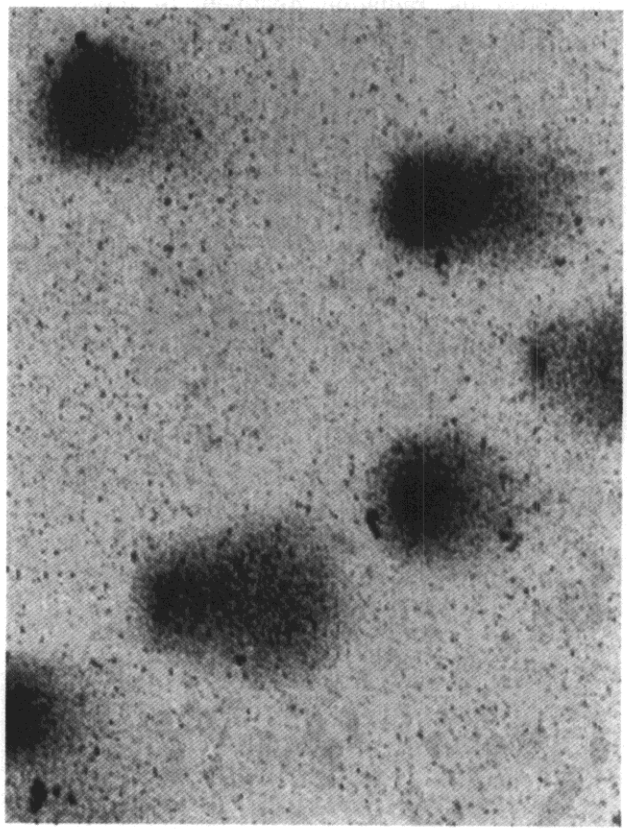
- «روش خنثی» بسیار ساده و در عین حال سریع است و می‌توان آن را از شروع کار که مرحلهٔ حاضرسازی است تا پایان آن که بررسی با میکروسکوپ است، در طی یک روز انجام داد.
- چون یاخته‌های کنترل (پرتوندیده) از شکل یکسانی تبعیت نمی‌کنند و ممکن است تمام حالات انواع ۱ تا ٤ را نشان دهند (به اصطلاح در حکم "موزاییک" هستند)، به آسانی می‌توان با «روش خنثی»، یاخته‌های پرتودیده را از کنترل جدا کرد. این حالت موزاییکی در نمونه‌های پرتودیده بسیار کمتر از نمونهٔ کنترل است و می‌توان بعنوان شاخص از آن در نمونه‌های پرتودیده استفاده کرد.
- نگهداری گوشت مرغ در دمای ۱۸- درجهٔ سانتی‌گراد (فریزر) باعث کاهش آسیب دیدن یاخته و در نتیجه افزایش دوام آن می‌شود. امّا نگهداری گوشت مرغ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد (در یخچال) به مدّت چند روز به علّت از بین رفتن یاخته‌ها توصیه نمی‌شود.
- در نتیجه روش SCGE نه تنها روش مناسبی برای شناسایی مواد غذایی پرتودیده است، بلکه هر نوع تنش وارد به یاخته مادّه غذایی، مانند تغییرات شدید دما، مدّت نگهداری در انبار و حتی تغییرات شیمیایی در محیط، که باعث شکستگی DNA آن شود، قابل بررسی است.

تشکر و قدردانی

از راهنماییهای جناب آقای دکتر مصطفی سهرابپور، ریاست محترم مرکز تابش گاما، و جناب آقای دکتر منوچهر قوجایی سرپرست محترم بخش پرتودهی مواد غذایی، و همکاران عزیز سرکارخانمها مهندس مرضیه سیحون، مهندس فرح خویلو، دکتر شهلا محمدی و دیگر همکاران گرامی آقایان علی‌اکبر سمیعی فرد، پرویز ایرانپور و مهندس پدرام آذرباد، که همواره در مراحل مختلف اجرای این پروژه تحقیقی هریک بنوعی یاریگر ما بودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.



شکل۸- رنگ‌آمیزی نمونهٔ کنترل مرغ با اتیدیوم بروماید به روش خنثی (بزرگنمایی 400x)



شکل۹- رنگ‌آمیزی نمونهٔ کنترل مرغ با نیترات نقره به روش خنثی (بزرگنمایی 400x)

www.SID.ir

پی‌نوشت‌ها:

۱- Single Cell Gel Electrophoresis

۲- DNA Comet

۳- DNA Double-Strand Breaks

٤- DNA Single-Strand Breaks

٥- Phosphate Buffered Saline, pH 7.4

٦- Silver staining

۷- Standard Deviation

۸- Autolysis

References:

1. H. Delincee, "Detection of food treated with ionizing radiation," Trends in Food Science and Technology, **9**, 73-82 (1998).

2. M. Miyahara, A. Saito, H. Ito, M. Toyoda, "Capability for identification of gamma irradiated bovine liver by new high sensivity comet assay," Biol.Pharm.Bull. **23 (12)**, 1399-1405 (2000).

3. G. Koppen, H. Cerda, "identification of low-dose irradiated seeds using the neutral comet assay," Lebensm.-Wiss. u.-Thenol. **30**, 452-457 (1997).

4. H. Delincee, "Rapid and simple screening tests to detect the radiation treatment of foods," Radiat. Phys. Chem. **46** (4-6), 677-680 (1995).

5. P.L. Olive, "DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology," Int. J. Radiat. Biol. **75** (4), 395-405 (1999).

6. P. L. Olive, D. Wlodek, J. P. Banath, "DNA double-strand breaks measured inindividual cells subjected to gel electrophoresis," Cancer Research **51**, 4671-4676 (1991).

7. P. L. Olive, D. Wlodek, R. E. Durand, J. P. Banath, "Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis," Experimental Cell Research **198**, 257-267 (1992).

8. S. Cotelle, J.F. Ferard, "Comet assay in genetic ecotoxicology: A rewiew," Environ. Molecul. Mutagen. **34**, 246-255 (1999).

9. A. R. Collins, V. L. Dobson, M. Dusinska, G. Kennedy, R. Stetina, " The comet assay: What can it really tell us?," Mutation Research, **375**, 183-193 (1997).

10. H. Cerda, H. Delincee, H. Haine, H. Rupp "The DNA comet assay as a rapid screening technique to control irradiated food," Mutation Research **375**, 167-181 (1997).

11. P. L. Olive, "The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation," Radiation Research **150**, S42-S51 (1998).

12. Codex Alimentarius, Volume XV, Rome (1984).

13. Food Irradiation Newsletter, Supplement (1995).

14. S. M. Piperakis, E. E. Visvardis, A. M. Tassiou, "Comet assay for nuclear DNA damage," Methods in Enzymology, **300**, 184-194 (1999).

15. H. Delincee, "Silver staining of DNA in the comet assay," Comet Newsletter (1995).

16. Comet Newsletter, Issue#6, April (1997).

17. N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, E. L. Schneider, "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells," Experimental Cell Research **175**, 184-191 (1988).

18. Z. Szot, T. Iwanenko, M. Kruszeweski, M. Wojewodzka, A. M. Dacewicz, "Effect of storage conditions and gamma irradiation of meat on DNA analyzed by comet assay," Nuclear Technologies and Methods, 105-107 (1999).

www.SID.ir