بنام خدا

بررسي دنباله DNA با استفاده از تكنيك SCGE در نمونه هاي مرغ و ميگو پرتوديده

رسا رجايي* (كارشناس ارشد بيولوژي) - **سيده ليلا حسيني** (كارشناس تغذيه)

بخش پرتودهي مواد غذايي، مركز تابش گاما، سازمان انرژي اتمي ايران، تهران

صندوق پستي ٣٤٨٦ - ١١٣٦٥

نوع مقاله: پژوهشي

* rsrajaei@aeoi.org.ir Fax: 8009054 Tel: 2724

چکیده: DNA سلولهاي مواد غذايي بوسيله پرتو گاما شکسته شده که اين شکستگي از طريق تکنيك حساسي به نام الکتروفورز يك سلول منفرد شناسايي ميگردد. براي اثبات اين منظور نمونه هاي مرغ و ميگو با استفاده از کبالت ٦٠ پرتو ديده و دزهاي بکار رفته براي نمونه مرغ ٢، ٥ و ٧ کيلوگري و براي نمونه ميگو ٣ و ٧ کيلوگري بوده است. سپس نمونه هاي پرتوديده با پرتونديده (کنترل) مقايسه شدند. بعلاوه اثرات طول مدت نگهداري و دما صرفاً بر روي نمونه ها ي مرغ مورد بررسي قرارگرفت. نتايج بدست آمده از آزمايشات مکرر نشان داد که دردزهاي متفاوت (حتي در دزهاي پايين) تشخيص نمونه هاي پرتوديده ازکنترل به سهولت امکان پذير است.

واژه هاي کليدي: مرغ، ميگو، پرتودهي، الکتروفورز يك سلول منفرد، سنجش دنباله DNA

DETECTION OF DNA COMET BY USING OF SCGE FOR IRRADIATED POULTRY AND SHRIMP

Rasa Rajaie* and S. Leila Hosseini

Gamma Irradiation Center, AEOI, P.O. Box: 11365-3486, Tehran - Iran

ABSTRACT: DNA in food will sustain damage by gamma radiation that this damage was detected by a sensetive technique called single cell gel electrophoresis. For this purpose poultry and shrimp samples were irradiated by ^{60}Co gamma radiation. The radiation doses for poultry were 2, 5 and 7 kGy and for shrimp were 3 and 7 kGy. Then, irradiated samples were compared with unirradiated ones (control). In addition, the effects of shelf-life and temperature were considered on the same samples. We found that with different doses (even at low dose) identification of irradiated from unirradiated samples were easily possible.

Keywords: ***poultry, shrimp, irradiation, single cell gel electrophoresis, DNA comet assay***

١ـ مقدمه

امروزه بسياري از کشورها براي افزايش مدت زمان نگهداري و جلوگيري يا کاهش فساد مواد غذايي از پرتوهاي يونيزه کننده استفاده ميکنند. اگر چه مواد غذايي پرتو ديده مطمئن و بي خطر بنظر ميرسند ولي مصرف کننده ميبايست حق انتخاب آزادانه ماده غذايي پرتوديده از پرتونديده را دارا باشد [٣-١].

روشهاي متعددي از قبيل فيزيکي، بيولوژيکي و بيوشيميايي براي شناسايي مواد غذايي پرتوديده پيشنهاد شده است. يك

نمونه از روش بيوشيميايي كه بر اساس شناسايي شكستگي DNA ميباشد، بدليل سهولت وكم هزينه بودن آن، توجه بسياري از محققان را به خود جلب كرده است[١٠]. در اين روش با استفاده ازتكنيك الكتروفورز يك سلول منفرد SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) سلولهايي كه تحت پرتو قرار گرفته اند، قابل شناسايي ميباشند. بعبارت ديگر، پرتو وارد شده به سلول باعث شكسته شدن مولكولهايي از جمله DNA كه داراي بار منفي ميباشد، ميگردد. بنابراين در يك محيط الكتريكي (دستگاه الكتروفورز) ذرات DNA به طرف قطب مثبت (آند) دستگاه كشيده شده و بر حسب اندازة ذرات، تشكيل دنباله اي را ميدهند كه اصطلاحاً به آن "دنبالة DNA" (DNA Comet) گويند. اندازة طول اين دنباله، با مقدار شكستگيDNA و در نتيجه با اندازة بزرگي انرژي وارد شده (پرتو) به سلول، نسبت مستقيم دارد [٤و٥]

براي سنجش دنبالة DNA از دو روش استفاده ميشود: روش خنثي (Neutral) و روش قلياي (Alkaline) [٧، ٨، ٩ و١١]. در روش خنثي كه pH محيط در حد خنثي است هرگونه شكست كه در دو رشتهDNA (DNA double-strand breaks) ايجاد شود، قابل شناسايي ميباشد. در صورتيكه در روش قلياي كهpH محيط قلياي است، علاوه بر شناسايي فوق، اين روش قادر است كه حتي شكستگي را دريك رشته از DNA (DNA single-strand breaks) مشخص كند. بنابراين اين روش نسبت به روش خنثي ازحساسيت بيشتري برخوردار است [٦و ٨].

در اين سري آزمايشات سعي شده است از طريق تكنيك SCGE، دنبالة DNA سلولهاي مرغ و ميگو پرتوديده را با روش خنثي شناسايي و همچنين تأثير مدت زمان انبارداري (Shelf-life) و دما صرفاً روي همان نمونه هاي مرغ (كنترل و پرتوديده) مورد بررسي قرارگيرد.

٢ـ روش كار

مرغ تازه براي هر نوبت پرتودهي وآزمايش از فروشگاه تعاوني جام جم خيابان شهيد مطهري و ميگو زنده با نام ببرسبز (Green tiger) و نام علمي *Penaeus semisulcatus* از مركز تحقيقات شيلات بوشهر تهيه شدند. مواد شيميايي مورد استفاده در اين تحقيقات، عمدتاً از شركتهاي Merck و Pharmacia خريداري گرديدند. همچنين از دستگاه الكتروفورز Submarine دست ساخت مركز تابش گاما و براي پرتودهي نمونه ها از كبالت ٦٠ (Gammacell 220) استفاده شد.

دزهاي انتخابي ، براساس مراجع (١٧و١٨) كه در اغلب كشورهاي جهان مورد استفاده قرار گرفته براي گوشت سينة مرغ صفر، ٢، ٥ و٧ كيلوگري (kGy) و براي گوشت ميگو صفر، ٣ و٧ كيلوگري (kGy) بوده است.

حاضرسازي نمونه:

بلافاصله بعد از پرتودهي، ٢ گرم از هر نمونه (كنترل و پرتوديده)، بدون ضايعاتي مانند پوست و چربي جدا و سپس بوسيلة چاقو به قطعات ريز خرد و ٢ ml PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4) سرد اضافه گرديد. مخلوط حاصله پس از بهم خوردن،

با پارچه تنزیب(Cheesecloth) تمیز، صاف شد. بمنظور رسوب ذرات بزرگ سوسپانسیون مدتي در یخ نگهداري شد.

حاضرسازي میکروژل:

تهیه میکروژل به روش خنثي (Neutral) شامل سه مرحله است:

- لایه اول *(pre-coat)* : به منظور بهتر چسبیدن ژل به شیشة لام میباشد. براي این منظور لامهاي تمیز، در ۰,۵ % آگارز با نقطة ذوب نرمال (NMP) حل شده در PBS، قرار گرفته و پس از خشك شدن در جاي خشك و خنك بدور از غبار، کنار گذاشته شدند. لامهایي که بدین صورت تهیه میشوند حتي تا چند ماه قابل استفاده میباشند.
- لایه دوم *(coat)یا* میاني: این قسمت لایه اصلي کار است که حاوي نمونه میباشد. این لایه ۰,۸% آگارز با نقطة ذوب پایین (LMP) محلول در PBS بوده که در دمایي حدود ۳۸°C با نسبت ۱ به ۱۰ با سوسپانسیون سلولي کاملا مخلوط گردیده است. مخلوط را بصورت یکنواخت روي پیش لایه ریخته و فوراً لامل را بطریقي که ژل حباب نگیرد روي آن قرار داده و لامها بمدت ۳۰ دقیقه، بمنظور سفت شدن و به اصطلاح بستن ژل، در یخچال نگهداري شدند.
- لایه سوم *(post-coat)* یا آخر: تهیه این لایه تماماً مشابه لایه میاني بدون سوسپانسیون سلولي میباشد. بنابراین لام درکل شامل سه لایه میباشد که به دلیل شکل قرار گرفتن لایه ها به مدل "ساندویچ" معروف است [۱۱و۱۳].

لیز(lysis) کردن سلولها:

لامهاي حاوي نمونه به طورکامل بمدت ۱۵ دقیقه در بافر لیز کننده SDS-TBE (2.5% SDS در TBE) و سپس در بافر الکتروفورز تازه و خنك TBE (45 mM Tris-borate,1 mM EDTA, pH 8.4) بمدت۱۰- ۵ دقیقه قرار داده شدند [۱۱].

الکتروفورز خنثي:

لامها کنار هم در یك دستگاه افقي الکترفورز که با بافر تازه و خنك TBE پر شده بود، به مدت ۲ دقیقه در ۲ V/cm الکتروفورز شد [۱۰].

تثبیت ژل:

بعد از الکترفورز، نمونه ها با یکي از دو روش ذیل تثبیت شدند: تثبیت با محلول TCA براي زمانیکه رنگ آمیزي با نیترات نقره در نظر گرفته شد [۱۲]. تثبیت با متانول خالص براي هنگامي که رنگ آمیزي فلورسنتي با اتیدیوم برمید مد نظر بود [۱٦].

رنگ آمیزي ژل:

I) در رنگ آمیزي با نیترات نقره (Silver staining) مرحله به مرحله از روش (۱۹۹۵) Delincee استفاده شد [۱۲].

II) در رنگ آمیزي فلورسنتي، پس از تثبیت نمونه، µl ۱۰۰ از محلول اتیدیوم برومید (/ 20 µg ml dH_2O) روي آن ریخته و پس ا ز ۱۰ دقیقه با آب مقطر شستشو داده شد. سپس لامها، خشك گردیده و براي بررسي با میکروسکوپ فلورسنت آماده شدند [۱٦].

میکروسکوپي:

در مورد لامهايي كه رنگ آميزي آنها با نيترات نقره بود، از ميكروسكوپ نوري نيكون (مدل OPTIPHOT-POL) استفاده شد. سلولها در زير ميكروسكوپ، به رنگ قهوه اي ـ سياه در زمينة خاكستري روشن پديدار بودند. تعدادي عكس با دوربين نيكون FX-35A گرفته شد.

در رنگ آميزي فلورسنتي، از ميكروسكوپ فلورسنت زايس (مدل OXIOPHOTE)، كه DNA و ضمايم مربوط به آن را قرمزدر زمينة سياه نشان مي داد، استفاده شد.

اندازه گيري مهاجرت DNA (DNA migration):

در هر لام، ۱۰۰ سلول بطور اتفاقي انتخاب، سپس طول سلول از ابتداي سر (Head) تا انتهاي دنباله (Comet) اندازه گيري شد. همة اندازه گيريها با ميكروسكوپ نوري نيكون انجام گرفت.

۲ـ۱ـ بررسي تاثير دما و طول مدت نگهداري بر روي دنباله DNA

چهار قطعه از گوشت سينه يك مرغ تازه، جدا و بعد از پرتودهي ۲، ۵ و ۷ كيلوگري در دماي ٤ درجة سانتيگراد بمدت يك هفته نگهداري شدند. نمونه ها با روش خنثي حاضر سازي و الكتروفورز گرديد و در آخر پس از تعيين نوع (Type determination) با نمونه كنترل (پرتونديده) مقايسه شدند.

همچنين يكسري نمونه مشابه، بمدت ۳ ماه در فريز در دماي ۱۸- درجة سانتيگراد نگهداري و پس از گذراندن مراحل فوق با نمونة كنترل، مقايسه شد.

۲ـ۲ـ سنجش دنبالة DNA (DNA Comet Assay)

دسته بندي سلولهاي كنترل و پرتوديده بر اساس شكل و اندازة دنباله آنها انجام گرفته و در واقع مقدار كشيدگي (مهاجرت) دنباله DNA نشاندهندة درجة شكستگي و بزرگي آسيب به آن ميباشد. در اينجا با استفاده از دو روش، دنبالة DNA شناسايي و اندازه گيري شد:

الف) اندازة طول سلول يعني فاصلة ابتداي سر (head) تا انتهاي دنباله (comet) با استفاده از عدسي چشمي درجه بندي شده (eyepiece micrometer) [۱٤].

ب) تعيين نوع سلول (Cell Type Determination): دسته بندي بر اساس شكل سلول و ميزان كشيدگي دنباله DNA آن است كه بر چهار نوع ميباشد: ۱) سلولهايي كه شكل آنها تغيير نيافته و يا اين ميزان كم است. ۲) دنباله از يك طرف سلول بيرون زده است. ۳) كشيدگي دنباله كه بطور واضح نمايان است. ٤) جدا شدن سر از دنباله و در بعضي مواقع فاصله گرفتن آنها بطوركامل مشاهده ميشود [۱٤و۱۵].

۳ـ يافته ها و بحث

براي تشخيص ميزان دزو تعيين نوع دنباله DNA در سلولهاي نمونه مرغ، اكثريت قريب به اتفاق كه از شكل و اندازة مشابه برخوردار بودند در نظر گرفته شد. درتصاوير (۱) حالت (a) نمونه كنترل ميباشد كه سلول پرتونديده را با سري متراكم به همراه دنباله اي گرد- بيضي نشان ميدهد. با توجه به اينكه سلولها تحت فشارهاي متعدد مانند بهم خوردن در بافر، صاف كردن آن و جابجايي حرارتي بوده، وجودكمي دنباله

بديهي بنظر ميرسد. درحالت (b) همان نمونه مرغ را نشان ميدهد كه ۲ كيلوگري پرتو ديده و دنباله كاملاً كشيده شده است. حالت (c) در ٥ كيلوگري سر بسيار متراكم شده و دنباله كه كشيده تر شده هنوز به سر متصل است. در ۷ كيلوگري (d) سر از دنباله تقريباً جدا شده و دنباله طويلتر شده است. همانطور كه از مقايسه تصاوير مشخص است با افزايش ميزان دز شكل سر و دنباله تغيير كرده و اين تغييرات در جهتي است كه سر متمركزتر و دنباله كشيده تر شده است. بنابراين چهار دسته بندي مذكوردرتعيين نوع سلول كاملاً منطبق برحالات فوق (a، b، c و d) ميباشند.

تصاوير (۲) حالتهاي a ، b وc رابطة فوق را براي نمونه ميگو (بترتيب: صفر، ۳و۷ كيلوگري) نشان ميدهد با اين تفاوت كه سلولهاي ميگوكمي درشت تر از سلولهاي مرغ هستند.

همانطور كه شكل (۱) نشان ميدهد، در شرايط يكسان، افزايش طول مهاجرت DNA (DNA Migration) با افزايش دز در نمونه تازة مرغ (كنترل تا پرتوديده) نسبت مستقيم داشته و حدود بارها (bars) نشاندهندة انحراف معيار (Standard Deviation) است كه در مقايسه با كنترل متفاوت نميباشد.

همچنين با مقايسة گرافها در شكل (۲) مشاهده ميشود كه از پايين به بالاو از سمت چپ به راست گرافها شيفت داشته و چون ميزان دزها بهم نزديك ميباشند، اين جابجايي تدريجاً صورت گرفته است. گراف كنترل، سلولهاي نوع ۱ و گرافهاي ۲، ٥ و۷ كيلوگري بترتيب نماينده سلولهاي نوع ۲، ۳ و ٤ ميباشند بنابراين اولاً هر نوع سلول مشخصاً در دز معيني از اكثريت تعداد برخوردار است و ثانياً در دزهاي بالاتر مانند ٥ و ۷ كيلوگري تعدادكمي ازسلولهاي نوع يك هنوزوجود دارند و دليل آن هم ميتواند يكسان نبودن تاثير پرتو بر روي سلولها باشد. زيرا همراه با سلولهاي عضلة سينه مرغ، تعدادي از انواع سلولهاي خوني نيز وجود داردكه درحين آزمايش در بافت باقي مي ماند.

شكل (۳) مقايسة افزايش طول مهاجرت DNA (DNA Migration) با افزايش دز در نمونه تازة ميگو (كنترل تا پرتوديده) را نشان ميدهد.

شكل (٤) مقايسة نمونة تازة گوشت مرغ و همان نمونه نگهداري شده بمدت يك هفته در يخچال را نشان ميدهد. بعلت نابودي سلولهاي پرتونديده، مهاجرتDNA وجود نداشت ولي اين مهاجرت درسلولهاي نمونة پرتوديده كه از بين نرفته بودند، ديده شد. نابودي سلولهاي نمونة كنترل ميتواند بدليل فعال بودن سيستم اتوليز سلولي باشد كه در دماي يخچال (٤ °C) همچنان فعاليت خود را حفظ كرده بود. فعاليت اين سيستم تحت تاثير پرتوكم شده و با افزايش ميزان دز كاهش پيدا ميكند. اما همانطور كه شكل (٥) نشان ميدهد در مقايسه با منحني نمونة تازة مرغ، نمونة نگهداري شده در فريزر تفاوت زيادي مشاهده نميشود و اين ميتواند بدليل كاهش فعاليت سلولي در دماي ۱۸- °C ميباشد.

قابل ذكر است كه در طي رنگ آميزيهاي متعدد با نيترات نقره و اتيديوم برميد، نتايج زير حاصل شد: همانطور كه جدول شماره (۱) نشان ميدهد، تهيه محلول و مراحل رنگ آميزي با

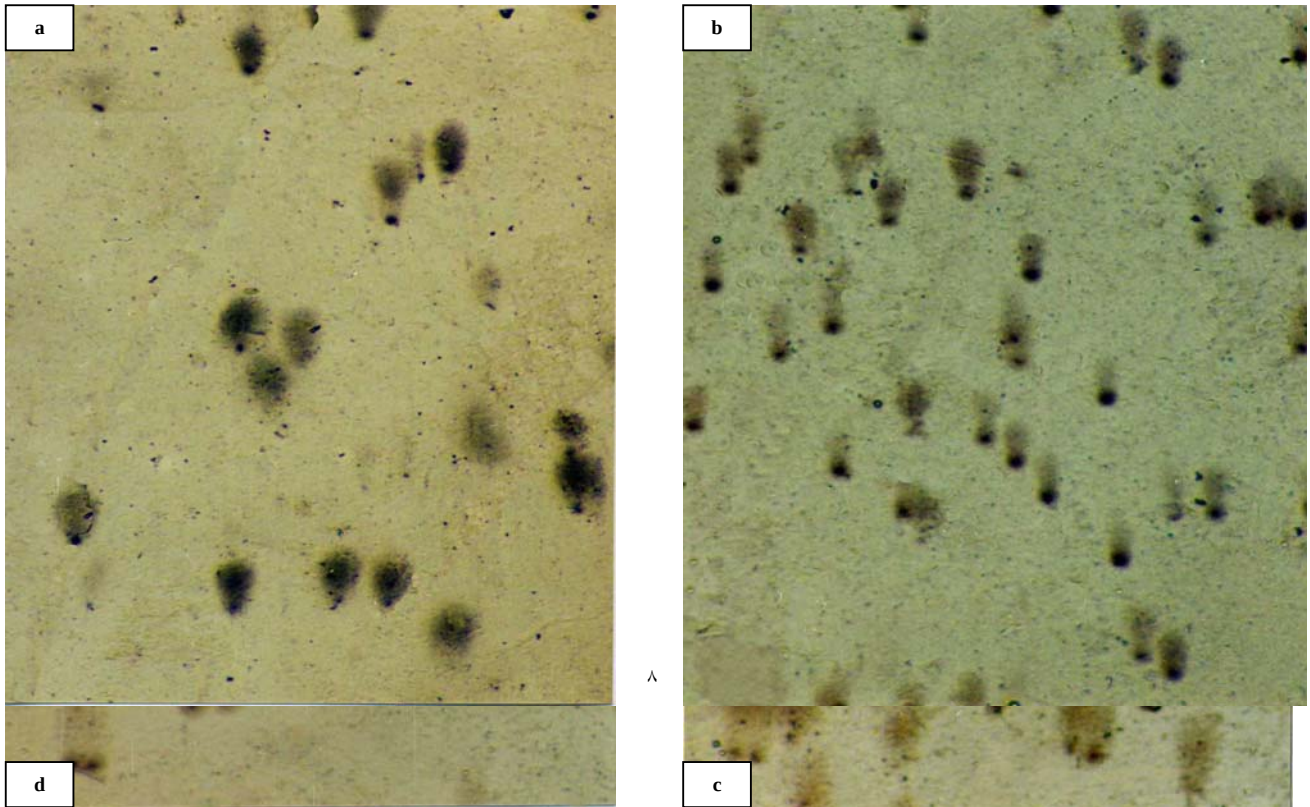
اتيديوم برميد بسيار كمتر است، در نتيجه لامها براي بررسي با ميكروسكوپ سريعتر آماده ميشوند. بعلاوه قرمز رنگ بودن سلولها و دنبالة آن تمايز را در زمينة تيره ژل بالا برده است. اما با تمام اين مزايا، رنگ آميزي با نيترات نقره بدليل قابل دسترس بودن ميكروسكوپ نوري و كم خطر بودن اين ماده شيميايي نسبت به اتيديوم برميد و همچنين نگهداري طولاني مدت لامها پس از رنگ آميزي، در اولويت قرار دارد. تصاوير (٣) و (٤) نمونه پرتونديده مرغ را با دو نوع رنگ آميزي نشان ميدهد.

٤ـ نتيجه گيري

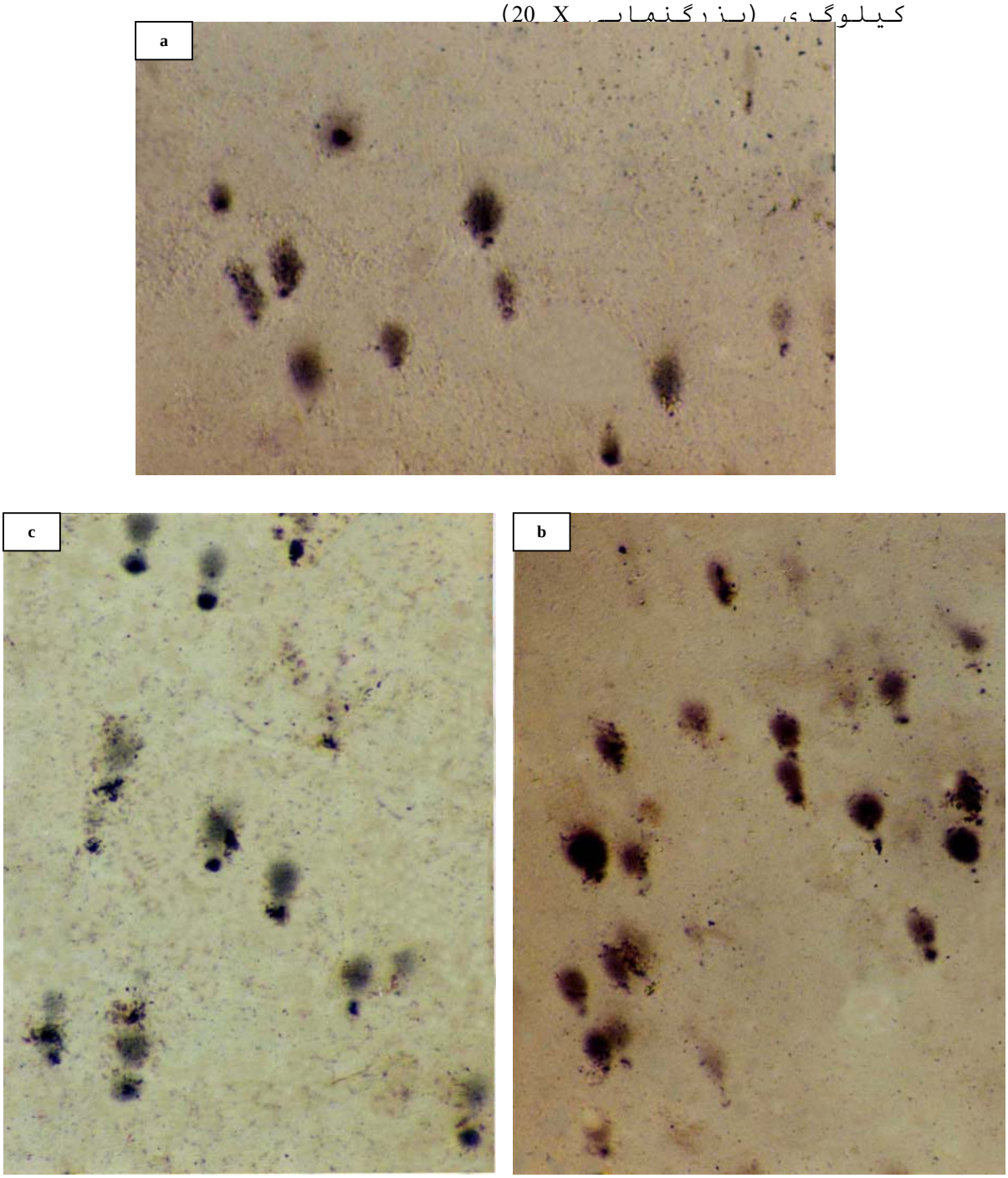
- « روش خنثي» بسيار روش ساده و در عين حال سريع ميباشد و ميتوان از شروع كه مرحلة حاضرسازي است تا به آخر كه بررسي با ميكروسكوپ ميباشد، در طي يك روز انجام داد.
- از آنجاييكه سلولهاي كنترل (پرتونديده) از شكل يكساني تبعيت نمي كنند و ميتوانند تمام حالات نوع ١ تا حتي ٤ را نشان دهند (به اصطلاح 'موزاييك' هستند)، به راحتي ميتوان با «روش خنثي»، سلولهاي پرتوديده را ازكنترل جدا كرد. اين حالت موزاييك در نمونه هاي پرتوديده بسياركمتر ازكنترل ميباشد و ميتوان بعنوان شاخصي در نمونه هاي پرتوديده ازآن استفاده كرد.
- بعلاوه نگهداري گوشت مرغ در دماي ١٨- درجه سانتيگراد (فريزر) باعث كاهش آسيب سلولي و در نتيجه افزايش ماندگاري آن ميگردد. وليكن نگهداري گوشت مرغ در دماي ٤ درجه سانتيگراد (يخچال) بعلت نابودي سلولها بمدت چند روز اصلاً توصيه نميشود.
- در نتيجه تكنيك SCGE نه فقط روش مناسبي براي شناسايي مواد غذايي پرتوديده است بلكه هر نوع استرس وارده به سلول ماده غذايي، نظيرتغييرات شديد دما، مدت زمان انبارداري و حتي تغييرات شيميايي محيط، كه باعث شكستگي DNA آن شود، قابل بررسي ميباشد.

تشكر

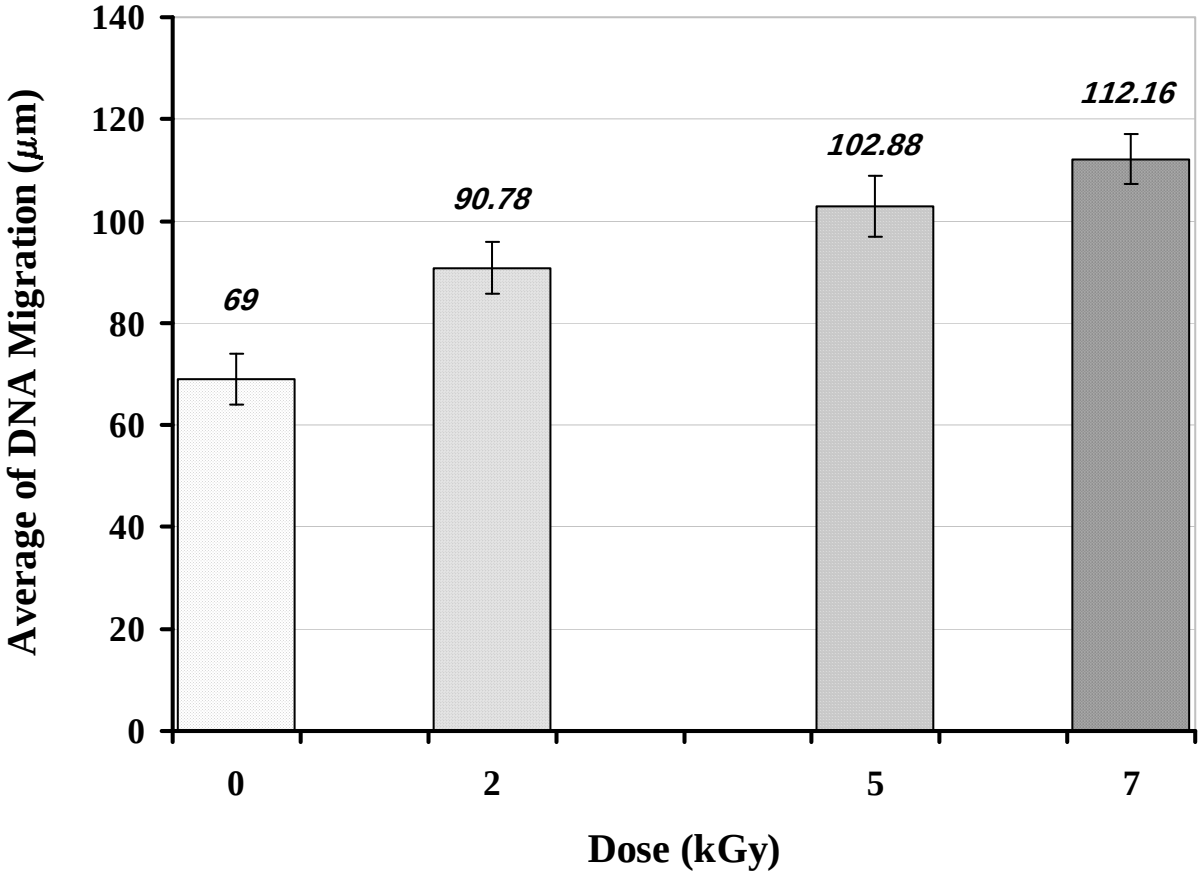
از راهنماييهاي رياست محترم مركز تابش گاما، جناب آقاي دكتر سهرابپورو سرپرست محترم بخش پرتودهي مواد غذايي جناب آقاي دكتر قوجايي و همكاران عزيز سركارخانمها مهندس سيحون، مهندس خويلوو دكتر محمدي و ديگر همكاران گرامي آقايان سميعي فرد، ايرانپورو مهندس آذرباد، كه همواره در مراحل مختلف اجراي اين پروژه تحقيقي هريك بنوعي ياريگر ما بودند،كمال تشكرو قدرداني را داريم.


a
b
d
c

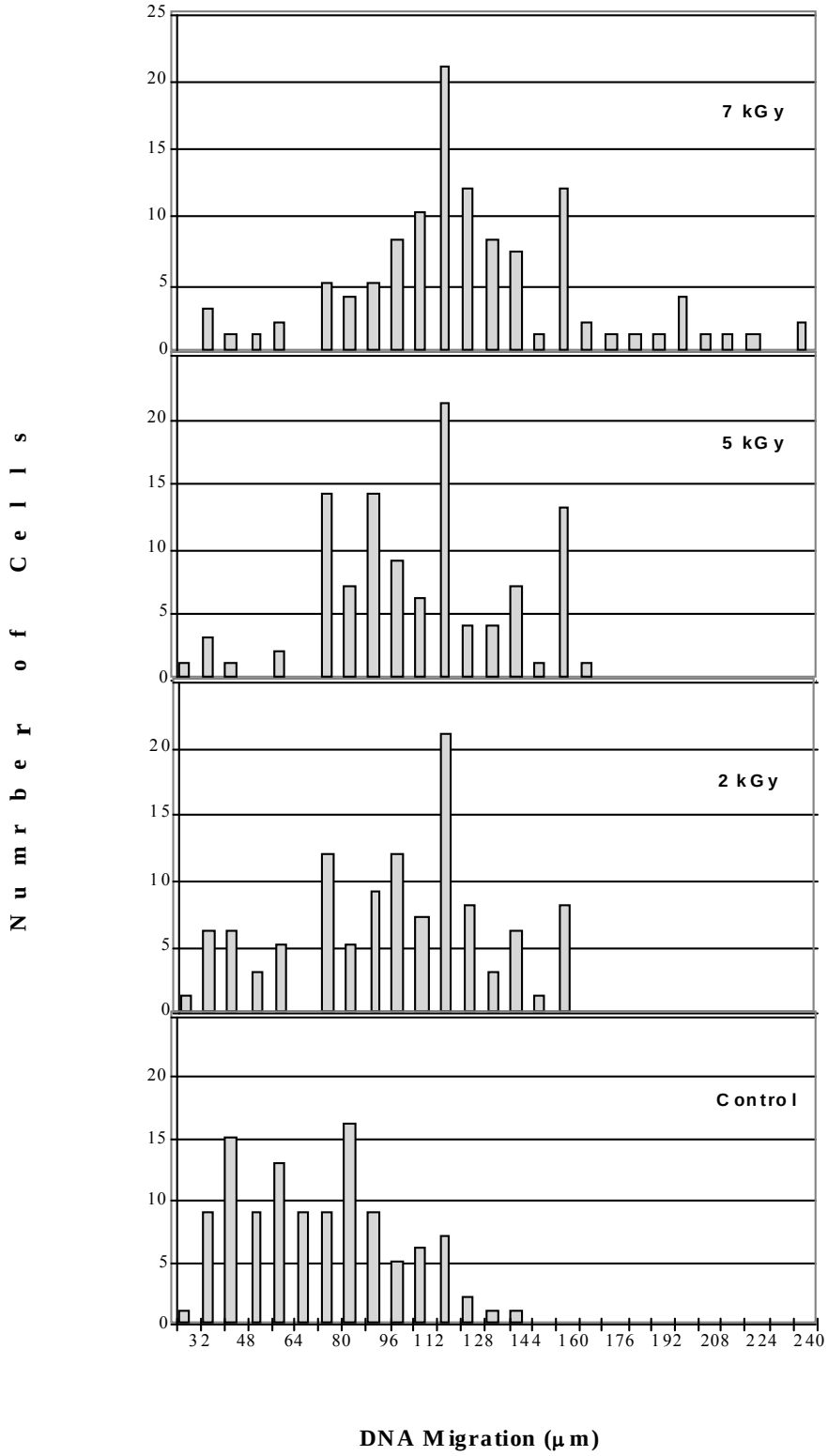
تصویر(۱) تعیین نوع براساس دنباله DNA از طریق روش خنثي در نمونه مرغ: صفر (a)، ۲ (b)، ۵ (c) و ۷ (d) کیلوگرم (بزرگنمایی X 20)



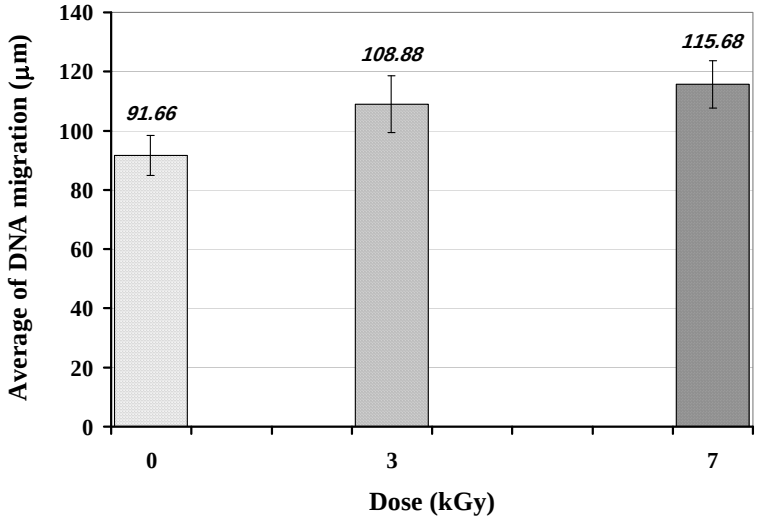
تصویر(۲) تعیین نوع براساس دنباله DNA از طریق روش خنثي در نمونه میگو: صفر (a)، ۳ (b) و۷ (c) کیلوگري (بزرگنمایي 20 X)



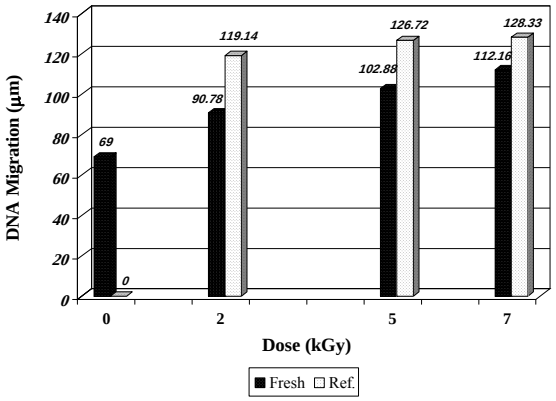
شکل (۱) مقایسه تاثیرافزایش دز با مهاجرت DNA همراه با انحراف معیاردر نمونه مرغ تازه



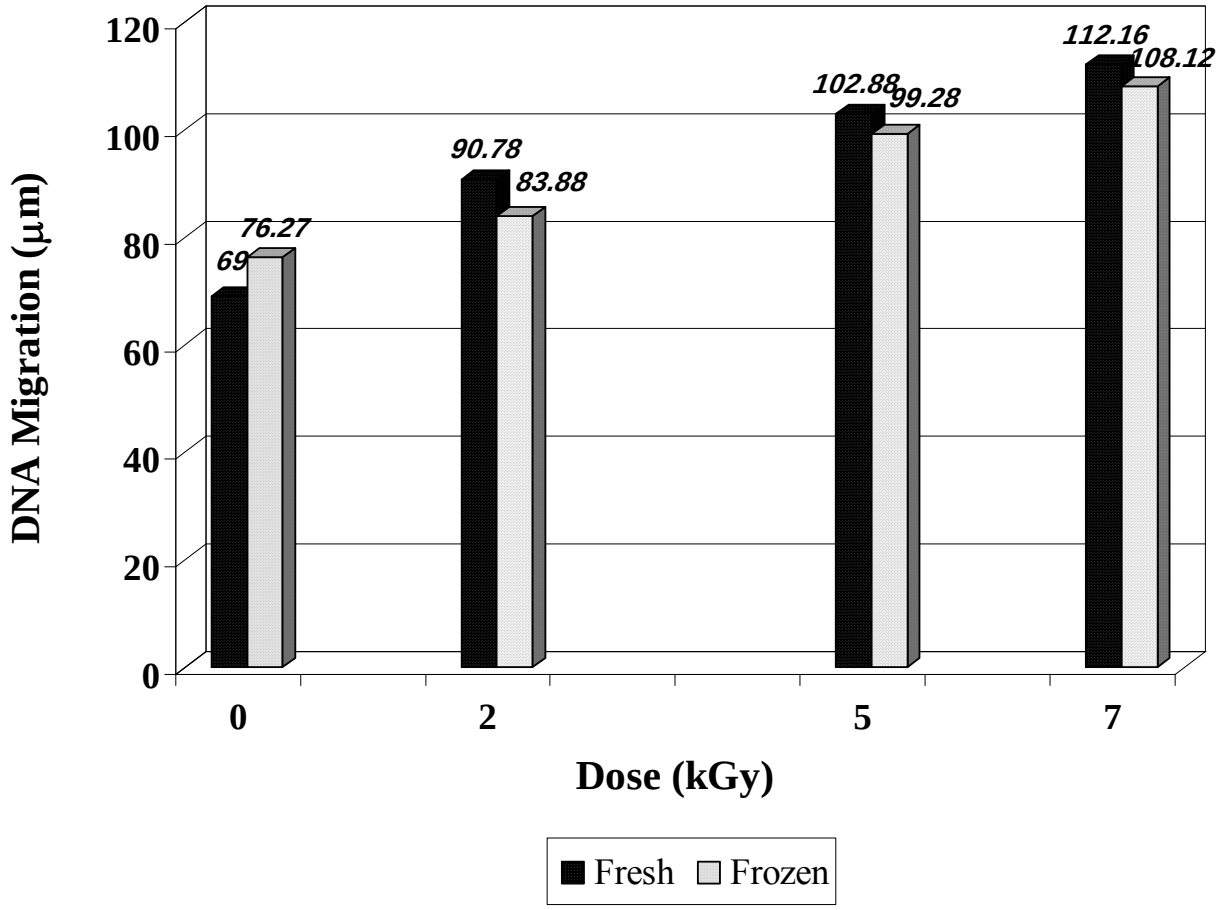
شکل (۲) مقایسه مهاجرت DNA در ۴۰۰ عدد سلول نمونه مرغ از دز صفر (کنترل) تا ۷ کیلوگری



شکل (۳) مقایسه تاثیرافزایش دز با مهاجرت DNA همراه با انحراف معیاردر نمونه میگو



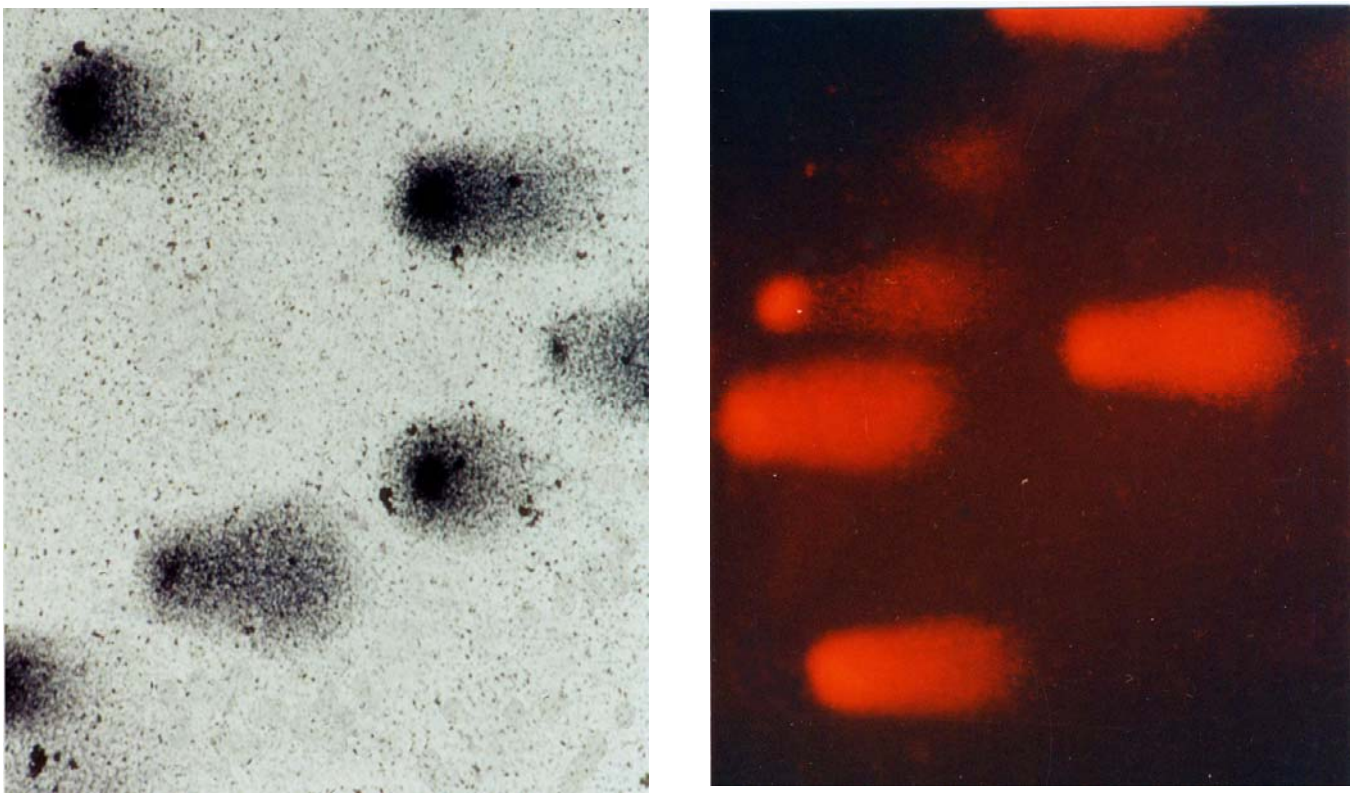
شكل (٤) مقايسه نمونه تازه گوشت مرغ و همان نمونه نگهداري شده در يخچال (٤ °C) پس از گذشت يك هفته



شکل (٥) مقایسه نمونه تازه گوشت مرغ و همان نمونه نگهداري شده در فریزر (-١٨ °C) پس از گذشت سه ماه

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

جدول (۱) مقایسه مراحل رنگ آمیزي اتیدیوم برمید و نیترات نقره



تصاویر (۳) و (٤) مقایسه رنگ آمیزي نمونه کنترل مرغ با اتیدیوم برمید (راست) و نیترات نقره (چپ) از طریق روش خنثي (بزرگنمایي 400 X)

References

1. H. Delincee, "Detection of food treated with ionizing radiation," Trends in Food Science and Technology, **9**, 73-82 (1998).
2. M. Makoto et.al., "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 and H. Cerda, "identification of low-dose irradiated seeds using the neutral comet assay," Lebensm.-Wiss. u.-Thenol. **30**, 452-457 (1997).
4. 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).
5. P.L. Olive et.al., "DNA double-strand breaks measured inindividual cells subjected to gel electrophoresis," Cancer Research **51**, 4671-4676 (1991).
6. P.L. Olive, "The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation," Radiation Research **150**, S42-S51 (1998).
7. P.L. Olive et.al., "Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis," Experimental Cell Research **198**, 256-267 (1992).
8. S. Cotelle and J.F. Ferard, "Comet assay in genetic ecotoxicology: A rewiew," Environ. Molecul. Mutagen. **34**, 246-255 (1999).
9. A.R. Collins et.al., " The comet assay: What can it really tell us?," Mutation Research, **375**, 183-193 (1997).
10. H. Delincee,"Rapid and simple screening tests to detect the radiation treatment of foods," Radiat. Phys. Chem. **46** (4-6), 677-680 (1995).
11. H. Cerda, H. Delincee, H. Haine and H. Rupp "The DNA comet assay as a rapid screening technique to control irradiated food," Mutation Research **375**, 167-181 (1997).
12. H. Delincee, "Silver staining of DNA in the comet assay," Comet Newsletter (1995).
13. S.M. Piperakis et.al., "Comet assay for nuclear DNA damage," Methods in Enzymology, **300**, 184-194 (1999).
14. N.P. Singh et.al., "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells," Experimental Cell Research, **175**, 184-191 (1988).
15. Z. Szot et.al., "Effect of storage conditions and gamma irradiation of meat on DNA analyzed by comet assay," Nuclear Technologies and Methods, 105-107 (1999).
16. Comet Newsletter, Issue#6, April (1997).
17. Codex Alimentarius, Volume XV, Rome (1984).
18. Food Irradiation newsletter, Supplement (1995).