سیستم مدیریت ایزو

www.isomanagement.ir

تماس تلفنی جهت دریافت مشاوره:

۱. مشاور دفتر تهران (آقای محسن ممیز)

۰۹۱۲ ۹۶۳ ۹۳۳۶

۲. مشاور دفتر اصفهان (سرکار خانم لیلا ممیز)

۰۹۱۳ ۳۲۲ ۸۲۵۹

مجموعه **سیستم مدیریت ایزو** با هدف بهبود مستمرعملکرد خود و افزایش رضایت مشتریان سعی برآن داشته، کلیه استانداردهای ملی و بین المللی را در فضای مجازی نشر داده و اطلاع رسانی کند، که تمام مردم ایران از حقوق اولیه شهروندی خود آگاهی لازم را کسب نمایند و از طرف دیگر کلیه مراکز و کارخانه جات بتوانند به راحتی به استانداردهای مورد نیاز دسترسی داشته باشند.

این موسسه اعلام می دارد در کلیه گرایشهای سیستم های بین المللی ISO پیشگام بوده و کلیه مشاوره های ایزو به صورت رایگان و صدور گواهینامه ها تحت اعتبارات بین المللی سازمان جهانی IAF و تامین صلاحیت ایران می باشد.

هم اکنون سیستم خود را با معیارهای جهانی سازگارکنید...

ISO

9001
14001
18001

CE

GMP
GAP
22716

IMS
HSE-MS

22000
HACCP

45001

INSO
15495
1st Edition
2018
Modification of
BS EN 13784: 2001

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۱۵۴۹۵
چاپ اول
۱۳۹۷

مواد غذایی– آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده با استفاده از روش سنجش دنباله DNA – روش غربال‌گری– روش آزمون

Foodstuffs— Detection of irradiated foodstuffs using DNA comet assay— Screening method — Test method

ICS: 67.050

استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۵۴۹۵ (چاپ اول): سال ۱۳۹۷

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri. gov.ir

وبگاه: http://www.isiri.gov.ir

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No. 2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri. .gov.ir

Website: http://www.isiri.gov.ir

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)[1]، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به‌منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
4- Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«مواد غذایی– آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده با استفاده از روش سنجش دنباله DNA – روش غربال‌گری- روش آزمون»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
سیحون، مرضیه (کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی)	سازمان انرژی اتمی ایران- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای- پژوهشکده کاربرد پرتوها
دبیر:	
فرحناز معتمدی سده (دکتری تخصصی میکروبیولوژی- ویروس‌شناسی)	سازمان انرژی اتمی ایران- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای- پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
برنجی اردستانی، سمیرا (دکتری تخصصی مهندسی علوم و صنایع غذایی)	سازمان انرژی اتمی ایران- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای- پژوهشکده کاربرد پرتوها
پزشک، لیلا (کارشناسی ارشد مدیریت تکنولوژی)	انجمن مواد جهش‌زای زیست محیطی ایران
جانعلی‌پور شهرانی، محمدرضا (کارشناسی ارشد فیزیک حالت جامد)	پژوهشکده سیستم‌های پیشرفته صنعتی
جمالی، سپیده السادات (کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی)	سازمان انرژی اتمی ایران- شرکت توسعه کاربرد پرتوها
حیدریه، مرضیه (دکتری دامپزشکی آبزیان)	سازمان انرژی اتمی ایران- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای- پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای
رجایی، رسا (کارشناسی ارشد بیولوژی)	سازمان انرژی اتمی ایران- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای- پژوهشکده کاربرد پرتوها
رحیمی‌فرد، ناهید (دکتری تخصصی میکروبیولوژی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی- سازمان غذا و دارو- آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو
رضایی مجاز، مهران (دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی)	سازمان دامپزشکی کشور

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	**سمت و/یا محل اشتغال:**
سمیع‌پور، فرهاد (کارشناسی ارشد مهندسی شیمی)	پژوهشکده سیستم‌های پیشرفته صنعتی
شاه‌حسینی، غلامرضا (دکتری تخصصی بهداشت و بیماری‌های آبزیان)	سازمان انرژی اتمی ایران- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای- پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای
گلشن تفتی، ابوالفضل (دکتری مهندسی علوم و صنایع غذایی)	وزارت جهاد کشاورزی- مؤسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی
مصدق، مجید (کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی)	سازمان شیلات ایران

ویراستار:	
حمزه لوئی، میترا (کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی- صنایع غذایی)	اداره کل استاندارد استان زنجان

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

پیش‌گفتار ح
مقدمه ط
۱ هدف و دامنه کاربرد ۱
۲ مراجع الزامی ۱
۳ اصول کلی ۲
۴ واکنش‌گرها ۳
۴-۱ کلیات ۳
۴-۲ هیدروکلریک اسید (HCl) ۳
۴-۳ دی متیل سولفوکسید، (DMSO) (اختیاری) ۳
۴-۴ بافر نمکی فسفات (PBS) ۳
۴-۵ محلول آگارز پوشش‌دهنده، ٪ ۰٫۵ آگارز در آب مقطر ۳
۴-۶ ریخته‌گری محلول ژل، ٪ ۰٫۸ آگارز در بافر نمکی فسفات (PBS) ۳
۴-۷ محلول ذخیره EDTA (غلظت EDTA معادل ۰٫۵ mol/l) ۴
۴-۸ محلول ذخیره TBE ۴
۴-۹ بافر الکتروفورز ۴
۴-۱۰ بافر لیز ۴
۴-۱۱ محلول‌های رنگ‌آمیزی ۴
۵ وسایل ۶
۶ روش انجام آزمون ۷
۶-۱ تهیه سوسپانسیون سلول منفرد ۷
۶-۲ پیش پوشش‌دهی لام‌ها ۹
۶-۳ ریخته‌گری ژل‌ها ۹
۶-۴ لیز سلول‌ها ۹
۶-۵ مشروط‌سازی ۹
۶-۶ الکتروفورز ۱۰
۶-۷ رنگ‌آمیزی ۱۰
۶-۸ شناسایی ۱۱
۷ ارزیابی ۱۱
۸ محدودیت‌ها ۱۲

عنوان **صفحه**

۹ صحه‌گذاری	۱۴
۱۰ گزارش آزمون	۱۴
پیوست الف (الزامی) صحه‌گذاری	۱۶
پیوست ب (آگاهی‌دهنده) نمونه‌هایی از دنباله‌های مشخص DNA	۱۷
پیوست پ (الزامی) تغییرات اعمال شده در این استاندارد ملی در مقایسه با استاندارد منبع	۲۰
کتاب‌نامه	۲۱

پیش‌گفتار

استاندارد «مواد غذایی – آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده با استفاده از روش سنجش دنباله DNA – روش غربال‌گری- روش آزمون» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده است، در یک‌هزار و ششصد و چهل و ششمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد خوراک و فرآورده‌های کشاورزی مورخ ۱۳۹۷/۰۴/۲۰ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون‌های مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

منبع و مأخذی که برای تهیه و تدوین این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

BS EN 13784: 2001, Foodstuffs – DNA Comet Assay for the detection of irradiated foodstuffs – Screening method

مقدمه

پرتودهی مواد غذایی برای فرآوری محصولات غذایی با استفاده از پرتوهای یون‌ساز و به منظور کنترل عوامل بیماری‌زای قابل انتقال از طریق مواد غذایی، کاهش بار میکروبی و آسیب حشرات، جلوگیری از جوانه‌زنی محصولات ریشه‌ای و افزایش ماندگاری محصولات با قابلیت فساد بالا انجام می‌شود.

این استاندارد حاوی اطلاعاتی برای آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی‌شده است. علاوه بر این استاندارد، استانداردهای EN 1784، EN 1785، EN 1786، EN 1787، EN 1788، EN 13751 و EN 13783 نیز برای آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده، تدوین شده است. هریک از این استانداردها برای گروه خاصی از مواد غذایی یا همه گروه‌های موادد غذایی کاربرد دارد. روش ارائه شده در این استاندارد، بر روی تعدادی از محصولات غذایی با منشأ حیوانی و گیاهی، مانند گوشت‌های مختلف، دانه‌ها، میوه‌های خشک شده و ادویه‌ها و بر اساس نتایج آزمون‌های بین آزمایشگاهی، به‌صورت موفقیت‌آمیزی آزمایش و صحه‌گذاری شده است (به پیوست **الف** مراجعه شود).

مواد غذایی– آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده با استفاده از روش سنجش دنباله DNA – روش غربال‌گری- روش آزمون

هشدار ۱- استفاده از این استاندارد ممکن است مستلزم کارکردن با مواد، عملیات و تجهیزات خطرناک باشد. در این استاندارد تمام موارد ایمنی مرتبط با استفاده از آن‌ها درج نشده است. در صورت مواجهه با چنین مواردی، مسئولیت برقراری شرایط بهداشت و ایمنی مناسب و اجرای آن و همچنین در نظر گرفتن محدودیت‌های قانونی و مقررات بهداشتی، برعهده کاربر این استاندارد است.

هشدار ۲- کاربران این استاندارد، باید با فعالیت‌های معمول آزمایشگاهی آشنایی داشته باشند و کاملاً ضروری است که آزمون‌های صورت گرفته بر طبق این استاندارد، به‌وسیله کارکنان صلاحیت‌دار انجام پذیرد.

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش غربال‌گری برای آشکارسازی تیمار پرتودهی مواد غذایی حاوی DNA است. این استاندارد بر اساس میکروژل الکتروفورز[1] سلول‌های منفرد یا هسته‌ها برای آشکارسازی قطعات DNA ناشی از تیمار پرتودهی است (به منابع [۱] تا [۸] کتاب‌نامه مراجعه شود). روش سنجش دنباله DNA فقط مختص پرتودهی نیست. بنابراین توصیه می‌شود نتایج مثبت با استفاده از یک روش استانداردسازی شده دیگری (به‌عنوان مثال استانداردهای EN 1786، EN 1787، EN 1788، EN 13708 و EN 13751)، تأیید شود تا به صراحت تیمار پرتودهی مواد غذایی مذکور اثبات شود.

یادآوری- این استاندارد در آزمون‌های بین‌آزمایشگاهی، با تعدادی از محصولات غذایی با منشأ حیوانی و گیاهی مانند گوشت‌های مختلف (به منابع [۹] تا [۱۱] کتاب‌نامه مراجعه شود)، دانه‌ها، میوه‌های خشک شده و ادویه‌ها به‌طور موفقیت‌آمیزی آزمایش شده است (به منابع [۶] و [۱۲] کتاب‌نامه مراجعه شود). سایر مطالعات نشان می‌دهند که این استاندارد برای انواع زیادی از مواد غذایی کاربرد دارد (به منابع [۱۳] تا [۳۲] کتاب‌نامه مراجعه شود)، اما محدودیت‌هایی نیز وجود دارد (به بند ۸ مراجعه شود).

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به‌صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین‌ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

1- Micro- gel electrophoresis

درصورتی‌که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

2-1 ISO 3696, Water for analytical laboratory use- Specification and test methods

یادآوری– استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸: سال ۱۳۸۱ (تجدید نظر اول)، آب مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون، با استفاده از استاندارد ISO 3696:1987، تدوین شده است.

۳ اصول کلی

قطعه شدن DNA می‌تواند با تیمارهای شیمیایی یا فیزیکی متنوعی شامل پرتو یون‌ساز ایجاد شود. هنگامی که مواد غذایی حاوی DNA با پرتو یون‌ساز تیمار می‌شوند، تغییرات این مولکول‌های بزرگ شامل قطعه شدن از طریق شکست در تک رشته یا در دو رشته ایجاد می‌شود. این قطعه شدن می‌تواند از طریق میکروژل الکتروفورز سلول‌های منفرد یا هسته‌ها مورد بررسی قرار گیرد. این‌ها در آگارُز روی لام‌های میکروسکوپی «جایگذاری شده»[1]، برای تخریب غشاء با استفاده از ماده شوینده[2] «لیز شده»[3] و با یک ولتاژ مناسب، الکتروفورز می‌شوند. قطعه‌های DNA کشیده خواهند شد یا این‌که به خارج از سلول حرکت می‌کنند و در جهت آند تشکیل یک دُم می‌دهند که منجر به‌ظهور یک دنباله از سلول‌های آسیب‌دیده می‌شود. این سنجش دنباله می‌تواند برای اندازه‌گیری آسیب DNA در شرایط مختلفی انجام شود. دو دستورالعمل خنثی و قلیایی وجود دارد. عموماً در شرایط قلیایی هم شکست DNA تک‌رشته‌ای و هم دو رشته‌ای و جایگاه‌های حساس به‌شرایط قلیایی اندازه‌گیری می‌شوند، در حالی‌که در شرایط خنثی فقط شکست‌های دو رشته‌ای مشاهده می‌شوند. هرچند که استفاده از شکست‌های تک‌رشته‌ای در شرایط خنثی بر روی ظهور دنباله‌ای که ناشی از استراحت[4] DNA اَبَرپیچیده[5] در هسته است، تأثیر می‌گذارد (به منابع [۷] و [۸] کتاب‌نامه مراجعه شود). سلول‌های پرتودهی شده یک امتداد افزایش یافته DNA از هسته به‌طرف آند نشان خواهند داد، بنابراین به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای دنباله‌های طویل‌تر (قطعه شدن بیشتر) نسبت به سلول‌های پرتودهی نشده را نشان می‌دهند. سلول‌های پرتودهی نشده تقریباً به شکل دایره یا با دُم‌های کوتاهی ظاهر خواهند شد (به شکل ب-۱ پیوست **ب** مراجعه شود).

1- Embedded
2- Detergent
3- Lysed
4- Relaxation
5- Supercoiled

این استاندارد کاربرد یک تک لایه آگارُز ساده متناسب با pH خنثی و ترکیب با یک ولتاژ پایین و زمان کوتاه الکتروفورِز را تشریح می‌کند.

۴ واکنشگرها

۴-۱ کلیات

در طی آنالیز، غیر از موارد مشخص شده، فقط از واکنشگرهای آزمایشگاهی با درجه تجزیه‌ای شناخته شده و آب با حداقل درجه ۱، طبق استاندارد ISO 3696 استفاده شود.

۴-۲ هیدروکلریک اسید (HCl)

غلظت c (HCL)= ۱ mol /l

۴-۳ دی متیل سولفوکسید، DMSO[1] (اختیاری)

یادآوری- از آن‌جایی‌که DMSO، یک ماده زیان‌آور است، هنگام استفاده از آن، باید اقدامات احتیاطی و ایمنی مناسب را انجام داد.

۴-۴ بافر نمکی فسفات (PBS) با pH برابر با ۷٫۴

۸ g سدیم کلرید، ۰٫۲ g پتاسیم کلرید، ۲٫۹۴ g دی سدیم هیدروژن فسفات ۱۲ آبه ($Na_2HPO_4.\ 12\ H_2O$) و ۰٫۲۴ g پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) را در ۹۰۰ ml آب حل کرده، pH را با چند قطره هیدروکلریک اسید تا ۷٫۴ تنظیم (مطابق زیربند ۴-۲) و حجم را با آب به ۱۰۰۰ ml برسانید. این محلول باید دراتوکلاو یا از طریق فیلتر، سترون شود.

۴-۵ محلول آگارز پوشش‌دهنده، ٪ ۰٫۵ آگارز در آب مقطر

۵۰mg آگارز را در ۱۰ ml آب از طریق جوشاندن یا با استفاده از ماکروویو حل کنید (محلول کاملاً شفاف بدون تکه). محلول را در حمام آبی ۴۵ °C برای پیش‌پوشش لام‌های میکروسکوپی نگهداری کنید.

۴-۶ ریخته‌گری محلول ژل، ٪ ۰٫۸ آگارز در بافر نمکی فسفات (PBS)

۸۰ mg آگارز را با دمای نقطه ذوب پایین را در ۱۰ ml بافر نمکی فسفات (مطابق زیربند ۴-۴) از طریق جوشاندن یا با ماکروویو حل کنید. محلول در حمام آبی در دمای ۴۵ °C نگه‌داری شود که آماده برای مخلوط کردن با سوسپانسیون سلولی و ریخته‌گری ژل روی لام‌ها شود.

۴-۷ محلول ذخیره[1] EDTA (غلظت EDTA معادل ۰٫۵ mol/l)

g ۹۳٫۰۵ اتیلن دی آمین تترا استیک اسید، دی هیدرات دی سدیم را به ml ۳۰۰ آب مقطر اضافه، به‌خوبی مخلوط کنید و pH آن را با محلول هیدروکسید سدیم ٪ ۴۰ تا ۸٫۰ تنظیم کنید. سپس آن را تا حجم ml ۵۰۰ با آب مقطر رقیق‌سازی و اتوکلاو کنید.

۴-۸ محلول ذخیره TBE

g ۵۴ تریس (هیدروکسی متیل) آمینومتان (تریس باز) و g ۲۷٫۵ بوریک اسید را در ml ۲۰ محلول ذخیره EDTA (مطابق زیربند ۴-۷) حل کرده، و آن را تا حجم ml ۱۰۰۰ با آب مقطر رقیق کنید (این محلول TBE نام دارد). این محلول ذخیره TBE می‌تواند در بطری‌های شیشه‌ای در دمای اتاق نگهداری شود. هر قسمتی که رسوب کند باید دور ریخته شود.

۴-۹ بافر الکتروفورز

یک قسمت حجمی از محلول ذخیره TBE (مطابق زیربند۴-۸) را در ۹ قسمت حجمی آب رقیق کنید. در صورت لزوم، pH را تا ۸٫۴ تنظیم کنید.

۴-۱۰ بافر لیز

g ۲۵ سدیم دودسیل سولفات (SDS) را در بافر الکتروفورز (مطابق زیربند ۴-۹) حل کرده و حجم آن را به ml ۱۰۰۰ برسانید.

۴-۱۱ محلول‌های رنگ‌آمیزی

یادآوری- آکریدین اورنج، اتیدیوم بروماید و پروپیدیوم یدید مواد زیان‌آور هستند و باید هنگام استفاده از آن‌ها، اقدامات احتیاطی و ایمنی مناسب را انجام داد.

۴-۱۱-۱ محلول ذخیره آکریدین اورنج[2]

mg۱۰۰ آکریدین اورنج را در ml ۱۰۰ آب حل و در تاریکی در دمای تقریبی ^{o}C ۴ تا ^{o}C ۶ نگهداری کنید.

۴-۱۱-۲ محلول رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج

ml ۰٫۵ محلول ذخیره آکریدین اورنج (مطابق زیربند ۴-۱۱-۱) را با ml ۱۰۰ بافر نمکی فسفات (PBS) (مطابق زیربند ۴-۴) رقیق کنید. این محلول را می‌توان در دمای ^{o}C ۴ تا ^{o}C ۶ و حداکثر تا یک هفته نگهداری کرد.

1- Stock Solution

۴-۱۱-۳ محلول ذخیره پروپیدیوم یدید

۱۰۰ mg پروپیدیوم یدید را در ۱۰۰ ml آب حل کنید و آن را در تاریکی و در دمای تقریبی ^{o}C ۴ تا ^{o}C ۶ نگهداری کنید.

۴-۱۱-۴ محلول رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یدید

۱ ml تا ۵ ml محلول ذخیره پروپیدیوم یدید (مطابق زیربند ۴-۱۱-۳) را تا حجم ۱۰۰ ml با بافر نمکی فسفات (مطابق زیربند ۴-۴) رقیق کنید.

۴-۱۱-۵ محلول ذخیره اتیدیوم بروماید

۱۰۰mg اتیدیوم بروماید را در ۱۰۰ ml آب حل کنید و در تاریکی و در دمای تقریبی ^{o}C ۴ تا ^{o}C ۶ نگهداری کنید.

۴-۱۱-۶ محلول رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید

۲ ml محلول ذخیره اتیدیوم بروماید (مطابق زیربند ۴-۱۱-۵) را تا حجم ۱۰۰ ml با آب رقیق کنید.

۴-۱۱-۷ رنگ‌آمیزی با نقره

۴-۱۱-۷-۱ کلیات

یادآوری ۱- محلول‌های رنگ‌آمیزی نقره و روش تهیه آن‌ها (به منبع [۳۳] کتاب‌نامه مراجعه شود) برای آزمون‌های بین آزمایشگاهی استفاده شده است (به منبع [۶] کتاب‌نامه مراجعه شود). محصولات معادل (به منبع [۳۴] کتاب‌نامه مراجعه شود) می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد، به‌شرطی که استفاده از آن محصول منجر به نتایج رضایت‌بخش شود.

یادآوری ۲- کیت‌های رنگ‌آمیزی نقره، از محصولات تجاری موجود در بازاراست. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده است و به منزله تأییدیه این محصول نیست.

۴-۱۱-۷-۲ محلول تثبیت‌کننده A [1]

۵۰ g سولفات روی و مقدار ۵۰ g گلیسرول را به ۱۵۰ g اسید تری کلرواستیک، اضافه کنید و آن را تا حجم ۱۰۰۰ ml با آب رقیق کنید.

۴-۱۱-۷-۳ محلول رنگ‌آمیزی B [2]

۱۲٫۵ g کربنات سدیم را در آب حل کرده و آن را به حجم ۲۵۰ ml برسانید.

1- Fixing solution A
2- Staining solution B

۴-۱۱-۷-۴ محلول رنگ‌آمیزی C[1]

۱۰۰ mg نیترات آمونیوم، ۱۰۰ mg نیترات نقره و ۵۰۰ mg اسید تانگستوسیلیک را در آب حل کنید. ۲۵۰ µl فرمالدئید (با حداقل غلظت ٪ ۳۷) را به آن اضافه کرده و آن را تا حجم ۵۰۰ ml با آب رقیق کنید.

۴-۱۱-۷-۵ محلول رنگ‌آمیزی D[2]

بلافاصله قبل از استفاده، ۶۸ ml محلول رنگ‌آمیزی C (مطابق زیربند ۴-۱۱-۷-۴) را به ۳۲ ml محلول رنگ‌آمیزی B (مطابق زیربند ۴-۱۱-۷-۳)، در حال هم زدن شدید، اضافه کنید.

۴-۱۱-۷-۶ محلول متوقف‌کننده E[3]

۱۰ ml اسید استیک گلاسیال را تا حجم ۱۰۰۰ ml با آب رقیق کنید.

۵ وسایل

وسایل معمول آزمایشگاهی و به‌ویژه موارد زیر مورد نیاز است:

۵-۱ اتاقک[4] الکتروفورز افقی زیرآبی برای DNA

۵-۲ منبع تغذیه، برای مثال ۰ V تا ۱۰۰ V، ۰ mA تا ۴۰۰ mA

۵-۳ کرنومتر (زمان‌سنج)

۵-۴ ترازو

۵-۵ حمام آبی

۵-۶ همزن مغناطیسی حرارتی

۵-۷ آون ماکروویو

۵-۸ صافی پارچه‌ای با اندازهٔ منافذ ۱۰۰ µm، ۲۰۰ µm و ۵۰۰ µm برای مثال نایلونی

۵-۹ لام‌های میکروسکوپ

(۲۶ mm × ۷۶ mm) با یک انتهای سمباده‌ای

1- Staining solution C
2- Staining solution D
3- Stopping solution E
4- Chamber

۵-۱۰ لامل‌ها

(۲۴ mm × ۶۰ mm)

۵-۱۱ ظروف رنگ‌آمیزی

۵-۱۲ میکروسکوپ

در مورد رنگ‌آمیزی DNA با نقره، می‌توان از یک میکروسکوپ عبوری استاندارد استفاده کرد، اما برای استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسنت، میکروسکوپی با منبع نوری اپی‌فلورسانس، با یک سری فیلتر، مورد نیاز است. برای مثال فیلترهای ۴۶۰ nm تا ۴۸۵ nm (القای نور آبی) برای آکریدین اورنج یا یک سری فیلتر، از ۵۱۵ nm تا ۵۶۰ nm (القای نور سبز) ترکیب شده با یک فیلتر ممانعتی ۵۹۰ nm برای پروپیدیوم یدید یا اتیدیوم بروماید لازم است.

بزرگ‌نمایی میکروسکوپ باید ۱۰۰ برابر تا ۴۰۰ برابر باشد.

۶ روش انجام آزمون

۶-۱ تهیه سوسپانسیون سلول منفرد

۶-۱-۱ کلیات

برای ارزیابی مناسب لام‌های الکتروفورز شده، سلول‌ها باید در ژل آگارز توزیع شوند و همدیگر را نپوشاند. اگر تعداد سلول‌ها خیلی کم باشد، می‌توان مقدار بافت را افزایش داد و بالعکس. سوسپانسیون سلولی را می‌توان حداکثر تا ۱۰ دقیقه روی یخ نگهداری کرد. با اضافه کردن DMSO تا سطح نهایی از ٪ ۵ تا ٪ ۱۰ به‌عنوان یک محافظت کننده از انجماد، سوسپانسیون سلولی را می‌توان برای دوره‌های طولانی مدت در دمای ^{o}C ۱۸- نگهداری کرد.

۶-۱-۲ بافت‌های حیوانی

۶-۱-۲-۱ مغز استخوان

استخوان (برای مثال پای جوجه) را شکافته و حدود ۵۰ mg از مغز استخوان را به یک لوله آزمایش حاوی ۳ ml بافر نمکی فسفات سرد-یخی منتقل کنید. سلول‌ها را با استفاده از میله شیشه‌ای مخلوط کنید. سوسپانسیون سلولی را با استفاده از صافی پارچه‌ای با اندازه منافذ ۱۰۰ µm فیلتر کنید. محصول فیلتر شده را روی یخ نگهداری و مایع رویی آن را برای بررسی‌های بعدی استفاده کنید.

۶-۱-۲-۲ بافت ماهیچه

بافت ماهیچه را به‌صورت لایه‌های بسیار نازک (بدون چربی قابل مشاهده) با تیغ اسکالپل[1] خراشیده یا ببُرید و حدود ۱ g آن را به بشر کوچک حاوی ۵ ml بافر نمکی فسفات سرد-یخی منتقل کنید. این بشر در بشری بزرگ‌تر حاوی پودر یخ، سرد و به‌مدت ۵ دقیقه حدود ۵۰۰ دور در دقیقه هم بزنید. سوسپانسیون با صافی پارچه‌ای با اندازه منافذ ۵۰۰ µm و ۲۰۰ µm فیلتر کنید و نمونه را حدود ۵ دقیقه روی یخ قرار داده تا ته‌نشین شود. این مایع رویی به‌عنوان عصاره سلولی استفاده شود.

۶-۱-۳ بافت‌های گیاهی

۶-۱-۳-۱ دانه‌ها، مغزها[2] و ادویه‌ها

حدود ۰٫۲۵ g از نمونه را به‌وسیله یک هاون لِه کنید (اگر لایه خارجی موجود است قبل از خُرد کردن آن را جدا کنید، گاهی اوقات غوطه‌ور کردن در آب، حذف لایه خارجی را تسهیل می‌کند) و به بشر کوچکی حاوی ۳ ml بافر نمکی فسفات سرد- یخی منتقل کنید. این بشر در بشری بزرگ‌تر حاوی پودر یخ، سرد و به مدت ۵ دقیقه حدود ۵۰۰ دور در دقیقه هم زده شود. به ترتیب سوسپانسیون را با صافی پارچه‌ای با اندازه منافذ ۲۰۰ µm و ۱۰۰ µm فیلتر کنید. نمونه به‌مدت ۱۵ دقیقه تا ۶۰ دقیقه روی یخ قرار دهید. مدت زمان طولانی‌تر باعث ایجاد سوسپانسیونی با آلودگی کمتر و همچنین کاهش نسبت سلول به هسته سلول می‌شود. مایع رویی برای بررسی‌های بعدی استفاده کنید.

۶-۱-۳-۲ توت‌فرنگی‌ها

دانه‌های روی توت‌فرنگی را به‌وسیله چیدن یا مخلوط کردن در مقدار زیاد آب جداسازی کنید. اجازه دهید دانه‌های بزرگ‌تر حل شوند. حدود ۰٫۲۵ g دانه‌ها را وزن کنید و مشابه موارد قبلی دانه‌ها، مغزها و ادویه‌ها ادامه دهید (مطابق زیربند ۶-۱-۳-۱).

۶-۱-۳-۳ سیب‌زمینی‌ها

مریستم سیب‌زمینی با یک اسکالپل به لایه‌های خیلی نازک بِبُرید و حدود ۴ g از آن را به یک بشر کوچک حاوی ۵ ml بافر نمکی فسفات سرد- یخی منتقل کنید. مشابه موارد قبلی دانه‌ها، مغزها و ادویه‌ها ادامه دهید (مطابق زیربند ۶-۱-۳-۱).

---

1 -Scalpel
2- Nuts

۶-۱-۳-۴ پیازها

مریستم پیازها با یک اسکالپل به لایه‌های خیلی نازک بُریده شود و حدود g ۲ از آن را به یک بشر کوچک حاوی ml ۴ بافر نمکی فسفات سرد- یخی منتقل کنید. مشابه موارد قبلی دانه‌ها، مغزها و ادویه‌ها ادامه داده شود (مطابق زیربند ۶-۱-۳-۱).

۶-۲ پیش‌پوشش‌دهی لام‌ها

برای بهبود اتصال ژل آگارز به لام‌ها، آن‌ها با یک لایه نازک آگارز پیش پوشش داده شوند. قبل از پوشش‌دهی و برای حذف کامل چربی، لام‌ها یک شب در متانل غوطه‌ور شده و در هوا خشک شوند. لام تمیز شده عاری از گرد و غبار را با انتشار یک قطره (تقریباً µl ۵۰) آگارز پوشش‌دهنده گرم (مطابق زیربند ۴-۵) به‌وسیله لام دوم در عرض لام اول پیش پوشش داده و اجازه داده شود به مدت حدود ۳۰ دقیقه در هوا خشک شود. پیش پوشش دادن می‌تواند به روش غوطه‌ور کردن و تمیز کردن یک طرف لام با دستمال کاغذی نیز انجام شود. لام‌های پوشش داده شده، می‌توانند بدون گرد و غبار و به مدت چند هفته نگهداری شوند.

۶-۳ ریخته‌گری ژل‌ها

µl ۱۰۰ سوسپانسیون سلولی را با حدود ml ۱ محلول ژل گرم (مطابق زیربند ۴-۶) مخلوط کنید. مقدار µl ۱۰۰ از این مخلوط را روی یک لام پیش پوشش داده شده منتقل کنید و به‌وسیله سر پیپت به طور سریع پخش شود. بلافاصله با یک لامل آن را بپوشانید به‌طوری که ژل پخش شود و حباب هوا ایجاد نشود. لام را روی یخ به مدت ۵ دقیقه قرار دهید تا ژل آگارز جامد شود. گوشه لامل را با سر یک اسکالپل حرکت دهید و با حرکت آرام لام، لامل را از آن دور کنید. ژل باید بدون حباب باشد. چندین لام به‌طور موازی با همان محلول ژل می‌توانند آماده شوند.

۶-۴ لیز سلول‌ها

قطعات DNA در طی الکتروفورز تحت شرایطی که غشاهای سلول نفوذپذیر باشد، از سلول خارج می‌شوند. بنابراین، لیز سلول‌ها، پیش‌نیاز ضروری برای کاربرد آزمون سنجش دنباله است. لام‌های کاملاً آماده را در بافر لیز در یک ظرف رنگ‌آمیزی برای مدت ۵ دقیقه، برای سلول‌های حیوانی و حداقل مدت ۱۵ دقیقه، برای سلول‌های گیاهی در دمای اتاق غوطه‌ور کنید. لایه آگارز را لمس نکنید. (برای بررسی لیز کامل، سلول‌ها می‌تواند رنگ‌آمیزی شده و با یک میکروسکوپ مشاهده شوند. سلول‌های لیز شده انتشار DNA به خارج سلول را نشان می‌دهند).

۶-۵ مشروط‌سازی

لام‌ها را بعد از لیز سلولی در بافر الکتروفورز (مطابق زیربند ۴-۹) به‌مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور کنید.

۶-۶ الکتروفورز

لام‌ها را کنار هم، بدون فضای خالی و با انتهای سمباده‌ای به سمت کاتد، در اتاقک الکتروفورز افقی قرار دهید. تانک را با بافر الکتروفورز (مطابق زیربند ۴-۹) تا سطح تقریباً ۲ mm تا ۴ mm بالای لام‌ها پُر کنید (لام‌ها را جابه‌جا نکنید). الکتروفورز را در دمای اتاق با ظرفیت ۲ V/cm (ولتاژ به‌کار رفته تقسیم بر مسافت بین الکترودها) برای مدت ۲٫۰ دقیقه هدایت کنید. بعد از این‌که جریان قطع شد، لام‌ها را به‌دقت از تانک خارج و در آب به‌مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور کنید. لام‌ها را حدود یک ساعت در هوای اتاق قرار دهید تا خشک شوند یا آن‌ها را در آون آزمایشگاه و در دمای ۴۰ ^{o}C تا ۵۰ ^{o}C خشک کنید.

۶-۷ رنگ‌آمیزی

۶-۷-۱ رنگ‌آمیزی با رنگ‌های فلورسنت

لام‌ها بلافاصله قبل از مشاهده باید رنگ‌آمیزی شوند چون در طی نگهداری، رنگ محو می‌شود.

۶-۷-۱-۱ آکریدین اورنج

لام‌ها را در محلول رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج (مطابق زیربند ۴-۱۱-۲) به‌مدت ۳ دقیقه تا ۵ دقیقه غوطه‌ور کنید. لام‌ها را با فرو بردن در آب به مدت ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه شستشو دهید. قبل از مشاهده با میکروسکوپ فلورسانس، روی لام مرطوب یک لامل قرار داده و آب اضافی را پاک کنید. سلول‌ها را بلافاصله مشاهده کنید، زیرا خشکی لام‌ها باعث اختلال در مشاهده سلول‌ها می‌شود.

لام‌ها را در معرض نور زیاد قرار ندهید، زیرا ممکن است محوشدگی ایجاد شود. رنگ‌آمیزی زیاد ممکن است باعث ازدیاد رنگ فلورسانس زمینه شود که می‌توان آن را با شستشوی بیشتر، کاهش داد.

۶-۷-۱-۲ پروپیدیوم یدید

لام‌ها را در محلول رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یدید (مطابق زیربند ۴-۱۱-۴) به‌مدت ۵ دقیقه تا ۱۰ دقیقه غوطه‌ور کنید. مطابق با روش آکریدین اورنج شستشو و ادامه داده دهید (مطابق زیربند ۶-۷-۱-۱).

۶-۷-۱-۳ اتیدیوم بروماید

همان روش پروپیدیوم یدید را استفاده کنید (مطابق زیربند ۶-۷-۱-۲).

۶-۷-۲ رنگ‌آمیزی نقره

لام‌ها را در محلول تثبیت کننده A (مطابق زیربند ۴-۱۱-۷-۲) به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور کنید. حدود یک دقیقه با آب شستشو دهید. ژل را به‌مدت یک ساعت در آون و در دمای ۴۰ ^{o}C تا ۵۰ ^{o}C یا در هوا و دمای اتاق خشک کنید (برای خشک شدن ژل می‌توان آن را به‌مدت یک شب در دمای اتاق قرار داد). لام‌ها را در محلول رنگ‌آمیزی D (مطابق زیربند ۴-۱۱-۷-۵) به‌مدت ۱۰ دقیقه تا ۲۰ دقیقه غوطه‌ور کنید. مرحله

رنگ‌آمیزی را یک یا دو بار با محلول رنگ‌آمیزی تازه D و به مدت ۵ دقیقه تا ۱۰ دقیقه تکرار کنید تا رنگ قهوه‌ای مایل به خاکستری روی لام‌ها ظاهر شود. حدود یک دقیقه با آب شستشو دهید. واکنش رنگ‌آمیزی را با محلول متوقف کننده E (مطابق زیربند ۴-۱۱-۷-۶) به مدت ۵ دقیقه متوقف کنید و دوباره حدود یک دقیقه با آب شستشو داده و لام‌ها را در دمای اتاق خشک کنید. رنگ این لام‌های رنگ‌آمیزی شده محو نمی‌شود و می‌توانید با میکروسکوپ بعد از مدت نگهداری طولانی مشاهده کنید.

۶-۸ شناسایی

برای مشاهده لام‌های رنگ‌شده با آکریدین اورنج یک میکروسکوپ فلورسانس با فیلتر برای مثال ۴۶۰ nm تا ۴۸۵ nm (القای نور آبی) لازم است. DNA رنگ شده (دو رشته‌ای) نور سبز می‌دهد، در صورتی‌که زمینه و باقی‌مانده‌های سلولی نارنجی ظاهر می‌شوند.

برای لام‌های رنگ‌شده با پروپیدیوم یدید یا اتیدیوم بروماید یک میکروسکوپ فلورسانس با یک فیلتر برای مثال ۵۱۵ nm تا ۵۶۰ nm (القای نور سبز) و یک فیلتر ممانعتی در ۵۹۰ nm لازم است. رنگ منتشر شده از DNA رنگ شده قرمز است.

برای لام‌های رنگ‌شده با نقره، می‌توان از هر نوع میکروسکوپ عبوری استاندارد، استفاده کرد.

۷ ارزیابی

ارزیابی با استفاده از مشاهده لام‌ها با یک میکروسکوپ انجام می‌شود و صدها سلول را در چند دقیقه می‌توان مشاهده کرد. الگوی ایجاد شده توسط DNA رنگ‌آمیزی شده بعد از الکتروفورز به تیمار قبلی سلول‌ها بستگی دارد. پرتودهی باعث قطعه قطعه شدن DNA می‌شود، بنابراین دنباله‌ها مشاهده خواهند شد. سلول‌های آسیب ندیده به‌صورت هسته‌های دست‌نخورده بدون دُم یا فقط با کمی دُم ظاهر می‌شوند، به شکل‌های ب-۱، ب-۲ و ب-۳ پیوست **ب** مراجعه شود.

الگوی دنباله و توزیع در عرض لام را در ابتدا با بزرگ‌نمائی کم (۱۰۰ ×) بررسی اجمالی و ارزیابی کنید. دنباله‌ها ممکن است متعاقباً با جزئیات بیشتر در بزرگ‌نمائی بالاتر (۲۰۰ × یا ۴۰۰ ×) آزمایش شوند. با دُزهای پرتودهی استفاده شده در پرتودهی مواد غذائی، قطعه قطعه شدن DNA کاملاً گسترده به دست می‌آید. بنابراین نمونه‌های پرتودهی شده، سلول‌های دست خورده و فقط دنباله‌ها را نشان خواهند داد، در حالی‌که نمونه‌های پرتودهی نشده در عمل همیشه مقادیری سلول‌های واقعاً آسیب ندیده بدون دُم یا با کمی دُم را نشان خواهند داد. با وجودی که تعدادی سلول‌های با اشکال متفاوت یا طول دنباله‌های متفاوت ممکن است در نمونه‌های پرتودهی نشده مشاهده شود، ولیکن وجود سلول‌های واقعاً آسیب ندیده، مشخصه آن است.

این تصمیم کیفی، که آیا مواد غذایی با پرتو یون‌ساز تیمار شده یا خیر، در مجموع می‌تواند فقط از طریق بازرسی چشمی لام با میکروسکوپ انجام شود. اغلب، فقط با یک نظر اجمالی، نمونه‌ها به‌عنوان پرتودهی شده یا پرتودهی نشده، طبقه‌بندی می‌شوند. اندازه‌گیری عینی الگوی دنباله‌ها با استفاده از یک تحلیلگر تصویر ممکن است به‌دست آید. از سنجش طول دنباله یا ناحیه یا دُم لحظه‌ای[1] یا سایر سنجش‌های متفاوت محتوی DNA در سر یا دُم دنباله، ممکن است اطلاعات بیشتری حاصل شود (به منابع [۷]، [۸]، [۳۵] و [۳۶] کتاب‌نامه مراجعه شود).

یادآوری- ارزیابی دُز پرتودهی می‌تواند از طریق مقایسه نمونه با یک سری لام‌های مرجع از نمونه‌های پرتودهی شده با دُزهای مشخص متفاوت انجام شود. این اطلاعات از مواد غذایی مورد تحقیق با دُزهای پرتودهی مشخص به دست آورده می‌شوند (به‌طور ایده‌آل برای اطمینان از شرایط یکسان لام‌های مرجع باید همراه با نمونه‌های نامعلوم، مورد آزمایش قرار داده شوند).

۸ محدودیت‌ها

در اصل، سنجش دنباله DNA ممکن است برای آشکارسازی هر ماده غذایی دارای DNA استفاده شود. سنجش دنباله قبلاً، به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تعدادی مواد غذایی هم با منشأ حیوانی، مانند گوشت جوجه، اُردک، بلدرچین، قرقاول، خوک، گراز، گاو، گوساله، بره، آهو، ماهی (قزل‌آلا و سالمون) و هم مواد غذایی با منشأ گیاهی مانند بادام، انجیر، عدس، دانه سویا، دانه‌های لوبیای کاروایکا و ماکاکار[2]، توت‌فرنگی، گریپ‌فروت، دانه کتان، دانه‌های کُنجد، دانه‌های آفتابگردان، فلفل قرمز، استفاده شده است.

تأکید می‌شود که سنجش دنباله به‌عنوان یک آزمون غربال‌گری عمل می‌کند و لازم است نتایج آن توسط روش اختصاصی دیگری که مختص پرتودهی است، تأیید شود، زیرا قطعه قطعه شدن DNA ممکن است به روش‌های دیگری هم حاصل شود (برای مثال به دانه‌های خردل همان‌طوری که در این بند شرح داده شده، مراجعه شود).

هر نوع ماده غذایی جدید باید قبل از این‌که نمونه‌های نامعلوم آنالیز شوند مورد آزمون واقع شود: محلول لیز و زمان تیمار، مانند زمان الکتروفورز و قدرت میدان را می‌توان به‌منظور مهاجرت[3] کافی DNA در ژل تغییر داد.

از آن‌جائی که در حال حاضر، دانش الگوهای دنباله DNA برای مواد غذایی مختلف هنوز محدود است، لذا استفاده از محصولات با منابع متفاوت برای به دست آوردن تجربیات تغییرپذیری الگوهای دنباله، مفید خواهد بود. همچنین توصیه می‌شود اثر متغیرهای زمان نگهداری و پرتودهی بیشتر مطالعه شوند. به‌علاوه آماده‌سازی سوسپانسیون‌های سلول مرحله مهمی است زیرا پیش‌نیاز ضروری برای کاربرد سنجش دنباله

1- Tail moment
2- Carioca and macacar beans
3 - Migration

است. برای برخی مواد غذایی، مانند پاپایا[1]، تمبر هندی (به منبع [۳۲] کتاب‌نامه مراجعه شود) مقدار زیاد بقایای سلول در الگو دنباله مداخله ایجاد می‌کنند و برخی مراحل اضافی در آماده‌سازی سوسپانسیون سلول برای رسیدن به یک زمینه مناسب لازم است. برای برخی محصولات دیگر، مانند بعضی مغزها، ادویه‌ها، ماهی‌ها ممکن است به دست آوردن سلول‌های مناسب، مشکل باشد (به منابع [۳۱] و [۳۲] کتاب‌نامه مراجعه شود). برای غذاهای حرارت داده شده، به علت آسیب وسیع ناشی از حرارت، هیچ سلولی در دسترس نخواهد بود. بنابراین، معمولاً هیچ سلول مناسبی نمی‌تواند برای میگو سریع پخته شده یا جوجه پخته شده (با ماکروویو) یافت شود (به منبع [۶] کتاب‌نامه مراجعه شود).

در مورد گوشت، بسته به شرایط نگهداری (دما و زمان بین کشتار تا انجماد) گوشت تازه و تجزیه طبیعی (آنزیمی) DNA اتفاق افتاده، باید قطعه قطعه شدن DNA تشخیص و تأیید شود (به منبع [۳۷] کتاب‌نامه مراجعه شود). دنباله‌ها در این موارد اشکال متفاوتی دارند. حضور تعداد زیاد سلول‌ها نشان می‌دهد تجزیه پیشرفته DNA ممکن است علامتی برای شرایط نگهداری نامناسب باشد. همچنین انجماد و رفع انجماد مکرر گوشت باعث ایجاد آسیب‌های زیاد به DNA (قطعه قطعه شدن) می‌شود. این الگوها مشابه با الگو به دست آمده از تجزیه طبیعی DNA هستند و معمولاً می‌توانند از نمونه‌های پرتودهی شده دارای الگوی همگن قابل تشخیص باشند (به منبع [۶] کتاب‌نامه مراجعه شود). یکی از محدودیت‌های روش سنجش دنباله این است که اگر همه سلول‌ها تجزیه پیشرفته DNA را نشان دهند، به هیچ عنوان نمی‌توان پرتودهی نمونه را تعیین کرد.

محدودیت دیگر می‌تواند لیز ناکافی سلول‌ها باشد که منجر به نفوذپذیری غشا شده، این نفوذپذیری باعث مهاجرت قطعات DNA به خارج از هسته می‌شود. در تجربیات اولیه (به منابع [۴]، [۵]، [۱۵]، [۱۷]، [۱۹] و [۲۰] کتاب‌نامه مراجعه شود) لیز ناکافی با غلظت فقط ٪ ۰٫۱ سدیم دودسیل سولفات (SDS) انجام می‌شد. با افزایش غلظت SDS تا ٪ ۲٫۵ این مشکل حداقل برای سلول‌های حیوانی مرتفع شد (به منبع [۶] کتاب‌نامه مراجعه شود). برای برخی سلول‌های گیاهی طول مدت لیز باید افزایش می‌یافت، مانند سویا یا گریپ فوروت از ۳۰ دقیقه تا ۶۰ دقیقه افزایش یافت (به منابع [۶]، [۲۶] و [۳۰] کتاب‌نامه مراجعه شود). برای برخی محصولات گیاهی دیگر مانند اسپورهای قارچ خوراکی *آگارسیوس بیسپوروس*[2]، لیز دیواره سلولی انجام نمی‌شود (به منابع [۶] و [۱۹] کتاب‌نامه مراجعه شود) و بنابراین، سنجش دنباله نمی‌تواند استفاده شود. احتمالاً، لیز ناکافی دلیلی برای مشاهده سلول‌های دست‌نخورده در نمونه‌های پرتودهی شده است، مانند گیاهان خانواده نخود خشک، خلال بادام (به منبع [۲۸] کتاب‌نامه مراجعه شود)، لوبیا قرمز، تمبر هندی (به منبع [۳۲] کتاب‌نامه مراجعه شود). محلول‌های لیز قوی‌تر یا مدت طولانی گرم‌خانه گذاری ممکن است این مشکل را کاهش دهد.

1- Papaya
2- Agaricus bispors

برای برخی مواد غذایی آماده‌سازی سلول می‌تواند انجام شود اما در تمایز بین نمونه‌های پرتودهی شده و پرتودهی نشده مشکلاتی به‌وجود می‌آید، مانند برخی مغزها، برخی دانه‌ها یا برخی ادویه‌ها (به منبع [۳۱] کتاب‌نامه مراجعه شود). همچنین این مشکلات برای مواد غذایی پرتودهی شده با دزهای پایین پرتو، مانند پیاز و سیب‌زمینی (به منابع [۶] و [۳۲] کتاب‌نامه مراجعه شود) مشاهده می‌شود. احتمالاً با استفاده از آنالیز تصویر پیچیده می‌توان به تشخیص کمک کرد، اما فقط استفاده از بازرسی چشمی برای قضاوت این‌که آیا نمونه پرتودهی شده یا نه، کافی نیست.

مورد خاصی در دانه‌های خردل مشاهده شد که یک الگو دنباله برای نمونه پرتودهی شده با دنباله‌های واضح و سلول‌های دست خورده، نشان داد. این نمونه به‌وسیله ترمولومینسانس مورد آزمون قرار گرفت (به استاندارد EN 1788 مراجعه شود)، اما مشخص شد که پرتودهی نشده است. همچنین قابلیت جوانه‌زنی دانه‌های خردل نشان داد که تیمار پرتودهی انجام نشده است (به منبع [۶] کتاب‌نامه مراجعه شود). یک نمونه ارزن با مشکلات مشابه مواجه شد. با این وجود فقط دنباله‌ها می‌توانند در نمونه مشاهده شوند، سایر روش‌های آشکارسازی شبیه سنجش‌های ترمولومینسانس (به استاندارد EN 1788 مراجعه شود) یا تشکیل هیدروکربن از قسمت لیپیدی مواد غذایی (به استاندارد EN 1784 مراجعه شود) مشخص می‌کند که نمونه پرتودهی نشده است (به منبع [۳۸] کتاب‌نامه مراجعه شود). احتمالاً وضعیت رشدی دانه‌ها که در دوره خواب[1] باشند یا نباشند، می‌تواند نقشی داشته باشد.

۹ صحه‌گذاری

به پیوست **الف** مراجعه شود.

۱۰ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید حداقل حاوی موارد زیر باشد:

۱۰-۱ اطلاعات برای شناسایی نمونه؛

۱۰-۲ ارجاع به این استاندارد ملی؛

۱۰-۳ تاریخ و روش اجرایی نمونه‌برداری (اگر مشخص باشد)؛

۱۰-۴ تاریخ پذیرش؛

۱۰-۵ تاریخ آزمون؛

1- Dormancy

۱۰-۶ نتایج آزمون؛

۱۰-۷ نکات خاصی که در طول آزمون دیده می‌شوند؛

۱۰-۸ هر عملیاتی که در این روش مشخص نشده یا اختیاری لحاظ شده است و ممکن است بر نتایج اثر داشته باشد؛

۱۰-۹ یک مستند مناسب، برای مثال فتومیکروگراف‌های[1] با فیلم‌های سیاه و سفید یا رنگی (ASA ۴۰۰ یا بیشتر). همچنین از تجهیزات آنالیز تصویر نیز می‌توان برای مستندسازی استفاده کرد.

1- Photomicrographs

پیوست الف

(الزامی)

صحه‌گذاری

الف-۱ این استاندارد بر اساس مطالعات بین آزمایشگاهی با مواد غذایی حیوانی (جوجه، خوک) (به منابع [۹] تا [۱۱] کتاب‌نامه مراجعه شود) و مواد غذایی گیاهی (به منابع [۶] و [۱۲] کتاب‌نامه مراجعه شود) تدوین شده است.

همچنین این مطالعات بر روی چندین نوع ماده غذایی دیگر نیز، با موفقیت انجام شده است (به منابع [۱۳] تا [۳۲] کتاب‌نامه مراجعه شود).

الف-۱-۱ مواد غذایی با منشأ حیوانی

در یک آزمون بین آزمایشگاهی که از طرف اداره کل ملی غذای سوئد[1] سازمان‌دهی شده بود، ۹ آزمایشگاه شرکت کننده، سه نوع سوسپانسیون سلولی کدگذاری شده که از مغز استخوان جوجه، بافت ماهیچه خوک و ماهیچه جوجه که پرتودهی شده و پرتودهی نشده تهیه شده بودند را بررسی کردند. دُزهای پرتودهی بین ۰ KGy، ۱ KGy، ۲٫۵ KGy، ۳ KGy، و ۵ KGy متغیر بودند. از کل ۱۶۲ نمونه ارسال شده، نتایج صحه‌گذاری شده از ۱۴۸ نمونه گزارش شد. از این‌ها، ۱۳۸ مورد صحیح تشخیص داده شدند. از ۱۰۶ نمونه پرتودهی شده ۹۹ مورد صحیح تشخیص داده شد، درحالی‌که ۳۹ تا از ۴۲ مورد پرتودهی نشده به‌طور صحیح تقسیم‌بندی شدند، به جدول الف- ۱ مراجعه شود (به منبع [۱۱] کتاب‌نامه مراجعه شود).

1- Swedish National Food Administration

جدول الف- ۱- داده‌های بین آزمایشگاهی برای جوجه و خوک

محصول	تعداد کل نمونه‌ها	تعداد نمونه‌ها (نتایج صحه‌گذاری شده)[a]	تعداد نمونه‌های صحیح تشخیص داده شده	تعداد نمونه منفی کاذب [b]	تعداد نمونه مثبت کاذب [c]
مغز استخوان جوجه	۵۴	۵۴	۵۲	۱	۱
ماهیچه جوجه	۵۴	۴۶	۴۲	۳	۱
ماهیچه خوک	۵۴	۴۸	۴۴	۳	۱
همه موارد	۱۶۲	۱۴۸	۱۳۸	۷	۳

[a] هیچ نتیجه‌ای برای موارد فاقد نمونه گزارش نشده است.
[b] منفی کاذب نمونه‌های پرتودهی‌شده که به‌عنوان پرتودهی‌نشده تعریف شده‌اند.
c مثبت کاذب نمونه‌های پرتودهی‌نشده که به‌عنوان پرتودهی‌شده تعریف شده‌اند.

برخی آزمایشگاه‌ها در زمان این برنامه مشترک، مشخص شده که تجربه زیادی در مورد سنجش دنباله نداشتند. با این وجود هر آزمایشگاهی یک سری نمونه‌های مرجع از مغز استخوان جوجه پرتودهی شده با دَزهای ۰ KGy، ۱ KGy، ۳ KGy، یا ۵ KGy و برچسب‌دار با دُز داده شده، دریافت کرد، مشکلاتی با این روش جدید در برخی از آزمایشگاه‌ها تجربه شده است. به‌هرحال شش آزمایشگاه به‌طور موفقیت‌آمیزی همه نمونه‌ها را به‌طور صحیح شناسایی کردند.

الف-۱-۱ مواد غذایی با منشأ گیاهی

یک برنامه مشترک دیگر با انواع گیاهان، مانند بادام، انجیر، عدس، تخم کتان (تخم بزرک)، فلفل قرمز، دانه کنجد، سویا و دانه آفتاب‌گردان انجام شد. نمونه‌های کدگذاری شده، پرتودهی نشده یا پرتودهی شده با دُزهای ۰٫۲ KGy، ۱ KGy یا ۵ KGy بودند. شرکت‌کنندگان علاوه بر ۲۰ نمونه کدگذاری شده، یک سری دوازده‌تائی نمونه‌های مرجع با دُز پرتودهی مشخص دریافت کردند. چهار آزمایشگاه در این مقایسه بین آزمایشگاهی شرکت کردند. از کل ۷۸ جواب دریافت شده، ۷۴ مورد صحیح بود (٪ ۹۵). نتایج در جدول الف- ۲ نشان داده شده است.

جدول الف- ۲- داده‌های بین‌آزمایشگاهی برای سلول‌های گیاهی مورد آزمون (برای ۱۰ ماه نگهداری بعد از پرتودهی)

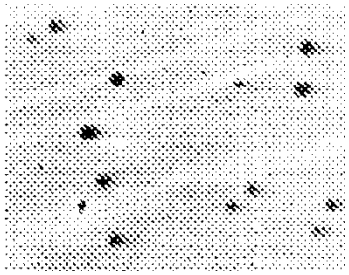
نمونه	تعداد کل نمونه‌ها	تعداد نمونه‌ها (نتایج صحه‌گذاری شده) [a]	تعداد تشخیص‌های صحیح	تعداد منفی کاذب [b]	تعداد مثبت کاذب [c]
پرتودهی‌نشده	۳۲	۳۱	۲۹	۰	۲
پرتودهی‌شده	۴۸	۴۷	۴۵	۲	۰
همه موارد	۸۰	۷۸	۷۴	۲	۲

[a] یک آزمایشگاه نتایج سویا را آماده نکرد زیرا مشکلاتی با شرایط لیز داشت.
[b] منفی کاذب نمونه‌های پرتودهی‌شده که به‌عنوان پرتودهی‌نشده تعریف شده‌اند.
[c] مثبت کاذب نمونه‌های پرتودهی‌نشده که به‌عنوان پرتودهی‌شده تعریف شده‌اند.

پیوست ب

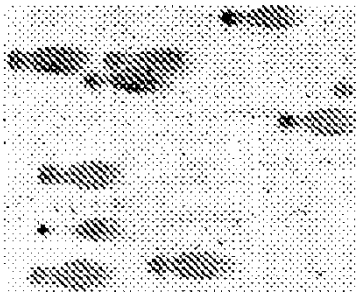
(آگاهی‌دهنده)

نمونه‌هایی از دنباله‌های مشخص DNA



شکل ب-۱ دنباله‌های مشخص[1] DNA از گوشت گاو یخ‌زده پرتودهی نشده با رنگ‌آمیزی نقره؛ آند سمت راست؛ عدسی شیئ میکروسکوپ ۲۰ ×.

شکل ب- ۲ دنباله‌های مشخص DNA از گوشت گاو یخ‌زده پرتودهی شده با دُز KGy ۲ با رنگ‌آمیزی نقره؛ آند سمت راست؛ عدسی شیئ میکروسکوپ ۲۰ ×.



شکل ب- ۳ دنباله‌های مشخص DNA از گوشت گاو یخ‌زده پرتودهی شده با دُز KGy ۷ با رنگ‌آمیزی نقره؛ آند سمت راست؛ عدسی شیئ میکروسکوپ ۲۰ ×.

1- Typical

پیوست پ

(الزامی)

تغییرات اعمال شده در این استاندارد ملی در مقایسه با استاندارد منبع

پ-۱ کلیات

تغییرات اعمال شده در متن استاندارد منبع در زیربندهای زیر ارائه شده است.

پ- ۱-۱ بخش‌های جایگزین شده

- هشدار پیش‌گفتار منبع، با «هشدار ۱» قبل از هدف و دامنه کاربرد استاندارد جایگزین شده است.

- پاراگراف آخر بند ۱ منبع، با «یادآوری» هدف و دامنه کاربرد استاندارد جایگزین شده است.

- بند ۹ منبع با عنوان «صحه‌گذاری»، با پیوست **ب** جایگزین شده است.

پ- ۱-۲ بخش‌های اضافه شده

- «مقدمه» اضافه شده است.

- «هشدار ۲» قبل از هدف و دامنه کاربرد استاندارد اضافه شده است.

- پیوست الزامی **ب** اضافه شده است.

- پیوست الزامی **پ** اضافه شده است.

کتاب‌نامه

[1] Ostling, 0 , and Johanson, K. J. *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Comm*., 1984, 123, 291-298.

[2] Ostling, 0., and v.Hofsten, B.: *Radiation-induced DNA strand breaks in single cells.: Health Impact, Identification, and Dosimetry of Irradiated Foods. Report of a WHO Working Group. Edited by B6gl, K.W., Regulla, D.F., and Suess, M.J. Bericht des lnstituts fur Strahlenhygiene des Bundesgesundheitsamtes. 1988. ISH-125, Neuherberg: lnstitut fur Sti-ahlenhygiene des Bundesgesundheitsamtes*, 305-307.

[3] Johanson, K. J.: *The microelectrophoresis method, a method for determination of irradiated food.: Potential New Methods of Detection of Irradiated Food. Edited by Raffi. J. J., and Belliardo, J.-J. BCR-lnformation.1991, Luxembourg: Commission of the European Community*, 1991, (Report EUR/13331/en), 52-54.

[4] Cerda, H , v Hofsten, B., and Johanson, K. J.: *Identification of irradiated food by microelectrophoresis of DNA from single cells. : Recent advances on detection of irradiated food. Edited by Leonardi, M., Raffi, J.J., and Belliardo. J.-J. BCR-lnformation. 1993, Luxembourg: Commission of the European Communities*. 1993, (Report EUR/14315/en), 401-405.

[5] Cerda, H.: *Analysis of DNA in fresh meat, poultry and fish. Possibility of identifying irradiated samples: Changes in DNA for the detection of irradiated food. Edited by Delincee, H., Marchioni, E., and Hasselmann, C BCR-lnformation. 1993, Luxembourg: Commission of the European Communities*. 1993, (Report EUR/15012/en) , 5-6.

[6] Cerda, H.. Delincee, H., Haine, H., and Rupp, H.: *The DNA --comet assay" as a rapid screening technique to control irradiated food Mutation Res* , 1997, 375, 167 -181.

[7] McKelvey-Martin, V J , Green. M. H. L , Schmezer, P , Pool-Zobel, B. L . *De Meo, M. P and Collins, A.: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. Mutation Res*., 1993, 288, 47 -63.

[8] Fairbairn, D. W., Olive, P. L., and O'Neill, K. L.: *The comet assay: a comprehensive review. Mutation Res*., 1995, 339, 37 -59.

[9] Delincee, H.: *Application of the DNA "Comet Assay" to detect irradiation treatment of foods.: Detection Methods for Irradiated Foods — Current Status. Edited by McMurray, C.H., Stewart, E.M., Gray, R., and Pearce, J. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK*, 1996, 349-354.

[10] Haine, H., Cerda, H., and Jones, L.: *Microgel electrophoresis of DNA to detect irradiation of foods.Food Sci.Technol.Today*, 1995 , 9, 139 -140.

[11] Cerda, H.: *Detection of irradiated frozen meat with the comet assay. lnterlaboratory test. J.Sci.Food Agric*., 1998, 76, 435 -442.

[12] Haine. H. E., *Cerda, H., and Jones, J. L.: Detecting irradiation of seeds using microgel electrophoresis (a collaborative trial). Campden & Chorleywood Food Research Association, R&D Report No.10. MAFF Project No*. 19456, 1995, 1-16.

[13] Nilson, H.. and Cerda, H.: *Analys av bestraalade livsmedel verksamhetsrapport under perioden 989/90 - 1992/93. Uppsala: National Food Administration*, 1993, SLV rapport 1993, nr. 17.

[14] Leth, T., Eriksen, H., Sjoberg, A.-M., *Hannisdal, A., Nilson, H., and Cerda, H.: Pavisr1ing af bestraling- to analysemetoder. Konsument Terna Nord*, 1994, 609, Copenhagen: *Nordic Council of Ministers*, 1994, 1-26.

[15] Haine. H. E., and Jones, J. L.: *The analysis of DNA fragmentation as a method for detecting irradiation of food. Campden Food and Drink Association, Technical Memorandum No*. 711, 1992, 57-59.

[16] Haine. H. E., and Jones, L.: *Microgel electrophoresis of DNA as a method to detect irradiated foods.Food Sci.Technol.Today*, 1994, 8, 103-105.

[17] Delincee, H.: *Micro gel electrophoresis of chicken DNA to detect radiation processing. Changes in DNA for the detection of irradiated Food. Edited by Delincee, H , Marchioni, E , and Hasselmann, C. BCR-lnformation*. 1993, Luxembourg: Commission of the European Communities, 1993, (Report EUR/15012/en), 7.

[18] Delincee, H., and Marchioni, E.: *l ntercomparison study with micro gel electrophoresis of DNA for detection of irradiated chicken: a preliminary trial.: Changes in DNA for the detection of irradiated food. Edited by Delincee. H., Marchioni. E., and Hasselmann, C. BCR-lnformation*. 1993, Luxembourg: Commission of the European Comm unities, 1993, (Report EUR/15012/en) , 8-14.

[19] Delincee, H.: *Detection of the irradiation treatment of food using micro gel electrophoresis of DNA.: New Developments in Food. Feed and Waste Irradiation. Edited by Schreiber, G. A., Helle, N., Bagi,K. W. Bericht des lnstituts fur Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes*, 1993, Berlin: Bundesgesundheitsamt, Soz-Ep Heft 16/1993, 112-116.

[20] Leffke, A .. Helle, N., Bagi, K.-W., and Schreiber, G. A.: *DNA-Electrophoresis of single cells - A method to screen for irradiated foodstuffs.: New Developments in Food, Feed and Waste Irradiation. Edited by Schreiber, G. A., Helle, N., Bagi, K. W. Bericht des lnstituts fur Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes*. 1993. Berlin: Bundesgesundheitsamt. Soz-Ep Heft 16/1993, 117-121.

[21] Ratti, J., Delincee, H , Marchioni. E., Hasselmann, C, Sjoberg, A-M., Leonardi. M., Kent, M., Bagi, K. W., Schreiber. G , Stevenson, H.. and Meier, W.: *Conceried action of the Community Bureau of Reference on methods of identification of irradiated foods. Final report. BCR-lnformation*. 1994, Luxembourg: Commission of the European Communities, 1994, (Report EUR/15261/en) , 1-119.

[22] Delincee, H.: *Detection of irrradiated food using simple screening methods. Food Sci.Technol.Today*, 1994, 8, 109-110.

[23] Delincee, H., Funk, P., and Roig, D.: *Fortschritte bei der Entwicklung von einfachen Schnelltests fur bestrahlte Lebensmittel.: Lebensmittelbestrahlung, 4. Deutsche Tagung. Edited by Brockmann, A., Erning, D., Helle, N., Schreiber, G. A. Bericht des lnstituts fur Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes*, 1994, Berlin: Bundesgesundheitsamt, SozEp-Heft 5/1994, 149-157.

[24] Delincee, H.: *Rapid and simple screening tests to detect the radiation treatment of food.Radiat.Phys.Chem*., 1995, 46, 677 -680.

[25] Delincee, H.: *DNA "Comet Assay" for rapid detection of irradiated food. Acta Alimentaria*, 1996, 25, 319-321.

[26] Koppen, G., and Cerda, H.: *Identification of low-dose irradiated seeds using the neutral comet assay. Lebensm.Wiss.Technol*., 1997, 30, 452-457.

[27] Cerda, H.: *Detection of irradiated fresh chicken, pork and fish using the DNA "Comet Assay". Lebensm.Wiss.Technol*., 1998, 31, 89-92.

[28] Khan, H.M., and Delincee, H. *Detection of Irradiation Treatment of Foods Using DNA '·Comet Assay". Radiat. Phys. Chem*., 1998. 52, 141-144.

[29] Villavicencio, A.L.C.H .. Mancini-Filho, J., and Delincee, H.: *Application of different techniques to identify the effects of irradiation on Brazilian beans after six months storage. Radiat. Phys. Chem*., 1998, 52, 161-166.

[30] Delincee, H.: Detection of Irradiated Food: *DNA Fragmentation in Grapefruits. Radiat. Phys. Chem*., 1998, 52, 135-139.

[31] Rupp, H., and Zoller, 0.: *Nachweis Mikroelektrophoreseverfahren*. 2001, in preparation. VOil Lebensm ittelbestrahlu ng mittels

[32] Khan, A.A., and Delincee, H.: *DNA ·'Comet Assay"' for detection of irradiated food 5. Deutsche Tagung Lebensmittelbestrahlung. Edited by Knorr, M., Ehlermann, DAE., and Delincee. H., Berichte der Bundesforschungsanstalt fur Ernahrung*. 1999, Karlsruhe: Bundesforschungsanstalt fur Ernahrung,BFE-R - - 99-01, 216-221.

[33] Delincee, H.: *Silver staining of DNA in the ··Comet Assay*". Comet Newsletter, July 1995.

[34] Cerda, H.: *DNA silver staining after electrophoresis in agarose gels: Changes in DNA for the detection of irradiated food. Edited by Delincee, H., Marchioni, E., and Hasselmann, C. BCR- lnformation*. 1993, Luxembourg: Commission of the European Communities. 1993, (Report EUR/15012/en), 6.

[35] Kent, C.R.H., Eady, J.J .. Ross, G.M., and Steel, G.G.: *The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay. lnt.J .Radiat.Biol*., 1995, 67, 655-660.

[36] Hellman, B., *Vaghef, H., and Bostrom. B.: The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. Mutat. Res*., 1995, 336, 123-131.

[37] Cerda, H., and Koppen, G.: *DNA degradation in chilled fresh chicken studied with the neutral comet assay. Z.Lebensm.Unters.Forsch*. A, 1998, 207, 22-25.

[38] Cerda, H., and Delincee, H.: *Identification of irradiated seeds using the comet assay*, 2001, in preparation.

[39] EN 1784, Foodstuffs— Detection of irradiated food containing fat— Gas chromatographic analysis of hydrocarbons.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۶۰۳۶: سال ۱۳۹۱، آشکارسازی مواد غذایی پرتودیده حاوی چربی بـا اسـتفاده از روش کروماتوگرافی گازی هیدروکربن‌ها- روش آزمون، با استفاده از استاندارد BS EN 1784 : 2003، تدوین شده است.

[40] EN 1785, Foodstuffs— Detection of irradiated food containing fat— Gas chromatographic/Mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۶۰۳۴: سال ۱۳۹۱، آشکارسازی مواد غذایی پرتودیده حاوی چربی با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی/ طیف‌نمایی جرمی ۲- الکیل سیکلو بوتانون‌ها- روش آزمون، با استفاده از استاندارد BS EN 1785 : 2003، تدوین شده است.

[41] EN 1786, Foodstuffs— Detection of irradiated food containing bone— Method by ESR-spectroscopy

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۶۷۱۱: سال ۱۳۸۴، میکروبیولوژی مواد غذایی- آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده حاوی مواد معدنی سیلیکاتی قابل تفکیک با استفاده از ترمولومینسانس- روش آزمون، با استفاده از استاندارد DIN/EN 1786 : 1997-03، تدوین شده است.

[42] EN 1787, Foodstuffs — Detection of irradiated food cellulose by ESR-spectroscopy

[43] EN 1788, Foodstuffs — Thermoluminescence detection of irradiated food from which silicate minerals can be isolated.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۵۸۳: سال ۱۳۸۴، میکروبیولوژی مواد غذایی- آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده حاوی مواد معدنی سیلیکاتی قابل تفکیک با استفاده از ترمولومینسانس- روش آزمون، با استفاده از استاندارد DIN/EN 1788 : 1997-03، تدوین شده است.

[44] EN 13708, Foodstuffs — Detection of irradiated food containing crystalline sugar by ESR spectroscopy.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۶۰۳۵: سال ۱۳۹۱، آشکارسازی مواد غذایی پرتو دیده حاوی بلورهای قند با استفاده از طیف‌نمایی تشدید اسپین الکترون- روش آزمون (ESR)، با استفاده از استاندارد BS EN 13708 : 2002، تدوین شده است.

[45] EN 13751, Foodstuffs —Detection of irradiated food by photostimulated luminescence.