

la place de Ca et Mg, on obtient des résultats similaires mais plus marqués; le cytoplasme est composé de grains assez nettement délimités qui sont probablement comparables aux grains de PALADE<sup>6</sup> et le nucléoplasme formé de

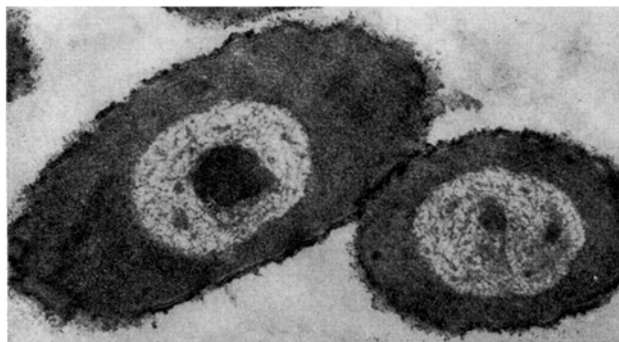


Fig. 3. *E. coli* K 12 S traité à l'aureomycine; fixé  $\text{OsO}_4$  2% pH 6,0; inclus au polyester. Le matériel nucléaire est très finement précipité. Grossissement 50 000  $\times$ .

«filaments» très fins d'un diamètre de 50 à 70 Å (fig. 4). Ces observations en accord avec celles d'autres auteurs<sup>7</sup> nous prouvent qu'il est absolument indispensable de continuer des expériences systématiques sur la fixation

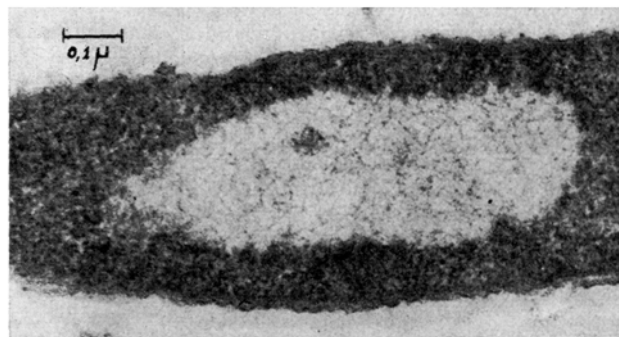


Fig. 4. Mêmes bactéries que celles de la figure 3, fixées au pH 6,0 avec adjonction de 0,03 M de  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ . Le noyau est formé de «filaments» d'environ 40 à 70 Å de diamètre. Grossissement 75 000  $\times$ .

et l'inclusion du matériel bactérien avant de discuter l'existence de mitoses avec fuseau et centrosomes<sup>8</sup>.

Ce travail a été effectué dans le cadre d'une recherche subventionnée par le Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique.

E. KELLENBERGER et A. RYTER

Laboratoire de Biophysique de l'Institut de Physique, Université de Genève, le 2 juin 1956.

### Zusammenfassung

In Abhängigkeit vom pH der Fixierungsflüssigkeit und vorhandener Kationen zeigt der Bakterienkern in Dünnschnitten entweder eine grobe oder aber eine feine Innenstruktur. Die als Chromosomenstrukturen gedeuteten Koagulationsbilder werden erneut in Frage gestellt.

<sup>6</sup> G. E. PALADE, J. Biophys. biochim. Cytol. 1, 59 (1955).

<sup>7</sup> C. F. ROBINOW, *Bact. Anatomy* (Cambridge University Press 1956), p. 181.

<sup>8</sup> E. D. DELAMATER, *Ann. Rev. Microbiol.* 8, 23 (1954).

### L'utilisation d'un copolymère du groupe des polyesters comme matériel d'inclusion en ultramicrotomie

L'inclusion au méthacrylate, introduite par NEWMANN, BORYSKO et SVERDLOW<sup>1</sup> est actuellement la méthode la plus répandue pour obtenir des coupes ultraminces<sup>2</sup>. Elle présente cependant certains inconvénients: La polymérisation irrégulière du méthacrylate conduit à des duretés variables, à la formation de bulles plus ou moins nombreuses suivant le matériel inclus ainsi qu'à des gonflements très fréquents du tissu allant jusqu'à l'éclatement des cellules.

Ces difficultés nous ont conduits à chercher d'autres milieux d'enrobage et nous nous sommes arrêtés à un «polyester» préparé à partir de l'anhydride maléique estérifié avec l'alcool polyhydrique (glycérol, hydroabiétyl, etc.). Pendant cette estérification l'anhydride donne naissance à la forme *cis*, l'acide maléique, et à son isomère, l'acide fumarique, la forme *trans*. La co-polymérisation a lieu en présence de styrène et elle est amorcée par addition de 0,7 à 1% de catalyseur (peroxyde de benzoyle) et de 0,5% d'accélérateur (naphtéate de Co)<sup>3</sup>. Les propriétés physiques de cette résine dépendent de l'équilibre entre les formes *cis* et *trans* de l'ester. La polymérisation doit commencer lentement et finir rapidement pour éviter les tensions internes: on maintient le «polyester» à 4° pendant 24 h puis on élève lentement la température jusqu'à 60° C afin d'obtenir ces résultats.

La méthode d'inclusion dans ce «polyester» est identique dans les grandes lignes à celle dans le méthacrylate<sup>2</sup>. Elle ne diffère que par une déshydratation à l'acétone à la place d'alcool éthylique, car le «polyester» est peu miscible à l'alcool. L'étude comparative entre ces deux déshydratations avec inclusion finale au méthacrylate nous a montré que ces séries parallèles donnent des résultats identiques. Le mélange d'esters monomères que nous avons employé est un liquide plus visqueux que le méthacrylate. Il se posait donc le problème de la pénétration à l'intérieur des cellules. Le passage brusque du tissu de l'acétone 100% au «polyester» pur provoque d'énormes contractions qui peuvent être presque totalement évitées si l'on introduit le tissu dans plusieurs mélanges d'acétone-«polyester» dont la proportion de «polyester» augmente progressivement.

Après fixation et lavage du tissu on déshydrate à l'acétone 25%, 50%, 75%, 95%, 100% pendant 30 à 60 min chacun. Puis on introduit 0,75% de catalyseur dans le «polyester» que l'on mélange ensuite en proportions variables avec l'acétone:

3 parties acétone sec — 1 partie «polyester» avec catalyseur, 30–60 min;

1 partie acétone sec — 1 partie «polyester» avec catalyseur, 30–60 min;

1 partie acétone sec — 3 parties «polyester» avec catalyseur, 30–60 min;

«polyester» seul avec catalyseur + 0,5% d'accélérateur, 30–60 min.

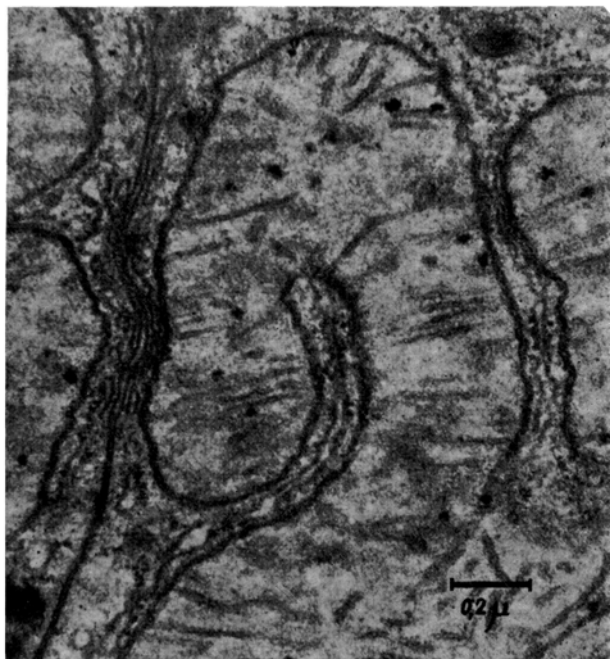
Ces quatre passages doivent se faire à 4° pour éviter un début trop rapide de la polymérisation. Le tissu est déposé au fond de capsules sèches de gélatine, remplies

<sup>1</sup> S. B. NEWMAN, E. BORYSKO et M. SVERDLOW, J. Res. nat. Bur. Stand. 43, 183 (1949).

<sup>2</sup> F. S. SJÖSTRAND, Z. wiss. Mikr. 62, 65 (1954).

<sup>3</sup> Les produits utilisés peuvent être obtenus au laboratoire Vincox, 10, avenue G. Werner, Genève, sous la désignation Vincox K3.

de «polyester» avec catalyseur et accélérateur, qui, enfermées dans une boîte contenant du desséchant, sont maintenues à 4° pendant 24 h, à 20° pendant 4 h et à 60° pendant 24 h.



Foie de souris fixé  $\text{OsO}_4$  2% pH 7,2, inclus dans le «polyester».  
Grossissement 50 000  $\times$ .

Le polymère est plus dur et plus cassant que le méthacrylate. Il se coupe cependant très facilement à 200 Å avec des couteaux de verre cassés sous un angle d'environ 30°. Des angles plus grands ainsi que des couteaux métalliques aiguisés selon la méthode de Sjöstrand<sup>2</sup> fournissent des coupes plissées et gondolées.

Nous avons employé un microtome Trüb-Täuber modifié<sup>4</sup>.

L'enrobage au «polyester» a été appliqué avec succès pour des fragments de foie (figure), pour des bactéries<sup>5</sup>, des gamètes d'Allomyces, de jeunes racines et feuilles de diverses plantes<sup>6</sup>. Les bactéries et les gamètes ont été inclus dans de l'agar 1,5% immédiatement après la fixation pour faciliter les manipulations ultérieures<sup>7</sup>. Le même procédé, appliqué aux feuilles, permet d'orienter ces dernières dans la position voulue et empêche presque totalement leur détachement du reste du matériel d'inclusion.

La polymérisation du «polyester» employé est extrêmement régulière car sur une trentaine de séries d'inclusions nous n'avons jamais observé ni bulles ni gonflement. Des inclusions comparatives de bactéries dans du méthacrylate et dans du «polyester» ont montré de nombreuses fois que les bactéries avaient éclaté dans le méthacrylate mais étaient restées intactes dans le «polyester».

Ce travail a pu être effectué grâce à une subvention fédérale pour l'encouragement des recherches scientifiques au moyen des crédits ouverts par la Confédération pour procurer du travail.

E. KELLENBERGER, W. SCHWAB et  
A. RYTER

Laboratoire de Biophysique, Institut de Physique, Université de Genève et Laboratoire Vinox, Genève, le 2 juin 1956.

#### Zusammenfassung

Zur Herstellung von Dünnschnitten für das Elektronenmikroskop wird eine neue Einbettungsmethode für biologisches Material beschrieben. An Stelle von Methacrylat wird ein Polyester verwendet, wodurch Unregelmässigkeiten in der Polymerisation vermieden werden können. Sukzessive Serieneinbettungen und Vergleichsstudien können mit grösserer Sicherheit ausgeführt werden.

### The Incorporation of Carbon Labelled Precursors into the Nucleic Acids of Various Tissues in the Intact Rabbit

We have previously described the pattern of incorporation of  $^{32}\text{P}$  into the nucleic acids of rabbit tissues *in vivo*<sup>1</sup>. Since most previous studies on the incorporation of carbon labelled precursors into the nucleic acids of the intact animal have been restricted to only a few tissues (for reviews see BROWN<sup>2</sup> and SMELLIE<sup>3</sup>), we have now examined the pattern of incorporation of carbon labelled formate, adenine and glycine into a series of rabbit tissues. For reasons of expense, the experiments were limited to a small number of animals and to a single incorporation time (2 h).

Female albino rabbits (about 1500 g) received 1 mc of the labelled precursor ( $^{14}\text{C}$ -formate, Na salt, or ( $2\text{-}^{14}\text{C}$ )-glycine or ( $8\text{-}^{14}\text{C}$ )-adenine sulphate) by intramuscular injection and the tissues were worked up to yield deoxyribonucleic acid (DNA), cytoplasmic ribonucleic acid (cRNA) and nuclear RNA (nRNA) as described by SMELLIE *et al.*<sup>1</sup>. The constituent bases after hydrolysis with 12 N  $\text{HClO}_4$  at 100° for 1 h (WYATT<sup>4</sup>) were separated by chromatography, using isopropanol- $\text{HCl}$ <sup>5</sup> as descending solvent and butanol ammonia<sup>6</sup> as ascending solvent. The bases were eluted and quantitatively estimated as described by CROSBIE *et al.*<sup>7</sup> and the radioactivity determined.

Wide variations were found in different animals but Table I shows some typical results for the purines and thymine. Incorporation into other pyrimidines was negligible. The pattern for DNA follows that found with  $^{32}\text{P}$ , specific activities being high in such tissues as appendix and bone marrow in which cellular proliferation

<sup>1</sup> R. M. S. SMELLIE, G. F. HUMPHREY, E. R. M. KAY, and J. N. DAVIDSON, *Biochem. J.* **60**, 177 (1955).

<sup>2</sup> G. B. BROWN and P. M. ROLL, Chapter 25, in *The Nucleic Acids* (edited by E. CHARGAFF and J. N. DAVIDSON, New York Academic Press).

<sup>3</sup> R. M. S. SMELLIE, Chapter 26, in *The Nucleic Acids* (edited by E. CHARGAFF and J. N. DAVIDSON, New York Academic Press).

<sup>4</sup> G. R. WYATT, *J. gen. Physiol.* **36**, 201 (1952).

<sup>5</sup> G. R. WYATT, *Biochem. J.* **48**, 584 (1951).

<sup>6</sup> W. S. MACNUTT, *Biochem. J.* **50**, 384 (1952).

<sup>7</sup> G. W. CROSBIE, R. M. S. SMELLIE, and J. N. DAVIDSON, *Biochem. J.* **54**, 287 (1953).

<sup>4</sup> E. KELLENBERGER, *Exper.* **12**, 282 (1956).

<sup>5</sup> E. KELLENBERGER et A. RYTER, *Exper.* même fascicule.

<sup>6</sup> Nous remercions vivement le Prof. E. HEITZ et le Dr. G. TURIAN qui ont fourni ce matériel végétal.

<sup>7</sup> E. KELLENBERGER et A. RYTER, *Schw. Z. Path. Bakt.* **18**, 1122 (1955).