

The cell is mounted on a special adjustable stand on the microscope stage so that the window can be located exactly in the field of view. The whole cell can be cleaned by short treatments with chromic acid, since attack on the balsam is slight and it is easy to replace the window from time to time. There is very little contact between the balsam and the solution in the cell and hence the danger of contamination is minimized. Suspensions can be introduced into the cell without removing it from the microscope.

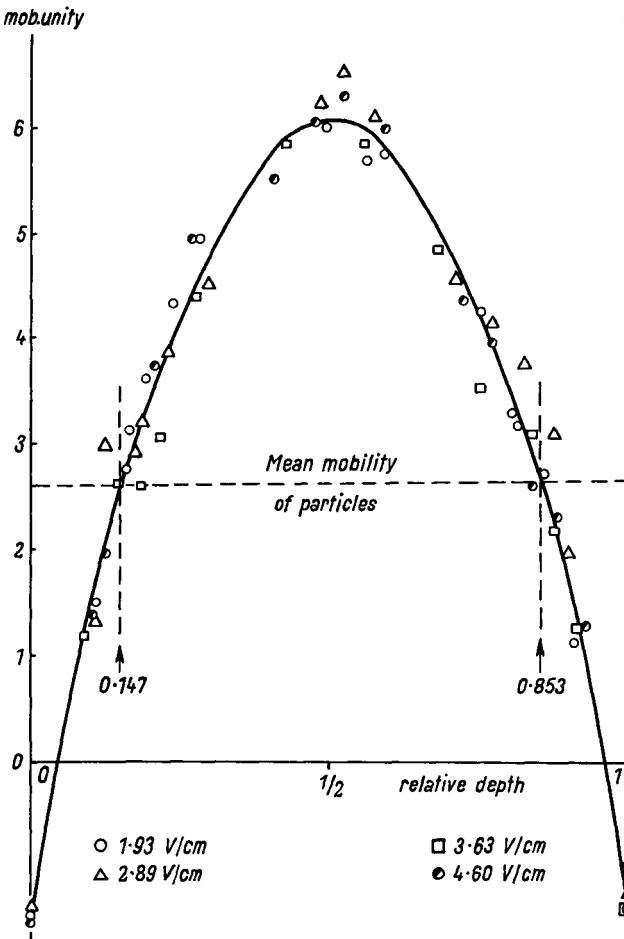


Fig. 2.—Mobility for different fieldstrengths in  $\text{KNO}_3 10^{-4} N$

In use, about 25 volts from a dry-battery gives a suitable rate of electrophoresis. The potential gradient is calculated from the applied voltage and length of the capillary with a small correction for the potential drop along the wider parts of the tube. (Alternatively, ABRAMSON's method of determining the gradient can be used<sup>1</sup>.) The platinum electrodes are suitable for work with dilute solutions up to about  $2 \times 10^{-2} N$ ; for more concentrated solutions the usual non-gassing electrode systems must be employed.

In carrying out a determination, the top and bottom of the cell are first located in the microscope and their readings on the microscope's fine-adjustment micrometer noted. The velocities of migration of particles at different depths are then determined, taking a mean of repeated timings back and forth on reversal of the field. A graph of mobilities as a function of depth is plotted and the mobilities at the 'stationary levels' (0.147 and 0.853 of the diameter from the sides) read off (Fig. 2). The two values may differ by several per cent because of the curvature

of the tube, but their mean will be sufficiently close to the correct value for a straight tube.

In all electrophoretic work with very dilute solutions it is advisable to repeat each series of determinations with a fresh portion of suspension to check against the possibility of contamination. Results reproducible to about  $\pm 2\%$  can be readily obtained with this apparatus.

Our thanks are due to the Schweizerische Nationalfonds for a grant to one of us (J. H. S.).

J. H. SCHENKEL and J. A. KITCHENER

Chemistry Department, Imperial College, London, July 28, 1958.

Zusammenfassung

Es wird eine modifizierte Glaselektrophoresezelle von zylindrischem Querschnitt beschrieben, die in jedem Laboratorium leicht hergestellt werden kann. Der Vorteil der Modifikation hinsichtlich der Fokussierung und der Beweglichkeit wird besprochen.

PRO EXPERIMENTIS

Culture *in vitro*  
d'un tissu nymphal de lépidoptère

Les processus de pathogénèse ou de métabolisme, sont de plus en plus étudiés sur cultures de cellules *in vitro*. De telles recherches sont envisagées depuis peu sur les insectes en raison de l'augmentation constante du nombre de leurs affections pathologiques connues.

Les tentatives de culture de tissus d'invertébrés sont peu nombreuses et un développement cellulaire n'a été que rarement observé<sup>1</sup>. Chez les insectes, l'émigration et la multiplication de fibroblastes ont été notées à partir de gonades femelles de larves.

Nous avons essayé de réaliser la culture de tissus provenant de nymphes de lépidoptères. Ce stade de la métamorphose représente en effet, un état physiologique particulier (lyse tissulaire accompagnée de phagocytose et formation des organes de l'imago, notamment de ceux de la reproduction).

Les cultures réalisées à partir de chrysalides du Lépidoptère *Bombyx mori* L., ont été faites en gouttes pendantes, en micro-tubes plats et en flacons à surface plane permettant l'observation pendant la culture<sup>2</sup>.

Le milieu très simplifié comprend pour 100 g d'eau bi-distillée:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	100 mg
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	300 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	350 mg
KCl . . . . .	300 mg
CaCl <sub>2</sub> . . . . .	100 mg
$\text{NaHCO}_3$ . . . . .	jusqu'à pH 6,5-6,7
Glucose . . . . .	100 mg
Hydrolysât de lactalbumine . . . . .	500 mg
Pénicilline . . . . .	20000 UI
Streptomycine . . . . .	5 mg

Cette solution est complétée de 10% d'hémolymphe de larves ou de nymphes de *B. mori*. Les chrysalides sont

<sup>1</sup> P. BOHUSLAV, Arch. exp. Zellforsch. 14, 139 (1933). – J. B. GATENBY, J. HILL et T. J. MACDOUGALD, Quart. J. micr. Sci. 77, 129 (1935). – W. TRAGER, J. exp. Med. 51, 501 (1935). – C. VAGO, Mikroskopie, 1958 (en cours d'impression). – C. VAGO et S. CHASTANG, Exper. 14, 110 (1958). – S. S. WYATT, J. gen. Phys. 39, 841 (1956).

<sup>2</sup> C. VAGO, Mikroskopie, 1958 (en cours d'impression).

conservées à 15°C pendant les 9 jours suivant leur formation, soit jusqu'à la fin de la lyse cellulaire afin d'obtenir le maximum de sang et le moins de débris possible.

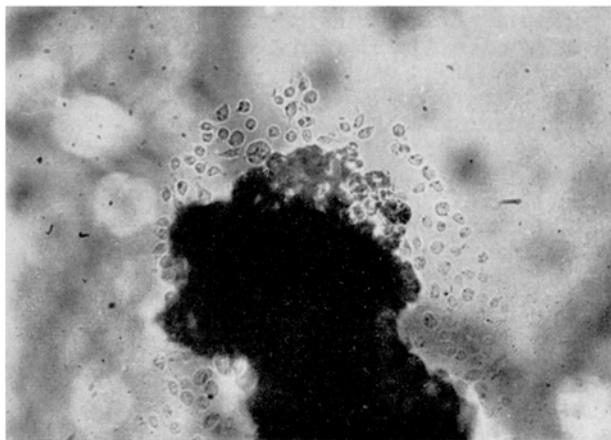


Fig. 1. Culture d'ovaire nymphal *Bombyx mori* L. 48 h. Emigration de fibroblastes et de cellules fusiformes. Contraste de phase: 850×.

L'hémolymphe est collectée en ampoules sans précautions d'asepsie. Elle est chauffée ensuite à 60°C pendant 5 min afin d'inactiver la tyrosinase et de permettre la filtration et la centrifugation à 7000 t/min pendant 20 min. Le surnageant est employé de plusieurs façons. Il peut être immédiatement mélangé au milieu et filtré avec celui-ci sur bougie Chamberland L<sub>3</sub> afin d'obtenir un milieu complet. Il peut également être filtré seul et conservé en ampoules scellées à 4°C pendant plusieurs mois. Dans ce cas, au moment de la préparation du milieu, il sera ajouté à ce dernier filtré à part. On peut enfin le congeler à -20°C et le filtrer avec le milieu au moment de l'emploi.

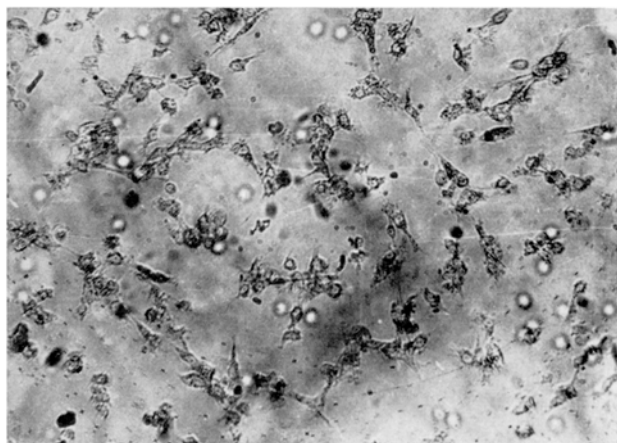


Fig. 2. La même culture au bout de 6 jours. Couche homogène de fibroblastes. Contraste de phase: 850×.

Le tissu mis en culture est un fragment d'ovaire prélevé aseptiquement sur chrysalide de formation récente quand les œufs ne sont encore que faiblement développés. La partie mince de la chaîne ovarienne est découpée aseptiquement en très petits morceaux dont le diamètre est inférieur à 1 mm.

Les explants d'ovaire conservent leurs mouvements de contraction pendant plus d'un mois. L'émigration des cellules commence au bout de 15 h et persiste avec aug-

mentation d'intensité périodique après chaque changement de milieu.

Les cellules forment un halo autour des fragments et couvrent au bout de 5 jours une plage correspondant à deux fois celle de l'explant. Après 11 jours, une grande surface est recouverte d'une façon homogène (Fig. 1 et 2).

Ces cellules sont du type fibroblaste. Elles conservent quelquefois une forme ovoïde ou fusiforme avec pseudopodes ramifiés et courts. La forme «fibroblaste» prédomine lorsque la culture s'étale sur une surface plane et le type «fusiforme» lorsque les cellules s'accumulent à la surface du milieu (Fig. 1). Notons que les cellules sont également fusiformes ou piriformes lorsqu'elles sortent du tissu ovarien pour émigrer dans le milieu. Elles s'arrondissent pendant la mitose.

A l'heure actuelle, les cultures ont été maintenues pendant plus de 40 jours avec changement de milieu tous les 4-5 jours. Le repiquage a également été réalisé.

Signalons que nous avons aussi obtenu la culture du tissu ovarien de nymphes, en employant comme milieu l'hémolymphe filtrée pure sans la mélanger à une solution physiologique. La contraction des fragments d'ovaire se maintient plusieurs semaines. L'émigration de fibroblastes et de cellules fusiformes est observée, mais les cellules sont assez vacuolisées.

La culture du tissu ovarien des nymphes de lépidoptères semble avoir un intérêt particulier pour le développement des méthodes de cultures de tissus d'insectes car les chrysalides offrent une source de tissus, disponible pendant une période sans doute variable selon les espèces, mais toujours incomparablement plus longue que les larves. Cet avantage est complété par la possibilité de stocker la matière première sans inconvénients, d'une part du fait de la diapause nymphale existant chez certaines espèces, d'autre part, grâce à la conservation à une température basse (4°C). Cet aspect est particulièrement intéressant pour les cultures en couches monocellulaires, possibilité en cours d'étude chez les invertébrés, que nous traiterons ultérieurement.

C. VAGO et S. CHASTANG

*Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Cytopathologie, Alès (France), le 7 juillet 1958.*

### Summary

Using a simplified medium, the composition of which is described in the text, cell cultures (fibroblast type) were obtained from nymphal ovarian tubes of *Bombyx mori*. The change in the form between fibroblasts and spindle cells is described. The preservation of activity of haemolymph congealed to -20° C for a long time is shown; the advantages of using nymphs for cultivating tissues in virological series are also noted.

## INFORMATION

### Corrigendum

H. M. HIRSCH: *Tumor-Isotimmunity*. Exper. 14, fasc.8, 269 (1958). The last sentence of the first paragraph from above, on page 270, second column, should read:

Antigens not present in normal host tissues have been reported in carcinogen-induced tumors by ZIL'BER *et al.*<sup>20</sup>, and NARTISSOV and ZIL'BER<sup>21</sup>, and WEILER<sup>22</sup> has reported that rat liver cell carcinoma lacked a liver-specific antigen.