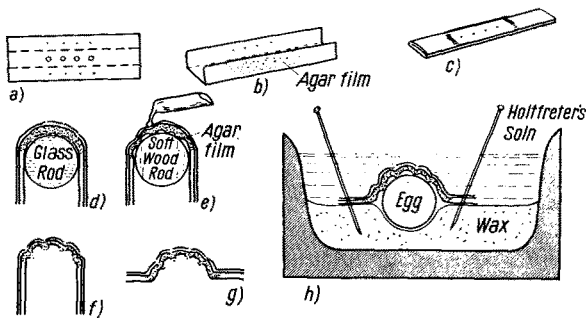


PRO EXPERIMENTIS

A Modified Vital Staining Technique for Amphibian Eggs

During a stay at the Hubrecht Laboratory, International Embryological Institute, Utrecht (Holland), the need arose for a technique facilitating the application of regular rows of vital stain marks of different size and spacing on amphibian eggs. The techniques used up till now are best suited for the application of single marks. The number of marks that can be held in position simultaneously is limited in these techniques. HASSA (Cf. NIEUWKOOP c. s. 1955)¹ used a thin collodion film with holes, which was fixed over the egg. By keeping a stained agar block on top of the film, the dye was allowed to pass through the holes in the film, resulting in a row of marks. The technique described here makes use of a strip of stained agar film which is made to protrude through holes in a strip of tin foil.



Various stages in the preparation of tin foil strip to hold stained agar film for vital staining of amphibian eggs.

A very thin agar film is made by pouring melted 3% agar on a clean, polished stainless steel plate. When dry, the film comes off automatically. It is then immersed for 24 h in a 1% solution of Nileblue sulphate, and dried again on the steel plate.

A strip of tin foil of about 15 mm long and 3–4 mm broad is cut out and divided longitudinally into three equal zones by lines (Figure a). Under a dissecting microscope provided with an ocular micrometer, a row of minute holes of proper spacing is made in the middle zone. The edges of the holes are smoothed with a glass rod with a ballend. In the lateral zones, at a level with the holes, small punctures are made, which will later serve as markers. The strip is now folded as shown in Figure b, sterilized in 70% alcohol (about 10 min), rinsed in sterile water, and placed with some water in the groove on a clean, sterile glass slide. A strip of stained agar film of the required size is cut out and placed in the groove. The sides of the tin foil strip are carefully folded one over the other and slightly pressed under another clean glass slide (Fig. c).

The tin foil strip with the agar strip inside is now curved smoothly around a glass rod of the same diameter as the egg (Fig. d). It is then transferred to a rod of soft wood of equal diameter, and, with a fine glass ball, depressions are made in the tin foil over the positions of the holes, indi-

cated by the punctures. Hereby the agar is made to protrude through the holes, and at the same time the parts between the holes become concave (Fig. e and f). Finally the strip is immersed in sterile water, so as to make the agar swell and protrude further.

The staining of the naked egg is illustrated by Figure h. The strip should be treated with gentle pressure only, and the surface of the tin foil should not make contact with the egg surface, since the latter tends to stick to the tin foil. The marks usually attain the required intensity in maximally 30 to 45 min.

With the necessary modifications, this technique may also be applied to the avian, and probably to the reptilian egg.

R. V. SHAH

Department of Zoology, M. S. University of Baroda (India), July 13, 1959.

Zusammenfassung

Es wird eine Methode beschrieben, die es ermöglicht, mit Hilfe eines gefärbten Agarfilms, der durch Löcher in Stanniopapier gepresst wird, am Amphibien-Ei regelmässige Reihen von Vitalfarbmarken zu setzen.

¹ P. D. NIEUWKOOP *et al.*, Origin and establishment of organization patterns in embryonic fields during early development in amphibians and birds, in particular in the nervous system and its substrate, I, Proc. Kon. Nederl. Akad. Wetensch. Amsterdam [C] 58, 2, 219 (1955).

PRO EXPERIMENTIS

Zur Wahl der organischen Lösungsmittel bei der Gewinnung von Chloroplasten in nichtwässrigem Milieu

Die präparative Isolierung morphologischer Zellen- und Gewebebestandteile kann in wässrigem und in nichtwässrigem Milieu (Behrens-Methode) vorgenommen werden. Beide Methoden haben Vor- und Nachteile. Während beim Arbeiten in wässrigem Milieu Fermente, Proteine und andere wasserlösliche Substanzen verloren gehen, wird in nichtwässrigem Milieu den morphologischen Zellbestandteilen ein Teil der Lipide entzogen.

Im Zusammenhang mit den kürzlich beschriebenen Arbeitsgängen zur Gewinnung von Chloroplasten in nichtwässrigem Milieu^{1–4} schien es uns von Bedeutung, den Lipidverlust zu ermitteln, welchen gefriergetrocknetes Blattpulver bei Suspension in verschiedenen organischen Solventien erleidet, um die organischen Lösungsmittel mit dem geringsten Lösungsvermögen für Lipide bei der Gewinnung von Chloroplasten heranzuziehen.

¹ M. BEHRENS und R. THALACKER, *Naturwissenschaften* 44, 621 (1957).

² U. HEBER, *Ber. dtsch. bot. Ges.* 70, 371 (1957).

³ C. R. STOCKING, *Plant Physiol.* 34, 56 (1959).

⁴ R. THALACKER und M. BEHRENS, *Z. Naturf.* 14b, 443 (1959).

Als Untersuchungsobjekte wählten wir *Eloдея canadensis*, Spinat- und Tabakblätter. Ausser den seither für die Gewinnung von morphologischen Zellbestandteilen aus tierischen und pflanzlichen Zellen benutzten organischen Lösungsmitteln, wie Äther, Chloroform, Benzol, Tetrachlorkohlenstoff, Petroläther, Cyclohexan und Hexan⁵⁻¹³, wurden noch einige andere Solventien mit in die Untersuchung einbezogen (Tabelle I).

Tabelle I

	<i>Eloдея canadensis</i> *	Spinat**	Tabak***
Pentan	11,4	19,4	21,4
Hexan	11,7	20,2	21,4
Heptan	11,9	20,2	20,1
Petroläther (bis 40°C) . .	10,8	20,2	21,4
Petroläther (40-60°C) . .	11,9	24,5	21,4
Petroläther (60-80°C) . .	11,9	23,0	20,1
Cyklohexan	17,8	23,4	38,6
Äther	32,7	37,1	45,5
Benzol	26,6	41,3	36,3
Toluol	30,2	30,9	39,9
Xylol	29,2	34,0	39,3
Chloroform			
(1% Äthanol enthaltend)	55,6	57,1	67,0
Tetrachlorkohlenstoff . .	19,9	38,5	31,9

* Junge Sprosse.

** Handelsware; die Mittelrippen wurden vor der Gefriertrocknung entfernt.

*** Bei dem untersuchten Tabak handelte es sich um die Sorte Havanna IIc. Es wurden junge Blätter von in Blüte stehenden Pflanzen benutzt. Mittelrippen und stark entwickelte Seitenrippen wurden vor der Gefriertrocknung entfernt

Lipidverlust (% Gesamtlipide) durch organische Lösungsmittel. 2 g gefriergetrocknete und pulverisierte Blätter bzw. Sprosse (*Eloдея*) wurden mit 100 ml Lösungsmittel 1 h bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nach Filtration wurde eine abgemessene Menge des Filtrates im Vakuum zur Trockne verdampft, der Rückstand im Vakuumexsikkator über konz. Schwefelsäure getrocknet und als Lipide gewogen. Bestimmung der Gesamtlipide: 0,5 g gefriergetrocknetes Blatt- bzw. Sprosspulver (*Eloдея*) wurden dreimal 30 min mit je 15 ml Methanol-Chloroform-Gemisch (3:1) am Rückflusskühler gekocht. Die filtrierten Extrakte wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mit kleinen Portionen (insgesamt 20 ml) einer siedenden Petroläther(40-60°C)-Chloroform-Mischung (1:1) extrahiert. Der Extrakt wurde durch Zentrifugieren vom Ungelösten getrennt und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde dann bis zur Gewichtskonstanz im Vakuum über konz. Schwefelsäure getrocknet

Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist die Höhe des Lipidverlustes nicht nur von der Art des Lösungsmittels, sondern auch von dem Untersuchungsmaterial abhängig. So werden der von uns als Ausgangsmaterial für die Chloroplastengewinnung gewählten *Eloдея canadensis* weniger Lipide entzogen als den Spinat- und Tabakblättern. Von den Solventien mit einem spezifischen Gewicht unter 1,0 lösen die aliphatischen Kohlenwasserstoffe (unter denen keine grösseren Differenzen bestehen) wenig Lipide, während von den beiden untersuchten Lösungsmitteln mit grösserem spezifischen Gewicht Tetrachlorkohlenstoff ein geringeres Lösungsvermögen als Chloroform besitzt. Da für die Isolierung von Chloroplasten in der Regel

Flüssigkeiten mit einem spezifischen Gewicht zwischen 1,25 und 1,40 benötigt werden, sind somit zur Herstellung des genannten spezifischen Gewichtsbereiches am günstigsten die Kombinationen Petroläther (Siedeber. bis 80°C), Pentan, Hexan oder Heptan mit Tetrachlorkohlenstoff; andere Kombinationen, insbesondere die von Äther mit Chloroform, sind weniger geeignet (Tab. II).

Tabelle II

Spezifisches Gewicht	Äther-Chloroform	Benzol-Tetrachlorkohlenstoff	Petroläther-(60-80°C)-Tetrachlorkohlenstoff
1,25	41,3	22,3	19,3
1,30	41,7	22,0	19,4
1,35	43,3	21,8	19,4
1,40	44,3	20,8	20,0

Eloдея canadensis. Lipidverlust (% Gesamtlipide) durch verschiedene organische Lösungsmittelgemische mit einem spezifischen Gewicht zwischen 1,25 und 1,40. 2 g gefriergetrocknete und pulverisierte Sprosse wurden mit 100 ml Lösungsmittelgemisch 1 h bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nach Filtration wurde eine abgemessene Menge des Filtrates im Vakuum zur Trockne verdampft und der im Vakuum über konzentrierte Schwefelsäure getrocknete Rückstand als Lipide gewogen. Bestimmung der Gesamtlipide siehe Tabelle I

Bei dem von uns beschriebenen Verfahren zur Gewinnung von Chloroplasten aus Blättern von *Eloдея canadensis*⁴ (Zerkleinern der gefriergetrockneten Sprosse und Anreichern der Chloroplasten in Petroläther (Siedeber. 60-80°C), Reinigung der Chloroplasten in einem spez. Gewichtsgradienten unter Verwendung von Petroläther-Tetrachlorkohlenstoff-Mischungen) wird dem Sprosspulver folgende Menge an Lipiden bzw. Lipidbestandteilen entzogen (Tab. III):

Tabelle III
% Gesamt-

Lipide	Lipid-P	Lipid-N	Chlorophyll
21,2	9,8	11,1	1,9

Verlust an Lipiden und Lipidbestandteilen bei der Gewinnung von Chloroplasten aus Blättern von *Eloдея canadensis*. N-Bestimmung nach KJELDAHL, Aufschluss der Substanz mit konzentrierter Schwefelsäure und Kaliumpermanganat nach BEET¹⁴. P-Bestimmung nach FISKE und SUBBAROW in der Modifikation von LOHMANN und JENDRASSIK¹⁵. Chlorophyllbestimmung nach ARNON¹⁶

⁵ M. BEHRENS, Hoppe-Seylers Z. 209, 59 (1932).

⁶ M. BEHRENS, Hoppe-Seylers Z. 232, 263 (1935).

⁷ R. FEULGEN, M. BEHRENS und S. MAHDHASSAN, Hoppe-Seylers Z. 246, 203 (1937).

⁸ M. BEHRENS, Hoppe-Seylers Z. 253, 185 (1938).

⁹ A. L. DOUNCE, G. H. TISHKOFF, S. R. BARNETT und R. M. FREER, J. gen. Physiol. 33, 629 (1950).

¹⁰ H. STERN und A. E. MIRSKY, J. gen. Physiol. 36, 181 (1952).

¹¹ V. ALLFREY, H. STERN, A. E. MIRSKY und H. SAETREN, J. gen. Physiol. 35, 529 (1952).

¹² H. STERN und A. E. MIRSKY, J. gen. Physiol. 37, 177 (1954).

¹³ E. R. M. KAY, R. M. S. SMELLIE, G. E. HUMPHREY und J. N. DAVIDSON, Biochem. J. 62, 160 (1956).

¹⁴ A. E. BEET, Nature 175, 514 (1955).

¹⁵ K. LOHMANN und L. JENDRASSIK, Biochem. Z. 178, 419 (1926).

¹⁶ D. I. ARNON, Plant Physiol. 24, 1 (1949).

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Unterstützung.

R. THALACKER und M. BEHRENS

Physiologisch-Chemisches Institut der Justus Liebig-Universität in Giessen, 22. Juli 1959.

Summary

For the isolation of chloroplasts in non-aqueous media the following organic solvents are suitable: pentane, hexane, heptane, petroleum ether and carbon tetrachloride. These solvents cause a minimum loss of lipids.

The loss of lipids and some lipid components of frozen-dried and ground shoots from *Elodea canadensis* during the isolation of chloroplasts in non-aqueous media (petroleum ether b. r. 60–80°C and petroleum ether-carbon tetrachloride mixtures) is reported.

PRO EXPERIMENTIS

Preparation of Subcellular Particles from Brain Tissue by a Filtration Technique¹

The chemistry and physiology of subcellular particles have been extensively studied during the past several decades. These particles are usually isolated by differential centrifugation of tissue homogenates². The present communication describes the isolation of two particulate subcellular fractions from homogenates of brain tissue by means of Millipore filters³, which are microscopic and submicroscopic sieves of cellulosic membranes with pores of precise, specified sizes. The particles in these two fractions have approximate size ranges, swelling properties and at least two biochemical properties that are similar to those of the large granules, prepared by differential centrifugation, to which the term 'mitochondria' is frequently applied.

Millipore filters have had several applications in the biological field. For example, they have been employed in the concentration of bacteria and viruses, which are in the size range of several classes of subcellular particles.

Methods. All operations in preparation of the subcellular fractions were carried out at 0°–4°C. 1 g of mixed grey and white matter from the cerebral hemispheres of Sprague-Dawley male rats was placed in sufficient 0.25 M sucrose solution to make the final volume 10 ml, and homogenization effected in a Dounce all glass homogenizer by 10 strokes with the loosely fitting plunger and 5 strokes with the tightly fitting plunger. The homogenate was passed successively through electrodeposited nickel screens⁴ of approximately 40 and 20 μ pore sizes. These filtrations removed tissue debris, whole cells and many nuclei. This is essential to avoid clogging of the filters with small pore size. Next the filtrate was passed through Millipore filter SM (pore size $5.0 \mu \pm 1.2 \mu$)⁵. Nuclei, red cells, and some of the largest rod shaped mitochondria were removed at this step. The filtrate was then passed through Millipore filter SS (pore size $3 \mu \pm 0.9 \mu$). This filtrate will be designated SSF. The residue on the SS filter disc was recovered by removing the disc from the filter holder, turning it upside down, replacing it in the holder and running 2 ml of 0.25 M sucrose through the

filtration apparatus, under suction. This resuspended residue is designated SSR. SSF was now put through the Millipore filter AA (pore size $0.80 \mu, \pm 0.05 \mu$). The residue on the disc, designated AAR, was removed as described previously.

Suction of minus 20–26 inches mercury vacuum was used at each filtration step. 4.7 cm filter discs were employed. The XX20 047 000 Hydrosol standard filter holder manufactured by the Millipore Corporation was used for support of the filter discs. The filter discs were placed directly on the wire screen. At 0°–4°C ambient temperature, great care must be exercised in manipulation to avoid producing minute cracks in the Millipore filters, especially when they are dry. Suction must be applied gently for the same reason. Failure to observe these precautions may lead to badly contaminated fractions.

Adenosine triphosphatase and nitrogen determinations were done by methods similar to those previously reported from this laboratory⁶. Cytochrome *c* oxidase determinations were done spectrophotometrically by the method of COOPERSTEIN and LAZAROW⁷.

Phase microscopy was used in optical study of the fractions. Sizes of the particles were estimated by means of a filar micrometer. Because of Brownian movement of the particles, these estimates are very difficult to make with accuracy and should be regarded as only rough approximations.

Swelling of the particles was studied by observing changes in their size under direct microscopic observation. Solutions of sucrose with osmotic strengths lower than that of the standard 0.25 M sucrose suspension media were run beneath the cover slip and changes in particle size were noted.

For the purposes of comparison with filtration fractions SSR and AAR, the subcellular fraction that sediments after centrifugation for 15 min at 12000 $\times$ gravity – the 'mitochondrial' fraction – was prepared from rat brain homogenate according to procedures previously described⁸. The fraction was not washed. It will be referred to as 12G15⁹.

Results. The two fractions SSR and AAR contain spherical, comma, and rod shaped particles morphologically indistinguishable in the phase microscope from the particles seen in the 12G15 or 'mitochondrial' fraction prepared by differential centrifugation. There was not a clear cut separation of particles with respect to size in the two fractions. In SSR there was a preponderance of the larger particles from approximately 2.5 to 4.0 μ in size. However, many of the smaller particles which are the main constituents of AAR were present in SSR. Rarely, a red cell was encountered in SSR. AAR consisted largely

¹ We are grateful to the David Baird Grant in Neurological Research of the United Cerebral Palsy Research and Educational Foundation, Inc. and to the National Institute for Neurological Diseases and Blindness, National Institutes of Health, United States Public Health Service (Grant B-305 C), for generous support of this work.

² R. R. BENSLEY and N. L. HOERR, *Anat. Rec.* **60**, 449 (1934).

³ Can be obtained from the Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts. In the early phase of our work some filters were supplied gratis. We are also indebted to their staff for helpful advice.

⁴ Kindly supplied gratis by the Pyramid Screen Corporation, Brookline, Massachusetts.

⁵ Details of calibration and standardization of these filters can be obtained from the Millipore Corporation.

⁶ W. K. JORDAN and R. MARCH, *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 301 (1956).

⁷ S. J. COOPERSTEIN and A. LAZAROW, *J. biol. Chem.* **189**, 665 (1951).