

% inhibition of oxidative phosphorylation (●—●) and of cytochrome oxidase activity (▲—▲) of rat liver mitochondria caused by varying amounts of sea water. Technical details as described in the text.

kynase or of glucose-6-phosphate (G-6-P)-dehydrogenase used in the determination of the esterified P, was ruled out.

When working with homogenates of sea urchin eggs, therefore, it appears important to be able to check the amount of contaminating sea water. We have found that the most convenient way to do this is the estimation of  $\text{Na}^+$ . It is known in fact that the  $\text{Na}^+$  content of sea urchin<sup>3</sup> and starfish egg<sup>4</sup> is very small, the prevailing ion being  $\text{K}^+$ . Therefore, from the estimate of  $\text{Na}^+$  in any preparation, the amount of sea water present can be calculated quite accurately. In our practice  $\text{Na}^+$  has been determined by flame-photometry.

Our test system consisted of a preparation of rat liver mitochondria; cytochrome oxidase has been estimated manometrically as described by MAGGIO and MONROY<sup>1</sup> and esterified P was determined enzymatically as G-6-P by the use of the dehydrogenase<sup>5</sup>.

**Riassunto.** Piccole quantità di acqua di mare causano una forte inibizione della fosforilazione ossidativa, mentre l'effetto sulla attività citocromossidasica è piuttosto modesto. L'ione responsabile di questo effetto è il Calcio.

FRANCA AIELLO and RACHELE MAGGIO

Laboratory of Comparative Anatomy, The University of Palermo (Italy), April 28, 1961.

<sup>3</sup> Lord ROTHSCHILD and H. BARNES, J. exp. Biol. 30, 534 (1953).

<sup>4</sup> A. TYLER, A. MONROY, C. Y. KAO, and H. GRUNDFEST, Biol. Bull. 111, 153 (1956).

<sup>5</sup> This work has been supported in part by a grant of the National Institute of Health, U.S. Public Health Service (RG-6211) to the Laboratory of Comparative Anatomy.

### Vergleichende Elektronenmikroskopie reiner DNS und der DNS des Bakteriennukleoids

Die Diskussion um die Existenz eines Bakterienkernes und dessen Struktur war schon lange vor den ersten erfolgreichen Ultradünnenschnitten<sup>1</sup> äußerst rege<sup>2-4</sup>. Die Frage nach der makromolekularen Ultrastruktur erfuhr durch die recht verschiedenartigen Ergebnisse und Schlussfolgerungen der einzelnen elektronenoptisch arbeitenden Laboratorien eine neue Belebung<sup>5,6</sup>.

Fasst man die stark divergierenden Hypothesen und Deutungen der Befunde in zwei Gruppen zusammen, so stehen Ansichten, in Anlehnung an die Chromosomenstrukturen höherer Organismen, über ein oder mehrere kompakte Bakterienchromosomen, die in einem elektronenoptisch nicht darstellbaren «Kernsaft» schwimmen sollen<sup>7-9</sup> und zum Teil als recht komplexe «Großschrauben» (GIESBRECHT<sup>7,8</sup>) gedeutet werden, diametral den Befunden und Hypothesen der zweiten Gruppe gegenüber<sup>10</sup>. KELLENBERGER et al. zeigen, dass unter bestimmten definierten Fixierungsbedingungen eine von keiner Membran begrenzte, mit homogenem, feinem DNS-Plasma ausgefüllte Kernvakuole beobachtet werden kann. Abweichungen von diesen Bedingungen führen zu elektronenoptisch dichten Körpern, die von den Autoren als Koagulate betrachtet werden. Argumente für diese Folgerungen waren jedoch indirekter Natur<sup>10</sup>.

Das Problem kann jedoch unmittelbar angegriffen werden, wenn gezeigt werden kann, dass reine DNS sich gegenüber den Fixierungsbedingungen gleich oder ähnlich verhält wie das DNS-haltige Plasma des Bakterienkernes. Soll reine DNS oder die Bakterien-DNS im Nukleoid im Dünnenschnitt dargestellt werden, so ist zu bedenken, dass erst nach einer Fixierung und Dehydratisierung in üblichen Einbettungsmitteln eingebettet werden kann. Was ist bei diesen Vorgängen zu erwarten? Die DNS ist physi-

<sup>1</sup> G. B. CHAPMAN and J. HILLIER, J. Bact. 66, 362 (1953).

<sup>2</sup> B. DELAPORTE, Rev. gén. bot. 51, 615, 689, 748 (1939).

<sup>3</sup> G. PIEKARSKI, Erg. Hyg. Bakteriol. Immunitätsf. exp. Therap. 26, 333 (1949).

<sup>4</sup> C. F. ROBINOW, in *addendum* zu «The Bacterial Cell», von R. J. DUBOS (Harvard University Press, Cambridge 1945), p. 355.

<sup>5</sup> A. RYTER und E. KELLENBERGER, Z. Naturforschung 13b, 597 (1958), hier ausführliches Schrifttum.

<sup>6</sup> R. G. E. MURRAY, Ausführlicher Beitrag in: *The Bacteria*, vol. I, *The Internal Structure of Cell* (Academic Press Inc., London 1960), p. 35.

<sup>7</sup> P. GIESBRECHT, Naturwiss. 45, 473 (1958).

<sup>8</sup> P. GIESBRECHT und G. PIEKARSKI, Archiv Mikrobiol. 31, 68 (1958).

<sup>9</sup> E. D. DELAMATER, Ann. Rev. Microbiol. 8, 23 (1954).

<sup>10</sup> E. KELLENBERGER, in *Microbial Genetics*, 10th Symposia of the Society for General Microbiology (University Press, Cambridge 1960).

kalisch-chemisch ein Kolloid mit den Eigenschaften hochpolymerer mehrbasischer Säuren<sup>11,12</sup>. Wird nun ein lyophilisches Kolloid durch Mischen mit Alkohol oder Aceton entwässert, so werden mit abnehmendem Wassergehalt mehr und mehr die das Kolloid stabil erhaltenden Ladungen entfernt. Schliesslich bricht das Kolloid zusammen, es fällt aus. Wir geben im Folgenden einige Resultate wieder, die im Rahmen von Untersuchungen über den Mechanismus der Fixierung erhalten wurden.

*Material und Methode.* *Escherichia coli* B, gezüchtet in aminosäurefreiem synthetischem Milieu M 9<sup>5</sup>, Kulturen belüftet. – Fixierungslösungen: 1prozentige  $\text{OsO}_4$ -Lösung in Veronalazetat-Michaelis-Puffer pH 6,2 oder pH 7,2, jeweils mit oder ohne  $\text{Ca}^{++}$  in Form von  $\text{CaCl}_2$ . – Versen-Lösung (Dinatrium-ethylen-diamintetraacetat), 0,25 molar in Veronalazetat-Michaelis-Puffer ohne  $\text{Ca}^{++}$ . – DNS-Präparate: (1) Präparat aus Forellensperma, Dr. ZAHN, Institut für vegetative Physiologie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt<sup>13</sup>. (2) DNA highly polymerized der Nutritional Biochemicals Corporation Cleveland, Ontario, USA. (3) DNS aus Kalbsthymus nach der Guanidinmethode, Institut für Virusforschung, Heidelberg. – Dialysiermembran: einfaches Haushaltzellophan «Zellopax». – Veronalagar als Umhüllungsmittel: 3prozentiger Difco-Pulver-Agar in Michaelis-Veronalacetat-Puffer pH 6,2 oder pH 7,2. Nach Erhitzen auf 100° abgekühlt auf 45°, behält er eine gewisse Zeit seine flüssige Phase bei. Bakterien und DNS werden bei 45° eingemischt. Nach Erstarrung der Mischung können die Blöcke der üblichen Form (1/2 mm Kantenlänge) geschnitten werden. – Kunststoffeinbettung in Vestopal W<sup>5</sup>. – Mikrotom: Ultrotome der LKB-Producter Stockholm, mit Glasmessern ausgerüstet. – Mikroskop: Siemens Elmiskop I, 60 kV, Kondensor I + II, Kondensorblende 200  $\mu$ , Strahlenverkleinerung auf 5  $\mu$ , Objektivaperturblende 30  $\mu$ , Aufnahmen auf Typonfilm FCK.

*Resultate.* Umhüllt man reine DNS als hochviskoses farbloses Kolloid, gelöst in Veronalazetat-Michaelis-Puffer, in Mengen von 0,05–0,01 ml mit einer Dialysiermembran, so bildet man damit, bildlich gesprochen, einen «künstlichen Kern». Diesen künstlichen Kern unterwarfen wir den gleichen Fixations- und Dehydratisierungsbedingungen, die für die Bakterien gelten, und erhielten für die Fixationsbedingung pH 6,2, Anwesenheit von  $\text{Ca}^{++}$ , mit oder

ohne nachfolgende 2stündige «Waschung» mit Uranylazetat<sup>5</sup> im Dünnschnitt ein feinfädiges Bild einer nur schwach koagulierten DNS mit Fäden von 25–60 AE im Durchmesser (Figur 1). Fixierten wir bei einem pH von 7,2 und entfernten wir restliche  $\text{Ca}^{++}$  durch eine Versen-Waschung, so zeigten die Dünnschnitte grob koagulierte, recht kompakte Strukturen der DNS, wie in Figur 2 erkennbar. Wir gingen nun einen Schritt weiter und fixierten reine viskose DNS zusammen mit Bakterien. Um das Kolloid der reinen DNS zusammen mit den mechanisch stabilen Bakterienzellen fixieren zu können, mussten aus der logarithmischen Wachstumsphase abzentrifugierte Bakterien als Sediment zusammen mit viskös-dickflüssiger reiner DNS mit dem elektronenoptisch kontrastlosen Umhüllungskolloid Agar-Agar vermischt werden. Die Agarblöcke wurden in üblicher Weise über Nacht in der Fixationslösung belassen, danach entweder sofort in der Acetonreihe dehydratisiert oder zuvor noch mit Uranylazetat oder Versenlösung 2 h gewaschen. Danach Entwässerung und Vestopaleinbettung wie üblich. Die Dünnschnitte zeigen hier entsprechend dem pH-Wert der Fixationslösung und entsprechend der Nachbehandlung in der Kernvakuole der Bakterien wie ausserhalb der Bakterienzellen die simultan entwässerte DNS in äusserst ähnlicher Struktur, sowohl im Hinblick auf den Fadendurchmesser wie auch auf die Anordnung der Fadengruppen. Figur 3 zeigt den Aspekt einer feinfädigen DNS, intrazellulär wie auch extrazellulär, mit Fadendurchmesser von 25–60 AE, Figur 4 einen Ausschnitt von Figur 3, höher vergrössert. Dieses Ergebnis konnten wir bei jeder Fixationsreihe erhalten, sofern wir bei einem pH von 6,2 mit  $\text{Ca}^{++}$  in der Fixierlösung arbeiten oder anschliessend mit Uranylazetat das DNS-Kolloid stabilisierten. In diesem Fall ist die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{++}$  nicht erforderlich. Fixierten wir bei pH 6,2 oder 7,2, entfernten wir alle  $\text{Ca}$ -Ionen durch Versen und verzichteten auf eine nachfolgende Uranylazetatbehandlung, so ergaben sich grobkoagulierte DNS-

<sup>11</sup> K. H. MEYER, *Natural and Synthetic High Polymers* (Interscience Publishers Ltd., London 1950), p. 255.

<sup>12</sup> E. CHARGAFF und I. N. DAVIDSON, *The Nucleic Acids* (Academic Press Inc., London 1960), vol. III, p. 15.

<sup>13</sup> Für Überlassung eines reinen DNS-Präparates aus Forellensperma sind wir Herrn Dr. ZAHN sehr zu Dank verpflichtet.

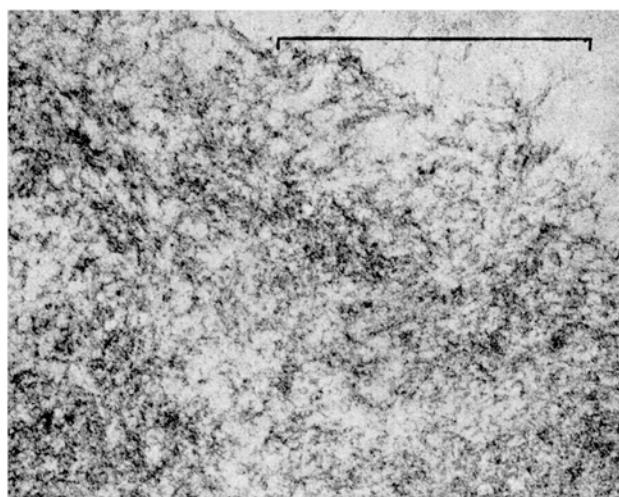


Fig. 1. DNS, von Dialysiermembran umhüllt,  $\text{OsO}_4$ -Fixierung bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{++}$  im Fixans, pH 6,2. Feinfädige Strukturen, 25–60 AE messend. Vergr. 41000:1.

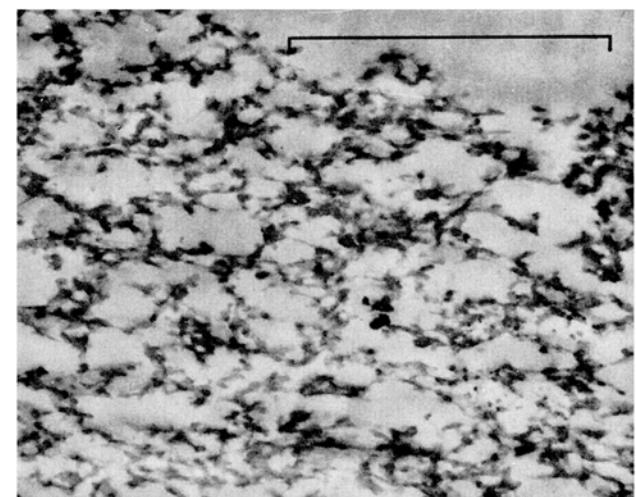


Fig. 2. DNS, von Dialysiermembran umhüllt,  $\text{OsO}_4$ -Fixierung, keine  $\text{Ca}^{++}$  im Fixans, anschliessend 2stündige Versen-Behandlung. Grob koagulierte Strukturen. Vergr. 42000:1.

Strukturen in vielgestaltiger, mehr oder weniger kompakter Form, wobei wiederum die Bakterien-DNS in der Kernvakuole wie auch die reine DNS ausserhalb der Bakterienzellen sehr ähnliche Konfigurationen zeigten (Figuren 5 und 6).

Zusammenfassend können wir sagen, dass sich bei gleichen Präparationsbedingungen reine DNS-Kolloide verschiedenster Herkunft (Forellensperma, Kalbsthymus) völlig gleich verhalten in ihrer Antwort auf die präparativen Eingriffe wie die DNS in der Kernvakuole der Bakterien. Das feinfädige Bild der DNS, wie es Figur 1, 3 und 4 zeigen, entspricht einigermassen dem, was man sich unter einer kolloidalen Lösung vorstellt. Dagegen wird doch sicherlich der Aspekt in Figur 2, aber auch in Figur 5 und Figur 6 wohl von jedermann als eine Koagulation angesprochen.

Es muss sich die Bakterien-DNS des Nukleoids in einem physikalisch-chemischen Zustand befinden, der nicht weit entfernt sein kann von demjenigen reiner DNS. Ob und in

welcher Form an die DNS gebundene Histone und Protamine das Resultat beeinflussen, wird gegenwärtig untersucht. Auf den Organisationszustand der Bakterien-DNS kann hier nicht im einzelnen eingegangen werden. In der Mehrzahl der Fälle erscheint das feinfädige DNS-Plasma bündelförmig angeordnet<sup>6,14,15</sup>. Auf Grund dieser und zahlreicher weiterer Beobachtungen wurde ein Modell des Bakterienchromosoms entwickelt<sup>10</sup>, das sowohl den genetischen wie auch den physikalischen und morphologischen Befunden gerecht wird. Es ist daraus ersichtlich, dass es nicht notwendig ist, die komplexe Organisation höherer Chromosomen auf die Bakterien zu übertragen. Dennoch ist das Modell nicht als endgültig zu betrachten, da zum Beispiel zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Frage nach der

<sup>14</sup> W. VAN ITERSON und C. F. ROBINOW, J. biophys. biochem. Cytol., 9, 171 (1961).

<sup>15</sup> A. M. GLAUERT, E. M. BRIEGER und J. M. ALLEN, Exp. Cell Res., 22, 73 (1961).

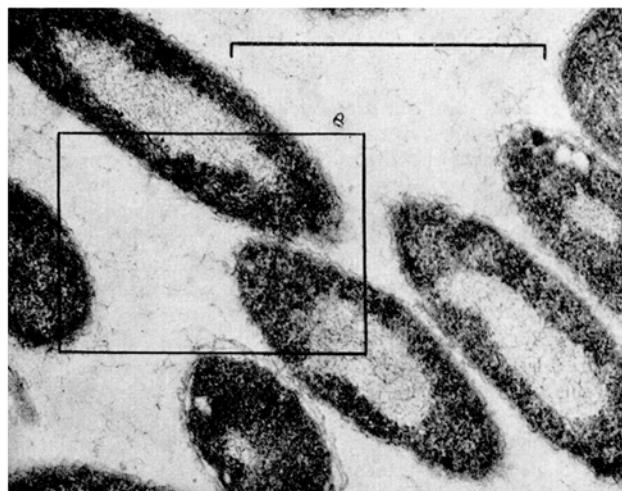


Fig. 3. *E. coli* B, zusammen mit reiner DNS von Agar-Agar umhüllt. OsO<sub>4</sub>-Fixierung bei Anwesenheit von Ca<sup>++</sup> im Fixans. Aspekt einer feinfädigen (nur schwach koagulierten) intra- und extrazellulären DNS, Fadendurchmesser 25–60 Å. Vergr. 41000:1.

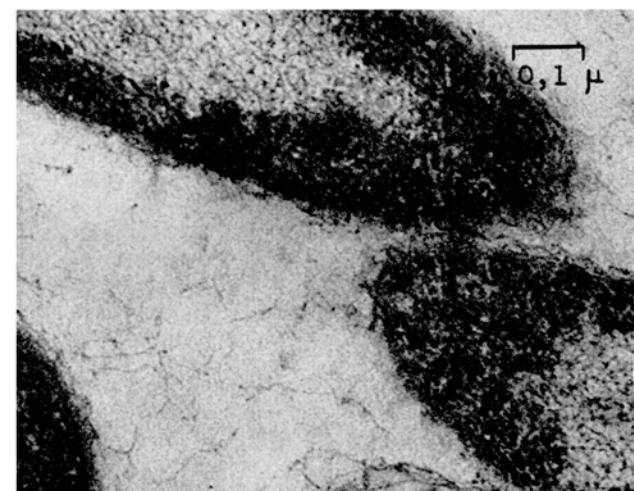


Fig. 4. Ausschnittvergrösserung von Figur 3. Vergr. 95000:1.

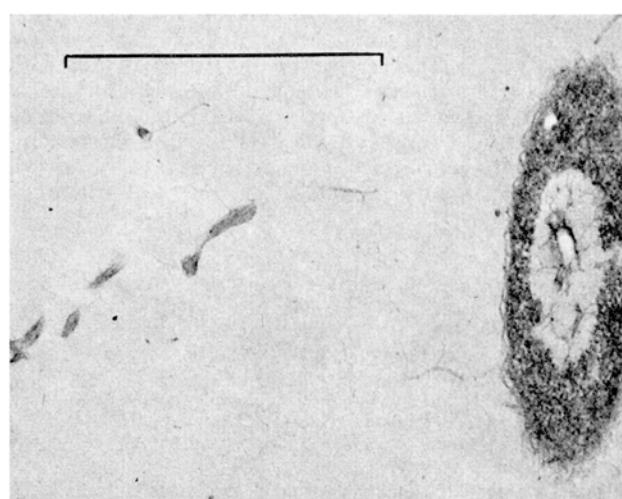


Fig. 5. *E. coli* B, zusammen mit reiner DNS von Agar-Agar umhüllt. OsO<sub>4</sub>-Fixierung ohne Ca<sup>++</sup>, Versen-Behandlung. Grobkoagulierte Strukturen, äusserst ähnliche Konfigurationen. Vergr. 42000:1.



Fig. 6. *E. coli* B, gleiche Fixationsverhältnisse wie Figur 5. Man beachte die typischen Koagulationsstrukturen mit einer optisch fast leeren Innenzone. Extrazellulär wie intrazellulär gleiches Verhalten der DNS. Vergr. 42000:1.

Länge des DNS-Moleküls noch nicht beantwortet werden kann. Aus diesen Beobachtungen, zusammen mit früheren und anderen noch nicht mitgeteilten, ergibt sich, dass die Osmiumfixierung noch nicht das DNS-Kolloid oder das DNS-Plasma «fixiert» im Sinne einer Verfestigung, sondern gewissermassen *die Weiche stellt* für die Vorgänge, die später bei der Entwässerung stattfinden. Es wurde von KELLENBERGER<sup>16</sup> die Forderung aufgestellt, dass das DNS-Kolloid so vorzubehandeln sei, dass bei der Dehydratisierung Vernetzungen entstehen. Dadurch gelingt das Kolloid zuerst, was zur Folge hat, dass die nachfolgende Koagulation, beziehungsweise das Aneinanderlagern der Fadenmoleküle auf ein Minimum beschränkt werden kann.

Zusätzliche Einzelheiten dieser Arbeiten und nachfolgende Diskussionen der Resultate werden an anderer Stelle mitgeteilt werden<sup>17</sup>.

**Summary.** The behaviour of pure isolated DNA towards the conditions of fixation and dehydration—prior to ultra-thin sectioning—has been studied and compared with

the behaviour of the DNA-plasm of the bacterial nucleus. It is found that those conditions which produce coarse coagulation of the free DNA also produce electron opaque bodies of variable aspect inside the bacterial nucleus. The coagulation figures obtained in both situations are very similar. This is a further direct evidence in favour of the view that the bacterial nucleus is an assembly of fine DNA-containing fibrilla in a highly hydrated plasma.

W. SCHREIL

*Laboratoire de Biophysique, Université de Genève (Suisse), 8. Juni 1961.*

<sup>16</sup> E. KELLENBERGER, in *Advances in Virus Research* (Academic Press Inc., London 1961), im Druck.

<sup>17</sup> Vorliegende Arbeit wurde mit der Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds durchgeführt. HANNA RUHE und SOPHIA ANNEN sei für wertvolle Mitarbeit gedankt. E. KELLENBERGER danke ich für Einführung in Arbeitsgebiet und Problemstellung sowie wertvolle Diskussionen.

### 'Pitfalls' in Immune Electron Microscopy

Immune electron microscopy<sup>1</sup> is an extension of immunofluorescence<sup>2</sup> at the subcellular level. Not only have many of the problems of immunofluorescence been inherited, but it has become apparent that other problems exist. Some of the problems encountered are presented. It is hoped that other problems can be predicted early in the development of the technique, to provide a more orderly and realistic approach than was encountered in immunofluorescence.

**Methods and Results.** Fixation. Unfixed and 10% formalin-fixed chorioallantoic membrane and normal mouse liver, kidney, heart, and spleen were treated with an immune *Staphylococcus aureus* ferritin conjugate<sup>1</sup> for 1 h; the treated material was then thoroughly washed and the unfixed material fixed in 10% formalin. The specimens were embedded in paraffin and 4 $\mu$ -sections stained with Gomori's iron stain<sup>3</sup>. As demonstrated by the iron stain, the tissues fixed prior to treatment with the immune conjugate exhibited a marked diminution of ferritin as compared with the tissues fixed subsequent to treatment with the conjugate.

Treatment on Copper Grids. Bacterial, viral, and mycotic agents were fixed in 10% formalin and drops placed on formvar and carbon covered grids<sup>4</sup>. The grids were air-dried, specific immune conjugate applied, then washed several times in deionized water. Electron microscopy revealed that even the most thorough washing failed to remove all of the ferritin conjugate not bound by the immune reaction.

Non-specific Reactions. Horse spleen ferritin<sup>5</sup> was diluted with phosphate buffered saline, pH 7.2, to contain 10 mg/ml of protein and conjugated with fluorescein isothiocyanate<sup>6</sup>. 0.5 ml of the ferritin fluorescein conjugate was injected intraperitoneally into mature mice. Sections of liver, embedded in paraffin, revealed that the ferritin-fluorescein conjugate was phagocytized by the Kupffer cells non-specifically (i.e. in regard to immune reactions). Observations were made using an ultraviolet light source and filters previously outlined<sup>6</sup>.

**Discussion.** The proper use of fixatives is of great importance in the detection of antigens by immune electron microscopy. Penetration of antibody into cellular material is dependent upon adequate fixation. Correlation can be

made with immunofluorescence; specific fluorescence is generally observed in the periphery of unfixed cells, while in fixed preparations the immune reaction can be observed in the periphery of the nuclear membrane. These observations are consistent with those of HIRAMOTO et al.<sup>7</sup>.

Fixation prior to treatment with the ferritin conjugate prevents pinocytosis, resulting in a marked diminution of the unreacted conjugate as compared with material fixed after treatment with the conjugate. Formalin generally fulfills the criteria as an excellent fixative for this technique. It does not tend to alter the antigenic components, is germicidal for most pathogens, and preserves the cellular architecture. Fixatives generally used in electron microscopy are potent oxidants, and thorough screening should be made to determine their effect on the antigenic system to be used. This does not preclude the use of these oxidants to enhance the architecture if applied subsequent to the immune reaction.

In the detection of sites of toxin activity and *in vivo* experiments, the use of adequate controls cannot be too greatly stressed. Ferritin can be observed under the electron microscope in normal cellular material (HAMPTON<sup>8</sup>, KUFF and DALTON<sup>9</sup>, and BESSIS and BRETON-GORIUS<sup>10</sup>) as well as ferritin conjugate which has been non-specifically phagocytized by the reticulo-endothelial system. Therefore, in correlation with nonimmune conjugate controls, histochemical methods, fluorescein-labeled ferritin and electron microscopy should be utilized. These will not only provide a control of the immune

<sup>1</sup> C. W. SMITH, J. F. METZGER, S. I. ZACKS, and A. KASE, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 104, 336 (1960).

<sup>2</sup> A. H. COONS and M. H. KAPLAN, J. exp. Med. 91, 1 (1950).

<sup>3</sup> F. B. MALLORY, *Pathological Technique*, (W. B. Saunders Co., Phila. 1942), p. 137.

<sup>4</sup> E. RIBI, W. BROWN, and G. GOODE, J. Bact. 79, 142 (1960).

<sup>5</sup> S. GRANICK and L. MICHAELIS, J. biol. Chem. 147, 91 (1943).

<sup>6</sup> J. D. MARSHALL, W. C. EVELAND, and C. W. SMITH, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 98, 898 (1958).

<sup>7</sup> R. HIRAMOTO, M. N. GOLDSTEIN, and D. PRESSMAN, J. Nat. Cancer Inst. 24, 255 (1960).

<sup>8</sup> J. C. HAMPTON, Blood, J. Hematology 15, 480 (1960).

<sup>9</sup> E. L. KUFF and A. J. DALTON, J. Ultrastructure Res. 1, 62 (1957).

<sup>10</sup> M. C. BESSIS and J. BRETON-GORIUS, J. biophys. biochem. Cytol. 3, 503 (1957).