

homogenizer. Molar sucrose was selected as the homogenizing medium after a number of preliminary experiments, since this molarity has been found to result in a better separation of the various subcellular structures than the lower ones, as judged by the distribution of cytochrome oxidase activity and by the RNA/protein ratio³. The fractions were isolated by differential centrifugations in a Spinco Model L Ultracentrifuge as indicated in the text. The pellets were re-suspended, without washing, in 0.25 M sucrose by gentle homogenization with a teflon pestle. All the operations were carried out at 0–2°C.

ATPase activity was tested in a medium of the following composition, in a final volume of 2 ml: 50 mM KCl; 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4; 2.5 mM ATP; 2.0 mM MgCl₂, and 0.4 mM CaCl₂, when indicated. Incubation time, 15 min at 25°C. The reaction was stopped by addition of 1 ml of cold N perchloric acid.

Inorganic phosphate was estimated according to the method of MARTIN and DOTY, as modified by LINDBERG and ERNSTER⁴. Protein content was measured by either the biuret reaction⁵, or the LOWRY procedure⁶.

Results and Discussion. When fractionating a pigeon breast muscle homogenate in M sucrose, the pattern of distribution of cytochrome oxidase shows that most of the mitochondria are sedimented below 50,000 g³. Therefore, in the table the results are reported which refer to the fractions isolated by applying gravitational forces up to 50,000 g.

The effect of Ca⁺⁺ on the Mg⁺⁺-stimulated ATPase activity of various mitochondrial fractions from pigeon breast muscle

Fractions	ATPase activity (μ moles P _i /mg protein/h)		% <i>A</i>
	without Ca ⁺⁺	with 0.4 mM Ca ⁺⁺	
400 g–2,000 g $\times$ 10 min	15.85	16.63	+ 4.8
2,000 g–10,000 g $\times$ 10 min	26.41	23.72	–10.2
10,000 g–26,000 g $\times$ 20 min	62.10	54.20	–12.8
26,000 g–50,000 g $\times$ 30 min	45.68	34.46	–24.2

Experimental conditions: The enzymatic activity was tested in a medium of the following composition, in a final volume of 2 ml: 50 mM KCl; 25 mM tris-HCl buffer, pH 7.4; 2.5 mM ATP; 2.0 mM MgCl₂, and resuspended enzyme corresponding to 0.1–0.9 mg protein. Incubation time, 15 min at 25°C. The values represent the average of six experiments.

As shown in the Table, the addition of Ca⁺⁺ resulted in a marked inhibition of the Mg⁺⁺-stimulated ATPase activity of all the muscle mitochondrial preparations, with the exception of the one obtained at low centrifugal force which occasionally showed a slight activation. However, in no case was this activation found to be of an order of magnitude comparable with that usually observed in liver mitochondria. The inhibition appeared to increase progressively in the fractions obtained at higher centrifugal forces, and to reach maximal values in the range of

sedimentation typical of microsomes (35 to 50% of inhibition at 105,000 g for 1 h). The fact that the specific activity of the fraction isolated between 26,000 g and 50,000 g was lower than that of the fraction obtained between 10,000 g and 26,000 g could possibly be explained by the presence of subcellular structures, different from mitochondria and microsomes (lisosomes?), demonstrated by electron microscope investigation of the pellet.

Since the Mg⁺⁺-stimulated ATPase activity associated with the sarcotubular system is the only one known to be strongly inhibited by addition of Ca⁺⁺², it may be concluded that fragments of sarcotubular origin are likely to contaminate mitochondrial preparations from muscle tissue obtained by the conventional isolation procedures. In this connection, it should be added that electron microscopical examinations of the fractions have shown that, even at the lowest gravitational forces employed, vesicular structures closely resembling those of sarcotubular origin are commonly present, intermingled with mitochondria. Thus sarcotubular fragments could be responsible, at least in part, for the remarkably high ATPase activity in the presence of Mg⁺⁺ of such preparations. It should be further emphasized that the contamination need not be large in order to give appreciable interference, since the specific activity is far higher in sarcotubular than in mitochondrial preparations².

The above considerations do not exclude, however, the existence in muscle mitochondria proper of a Mg⁺⁺-stimulated ATPase such as that of liver mitochondria. The fact that the mitochondrial fractions isolated at low gravitational force appeared to be only slightly inhibited, or even sometime activated, by addition of Ca⁺⁺, strengthens the above possibility.

Riassunto. Nelle preparazioni mitocondriali di muscolo è presente una notevole attività ATPasica stimolata dal Mg⁺⁺, anche se i mitocondri sono intatti e ben fosforilanti. Questa attività ATPasica, stimolata da Mg⁺⁺, appare essere inibita dall'aggiunta di Ca⁺⁺. Poiché questo comportamento è tipico della attività ATPasica associata ai microsomi, gli autori concludono che l'attività ATPasica stimolata da Mg⁺⁺ delle preparazioni mitocondriali di muscolo è molto probabilmente espressione di un inquinamento delle preparazioni stesse da parte di frammenti originanti dal reticolo sarcoplasmico.

E. CARAFOLI and U. MUSCATELLO

Istituto di Patologia Generale dell'Università, Modena (Italy), June 11, 1963.

² E. CARAFOLI and U. MUSCATELLO, unpublished experiments.

⁴ O. LINDBERG and L. ERNSTER, in *Methods of Biochemical Analysis* (D. GLICK, ed.; Interscience Publishers Inc., New York 1955), vol. 3, p. 1.

⁵ A. GORNALL, C. J. BARDAWILL, and M. M. DAVID, *J. biol. Chem.* 177, 751 (1949).

⁶ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).

Etude de la distribution du calcium dans l'os haversien avec le radioanalyseur à microsonde électronique

Le radioanalyseur à microsonde électronique peut être utilisé avec succès pour l'étude des tissus biologiques minéralisés. La distribution du calcium a été déterminée au moyen de cet instrument dans la dentine et l'émail par

BOYDE, SWITSUR et FEARNHEAD¹, dans l'os adulte par TOUSIMIS², et dans le cartilage épiphysaire par BROOKS, TOUSIMIS et BIRKS³.

¹ A. BOYDE, V. S. SWITSUR et R. W. FEARNHEAD, *J. Ultrastructure Res.* 5, 201 (1961).

² A. J. TOUSIMIS, *ISA Proceedings* 8, 53 (1962).

³ E. J. BROOKS, A. J. TOUSIMIS et L. S. BIRKS, *J. Ultrastructure Res.* 7, 56 (1962).

Deux caractéristiques de cet instrument sont d'une importance fondamentale: un pouvoir de résolution d'approximativement $1\ \mu$, et une sensibilité variant entre 0,1 et 0,01%, ce qui signifie que 10^{-12} à 10^{-14} g d'un élément peut être détecté dans un volume de $1\ \mu^3$. Il est donc intéressant de réétudier par cette méthode le problème du degré de minéralisation de l'os haversien, qui n'a été abordé jusqu'ici que par la microradiographie dont les performances sont plus faibles.

Des tranches de diaphyse tibiale prélevées chez l'homme adulte ont été polies jusqu'à obtention d'une surface parfaitement régulière, revêtues d'une mince couche de carbone par évaporation sous vide, et étudiées au moyen d'un radioanalyseur à microsonde électronique Jeol JXA-3. Après que l'échantillon a été mis en place sous le faisceau focalisé d'électrons, il est déplacé automatiquement à vitesse constante tandis que l'intensité du rayonnement X $K\alpha$ du calcium émis par la préparation est enregistrée. Aux fins de comparaisons, les coupes sont ensuite microradiographiées et observées au microscope polarisant.

Les courbes d'enregistrement de l'intensité du rayonnement Ca $K\alpha$, qui dépend de la concentration en calcium, montrent de nombreuses fluctuations, qui correspondent au passage de la sonde électronique sur les diverses structures de la substance osseuse. L'observation au microscope polarisant des préparations soumises au faisceau électronique révèle que les zones à teneur élevée en calcium correspondent aux zones biréfringentes, et inversement que les zones à moindre teneur en calcium sont peu ou

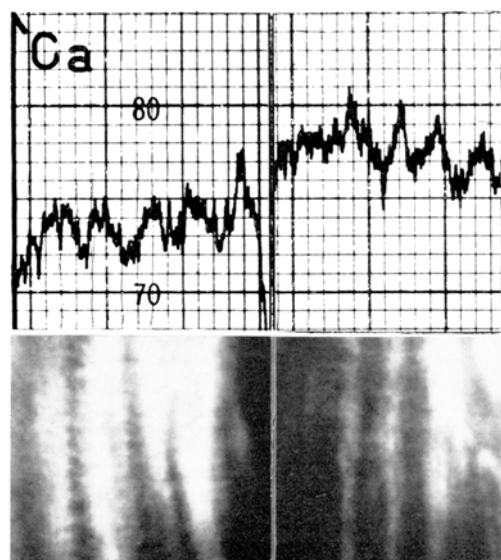
pas biréfringentes. Ce phénomène est toujours net, qu'il s'agisse d'ostéones incomplètement minéralisés (Figure, à gauche, zone de substance osseuse dont l'équivalent aluminium moyen mesuré par microradiographie quantitative est de 0,77, ce qui correspond à une teneur en apatite de $1,2\ \text{g/cm}^3$) ou de fragments d'ostéones anciens d'un territoire de brèche fortement minéralisé (Figure, à droite, zone de substance osseuse dont l'équivalent aluminium moyen est de 0,92, ce qui correspond à une teneur en apatite de $1,4\ \text{g/cm}^3$). Les différences de teneur en calcium entre les points les plus riches et les moins riches d'un territoire donné atteignent environ 10% de la concentration totale. Une détermination plus exacte ne pourra être faite que grâce à un étalonnage approprié. Les enregistrements ne révèlent pas l'existence de plages à forte et uniforme teneur en calcium et de plages à teneur faible et uniforme, nettement délimitées et juxtaposées les unes aux autres, mais une variation périodique oscillant graduellement d'une teneur forte à une teneur faible.

Ces résultats confirment les constatations de ENGSTRÖM et ENGELDT⁴, de DAVIES et ENGSTRÖM⁵, de VINCENT^{6,7} et de BOHATIRCHUK⁸, qui ont montré que l'os haversien pouvait présenter dans les microradiographies un aspect stratifié dû à une absorption différente des rayons X dans des couches successives, donc une teneur différente en calcium des différentes couches. Ils apportent de nouveaux arguments en faveur de la conception de VINCENT^{9,10} selon laquelle les zones biréfringentes sont aussi les plus calcifiées. Enfin, l'absence d'une délimitation nette de plages faiblement et fortement minéralisées est une nouvelle preuve de ce que l'os haversien n'est pas composé de «lamelles» concentriques indépendantes, les unes plus riches en collagène et les autres plus chargées de substance minérale, mais est en fait un «continuum» plus ou moins nettement stratifié, comme l'ont décrit PRITCHARD¹¹, de même que POLICARD et BAUD¹².

Summary. The distribution of calcium in the fine-fibred bone tissue of the human adult tibia is measured with the electron probe X-ray microanalyzer. Variations in the calcium concentration may be related to the stratified fine structure of the bone matrix.

C. A. BAUD, S. KIMOTO et H. HASHIMOTO

Institut de Morphologie, École de Médecine, Genève (Suisse) et Japan Electron Optics Laboratory, Chiyoda-ku, Tokyo (Japon), le 30 mai 1963.



La partie inférieure de la Figure montre deux champs d'os haversien microphotographiés entre nicols croisés ($1000\times$); celui de gauche fait partie d'un ostéone incomplètement minéralisé, et celui de droite d'une brèche fortement minéralisée. Les flèches repèrent le niveau des lignes de passage de la sonde électronique. – La partie supérieure de la Figure montre les deux courbes correspondantes d'un enregistrement de l'intensité du rayonnement X Ca $K\alpha$, exprimant la teneur en calcium. Les strates biréfringentes sont plus riches en calcium.

On the Structure of the Chromosomes of *Scilla non-scripta*

The strand number of the somatic chromosome has been debated extensively over many years^{1,2}. Some authors have pointed out that the chromosomes are longitudinally split at the anaphase³⁻⁶. Moreover, it has now

become possible to demonstrate cytologically that anaphase and telophase chromosomes contain two chromosome-mata and the late prophase chromosomes four half-chromatids^{4,7}.

These observations were confirmed experimentally by analysis of radiation-induced chromosomal aberrations and by the application of autoradiographic techniques⁸⁻¹⁰.

⁴ A. ENGSTRÖM et B. ENGELDT, *Exper.* 9, 19 (1953).

⁵ H. G. DAVIES et A. ENGSTRÖM, *Exp. Cell Res.* 7, 243 (1954).

⁶ J. VINCENT, *Arch. Biol.* 65, 531 (1954).

⁷ J. VINCENT, *Recherches sur la constitution de l'os adulte*, Thèse Université Louvain, Bruxelles, Arscia (1954).

⁸ F. BOHATIRCHUK, *Anat. Rec.* 133, 203 (1959).

⁹ J. VINCENT, *Exp. Cell Res.* 12, 422 (1957).

¹⁰ J. VINCENT, *Arch. Biol.* 69, 561 (1958).

¹¹ J. J. PRITCHARD, *The Biochemistry and Physiology of Bone* (Ed. by G. H. BOURNE, Academic Press, New York 1956), p. 1.

¹² A. POLICARD et C. A. BAUD, *Les structures inframicroscopiques normales et pathologiques des cellules et des tissus* (Masson, Paris 1958).