

for 3 days until a pure suspension of cysts, completely free of trophozoites, was obtained. The cysts were transferred to isotonic saline before injection into rabbits for immunization. The immunization schedule consisted of 4 injections given intravenously at 7 day intervals. The total number of cysts injected was approximately 1,000,000 cells per animal.

The sera taken 7 days after the last immunizing injection were pooled and used for conjugation. The globulin fraction of the serum was conjugated to Fluorescein isothiocyanate on celite⁴ according to the method described by RINDERKNECHT⁵. The unconjugated dye was separated by passing it through a column of Sephadex G25⁶. The serum was absorbed twice against rabbit liver powder before use.

The tests were performed using cysts prepared by the following methods: (a) Unfixed cysts suspended in phosphate buffered saline of pH 7.2, 0.01 M (PBS). (b) Cysts fixed in 10% formalin at room temperature for $\frac{1}{2}$ h. (c) Cysts fixed in 95% methanol at room temperature for $\frac{1}{2}$ h. (d) Cysts fixed in 95% ethanol at room temperature for $\frac{1}{2}$ h. (e) Cysts fixed in acetone at room temperature for $\frac{1}{2}$ h.



The cyst on the right has been treated with conjugated antiserum and the cyst on the left with conjugated normal serum. Both the cysts were from unfixed preparations.

The fixed and unfixed cells were treated with 1:5 dilution of specific antiserum for $\frac{1}{2}$ h at room temperature, washed in PBS by centrifugation and examined as a wet preparation with a Zeiss fluorescent microscope.

The controls consisted of cells identically prepared but treated with normal conjugated rabbit serum. In addition, cells were pre-treated with unconjugated antiserum and then with conjugated antiserum to test for any inhibition of the reaction.

The test slides showed intense fluorescence when both the unfixed and chemically fixed cells were used. None of the fixatives tried destroyed the specificity of the reaction. Non-specific staining was negligible in unfixed cells and only slight in the chemically fixed cells. Formalin fixation seemed to be the best as it least affected the specificity of the reaction. However, acetone gave the brightest fluorescence. Pre-treatment with normal antiserum inhibited the reaction. It was possible to remove the fluorescent effect of the antiserum by repeated absorption against a heavy suspension of cysts. This indicated that it was a true antigen-antibody reaction.

Work is at present in progress to study the antigenic relationship of cysts of different species of *Entamoeba* using this technique.

Zusammenfassung. Die Methode fluoreszierender Antikörper wurde zur Darstellung von Blasen bei *Entamoeba invadens* benutzt. Sowohl mit nativen, wie auch mit fixierten Zellen konnte eine befriedigende Reaktion erzielt werden. Formalin erwies sich als günstigstes Fixationsmittel.

V. ZAMAN

Department of Parasitology, Faculty of Medicine,
University of Singapore (Malaysia), November 2, 1964.

⁴ California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles (Calif. USA).

⁵ H. RINDERKNECHT, Exper. 16, 430 (1960).

⁶ Pharmacia, Uppsala (Sweden).

Eine Variation der Bichromat-Osmiumsäure-fixation für das Nervensystem

Die von DALTON¹ eingeführte Bichromat-Osmiumsäurefixation bedarf einer Verfeinerung, um Nachteile bei den Fixationsresultaten, sowie verschiedene Fixationsartefakte zu vermeiden, welche sich besonders an Zellen des Nervensystems finden. Wir stellten uns die Aufgabe, durch empirische Versuche die Bichromat-Osmiumsäurefixation zu verbessern, damit eine gleichmässige und gute Fixation erfolgt. Es wurde in Versuchen festgestellt, dass sich einige Salze zur Veränderung der Tonizität besonders eignen, ähnlich dem Prinzip von ZETTERQUIST² bei der Osmiumsäurefixation. Im Vergleich mit den bisherigen Fixationen an den Zellen des Nervensystems hat die von uns erprobte Fixationsart bessere Resultate gezeigt: die Weitstellung des Ergastoplasmas bei der Osmiumsäurefixation nach PALADE³ sowie die Aufblähung von Zellkern

und Mitochondrien bei der ursprünglichen Daltonischen Bichromat-Osmiumsäurefixation konnte vermieden werden. Die Membransysteme sind wie bei der Daltonischen Fixation sehr gut dargestellt.

Bei den Untersuchungen wurde Nervengewebe von Albinoratten, Katzen und Meerschweinchen entnommen. Bei den gezeigten Abbildungen handelt es sich um eine sympathische Nervenzelle aus dem Ganglion cervicale superius der Ratte (Figur 1) und um die Neuron aus dem

¹ A. J. DALTON, Anat. Rec. 121, 281 (1955).

² H. ZETTERQUIST, *The Ultrastructural Organisation of the Columnar Absorbing Cells of the Mouse Jejunum* (Dept. Anat., Karolinska Institutet; Aktiebolaget Godvil, Stockholm 1956).

³ G. E. PALADE, J. exp. Med. 95, 285 (1952).

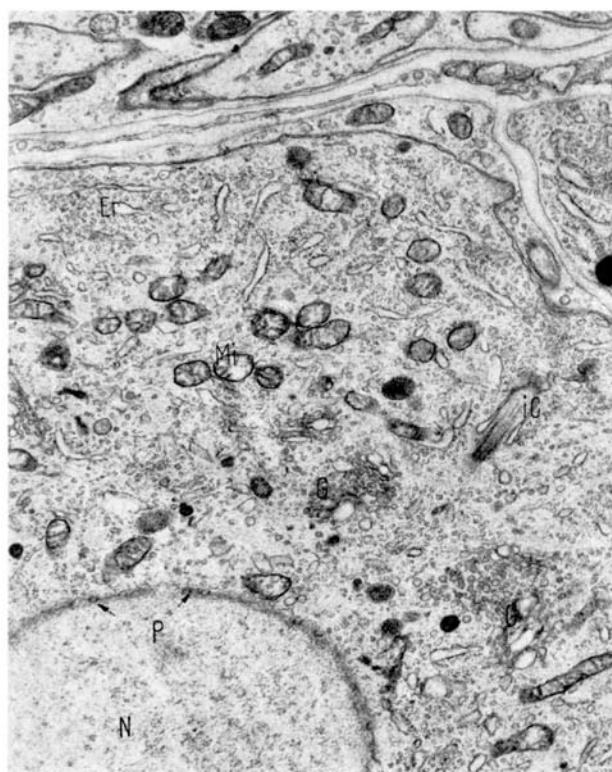


Fig. 1. Ausschnitt aus einer Ganglienzelle des Ganglion cervicale superius der Ratte: N, Zellkern; Mi, Mitochondrien; G, Golgiapparat; P, Kernporen; Er, Ergastoplasmata; iC, intracelluläre Cilie. Vergr. $\times 22000$.

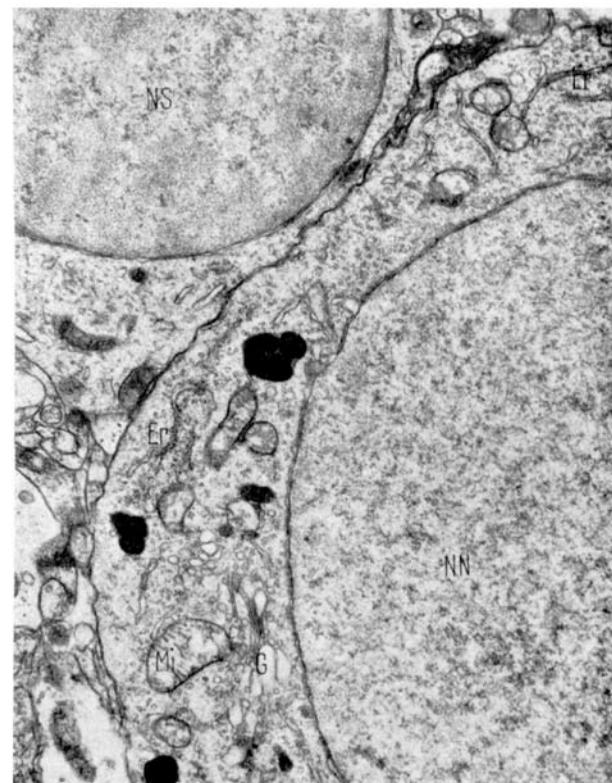


Fig. 2. Ausschnitt aus einem Neuron mit Satellitenzelle des Parietalappens vom Grosshirn der Ratte: NN, Zellkern des Neurons; NS, Zellkern der Satellitenzelle; Mi, Mitochondrien; G, Golgi-Apparatus; Er, Ergastoplasmata. Vergr. $\times 22000$.

Parietalappengebiet des Grosshirns der Ratte (Figur 2). Eine Perfusion der Gewebe wurde nicht durchgeführt.

Zubereitung der Fixationslösung. (1) Stammlösung: Es wird ein Puffergemisch von s-Collidinum und Salzsäure benutzt (BENNETT und LUFT⁴). Zu etwa 60 ml dest. Wasser werden 2,67 ml s-Collidinum gegeben. Dann fügt man 8 ml 1,0 n-Salzsäure hinzu und füllt bis 100 ml mit dest. Wasser auf. In dieser Lösung werden folgende Salze aufgelöst: 0,31 g NaCl; 0,02 g MgCl₂ · 6 H₂O; 0,02 g CaCl₂ · 6 H₂O; 0,017 g NaH₂PO₄ · H₂O. Nachdem sich diese Salze gelöst haben, ist die Stammlösung bei 3 bis 6°C aufzubewahren. Sie ist mehrere Monate haltbar. Der pH-Wert der Stammlösung liegt bei der angegebenen Temperatur bei 7,4 bis 7,5.

(2) Fixationslösung: In einem gut verschließbaren Glasbehälter wird in der Stammlösung soviel Kaliumbichromat (etwa 4%) aufgelöst, dass die Lösung übersättigt ist. Diese Lösung wird geschüttelt, und nach 10 min wird die gleiche Menge 4%ige Osmiumsäurelösung in dest. Wasser dazugegossen. Die noch ungelösten Kaliumbichromatteilchen schaden bei der Fixation nicht. Man kann das Fixationsmittel von oben abgießen, wenn das ungelöste Kaliumbichromat sich abgesetzt hat. Bei der Herstellung der Fixationslösung benutzten wir stets Stammlösungen und Osmiumsäurelösungen von 3 bis 6°C, um sofort die endgültige Fixationstemperatur zu haben. Eine Fixationsdauer von 25 bis 60 min ergab die besten Resultate.

Bei unseren Einbettungen haben wir die Blöcke direkt nach der Fixation nur mit 30%igem Aceton gespült, die

übliche Entwässerung mit 50%igem Aceton fortgesetzt und nach RYTER und KELLENBERGER⁵ in Vestopal eingebettet. Die Ultradünnschnitte stellen wir am Porter-Blum-Ultratom her, kontrastierten sie mit Bleicitrat (REYNOLDS⁶) und untersuchten sie am Zeiss EM 9 Elektronenmikroskop.

Résumé. Grâce à une variation du fixateur «bichromate-tetroxyde d'osmium» nous avons obtenu de bons résultats dans la fixation du système nerveux. Le gonflement des mitochondries et de l'ergastoplasme a pu être évité. Comme tampon nous avons utilisé de l's-collidine et de l'acide chlorhydrique. La tonicité de la solution tamponnée fut réglée par les sels suivants: chlorure de sodium, chlorure de calcium, chlorure de magnésium et phosphate monosodique.

W. G. FORSSMANN

Institut d'Histologie et d'Embryologie,
Ecole de Médecine, Genève (Schweiz),
4. Februar, 1965.

⁴ H. S. BENNETT und J. H. LUFT, J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 113 (1959).

⁵ A. RYTER und E. KELLENBERGER, J. Ultrastr. Res. 2, 200 (1958).

⁶ E. S. REYNOLDS, J. Cell Biol. 17, 208 (1963).