

staining. This specific reduction or disappearance of the yellow fluorescence of the platelets in the presence of the antigen constitutes a positive test.

(c) *Thin gel electrophoresis histamine assay.* Platelet-rich plasma was obtained by spinning heparinized blood for 10 min at 2500 rpm. Aliquots (0.5 ml) were incubated for 30 min at 37°C with and without egg albumin in varying concentrations. Following this a 2 min high-speed spin at 8000 rpm permitted removal and discarding of supernate. Addition of 0.03 ml of distilled water released the histamine from residual platelet plug. After a second high-speed spin, the distilled water supernate was placed in a 1 mm micro-well in a thin agar gel. 10 min of electrophoresis (Turner Model 310, 200 V, 30 mA) was followed by spraying, first with 0.2N NaOH and then with 1% o-phthalaldehyde in xylene³. By reading with transmitted UV-light (3650 Å) it was possible to see histamine as a distinct separate blue fluorescent spot (Figure).

Results. Direct basophil degranulation tests were done on the 15 sensitized rabbits at 1 (Table), 2, and 3 months. At 2 months, 12 of the rabbits still had a positive basophil test but only 6 exhibited a drop in number of over 50%. By 3 months, 11 of the 15 rabbits still had a positive basophil test, but only 4 showed the diagnostic basophil drop.

At 2 and again at 3 months, all 15 of the sensitized rabbits showed a positive platelet histamine stain test. By contrast, all of the control rabbits showed normal

histamine staining of the platelets exposed to the egg albumin. Finally, it was possible in 13 of these 15 rabbits to show on thin gel electrophoresis that platelets from the sensitized rabbits released their histamine upon exposure to the albumin. In the other 2, histamine was not detectable in the platelets using the regular quantities of blood employed by us. None of the 10 control rabbits showed loss of platelet histamine when incubated with the antigen⁴.

Zusammenfassung. Einfache Färbemethode und Elektrophoresetechnik zum Nachweis von Thrombocyten-Histamin zur Aufdeckung einer allergischen Überempfindlichkeit vom Sofort-Typ: zum Versuch dienten gegenüber Ei-Albumin überempfindliche Kaninchen, zum Vergleich der Basophildegranulationstest.

W. B. SHELLEY and L. JUHLIN

University of Pennsylvania School of Medicine, Department of Dermatology, Philadelphia 19104 (Pennsylvania, USA), January 17, 1966.

³ W. B. SHELLEY and L. JUHLIN, *J. Chromat.*, in press (1966).

⁴ These studies were supported by a grant from the JOHN A. HARTFORD Foundation, Inc.

Elektrischer Widerstand, Aussendurchmesser der Spitze und Wandstärke von Glas-Mikro-elektroden¹

Für die intrazelluläre Registrierung der elektrischen Aktivität von Einzelneuronen werden Glas-Mikroelektroden (GME) verwendet, deren Aussendurchmesser (AD) an der Spitze im Bereich von 0,5 μ liegt. Zuverlässige Messungen der GME-Spitze sind damit nur elektronenoptisch möglich. Üblicherweise wird der elektrische Widerstand (EW) als Mass der Spitzenöffnung der GME und indirekt auch des AD der Spitze verwendet. Wir hatten uns zum Ziel gesetzt, die Beziehung zwischen EW und elektronenoptisch gemessenem AD zu bestimmen und mit den theoretisch errechneten Werten zu vergleichen. Dabei zeigt sich, dass theoretische und gemessene Werte nur innerhalb eines beschränkten Bereichs übereinstimmen. Von besonderem Interesse war der Nachweis eines konstanten Verhältnisses zwischen Wandstärke (WS) und AD im Bereich der ausgezogenen GME-Spitze.

Material und Methoden. Als Ausgangsmaterial wurden Glaskröpfchen aus Pyrex 7740 (Corning 9530) mit einem AD von 1,5 mm und einem mittleren Verhältnis WS zu AD von 1:6,35 verwendet. Die GME wurden auf einem Puller der Firma Industrial Science Associates, Ridgewood, N.Y., hergestellt; dabei resultierten ausgezogene Spitzen von bis zu 0,2 μ AD. Die GME wurden nach TASAKI et al.² mit 3 m KCl-Lösung gefüllt. Der *elektrische Widerstand* wurde mit der in einem Negative Capacitance Electrometer (Bak Unity Gain Amplifier³) eingebauten «Voltage Ramp»⁴ gegen physiologische Kochsalzlösung gemessen. Die verwendeten Rechteckimpulse von 1 kHz entsprechen in bezug auf die Anstiegszeit einer 50 kHz

Sinusspannung. Diese Methode wurde gewählt, weil sie auch im Tierversuch angewendet wird. Wenn zur Eichung der Apparatur ein bekannter Widerstand mit 5% Toleranz verwendet wird und die Ablesegenaugigkeit am Oszilloskop 2 mV ist, beträgt die Genauigkeit der Methode ungefähr 13,5%. Aus einer Serie von 100 GME war es uns möglich, an 22 sowohl EW als auch AD zu bestimmen.

Der *Aussendurchmesser* (AD) der Elektrodenspitze wurde im Elektronenmikroskop (Typ Elmiskop I) bei einer Strahlspannung von 80 kV mit 8000facher Vergrößerung photographiert (Figur 1A). Die Messung der Spitzen-AD wurde mit einer Messlupe direkt am Negativ ausgeführt (Platten Scientia 23D50). Bei einer Messgenauigkeit von ± 0,1 mm ist der prozentuale Fehler 2,5% im Bereich von 1 μ, 5% im Bereich von 0,5 μ und 25% im Bereich von 0,1 μ.

Die Konstanz des Verhältnisses WS zu AD wurde an sieben mit Phosphorwolframsäure ($H_3P[W_3O_{10}]_4 \times H_2O$) als elektronenmikroskopischem Kontrastmittel gefüllten GME überprüft (Figur 1B).

Resultate. (a) Die elektronenmikroskopischen Messungen der mit Kontrastmittel gefüllten GME sind in der Tabelle zusammengestellt. Für das von uns verwendete

¹ Mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds, Projekt Nr. 2903.

² I. TASAKI, E. H. POLLEY und F. ORREGO, *J. Neurophysiol.* 17, 454 (1954).

³ A. F. BAK, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 10, 745 (1958).

⁴ K. FRANK und M. C. BECKER, in *Physical Techniques in Biological Research*, Vol. V, Part A (Ed., W. L. NASTUK; Academic Press, New York 1964), p. 72.

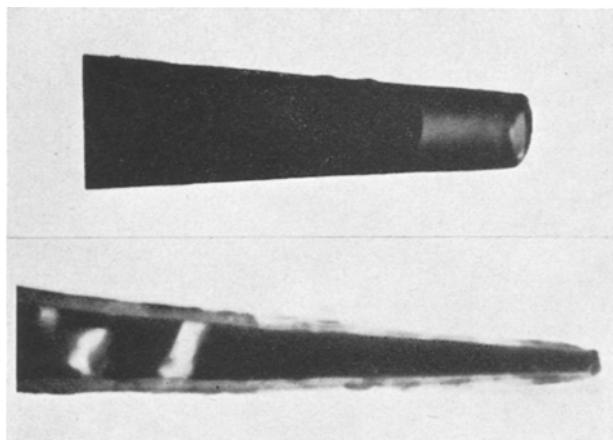
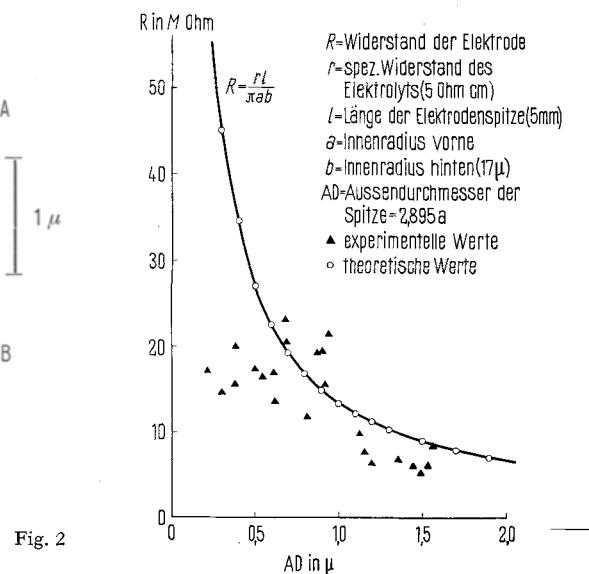


Fig. 1



Elektrode	Verhältnis WS zu AD		Mittel	Elektrode	Verhältnis WS zu AD		Mittel
	gemessen am Schaft	gemessen im Bereich der Spitze			gemessen am Schaft	gemessen im Bereich der Spitze	
A	1:6,25	1:7,35 1:7,98	1:7,66	E	1:6,5	1:9,43 1:6,43 1:8,15	1:7,28
B	1:6,25	1:9,84 1:6,66 1:6,6 1:6,7 1:5,25 1:6,44 1:5,75 1:6,44 1:6,94 1:7,08 1:7,67	1:6,76	F	1:6,5	1:7,18 1:6,55 1:7 1:6,22	1:6,74
C	1:6,5	1:7,43 1:7,33 1:6,08 1:6,43	1:6,82	G	1:6,05	1:7,86 1:6,57 1:6,54 1:7,08 1:8,06 1:7,16	1:6,77
D	1:6,45	1:6,63 1:6,63	1:6,63			1:6,28 1:6,67 1:6,8 1:6,5 1:6,5 1:5,72 1:6,33	

Ausgangsmaterial mit einem mittleren WS zu AD Verhältnis von 1:6,35 bleibt dieser Quotient im Bereich von 1,5 mm bis $0,3 \mu$ AD konstant. Die gefundenen Abweichungen liegen für die einzelnen Elektroden zwischen 2,8% und 17,6%, sind aber für unsere Untersuchung nicht von grosser Bedeutung. BILS und LAVALLEE⁵ fanden an GME aus anderem Ausgangsmaterial, im Bereich von nur $0,12 \mu$ AD der Spitzen, grössere Abweichungen (43%) des Verhältnisses WS zu AD. (b) Theoretischer und wirklicher Verlauf des EW der GME sind in Figur 2 als Funktion des AD der Elektrodenspitzen dargestellt. Die theoretische Kurve beruht auf den Annahmen, dass die Elektrodenspitzen die Form eines hohlen, geraden Kegelstumpfs haben und dass das Verhältnis WS zu AD kon-

stant bleibt. Die gemessenen Widerstandswerte stimmen bis zu einem AD der Spitze von $0,7 \mu$ mit den theoretisch erwarteten überein. Bei kleineren Werten des AD steigt der EW nicht weiter an, sondern bleibt im Bereich von 15–21 $M\Omega$ konstant. Die GME mit dem kleinsten AD der Spitze von $0,21 \mu$ wies einen Widerstand von $17,2 M\Omega$ auf.

Diskussion. Mit der Einschränkung, dass die Messergebnisse nur für die von uns verwendete Geometrie der GME und das von uns gebrauchte Ausgangsmaterial gelten, kann gesagt werden: (a) Das Verhältnis von WS zu AD kon-

⁵ R. F. BILS und M. LAVALLEE, Experientia 20, 231 (1964).

bleibt auch im elektronenmikroskopischen Bereich konstant wie es bereits im lichtmikroskopischen Bereich bewiesen wurde⁶⁻⁸. (b) Für die Abweichung der Widerstandswerte von GME mit Spalten-AD unter $0,7 \mu$ kommen folgende 3 Effekte in Frage: 1. elektrischer Volumenwiderstand des verwendeten Glasmaterials, 2. elektrischer Oberflächenwiderstand des Glases^{9,10}, und 3. kapazitiver Widerstand der Elektrodenspitze. Die Berechnung der Anteile von 1, 2 und 3 für eine Spitze von 1 mm Länge und $0,5 \mu$ Spalten-AD ergibt: 1. Volumenwiderstand: $\sim 5 \cdot 10^6 M\Omega$; dieser Anteil ist zu vernachlässigen. 2. Oberflächenwiderstand: $\sim 10^2 M\Omega$; Beeinflussung in der Größenordnung 10%. 3. Kapazitiver Widerstand bei 50 kHz: $\sim 50 M\Omega$ (Kapazität 1 pf); Beeinflussung in der Größenordnung 25-50%. Die einzelnen Anteile wurden nicht getrennt bestimmt.

Unsere Resultate deuten darauf hin, dass vor allem schnelle Potentialschwankungen nicht nur mit der Spaltenöffnung abgeleitet werden. Man hat zu berücksichtigen, dass trotz intrazellulärer Lage der Elektrodenspitze sowohl extrazelluläre (negative) als auch intrazelluläre (positive) Potentialänderungen erfasst werden können, die sich überlagern. Solche Situationen führen dazu, dass bei Absolutmessungen zu niedrige Amplitudenwerte erhalten werden.

Summary. Electrical impedance and outside tip diameter of glass microelectrodes were measured. With outside tip diameters smaller than 0.7μ there was a significant deviation between calculated and measured values. The relationship between outside tip diameter and wall thickness was investigated electronmicroscopically on micropipettes filled with phosphotungstic acid.

B. HAMMER und A. M. LANDOLT

Institut für Hirnforschung der Universität Zürich
(Schweiz), 14. Januar 1966.

⁶ D. W. KENNARD, in *Electronic Apparatus for Biological Research* (Ed., P. E. K. DONALDSON; Butterworth, London 1958), p. 547.

⁷ D. W. KENNARD, in Ciba Foundation Symposium, *The Spinal Cord* (Ed., G. E. W. WOLSTENHOLME; Little Brown, Boston 1953), p. 214.

⁸ D. W. KENNARD, Persönliche Mitteilung (1965).

⁹ *Properties of Selected Commercial Glasses* (Corning Glass Works 1963), p. 6.

¹⁰ *Physikalische und chemische Eigenschaften technischer Gläser* (Jenaer Glaswerk Schott & Gen. Mainz 1959), p. 24.

Production of Ergotamine by a Strain of *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.

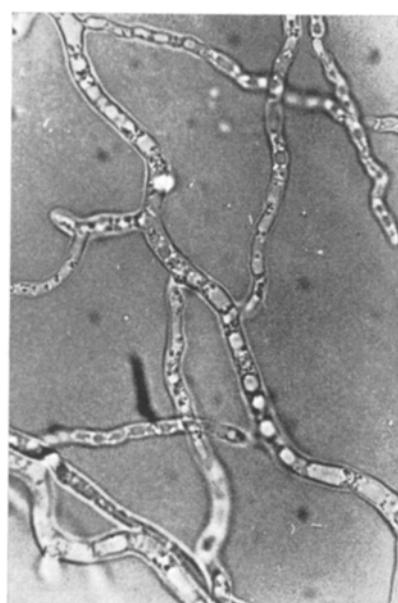
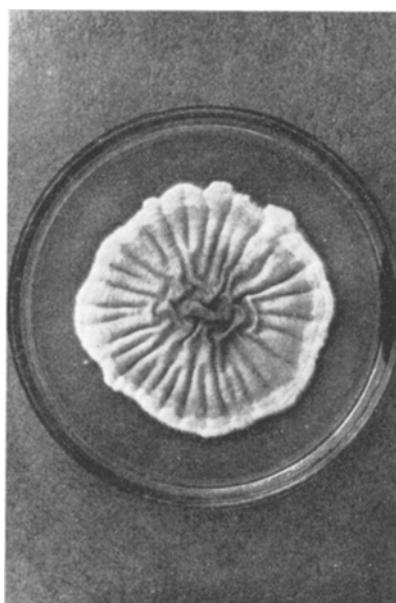
A culture of *Claviceps purpurea*, labelled 275 F.I. (Figure 1), produces considerable amounts of peptide alkaloids in a suitable medium under submerged conditions¹. The composition of the culture media for the different fermentation steps is reported in the Table.

Slants of 275 F.I. grown for 8 days at 28°C are transferred into 300 ml Erlenmeyer flasks containing 60 ml of

the inoculum medium, and incubated for 6 days at 24°C on a rotary shaker operating at 220 rpm and describing a circle 8 cm in diameter.

Aliquots of the culture obtained in such a way are employed for the inoculum of 300 ml flasks containing 50 ml

¹ A. M. AMICI, A. MINGHETTI, T. SCOTTI, and C. SPALLA, French Patent No. 1.404.533, 1965; British Patent No. 99.82.54 1965; Chem. Abstr. 63, 9026f (1965).



b

Fig. 1. (a) 25-day-old culture of *C. purpurea* 275 F.I. on nutrient agar. (b) Mycelium of *C. purpurea* 275 F.I. grown on nutrient agar magnified 800 times.