

einem Ca-Gehalt von 3 mÄq./kg Feuchtgewicht werden zur Bestimmung 6–10 mg Gewebe benötigt. Man kann die Messgenauigkeit durch Verminderung von Pipettierfehlern steigern, indem man ein einheitliches Gemisch von Calceinlösung:KOH:Aqua bidest. in den angegebenen Relationen herstellt und dann zu den gelösten Muskelproben in gleichen Mengen direkt zusetzt. Diese Messansätze verlieren in 6 h nur 2% ihrer Fluoreszenz.

Tabelle II. Wiedergewinnung zugesetzter Ca-Mengen (angegeben sind Mittelwerte $\pm$ mittlere Fehler der Mittelwerte von jeweils 10 Bestimmungen)

Zusatz nÄq. Ca	Wiedergefunden nÄq. Ca	%
50	56 $\pm$ 8	112 $\pm$ 16
100	105 $\pm$ 4	105 $\pm$ 4
150	148 $\pm$ 4	99 $\pm$ 3
200	205 $\pm$ 3	103 $\pm$ 2
250	252 $\pm$ 2	101 $\pm$ 1

Tabelle III. Zusatz von Stör-Ionen zu einem Ca-Standard von 200 nÄq., %-Abweichung der ermittelten Ca-Menge vom Sollwert

Zusatz	500	1000	2500	5000	10000 nÄq.
Mg ²⁺	— 2,0	+ 4,5	+ 6,0	—	— %
Zn ²⁺	$\pm$ 0	+ 1,0	+ 6,1	—	— %
PO ₄ ³⁻	$\pm$ 0	— 0,9	— 1,2	— 0,5	— 8,0%

Trotzdem empfiehlt es sich, die Messungen zu einem definierten Zeitpunkt nach Herstellung der Messansätze vorzunehmen.

Innerer Standard. Veraschten Proben von Meerschweinchenventrikeln wurden nach erfolgter Ca-Bestimmung (Ca-Konzentrationen 301 $\pm$ 6 nÄq./100 mg Feuchtgewicht; Ca-Gehalt der Ansätze 50–350 nÄq.) definierte Mengen der Ca-Standardlösung zugesetzt, dann wurde erneut verascht und in jeweils 10 Ansätzen nochmals der Ca-Gehalt ermittelt. Tabelle II gibt Aufschluss über die wiedergefundenen Ca-Mengen, im Mittel 104 $\pm$ 5%. Die Abweichung ist bei niedrigen Zusätzen am grössten, vermutlich wegen grösserer Pipettierfehler.

Zusatz von Stör-Ionen. Zu einem Ca²⁺-Standard von 200 nÄq. wurden verschiedene Mengen Mg²⁺, Zn²⁺- oder PO₄³⁻-Ionen zugesetzt. Nach Veraschung wurde der Ca-Gehalt ermittelt und die mittleren prozentualen Abweichungen vom Ca-Standard für jeweils 10 Einzelmessungen berechnet (Tabelle 3). Die Ergebnisse zeigen, dass die Ca-Bestimmung erst durch Konzentrationen dieser Ionen beeinflusst wird, die unter biologischen Verhältnissen nicht zu erwarten sind.

Summary. A method for fluorometric estimation of micro-amounts of calcium (about 10 nEq./sample) in biological materials using calcein as indicator. Its applicability to heart muscle specimens (6–100 mg wet weight) and its limitation by interfering substances are described.

H. M. v. HATTINGBERG, W. KLAUS,
H. LÜLLMANN und S. ZEPF

Pharmakologisches Institut der Universität, 65 Mainz,
und Pharmakologisches Institut der Universität, 23 Kiel
(Deutschland), 27. Dezember 1965.

Growth of *Aedes aegypti* Embryonic Cells and Tissues in vitro

In a previous paper¹, the cultivation of tissues from newly hatched *Aedes aegypti* larvae was reported. Under the experimental conditions used, the first appearance of cells outside the explant was observed only after 8–10 days. The number of cells then slowly increased and mitotic figures were observed even in 5-month-old cultures, but the extent of growth was generally small and limited to the vicinity of the explant. In the present communication, some further progress in the field of mosquito tissue culture is reported by growing cells from wholly or partially disintegrated *Aedes aegypti* embryos.

Pools of eggs which were deposited during a 48 h period, containing non-uniformly developed embryos, were found to give the most satisfactory results. The eggs, after being removed from the filter paper, were placed in sterile water containing the following antibiotics per ml, penicillin 500 U, streptomycin 250 U and mycostatin 100 U, and were left there for 30 min at 37°C. After 2 additional treatments as above, the eggs were immersed for 5 min in 0.05% HgCl₂ in 70% ethyl alcohol, followed by rinsing in 7 changes of sterile water and once in the culture medium. The sterilized eggs were then homo-

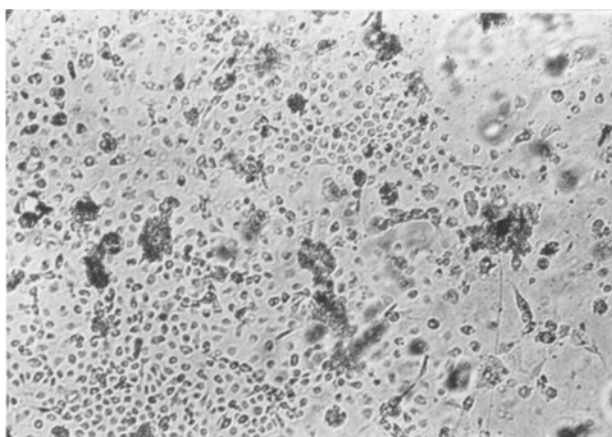


Fig. 1. 10-day-old culture grown in Leighton tube ($\times$ 100).

¹ J. PELEG, Nature 206, 427 (1965).

genized lightly by means of a glass rod and pressed through an 80 mesh stainless steel grid that had been fitted to the bottom of a stainless steel homogenizer. The tissue pulp was collected in a centrifuge tube containing 5 ml medium. The egg shells were allowed to settle to the bottom of the centrifuge tube, the suspension containing the cells and tissues was collected, centrifuged at 800 rpm for 3 min, washed three times and then seeded either in Leighton tubes or in Porter flasks. Various vertebrate and invertebrate tissue culture media were tested either alone or in combinations.

Good results were obtained in TRAGER's modified insect tissue culture medium², where in addition to the altered

salt composition the yeast extract was substituted by the vitamins of EAGLE's medium³. MORGAN's 199 vertebrate tissue culture medium⁴ alone also supports cell proliferation, but the cells are not healthy looking and resemble mostly filamentous forms. However, this medium, in combination with TRAGER's modified medium or with the medium formulated by KITAMURA⁵ for the cultivation of ovarian tissues from *Culex pipiens* var. *molestus*, gave the most satisfactory results so far. In these media, enriched with 2% chick embryo extract, new transparent cells were seen to appear on the third or fourth day. By the fifth or sixth day whole microscopic fields were seen to be covered with new cells and many mitotic figures could be demonstrated. Figure 1 shows a 10-day-old culture grown in Leighton tube, and Figure 2 is the same after being stained with Giemsa. The medium was changed usually once in 4 days. Cultures were maintained in good condition for over 3 weeks^{6,7}.

Preliminary results obtained from virological studies in these cells indicate that they support the proliferation of WN virus.

Résumé. Des tissus et cellules d'embryos d'*Aedes aegypti* ont été cultivés dans des milieux de culture pour tissus des insectes contenant aussi le milieu MORGAN 199 pour cellules-vertèbres. On peut observer, au commencement du troisième jour, des cellules transparentes nouvelles et formes mitotiques. Les cultures sont restées en bon état pendant plus de trois semaines.

J. PELEG

Israel Institute for Biological Research, Ness-Ziona (Israel), February 21, 1966.

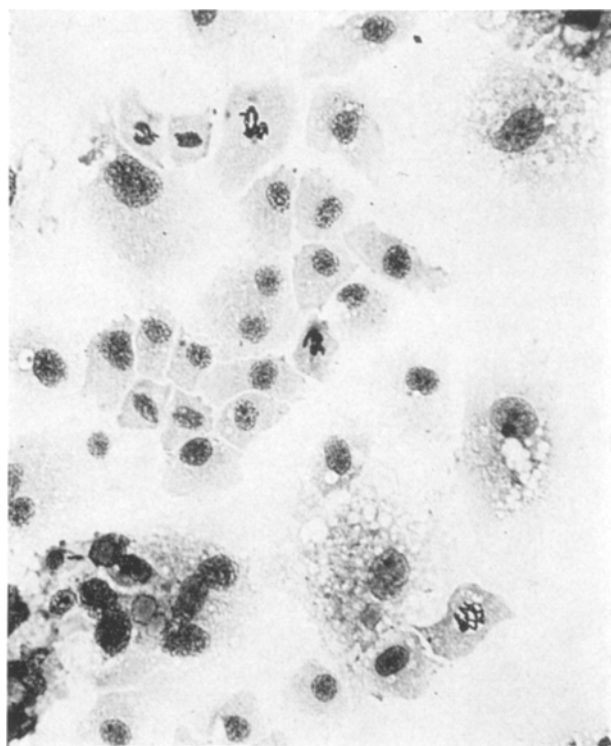


Fig. 2. Mitotic figures in 10-day-old culture ($\times 400$).

² W. TRAGER, Nature 184, B.A. 31 (1959).

³ H. EAGLE, J. exp. Med. 102, 595 (1955).

⁴ J. F. MORGAN, H. J. MORTON, and R. C. PARKER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 73, 1 (1950).

⁵ S. KITAMURA, Kobe J. med. Sci. 17, 23 (1965).

⁶ Acknowledgments: The technical assistance of Mrs. CH. HORAK is gratefully acknowledged.

⁷ This investigation was supported by Research Grant No. 63-CDC-51-01 from the U.S. Public Health Service, Bureau of State Services.

Facteurs influençant la fertilité des mâles de *Xenopus laevis* D. (Batracien anoure)

A toute saison, il est possible de provoquer le développement des caractères sexuels secondaires chez *Xenopus laevis* par l'injection d'hormone gonadotrope chorionique, tel le Gonadotropine chorionique (CIBA), le Pregnyl (Organon) ou le Physex (Leo). Ces produits, riches en hormone lutéinisante (LH) provoquent chez le mâle la formation des callosités nuptiales et leur pigmentation, ainsi que l'amplexus. Chez la femelle, l'hormone induit la ponte (un surdosage peut même provoquer la ponte d'œufs immatures (ORTOLANI et VANDERHAEGHE¹). Toutefois, les résultats de ces croisements sont mauvais en automne.

La figure illustre ce déclin saisonnier. Elle a été établie sur la base de 410 croisements effectués avec des animaux d'âge et d'origine très divers, pendant la période de juin 1962 à novembre 1965. Néanmoins, malgré l'effet saisonnier, on obtient encore un faible pourcentage de fécondation en «mauvaise période» (16%), par contre en «bonne période» le pourcentage de fécondation n'est pas aussi élevé que possible (37% seulement). Comme la température de notre salle d'aquariums est maintenue constante à 22–23°C, ce déclin d'origine apparemment photo-

¹ G. ORTOLANI et F. VANDERHAEGHE, Rev. suisse Zool. 72, 652 (1965).