

The azo dye is not soluble in water but in lipids, so that it is probable that it migrates into the fat vacuoles of the fungal cell after its enzymatic formation. As the site of deposition need not to be identical with the site of formation, it is impossible to assign exactly the reaction granules to individual cell particles.

The reason for the absence of any staining after incubation with L-tyrosine as substrate is very probably that all 3 fungi do not produce tyrosinase under the given conditions. This can be explained by the composition of the culture medium. Malt extract solution contains all nutrients for the most commonly occurring fungi and thus for the organisms examined in this case. HOROWITZ and SHEN<sup>17</sup> found that *Neurospora* shows strong tyrosinase activity only when it is grown on a sulfur-deficient medium. The tyrosinase inhibitor suspected by these authors might also to a large extent restrict enzyme production in the malt extract solution. Whether, and under what conditions, *A. fumigatus* and *Aur. pullulans* can produce tyrosinase is not known.

**Zusammenfassung.** Nachweis des Enzyms *p*-Diphenol: O<sub>2</sub> oxidoreductase (Laccase) in den Zellen der Pilze *Aspergillus fumigatus*, *Aureobasidium pullulans* und *Neurospora sitophila* durch einen Azofarbstoff, der mittels Kupplung des enzymatisch gebildeten *p*-Chinons mit BESTHORN's Hydrazon(3-Methyl-benzthiazolon(2)-hydrazon-hydrochlorid) entsteht. Als Substrat wird Hydrochinon verwendet. Der Farbstoff wird in runden, rot-braunen Granula abgelagert. Kontrollreaktionen bestätigen die Spezifität der Reaktion.

J. REISS<sup>22</sup>

*Institute of Special Botany, University of Mainz, D-65 Mainz (Germany), 6 October 1970.*

<sup>22</sup> I thank Prof. Dr. B. HACCIVUS, Institute for Special Botany, University of Mainz, for the fungus cultures and Mr. E. WHITACKER, B. A., for his help in the preparation of the manuscript.

### Microméthode de dosage des anticorps antiallotype chez la Souris par un test de liaison avec le fragment Fc marqué à l'iode radioactif

Il s'agit de doser dans un sérum de Souris C 57 Bl/6 les anticorps anti-Igla, c'est-à-dire anti-IgG de Souris CBA. Le déterminant Igla se trouve sur le fragment Fc de l'IgG de Souris CBA. On peut marquer ce fragment Fc par l'iode radioactif. Les anticorps anti-Igla doivent se lier aux fragments Fc marqués de l'IgG Igla. Il est possible ensuite de précipiter les anticorps liés, sans précipiter les fragments Fc non liés, grâce à un sérum de Lapin anti Fab de Souris.

La mesure de la radioactivité du précipité permettra de déduire la capacité de liaison avec l'allotype Igla des anticorps d'un sérum anti-Igla.

La courbe de la radioactivité du précipité en fonction de la dilution d'un sérum anti-Igla de référence de titre connu permet aussi de doser l'activité d'un sérum anti-Igla en pourcentage d'activité du sérum de référence.

**Matériel et méthodes.** Préparation des fragments Fab et Fc d'IgG de Souris CBA. L'IgG est obtenue à partir de sérum normal de Souris CBA par précipitation au moyen d'une solution de sulfate d'ammonium saturée à 35% puis par chromatographie sur DEAE Cellulose. Digestion de l'IgG (100 mg) 16 h à 37°C par la papaïne à 1% (Worthington) activée par du mercaptoéthanol. Les résidus sont passés à travers une colonne de sephadex G 75: on recueille le pic des fragments 3 S. On applique un gradient d'élution: de Tris 0,01M sans ClNa à Tris 0,01M ClNa 0,4M. On obtient 2 pics à la sortie: le premier correspond au fragment Fab, le second au fragment Fc.

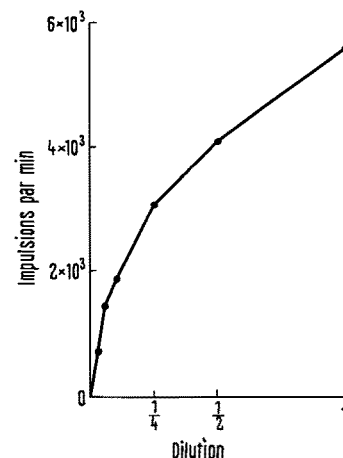
Marquage du fragment Fc Igla par l'iode 131 avec la technique à la Chloramine T<sup>1</sup>. On a obtenu une solution de Fc marquée à 25 µCi/ml et 5 µg/ml. Le fragment Fc peut également être marqué à l'iode 125.

Préparation du sérum de Lapin anti-Fab de Souris CBA. On a immunisé des Lapins avec les fragments Fab. On a obtenu un sérum de Lapin anti-Fab de Souris contenant 2,7 mg/ml d'anticorps avec une activité anti-Fc inférieure à 10%.

Préparation du sérum anti-Igla. On immunise des Souris C 57 Bl/6 avec des suspensions de 2 × 10<sup>9</sup> bacilles *Hémophilus pertussis* formolés agglutinés par des anticorps anti-*Hémophilus pertussis* développés chez des

Souris CBA. On teste les sérums immuns C 57 Bl/6 contre du sérum CBA par précipitation en gel d'agar suivant la technique d'OUCHTERLONY<sup>2</sup>, qui montre un trait de précipitation.

Méthode de microdosage des anticorps antiallotype. A 10 µl de solution de sérum-albumine de bœuf à 1 mg/ml contenant 8 µg/ml de fragment Fc non marqué, on mélange 10 µl de solution de Fc marqué par l'iode 131 à 5 µg/ml. Ces concentrations en fragment Fc ont été trouvées optimales. On ajoute 10 µl de sérum anti-Igla à diverses dilutions dans du sérum normal de Souris



Radioactivité, exprimée en impulsions par minute, des fragments Fc (Igla) marqués par <sup>131</sup>I précipités de façon spécifique par liaison aux anticorps anti-Igla grâce au sérum anti-Fab, en fonction de la dilution d'un sérum anti-Igla.

<sup>1</sup> F. C. GREENWOOD, W. M. HUNTER et J. S. CLOVER, *Biochem. J.* 89, 114 (1963).

<sup>2</sup> O. OUCHTERLONY, *Progr. Allergy* 5, 1 (1958).

C 57 Bl/6. On laisse incuber 10 min à température ordinaire. On ajoute 100  $\mu$ l de sérum anti-Fab. On incube à +4°C pendant la nuit. On centrifuge ensuite 30 min à 40000g à +4°C. On mesure la radioactivité dans le précipité. Chaque dosage est effectué en double.

Résultats et discussion. La Figure montre les radioactivités moyennes de Fc marqué précipitées spécifiquement en fonction de la dilution du sérum anti-Igla. La radioactivité totale précipitable par l'acide trichloracétique est de 14950 impulsions par minute (ipm). On a soustrait des radioactivités totales précipitées, la radioactivité précipitée de façon non spécifique qui représente 12,3% de la radioactivité du surnageant comme on l'a constaté avec le sérum normal C 57 Bl/6. Cette courbe permet de déterminer soit une dilution inconnue de ce sérum soit l'activité du sérum anti-Igla de référence.

On peut aussi calculer à partir de ces résultats la capacité de liaison du sérum anti-Igla utilisé avec le fragment Fc d'immunoglobuline Igla. La dilution de sérum correspondant à 33% de précipitation de la radioactivité spécifique des fragments Fc marqués liés aux

anticorps est entre 1 et  $1\frac{1}{2}$ . On en déduit que la capacité de liaison de sérum est de 5,2  $\mu$ g de Fc/ml de sérum.

**Summary.** We describe a new binding test of anti-allotype antibodies anti-Igla from C 57 Bl/6 mouse serum with Fc fragments of CBA mouse IgG labelled with 131 (or 125) iodine. The precipitation of bound antibodies is achieved by rabbit anti-mouse Fab serum.

M. STERNBERG<sup>3,4</sup>

*Division of Experimental Biology,  
National Institute for Medical Research,  
Mill Hill, London N.W.7 (England), 20. November 1970.*

<sup>3</sup> L'auteur remercie le Dr N. A. MITCHISON pour ses suggestions et pour l'hospitalité de son département.

<sup>4</sup> Adresse actuelle: Centre de Recherches sur l'Hypertension Artérielle, Service du Prof. P. MILLIEZ et Institut d'Immunobiologie (Directeur Prof. B. HALPERN), Hôpital Broussais, Paris 14<sup>e</sup> (France).

## A New Culture Flask for Cinemicrography

Kinetics of individual cells can be studied by intermittent observation under a phase microscope. Cinemicrography<sup>1,2</sup> and time-lapse photography<sup>3</sup> may be

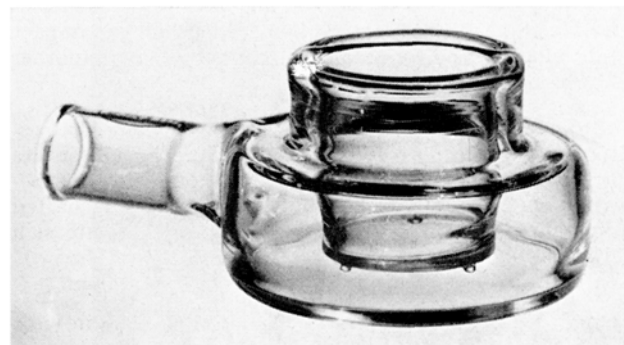


Fig. 1. Culture flask for cinematography.

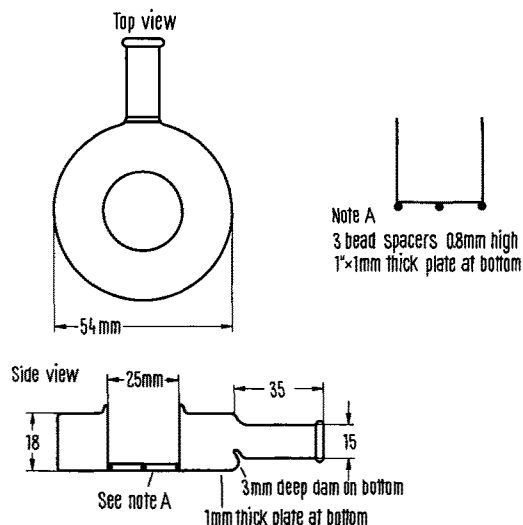


Fig. 2. Top and Side view of the culture flask.

used to record permanently the changes undergone by the cells being studied.

A culture vessel especially designed<sup>4</sup> for microphotography utilizing a regular phase microscope is reported (Figures 1 and 2). The flask can be sealed with a 00 silicon rubber stopper; therefore, it may be utilized in a simple, temperature-controlled environment, and does not necessitate a humid, CO<sub>2</sub> atmosphere. The center well allows the introduction of a 10X or a 16X objective lens, which is adequate for most kinetic studies.

The flask is made of optically transparent Pyrex glass, and can be autoclaved in the usual fashion. To reuse the bottle, the cells are removed by trypsinization; the flask is then treated with bichromate solution for 15 min. The vessel is rinsed 5 times with tap water, 5 times with distilled water, and 5 times with double-distilled water, after which it is ready for sterilization.

This culture vessel has been repeatedly utilized in our laboratory for kinetic studies of long-term cultures of human lymphocytes. It has demonstrated versatile uses and excellent optical qualities<sup>5</sup>.

**Resumen.** Se describe un frasco de cultivo especialmente adaptado para la cinemicrografia bajo microscopio de fase.

B. DREWINKO<sup>6</sup>

*Department of Clinical Pathology,  
The University of Texas, M. D. Anderson Hospital, and  
Tumor Institute at Houston, Houston (Texas 77025, USA),  
15 October 1970.*

<sup>1</sup> T. C. HSU, Texas Rep. Biol. Med. 18, 31 (1960).

<sup>2</sup> E. STUBBLEFIELD, in *Cytogenetics of Cells in Culture* (Ed. R. J. C. HARRIS, Academic Press, New York 1964).

<sup>3</sup> L. H. THOMPSON and H. D. SUIT, Int. J. Rad. Biol. 15, 347 (1969).

<sup>4</sup> The author gratefully acknowledges the helpful suggestions and final development of the culture flask by Mr. JAMES A. RAMIN and Mr. HOMER BLANKENSHIP JR., of Glenco Scientific Inc., Houston, Texas.

<sup>5</sup> This investigation was supported by the National Cancer Institute, USPHS Grant No. CA 06939-05.

<sup>6</sup> Special Research Career Development Fellow, National Cancer Institute, USPHS No. 1F03 CA 42078.