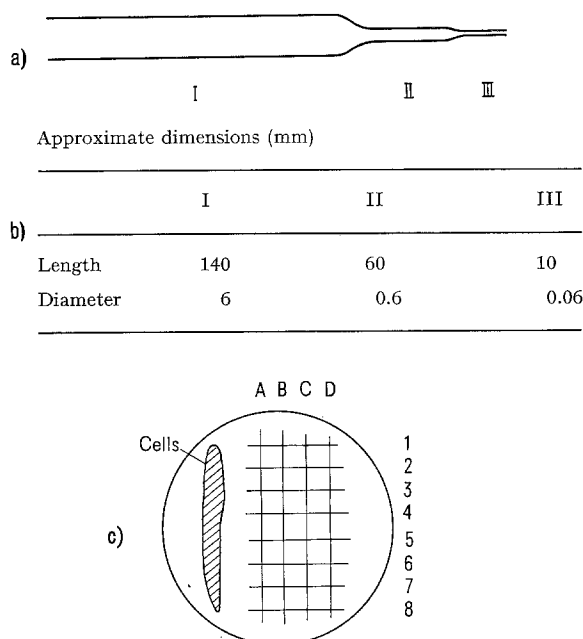


tube is fitted, approximately 40 cm in length. The tip is held in ethanol and cleaned by repeatedly blowing air through the system. Secondly, from glass rod, a microneedle is made having the same form and dimensions as the pipette, the tip being rounded in a small flame. Plates with particle-free agar, which were poured in an exactly horizontal position, are prepared by cutting lines in the surface, as indicated in the Figure (c), with the aid of a sterile needle or scalpel etc. The age of the agar plates is not very critical although neither freshly poured nor old dry plates should be used. The spores will be placed at the intersections. In the diagram the plate is prepared for 8 asci. A loop of sporulated cell material is transferred to an enzyme solution (e.g. 'Glusulase', Endo Laboratories, Inc., Garden City, N.Y. 11530; 0.02 ml enzyme preparation in 5 ml distilled water, 20–30 min at room temperature). If necessary the titer of this suspension is adjusted as to generate a reasonable average 'nearest neighbour' distance (e.g. $20 \times$ cell diameter) between cells and asci on the plate. A loop of the suspension is then streaked on the left side



Form a) and approximate dimensions b) of glass micropipette. Prepared agar plate (c).

of the plate (Figure c). The microscopic magnification is chosen such that a workable distance between agar and objective is maintained and that asci can be recognized with ease (e.g. objective $10 \times$, eye pieces $10 \times$). Also an armrest is necessary for supporting the hand which holds the pipette.

An isolated four-spored ascus is identified under the microscope. The free end of the plastic tube is held in the mouth and the tip of the pipette is brought into the field. A cell-free area on the surface is touched repeatedly thus filling the tip with liquid by capillary action. Then the ascus is touched and thereby picked up. The pipette is lifted slightly, and, with the other hand, the plate is moved so as to bring the first intersection 1A into focus (Figure c). The pipette is lowered and the ascus blown out. The success or failure of the manoeuvre has to be checked. The tip is then cleaned in ethanol and further asci are accordingly placed at the other intersections 2A to 8A. The second step consists in separating the 4 adhering spores of an ascus by rubbing it with the microneedle. This step may be facilitated by keeping the plate at 4°C over night. Finally, in the third step, 3 spores of each ascus are transferred with the pipette to the corresponding intersections B, C and D, using the same technique as for the initial ascus isolation.

It is my experience that with sufficient practice yeast asci can be dissected by free hand no less efficiently than with the micromanipulator. The free hand method can also be used, with modifications, for 1. work with other yeasts such as *Schizosaccharomyces pombe*, 2. single cell isolations (standard cloning, zygote isolation), 3. cell to cell pairings and 4. pedigree analyses³.

Zusammenfassung. Eine Methode wird beschrieben, die es erlaubt, einzelne Hefezellen freihändig, d.h. ohne Zuhilfenahme eines Mikromanipulators, zu isolieren. Diese Methode mag Anwendung finden bei Einzelzellisolationen, Stammbaumanalysen, Tetradenanalysen und Zell-zu-Zell-Paarungen.

P. MUNZ

Institute for General Microbiology, University of Bern, Altenbergrain 21, CH-3013 Bern (Switzerland), 27 April 1972.

³ The author is grateful to the Department of Genetics, University of Washington, Seattle, Washington 98105, for the hospitality offered during 1970–1971. This work was supported by the Swiss National Science Foundation.

A Modified Technique of Tissue Incubation for Insect Fat Body

Protein synthesis in insect fat body has frequently been studied in vitro by the incorporation of labelled amino acid from an incubation medium^{1–3}. Previous reports have described the incubation of pooled fat bodies for periods of up to 5 h, using small flasks or boiling tubes mounted vertically on shaking machines achieving rapid agitation. A modification of this procedure has been developed to optimize the aeration of incubated tissues and facilitate the separate use of individual fat bodies.

5-day-old adult males of *Locusta migratoria migratorioides* (R. & F.) were decapitated and each carcass opened in the mid-ventral line. After removal of the gut and testis, the visceral fat body was dissected under sterile Ringer's solution and floated out as a single sheet.

Each fat body was collected on a stainless steel spatula and introduced into a tissue culture tube containing a sterile aliquot of STEVENSON and WYATT's 'A' medium², modified by the inclusion of leucine (0.2 mM) and a mixture of unlabelled and U-¹⁴C-valine. Each fat body was stranded on the side of a culture tube in a position where the medium would wash over it periodically during the incubation. The tubes were fitted onto a Matburn

¹ H. SHIGEMATSU, Bull. seric. Exp. Stn Japan 16, 141 (1960).

² E. STEVENSON and G. R. WYATT, Archs Biochem. Biophys. 99, 65 (1962).

³ G. M. PRICE, J. Insect. Physiol. 12, 731 (1966).

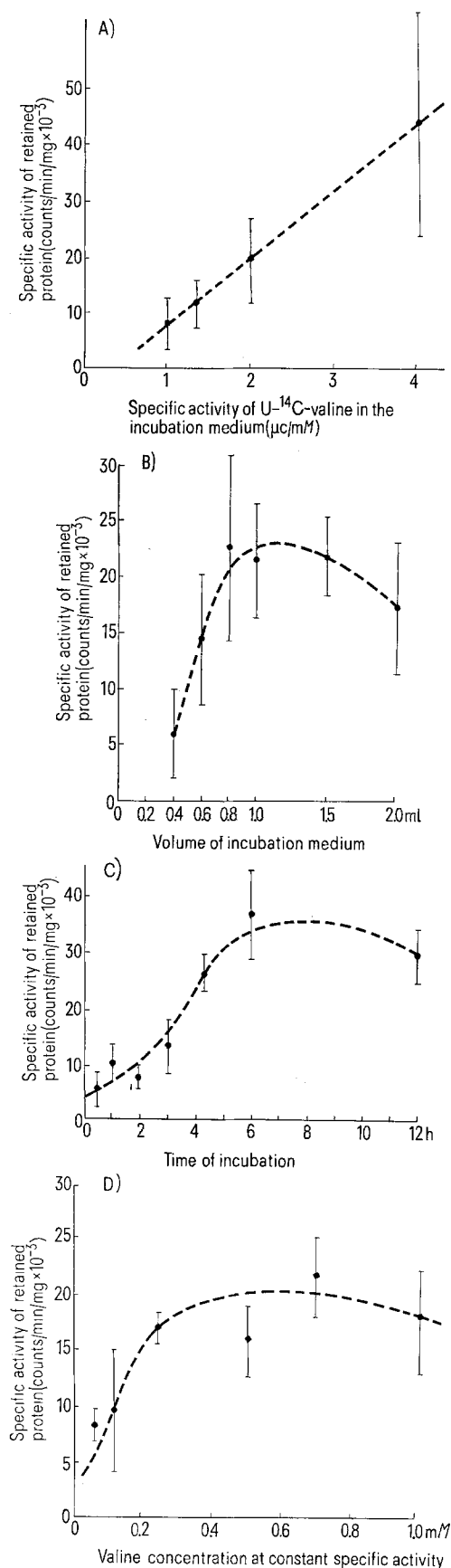


Fig. 1. Incorporation of U-¹⁴C-valine into retained fat body protein in vitro; A) with specific activity in the incubation medium; B) with the volume of incubation medium; C) with time of incubation; D) with valine concentration at constant specific activity.

Tissue Culture Roller Apparatus at an angle of 10° from horizontal and turned at 0.5 rpm in a constant temperature room at $29 \pm 1^\circ\text{C}$. The tissues thus passed through alternate 1 min phases of aeration and submersion. Following the incubation TCA-insoluble fractions of retained fat body protein were prepared for the determination of specific activity.

During an incubation of 3 h the relationship between specific activity in the incubation medium and in the retained protein was observed to be linear (Figure 1, A). Incorporation was maximal when the volume of incubation medium was 0.8–1.5 ml (Figure 1, B).

Incorporation into retained protein increased to a maximum after 6 h of incubation (Figure 1, C). The 12-hour level indicated that no further net incorporation occurred. During this period only small quantities of protein (less than $50 \mu\text{g}$) were released into the medium, indicating that the levelling off of incorporation at 6 h was not due to the attainment of an equilibrium between protein release and uptake by the fat body. The incorporation of labelled valine lagged during the first 2 h of incubation. SHIGEMATSU¹ found that this initial lag was eliminated by a preincubation of the tissue prior to adding the isotope.

Incorporation was unaffected by total valine concentrations in excess of 0.25 mM, but fell off sharply at lower levels (Figure 1, D). A similar result was obtained by PRICE³, and indicated that the rate of incorporation did not depend on valine concentration alone.

Fat bodies were dissected and halved; one half of each tissue was incubated for 3 h, the other for 6 h. Protein synthesis varied widely amongst individuals of the same age and treatment, but from the slopes it was concluded that the general rates of incorporation were similar in five of the fat bodies (Figure 2).

The results reported here were obtained from animals subject to normal treatment⁴. The technique is suitable for the incubation of small quantities of fragile fat body tissue and is in current use to study protein synthesis in insects treated by starvation and frontal ganglionectomy⁴.

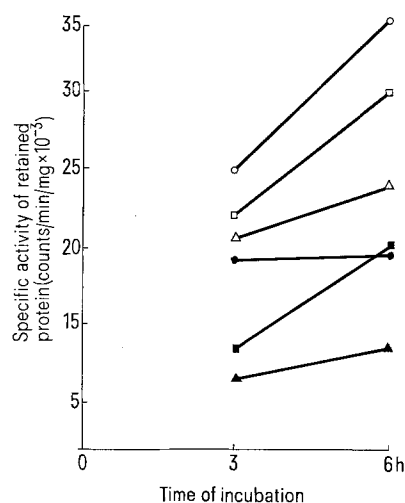


Fig. 2. Rates of incorporation of U-¹⁴C-valine into the retained protein of 6 fat bodies.

⁴ K. U. CLARKE and P. A. LANGLEY, *J. Insect Physiol.* 9, 411 (1963).

Résumé. Les synthèses des protéines dans le corps gras de chaque insecte ont été étudiées par l'incorporation de $U^{14}C$ -valine in vitro. Les tissus sont mis à incuber dans les tubes tournant à un régime minimum. Même si

l'incubation dure pendant 6 h, le taux d'incorporation ne dépend pas uniquement de la concentration de valine. Le taux des synthèses des protéines varie largement chez les individus traités de la même manière.

⁵ Present address: Dept. of Zoology, The University of Western Ontario, London 72 (Canada).

Department of Zoology, The University,
Nottingham NG7 2RD (England), 9 June 1972.

D. E. BIGNELL⁵

Zur Technik der Blutentnahme beim Meerschweinchen

Die Herzpunktion gilt als das Mittel der Wahl zur schnellen Gewinnung grösserer Mengen Blut. Nach Erfahrungen mit der klassischen Methode an über 400 Tieren wandten wir uns einer von anderen¹ und von uns in der Literatur nicht gefundenen Methode zu.

Methode. Das Meerschweinchen wird durch einen Mitarbeiter in genauer Rückenlage gut fixiert. Die Punktion erfolgt durch die obere Thoraxapertur hinter dem Sternum und in 1 bis 1,5 cm Tiefe von kranial nach kaudal bei etwa 10 Grad Neigung nach links wird das Herz erreicht. Die Herzpunktion wird ohne Narkose durchgeführt.

Erfahrungen und Diskussion. Wir haben diese Methode in über 200 Fällen angewandt und können eine wesentlich höhere Treffsicherheit und Schnelligkeit als mit der klassischen Methode bestätigen. Kommt es darauf an, dass das Tier die Herzpunktion überlebt, so ist es besonders gut zu fixieren und die Benutzung möglichst feiner, scharfer und kurz geschliffener Nadeln ist angezeigt. Mit den von uns angewandten 1,1 mm dicken und nicht ideal kurz geschliffenen Nadeln konnten wir bei 20 untersuchten Meerschweinchen zwischen 250 und 400 g KGW 5 min nach der Punktion in 12 Fällen ein Hämoperikard (in 4 Fällen ein sehr ausgeprägtes Hämoperikard) und in 1 Fall einen Hämothorax beobachten. Diese Untersuchungen veranlassten uns, die Tiere nach einer Herzpunktion nicht zu weiteren pharmakodynamischen Versuchen zu verwenden. So erklärt sich auch, warum wir zur Zeit keine Angaben über die Mortalität nach Herzpunktionen an einem grösseren «Krankengut» machen können.

Das von COLLIER bei Maus und Ratte empfohlene Vorgehen, direkt unter dem Sternum, im spitzen Winkel von kaudal her, haben wir beim Meerschweinchen nicht angewandt. In seltenen Fällen haben wir Blut nach Dekapitation gewonnen.

Gute Erfahrungen besitzen wir mit den Punktionen der Vena jugularis und femoralis. Technisch ist das Aufsuchen der Vena jugularis externa nach einem 1 cm unter dem Unterkiefer gelegten oberflächlichen Kragenschnitt einfach, da diese Vene die einzige starke Halsvene beim Meerschweinchen ist. Ebenso bietet das Aufsuchen einer oberflächlichen Vene nach einer Inzision in der Leisten- gegen keine Schwierigkeiten, wenn auch die hier ange- troffenen Venen wesentlich dünner als die Vena jugularis externa sind. Eine Unterbindung der angestochenen Venen kann dadurch erspart werden, dass dünne Kanülen benutzt werden. In seltenen Fällen kann ein Exitus letalis durch Nichtbeherrschung der auf die Venenpunk- tion folgenden Blutung nach ungenügend breiter Frei- legung der Vene beobachtet werden.

Mit der von NÖLLER² und SCHERMER³ als einfach und leistungsfähig angegebenen Punktion des Venenplexus

der Orbita haben wir wenig Erfahrung. Entnahmestelle ist der zwischen Augen und hinterer Begrenzung der Augenhöhle gelegene retroorbitale Venenplexus nach Stauung der Venen des Kopfes durch leichten Druck mit Zeigefinger und Daumen, die den Hals umschliessen.

TIESLER und SCHMIDT⁴ berichten über sehr gute Er- fahrungen durch Ansaugen des Blutes aus der Ohrvene mit einer an einen Saugapparat angeschlossenen Saug- glocke. Wir haben diese Methode selten zu unseren Un- tersuchungen benutzt, da durch den Unterdruck am Trommelfell Störungen der Innenohrphysiologie zu be- fürchten sind. Die von LEHNERT⁵ beschriebene 'Farmer's Wife Method', die im Abtragen eines Zehnagels und Ein- ritzen des Wundbettes besteht, ist uns nur aus der Lite- ratur bekannt.

Abschliessend wird nochmals betont, dass unsere Me- thode der Herzpunktion einen wesentlichen Fortschritt zur schnellen und sicheren Gewinnung grösserer Mengen sterilen Blutes beim Meerschweinchen darstellt⁶⁻⁸.

Résumé. Une nouvelle technique de ponction cardiaque est décrite et l'accent est mis sur les avantages de cette méthode.

P. FEDERSPIEL

Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenkranke der
Universität des Saarlandes, D-665 Homburg (Saar,
Deutschland), 18. Mai 1972.

¹ J. COMSA, persönliche Mitteilung (1971).

² H. G. NÖLLER, Klin. Wschr. 33, 770 (1955).

³ S. SCHERMER, *Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere*, 2. Aufl. (Barth Verlag, Leipzig 1958).

⁴ E. TIESLER und K. SCHMIDT, persönliche Mitteilung (1971).

⁵ J. P. LEHNERT, Am. J. clin. Path. 47, 416 (1967).

⁶ E. ABDERHALDEN, *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden* (Ed. W. A. COLLIER; Urban und Schwarzenberg, Berlin-Wien 1932), Abt. VIII, Teil 2.

⁷ G. HOFFMANN, *Abriss der Laboratoriumstierkunde* (G. Fischer Ver- lag, Jena 1961).

⁸ S. JUNG, *Die Grundlagen für die Zucht und Haltung der wichtigsten Versuchstiere* (G. Fischer Verlag, Stuttgart 1962).