

levels. The critical moment for the animal is the extraction of the microchamber. At the 8th day the microchamber is covered by a coat formed by cells and peritoneal secretions; occasionally there can also exist fibrine adherences to the peritoneum or intestine. If microchambers are carelessly taken off the animal recovers from the anaesthesia to die shortly after in shock. This problem can be prevented by careful handling of microchambers or by injecting the animal with 1 mg of hydrocortisone after the second operation.

In some cases it may be advisable not to inject the rodent with colchicine. In these cases, after removing the microchambers are incubated for 3 h at 37°C in Hanks solution containing 0.2 µg/ml of colchicine. Afterwards the procedure is followed as described above⁶.

Resumen. Se describe una técnica que hace posible el estudio cromosómico de pequeños roedores sin sacrificar el animal. El método consiste en: a) se introduce una microcámara de difusión cargada con un antígeno en la

cavidad abdominal del animal a estudiar, b) se extrae la microcámara cuando está rodeada por una población de células inmunocompetentes en división activa (el animal se colchicina 3 h antes de sacar la microcámara), c) se colectan las células adheridas a la cámara mediante tratamiento enzimático con Pronasa, d) se preparan las metafases para estudio cromosómico, mediante shock hipotónico, fijación y preparación de extendidos por secado al aire.

MARTHA S. BIANCHI, SUSANA MERANI and
N. O. BIANCHI

*Instituto Multidisciplinario de Biología Celular,
Calle 526 entre 10 y 11, La Plata (Argentina),
15 January 1975.*

⁶ Supported by grants from C.I.C. (Comisión de Investigaciones Científicas) and CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Simple Method for a Medium-Cell Separation

A rapid progress in the biochemistry of eucaryotic cells depends to a great extent on the development of new techniques. Tissue culture is the most useful model for cytological and biochemical studies of eucaryotic cells¹.

For separation of cells from culture medium, 2 methods have been used up to now. The first one employs centrifugation of cell suspensions followed by washing. This method is not suitable for taking samples at very short intervals, as well as the fact that fragile cells can be damaged during the procedure. The second one, a rapid sampling technique, used in special cases uses the ability of neutrophils to adhere to glass². Neutrophil cells are allowed to adhere to a coverslip and then are easily washed.

In the present paper, another simple method for medium-cell separation with broad spectrum of application is described.

Material and methods. 1. Whatman 3MM paper strips, size shown in Figure 1. 2. Phosphate buffered saline (PBS) or any physiological medium. 3. Vessel varying in length according to the number of processed samples.

Aliquots of cell suspension (in our case 0.1 ml samples were withdrawn) are dropped in the middle of Whatman 3MM paper, and one end of the strip is immediately dipped into the vessel filled with cold PBS. A fixation of the opposite end of paper should assure an ascending flow of the fluid. All extracellular soluble material

(including radioactivity) moves rapidly with the front of soaking solution, while cells remain at the same place (Figure 2). By this procedure the cells are washed within 2–3 min, during which time further samples can be taken. The zone with the spotted sample can be cut out of the wet or dried strip and radioactivity measured in dioxane or toluene scintillation liquid, respectively.

¹ H. EAGLE, *Science* 130, 432 (1959).

² R. A. HAWKINS and R. D. BERLIN, *Biochim. biophys. Acta* 173, 324 (1969).

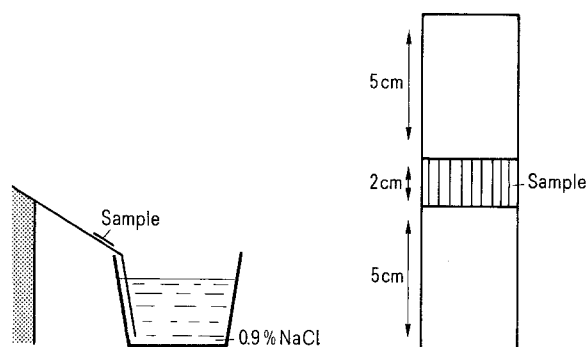


Fig. 1. Schematic representation of the method described.

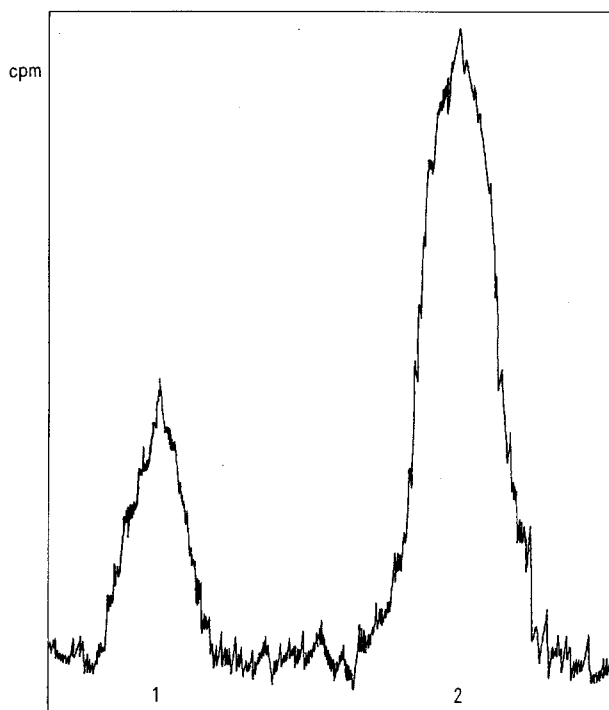


Fig. 2. Radioactivity tracing on paper strip after processing. 1. Zone where suspension of mouse thymus cell labelled by ¹⁴C uridine (spec. act. 0.1 mCi/0.46 mg) was spotted. 2. Radioactivity separated from the cell sample by soaking PBS.

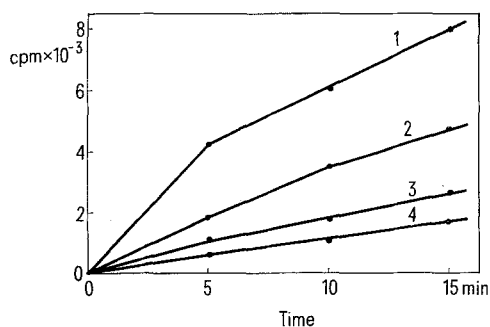


Fig. 3. Uptake of ^{14}C uridine. Time dependence of total radioactivity retained by mouse thymus cells incubated in medium M-199 with 10% of fetal calf serum. Samples loaded on the strip contained 5×10^5 cells. Concentration of ^{14}C uridine (spec. act. 0.1 mCi/0.46 mg): 1. 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$; 2. 0.05 $\mu\text{Ci/ml}$; 3. 0.02 $\mu\text{Ci/ml}$; 4. 0.01 $\mu\text{Ci/ml}$.

³ F. J. BOLLUM, J. biol. Chem. 234, 2733 (1959).

⁴ We acknowledge the valuable technical assistance of Mr. I. TOLMOVÁ of our Institute.

Using cold TCA (10%) instead of PBS as a washing fluid makes it possible to check the radioactivity incorporated in the TCA precipitable material of cells³. We conclude that samples of cell suspensions can be quickly and carefully separated from culture medium by the method described.

Summary. The present method makes possible a quick separation of cells from the medium with the aid of strips of filter paper and physiological solution. Cell suspension is put on the strip and all water soluble components are washed away by soaking in saline solution, while cells remain on the spot. The experiment on ^{14}C -uridine uptake proved the suitability of the method for membrane-transport studies.

M. JUROVČÍK⁴

Czechoslovak Academy of Sciences, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Flemingovo náměstí 2, Praha 6 (Czechoslovakia), 18 December 1974.

Technique immunohistochimique rapide d'identification des cellules lymphoïdes de la lignée B

B Lymphocytes Subpopulation. Rapid Identification with a Histoimmunological Method

La connaissance du type de lymphocytes (cellules B ou cellules T, plasmocyte) impliquées dans les réactions immunologiques normales ou pathologiques nécessite la mise au point de techniques d'identification immunologique.

Les lymphocytes B peuvent être repérés grâce à leurs globulines de surface; les plasmocytes par leurs globulines cytoplasmiques. Celles-ci peuvent être visualisées grâce à l'emploi d'une antiglobuline marquée. Cette réaction est possible en microscopie optique, comme en microscopie électronique grâce aux conjugués enzymatiques et en particulier les conjugués à la peroxydase. Ce travail rapporte les techniques mises au point en Microscopie optique et électronique afin de marquer les cellules de la lignée B, du thymus, du sang et de la rate.

Les cellules sont extraites du tissu dans le cas du thymus et de la rate. Le marquage est réalisé sur frottis ou sur culot de centrifugation.

Matériel et méthodes. Les cellules lymphoïdes ont été obtenues chez l'homme à partir du sang et chez la souris à partir du thymus et de la rate. Les conjugués utilisés sont ceux de l'Institut Pasteur.

Après avoir fabriqué nous-même nos conjugués nous avons adopté les conjugués n'utilisant que le fragment Fab de l'antiglobuline. Ceux-ci pénètrent en effet beaucoup mieux que les conjugués à globulines entières. Chez l'homme, on peut employer le conjugué Fab-Peroxydase de mouton. Pour la souris existe un conjugué Fab-Peroxydase de mouton également.

Extraction des lymphocytes au niveau du sang. A partir de sang frais hépariné mélangé à du liquide de Hank's, les lymphocytes sont séparés sur gradient de Ficoll avec metrizoate.

Au niveau des tissus. Le tissu est finement découpé au scalpel puis broyé au Potter, de façon ménagée. Le broyat obtenu est filtré sur colonne de coton. Le filtrat obtenu est centrifugé et le culot obtenu repris dans un volume tel que la concentration en cellules soit de 5×10^6 par ml.

Immunomarquage enzymatique en microscopie optique, sur frottis. Les cellules sont étalées sur lame de verre puis séchées à 37°C. Après légère fixation par la paraformaldéhyde à 4%, les cellules sont lavées puis mises en contact avec le conjugué dilué du 1/10 au 1/20, à 37°C durant 30 min. Après lavage et post fixation par le glutaraldéhyde tamponné, la Peroxydase est révélée par le mélange de Graham-Karnovsky (3-3'-diaminobenzidine en tampon tris-HCl) en présence d'eau oxygénée. Après lavage, les frottis sont recouvert d'une lamelle en milieu glyciné et sont examinés en microscopie optique avec l'objectif à immersion.

En microscopie électronique, sur culot. Après légère fixation par la paraformaldéhyde à 4% à pH 7,4, les cellules sont lavées, puis mises en contact avec le conjugué Fab-Peroxydase (Institut Pasteur Paris) à la dilution 1/10 pendant 3 h à 37°C. Après lavage soigneux et fixation par le glutaraldéhyde à 2% en tampon cacodylate durant 15 min à la température ambiante, les cellules sont mises en contact avec le milieu de Graham-Karnovsky (3-3'-diaminobenzidine) en présence d'eau oxygénée, durant 1 h à la température ambiante. Après lavage les cellules sont post-fixées au tetroxyde d'osmium à 1% durant 20 min.

Après déshydratation, les cellules sont imprégnées dans les résines epoxy et incluses dans le même milieu. Les coupes semi-fines de 1 μm permettent une lecture directe de l'immunomarquage. Les coupes fines sont observées sur microscope Philips EM 300 sans coloration.

Résultats. D'une façon générale, le conjugué Fab-Peroxydase permet un marquage très fin des immunoglobulines, et il ne donne pas de fausse réaction positive ni coloration de fond.

Sur lame. Le marquage sur frottis est rapide. Sa lecture est facile en immersion. Les plasmocytes ont un cytoplasme brun qui fait opposition avec le noyau excentré très clair. Ils sont parfaitement reconnaissables. Les lymphocytes B sont ronds avec un liseré brun noir qui paraît finement dentelé. Le reste de la cellule est clair.