

zonal-reograd mode. HB_sAg and 0.18% of protein originally present in the serum (as determined by measurements of OD at 280 nm) were recovered in the middle of the gradient (figure 3). Due to mixing during gradient reorienting, the resolution of molecules with different buoyant densities was less complete than would be expected for nonreorienting gradient centrifugation. For this reason, the samples containing HB_sAg were re-centrifuged under the same conditions. The final recovery of HB_sAg after all purification steps was approximately 50% as calculated from results of radioimmunoassays and complement fixation tests. The amount of normal human serum protein per mg of HB_sAg was not more than 60 µg as determined by a radioimmunoassay inhibition test⁶ even though this test does not discriminate

between protein impurities and antigenic sites related to normal human protein(s) which are an integral part of HB_sAg particles.

- 1 This study was supported by grant 09011 from the National Heart, Lung and Blood Institute. We thank Dr. B. Hollinger for testing HB_sAg samples by a complement fixation test.
- 2 C. R. Howard and C. J. Burrell, *Prog. med. Virol.* 22, 37 (1976).
- 3 A. R. Neurath, L. Cosio, A. M. Prince, A. Lippin and H. Ikram, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 143, 440 (1974).
- 4 A. R. Neurath, A. M. Prince and A. Lippin, *J. gen. Virol.* 19, 391 (1973).
- 5 A. R. Neurath, S. Lerman, M. Chen and A. M. Prince, *J. gen. Virol.* 28, 251 (1975).
- 6 Own data to be published.

Sur une méthode de récolte de diatomées vivantes après culture A method for collecting living diatoms after culture

J.-L. Boutry et M. Bordes

Laboratoire de biologie et Biochimie Marines, I.U.T., F-1700-La Rochelle (France), 26 août 1977

Summary. The best conditions for collecting living diatoms (*Chaetoceros simplex calcitrans*) after culture and their introduction into a replacement medium have been determined. Traumatism (such as ionic, thermic, gravimetric) have been minimized.

Au cours de recherches précédentes nous avons été amenés à récolter des diatomées intactes à partir d'un milieu de culture et ceci dans des conditions satisfaisantes de stérilité, afin de pouvoir les réintroduire dans un milieu neuf. Dans la présente note nous reportons les conditions qui nous ont fourni les meilleurs résultats. De telles opérations nécessitent en effet de cerner convenablement un ensemble de facteurs traumatisant, qu'il s'agisse de la température, de l'accélération durant la centrifugation, de la pression osmotique et de la force ionique.

Les diatomées ont été séparées du milieu par centrifugation, ce qui amène à circonscrire 4 phénomènes physiques:

1. Nous avons travaillé avec les diatomées *Chaetoceros simplex calcitrans* Paulsen cultivées à $+18 \pm 0,1^\circ\text{C}$; elles doivent être récoltées entre $+1^\circ\text{C}$ et $+5^\circ\text{C}$ afin d'augmenter la résistance de leur protoplasme et de diminuer le pouvoir d'échange de leur membrane cellulaire: d'où le risque d'un choc thermique capable de mettre les algues en «dormance».
2. L'accélération centrifuge utilisée doit être inférieure à la résistance à l'écrasement de la carapace péricellulaire externe des diatomées: le choc dynamique est donc à réduire au minimum.
3. Ces carapaces siliceuses prennent facilement des charges électriques par friction lors de leur déplacement dans un fluide: ces charges maintiennent les diatomées agglomérées entre elles si toute décharge est impossible.
4. Le passage des diatomées d'un milieu usé à pH 8,6–8,7 dans un milieu neuf à pH 7,5 ne se fait pas sans choc ionique: atténuer ce choc et une variation trop brusque de la pression osmotique du milieu par rapport à celle des algues est nécessaire pour qu'elles poursuivent leur croissance normalement.

Méthodes. Après lavage, et double rinçage à l'eau bidistillée, toute la verrerie utilisée est stérilisée à $+140^\circ\text{C}$ à l'étuve durant 1 h; tous les liquides sont filtrés sur coton hydrophile puis stérilisés à l'autoclave à $+120^\circ\text{C}$ durant 20 min: les pertes en volume à l'autoclave sont compensées. Les godets de centrifugation en polypropylène, après lavage et rinçage, sont immergés dans l'éthanol à 98%,

puis emballés dans des feuilles d'aluminium stériles ils sont séchés à l'étuve stérile à $+60^\circ\text{C}$; on opère de même pour les bouchons en duralumin et les joints en latex.

Les erlenmeyers contenant une culture en milieu stérile de diatomées *Chaetoceros simplex calcitrans* Paulsen âgée de 8 à 10 jours^{1,2} sont mis durant 5 h dans une chambre froide stabilisée à $+1^\circ\text{C}$: la température de $+8^\circ\text{C}$ étant atteinte dans la culture, on la transvase stérilement dans les godets de 500 ml en polypropylène qui sont placés dans un rotor angulaire de centrifugeuse climatisé à $+5 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Le rotor est lancé à 10 000 t/min durant 20 min, fournissant ainsi une accélération centrifuge de $16\,500 \times g$ au fond, $9\,000 \times g$ au milieu, et $7\,000 \times g$ en tête des godets. L'arrêt du rotor est obtenu sans freinage et demande 13–15 min (centrifugeuse Martin Christ modèle Zeta 20). Nous avons pu abaisser la force centrifuge utilisée à $15\,000 \times g$ au fond, $8\,000 \times g$ au milieu et $6\,000 \times g$ en tête des godets, durant 15 min (rotor 6 · 500 ml, 9000 t/min): la séparation est tout aussi bonne, mais la décantation du surnageant est plus délicate bien que possible.

La température dans le rotor est surveillée par la thermistance de commande du groupe réfrigérant: de $+1^\circ\text{C}$ en fin d'accélération elle passe à $+5^\circ\text{C}$ à la fin de l'opération. Après décantation du surnageant, les culots sont réunis stérilement dans 50 ml de milieu usé et homogénéisés pendant 6 min à 200 t/min avec un agitateur magnétique: la température progresse ainsi de $+5^\circ\text{C}$ à $+12^\circ\text{C}$. On ajoute alors, par fractions de 50 ml, 150 ml de milieu neuf stérile climatisé à $+12^\circ\text{C}$, et l'homogénéisation est poursuivie 5–6 min à 300 t/min: la température remonte de $+12^\circ\text{C}$ à $+18^\circ\text{C}$.

Sans attendre, on répartit également le volume obtenu (200 ml) dans le volume choisi pour la nouvelle culture stérile et climatisée à $+18^\circ\text{C}$.

- 1 J.-L. Boutry et M. Barbier, *Mar. Chem.* 2, 217 (1974).
- 2 J.-L. Boutry, M. Bordes, A. Février, M. Barbier et A. Saliot, *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 28, 41 (1977).

Ainsi nous avons réparti en courts palliers successifs les chocs thermique (de $+5^{\circ}\text{C}$ à $+18^{\circ}\text{C}$), ionique et osmotique (de pH 8,7 à 7,5) lors de l'homogénéisation des culots obtenus.

Nous précisons que l'emploi des godets en polypropylène permet aux diatomées de conserver la charge électromagnétique de friction qui les maintient agglomérées lors de la décélération et des transvasements: l'utilisation de godets en acier, ou tout matériau conducteur, conduit à un échec.

Discussion. Au cours de nos travaux sur les échanges en lipides existant entre *Chaetoceros simplex calcitrans* Paulsen et son milieu¹⁻⁴, les milieux de culture usés récupérés par cette méthode ont été examinés. Au microscope à immersion ($\times 1800$ – 2000) on n'observe aucune diatomée entière, ou fragments cellulaires, pouvant ainsi la bonne séparation. Une autre preuve d'efficacité est donnée par l'analyse des lipides des diatomées et des milieux usés lors des 2 cultures successives. Dans nos travaux sur le pouvoir d'incorporation par la diatomée d'un hydrocarbure³ ou du cholestérol⁴ marqués au ^{14}C , certains lipides extraits de la diatomée sont absents des milieux usés. Ceci montre

l'absence de perfusion notoire du contenu cellulaire de l'algue dans le milieu de culture au cours des centrifugations.

Les poids secs de diatomées obtenues à la fin de la première culture (488 mg et 498 mg/5 l), et de la 2e culture (647 mg et 622 mg/5 l), nous ont prouvé la très bonne survie de l'algue après les centrifugations qui n'ont pas freiné sa croissance lors de la 2e étape.

Divers essais de récolte des diatomées avec contrôle de la survie ont été réalisés: centrifugations en continu à $10000 \times g$ à $+18^{\circ}\text{C}$ et à $+4^{\circ}\text{C}$, puis à $28000 \times g$ (rotor normal) à $+4^{\circ}\text{C}$; ces 2 séries ne fournissent pas un rendement satisfaisant du test de survie effectué a posteriori; la 2e série donne seule une bonne séparation. C'est à la suite de la recherche systématique des conditions assurant l'optimisation de ces deux paramètres que la méthodologie reportée dans ce travail a pu être précisée.

Applications. Dans les travaux précités, cette méthode de changement de milieu de toute une récolte de diatomées nous a permis d'étudier quels produits de transformation l'algue échangeait avec un milieu neuf après avoir incorporé un précurseur marqué dans un précédent milieu: c'est la première fois, à notre connaissance, qu'un tel travail a été réalisé. Les applications de cette technique sont innombrables et se rapportent essentiellement à toute étude sur des diatomées vivantes et en particulier touchant l'évolution des échanges entre une diatomée et son milieu.

3 J.-L. Boutry, M. Bordes, A. Fevrier et M. Barbier, J. exp. mar. Biol. Ecol., sous presse (1977).

4 J.-L. Boutry, M. Bordes, A. Fevrier et M. Barbier, J. exp. mar. Biol. Ecol., sous presse (1977).

Scanning-autoradiography - a new method for the demonstration of membrane-surface-associated structures

F. Sudár and G. Csaba

Department of Biology, Semmelweis University of Medicine, P.O. Box 95, H-1450 Budapest (Hungary), 1 July 1977

Summary. A method for the demonstration of membrane-localized markers and receptors is described which results from the combination of autoradiography and scanning electron microscopy.

The demonstration of membrane-localized markers, hormone- and immunoreceptors is an important and difficult task in present research. Although biochemical investigations of isolated membrane components furnish reliable quantitative data, the exact localization of membrane components can be established only if the integrity of the cell membrane is not disturbed. To serve this purpose, investigations making use of isotope, fluorescent dye or other labels are appropriate. A different approach is to examine the cell surface by scanning electron microscopy; however, this method gives only a picture of the fine structure of the surface without revealing the exact localization of the structures in question¹. The methods were sometimes combined: a substance that specifically binds to membrane structures was labelled with molecules that are easily seen in the scanning electron microscope, as, for instance, synthetics²⁻⁴, metal⁵, or immune molecules⁶. A new type of experiment is reported here, where the grains produced by autoradiography are demonstrated by means of scanning electron microscopy.

In pilot experiments, thin sections were covered and developed like in ordinary autoradiography, and then examined by transmission and scanning electron microscopy in the visual area. This was possible because, with the JEOL 100 B electron microscope, the grid has not to be changed when switching from transmission to scanning. It was essential to place the grid with the section face

down into the microscope in order to enable the scanning beam to reach the emulsion layer. It could be shown in these experiments that the grains can be seen and identified in scanning electron microscopy due to their ability to emit secondary electrons (figure 1, a and b).

In the following experiments, ^{125}I -albumin was used for unspecific labelling of the cell membrane, and ^{125}I -triiodothyronine for specific labelling.

The thymus of newborn rats was grown in tissue culture for 3 days, fixed with 1.25% glutaraldehyde for 1 h, washed with PBS (phosphate-buffered saline) and incubated for 30 min in 2 ml of 2% human albumin labelled with $40 \mu\text{Ci } ^{125}\text{I}$ (spec. act. 5 mCi/mg). After washing 3 times, the material was postfixed for 1 h with 1% OsO_4 , dehydrated, dried (using CO_2 and the critical point drying procedure), and coated by evaporated C+Au. The specimens were then dipped into Ilford L 4 emulsion diluted 1:4, and 1 week later developed for 4 min in Microdol X. When examined in a JEOL 100 B electron microscope using the scanning option, the screw-shaped grains are easily recognized at the cell surface (figure 2).

Since the cell surface is not everywhere as smooth as in thymus cultures, the use of a different method seems required which demonstrates the radioactivity in spherical shape. This was especially important in the case of *Tetrahymena pyriformis* GL, the 2nd of our experimental objects, where the structure of the cilia is often screw-like.