

were chosen under the light microscope and sectioned in an LKB microtome either perpendicular to, or parallel to, the plane defined by the surface of the coverslip on which the cells had grown.

Results and discussion. Perpendicularly sectioned specimens from a 9 h PHA culture are shown in Figure 1. In these sections the unit membranes of the upper and lower surfaces of the cells can be viewed. Figure 1, a shows a small lymphocyte on the upper surface of another cell which serial sections identified as belonging to a blastoid lymphocyte. The ultrastructure of the cells and their organelles has not been damaged by the extreme variations in temperature to which such embedded blocks had been subjected. It is apparent from the shape of the uppermost cell that there was no significant flattening or distortion during the preparative procedure.

Figure 1, b shows another section of the lowermost cell of Figure 1, a. The arrows indicate points at which the cell's membrane had been in contact with the glass coverslip. Along the straight surface between A and B the coverslip has been separated cleanly from the Epon. From B to C, however, the Epon which had permeated between the cell and the coverslip has been stripped away with the coverslip as a line of cleavage developed at the under-surface of the cell. The homogeneous, electron dense material (GL) under the cell is the epoxy glue used to mount the Epon block for sectioning.

In specimens cut in a plane parallel to the surface of the coverslip on which the cells were cultured, the membranes of the lateral surfaces of the cells can be viewed. As shown in Figure 2, a, microvilli of a monocyte are in contact with a small lymphocyte in a 3 h culture stimulated with PPD. Figures 2, b and c illustrate the fact that in later, 24 h cultures containing either PPD (Figure 2, b) or PHA (Figure 2, c) the apposition of cell membranes

has become more extensive between the macrophages and the lymphocytes undergoing blastogenesis.

While contacts between lymphocytes and macrophages were more numerous in cultures stimulated with PHA than in those stimulated with PPD, the ultrastructure of the contacts appeared generally similar in both cases, consisting essentially of the apposition of unit membranes without any accumulation of cell organelles at these sites. Intercellular bridges such as those described connecting the cytoplasm of macrophages with that of lymphocytes in lymph nodes *in vivo*¹³ were not found in any of our cultures. Such bridges, if they occurred, did so only fleetingly or extremely infrequently.

Résumé. Des globules blancs humains ont été cultivés sur des lamelles de verre puis fixées et inclus *in situ* pour l'examen au microscope électronique. Les lamelles furent enlevées des cellules incluses dans l'Epon par la méthode de contraction et d'expansion thermique induite par passage répété du bloc d'Epon de l'eau bouillante à l'azote liquide.

P. M. ELIAS, L. ORNSTEIN,
M. A. LUTZNER and J. H. ROBBINS

*Dermatology Branch of the National Cancer Institute,
National Institutes of Health, Building 10,
Room 12 N 238, Bethesda (Maryland 20014, USA), and
the Cell Research Laboratory, Mount Sinai School of
Medicine, New York (N.Y. 10029, USA), 1 June 1970.*

¹³ M. D. SCHOENBERG, V. R. MUMAW, R. D. MOORE and A. S. WEISBERGER, *Science* 143, 964 (1964).

Méthode de séparation des diverses classes d'ARN par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en plaques

La séparation des différentes classes d'ARN¹ à partir d'un extrait brut est à la base de l'étude de cet acide nucléique et a fait l'objet de nombreux travaux de sorte que l'on dispose actuellement de plusieurs techniques éprouvées. Cependant, si les méthodes de séparation par centrifugation sur gradient de densité²⁻⁵ ou par chromatographie sur colonne de MAK⁶⁻⁸ sont universellement utilisées, celle d'électrophorèse prenant comme support un gel de polyacrylamide semble beaucoup moins répandue⁹⁻¹¹. Un tel support devrait pourtant permettre l'obtention rapide d'un «profil» de la composition en ARN d'une cellule.

Lors de l'étude de cellules végétales, nous avons été amenés à mettre au point, pour l'ARN, une méthode d'électrophorèse sur gels de polyacrylamide-agarose dérivée de celle utilisée par URIEL¹² pour la séparation des protéines. (Des essais avec de l'ARN extrait de foie de rat ont donné des résultats analogues.)

Des régions apicales de racines sont mises à incuber dans une solution de Hoagland contenant des antibiotiques³ et du phosphore 32 à l'activité spécifique désirée; après des temps d'incubation variables, les tissus sont lavés et broyés dans le milieu suivant: Tampon acétate de sodium: 0,05 M, pH 5,0; NaCl: 0,1 M; SLS: 1%; EDTA: 1 mM; bentonite: 0,5%.

L'ARN est extrait par les méthodes classiques de déprotéinisation au phénol à froid, puis, après plusieurs précipitations et lavages à l'alcool 70°, l'ARN est mis en solution dans des tampons différents selon son utilisation ultérieure; soit sur gradient de densité, soit dans des gels de polyacrylamide. Il est dosé en UV à 260 nm et la radioactivité comptée par effet Cerenkov¹³ à l'aide d'un Pakard Tricarb.

Pour les contrôles, nous avons utilisé des gradients de sucre 5 à 20% contenant du NaCl 0,1 M et de la bentonite. 0,2 ml d'ARN (600-1000 µg/ml) sont déposés sur ces gradients et centrifugés 5 h à 37000 × g dans une Spinco L, rotor SW 39; des fractions de 5 gouttes sont ensuite prélevées automatiquement diluées et dosées à 260 nm et leur radioactivité comptée.

Les gels de polyacrylamide sont bien connus comme support d'électrophorèse pour leur séparation extrêmement fine, supérieure à tout autre milieu. L'adjonction d'agarose accroît selon URIEL¹² la maniabilité de ces gels sans nuire à leurs propriétés.

La concentration en acrylamide est choisie en fonction de la masse moléculaire de la catégorie d'ARN à étudier. Nous voyons sur la Figure 1 (établie d'après diverses données de la littérature¹⁴) qu'un gel contenant 2,5 à 3% d'acrylamide laisse pénétrer toutes les classes d'ARN;

pour des concentrations aussi basses, nous utilisons l'agarose à 0,4%.

Les gels sont préparés essentiellement selon la méthode de URIEL¹². Les tampons utilisés sont les suivants: Tampon *Tris-HCl* pH 8,1, 0,05 M d'imbibition du gel; tampon *Tris Glycine* pH 8,1, 0,01 M des bacs d'électrophorèse.

Après lavage et imbibition des gels par le tampon 0,05 M, ceux-ci sont disposés dans la cuve à électrophorèse contenant le tampon 0,01 M. L'ARN (0,05 ml; 500 µg/ml) est mis dans les réservoirs de dépôt prévus

à cet effet dans le gel, l'ensemble de l'appareillage est placé dans un réfrigérateur et mis sous tension de 15 V/cm de gel pendant 1 $\frac{1}{2}$ h.

La migration terminée, les gels sont immédiatement fixés dans de l'acide acétique 7% ou fixés-colorés dans la solution suivante: Méthanol: 50 ml; eau distillée: 50 ml; glycérol: 20 ml; acide acétique: 1 ml; bleu de Toluidine: 1 g. Les gels sont laissés 2 h dans cette solution colorante puis décolorés soit par électrophorèse dans l'acide acétique 5% soit lentement par plusieurs bains d'acide acétique 1%. Pour sécher ces gels, la portion intéressante de l'électrophorègramme est découpée et déposée sur une lame de verre; le tout est disposé dans une boîte de Pétri. Lame et portion de gel sont alors recouverts d'eau distillée qui s'évaporera lentement. Le gel sèche progressivement et colle à la lame tout en conservant sa taille.

De tels gels en plaque sont très maniables et permettent une exploitation très aisée des résultats ce qui constitue un de leurs principaux avantages.

1. Les gels colorés, séchés, sont «lus» par un chromoscan et l'on obtient une courbe de densité optique (Figure 2A).

2. Ces mêmes gels peuvent être autoradiographiés: on les dépose sur un film radiographique, une exposition de 48 h est généralement suffisante, le développement des films procure une image du marquage des différentes classes d'ARN.

3. Les gels ayant été fixés mais non colorés sont découpés en fractions égales de 2 nm, la radioactivité de chaque fraction est comptée par effet Cerenkov. On obtient donc l'aspect quantitatif du marquage de l'ARN (Figure 2B).

Nous avons vu qu'un gel contenant 2,5% d'acrylamide laisse pénétrer toutes les classes d'ARN et en permet la séparation. Nous pouvons donc comparer les résultats obtenus à l'aide de l'électrophorèse et ceux obtenus par centrifugation sur gradient de densité. La Figure 2A est effectivement comparable aux profils généralement obtenus par centrifugation, il en est de même pour les courbes de radioactivité. D'autre part, l'intégration automatique des pics par le Chromoscan nous fournit un rapport des ARN ribosomiens lourds et légers de 1,8-2 pour les électrophorègrammes c'est à dire parfaitement conforme à un ARN d'origine végétale⁹.

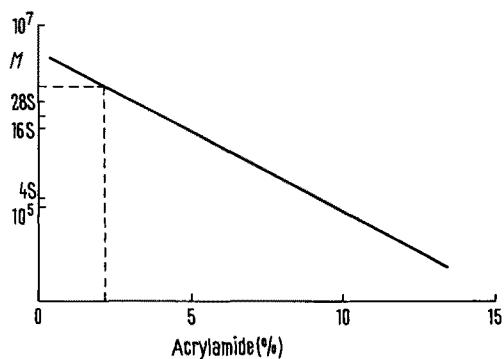


Fig. 1. Courbe montrant la possibilité de pénétration d'une molécule donnée dans des gels de diverses concentrations en acrylamide. On a mentionné en abscisse le pourcentage d'acrylamide permettant au gel de laisser pénétrer les composés dont le poids moléculaire (M) est porté en ordonnée (les équivalences en S des principales classes d'ARN y figurent également).

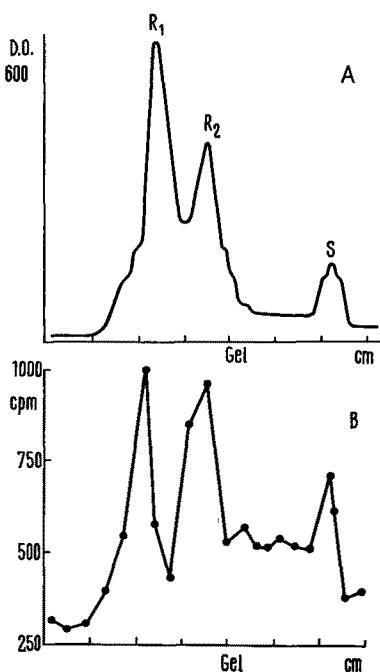


Fig. 2. A) Courbe obtenue en réflexion, par lecture au Chromoscan, d'un électrophorégramme d'ARN obtenu selon la méthode décrite dans le texte et coloré au bleu de Toluidine. B) Mesure de la radioactivité des fractions obtenues par découpage d'un gel analogue à A). R1, ARN ribosomique lourd; R2, ARN ribosomique léger; S, ARN soluble.

¹ Abréviations utilisées: ARN, acide ribonucléique; EDTA, ethylene diamine tetracetic acid; MAK, methylated albumin kieselgur; SLS, sodium lauryl sulfate; *Tris*, *tris* (hydroxy methyl) aminomethane.

² K. S. KIRBY, Biochem. J. 96, 266 (1965).

³ R. MIASSOD, P. PENON, M. TEISSÈRE et J. RICARD, C. r. Acad. Sci., Paris 268, 2608 (1969).

⁴ J. H. PARISH et J. R. B. HASTINGS, Biochim. biophys. Acta 123, 202 (1966).

⁵ W. J. STEELE et H. BUSCH, in *Methods in Cancer Research* (Academic Press, New York and London 1967), vol. III, p. 62.

⁶ J. H. CHERRY, H. CHROBECZEK, W. J. CARPENTIER et A. RICHMOND, Plant. Physiol. 40, 582 (1965).

⁷ J. INGLE, J. L. KEY et R. E. HOLM, J. molec. Biol. 11, 730 (1965).

⁸ J. D. MANDELL et A. D. HERSHY, Analyt. Biochem. 1, 66 (1960).

⁹ J. INGLE et J. L. KEY, Biochem. biophys. Res. Com. 30, 711 (1968).

¹⁰ U. E. LOENING, Biochem. J. 102, 251 (1967).

¹¹ E. G. RICHARDS, J. A. COOL et W. B. GRATZER, Analyt. Biochem. 12, 452 (1965).

¹² J. URIEL, Bull. Soc. Chim. biol. 48, 969 (1966).

¹³ H. H. ROSS, Analyt. Biochem. 41, 1260 (1969).

¹⁴ A. H. GORDON, in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (Eds T. S. WORK and E. WORK; North Holland Publ. Co., Amsterdam, London 1969), vol. 1, p. 1.

Les principaux avantages de cette technique d'électrophorèse sur gels de polyacrylamide en plaques sont donc les suivants: on peut obtenir rapidement et sans appareillage spécial, une image électrophorétique de l'ARN de tout matériel en cours d'étude. La reproductibilité de cette méthode ne nous a pas posé de problèmes particuliers. Enfin, la séparation des diverses familles moléculaires peut être plus fine que par centrifugation ou par chromatographie sur colonne de MAK, en effet, on n'observe pas d'aggrégation des ARN de poids moléculaire élevé pour le matériel végétal⁹. De plus, la séparation peut être plus poussée et ce en utilisant diverses concentrations en acrylamide.

Summary. A method of electrophoresis in polyacrylamide gel slabs for the separation of different classes of RNA is described. A gel mixture of 2.5% acrylamide and 0.5% agarose allows an improved and rapid separation of RNA molecules. Comparison between electrophoresis and centrifugation on a linear density gradient is discussed.

R. JALOUZOT

*Laboratoire de Biologie Cellulaire,
Centre de Biologie et de Biochimie du Développement,
B.P. 347, F-51 Reims (France), 24 juin 1970.*

CONGRESSUS

Switzerland

Third International Congress for Stereology

in Berne 26-31 August 1971

Under the auspices of the International Society for Stereology the meeting shall comprise interdisciplinary sessions on basic stereological methods, their mathematical foundations and their application to various disciplines. Analysis of shape, topological properties, size distribution and number of particles on microscopic sections shall

receive special attention. Further topics include sampling problems and instrumentation, particularly automatic image analysis and data processing. Information and provisional program by: Third International Congress for Stereology, Anatomisches Institut der Universität, Bühlerstrasse 26, CH-3000 Bern (Switzerland).

Great Britain

The First Meeting of the European Teratology Society

in Cardiff (Great Britain), 14-16 April 1971

The European Teratology Society began its formal existence on 1 October 1970. It has been founded to stimulate interest in and promote the exchange of ideas and information about the etiology, prevention and treatment of congenital malformations. It is hoped that the Society will include members from different experimental, clinical and epidemiological disciplines and will encourage communication between these disciplines and among teratologists employed in universities, hospitals, government institutes and the pharmaceutical industry.

The first meeting of the Society will be held in the Pre-Clinical Sciences Complex, University College. Inquiries about membership of the European Teratology Society should be sent to the Acting Secretary, Dr. K. S. Larsson, Laboratory of Teratology, Karolinska sjukhuset, S-10401 Stockholm 60 (Sweden), and inquiries about the Cardiff Meeting to Dr. J. B. Lloyd, Department of Biochemistry, University College, Cardiff (Great Britain).

ACTUALITAS

International Cell Research Organization (ICRO)

1. *Training Courses.* One of the main activities of ICRO is the organization of training courses on topics of high novelty and on modern techniques in cellular and molecular biology: Principles and techniques of tissue and organ culture; Genetics and Physiology of Bacterial viruses; Energy transducing systems on the sub-cellular level; Methods in mammalian cytogenetics; Membrane Biophysics; DNA-RNA Hybridization; Biogenesis of Mitochondria; Embryology and Epigenetics; Interaction between Animal Viruses and host cells, application of computers to experimental work in biology and chemistry; Methods in molecular biology, etc. The courses generally last 3-5 weeks, and include 16-20 young participants (sometimes more). The ICRO courses are fully inter-

national, both the teaching staff and the participants coming from the largest possible number of countries.

2. *The Problem of Developing Countries.* Most of the past ICRO courses have been organizing in European countries – east and west – but the demand from developing countries is increasing steadily. ICRO activities in developing countries may tend to give preference to topics of potential economic usefulness, such as applied microbiology, microbial protein production, fermentation industries, soil microbiology, plant genetics, etc.

Inquiries for more information should be addressed to: Dr. Adam Kepes, International Cell Research Organization, c/o Unesco – AVS, Place de Fontenoy, 75 Paris 7e, France.