

Fig. 1. Sagittal section of rat brain. Site of the described artefact indicated by arrow (scale, 250 µm).

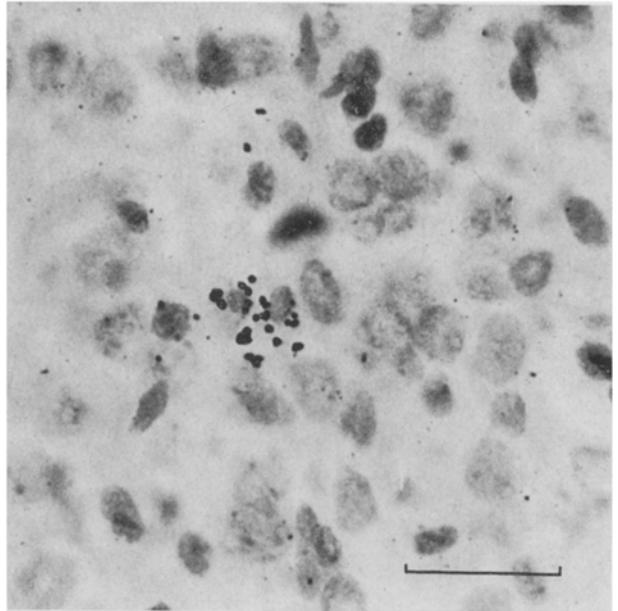


Fig. 3. Detail of autoradiograph showing size and arrangement of artefactual silver grains (scale, 25 µm).

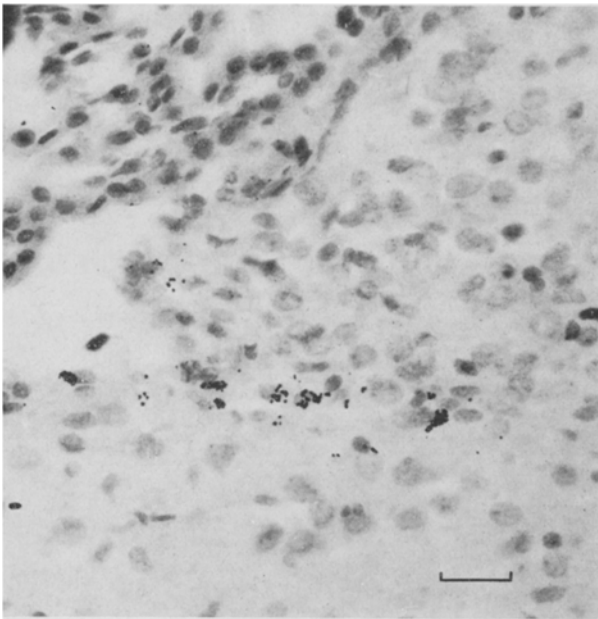


Fig. 2. Autoradiograph showing artefactual silver grains along the ventral border of the fourth ventricle (scale, 25 µm).

When the groups of artefactual silver grains described here (Figure 3) are compared with previously published

genuine β -autoradiographs of rat brains³, a great similarity in size and arrangement of the grains is seen. Lately the distribution of substances in the central nervous system has attracted increasing attention. Accordingly, it may be of value to take notice of this artefact as a possible source of incorrect interpretations in autoradiographic work on the brain⁴.

Zusammenfassung. Als die Verteilung des ³⁵S-Chlorpromazins bei Ratten mit mikroskopischer Autoradiographie untersucht wurde, bemerkte man bei Kontrolltieren, die keine radioaktive Substanz bekommen hatten, im Gehirn im ventralen Rand des kaudalen Teils des vierten Ventrikels Anhäufungen von Silberkörnchen. Die Art der Körnchen wurde mit der Röntgen-Mikroprobe bestätigt. Es wird vor diesen positiven chemographischen Artefakten in der Beurteilung der Autoradiogramme gewarnt.

C. R. HACKMAN and H. VAPAATALO

Research Laboratory of Medica Ltd.,
P.O. Box 325, SF-00101 Helsinki 10; and
Department of Pharmacology, University of Helsinki
(Finland), 4 October 1971.

² A. W. ROGERS, *Techniques of Autoradiography* (Elsevier, Amsterdam 1967), p. 89.

³ W. E. STUMPF, *Science* 162, 1001 (1968).

⁴ This work was partly supported by the O. Öflund Foundation, Finland.

Ein Durchflusszählrohr mit getrennter Messkammer für Mikroversuche mit biologischem Material in geschlossenen Systemen

Es wird ein Durchflusszählrohr mit getrennter Mess- und Zählkammer beschrieben, mit dem in geschlossenen Systemen Stoffwechselumsetzungen von geringen Mengen biologischen Materials untersucht werden können.

Verfolgt wurden der Verlauf der Veratmung von Saccharose durch Rebläuse im Gewicht von etwa 20 mg sowie die Dunkelfixierung von CO₂ durch 8 grüne Weinbeeren. In Gärversuchen (0,5–2 ml) wurde die Veratmung von Sac-

charose und Äpfelsäure durch Hefen verfolgt. Der Verlauf der Stoffwechselvorgänge ist anhand der Radioaktivitätskurven gut zu erkennen.

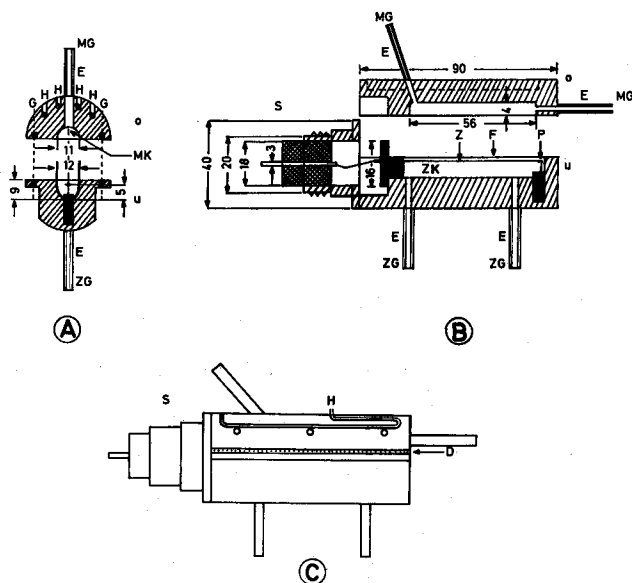
Bei Tracerversuchen mit ^{14}C -markierten Verbindungen an Pflanzen, Kleintieren und Mikroorganismen sollen die an die Umgebung (umgebende Luft) abgegebenen Stoffwechselprodukte auf ihre Radioaktivität untersucht werden. Je kleiner das Versuchsobjekt und je schwächer die Aktivität der markierten Verbindung ist, desto geringer wird die zu erwartende abgegebene Aktivitätsmenge sein. Zur kontinuierlichen Aktivitätsbestimmung ist es bei geringen Zählraten schon von der Messtechnik her gesehen oft notwendig, in einem geschlossenen System zu arbeiten, um die Impulse über die Zeit zu summieren. Bei Photosyntheseprozessen z. B., bei denen die Aufnahme von $^{14}\text{CO}_2$ über einen bestimmten Zeitraum studiert werden soll, ist ein System mit geschlossenem Kreislauf unentbehrlich.

Ein übliches Zählrohr kann dabei für die Aktivitätsmessung nicht verwendet werden, da das Zählgas Methan nicht von der Umluft zu trennen ist. Andere Autoren¹⁻³ haben bei Versuchen im Durchfluss das Methan hinter dem Versuchsgefäß zugemischt und dann durch das Zählrohr geleitet. Bei diesen Versuchsanordnungen kann infolge der Methanzumischung die Atem- bzw. Transpirationsluft nicht im Kreislauf geführt werden, wodurch bei geringen Aktivitäten die Impulse nicht aufsummiert werden können. Zur kontinuierlichen Überprüfung der Radioaktivität von CO_2 in geschlossenen Systemen mit kleinsten Ansätzen von biologischem Material war unbedingt ein Zählrohr mit getrennter, kleinvolumiger Mess- und Zählkammer erforderlich. Das von GEBAUER und SUTTOR⁴ und von HOLT und SCHMIDT⁵ angegebene Messgerät mit großflächigem Methandurchflusszähler ist für den Kleinversuch nicht geeignet. Ausserdem wird der Detektor in einer Antikoinzidenzanlage betrieben, womit ein höherer Kostenaufwand verbunden ist. Das nachfolgend beschriebene Zählrohr ist an jedes vorhandene Zählgerät mit einem Vorverstärkereingang anschliessbar.

Beschreibung des Durchflusszählrohrs. Wie aus der Figur A hervorgeht, besteht das Zählrohr aus zwei Messingrohrhälften. Die eine Hälfte (untere Hälfte im Querschnitt; Figur A, u) ist mit zwei Flanschstücken versehen, durch die die beiden Zählrohrteile (o und u) aufeinander geschraubt sind. Die gesamte Auflagefläche der beiden Teil-

stücke ist mit einer 1 mm dicken Silicongummidichtung versehen, die auf die Auflagefläche des oberen Zählrohrteiles (Figur A und B, o) mit Pattex aufgeklebt wird. Hierdurch ist gewährleistet, dass die Messkammer MK (Figur A und B) für geringe Unter- und Überdrücke dicht bleibt. Durch eine metallisierte Folie F (Fa. Frieske und Hoepfner, metallisierte Kunststoff-Folie, Flächengewicht 0,4 mg/cm²) wird die Bohrung des Zählrohrs in eine Messkammer MK (Figur A und B, o) und eine Zählkammer ZK (Figur A und B, u) getrennt. Die Kunststoff-Folie wird in ausreichender Grösse (75 mm × 50 mm) auf einer Glasplatte (metallisierte Schicht auf Glasplatte) faltenlos geglättet und die Enden mit Tesafilm befestigt. Auf die am oberen Zählrohrteil (Figur A und B, o) angeklebte Silicongummidichtung (D) wird wenig Pattex aufgetragen und nach kurzer Antrocknungszeit wird die Folie mit der Glasscheibe auf die Dichtung aufgeklebt. Danach wird die Glasscheibe vorsichtig entfernt und die beiden Zählrohrteile werden zusammengeschraubt. Durch den Pressdruck der Auflageflächen wird ein einwandfreier Halt der Folie gewährleistet sowie ein guter Massekontakt zwischen metallisierter Schicht und Zählrohrgehäuse hergestellt. Die metallisierte Schicht der Kunststoff-Folie ist auf der Seite der Zählkammer. Die Bohrung der Zählkammer (ZK) ist so gewählt, dass der Abstand zwischen der Wand und der Folie (F) eine günstige Verteilung der Feldlinien gewährleistet. Der Zählrohrdraht (Z) ist ein Platin-Iridium-Draht (90/10; Fa. Heraeus) mit einem Durchmesser von 0,08 mm. Er wird an einem in Teflon eingelassenen Draht aus Phosphorbronze (P) befestigt und durch diesen ständig straff gespannt. Beide Kammern, Messkammer (MK) und Zählkammer (ZK), sind innen galvanisch vergoldet. Die Zählkammer wird ständig von Methan (ZG = Zählgas) und die Messkammer von der zu untersuchenden Atmosphäre (MG = Messgas) durchspült. Die Messkammer hat ein Volumen von 1,9 ml, mit den Anschlussrohren (E) 2,6 ml, und die Zählkammer (mit Anschlussrohre, E) 4,0 ml.

Das Zählrohr wird an einem Zählgerät (Messkombination der Fa. Berthold, bestehend aus: Vorverstärker, Li-



- ¹ H. SIMON und F. BERTHOLD, Atomwirtschaft 7, 498 (1962).
- ² W. KLOFT, Z. angew. Entomol. 61, 413 (1968).
- ³ W. KLOFT und F. SCHULZE, Atompraxis 13, 265 (1967).
- ⁴ H. GEBAUER und F. SUTTOR, Atompraxis 12, 454 (1966).
- ⁵ C. VON HOLT und H. SCHMIDT, Biochim. Acta 334, 516 (1961).

A, Zählrohr Querschnitt; B, Zählrohr Längsschnitt; C, Zählrohr; //, Messing; ■, Teflon; H, Heizung; G, Gewinde M3; Z, Zählrohrdraht (Platin-Iridium 90/10); F, metallisierte Kunststoff-Folie; P, Phosphorbronzedraht; D, Silicongummidichtung; E, Edelstahlrohre (Ø innen: 2 mm, aussen: 4 mm); ZK, Zählkammer; ZG, Zählgas; MK, Messkammer; MG, Messgas; S, Anschlussstecker von Berthold Zählrohr. Angaben in mm.

nearverstärker, Ratemeter, Impulszähler und Hochspannungsteil) betrieben, hierbei wird der Anschlußstecker (S) mit dem Vorverstärker des Zählgerätes verbunden.

Die Eingangsempfindlichkeit am Linearverstärker betrug 400 mV. Die Arbeitsspannung liegt bei 3,0 kV. Die Lage des Zählrohres (horizontal, vertikal) hat keinen Einfluss auf die Messeigenschaften.

Die Nachweisempfindlichkeit, bei stationärem Betrieb, beträgt 10 pCi bei einem Nulleffekt von 17 ipm. Die Messkammer wurde ohne Störung bei einer Durchflussmenge von 100 ml/min betrieben.

Unser Zählrohr kann nach Kontamination leicht zerlegt und gereinigt werden. Vorwiegend bei Gärversuchen zeigte sich nach Versuchsende ein Memory-Effekt (durch höher siedende markierte Gärprodukte verursacht), der sich durch Auswaschen der Messkammer mit Aceton und Alkohol beseitigen lässt. Zur Vermeidung von Kondensationen (Wasser, Aromastoffe) in der Messkammer kann der obere Zählrohrteil (Figur A und B, o) beheizt werden. Die Heizelemente (H) bestehen aus Thermocoax-Draht (Fa. Philips). Sie sind in eingefrästen Nuten eingelassen und werden über einen regelbaren Heiztrafo (Bereich 0–20 V) ans Netz angeschlossen.

Anwendungsbeispiele. 1. Respirationsmessung bei Rebläusen (*Dactylophaera vitifolia* Shimer)⁶. 95 Rebläuse (Durchschnittsgewicht 220 µg pro Laus) nehmen in einem speziellen Fütterungsgefäß durch eine Parafilm-Membran⁷ hindurch ¹⁴C-Saccharose auf. Die kontinuierliche Aufzeichnung der im Atmungs-CO₂ auftretenden Aktivität zeigt, dass, bei 23°C Versuchstemperatur, bereits 1/2 Stunde nach Beginn der Fütterung ¹⁴CO₂ von den Rebläusen ausgeatmet wird. Ab der 4. bis 5. Stunde wird von den Rebläusen in der Zeiteinheit stets die gleiche Menge ¹⁴CO₂ ausgeatmet und nach etwa 27 Stunden wird kein ¹⁴CO₂ mehr abgegeben.

2. Messung der CO₂-Fixierung von Weinbeeren (Dunkelfixierung). Der Verlauf der CO₂-Aufnahme durch Weinbeeren (etwa 10 g Beeren) ist anhand der Abnahme des im Kreislauf vorhandenen ¹⁴CO₂ zu verfolgen. Die Versuche zeigten, dass schon nach 3–4 Stunden die Hauptmenge des CO₂ von den Beeren aufgenommen wurde. Nach etwa 20 Stunden hat sich ein Gleichgewicht eingestellt. Wie dieser Versuch zeigt, kann mit dem Zählrohr auch die Photosynthese von geringen Mengen pflanzlichen Materials (z. B. Keimlinge, Triebe usw.) verfolgt werden.

In weiteren Versuchen wurde die Abbaugeschwindigkeit von ¹⁴C-Äpfelsäure durch säureabbauende Hefen der Gattung *Schizosaccharomyces* und *Saccharomyces* verfolgt.

Summary. A fluid-measuring tube with separate cell measuring and counting chamber, is described with which metabolic transposition of small amounts of biological materials can be examined within an enclosed system. Tests were carried out on the course of the expiration of sucrose through phylloxera weighing 20 mg, and also on the fixation in the dark of CO₂ by 8 green grapes. Tests were also carried out on the expiration of sucrose and malic acid by yeast in fermentation. The course of metabolism can easily be seen by means of the radioactivity curves.

A. RAPP, H. STEFFEN, H. ULLEMEYER und G. RILLING

Bundesforschungsanstalt für Rebenzüchtung,
Geilweilerhof, D-6741 Siebeldingen über Landau/Pfalz
(Deutschland), 7. Oktober 1971.

⁶ G. RILLING und H. STEFFAN (unveröffentlicht).

⁷ T. E. MITTLER und R. H. DADD, *Nature*, Lond. 195, 404 (1962).
Herrn Prof. Dr. G. ALLEWELDT danken wir für die Förderung unserer Arbeiten.

An Appraisal of the Microinjection Technique Used in Investigating Sodium Efflux in Barnacle Muscle Fibers

Recent work by us on single barnacle muscle fibers loaded with radiosodium by microinjection has shown that the Na efflux always follows an exponential course, but that the rate constants plotted against time on a linear scale are seldom a constant. The question then asked was whether a declining rate constant for Na⁺ loss was the result of gradual sequestration of a fraction of the microinjected ²²Na or the result of an extraleaky fiber membrane associated with damage to the T-system caused by the microinjector. The simplest way of testing the latter possibility was to reinsert the microinjector into the fiber shortly after equilibration of the injected radiosodium and to see whether this maneuver brought about any change in the kinetics of the Na efflux. Control experiments along these lines were done, and the results obtained show quite clearly that insertion of an inner capillary 110 µm in diameter, as well as ejection of a 1 cm column of distilled water were without any significant effect on the Na efflux. However, experiments designed to see if deeper penetration into the fiber with the microinjector modifies the Na efflux were not then done. This paper is hence concerned with the problem of whether greater damage to the T-system would result in a noticeable dilution of the specific activity of the internal Na⁺.

The experiments were carried out using single muscle fibers of the barnacle *Balanus nubilus* or *B. aquila*. These fibers measured approximately 3 cm in length and 1.5 mm in diameter. The method of loading with ²²Na by means of

a modified Hodgkin and Keynes type of microinjector, and counting the activity of the washing-out specimens and the activity remaining in the fiber at the end of each experiment were essentially those already described^{1,2}. In some of the experiments a microinjector having an inner capillary 130 µm in diameter was used in order to produce more damage to the fiber. The procedure consisted in axial insertion of the microinjector at least 1/2 h following full equilibration of the injected ²²Na with the internal free Na, and in discharging a 1 cm column of distilled water. This was repeated in a few experiments by first ejecting a 1 cm column of distilled water, followed 30 min later by ejecting a further 1 cm column of distilled water.

The object of the first series of experiments was to check the finding that the Na efflux is unaffected by microinjecting 0.1 µl of distilled water, using an inner capillary 110 µm in diameter. Figure 1 shows that this is so (10 experiments). One sees that a steady state was achieved a few minutes after loading the fiber with ²²Na and that reinsertion of the microinjector, as well as the discharge of a 1 cm column of distilled water, failed to modify the behavior of the Na efflux. From this it may be deduced that damage of the T-system is not great enough to lead to a noticeable increase in influx of Na or that the damage done to the

¹ E. E. BITTAR, *J. Physiol.*, Lond. 187, 81 (1966).

² E. E. BITTAR and E. TONG, *Life Sci.* 10, 43 (1971).