

type strains were obtained from the American Type Culture Collection: *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. chelonae* ATCC 19977, *M. smegmatis* ATCC 19420, *M. phlei* ATCC 11758 and *M. vaccae* ATCC 15483. Rapidly growing mycobacteria isolated in the microbiology laboratory of the Methodist Hospital as well as strains from the Center for Disease Control and College of American Pathologists survey isolates were also tested.

All cultures had been grown for 5–7 days at 36 °C in 5% CO₂ atmosphere and were inspected for growth. Both the TAD and TAB media supported growth of all strains of *M. fortuitum* and *M. chelonae* capable of growing on MacConkey agar, while inhibiting the growth of all other rapidly growing mycobacteria (table). The growth of *M. fortuitum* and *M. chelonae* on TAD media was more luxuriant than on TAB media.

Detection of arylsulfatase activity was performed by flooding the plate with 2.0 M solution of sodium carbonate. Colonies with arylsulfatase activity become pink, indicating the release of phenolphthalein from the substrate. All strains of *M. fortuitum* and *M. chelonae* were positive for arylsulfatase.

Various representatives of bile tolerant Enterobacteriaceae, including Salmonellae, capable of growing on MacConkey

agar also grew on TAB and TAD agar plates, but their colonies became visible after overnight incubation and they were invariably arylsulfatase negative.

The tryptose-arylsulfate-desoxycholate and tryptose-arylsulfate-bile salts media can be used for the isolation and simultaneous identification of *M. fortuitum* complex from processed sputum specimens. The use of TAD or TAB media for this purpose is economical because it obviates the need for subculturing and reduces the total time required for the identification of pathogenic, rapidly growing mycobacteria.

- 1 L. Barksdale and K.-S. Kim, Bact. Rev. 41, 217 (1977).
- 2 E.H. Runyon, A.G. Karlson, G.P. Kubica and L.G. Wayne, in: Manual Clinical Microbiology, 2nd edn, p.148. Ed. E.H. Lennette, E.H. Spaulding and J.P. Truant. American Society of Microbiology, Washington, DC 1974.
- 3 W.D. Jones, Jr, and G.P. Kubica, Am. J. med. Technol. 30, 187 (1964).
- 4 J.E.M. Whitehead, P. Wildy and H.C. Engback, J. Path. Bact. 65, 451 (1953).
- 5 A.L. Vestal, Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria, p.66. Public Health Service, CDC, Atlanta, Ga. 1975.

Préparation des acides desoxyribonucléiques de foie de rat par filtration sur Ultrogel A 2

Preparation of DNA from rat liver by gel filtration on Ultrogel A 2

J.-E. Besson, G. Veillas, R. Teyssier et J. Radisson

Faculté de Médecine Alexis Carrel, Laboratoire de Biophysique, Rue Guillaume Paradin, F-69008 Lyon (France), 10 juillet 1980

Summary. Rat liver DNA was prepared by 2 successive filtrations on Ultrogel A 2 (LKB, Sweden). The method gives a high yield (2.33 mg/g of fresh liver) of pure ($A_{260}/A_{230} = 2.44$, $A_{260}/A_{280} = 1.88$) HMW-DNA ($s = 26.2$ S).

Matériel et méthodes. Le foie de rat est conservé à –25 °C. L'organe, encore congelé, est coupé en tranches minces. 2 g de tissu sont homogénéisés à 20 °C à l'aide d'un homogénéisateur Polytron dans 10 ml de LiCl 2 M, tris 0,01 M, pH 7,5. L'homogénat est laissé 30 min à 2 °C, et agité doucement à la main 2 ou 3 fois. Il est ensuite centrifugé 30 min à 25000 × g à 0 °C. Le surnageant est soumis à 2 filtrations successives sur Ultrogel A 2. Le haut de chacune des colonnes C1 et C2 est muni d'un entonnoir servant de réservoir et restant à demeure. Le débit des colonnes, assuré par 2 pompes péristaltiques P1 et P2, est de 3 ml/cm² · h. La filtration est descendante et s'effectue à 20 °C.

L'Ultrogel A 2 de la colonne C1 (2,5 × 24 cm) est équilibré avec NaCl 2 M, EDTA 2,5 mM, pH 7,5. Nous déposons 5 ml de surnageant directement à la surface du gel. Lorsque l'échantillon a entièrement pénétré dans le gel, nous remplissons l'entonnoir de C1 de tampon NaCl 0,1 M, SDS 0,1%, tris 0,01 M, pH 7,5. L'absorbance à 260 nm de l'éluat est enregistrée. Tant qu'aucun composé absorbant à cette longueur d'onde n'est détecté, l'éluat est éliminé.

L'Ultrogel A 2 de la colonne C2 (2,5 × 48 cm) est équilibré avec NaCl 0,1 M, SDS 0,1%, tris 0,01 M, pH 7,5. Après avoir déposé le surnageant sur la colonne C1, on dépose 30 mg de protéase VI (Sigma) dans 30 ml de NaCl 0,2 M, tris 0,05 M, SDS 0,2%, pH 7,5 à la surface du gel de la colonne C2. Lorsque la protéase a entièrement pénétré dans le gel, la pompe P2 est arrêtée.

Au moment où un pic commence à apparaître dans l'éluat de C1, on fait couler ce dernier dans l'entonnoir de C2, et l'on règle P2 de façon à ce que son débit soit égal à celui de P1. On désolidarise de nouveau les 2 colonnes après le passage du premier pic de C1, et l'on remplit l'entonnoir de C2 avec son tampon d'équilibration. L'absorbance des fractions recueillies à la sortie de C2 est lue au spectrophotomètre à 230, 260 et 280 nm.

Pour une utilisation ultérieure, le gel de C1 est rééquilibré avec NaCl 2 M, EDTA 2,5 mM, tris 0,01 M, pH 7,5, après avoir fait passer au moins 100 ml de NaCl 0,1 M, SDS 0,1%, tris 0,01 M, pH 7,5, déposé après le surnageant, puis au moins 100 ml d'eau distillée. Les 2 colonnes peuvent servir un grand nombre de fois sans qu'il soit besoin de recouler le gel.

Résultats et discussion. La figure donne un exemple de diagramme des absorbances des fractions du premier pic de C2. Le spectre UV de ces fractions est caractéristique des ADN. En particulier les rapports (moyennes de 16 valeurs ± écart-type) $A_{260}/A_{230} = 2,44 \pm 0,12$ et $A_{260}/A_{280} = 1,88 \pm 0,10$ montrent que la contamination par les protéines est faible (par les méthodes de la littérature, A_{260}/A_{230} varie de 2,23¹ à 2,32² et A_{260}/A_{280} de 1,80¹ à 1,86^{2,3}). Le dosage colorimétrique des protéines⁴ est négatif. Dans nos conditions d'expérience, cela correspond à une contamination protéique inférieure à 3%. La réaction colorimétrique à l'orcino⁵ et une chromatographie sur colonne MAK⁶ mon-

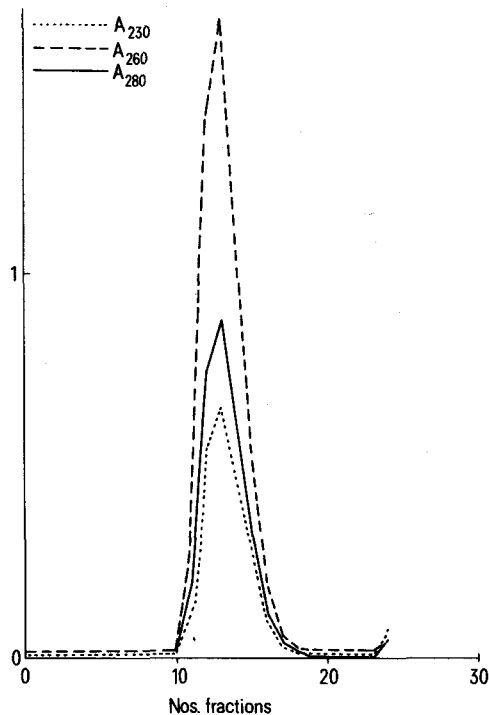


Diagramme des absorbances à 230, 260 et 280 nm des fractions du 1er pic de la colonne C2. Les absorbances des fractions du 2ème pic, qui commence ici au tube no 24, n'ont pas été mesurées. (Le foie est broyé dans LiCl 2 M, puis l'homogénat est centrifugé. Le surnageant est déposé sur une colonne C1 d'Ultrogel A2, équilibrée avec un tampon de force ionique élevée. L'absorbance à 260 nm de l'éluat de C1 est enregistrée. Sur une 2ème colonne C2 d'Ultrogel A 2, équilibrée avec un tampon de faible force ionique, on fait passer successivement de la protéase et le 1er pic de C1.) Débit: 3 ml/cm² · h. Volume des fractions: 7,5 ml.

trent de plus l'absence d'ARN et de nucléotides. Une limite supérieure de contamination par l'ARN peut être estimée à 0,1%. Les «gros» ARN (ARN nucléaires géants, ARN ribosomiques) sont insolubles dans LiCl 2 M et sont déjà éliminés totalement ou presque dans la première étape de broyage suivi de centrifugation⁷. Si même il en restait dans le surnageant, ils seraient adsorbés sur C1⁸. Les ARNt et les oligonucléotides par contre sont solubles dans LiCl 2 M et ne sont pas adsorbés sur l'agarose en milieu de force ionique élevée. Mais leur poids moléculaire est faible (26000 environ pour les ARNt), et ils sont totalement séparés des ADN par filtration sur Ultrogel A 2 dont la limite d'exclusion est de $50 \cdot 10^6$. Le taux d'ADN obtenu, déterminé par spectrophotométrie, est de $2,33 \pm 0,13$ mg/g de tissu frais (il est de 1,3 pour Ganguli et al.³ et de 2 pour Kirby⁹). Le coefficient de sédimentation $S_{20,w}^0$, déterminé à l'aide d'une ultracentrifugeuse analytique M.S.E., est de 26,2 (les valeurs trouvées dans la littérature vont de 23 S^{1,9} à 24,4 S³).

- 1 J.E. Loeb et J. Chauveau, *Biochim. biophys. Acta* 182, 225 (1969).
- 2 J.P. Savitsky et F. Stand, *Biochim. biophys. Acta* 114, 419 (1966).
- 3 P.K. Ganguli, R. Bresseur et L. Gyenes, *Prep. Biochem.* 3, 313 (1973).
- 4 O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr et R.J. Randall, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).
- 5 W.C. Hutchison et H.N. Munro, *Analyst* 86, 768 (1961).
- 6 J.D. Mandell et A.D. Hershey, *Analyt. Biochem.* 1, 66 (1960).
- 7 J.E. Besson, J. Champier, A.M. Chambosse, J. Radisson et M. Berger, *Can. J. Biochem.* 56, 129 (1978).
- 8 S.L. Petrovic, J.S. Petrovic, R.A. Markovic et Z.A. Knezevic, *Prep. Biochem.* 4, 509 (1974).
- 9 K.S. Kirby, *Biochem. J.* 104, 254 (1967).

Cornea regeneration in the Pacific giant octopus, *Octopus dofleini*, and the common octopus, *O. vulgaris*

G. Dingerkus and E.D. Santoro¹

Department of Ichthyology, American Museum of Natural History, New York (New York 10024, USA), and Biology Department, City College of New York, New York (New York 10031, USA), 27 August 1980

Summary. Cornea regeneration in a Pacific giant octopus, *Octopus dofleini*, occurred within 10 days after the injury was observed. Surgical removal of the cornea in 2 common octopi, *O. vulgaris* experimentally duplicated this cornea regeneration within a 10-day period. It is, therefore, concluded that besides sucking discs, arms, and nerve fibres, octopi can also regenerate corneal tissue.

The regeneration of sucking discs, arms, and nerve fibres has been well documented in octopi²⁻³. However, there have been no reports of cornea regeneration in octopi. Past studies have revealed that certain gastropods have the capacity to regenerate eye tissues, however, their eyes are dissimilar to those of cephalopods, especially octopi⁴. Numerous similarities exist between the eyes of octopi and vertebrates⁵⁻⁷. However, the vertebrate cornea is derived from ectodermal and mesodermal components, whereas the cephalopod cornea is only ectodermal in origin. Among vertebrates, lens regeneration occurs in salamanders, and cornea repair, but not cornea regeneration, has been observed in various species⁸⁻¹⁰.

On 9 February 1979, a female Pacific giant octopus, *Octopus dofleini*, arrived at the New York Aquarium. The

specimen, New York Aquarium No.02-415, was captured on 3 January 1979 by Blakely Rocks, Elliott Bay, off Seattle, Washington, at a depth of 20-25 m, and weighed approximately 18 kg with a 2.5-m arm-span. Upon arrival aquarist Peter Fenimore and the senior author noted that the left eye of the animal had been damaged and that the cornea was missing. A rough jagged edge of cornea, about 1 mm in width, was observed around the circumference of the eye (figure 1). The cause and exact date of injury could not be determined. The animal was placed into and maintained in a 200-gallon semi-open natural seawater aquarium at 4-7°C, with a daily diet of 2.5 kg herring, mackerel, clam, or crabs.

The animal was inspected daily and on the 10th day after noting the injured eye, a new cornea was observed. At this