

sealed tube) 6% of ammonia were found; with milder hydrolysis methods the amounts of NH_3 varied from 2.6 to 3.8%.

This work has been supported by a grant from the *Life Insurance Medical Research Fund*.

ERWIN CHARGAFF, CELIA LEVINE,
CHARLOTTE GREEN, and JACOB
KREAM

Department of Biochemistry, College of Physicians
and Surgeons, Columbia University, New York 32, N. Y.,
February 28, 1950.

Zusammenfassung

Es wird über eine Reihe von Studien berichtet, welche die Zusammensetzung des Vitamins B_{12} zum Gegenstand haben. Diese mit sehr kleinen Substanzmengen ausgeführten Versuche bedienten sich ausschließlich der Chromatographie auf Filtrierpapier. Zwei Probleme bildeten den Hauptgegenstand der Untersuchung, nämlich die Frage des Vorkommens von Nukleinsäurebestandteilen im Vitamin und die quantitative Bestimmung der schon früher nachgewiesenen Aminoverbindung. In der für Nukleinsäuren ausgearbeiteten Versuchsanordnung konnten weder Purine, noch Pyrimidine oder Desoxyribose nachgewiesen werden. Die Bestimmung der Aminoverbindung ergab das Vorliegen von 2 Molen Aminoderivat (berechnet als 2-Amino-1-propanol) pro Mol Phosphor.

Studies on the Possibility of Using Protamin Sulfate in the Technique of *in vitro* Cultures of Hematopoietic Tissues

The use of heparin (CRACIUN¹) has rendered easier the technique of the culture of tissues, because it allows of obtaining a fluid plasma—with unaltered physical and chemical conditions—to be used as a cultural medium. At the appropriate moment this heparinized fluid plasma is then coagulated by the addition of embryonic extract.

In order to simplify this second phase of the cultural technique, which depends on embryonic extracts of recent preparation (these extracts lose their activity in 1–2 days), we have thought useful to investigate whether the part played by these extracts could be taken over by some stuff easy to store, and consequently always at the disposal of the scientist. Such a stuff would be desirable especially for cultures of leucocytes and hematopoietic tissues in general, which themselves secrete trephonic substances into the medium.

As a means for coagulating heparinized plasma we have chosen to study the properties of protamin sulfate, whose ability to neutralize heparin had been shown by CHARGAFF and OLSON². On the one hand we investigated not entirely clear some aspects of the interference of protamin sulfate with heparinized plasma, and on the other hand the behaviour of the various functional activities of bone marrow cultures in heparinized plasma coagulated with protamin sulfate instead of embryonic extracts. In this paper we summarize some of the results that concern the first of the two aspects of this question.

First we set out to find the amount of protamin sulfate (Protamin 3711/2 Roche) necessary to coagulate *in vitro*

human plasma of healthy subjects fasting since 12 hours, this plasma having been obtained and kept fluid by the addition of 10 AU (anticoagulant units) of heparin (Liquemin Roche) per cc. of blood. At the same time we determined the time necessary for clotting when the amounts of protamin varied in relation to the optimal amount. We have chosen 10 AU of heparin per cc. of blood, because this is the dose which we generally use for the preparation of the cultural medium in our studies of cultures of hematopoietic tissues. We have been able to establish the following points:—

(1) With amounts of protamin less than 0.001 mg no clotting takes place—at least within the 48 hours we prolonged our observation.

(2) At 37° C coagulation begins with a dose of 0.001–0.005 mg of protamin, and can be obtained with all the intermediate amounts up to the extreme one of 3 mg.

(3) With an amount of protamin greater than 3 mg, the plasma does not coagulate any more, at least within 48 hours.

(4) The optimal amounts of protamin by which the fluid plasma is coagulated within 15' extend from 0.03–0.6 mg; those by which the clotting is obtained within 30' range between 0.02 mg and 1 mg.

(5) When the amounts of protamin depart from the optimal ones—increasingly or decreasingly—the clotting time is obviously increased. For instance, our minimal coagulating amount of protamin has been 0.001 mg with a coagulation time of 115'; the maximal coagulating amount of protamin has been 3 mg, and coagulation time was 840'.

The second point we wanted to investigate was the influence of temperature on the clotting time *in vitro* of human heparinized plasma under the effect of protamin. We have been able to note that:

(1) The optimal temperature for clotting to happen lies between 33°–37° C.

(2) At room temperature the clotting time is twice or three times as great as at optimal temperature.

(3) The influence of temperature on coagulation becomes more marked when amounts under and over the optimal protamin quantities are used.

As a third aspect of the problem we wanted to investigate whether protamin is active only on recently prepared plasma, or whether it is able to coagulate also fluid plasma stored at room temperature. We established that upon addition of optimal doses of protamin the clotting time increases (up to 2–3 times the initial one) up to complete absence of clotting on the 3rd–5th day. For the plasma stored in ice-box we have been able to note the persistence of the coagulability till 9th day.

Experiments made with heparinized plasma of guinea pig and rabbit fasting since 18 hours showed that the optimal protamin amounts and coagulation times for the plasma of these animals correspond to the values established for human plasma.

At last we tried to assemble some data in order to explain the fact that protamin is able to clot plasma obtained and preserved fluid by heparin addition, although it is itself an anticoagulant (THOMPSON¹, WALDSCHMIDT-LEITZ and coworkers, 1929). We have therefore repeated the titration between heparin and protamin (CHARGAFF²), by titrating 5 cc. of a heparin solution containing 1,000 AU/cc. with a 1:1,000 protamin

¹ E. CRACIUN, Arch. exp. Zellforsch. 2, 295 (1925/26).

² E. CHARGAFF and K. B. OLSON, J. Biol. Chem. 122, 153 (1937/38).

¹ W. H. THOMPSON, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 29, 1 (1900).

² E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. 25, 671 (1938).

solution. A slight milkish opalescence was to be seen with a protamin amount of 0.5 mg. This opalescent liquid precipitated after centrifugation into a whitish crystalline sediment, which could be suspended by stirring in water or plasma. If this substance is the result of the reaction between protamin and heparin, it is easy to understand that the plasma liberated from heparin by the addition of an appropriate amount of protamin undergoes the normal coagulation phases.

At the end of this short report we conclude that protamin sulfate offers sufficiently favourable characteristics as a coagulation means for the nutritional medium, and consequently its use appears justified for the *in vitro* cultures of hematopoietic tissues. We have therefore initiated experiments in order to establish whether such procedure does not interfere with the normal behaviour of the functional activities of the explanted cells.

GIOVANNI ASTALDI and JENNY FRANKO

Department of Internal Medicine, University of Pavia, December 1, 1949.

Zusammenfassung

Die Autoren haben sich die Aufgabe gestellt, eine Substanz zu suchen, die an Stelle der embryonalen Extrakte den zur Kultur von hämatopoietischem Gewebe nötigen Nährboden koagulieren kann. Zu diesem Zwecke haben sie die Fähigkeit des Protaminsulfats, menschliches, heparinisierendes Plasma zu koagulieren, untersucht. Hierbei wurde festgestellt, welches die optimalen Konzentrationen und die Grenzmengen des Protaminsulfats sind, die zur Gerinnung des Plasmas führen. Ferner wurde die Gerinnungszeit bei verschiedenen Protaminmengen, der Einfluß der Temperatur auf die Koagulationsgeschwindigkeit sowie die Zeitspanne, in der die Zugabe von Protamin jedoch noch insofern ist, heparinisierendes Plasma zur Gerinnung zu bringen, bestimmt.

Zytochemischer Nachweis der Adenosintriphosphatase (ATP-ase) in den Zellen des Ascitestumors der Maus

Während einer Untersuchung über den Ribonucleinsäuregehalt (RNS) der Zellen des Ascitestumors der Maus ergaben Versuche mit der Gomori-Reaktion, daß die Zellen keine alkalische Phosphatase enthielten. An bestimmten epithelialen Tumoren kamen KABAT und FURTH¹ und MANHEIMER und SELIGMAN² zu gleichen Befunden. Da sich unser Testobjekt frei von alkalischer Phosphatase zeigte, wurde es für die Untersuchung auf ATP-ase gewählt, nachdem Herr Prof. LETTRÉ mich anregte, das Enzym zytochemisch nachzuweisen.

Methode. Der Ascitestumor der Maus ist eine Abart des Ehrlichschen Mäusekarzinoms und entsteht durch intraperitoneales Verimpfen der Zellen³. Es bildet sich dabei ein Transsudat in der Bauchhöhle, in dem sich die Zellen frei beweglich vermehren. Durch Punktion der Ascitesflüssigkeit läßt sich Tumormaterial gewinnen. Die Lebenszeit der Tiere beträgt infolge des starken Ascites etwa 15 Tage.

Von ungefähr 50 weißen Mäusen mit Ascitestumoren verschiedenen Alters wurden pro Tier 8–10 Ausstriche angefertigt und bei Zimmertemperatur luftgetrocknet. Die Hälfte der Präparate diente als Kontrolle.

ATP-ase wurde mit der von GLICK¹ modifizierten Gomori-Reaktion nachgewiesen. Zu jedem Versuch lief als Kontrolle die Gomori-Reaktion² auf alkalische Phosphatase. Als Substrate dienten Na-Glycerophosphat und Adenosintriphosphorsäure (ATP)³. Die Versuchslösung zum Nachweis der alkalischen Phosphatase hatte einen p_H -Wert von 9,4 und die für ATP-ase einen p_H -Wert von 9,0. Als Puffer wurde Veronal-Na benutzt. Die günstigste Bebrütungszeit betrug 5 Stunden. Die Reaktion auf alkalische Phosphatase blieb auch nach 24stündiger Inkubation negativ. In den Kontrollausstrichen wurden die organischen Phosphatlösungen durch destilliertes Wasser ersetzt. Bei einem Teil der Präparate kam als Gegenfärbung die Feulgen-Nukleal-Reaktion zur Anwendung.

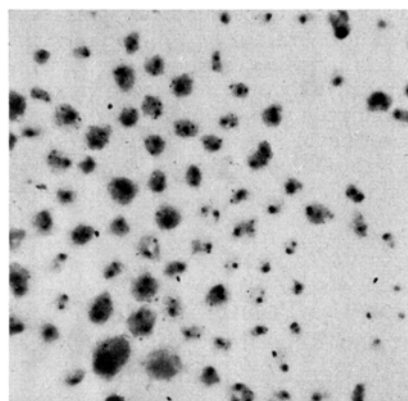


Abb. 1. Gomori-Reaktion auf ATP-ase. Mikrophotographie, Vergr. etwa 1000mal.

Resultate. Die stärkste ATP-ase-Reaktion gaben die Nucleoli der Tumorzellen (Abb. 1). Die Stärke der Schwärzung nahm in der Reihenfolge Nucleolus, Nucleus, Zytoplasma ab. Wie die Aufnahme zeigt, war letzteres in manchen Zellen negativ. Daß die Orte der ausgeprägtesten Schwärzung in den Zellen den Nucleolen entsprachen, konnte durch Beobachtungen mit dem Phasenkontrastmikroskop erhärtet werden.

Im Gegensatz zu diesen 2–8 Tage alten Ascitestumoren fiel der ATP-ase-Gehalt etwa vom achten Tag an in allen Zellen zuerst im Zytoplasma ab, dann folgten Nucleus und Nucleolus. In 12–14 Tage alten Tumoren bildeten die Nucleolen die einzigen färbbaren Zellstrukturen.

Abb. 2 zeigt eine vierkernige Zelle aus einem 9 Tage alten Tumor mit negativem Zytoplasma, wobei von dem vierten Kern nur noch der Nucleolus sichtbar ist. Das gleiche Verteilungsmuster besitzen bemerkenswerterweise auch jüngere multinukleäre Zellen. Sie haben im Gegensatz zu ihren gleichaltrigen ein- oder zweikernigen Zellen ihre zytoplasmatische ATP-ase verloren.

Daß außer Zytoplasma und Kern auch die Kernkörperchen die Fähigkeit verlieren können, ATP zu

¹ E. A. KABAT und J. FURTH, Amer. J. Path. 17, 303 (1941).

² L. H. MANHEIMER und A. M. SELIGMAN, J. Natl. Canc. Inst. 9, 181 (1948).

³ H. LETTRÉ, Z. Physiol. Chem. 268, 59 (1941).

¹ D. GLICK und E. E. FISCHER, Arch. Biochem. 8, 91 (1945). – D. GLICK, *Techniques of Histo- and Cytochemistry* (Interscience Publishers, New York, 1949).

² G. GOMORI, Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 42, 23 (1939).

³ Die ATP stammte von der Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio.