

A figure of 4500 eggs per milligram of dried *Paracentrotus* eggs was derived from data provided by ÖHMAN¹ and GUSTAFSON (private communication).

Paracentrotus sperm was analyzed by three independent methods, namely, by means of the microbiological assay described here, by the colorimetry of the reaction product with diphenylamine, and, most accurately, by the quantitative determination of the individual purines and pyrimidines² after the hydrolysis of the D.N.A. fraction with concentrated formic acid. The values found, as 10⁻⁶ µg D.N.A. per sperm cell, were, respectively, 1.0, 1.1, 1.0. This corresponds to a D.N.A. content of 15% of the dry weight.

The thymine content of *Paracentrotus* eggs was so low (corresponding to a D.N.A. content of about 0.01% of the dry weight) that only the microbiological assay could be employed; and even with this method the results are subject to some uncertainty. Five assays of two batches of unfertilized eggs, collected at different times, gave an average value of 28 × 10⁻⁶ µg of D.N.A. per egg. The most reliable individual determination corresponded to a D.N.A. content of 24 × 10⁻⁶ µg per egg. No significant difference between the two batches was observed.

The D.N.A. contents of the nuclei of sea urchin gametes are unknown, nor can the contribution by the polar bodies be estimated. When the sperm and egg analyses reported here are compared, it appears not unlikely that in sea urchin eggs D.N.A. is not limited to the nucleus. Indications of the existence of extranuclear D.N.A. in eggs have been reported recently³. What should, however, be stressed is that the differences in the D.N.A. contents of whole egg and of sperm recorded in the present study are of a less dramatic order of magnitude than those reported for sea urchins by other workers. It is obvious that the problem of the D.N.A. analysis of biological materials low in this constituent can hardly be solved in a general manner, before better methods become available⁴.

This work has been supported by research grants from the National Institutes of Health, United States Public Health Service, and the Rockefeller Foundation.

D. ELSON⁵ and E. CHARGAFF

Cell Chemistry Laboratory, Department of Biochemistry, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York 32, N. Y., January 22, 1952.

Résumé

Nous avons déterminé les quantités d'acide désoxyribonucléique contenues dans les spermatozoïdes et les œufs

¹ L. O. ÖHMAN, Arkiv Zool. [A] 36, No. 7 (1944).
² E. VISCHER and E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. 176, 703, 715 (1948). – E. CHARGAFF, E. VISCHER, R. DONIGER, C. GREEN, and F. MISANI, J. Biol. Chem. 177, 405 (1949). – E. CHARGAFF, R. LIPSHITZ, C. GREEN, and M. E. HODES, J. Biol. Chem. 192, 223 (1951). – Compare also E. CHARGAFF, Exper. 6, 201 (1950); J. Cell. and Comp. Physiol. 38, suppl. 1, 41 (1951); Federation Proc. 10, 654 (1951).
³ F. SCHRADER, Science 114, 486 (1951). – H. L. FRAENKEL-CONRAT, W. H. WARD, N. S. SNELL, and E. D. DUCAY, J. Am. Chem. Soc. 72, 3826 (1950). – H. L. FRAENKEL-CONRAT and E. D. DUCAY, Biochem. J. 49, XXXIX (1951).
⁴ Note added in proof.—A microbiological assay of desoxyribosides and its application to their estimation in frog's eggs have come to our attention after the submission of this paper: E. HOFF-JØRGENSEN, Biochem. J. 60, 400 (1952). – E. HOFF-JØRGENSEN and E. ZEUTHEN, Nature 169, 245 (1952).
⁵ U. S. Public Health Service Research Fellow.

vierges de l'oursin *Paracentrotus lividus*. Ces déterminations, faites au moyen d'une méthode microbiologique pour le dosage de la thymine, ont donné les résultats suivants: sperme 1,0 × 10⁻⁶, œuf environ 25 × 10⁻⁶ µg d'acide désoxyribonucléique par cellule.

Zur Frage der Begleitstoffe in gonadotropen Hormonpräparaten

Es gibt eine Gruppe von Substanzen vom Charakter der Mucopolysaccharide, die von gewissen bakteriellen Enzymen und der «enzymatischen Komponente» der Viren der Influenzagruppe gespalten werden. Solche Stoffe können als Inhibitoren der Virus-Hämagglutination (HIRST) funktionieren und durch Einwirkung von «receptor destroying enzyme» (RDE.), einem Produkt von *Vibrio cholerae*, oder beim Kontakt mit Influenzavirus diese inhibitorische Eigenschaft einbüßen. Stoffe, wie Ovomucin¹, Francis Inhibitor (= unspezifischer Serum-inhibitor der Influenzavirus-Hämagglutination²), Blutgruppensubstanzen, Ovarialzystenschleim³, Serumgonadotrophin⁴, diverse Urinextrakte⁵, gelten deshalb als dem enzymatischen Abbau zugänglich. Im Falle des Ovomucins sind auch Abbauprodukte schon beschrieben worden⁶.

Tabelle I

Inhibitorische Wirksamkeit verschiedener Harnextraktstoffe und gonadotroper Hormonpräparate gegen die Virus-Hämagglutination

Inhibitor	Inhibitionstiter, reziproke Verdünnungswerte
Extrakt aus Schwangerenharn: 400 Hormon-E/mg	64000
Extrakt aus Schwangerenharn: 750 E/mg	512000
Extrakt aus Harn klimakterischer Frauen, 200 E/mg	128000
Extrakt aus Männerharn	128000
Präparat aus Stutenserum: 200 E/mg	< 1000
Präparat aus Schafshypophysen .	< 1000

Hemmung von 4 Hämagglutinationsdosen von erhitzer (30 min auf 56°C) PR8-Influenzavirus-Allantoisflüssigkeit gegen 0,8% Hühnererythrozyten.

In unseren chemischen Laboratorien von BENZ nach dem gleichen Verfahren gewonnene Harnfraktionen wurden auf ihre virus-hämagglutinationshemmende Wirkung untersucht, da nach dem auch für die Gewinnung gonadotropen Hormons geeigneten Verfahren vermutet werden konnte, dass sie mucopolysaccharidartige Stoffe enthalten könnten. Tabelle I zeigt, dass eine Reihe dieser Fraktionen stark hemmend auf die Influenzavirus-Hämagglutination wirken. Gonadotrop hormonal wirksame Harnpräparate unterscheiden sich hierin nicht von

¹ F. M. BURNET, Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 27, 245 (1949).
² F. M. BURNET, J. F. MCCREA und S. G. ANDERSON, Nature 160, 404 (1947).
³ F. M. BURNET, J. F. MCCREA und S. G. ANDERSON, Nature 160, 404 (1947). – W. T. J. MORGAN, Nature 158, 759 (1946).
⁴ W. K. WHITTEN, Nature 163, 534 (1949).
⁵ J. TAMM und F. L. HORSFALL, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74, 108 (1950).
⁶ A. GOTTSCHALK und P. E. LIND, Nature 164, 232 (1949). – A. GOTTSCHALK, Nature 167, 845 (1951).

Tabelle II
Veränderung der Eigenschaften von Schwangerenharnextrakt durch RDE.-Behandlung

Harnextrakt	Virus-Hämagglutination: 4 Hämagglutinationsdosen werden gehemmt durch c)	Hormonaktivität: einer internationalen Einheit entsprechend d)	Leukozytotaktischer Effekt: e)		
			+	±	0
Unbehandelt a) Behandelt mit RDE. b) . . .	26 γ 800 γ	~ 1,5 γ 6 γ	3 γ 3 γ	0,6 γ 0,6 γ	0,1 γ 0,1 γ

a) Hormonpräparat 5390/471 in Ca-Boratpuffer-NaCl-Lösung.

b) Hormonpräparat wie a) + RDE. 20%. Kontaktzeit Hormon + RDE.: 3 h auf 37°C. Herstellung des RDE. nach BURNET und STONE¹; Agarfiltrat von *Vibrio cholerae*, Stamm Ogawa; Titer 1:620. Für die Hämagglutinationsproben wurden die Reaktionsgemische 30 min auf 65°C erhitzt zur Inaktivierung des RDE. Das verwendete RDE.-Präparat zeigt für sich allein keine Wir-

kung auf Uterusgewicht und Leukozytenwanderung.

c) PR8-Influenza-Virus; Allantoisflüssigkeit in physiologischer NaCl-Lösung, 30 min lang auf 56°C inaktiviert.

d) Juvenile Ratten. Applikation: Gesamtdosis verteilt auf täglich 2 Dosen an 3 aufeinanderfolgenden Tagen. Uterusgewichtsbestimmung.

e) Gemäss R. MEIER und B. SCHÄR¹.

hormonal unwirksamen Männerharnextrakt. Andererseits kommt die Virus-Rezeptor-Eigenschaft nicht allen gonadotrop wirksamen Hormonpräparaten zu, wie aus dem Vergleich mit dem nur niedrigen Hemmtiter der Hormonpräparate von anderer Herkunft als Urin (Stutenserum und Schafshypophysen) hervorgeht. Der Hemmtiter solcher Stutenserum- oder Hypophysenpräparate schwankt je nach Provenienz der Produkte (gewöhnliche Handelspräparate), doch standen alle von uns geprüften Präparate mit ihrer virus-hämagglutinationshemmenden Aktivität deutlich hinter den aus Harn gewonnenen Fraktionen zurück.

Auf Grund dieser Befunde lag die Annahme nahe, dass die Virus-Substrat-Eigenschaft der gonadotropen Präparate auf Begleitstoffen beruhen könnte.

MEIER und SCHÄR¹ haben andersartige Wirkungen, die den aus Urin gewonnenen gonadotropen Hormonpräparaten anhaften, aufgefunden. Sie konnten zeigen, dass im Urin Schwangerer neben dem gonadotropen auch ein *in vitro* wirksames Prinzip mit anlockender und beweglichkeitsfördernder Wirkung auf die weissen Elemente des Blutes vorhanden ist. Die Wirkung dieser Stoffe wird im Gegensatz zur Hormonwirkung durch Hitzebehandlung nicht beeinträchtigt. Aus diesem Grunde nahmen die obigen Autoren die Anwesenheit besonderer Begleitstoffe an.

Während die Virus-Rezeptor-Eigenschaft einheitlich allen hier geprüften Harnextraktpräparaten zukommt, fanden MEIER und SCHÄR nur einzelne der hormonal wirksamen Fraktionen aktiv im Leukozytenversuch.

Diese Beobachtungen ermöglichten die Frage der besonderen Natur der wirksamen Stoffe in den aus Urin hergestellten Hormonpräparaten so zu analysieren, dass der Stoff dem enzymatischen Abbau unterworfen und festgestellt wird, welche Veränderungen seine verschiedenen Eigenschaften dadurch erfahren. So prüften wir einen gonadotropen Extrakt aus Schwangerenharn vor und nach Kontakt mit RDE. auf seine Hormonaktivität und seine Wirkung auf die lokomotorische Reaktion der Leukozyten und die Hemmung der Virus-Hämagglutination. Wir stellten fest (Tab. II), dass die Hormonaktivität dadurch relativ wenig (etwa auf ein Viertel)², die leuko-

taktische Wirkung gar nicht beeinträchtigt wurde. Die gleiche Probe zeigte hingegen eine Einbusse in der agglutinationshemmenden Aktivität auf ein Dreissigstel. Auf Grund dieser Ergebnisse möchten wir vorläufig feststellen, dass die Unterschiedlichkeit der RDE.-Empfindlichkeit dieser drei Wirkungstypen eine weitere Stütze für die Annahme sein kann, dass in Harnextraktstoffen ein Gemisch verschiedener, chemisch wohl nahe verwandter Wirkstoffe vorliegt. Des weiteren ergibt sich daraus die Möglichkeit, an solchen Stoffen durch enzymatischen Abbau einzelne Wirkfaktoren herauszuarbeiten.

FR. KRADOLFER, B. SCHÄR und R. MEIER

Wissenschaftliche Laboratorien der Ciba, Aktiengesellschaft, Basel, den 1. November 1951.

Summary

Substances obtained from urinary extracts were investigated for their inhibitory effect on virus hemagglutination (HIRST), and a comparison was made with the gonadotropic hormone activity of these substances. No clear-cut parallelity between these characteristics was demonstrable. An urinary extract substance was further tested both prior to and subsequent to contact with the virus receptor destroying enzyme (R.D.E.), for the three established properties, hormonal activity, leucocytotoxic effect and influenza-virus-receptor characteristics. R.D.E. did not affect these three properties to the same degree. These results support the assumption that urinary extracts represent a mixture of chemically closely related substances.

¹ R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 7, 308 (1951).

Über Aktivierung von Cholinesterasen durch Alkylphosphate *in vivo*¹

Nach durch Alkylphosphate, wie DFP. (Diisopropyl-Fluorophosphat), Parathion, Pestox III (Bis-bis-Dimethyl-amino-Phosphorsäureanhydrid) und TEPP (Tetraäthylpyrophosphat), *in vivo* bewirkte Hemmung verschiedener Cholinesterasen (ChE) verstreicht meist ein Zeitraum

¹ F. M. BURNET und J. D. STONE, Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 25, 227 (1947).

² R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 7, 308 (1951).

³ Die Werte für die gonadotrope Wirksamkeit verdanken wir Herrn Professor W. SCHULER.

¹ Vorläufige Mitteilung.