



Ionenaktivierung (Versuchsbedingungen siehe Text). Abszisse: Ionenkonzentrationen in Mol. Ordinate: Hydroxamsäurebildung in Mikromol. Kurven: 1 Hydroxamsäurebildung in Gegenwart von Kobaltionen; 2 dieselbe in Gegenwart von Magnesiumionen; 3 dieselbe in Gegenwart von Manganionen.

Der nähere Mechanismus der Teilnahme des ATP. in der Glutaminsynthese ist heute noch nicht klar. Es ist aber möglich, dass das Enzym eine Reaktion zwischen Glutaminsäure und ATP. katalysiert, wobei Glutaminsäure- γ -Azyolphosphat entsteht. Diese Verbindung reagiert nicht enzymatisch mit Ammoniak oder Hydroxylamin, und es entsteht Glutamin, bzw. Hydroxamsäure, wobei anorganisches Phosphat freigesetzt wird. Dafür spricht die Beobachtung, dass das von uns nach einer unveröffentlichten Methode synthetisierte Glutaminsäure- γ -Azyolphosphat auch in Abwesenheit des Enzyms mit Ammoniak und Hydroxylamin reagiert.

Tabelle II

Inkubation	Hydroxamsäurebildung in Mikromol	Glutaminbildung in Mikromol
25 μ M Glutaminsäure- γ -Azyolphosphat + 50 μ M Hydroxylamin . .	24,2	—
25 μ M Glutaminsäure- γ -Azyolphosphat + 50 μ M Ammoniumchlorid	—	24,4

Unter Freisetzung von anorganischem Phosphat entsteht Glutamin bzw. Glutaminsäure-Hydroxamsäure. In diesem Falle wäre das Enzym, welches die Synthese katalysiert, als eine Phosphophorase zu betrachten. Eine ausführlichere Mitteilung über diese Experimente wird in *Acta Physiologica Hungarica* erscheinen.

G. DÉNES

Medizinisch-Chemisches Institut der Medizinischen Universität, Budapest, den 15. September 1952.

Summary

Purified extracts of germinated *Lupinus albus* seeds catalyse the reaction between A.T.P., glutamate and ammonia or hydroxylamine in the presence of cobalt ions, with the formation of glutamine and hydroxamic

acid, respectively. The preparation and some properties of the enzyme are described. In this system 1 (+) glutamic acid cannot be replaced by d (–) glutamic or aspartic acid. Cobalt ions can be substituted by magnesium or manganese ions.

Synthetic γ -glutamyl phosphate reacts non-enzymatically with ammonia or hydroxylamine, whereby glutamine, respectively hydroxamic acid is formed. If the enzyme reaction involves the intermediate formation of γ -glutamyl phosphate – as is generally supposed – it seems most probable that the synthesis of glutamine and hydroxamic acid requires no further enzyme action. Once the γ -phosphate is formed, the mixed anhydride is simply split in the presence of any nitrogenous base. In this case the enzyme catalysing the synthesis of glutamine may be considered to be a phosphophorase.

Fécondation artificielle de *Xenopus laevis* sans sacrifice du géniteur mâle¹

Dans certaines conditions, le crapaud sud-africain *Xenopus laevis* peut toute l'année se reproduire en captivité et il présente de nombreux autres avantages: élevage facile², développement embryonnaire rapide³, les animaux peuvent rapidement atteindre leur maturité sexuelle (6-8 mois)⁴, les œufs sont relativement peu chargés de vitellus et leur gangue muqueuse est peu épaisse.

Toutefois, l'amplexus durant plusieurs heures, les embryons se trouvent à des stades très différents à un temps donné. Quant à la fécondation artificielle des batraciens en général, elle ne se pratique qu'en obtenant le sperme par prélèvement des testicules⁵, c'est un procédé peu économique, et l'élimination d'un des géniteurs met en cause l'éventualité du back-cross. L'obtention d'œufs fécondables de *X. laevis* par injections de gonadotrophines est bien connue⁶. Notre problème essentiel consistait à disposer d'une suspension spermatique où les spermatozoïdes soient en concentration suffisante et doués d'une bonne motilité. Plusieurs endocrinologistes ont montré qu'il était possible d'amener l'émission de spermatozoïdes chez les batraciens par injection de petites quantités d'adrénaline⁷ ou de gonadotrophines⁸. Nous avons pu obtenir des spermatozoïdes répondant aux exigences du problème en opérant de la façon suivante:

1° *Prétraitement*. Les femelles et les mâles étant élevés séparément dans des bassins dont l'eau courante est à la température de 12-15°C, des mâles adultes, à jeun depuis au moins une semaine, reçoivent de la

¹ Note préliminaire.

² O. HARJOLA et S. TOIVONEN, Ann. Chirurg. Gynaec. Fenniae 38, sup. 3, 68 (1949).

³ P. B. WEISZ, Anat. Rec. 93, 161 (1945).

⁴ L. R. ARONSON, Amer. Nat. 78, 131 (1944). – R. GASCHÉ, Rev. suisse Zool. 50, 262 (1943).

⁵ R. RUGH, *Experimental embryology, A manual of techniques and procedures* (Burgers Pub. Co., Minneapolis, 1948) 481 pp.

⁶ H. ZWARENSTEIN, N. SAPIKA et H. A. SHAPIRO, *Xenopus laevis, a Bibliography* (Cape Town 1946). – G. ANDRES, A. BRETSCHER, F. E. LEHMANN et D. ROTH, Exper. 5, 83 (1949).

⁷ LI MIN-HSIN et CHANG HSI-CHUN, Chinese J. Physiol. 17, 201 (1949). – S. L. ROBBINS et F. PARKER JR., Endocrinology 44, 384 (1949).

⁸ A. L. HASKINS et A. I. SHERMAN, Endocrinology 44, 542 (1949). – L. GALLIEN, C. r. Acad. Sci. 226, 1141 (1948). – J. CREZE, C. r. Soc. Biol. 143, 1391 (1949).

gonadotrophine chorale de jument par injections dans les sacs lymphatiques dorsaux (solutions en eau physiologique). Les doses optima sont variables, elles paraissent comprises entre 150 et 400 U.I. (préparations «Pregnyl», Pharmacia, Uppsala); l'administration se fait en une seule fois ou, pour les doses les plus fortes, en deux fois avec un délai de 24 h entre les deux injections. Les animaux sont maintenus alors à 20°C pendant 24 h avant le traitement d'obtention des spermatozoïdes.

On peut remplacer ce prétraitement par une illumination ultra-violette pour des aquariums de surface $S \# 168 \text{ cm}^2$, placer 8 mâles sous environs 15 cm d'eau et irradier de façon continue 48-96 h avec des lampes type Luma Hgu 75 W (λ entre 3300 et 4000 Å avec optimum à 3650 Å); distance moyenne lampe-surface de l'eau: 13 cm, $\theta = 20^\circ \text{C}$. Ces mâles sont susceptibles de produire l'amplexus.

2° Obtention des spermatozoïdes. Dans les sacs lymphatiques dorsaux des animaux prétraités, injecter 0,5 mg d'adrénaline dans un volume de 0,5 cm³ d'eau physiologique et placer les animaux à 15°C sous environ 10 cm d'eau où ils ne tardent pas à se trouver comme anesthésiés, ce qui est favorable pour leur manipulation ultérieure. Après 120 min, introduire une pipette ($\varphi \# 1 \text{ mm}$) à bord mousse dans le rectum des animaux. On obtient ainsi d'emblée 0,3-1,5 cm³ d'une urine opalescente dont la turbidité est presque uniquement due à la concentration spermatique. Il est très important de manipuler les animaux avec grande douceur au moment du prélèvement de cette «urine spermatique» sinon ils sortent de leur engourdissement et rejettent alors souvent de l'urine, ce qui en amène la perte parfois totale.

Les animaux traités sont essuyés avec un linge du venin qu'ils ont pu produire sous l'action de l'adrénaline; on en profite pour les frictionner légèrement, ce qui permet un retour plus rapide à leur état normal qui débute généralement 4 h après l'injection d'adrénaline. On les place alors dans un aquarium pendant 24 h, sans nourriture, à la lumière blanche diffuse ($\theta = 20^\circ \text{C}$) et sous environ 6 cm d'eau de façon à ce qu'ils puissent venir respirer facilement en surface.

D'avril à décembre de tels animaux peuvent encore fournir une urine bien chargée en spermatozoïdes pendant 2-4 jours consécutifs, à raison d'une ponction rectale par jour après injection de 0,5 mg d'adrénaline. Les animaux sont finalement transférés dans un tank d'eau courante d'environ 300 litres de capacité à l'obscurité ($\theta = 12-15^\circ \text{C}$) ils peuvent recevoir alors une nourriture légère (cubes de cœur de bœuf). On peut les réutiliser après 8-10 jours.

Fécondations. Les œufs, obtenus par pression abdominale de femelles traitées par de la gonadotrophine chorale, sont recueillis sur des lames de microscope et étalés avec précaution en couches mono-ovulaires à l'aide de papilles cloacales de la femelle même. On doit rejeter toute ponte souillée par de l'eau ou de l'urine, elle serait en effet impropre à la fécondation par suite du gonflement de la gangue; rejeter également les fins de ponte chargées d'œufs non mûrs.

A l'aide d'une pipette fine (φ de l'embout 0,2 mm) on égoutte alors la préparation spermatique sur les œufs. La densité optique moyenne de l'urine spermatique obtenue par notre technique a été mesurée au photomètre SPEKKER avec le filtre H 508 et une cuve de 2,5 mm: l'extinction est de l'ordre de 0,110. Nous avons trouvé avantageux (voir au sujet des œufs d'oursins¹ et pour les spermatozoïdes d'oursins², de placer dans la suspension spermatique du glyocolle jusqu'à une concentra-

tion finale d'environ 0,02-0,03 % (solution-mère à 0,1 % pH 8).

L'insémination des œufs d'une lame de 75 × 35 mm exigeant environ 90 s, la lame traitée est immédiatement décantée sur une lame à traiter à laquelle on adjoint des spermatozoïdes provenant du stock *fraîchement récolté* (moins de 30 min de stockage à 20°C, mais, conservés à 3°C pendant 4 h, ils sont encore fécondants). Après 10 min de contact à 20°C, les lames placées dans un couvercle de boîte de PETRI sont lavées rapidement soit avec de l'eau provenant d'élevages de larves et filtrée (exempte de Cl⁻) soit simplement avec de l'eau de conduite et immédiatement recouvertes d'eau de l'un ou de l'autre type.

En opérant ainsi, nous avons pu obtenir jusqu'à 100 % de fécondations, mais même dans ces cas favorables 70-80 % seulement des œufs suivent un clivage normal et donnent des embryons et des larves. On obtient dans la pratique ordinaire 40-60 % d'embryons à des stades homogènes ou peu distincts.

Nous adressons nos vifs remerciements au Professeur J. RUNNSTRÖM pour le grand intérêt qu'il a porté à notre travail.

B. RYBAK¹ et T. GUSTAFSON

Institut Wenner-Gren de biologie expérimentale, Université de Stockholm, le 22 juillet 1952.

Summary

The technique of artificial fertilization of *Xenopus laevis*, without sacrifice of the males, consists of treating both the male and the female with mare chorionic gonadotrophin—or in the case of the male by submitting it to a prolonged ultraviolet irradiation—after which the female is able to shed fertilizable eggs by squeezing, and the male can give urine rich in motile spermatozoa after injection of one high dose of epinephrine. The fertilizations are performed on glass slides in presence of glycine; 40-60 % of embryonic developments usually succeed.

¹ Adresse actuelle: Laboratoire de Physiologie, Faculté des Sciences, Nancy..

Faster Action of Vitamin K₁ than of Menadione and Synkavit Intravenously Injected into Vitamin K-deficient Chicks

Numerous investigations have demonstrated the superiority of vitamin K₁ over its simpler substitutes in reversing the prolonged prothrombin time caused by ingestion of dicoumarol. Nevertheless, in the usual tests for vitamin K activity, vitamin K₁, Menadione and Synkavit (tetrasodium salt of 2-methyl-1,4-naphthohydroquinone diphosphoric acid) are found to be about equally active when calculated on a molecular basis. If, however, the prothrombin time is determined very soon after the substances have been introduced into the blood stream, it is seen that vitamin K₁ acts much faster than the two other compounds, although after a sufficient time they all result in prothrombin times equal to or slightly shorter than that of normal chicks.

The following experiment was carried out by the assay technique of DAM, KRUSE, and SØNDERGAARD¹ with

¹ E. WICKLUND et T. GUSTAFSON, Ark. Zool. [A]42, n° 12 (1949).

² A. TYLER et E. ATKINSON, Science 112, 783 (1950).

¹ H. DAM, I. KRUSE, and E. SØNDERGAARD, Acta Physiol. Scand. 22, 229 (1951).