

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).

minor modifications. The prothrombin time was determined six times for each chick at the intervals indicated in the table, counted from the intravenous injection of aqueous colloidal, or crystalloid respectively solutions of the substances. The amounts used were stoichiometrically equivalent to 100 times the limit dose of menadione (0.03 micrograms per gram of body weight) which results in normal prothrombin time after 22 h when given orally in oil solution.

Prothrombin times in seconds at various intervals after the intravenous injection of vitamin K₁, Menadione and Synkavit. Normal value = 25 s.

	0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	22 h
Vitamin K ₁ . .	223	44	30	27	28	22
Vitamin K ₁ . .	153	39	32	31	30	24
Menadione . .	165	155	59	40	30	22
Menadione . .	251	206	79	43	33	25
Synkavit. . .	154	120	41	31	27	23
Synkavit. . .	170	151	59	39	34	25

A similar difference between vitamin K₁ and the other substances is observed when the comparison is carried out at much lower or higher levels.

Further details of this study will be published elsewhere.

H. DAM and EBBE SØNDERGAARD

Department of Biochemistry and Nutrition, Polytechnic Institute, Copenhagen, November 1st, 1952.

Zusammenfassung

Die Wirkungsgeschwindigkeiten von intravenös injiziertem Vitamin K₁, Methylnaphthochinon und Synkavit in Vitamin-K-frei ernährten Küken wurden verglichen. Es zeigte sich, dass in den ersten Stunden nach der Injektion Vitamin K₁ die Prothrombinzeit viel schneller zum Absinken brachte als die beiden anderen Verbindungen.

Nucleic Acids and Proteins in the Liver of Guinea Pigs dying from Experimental Ascorbic Acid Deficiency

At present it is generally accepted¹ that total pentose-nucleic acid (P.N.A.) of the liver and of many other tissues is readily diminished by protein-deficient diet or starvation, whereas total desoxypentosenucleic acid (D.N.A.) remains unaffected, and that the loss of P.N.A. is paralleled by that of proteins as well as phospholipids. Studying the relation between the P.N.A. content and the basophilic pattern of mammalian livers, we had an occasion of examining scorbutic guinea pig livers which showed a marked diminution of total protein content without any sign of concomitant loss of P.N.A.

Guinea pigs weighing about 300 g were fed on ascorbic acid-deficient diet by removing green grass and

vegetables from stock diet. In some four weeks the animals became typically scorbutic and began to die. During this period they did not grow but lost body weight gradually, while control animals on normal diet gained much body weight. After the appearance of scorbutic symptoms animals ate little, and their body weight decreased rapidly. It might seem as if the animals died from starvation during the last few days; but this can not have been the case, as shown below. Livers of three dying animals, two of which (II and III in the Table) showed a typical picture of premortal enlargement of mitochondria¹, were subjected to determination of nucleic acids and proteins by SCHNEIDER procedure². As many guinea pigs on normal diet weighing about 300 g (equal to the initial body weight of experimental animals) served as the control. Livers of individual animals were perfused with ice-cold saline and analyzed separately. Orcinol and diphenylamine tests and digestion with H₂SO₄ - H₂O₂ followed by hypobromite-iodometry were employed for the determination of P.N.A.-P, D.N.A.-P., and protein-N, respectively³. The D.N.A. content of the average liver nuclei was also determined as reported elsewhere⁴, and the total number of liver nuclei was calculated from D.N.A. contents of the nuclei and the whole tissue.

The results are summarized in accompanying Table. For comparison, our own data on rats dying from prolonged starvation⁵ are also listed. Total D.N.A. and D.N.A. per nucleus of the liver, and hence the number of liver nuclei showed no change from the normal values in both the scorbutic guinea pigs and the fasted rats, suggesting that no necrotic degeneration of liver cells had occurred before the final death. This adds a new example to the concept of the stability of D.N.A. in the liver of adult animals⁶. Now, total P.N.A. of the scorbutic guinea pigs remained constant, whereas that in the fasted rats decreased down to about one third of the control, although the loss of the body weight was nearly comparable in both cases. The striking stability of P.N.A. in the scorbutic liver might be partially reflected by less pronounced decrease of liver weight in these animals than in fasted rats, but this may rather be due to other constituents such as glycogen and lipids. Protein-N of scorbutic animals, however, does show a loss comparable in order with the body weight, but to a lesser extent than in fasted animals. As the number of nuclei in the scorbutic liver is the same as that of the control, the above findings concerning P.N.A. and proteins hold in cell unit also.

The link between the protein and P.N.A. contents of the liver tissue is noted by several workers⁷. As shown in the table, in prolonged starvation the decrease of P.N.A. was, indeed, even more extensive than that of proteins. Therefore, it is rather surprising that the ascorbic acid deficiency resulting in a marked loss of liver protein does not affect the liver P.N.A. at all. Here it should be remembered that the metabolism of our scorbutic animals had been damaged so severely that they were almost dying at the time of analysis.

¹ A. SIBATANI, *Cytologia* 16, 58 (1950).

² W. C. SCHNEIDER, *J. biol. Chem.* 161, 293 (1945).

³ Y. YAGI, in F. EGAMI, *Nucleic acids and nucleoproteins: physics, chemistry, biology, and medicine*, Tokyo 1, 132 (1951), in Japanese.

⁴ M. FUKUDA and A. SIBATANI (in course of publication).

⁵ M. FUKUDA and A. SIBATANI (unpublished experiment).

⁶ J. N. DAVIDSON and I. LESLIE, *Cancer Res.* 10, 587 (1950).

⁷ R. M. CAMPBELL and H. W. KOSTERLITZ, *J. Endocrinol.* 6, 308 (1950). - S. LAGERSTEDT, *Acta Anat., Suppl.* 9 (1949).

¹ J. N. DAVIDSON and C. WAYMOUTH, *Biochem. J.* 38, 379 (1944). - J. N. DAVIDSON, *Biochem. J.* 39, lix Proceedings (1945). - P. MANDEL, M. JACOB, and L. MANDEL, *Bull. Soc. Chim. biol.* 32, 80 (1950). - H. W. KOSTERLITZ and I. D. CRAMB, *J. Physiol.* 102, xviii Proceedings (1943). - H. W. KOSTERLITZ, *J. Physiol.* 106, 194 (1947).