

Zusammenfassung

Der Zitronensäuregehalt wurde vom Gastrulastadium bis in larvale Stadien gemessen. Während des Schwanzknospenstadiums und kurz nachher erfolgt eine relativ rasche Zunahme, die möglicherweise in Zusammenhang mit der Entwicklung und Differenzierung von Mitochondrien steht.

Influenza del Mg^{++}

sulla «eptoformazione non ossidativa» nel muscolo scheletrico

In ricerche precedenti¹⁻³ abbiamo osservato, in estratti enzimatici di muscolo scheletrico di ratto, il processo indicato da BONSIGNORE *et al.*⁴ col termine di «eptoformazione non ossidativa», e cioè la formazione di eptoso-fosfato da esoso-fosfato (G-6-P e F-6-P) attraverso reazioni non appartenenti allo shunt ossidativo. Nelle nostre condizioni, tale eptoformazione veniva aumentata per aggiunta di fruttosio-1,6-difosfato (F-1,6-P).

Per spiegare i dati sperimentali abbiamo ammesso – come suggerito da BONSIGNORE *et al.*⁴ – che la velocità del processo eptoformativo dal solo esoso-fosfato fosse «limitata» da tracce di trioso-fosfato presenti nell'estratto enzimatico. Nelle nostre condizioni, il F-1,6-P aggiunto avrebbe agito in quanto aumentava, per scissione aldolasica, la concentrazione del trioso-fosfato.

Nella Tabella seguente sono esposti i risultati di alcune esperienze⁵ che suffragano, a nostro parere, questa ipotesi.

Dalla Tabella risulta:

1) Aumentando la concentrazione del F-6-P – nelle prove contenenti questo solo substrato – da 7,5 a 10,0 μM , la eptoformazione non ammonta. Quindi nelle prove enzimatiche in presenza di «F-6-P + F-1,6-P», l'aumento della concentrazione del F-6-P dovuto alla idrolisi del legame fosforico in 1 dell'estere difosforico, non dovrebbe influire sulla eptoformazione, essendo già ottimale la concentrazione delle 7,5 μM di F-6-P aggiunte.

2) Aggiungendo Mg^{++} , attivatore della idrolisi fosfatasi in 1 a carico del F-1,6-P, si ha – nelle prove in presenza di ambedue i substrati – una diminuzione della eptoformazione. Questa diminuzione è spiegabile in quanto la attivazione dell'idrolisi fosfatasi da parte degli Mg^{++} sottrarrebbe il F-1,6-P alla azione aldolasica. Ne deriverebbe una minore formazione di trioso-fosfato e conseguente minore eptoformazione.

3) L'aggiunta, oltre al Mg^{++} , di KF – inibitore della attivazione degli ioni Mg^{++} sull'attività fosfatasi del nostro estratto – ripristina pressoché quantitativamente l'eptoformazione nelle prove in presenza di F-6-P + F-1,6-P.

Tutti questi fatti depongono a favore dell'ipotesi che il F-1,6-P nelle nostre condizioni agisca come donatore di

Attività eptoformativa di estratti enzimatici di muscolo scheletrico a partire da F-6-P e da F-1,6-P, in assenza e in presenza di $MgCl_2$ (10 μM) e di $MgCl_2$ (10 μM) + KF (200 μM).
Volume finale delle prove: 2,5 ml

Substrati	Aggiunte	μM eptoso formato/ mg N proteico	% F-1,6-P idroliz- zato*
7,5 μM F-6-P	—	0,18	—
10 μM F-6-P	—	0,17	—
7,5 μM F-6-P	$MgCl_2$	0,18	—
7,5 μM F-6-P + 1,8 μM F-1,6-P } 7,5 μM F-6-P + 1,8 μM F-1,6-P } 7,5 μM F-6-P + 1,8 μM F-1,6-P }	— $MgCl_2$ $MgCl_2 + KF$	0,41 0,27 0,36	53% 62% 48%
1,8 μM F-1,6-P	—	0,12	50%
1,8 μM F-1,6-P	$MgCl_2$	0,13	62%

* L'idrolisi del F-1,6-P è stata constatata dosando i fosfati liberi nel mezzo, prima e dopo l'incubazione, con il metodo di BERENBLUM e CHAIN⁶. Tale idrolisi, maggiore in presenza di Mg^{++} , si svolgeva a livello del legame fosforico in 1. Infatti il F-6-P non veniva idrolizzato né in assenza né in presenza di Mg^{++} .
È noto d'altra parte che gli ioni Mg^{++} attivano la F-1,6-P-asi del muscolo scheletrico⁷.

trioso-fosfato, necessario per la eptoformazione, e non come donatore di F-6-P.

V. MORET e S. SPERTI

Istituto di Chimica Biologica, Università di Padova, il 3 ottobre 1958.

Summary

Mg^{++} influence on 'non-oxydative heptoformation' from hexose-phosphate has been studied in enzymatic preparations of rat skeletal muscle. The results give further evidence that F-1,6-P, added to F-6-P, increases the rate of heptoformation inasmuch as it gives, by aldolase action, triosephosphate.

⁶ I. BERENBLUM e E. CHAIN, *Biochem. J.* 32, 295 (1938).

⁷ K. LOHMANN, *Biochem. Z.* 262, 137 (1933).

Analyses immunoélectrophorétiques des fractions protéiques du sérum humain séparées par électrophorèse en gel d'amidon

Le sérum humain, soumis à une électrophorèse en gel d'amidon se scinde en de nombreux composants (SMITHIES¹). Ce pouvoir de résolution du milieu, plus élevé que celui du papier ou de la gélose résulte d'un phénomène complexe régissant dans un gel d'amidon, la position des fractions en fin d'électrophorèse.

Dans les modes habituels d'électrophorèse de zone (papier ou gélose) la mobilité en fin d'expérience est due à la résultante du courant électrique et de l'électro-osmose. En gel d'amidon la mobilité habituelle d'une protéine se trouve perturbée par le pouvoir du gel à ralentir les protéines composées de grosses molécules, à l'avantage de celles composées de molécules de plus petites dimensions.

¹ O. SMITHIES, *Biochem. J.* 61, 629 (1955).

¹ V. MORET e S. SPERTI, *Exper.* 14, 342 (1958).

² S. SPERTI e V. MORET, *Exper.* 14, 358 (1958).

³ S. SPERTI e V. MORET, *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* (1958) in corso di stampa.

⁴ A. BONSIGNORE, S. PONTREMOLI, G. FORNAINI e E. GRAZI, *G. Biochim.* 6, 241 (1957).

⁵ Il metodo di preparazione dell'estratto, le condizioni sperimentali seguite nelle prove enzimatiche, ed i metodi di dosaggio sono esposti in una nota precedente ¹.

C'est ainsi qu'une fraction homogène à l'électrophorèse sur papier ou en gélose se scinde en plusieurs composants si sa population comprend des molécules de dimensions variées. On comprend alors que les globulines α^2 par exemple se trouvent scindées en gel d'amidon en plusieurs composants, les uns en avant des β -globulines; les autres en arrière de celles-ci.

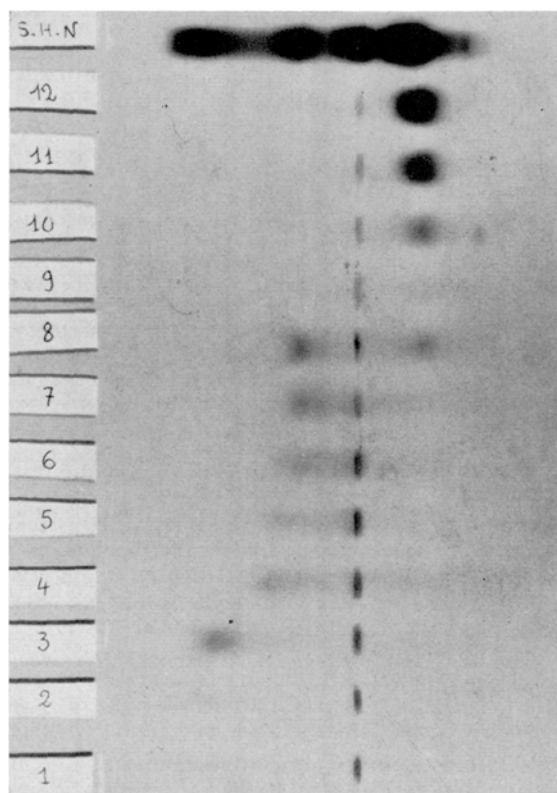


Fig. 1. Electrophorèse en gélose des éluats obtenus à partir des fractions séparées par électrophorèse en gel d'amidon, coloration à l'amidoschwarz

1, 2, 3 = γ -Globulines; 4 = β -lipoprotéines; 5 = α 2 lentes; 6 = α - β ; 7 = β -globulines; 8 = α 2 rapides; 9 = postalbumines; 10, 11, 12 = albumines

La nomenclature des différentes fractions protéiques du sérum humain a été établie soit par comparaison avec des fractions obtenues par électrophorèse sur papier, soit à l'aide de l'électrophorèse bidimensionnelle, la première dimension étant réalisée sur papier, et la seconde en gel d'amidon (POULIK et SMITHIES²).

Dans ce travail nous avons étudié par la méthode immuno-électrophorétique de GRABAR et WILLIAMS³, la nature immunologique de chaque fraction séparée en gel d'amidon et préalablement éluée.

Protocole expérimental. L'électrophorèse en gel d'amidon est réalisée suivant les modalités que nous avons décrites dans une précédente communication⁴. Après séparation électrophorétique, on coupe sur toute la longueur du gel une tranche supérieure et une tranche inférieure afin d'éliminer les phénomènes de traînées existant en surface.

Les faces internes de ces tranches sont colorées au bleu de bromophénol alcool-acétique (coloration immédiate). Par référence aux fractions colorées on peut alors découper le gel d'amidon en autant de tranches perpendiculaires que l'on voit de fractions. Chaque tranche est additionnée de 20 ml d'eau physiologique, broyée, centrifugée à 10 000 T/min 30 min, le surnageant est recueilli; lyophilisé, et repris par 1 ml d'eau distillée. Chaque éluat est ensuite soumis à une immunoélectrophorèse pratiquée en gélose avec du sérum de cheval antisérum humain préparé par P. GRABAR⁵.

Résultats. La méthode immunoélectrophorétique, par sa sensibilité permet de révéler la nature antigénique des éluats obtenus.

Les fractions albumine, postalbumines, β -lipoprotéines et γ -globulines obtenues par électrophorèse en gel d'amidon se présentent comme des fractions immunologiquement homogènes, ne donnant qu'une seule ligne de précipitation avec le sérum antihumain (voir Figure 2). Leur nature immunologique confirme entièrement l'appellation qui leur a été donnée par SMITHIES. Les autres fractions par contre apparaissent comme immunologiquement hétérogènes.

Les globulines α 2 rapides ($F\alpha_2$) donnent une ligne de précipitation de mobilité α 1, une α 2 et une β 1. Les globulines α 2 lentes ($S\alpha_2$) donnent une ligne de mobilité α 2 et une ligne β 1, enfin les globulines β , une ligne β 1 et une ligne α 2. Dans certaines expériences, ces globulines β ne donnent qu'une ligne β 1.

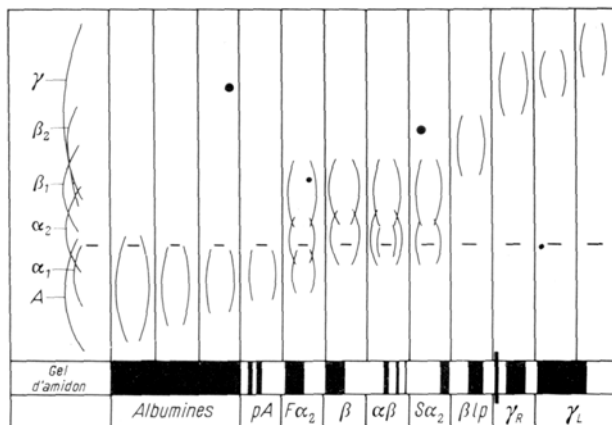


Fig. 2. Immunoélectrophorèses en gélose des mêmes fractions. Sérum de cheval antisérum humain (Institut Pasteur, Paris)

Discussion. L'hétérogénéité immunologique de ces fractions peut trouver une explication dans l'hypothèse suivante:

Sur un fond de protéines constituant une véritable solution de continuité se détachent des fractions qui nous apparaissent comme nettement délimitées. L'analyse immunoélectrophorétique de ces fractions montre que celles-ci sont constituées d'un mélange en proportions inégales d'un constituant principal et de constituants qui sont ses voisins immédiats, et ayant une mobilité soit légèrement plus rapide, soit légèrement plus lente que le constituant principal.

A l'appui de cette théorie, nous pouvons citer le fait que, si l'on soumet un sérum à une plus grande différence de potentiel pendant une durée d'électrophorèse plus longue, on voit apparaître un nombre plus grand de

² M. D. POULIK et O. SMITHIES, Biochem. J. 68, 636 (1958).

³ P. GRABAR et C. H. WILLIAMS, Biochem. biophys. Acta 10, 193 (1953); 17, 67 (1955).

⁴ J. M. FINE, J. LOEB et C. WASZCZENKO-Z, Nature 182, 452 (1958).

⁵ Sérum commercialisé par l'Institut Pasteur, Paris.

constituants, ceux-ci sont issus de cette solution de continuité et sont alors rassemblés sous forme de nouvelles bandes.

En conclusion. L'obtention par élution de fractions parfaitement homogènes après électrophorèse en gel d'amidon, est extrêmement difficile et doit être soumise comme contrôle de pureté à l'analyse immunoelectrophorétique, capable par sa sensibilité de révéler éventuellement l'hétérogénéité de la fraction envisagée.

J. M. FINE et J. LOEB

Centre National de Transfusion sanguine, Paris, le 3 novembre 1958.

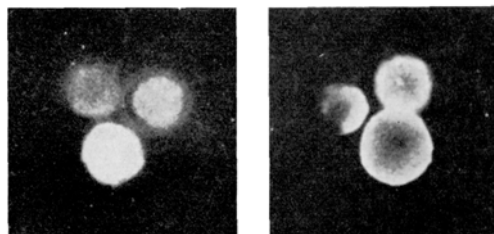
Summary

Human plasma components, separated by starch gel electrophoresis, are eluted and concentrated by lyophilisation. Immuno-electrophoretic analysis shows that certain of these fractions are immunologically heterogeneous.

The authors point out that this immunological criterion should be used before employing an eluted fraction, even if it appears electrophoretically homogenous.

The Demonstration of D (Rh) Antigen in Human Leukocytes

Observations on the presence of D (Rh) antigen in human leukocytes are scarce and contradictory^{1,2}. Results described in this communication indicate that D antigen may be detected in white cells from Rh-positive persons by means of the fluorescent antibody technique first described by COONS and KAPLAN³.



A

B

The staining technique consists of three steps: (1) incubation of leukocytes with anti-D serum; (2) exposure of sensitized white cells to chicken anti-human globulin serum, and (3) staining with anti-chicken globulin fluorescein conjugate (kindly prepared by Dr. A. PRINCE). The leukocytes from Rh-positive and Rh-negative persons were investigated. The controls were as follows: (a) washed cells, examined for autofluorescence; (b) leukocytes directly exposed to fluorescein conjugate; (c) sensitized white cells stained with fluorescein conjugate; (d) leukocytes treated with chicken anti-human globulin serum and incubated with conjugate, and (e) white cells from Rh-positive persons incubated in normal human serum which does not contain anti-D antibody. A Reichert

fluorescent microscope equipped with a high pressure mercury vapor lamp and dark field condenser was used. The photographs were taken on Agfa Fluorapid Film which is particularly sensitive to yellow-green light.

Typical results are shown in the Figure in A the white cells are seen in ordinary dark field, and in B with ultraviolet light. Controls are equally visible in ordinary dark field, but did not fluoresce yellow-green. A weak bluish autofluorescence was sometimes visible. Positive results are only obtained with leukocytes from Rh-positive persons. The full report will be published elsewhere.

Mr. T. L. LINCOLN is supported by a U.S. Public Health Service Fellowship, and a James Hudson Brown Fellowship, Yale University.

B. D. JANKOVIĆ and T. L. LINCOLN

Microbiological Institute, Belgrade University School of Pharmacy, Belgrade (Yugoslavia), September 30, 1958.

Zusammenfassung

Mit indirekter Fluoreszenz-Antikörper-Methode wurde nachgewiesen, dass Leukozyten Rh-positiver Versuchspersonen D-Antigen enthalten.

Immunology of Toxemias of Pregnancy II. Immunological Reactivity in Eclamptic Conditions

In the first part of this study we have pointed out the presence of autoantibodies in the sera of pregnant women suffering from preeclampsia. In this part we are following immunological reactivity in this disease.

Materials and Method. A group of 86 women whose pregnancy had lasted from 2 to 8 months were each given a single antigenic stimulus by injecting subcutaneously 0.5 ml Brucella bacterine of Nr. 2 density of the McFarland scale. The immunization had been preceded by control tests for antibody to Brucella, with uniformly negative results. The response by antibody was assessed thrice: on the 7th, the 14th and the 21st days following the impulse. Evaluation of immunological reactivity was based solely on findings of incomplete antibodies. In cases where their titre did not exceed the titre of agglutinins, it was presumed that both titres were identical. The method employed had been described in detail in previous papers¹⁻³.

Only those women whose history was free of brucellosis, allergic diseases, acute rheumatic fever and acute diffuse glomerulonephritis were selected for the research. Simultaneously with the antigenic impulse, they were subjected to a thorough medical and gynaecological investigation; in none of them was the result pathological.

After parturition the women were divided, according to their course of pregnancy following the immunization, into a group with pathological (preeclamptic) course of pregnancy (19 cases), and into a control group (67 cases). Symptoms adopted for the determination of toxemia of

¹ V. WAGNER, V. REJHOLEC, and V. MALÝ, *Ann. rheum. Dis.* 14, 243 (1955).

² H. PADOVCOVÁ, V. REJHOLEC, V. MALÝ, F. SUDA, and V. WAGNER, *Ann. Paediatr.* 187, 351 (1956).

³ V. REJHOLEC, V. FENC, V. WAGNER, M. REPIČ-ŠLECHTA, and E. HALLEROVÁ, *Minerva nefrolog.* 2, 3 (1955).

¹ B. W. GURNER and R. R. A. COOMBS, *Vox Sang.* 3, 13 (1958).

² J. DAUSSET, J. COLOMBANI, and J. EVELIN, *Vox Sang.* 3, 266 (1958).

³ A. H. COONS and M. H. KAPLAN, *J. exp. Med.* 91, 1 (1950).