

in the number of metachromatically granulated leucocytes following incubation of rabbit blood *in vitro* with heparin. So, it seems more likely that the observed changes in the number of circulating basophils (increase, or decrease as in the present experiment) reflect a generalized systemic reaction to heparin administration.

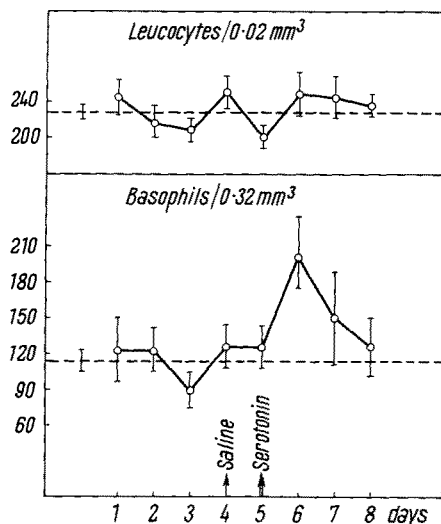


Fig. 3.—Effect of intravenous injection of serotonin (15 mg/kg) on morning counts of basophil and all white cells in rabbit blood (mean for 10 rabbits; standard error of the means indicated by vertical lines; ---- indicates the mean count of 4 control days).

Serotonin injection caused an increase in the number of circulating basophils in rabbit blood, significant only after 24 h, but it did not produce a specific, quick, and highly significant basophilia comparable to that occurring within 4 h as a response to histamine administration in the rabbit<sup>11</sup>. Whereas in the rabbit, histamine is a highly potent edema-producing factor, acting by an increase of capillary permeability, serotonin produces but a negligible increase in tissue water in this species<sup>12</sup>. This difference may explain the non-conformity between the actions of the two agents on the blood basophils in the rabbit.

Under the conditions of the present experiment, neither protamine nor reserpine seems to induce a measurable change in the number of circulating basophils of rabbit.

A.-W. A. BOSEILA<sup>13</sup>

Connective Tissue Research Laboratory, Institute of Medical Anatomy, Copenhagen (Denmark), May 8, 1959.

#### Résumé

Chez le lapin, l'injection intraveineuse d'héparine a été suivie d'une diminution significative du nombre des basophiles du sang au cours de 6 h. La sérotonine a produit pendant ce temps une augmentation du nombre total des leucocytes, et au bout de 24 h, une augmentation spécifique du nombre des basophiles.

Les basophiles n'ont pas changé de nombre après l'injection de protamine ou de reserpine.

### Studies on a Possible Method of Separation of $\gamma$ -Casein by High-Speed Centrifugation and its Identification by Agar Electrophoresis

By high-speed centrifugation, various portions of casein separate out, according to their contents in the milk and the applied centrifugal force. HEYNDRIKX and VLEESCHAUWER<sup>1,2</sup> subjected milk, and its sera obtained by centrifugation, to moving boundary electrophoresis. From the results of investigation on centrifuged and non-centrifuged milk, the authors concluded that three caseins occur in milk, and identified the  $\alpha$ - and  $\beta$ -components. They made no reference to  $\gamma$ -casein, but mentioned that the component which settled down faster and showed a decrease from 9.3 to 3.6% in the milk serum was also of a casein character.

The present report provides additional information as to the nature of the casein fraction that settles down on high-speed centrifugation at low temperature. Using a suitable concentration of the sediment, it has been possible to demonstrate by agar electrophoresis<sup>3</sup> the presence of a distinct band of  $\gamma$ -casein, and also three bands of casein fractions, in a mixed solution of the sediment and of the caseins precipitated from the clear serum.

**Method.**—Milk was dialysed in the cold in cellophane bags for 72 h against veronal buffer at pH 8.6 and ionic strength of 0.1. An aliquot of 20 ml of dialysed milk was centrifuged at 10,000 r.p.m. in the cold (2°C) for 30 min. This separated the fat out as a solid mass at the top leaving a clear serum, and a compact sediment at the bottom.

**Treatment of the sediment:** After removal of the layer of fat, the clear serum was decanted off completely. The sediment was washed twice with a solution of N/50 acetate buffer of pH 6.0 and then with cold ether. The sediment was finally dissolved in 1.0 ml of KCl-borate buffer solution of pH 10.0 (Solution 1).

**Treatment of the serum:** The casein fractions in the clear serum were precipitated at pH 4.6 with dilute acetic acid and centrifuged. The precipitate from 5.0 ml of clear serum was washed with cold ether and dissolved in 2.0 ml of KCl-borate buffer solution (Solution 2).

**Solution 3** is a mixture of equal volumes of solution 1 and Solution 2 and, therefore, contained all the casein fractions present in milk. The concentration of the casein fraction that separated as a sediment on centrifugation was at a higher level in solution 3 as compared to that present in the original milk.

The solutions were subjected to agar electrophoresis for 6 h at 250 volts and a current strength of 8 mA. The electrophoretic diagrams are shown below in the following Figures.

**Discussion.**—Figure 1 shows a distinct band due to the casein fraction present in the sediment. In Figure 2, the same band is seen against two distinct bands due to the casein components present in the clear serum. The single band at the top having the lowest mobility is presumably due to  $\gamma$ -casein, while the two lower bands probably correspond to  $\beta$ - and  $\alpha$ -caseins in the order of increasing mobility.

Figure 3 depicts the three bands due to  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -caseins in the mixed solution, the band of  $\gamma$ -casein being

<sup>11</sup> A.-W. A. BOSEILA, Acta allergol., in press (1959).

<sup>12</sup> D. WILHELM, in *5-Hydroxytryptamine* (Pergamon Press, London 1958), Discussion p. 178.

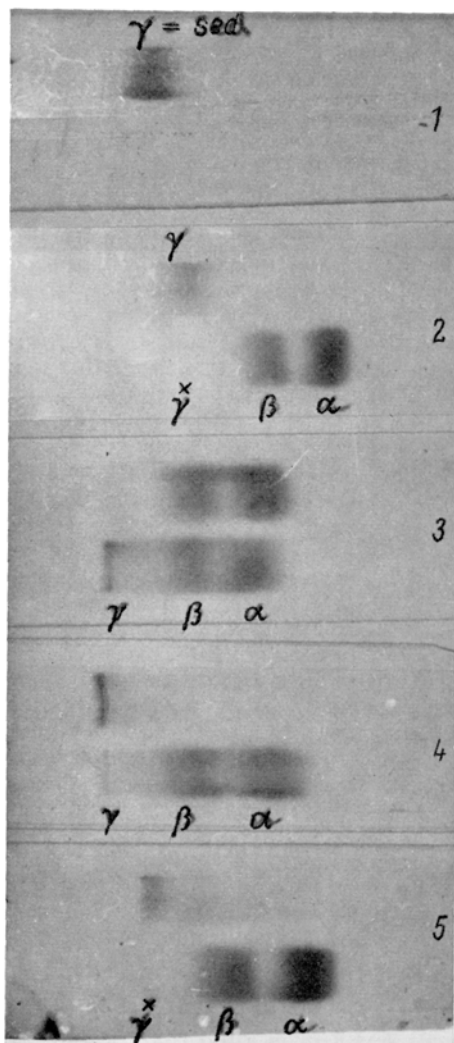
<sup>13</sup> Author on leave from the Histology Department, Faculty of Medicine, Cairo University (Egypt).

<sup>1</sup> G. V. HEYNDRIKX and A. DE VLEESCHAUWER, Exper. 8, 317 (1952).

<sup>2</sup> G. V. HEYNDRIKX and A. DE VLEESCHAUWER, Biochim. biophys. Acta 6, 487 (1951).

<sup>3</sup> K. V. GIRI, Naturwissenschaften 43, 232 (1956).

demonstrable as its concentration in the mixed solution was ten times that in original milk.



In Figure 4 the least mobile fraction in the mixed solution exactly corresponds to the position occupied by the single band due to sediment solution (Solution 1) at the top.

From a study of the electrophoretic diagrams, it is evident that the position of  $\gamma$ -casein singly and also in the mixture is quite distinct and characteristic. That a portion of  $\beta$ -casein also settles down in the sediment at higher speed of centrifugation became evident when the solution of such sediment was subjected to electrophoresis for longer periods using 0.5% agar (Fig. 5).

It is, therefore, concluded that the sediment that settles down on high-speed centrifugation comprises mostly of  $\gamma$ -casein.

A. K. DEB, K. V. GIRI\*, and N. C. DATTA

Department of Biochemistry, Indian Institute of Science, Bangalore, and Bangalore Medical College, March 16, 1959.

#### Résumé

Le présent article traite de la possibilité d'obtenir une méthode de séparation du  $\gamma$ -caséine par centrifugation à grande vitesse et à basse température et son identification par l'électrophorèse avec la gélee.

\* Deceased.

### Der Einbau von radioaktiv markiertem Schwefel ( $^{35}\text{S}$ ) in den Knorpel normaler und Vitamin-C-frei ernährter Meerschweinchen

Die Untersuchungen von DZIEWIATKOWSKI *et al.*<sup>1,2</sup> und von BOSTRÖM *et al.*<sup>3-5</sup> an Ratten haben ergeben, dass nach intraperitonealer Injektion von anorganisch gebundenem Schwefel (Sulfat) dieser zum Aufbau von Knorpelgewebe, insbesondere von Chondroitinschwefelsäure, verwertet wird. Das Mucopolysaccharid Chondroitinschwefelsäure ist der wesentlichste Bestandteil des hyalinen Knorpels. Es zeigte sich, dass 24 h nach der Injektion das Maximum der Schwefelaufnahme erreicht ist; von diesem Zeitpunkt an nimmt die Radioaktivität des Knorpelgewebes allmählich wieder ab und geht nach rund 16 Tagen auf die Hälfte des Maximalwertes zurück (BOSTRÖM<sup>3</sup>). REDDI und NÖRSTROM<sup>6</sup> konnten ferner nachweisen, dass die Verwertung von Schwefel bei Vitamin-C-frei ernährten Meerschweinchen wesentlich schlechter ist als bei Normaltieren. So fand sich in den Kostalknorpeln von Vitamin-C-Mangeltieren, 48 h nach der Injektion markierter Sulfatlösung, nur rund ein Drittel der Menge radioaktiver Chondroitinschwefelsäure, wie sie bei gesunden, normal ernährten Tieren im Knorpel ermittelt werden konnte.

Im Rahmen eigener Untersuchungen über den Stoffwechsel des Knorpelgewebes führten wir unter anderem zwei Versuchsreihen durch, deren Ergebnisse den Befund von REDDI und NÖRSTROM vollauf bestätigten konnten. Es sei dies hier kurz mitgeteilt.

Wir benutzten zu den Versuchen ausgewachsene, weibliche Meerschweinchen. Die Vitamin-C-Mangeltiere erhielten als Nahrung Grundfutter (Biskuits aus Haferflocken, Kleie, Magermilchpulver, Lebertran u. a.), sterilisiertes Heu und Wasser, während die Normaltiere Grundfutter, normales Heu und Runkelrüben bekamen; ausserdem wurde jedem Normaltier täglich 10 mg Ascorbinsäure injiziert. Zwei Tage vor der Sektion, die auf den 17. bzw. 18. Skorbtag fiel, wurde allen Tieren intraperitoneal 1,5 ml trägerfreie Natriumsulfatlösung ( $^{35}\text{S}$ ) injiziert,  $1,5 \times 10^6$  cpm pro Tier. Die 12 seziierten Normaltiere hatten ein Durchschnittsgewicht von 280–300 g, während die 36 überlebenden Skorbtiere am Tage der Sektion nur noch 180–200 g schwer waren. Die Kostalknorpel von je zwei Tieren wurden gemeinsam verarbeitet. Nach Aufschliessen des getrockneten Knorpelmateri als mit der Methode nach BAILEY<sup>7</sup> und Zugabe von 0,25 ml normaler Natriumsulfat-Lösung als Trägersubstanz wurde der Gesamtschwefel durch Bariumchlorid gefällt und die Radioaktivität des Sulfatniederschlages bestimmt.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, dass von den Normaltieren rund doppelt soviel Schwefel in die Kostalknorpel eingelagert wurde wie von den Skorbttieren. Dieser Befund bestätigt die Versuchsergebnisse von REDDI und NÖRSTROM, die bei Normaltieren dreimal mehr radioaktiven Schwefel feststellten als bei Vitamin-C-Mangeltieren. Der graduelle Unterschied zu unseren Zahlen beruht wohl darauf, dass REDDI und NÖRSTROM die injizierte Menge aktiven Schwefels auf je 100 g Körpergewicht pro Tier berechneten, während wir allen Tieren gleichviel Schwefel injizierten. Die wesentlich schwereren

<sup>1</sup> D. D. DZIEWIATKOWSKI, R. E. BENESCH und R. BENESCH, J. biol. Chem. 178, 931 (1949).

<sup>2</sup> D. D. DZIEWIATKOWSKI, J. biol. Chem. 189, 187 (1951).

<sup>3</sup> H. BOSTRÖM, J. biol. Chem. 196, 477 (1952).

<sup>4</sup> H. BOSTRÖM und S. ÅQVIST, Acta chem. scand. 6, 1557 (1952).

<sup>5</sup> H. BOSTRÖM und E. JORPES, Exper. 10, 392 (1954).

<sup>6</sup> K. K. REDDI und A. NÖRSTROM, Nature 173, 1232 (1954).

<sup>7</sup> K. BAILEY, Biochem. J. 31, 1396 (1937).