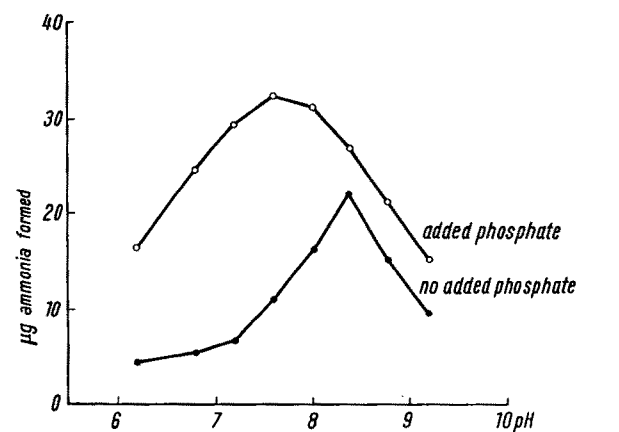


Table I
Glutaminase I activity of guinea pig and rabbit liver and kidney
(a) tissue extracts and (b) mitochondrial preparations

Tissue Preparations	Additions	μg Ammonia formed per h at			
		pH 7.2		pH 8.4	
		Preparation (a)	Preparations (b)	Preparation (a)	Preparation (b)
1. Guinea pig Liver	None	12.0	6.2	19.0	22.0
	PO ₄	20.0	27.0	19.8	27.0
	DL-glutamate	11.0	6.0	19.0	22.0
	PO ₄ + DL-glutamate	16.0	17.0	19.5	23.0
2. Guinea pig Kidney	None	9.0	9.0	18.0	26.5
	PO ₄	26.5	28.0	25.0	35.5
	DL-glutamate	6.0	6.0	16.0	26.0
	PO ₄ + DL-glutamate	16.0	12.0	15.0	29.0
3. Rabbit Liver	None	7.0	8.0	14.0	17.0
	PO ₄	18.0	25.0	20.0	26.5
	DL-glutamate	7.0	8.0	13.0	16.0
	PO ₄ + DL-glutamate	11.0	16.0	14.0	20.0
4. Rabbit Kidney	None	6.0	9.0	12.0	13.0
	PO ₄	20.0	26.0	22.0	26.0
	DL-glutamate	4.0	7.0	9.0	10.0
	PO ₄ + DL-glutamate	8.0	18.0	16.0	20.0

0.2 M Phosphate and 0.05 M DL-glutamate were used. Other conditions are given in the text.

The pH activity curve of glutaminase of guinea pig liver mitochondria (Fig.) indicates that the optimum range for phosphate activation lies between pH 7.2–7.8, and the net effect of phosphate activation decreases as the pH is further raised.



pH-activity curve of Glutaminase I of guinea pig liver mitochondria

It is evident from Table II that the glutaminase of guinea pig liver mitochondria, prepared and suspended in hypertonic sucrose medium, is not activated even at pH 7.2, with the usual phosphate concentration (0.2 M). However, a higher concentration of phosphate (0.5 M) is required to produce significant activation of glutaminase, which suggests that the effect of phosphate is in some way counteracted by hypertonic sucrose medium.

Table II
Effect of tonicity of medium on Glutaminase I activity of guinea pig liver mitochondria (100 mg wet weight) at pH 7.2

System	μg Ammonia formed per h	
	Without PO ₄	With PO ₄ (0.2 M)
1. Suspension prepared according to ERRERA <i>et al.</i> ¹	6.2	27.0
2. 0.3 M Sucrose suspension	15.0	27.0
3. 0.88 M Sucrose suspension	16.5	17.0
4. 0.88 M Sucrose suspension + 0.5 M PO ₄ (in place of 0.2 M)	16.5	24.5

Although it is well known that phosphate, glutamic acid, higher pH, or hypertonic sucrose produce profound influences on the structural morphology and function of the mitochondrion, it cannot definitely be said at this stage whether the observed effects of these factors on the glutaminase activity and on the mitochondrial morphology are correlated phenomena.

S. R. GUHA and H. S. CHAKRAVARTI
Indian Institute for Biochemistry and Experimental Medicine, Calcutta (India), October 12, 1959.

Zusammenfassung
Aktive Glutaminase I wurde in Meerschweinchen- und Kaninchenleber, in Nierengewebsextrakten und in Mitochondrienpräparaten der erwähnten Organe bei pH 7,2 nachgewiesen. DL-Glutaminsäure bewirkte eine ausgesprochene Hemmung des Enzyms nach Zusatz von Phosphat. In hypertonischer Sukrosenährlösung lässt sich eine Aktivierung durch Phosphatzusatz gewöhnlich nicht nachweisen, selbst nicht beim pH-Optimum 7,2, es sei denn bei sehr hohen Phosphatkonzentrationen.

PRO EXPERIMENTIS
A Method for Avoidance
of Electrostatic Flashing in Preparing
Autoradiographs with Stripping Film

In unusually dry climates static electricity complicates the use of stripping film for autoradiography. Peeling the film from its base, however gently, tends to produce bright flashes which raise the background to intolerable levels unless special precautions are taken to humidify the film or the atmosphere to the proper degree. (If it is too damp, the film cannot be separated from the plate.)
Accurately controlled hydration can be achieved by immersion of the film plate in aqueous alcohol. The following procedure has been found effective: autoradiographic plates (Kodak AR 10) are immersed briefly (15–30 s) in 100% ethanol and then transferred to a shallow dish of 95% ethanol. While submerged, the film is scored with a razor blade into strips of requisite size, the pieces are peeled off and floated on water emulsion-side down in the usual way. The film strips flatten rapidly and can be mounted on slides within a few seconds. The water on which the film is floated must be changed at frequent intervals, because alcohol that is carried over alters the

surface tension and the strips will sink. It is advisable to carry out this procedure only in a well-ventilated dark room.

Autoradiographs with film stripped by the usual method in a humidified dark room and by the ethanol method described above were compared. Duplicate slides were developed after increasing intervals of exposure. Grains appeared over the radioactive sites at approximately parallel rates, and in fact the two types of preparations were indistinguishable.

This method has yielded highly satisfactory results in qualitative studies on biological material. No grain counting has been attempted. It is simple, rapid and requires no special equipment. Preparations of good quality are readily obtainable in areas where atmospheric conditions are unfavorable.

D. MAZIA¹ and NANCY L. R. BUCHER^{2,3}

Department of Zoology, University of California, Berkeley, and John Collins Warren Laboratories of the Huntington Memorial Hospital of Harvard University, at the Massachusetts General Hospital, Boston (Massachusetts), January 25, 1960.

Zusammenfassung

Die Vorbereitung des Films unter einer Alkohol-Wasser-Lösung wird empfohlen, um die störende Belichtung des autoradiographischen «stripping film» durch elektrostatische Entladungen in einer trockenen Atmosphäre zu vermeiden.

¹ Supported by a grant from the National Institutes of Health.

² Present address: Massachusetts General Hospital, Boston.

³ Supported by a grant from the American Cancer Society. This is publication No. 972 of the Cancer Commission of Harvard University.

PRO EXPERIMENTIS

Une combinaison chimique de la fertilisine

L'un de nous a montré¹ que lorsqu'on met en contact le sérum d'un lapin avec de l'eau de mer ovulaire d'oursin ou une solution de fertilisine d'extraction trichloracétique² en eau de mer, il se forme un trouble pouvant interférer avec d'éventuelles lectures de réactions immunologiques. Or, il a été démontré^{3,4} que la fertilisine possède des propriétés proches de celles de l'héparine: d'une part c'est un polyside estérifié par des groupements SO_4^- , d'autre part c'est une antithrombine.

L'un de nous a montré^{5,6} qu'en présence de certains cations divalents, dont Ca^{++} , l'héparine et les héparinoïdes de synthèse précipitent sélectivement les β -lipoprotéines sériques. Il nous a paru intéressant de rechercher si la fertilisine précipite également les β -lipoprotéines. Effectivement nous avons constaté qu'une solution de fertilisine de *Psammechinus miliaris* en présence de 0,1 M CaCl_2 floccule les β -lipoprotéines du sérum de l'homme. La combinaison est mise en évidence par coloration des lipides avec le noir Soudan dans le précipité redissous en présence de citrate et après électrophorèse sur papier.

Cette réaction de la fertilisine nous paraît avoir un certain nombre d'incidences physiologiques:

1° Il est possible que la combinaison fertilisine- Ca^{++} - β -lipoprotéines joue un rôle important au cours de l'agglutination des spermatozoïdes spécifiques notamment par la fertilisine. En effet la présence d'une gaine lipidique dans la tête des spermatozoïdes d'oursins^{7,8} rend très vraisemblable une telle hypothèse.

Notons toutefois que l'héparine n'agglutine pas les spermatozoïdes d'oursins en eau de mer; il s'agit probablement d'une question de poids moléculaire, celui de l'héparine étant trop faible dans les conditions de force ionique qui sont celles de l'eau de mer. En effet l'héparine, contrairement à certains héparinoïdes de synthèse, ne précipite les β -lipoprotéines que dans des conditions de force ionique faible⁵.

La combinaison fertilisine-protéines basiques spermatozoïdes-phosphatides spermatozoïdes envisagée par l'un de nous⁹ interviendrait dans les processus d'agglutination irréversibles décrits en⁹.

2° Il nous paraît possible de généraliser la portée de la combinaison polysides sulfuriques- Ca^{++} - β -lipoprotéines. HEILBRUNN et WILSON^{10,11} ont montré que l'héparine inhibe la formation du fuseau achromatique; d'après JAHN¹² et KOPAC¹³, cette inhibition est en faveur de l'hypothèse soulevée par l'un de nous¹⁴ selon laquelle le fuseau achromatique serait constitué par une combinaison entre des protéines basiques nucléaires et des protéines à point isoélectrique acide cytoplasmiques, l'héparine entrant en compétition avec les protéines acides cytoplasmiques. La combinaison des β -lipoprotéines avec les polysides sulfuriques nous paraît désormais orienter utilement dans une nouvelle voie les recherches sur la constitution du fuseau achromatique.

Un dosage de la fertilisine fondé sur la combinaison chimique que nous venons de mettre en évidence est en cours de réalisation.

B. RYBAK et M. BURSTEIN

Département de Zoophysologie, Faculté des Sciences, Caen et Centre Nationale de Transfusion Sanguine, Paris, le 23 décembre 1959.

Summary

The fertilizin of sea-urchins combines with β -lipoproteins of mammals sera in the presence of calcium ions. It is suggested that a combination of this type occurs *in vivo* during the sperm-fertilizin interaction.

¹ B. RYBAK, Bull. Soc. Chim. biol., Paris 31, 464 (1949).

² B. RYBAK, C. R. Acad. Sci., Paris 225, 701 (1947).

³ E. VASSEUR, Acta chim. scand. 2, 900 (1948).

⁴ J. IMMERS et E. VASSEUR, Paris 5, 124 (1949).

⁵ M. BURSTEIN, C. R. Acad. Sci., Exper. 243, 527 (1956).

⁶ M. BURSTEIN et J. SAMAILLE, C. R. Acad. Sci., Paris 241, 664 (1955).

⁷ G. T. POPA, Biol. Bull. 52, 238 (1927).

⁸ O. TUZET, C. R. Soc. Biol., Paris 109, 696 (1932).

⁹ B. RYBAK, Bull. Biol. France et Belge, Suppl. 41 (1957).

¹⁰ L. V. HEILBRUNN et W. L. WILSON, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 70, 179 (1949).

¹¹ L. V. HEILBRUNN et W. L. WILSON, Biol. Bull. 97, 242 (1949).

¹² U. JAHN, Z. mikr. anat. Forschung 58, 37 (1952).

¹³ M. KOPAC, Ann. Rev. Physiol. 12, 7 (1950).

¹⁴ B. RYBAK, Bull. Soc. Chim. biol., Paris 32, 703 (1950).

NOTA

Editor's Note: MARGARET H. SHERLOCK, N. SPERBER, and J. TOPLISS: 3-Haloalkyl-Dihydrobenzothiadiazine Dioxides as Potent Diuretic Agents. A Brief Report on the same subject by DE STEVENS *et al.* has been received February, 9 and appeared in Exper. 16, no. 3, p. 113 (1960). For various technical reasons publication on the present report — which definitely has priority — has unfortunately been delayed.