

faint reaction in the lymphocytes in these areas as well as in cortical nodules (Figure 2). Positive reactions using this substrate have been demonstrated in rabbit alveolar macrophages and peritoneal mononuclear cell exudates<sup>5</sup>. Glucuronidase activity has also been found in polymorphonuclear leucocytes by a different method<sup>6</sup>.

The results of the present study confirm the suitability of halogen-substituted indolyl substrates for the histochemical detection of enzyme activity. The reactions are characterized by satisfactory resolution, specificity, and stability.  $\beta$ -glucuronidase activity was found in mononuclear cells in the thymus, spleen, intestine, and lymph nodes. Reactive mononuclear cells have also been described using an analogous substrate for  $\beta$ -galactosidase<sup>1,7</sup>. These substrates provide a simple but reliable histochemical method for the study of the normal and altered reticuloendothelial system in tissue sections<sup>8</sup>.

**Zusammenfassung.** Eine Halogen enthaltende Indolverbindung wurde zum Nachweis der  $\beta$ -D-Glucuronidase

benutzt. Die Methode eignet sich zur Lokalisierung von reaktiven Kleinzellen im reticuloendothelialen System.

B. PEARSON, A. C. STANDEN  
and J. R. ESTERLY

Medical Sciences Laboratory, Fort Detrick, Frederick (Maryland 21701, USA), 18th May 1967.

<sup>5</sup> D. J. YARBOROUGH, O. T. MEYER, A. M. DANNENBERG JR. and B. PEARSON, submitted to *J. Histochem. Cytochem.*

<sup>6</sup> W. H. FISHMAN and R. DE LELLIS, *Nature* 212, 312 (1966).

<sup>7</sup> B. PEARSON and A. C. STANDEN, *Fedn. Proc. Am. Soc. exp. Biol.* 25, 596 (1966).

<sup>8</sup> In conducting the research reported herein, the investigators adhered to 'Guide for Laboratory Animal Facilities and Care' established by the Committee on the Guide for Laboratory Animal Facilities and Care of the Institute of Laboratory Animal Resources, NAS-NRC.

### Polymorphisme des lipoprotéines et des glycoprotéines sériques chez la Truite

Le polymorphisme des protéines sériques est maintenant bien établi à la suite des travaux de BÉARN<sup>1</sup>, BLUMBERG<sup>2</sup> et HIRSCHFELD<sup>3</sup>.

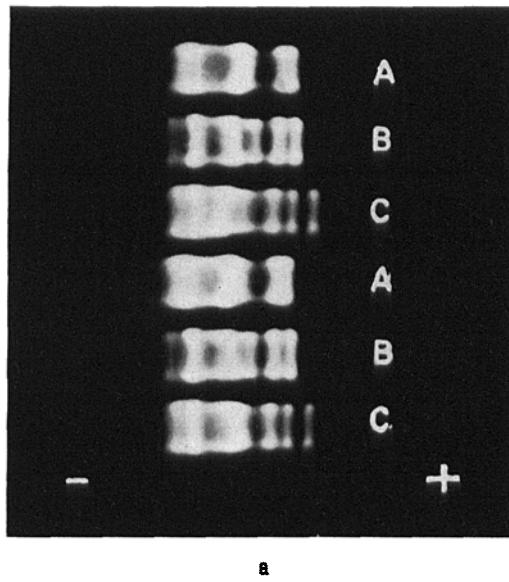
KOSSWIG<sup>4</sup> a mis le premier en évidence le polymorphisme des protéines sériques des poissons, qui a été depuis étudié par NYMAN<sup>5</sup>, SALIBIAN<sup>6</sup> et FINE<sup>7</sup>.

Nous avons étudié les sites protéiques des variations génétiques chez trois espèces de truites, soit *Salmo trutta*, *Salvelinus fontinalis*, et *Salmo gairdneri*.

*Matériel et méthodes.* Ces truites proviennent de la Station biologique du lac Jacques-Cartier (Québec). Elles sont gardées au laboratoire dans un aquarium contenant de l'eau douce provenant du lac St-Charles (Québec), à 4°C, au pH de 7,6, dans un volume de 120 gallons, filtré à chaque 10 min.

Le sang est prélevé, sous anesthésie à l'uréthane, par la veine dorsale; le sérum est poolé par espèces, sans distinction de sexe, et soumis aux analyses suivantes: (a) l'analyse électrophorétique sur membrane d'acétate de cellulose à l'aide de l'appareil Spinco Duostat et sur la cellule microzone R-101. Cette analyse est faite à 250 V, 4 mA, durant 20 min, dans un tampon véronal 0,075 M, pH 8,6; (b) l'analyse électrophorétique a été faite sur gélose à 1,5%, en tampon véronal-barbital 0,075 M, pH 8,6, sur lames de microscope sur l'appareil immunophor (LKB), sous un courant électrique de 10 V/cm, durant 75 min; (c) l'analyse immunoélectrophorétique<sup>8</sup> a été faite sur le même appareil immunophor (LKB) en utilisant également un tampon véronal-barbital 0,075 M, pH 8,6 durant 75 min, sous un courant électrique de 10 V/cm.

L'anticorps nécessaire a été préparé chez le lapin, selon la méthode à l'Adjuvant complet de Freund (Difco 063859) avec, comme antigène, le sérum de *Salmo gairdneri*. Nous avons fait sur ces électrophorégrammes et immunoélectrophorégrammes, la coloration des protéines simples à l'Amidoschwarz<sup>9</sup>, la coloration des glycoprotéines à la phénylhydrazine<sup>10</sup>, des lipoprotéines au Soudan IV<sup>11</sup>. Nous avons de plus caractérisé l'activité



<sup>1</sup> A. G. BÉARN, *Bull. N.Y. Acad. Med.* 37, 593 (1961).

<sup>2</sup> B. A. BLUMBERG, *Vox Sang.* 10, 366 (1965).

<sup>3</sup> J. HIRSCHFELD, *Biblthca haemat.* 23, 365 (1965).

<sup>4</sup> C. KOSSWIG, *Copeia* 1, 65 (1964).

<sup>5</sup> L. NYMAN, *Hereditas* 70, 117 (1965).

<sup>6</sup> A. SALIBIAN, *Revta Soc. argent. Biol.* 41, 121 (1965).

<sup>7</sup> J. M. FINE et A. DRILHON, *C. r. Séanc. Soc. Biol.* 158, 1807 (1964).

<sup>8</sup> P. GRABAR et C. A. WILLIAMS JR., *Biochem. biophys. Acta* 10, 193 (1953).

<sup>9</sup> J. URIEL, in *Immunolectrophoretic Analysis* (Ed. P. GRABAR et P. BURTIN; Elsevier Publ. Co., New York 1964), vol. I, p. 34.

<sup>10</sup> J. URIEL, in *Immunolectrophoretic Analysis* (Ed. P. GRABAR et P. BURTIN; Elsevier Publ. Co., New York 1964), vol. I, p. 35.

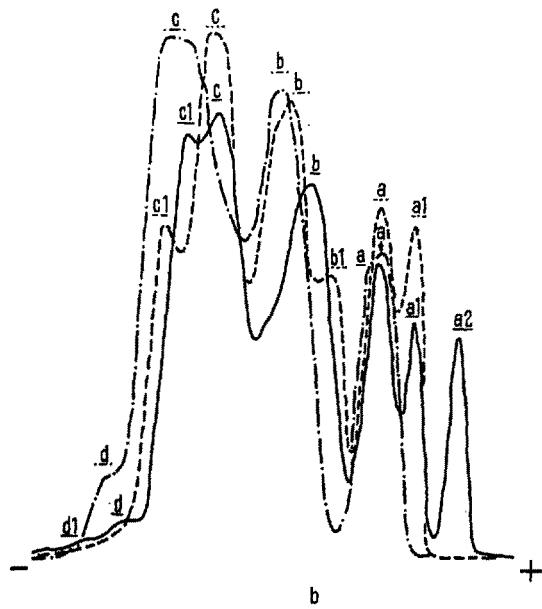
<sup>11</sup> J. URIEL, in *Immunolectrophoretic Analysis* (Ed. P. GRABAR et P. BURTIN; Elsevier Publ. Co., New York 1964), vol. I, p. 40.

phosphatasique alcaline selon la technique d'URIEL<sup>12</sup>, à l'aide, comme substrat, du  $\beta$ -naphtol ASB<sub>1</sub>, de l'acide phosphorique (Sigma, lot 6870).

Nous avons utilisé l'appareil Chromoscan (Joyce) pour faire l'intégration automatique de ces électrophorogrammes. Cette intégration se fait à l'aide d'un filtre orange 5,045 avec un rapport vitesse de la plume sur vitesse du rouleau de 1 à 3. L'intégration des lipoprotéines et des glycoprotéines a été faite avec le filtre gris (No. 2-OD) dans le même rapport de vitesse 1 à 3.

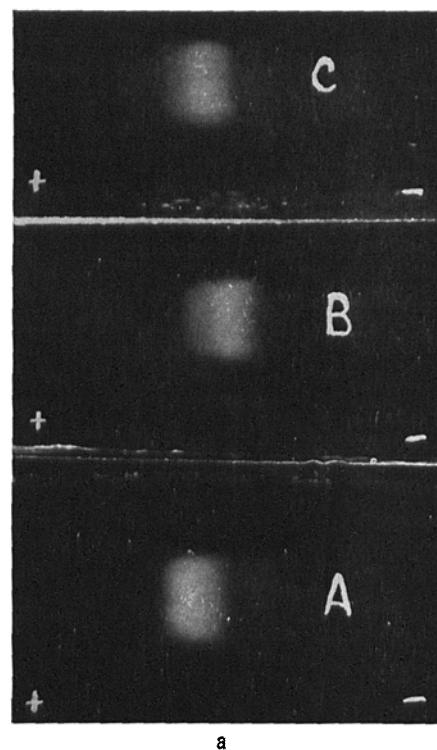
**Résultats.** (a) Les analyses électrophorétiques sur membrane d'acétate de cellulose (Figure 1) et sur gélose (Figures 2 et 3) montrent d'importantes variations, aussi

<sup>12</sup> J. URIEL et P. GRABAR, Annls Inst. Pasteur, Paris 90, 427 (1956).



	D <sub>1</sub>	D	C <sub>1</sub>	C	B	B <sub>1</sub>	A	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
S. trutta, %	1,4	2,1	17,6	18,2	30,7	—	15,2	7,5	7,3
S. fontinalis, %	—	—	14,0	26,9	25,3	10,7	13,2	9,9	—
S. gairdneri, %	—	2,7	—	52,6	28,3	—	16,4	—	—

c



	E	D <sub>1</sub>	D	C	B	A
S. trutta, %	5,8	32,1	37,3	15,7	3,3	5,8
S. fontinalis, %	—	17,6	64,5	—	10,4	7,5
S. gairdneri, %	—	19,8	50,3	20,9	7,1	1,9

b

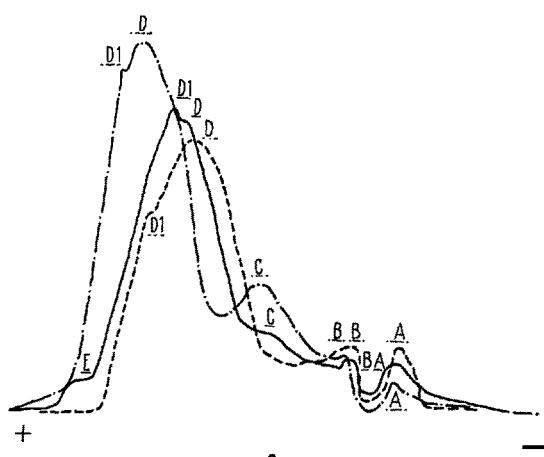


Fig. 1. Analyse électrophorétique des protéines sériques de truites de races différentes, mettant en évidence d'importantes variations phénotypiques génétiques, notamment au niveau des rho et des immunoglobulines. (a) Electrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose du sérum de *S. trutta* (C), *S. fontinalis* (B) et *S. gairdneri* (A), en tampon véronal-barbital, pH 8,6, 0,075 M, durant 30 min. Coloration des protéines simples à l'Amidoschwarz. (b) Intégration automatique de l'électrophorégramme de la figure (a) sur l'appareil Chromoscan (Joyce). (c) Analyse de la distribution proportionnelle des protéines sériques de truites de 3 espèces différentes, montrant la présence de D<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> exclusivement chez la *S. trutta* et l'absence de D chez la *S. fontinalis* et de B<sub>1</sub> chez *S. trutta* et *S. gairdneri*. (C) *S. trutta* —, (B) *S. fontinalis* ----, (A) *S. gairdneri* ······.

Fig. 2. Caractérisation des glycoprotéines sériques de la truite montrant une importante différence génétique entre *S. trutta* (C), *S. fontinalis* (B) et *S. gairdneri* (A). La différence majeure se situe au niveau de l' $\alpha_1$  rapide glycoprotéine. (a) Coloration des glycoprotéines après électrophorèse simple sur gélose, en tampon véronal-barbital, pH 8,6, 0,075 M, durant 1,30 h. (b) Intégration automatique des glycoprotéines sériques sur l'appareil Chromoscan (Joyce). (C) *S. trutta* —, (B) *S. fontinalis* ----, (A) *S. gairdneri* ······, (c) Distribution proportionnelle des glycoprotéines sériques, de ces différentes races de truite, montrant la présence exclusive à la truite brune de E et l'absence de C dans le sérum de la truite mouchetée.

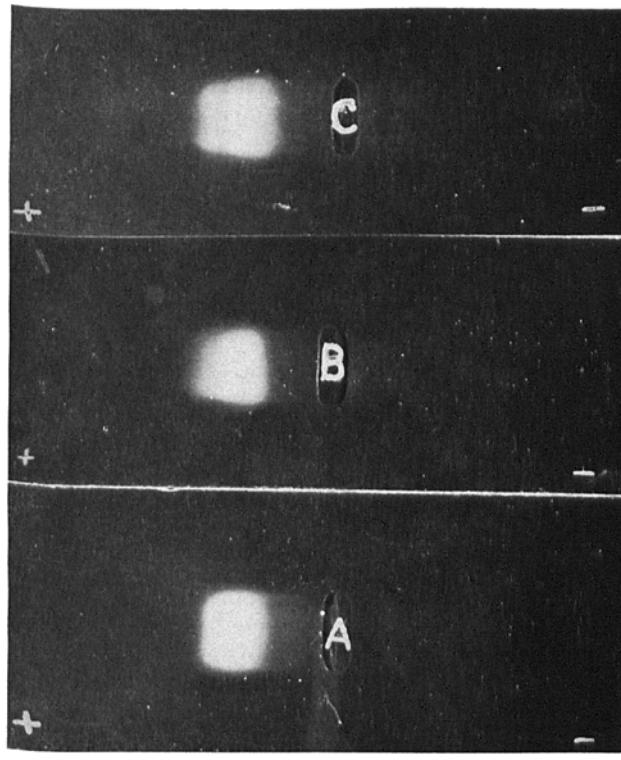
bien au niveau des protéines sériques simples qu'au niveau des lipoprotéines et des glycoprotéines entre le sérum de ces 3 espèces de salmonidés.

L'examen minutieux de ces variations électrophorétiques montre, notamment, les points suivants: d'une part, l'électrophorégramme des protéines du sérum de *Salmo trutta* révèle 2 protéines qui sont absentes du sérum *Salvelinus fontinalis* et de *Salmo gairdneri*, soit les protéines A<sub>2</sub> et D<sub>1</sub> (Figure 1c); d'autre part, *S. fontinalis* ne contient pas la protéine D, présente chez les 2 autres espèces de truite, alors qu'elle contient la protéine B<sub>1</sub>,

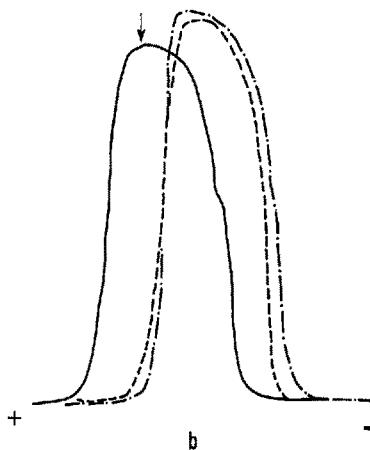
absente du sérum des 2 autres espèces. Chez *S. gairdneri*, les protéines C<sub>1</sub> et A<sub>1</sub> ne sont pas détectables.

Au niveau des lipoprotéines, nous pouvons voir, sur la Figure 3, alors qu'il n'y a pas de variations entre *S. gairdneri* et *S. fontinalis* (A et B), il y a une importante différence chez *S. trutta* (C); chez cette espèce, en effet, les lipoprotéines sériques se fragmentent en 2 lignes de précipité électrophorétique (Figure 3a).

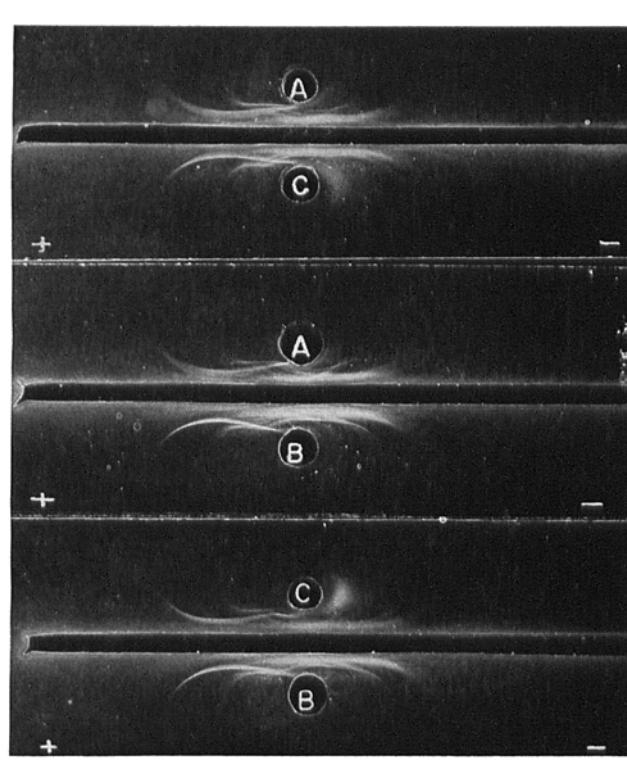
Le polymorphisme des glycoprotéines est beaucoup plus important. L'examen de la Figure 2 révèle, en effet, dans le sérum de *S. trutta*, 6 zones électrophorétiques glycoprotéiques.



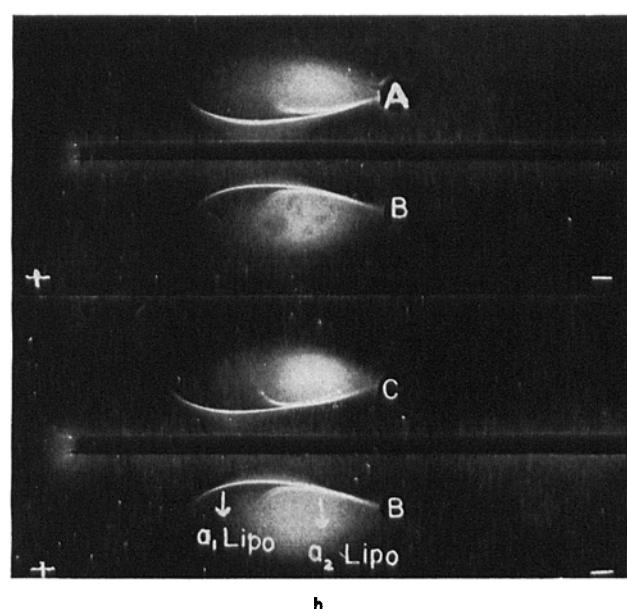
a



b



a



b

Fig. 3. Coloration des lipoprotéines sériques de *S. gairdneri* (A) *S. fontinalis* (B) et *S. trutta* (C), après électrophorèse simple sur gélose montrant une importante différence phénotypique au niveau de l' $\alpha$ -lipoprotéine sérique de *S. trutta*. L'intégration automatique en (b) montre bien (flèche) cette importante différence. (C) *S. trutta* —, (B) *S. fontinalis* -----, (A) *S. gairdneri* - - -.

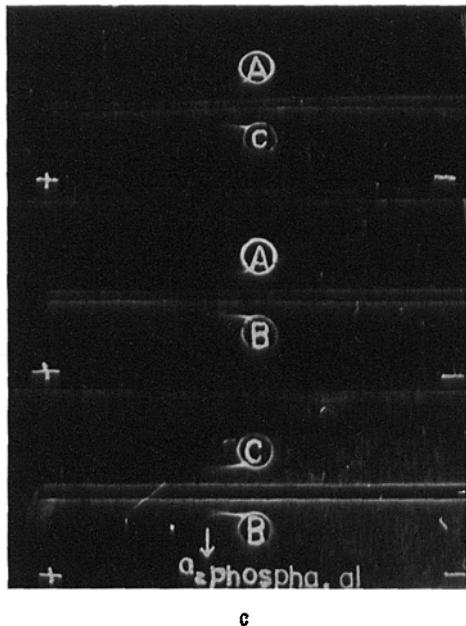
On peut aussi observer, dans le Tableau 2c, que la glycoprotéine E est exclusive au sérum de *S. trutta*, alors que *S. fontinalis* ne contient pas la glycoprotéine C; qu'il y a une forte proportion de la glycoprotéine A chez *S. fontinalis* et une faible proportion de la glycoprotéine A chez *S. gairdneri*.

(b) Les Figures 4 et 5 résument les résultats obtenus par les analyses immunochimiques. On peut observer notamment que le sérum *S. fontinalis* et *S. trutta* ont un équipement protéique très voisin de celui de *S. gairdneri*. Nous pouvons voir que le sérum de brochet *Esox lucius* a une certaine parenté antigénique avec les protéines sériques de *S. gairdneri* (Figure 5a), alors que *Anguilla rostrotu* n'en possède aucune.

Dans la Figure 4b, nous montrons que le polymorphisme des lipoprotéines, révélé par l'analyse électrophorétique n'apparaît pas à l'analyse immunoélectrophorétique et n'affecte pas la spécificité antigénique des lipoprotéines qui sont identiques d'une espèce à l'autre. Bien plus, nous pouvons voir que les lipoprotéines  $\alpha_2$  de *Esox lucius* (Figure 5b) ont des déterminants antigéniques communs avec l' $\alpha_2$ -lipoprotéine du sérum de *S. gairdneri*.

Au niveau des glycoprotéines, le polymorphisme, détecté à l'électrophorèse, n'est pas traduit à l'immunoélectrophorèse et ne dérange pas la spécificité, qui est la même chez les trois espèces. A ce niveau, nous voyons, en outre, que *E. lucius* contient aussi une glycoprotéine possédant des déterminants antigéniques communs avec *S. gairdneri* (Figure 5c).

La détection de l'activité phosphatasique alcaline sur les précipités immunoélectrophorétiques montre qu'il n'y a pas de variations d'une espèce de truite à une autre. Cependant cette  $\alpha_2$ -phosphatase alcaline a, quand même,



c

une spécificité, ne montrant pas de lien avec les protéines sériques de *E. lucius*.

*Discussion.* Grâce à la combinaison des méthodes électrophorétiques et immunologiques, nous avons pu

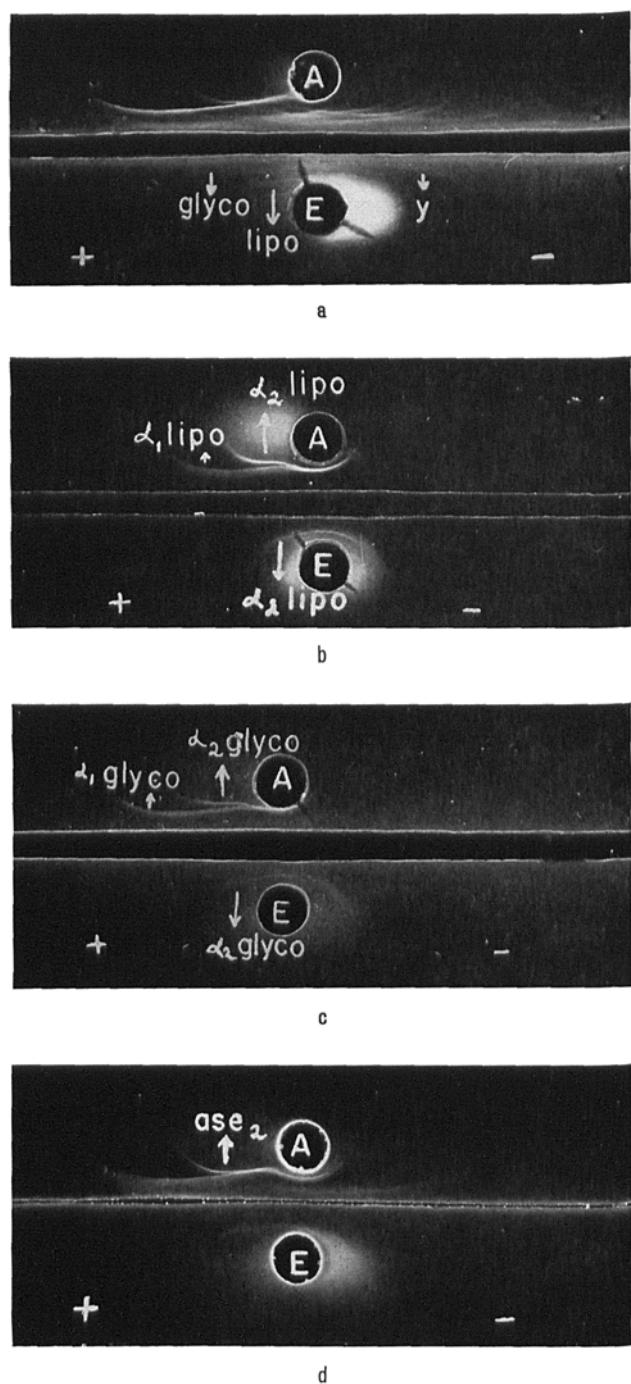


Fig. 5. Caractérisation, après analyse immunoélectrophorétique, des relations antigéniques entre le sérum de la truite (A) et celui du brochet (E). A noter: Trois protéines sériques du brochet ont des déterminants antigéniques communs avec la truite (a). Ces relations antigéniques entre la truite et le brochet se situent au niveau de l' $\alpha_2$ -lipoprotéine (b), et de l' $\alpha_2$ -glycoprotéine (c). L' $\alpha_2$ -phosphatase alcaline de la truite n'est pas reliée à celle du brochet (d).

Fig. 4. Analyses immunoélectrophorétiques comparées des protéines sériques (a), des lipoprotéines sériques (b), et de la phosphatase alcaline sérique (c) de *S. trutta* (C), de *S. fontinalis* (B) et de *S. gairdneri* (A). Ces analyses ont été faites à l'aide d'un immunosérum de lapin antisérum de *S. gairdneri*. A noter: Ces analyses immunoélectrophorétique et de spécificité immunologique, au niveau des lipoprotéines et de la phosphatase alcaline, entre ces différentes espèces de truite.

mettre en relief d'importantes variations phénotypiques au niveau des protéines simples, des lipoprotéines et des glycoprotéines sériques de ces 3 espèces de truites.

L'association de ces méthodologies pourraient s'avérer utile dans des travaux de génétique utilisant ces différences au niveau des protéines simples et complexes comme marqueurs.

Nous nous proposons d'étudier la nature biochimique des différences entre les protéines sériques d'une espèce à l'autre<sup>18</sup>.

**Summary.** It is shown that there are important differences among the serum proteins of 3 different species of trout. We stress that these genetic variations concern the lipoproteins as well as the glycoproteins. Furthermore,

3 serum proteins of *Esox lucius* have antigenic determinants common with the serum proteins of *S. gairdneri*; they are an  $\alpha_1$ -lipoprotein, an  $\alpha_2$ -glycoprotein and a  $\gamma$ -globulin.

D. DUFOUR et D. BARRETTE

Centre de Biomédecine, Université Laval, Québec (Canada), 7 avril 1967.

<sup>18</sup> Travail présenté au Congrès de la North-East Wild Life Conference, Québec 1967 et subventionné par le Conseil national des recherches (Ottawa).

### The Acetylation of Tryptophan Metabolites by Rapid and Slow Acetylators of Sulfamethazine

N-acetyl-kynurenine (NA-K) and N-acetyl-3-hydroxykynurenine (NA-OHK) were identified in rat urine following tryptophan ingestion by DALGLIESH et al.<sup>1</sup>. NA-K was demonstrated in the urine of other species, including man, following tryptophan ingestion, by BROWN and PRICE<sup>2</sup>. A simple paper chromatographic method for demonstrating kynurenine (K), 3-hydroxy-kynurenine (OHK), NA-K and NA-OHK in human urine following tryptophan ingestion was devised by WESTALL<sup>3</sup>.

There is a Mendelian polymorphism in man for the acetylation of sulfamethazine, isoniazid and hydralazine (EVANS and WHITE<sup>4</sup>). Other compounds such as sulfanilamide (PETERS et al.<sup>5</sup>) and PAS (MOTULSKY and STEINMANN<sup>6</sup>), though extensively acetylated in man, are monomorphically acetylated, their acetylation apparently not being influenced by the polymorphism.

It was, therefore, of interest to determine whether the acetylation of tryptophan metabolites in man was subject to the action of the acetylation polymorphism.

**Materials.** Experimental subjects: Volunteer subjects were healthy medical students and laboratory staff.

Sulfamethazine was kindly donated by I.C.I. Pharmaceutical Division, Wilmslow, Cheshire, U.K.<sup>7</sup>. Ammonium sulfamate was British Drug Houses Reagent Grade. L-Tryptophan<sup>8</sup> and 3-hydroxy-DL-kynurenine were purchased from Koch-Light Laboratories, Colnbrook, Bucks, U.K. DL-Kynurenine from Fluka AG Chemische Fabrik, Buchs, SG, Switzerland. Chromatography paper was Whatman No. 1 10 x 10 inch, 'A' pattern. Other chemicals were analytical grade reagents purchased from British Drug Houses.

**Methods.** Sulfamethazine test on experimental subjects: Fasting subjects were observed to swallow 160 mg pure sulfamethazine powder per kg metabolically active mass (MAM = weight<sup>0.7</sup>) with a little water. 2 h following drug ingestion subjects were allowed tea and toast. All urine passed during 8 h following drug ingestion was collected. The urine volume was measured and a portion stored at -20 °C to await analysis.

Estimation of sulfamethazine concentration in urine: Free and total sulfamethazine were estimated by the Bratton-Marshall procedure<sup>9</sup>. Unknowns were processed in duplicate and a range of standards at 2, 4, 6, 8 and 10 µg sulfamethazine per ml, together with suitable blanks, were processed in duplicate simultaneously.

Determination of acetylator phenotype: The subjects who received a tryptophan load test some weeks following the sulfamethazine test formed part of a much larger series of healthy subjects who had undertaken the latter procedure. It will be seen from Figure 1 and from the Table that these 18 subjects are a representative sample of the population.

L-Tryptophan test on experimental subjects: 18 subjects who had been phenotyped by the sulfamethazine test, were utilized for this portion of the study. Subjects were fasted from 22.00 h on the previous evening, and on the test morning were observed to swallow 5.0 g L-tryptophan with a little water. The same dosage was given to each subject regardless of weight. A light meal of tea and toast was allowed 2 h following L-tryptophan ingestion. Urine was collected for 6 h following the ingestion of the amino-acid. The urine was mixed, the volume recorded and a portion placed at -20 °C to await further processing.

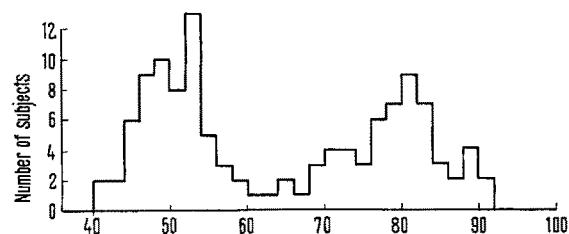


Fig. 1. The percentage of urinary sulfamethazine acetylated in 119 healthy subjects.

<sup>1</sup> C. E. DALGLIESH, W. E. KNOX and A. NEUBERGER, Nature 768, 20 (1951).

<sup>2</sup> P. R. BROWN and J. M. PRICE, J. biol. Chem. 219, 985 (1965).

<sup>3</sup> R. G. WESTALL, Personal communication (1965).

<sup>4</sup> D. A. P. EVANS and T. A. WHITE, J. Lab. clin. Med. 63, 394 (1964).

<sup>5</sup> J. H. PETERS, G. ROSS GORDON and P. BROWN, Life Sci. 4, 99 (1965).

<sup>6</sup> A. G. MOTULSKY and L. STEINMANN, J. clin. Invest. 41, 1387 (1962).

<sup>7</sup> T. A. WHITE and D. A. P. EVANS, Clin. Pharmac. Ther., in press (1967).

<sup>8</sup> W. I. AUSTAD, J. R. CLAMP and R. G. WESTALL, Nature, 207, 757 (1965).

<sup>9</sup> H. VARLEY, in *Practical Clinical Biochemistry* (Heinemann, London, First Edition, 1954).