

experiments coincided with the exceptionally hot summer of 1952 and no unequivocal result was obtained when all stages of the experiment were performed at room temperature (32–35°C). The addition of α -methyl glucoside after the irradiation resulted in up to a 100-fold greater degree of survival than in control suspensions. However, there was considerable death in both irradiated and unirradiated control suspensions due to heat inactivation (arising from the poor dissipation of heat generated during centrifugation).

The Effect of Postirradiation Treatment with Iodoacetate upon the Survival of Stationary Phase Cultures

Experiment No.	Unirradiated Control Viable Cells /ml·10 ⁷	Irradiated Control Viable Cells /ml·10 ³	Irradiated Cells Treated with M/5000 Iodoacetate Viable Cells /ml·10 ³
(1)	46	24	58
(2)	135	60	100
(3)	48	25	112
(4)	50	32	40
(5)	34	560	870

5 ml aliquots of washed cell suspension from stationary phase aerated cultures were irradiated at 31–34°C for 30 s. To 4 ml of irradiated suspension was added 1 ml of either water or M/1000 Na Iodoacetate (pH 7.2) and centrifugation commenced immediately in precooled centrifuge heads, the temperature of which rose to ca. 35°C after 15 min spinning. The cells were washed once and plated in synthetic medium with M/250 glucose as carbon source.

Experiments with cells irradiated at 4°C and subsequently incubated at 37°C prior to washing and plating did reveal an influence of post-irradiation treatment with α -methyl glucoside upon the observed degree of survival. The figure illustrates the results of one such experiment. Incubation at 37°C led to a transient recovery of some of the irradiated cells as measured by the ability to give rise to a visible colony (curve A), and this recovery process was inhibited by the glucoside (curve B). Some variation of results was obtained in different experiments. However, of nine experiments the transient recovery was observed in six, and for four of them the probability that the variations in apparent number of survivors could be attributed to sampling errors was found to be less than 0.001 by the chi-square test. Further, inhibition of the recovery was observed in all but one of these six experiments.

The demonstration of this effect of the glucoside did not, however, shed any light on the question of whether the extent of survival could be increased by post-irradiation treatment. α -methyl glucoside has been shown to be an inhibitor of the metabolism by *E. coli* and other microorganisms of a number of carbohydrates, and there is strong evidence suggesting that the inhibition of glucose metabolism is competitive in nature¹. It was, therefore, decided to examine the effect of post-irradiation treatment with other inhibitors of carbohydrate metabolism. Arsenate (competitive) gave similar results to those obtained with α -methyl glucoside. On the other hand, post-irradiation treatment with M/5000 iodoacetate for approximately 15 min (the time required for centrifugation of the suspension) consistently resulted in a higher degree of survival than for control suspensions (Table).

Although the results presented here are preliminary in nature we believe them to be of importance in relation to hypotheses advanced to explain the action of ultraviolet light upon biological material. Our results do not warrant any detailed speculation, especially as the *h-m-5b* strain of *E. coli* is colicinogenic¹. However, as experiments now in progress with a strain of *Streptomyces*² indicate that postirradiation treatment with metabolic inhibitors can change the proportion of colonies exhibiting ultraviolet induced heritable variations of character either (i) without affecting the degree of survival or (ii) as some function of an effect upon the extent of survival, we believe that the results presented above can be most readily explained as the consequences of disturbances of the intracellular balance of metabolism.

Acknowledgment. It is a pleasure to record our indebtedness to Prof. F. J. RYAN for valuable criticism and encouragement. – This work was supported in part by an American Cancer Society grant recommended by the Committee on Growth of the National Research Council, and by a grant from the Division of Research Grants and Fellowships of the National Institutes of Health, U.S. Public Health Service.

S. D. WAINWRIGHT³
and J. MULLANEY

Department of Zoology, Columbia University, New York 27, N. Y., July 15, 1953.

Résumé

Le niveau apparent de survie des cellules d'*Escherichia coli* irradiées par rayonnement ultra-violet peut être modifié par «post irradiation» avec des inhibiteurs du métabolisme cellulaire.

¹ F. J. RYAN, personal communication.

² S. D. WAINWRIGHT and A. NEVILL, to be published.

³ Present address: Biology Division, Atomic Energy of Canada, Ltd., Chalk River, Ontario.

Incorporation *in vitro* de glycolle-I-¹⁴C dans les oocytes d'Astéries

On sait que de nombreuses recherches ont été effectuées, au moyen d'acides aminés marqués, dans le but de suivre la vitesse de synthèse ou de renouvellement des protéines; elles ont porté soit sur des homogénats d'organes (HULTIN¹) soit sur des embryons de Batraciens (BRACHET², FRIEDBERG et EAKIN³).

Il nous a semblé utile de suivre, par la méthode autoradiographique, le sort de l'acide aminé marqué au sein de cellules isolées en voie de croissance.

Nos observations ont porté sur des oocytes d'*Asterias rubens*, provenant de divers individus et se trouvant à des stades variables de la croissance.

Des lots d'une centaine d'oocytes, soigneusement lavés au préalable, ont été placés dans 5 cm³ d'eau de mer stérile, contenant 1 μ mole de glycolle, marqué sur le carbone du carboxyle.

Une première expérience, qui a porté sur des oocytes jeunes, avait pour but de vérifier si le glycolle pénètre effectivement dans la cellule. L'incubation, d'une durée de 5 h, a été suivie d'un lavage soigneux dans de l'eau de mer contenant du glycolle non marqué, puis, à deux reprises, dans de l'eau de mer stérile.

¹ T. HULTIN, Exp. Cell. Res. 1, 376 (1950).

² J. BRACHET (communication personnelle).

³ F. FRIEDBERG et R. M. EAKIN, J. exp. Zool. 110, 33 (1949).

¹ S. D. WAINWRIGHT, Biochim. Biophys. Acta 11, 157 (1953). – F. H. JOHNSON and R. S. ANDERSON, J. Cell. Comp. Phys. 12, 273 (1938). – J. LEIBOWITZ and S. HESTRIN, Biochem. J. 36, 772 (1942).

Les oocytes ont été fixés pendant 1 h dans un mélange de 3 parties d'alcool à 94° pour 1 partie d'acide acétique. Après lavage à l'alcool, les cellules ont été dispersées en frottis sur des lames gélatinées.

Une mesure au compteur de GEIGER-MÜLLER a montré que ces manipulations réduisent d'un tiers la radioactivité globale.

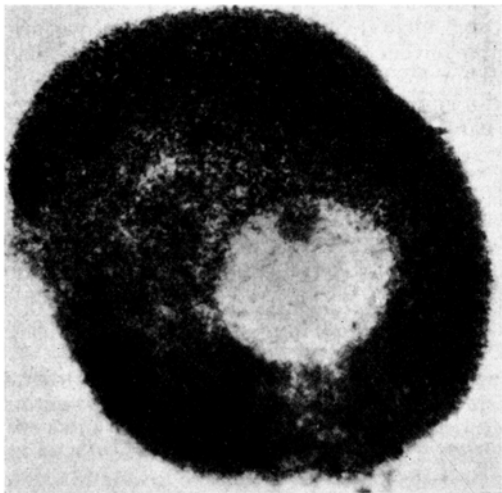


Fig. 1. Jeune oocyte ayant incorporé du glycocole-I-14C coloré à la pyronine: on observe un noircissement du film au niveau des régions basophiles.

Les frottis ont été ensuite recouverts de «stripping film» Kodak d'une épaisseur de 4 μ suivant la méthode de PELC et HOWARD¹. L'autoradiographie a été développée après un mois d'exposition en chambre noire et la radioactivité a été appréciée en suivant l'intensité du noircissement.

La totalité du cytoplasme présente un noircissement d'aspect homogène; dans la vésicule germinative, il est limité au nucléole.

Si l'on colore les oocytes par la méthode d'UNNA après le développement, on note une coïncidence frappante entre l'intensité de la basophilie et celle de la radioactivité. Les nucléoles présentent le même phénomène lorsqu'on travaille sur des vésicules germinatives isolées au lieu d'oocytes entiers.

La Figure 1 illustre ces observations; il faut tenir compte, cependant, du fait que la coloration rouge due à la pyronine tend à exagérer le contraste entre le cytoplasme et la vésicule germinative.

Dans une deuxième série d'expériences, les autoradiographies ont été effectuées sur des coupes histologiques des oocytes; les conditions d'incubation étaient les mêmes que précédemment, sauf que deux lots différents ont été soumis à des traitements de 1 h et de 12 h respectivement. Les oocytes, inclus dans de l'agar, ont été coupés à 10 μ d'épaisseur et recouverts, cette fois, d'émulsion nucléaire (G_5 in gel form. ILFORD). Après 5 jours d'exposition en chambre noire, les autoradiographies ont été développées suivant la méthode que nous avons exposée antérieurement², puis lavées soigneusement et colorées par la méthode d'UNNA (Fig. 2).

Les traces d'électrons ont été dénombrées et rapportées à la surface de tissu responsable de l'émission

des particules ionisantes. Le tableau ci-dessous donne une idée de la concentration en glycocole marqué dans les différentes régions de l'oocyte.

Tableau I

Durée d'incubation	Nombre de coupes observées	Nombre de trajectoires observées par mm ²		
		Cytoplasme	Vésicule germinat.	Nucléoles
1 h	225	120	100	6,300
12 h	150	318	256	6,000

Afin de distinguer la radioactivité due aux protéines de celle causée par les acides nucléiques (où le glycocole peut s'incorporer en tant que précurseur des purines), une série de préparations ont été hydrolysées dans une solution d'HCl N à 60°, pendant 5 min, puis lavées à l'eau distillée et recouvertes d'émulsion photographique: on sait, en effet, qu'une telle hydrolyse élimine quantitativement l'acide ribonucléique (VENDRELY³). Les coupes colorées par la méthode d'UNNA, témoignent, après ce traitement, d'une disparition totale de la basophilie. Cette hydrolyse fait décroître de 75% la radioactivité du cytoplasme, de 70% celle du nucléole et de 35% seulement, celle de la vésicule germinative. Il est vraisemblable, toutefois, que cette extraction enlève aussi une fraction minime des protéines.

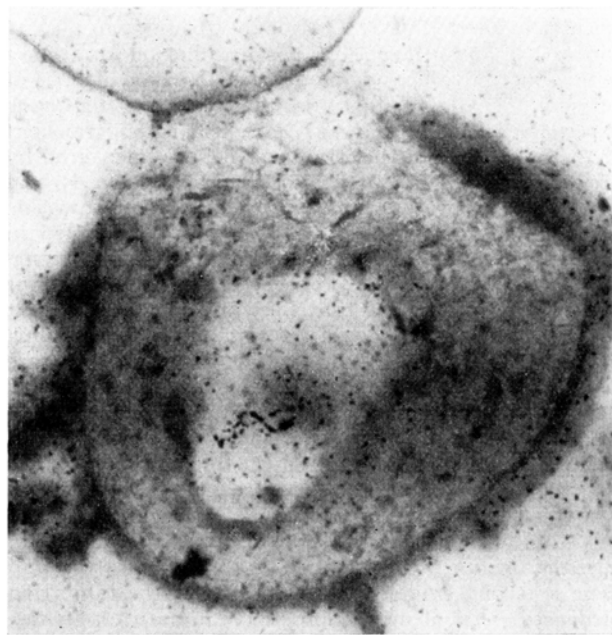


Fig. 2. Oocyte recouvert d'émulsion nucléaire montrant l'émission de deux électrons au niveau du nucléole.

En rapprochant ces données de celles de VINCENT² et de BALTUS³, qui estiment à 5% la teneur en A.R.N. du nucléole et à 10% celle des granules cytoplasmiques, nous avons pu évaluer de façon approximative la radio-

¹ S. R. PELC et A. HOWARD, Brit. med. Bull. 8, 132 (1952).
² A. FICQ, F. GAVOSTO et M. ERRERA, Exp. Cell. Res. (sous presse).

¹ R. VENDRELY et J. LIPARDY, C. r. Acad. Sci. 223, 342 (1946).
² W. VINCENT, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 38, 139 (1952).
³ E. BALTUS (communication personnelle).

Tableau II

	Radioactivité due aux acides nucléiques				Radioactivité due aux protéines			
	1 h d'incubation	12 h d'incubation	% A.R.N.	Radioactivité spécifique relative	1 h d'incubation	12 h d'incubation	Extinction	Radioactivité spécifique relative
Cytoplasme . . .	90	236	10	90	30	79	0,530	57
Vésicule germinative . . .	35	90	—	—	65	166	0,410	159
Nucléole	4400	4200	5	8800	1900	1800	0,325	5850

activité spécifique relative de l'acide nucléique dans le nucléole et le cytoplasme.

D'autre part, des mesures microspectrophotométriques de la concentration en protéines des différentes régions de la cellule ont été effectuées suivant la méthode de MAZIA¹ sur des oocytes ayant séjourné pendant 1 h dans une solution de glycolle marqué. Les extinctions relatives indiquées au Tableau II nous ont permis de calculer la radioactivité spécifique due aux protéines.

Il semble donc que, pour des durées brèves d'incubation, l'incorporation du glycolle soit considérablement plus rapide dans le nucléole que dans le cytoplasme, tant au niveau des protéines que des acides nucléiques; ce phénomène s'atténue dans le cas des incubations prolongées, pour lesquelles un état de régime semble s'établir.

Il est intéressant de constater que la méthode autoradiographique, tout en permettant de localiser cette activité dans le nucléole, confirme les résultats obtenus par l'analyse chimique de noyaux entiers isolés à partir d'organes traités *in vivo* par le ³²P (JEENER et SZAFARZ², BARNUM et HUSEBY³, MARSHAK⁴).

(M^{me}) A. FICQ

Laboratoire de morphologie animale, Université de Bruxelles, le 15 mai 1953.

Summary

An autoradiographic method, based on the observation of individual particles, was used to determine the relative specific radioactivity of RNA and of the proteins in the different parts of the oocytes of *Asterias rubens*.

The nucleolus incorporates glycine in both fractions about 100 times more rapidly than the cytoplasm.

¹ D. MAZIA, P. BREWER et M. ALFERT, Biol. Bull. 104, 57 (1953).
² R. JEENER et D. SZAFARZ, Arch. Biochem. 26, 54 (1950).
³ C. P. BARNUM et R. A. HUSEBY, Feder. Proc. 8, 182 (1949).
⁴ A. MARSHAK et F. CALVET, J. cell. comp. Physiol. 32, 381 (1948); 34, 451 (1949).

Über die Ausscheidung und Speicherung von radioaktiv indizierten Xylanschweifelsäureestern

II. Dauer der Speicherung, Kumulierung, Vergleich mit Heparin

Wie aus der 1. Mitteilung¹ hervorgeht, lässt sich die Ausscheidung und Speicherung von blutgerinnungshemmenden Polysaccharidschweifelsäureestern durch Indizierung mit S³⁵ ermitteln. Die Versuche ergaben eine mit steigendem Polymerisationsgrad zunehmende Speicherung, insbesondere in Leber, Niere und Milz.

¹ E. HUSEMANN, E. G. HOFFMANN, R. LÖTTERLE und M. WIEDERSHEIM, Exper. 8, 153 (1952).

Nach eingehender Ausarbeitung der Methode¹ wurden weitere Versuche unternommen zur Klärung folgender für die therapeutische Anwendbarkeit der Substanzen wichtigen Fragen: Wie lange verweilt die gespeicherte Substanz im Organismus? Findet bei mehrfacher Injektion eine Kumulierung statt? Nimmt Heparin als körpereigene Substanz eine Sonderstellung ein, oder verhält es sich wie ein Xylanester gleichen Schwefelgehaltes?

Zur Untersuchung der beiden ersten Fragen verwendeten wir einen Xylanschweifelsäureester mit einem η -Wert von 0,02 – das entspricht einem Polymerisationsgrad von 90² und 14,7 % S (XSI).

Zur Bestimmung der Verweildauer der gespeicherten Substanz wurden 2 Kaninchen 100 mg/kg von XSI in physiologischer Kochsalzlösung intravenös injiziert und der Gehalt der Organe an Schwefelsäureester durch Messung der Aktivität nach 48 h bzw. 3 Wochen ermittelt.

Tabelle I
Verweildauer von Xylanschweifelsäureester XSI in den Organen

Organ	Spezifische Aktivität nach		Anteil der verabfolgten Aktivität in %	
	48 h	3 Wochen	48 h	3 Wochen
Leber. .	0,51	0,69	3,72	6,3
Niere . .	2,14	1,78	4,29	2,7
Milz . .	0,755	0,58	0,08	0,08

Man sieht aus der Tabelle, dass der Gehalt an Xylanester in drei Wochen in den meisten Organen nur unwesentlich absinkt, in der Leber sogar deutlich ansteigt. Gespeicherte Substanz wird also äusserst langsam wieder abgegeben.

Tabelle II
Vergleich der Gehalte von Xylanschweifelsäureester nach 1-, 5- und 14maliger Injektion von 100 mg/kg

Organ	Spezifische Aktivität Zahl der Injektionen			Anteil der verabfolgten Aktivität in % Zahl der Injektionen		
	1	5	14	1	5	14
Leber. . . .	0,51	4,95	6,51	3,72	8,44	3,51
Niere	2,14	8,14	11,68	4,29	2,48	1,27
Milz	0,78	5,64	20,6	0,08	0,09	0,12

¹ E. G. HOFFMANN, E. HUSEMANN, R. LÖTTERLE, M. WIEDERSHEIM und W. HERTLEIN, Makromolekulare Chemie (im Druck).
² Nach osmotischen Messungen von B. PFANNMÜLLER liegt der K_m -Wert bei $3 \cdot 10^{-4}$. Die bei der 1. Mitteilung mit 6,2 berechneten Polymerisationsgrade sind also entsprechend umzurechnen.