

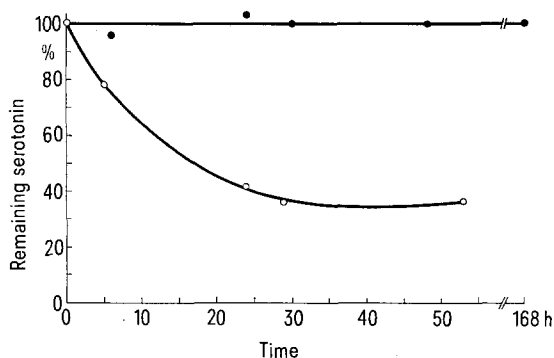
## A Simple Routine-Method to Preserve and Determine Blood Serotonin

Several methods for the quantitative fluorometric determination of serotonin in whole blood or platelets are described in the literature<sup>1-8</sup>. These methods are time-consuming (extractions with organic solvents or condensation reactions) and need too much blood, so there is still a need for a method that can be used in a routine laboratory without any difficulty<sup>9</sup>. Moreover, the instability of serotonin in stored blood complicates its assay. We describe here a rapid, sensitive and reproducible method for the determination of serotonin, as well as a medium in which the serotonin content of blood can be kept stable for at least 1 week. The small quantity of blood necessary for the determination (1 ml) allows its application to the blood of babies.

**Materials and methods.** In plastic tubes, 1 ml blood is added to 0.1 ml of a 3% solution of ascorbic acid in saturated EDTA Na<sub>2</sub> (15 g/100 ml)<sup>1</sup> and frozen in a mixture of dry ice and acetone. When not immediately used, the blood can be stored in this form for at least 7 days at -18°C. Just before determination of serotonin, the blood is unfrozen and 2.5 ml water is added.

From that time and during the whole procedure, the tubes are kept in ice. After 10 min, in order to ensure total hemolysis, 1 ml 10% ZnSO<sub>4</sub> and 0.5 ml 1 N NaOH are added to precipitate the proteins. After addition of each reagent, mixing is done either manually or with a Whirlimixer. The suspension is centrifuged in a refrigerated Sorvall RC2B centrifuge at 3000 g for 5 min. To 1 ml of the clear supernatant, 0.3 ml 12 N HCl (containing 5 mg ascorbic acid per 10 ml HCl)<sup>9,10</sup> is added. This is done just before measuring the fluorescence of the sample with an Aminco-Bowman spectrofluorometer at 540 nm after excitation at 295 nm (both uncorrected instrument values)<sup>11</sup>.

A stock solution of serotonin-creatinine sulfate in 0.1 N HCl (corresponding to 100 µg serotonin/ml) is diluted with 0.1 N HCl so as to obtain standard solutions containing resp. 500, 250 and 125 ng/ml, which are handled in the same way as the samples; 1 ml 0.1 N HCl is used as a blank. This should be done for every set of determinations. All reagents are stored at 4°C.



Stability test: ●, blood samples added to ascorbic-acid EDTA and cooled in dry ice-acetone. ○, blood samples added to Heparine (1,000 IU/ml) cooled in ice.

**Results and discussion.** The serotonin determinations made in our laboratory according to methods described in the literature gave very low values. Experiments showed that serotonin disappears by oxidation as a function of time, the oxidating agent being oxyhemoglobin<sup>12</sup>. The addition of ascorbic acid together with fast cooling in dry ice-acetone prevents this destruction.

The sensitivity and linearity of the method described here were tested with standards of serotonin-creatinine sulfate in the range 20–5000 ng, expressed as serotonin. When a given amount of serotonin is added to a blood sample, the recovery lies between 80 and 85%.

By this method we determined the blood serotonin concentration of 50 normal children aged between 6 months and 16 years. The blood serotonin levels were calculated from the fluorescence of the samples compared with the fluorescence of the standards. The mean total serotonin blood level was 189 ng/ml, with a range from 76 to 317 ng/ml (These values are not corrected for the 80–85% recovery of serotonin added to blood.) whole blood. These results are in agreement with those found by TU and PARTINGTON<sup>13</sup> and others.

Stability tests show (see Figure) that, for at least 7 days, there is no variation in the serotonin content if the sample is frozen immediately and kept at -18°C until determination.

**Résumé.** Une nouvelle méthode de routine pour le dosage par spectrophotofluorométrie de la sérotonine dans 1 ml de sang est décrite. Grâce à l'emploi d'un antioxydant et à une congélation immédiate, le taux de sérotonine reste constant pendant au moins une semaine.

F. GEERAERTS, L. SCHIMPFESSEL and R. CROKAERT

*Vrije Universiteit Brussel, Laboratorium voor Biochemie, Waterloolaan 115, B-1000 Brussels (Belgium), 29 November 1973.*

- G. W. ASHCROFT, T. B. B. CRAWFORD, J. K. BINNS and E. J. MACDOUGALL, *Clin. chim. Acta* 9, 364 (1964).
- M. L. DAS, *Biochem. Med.* 6, 299 (1972).
- T. P. WAALKES, *J. Lab. clin. Med.* 53, 824 (1959).
- A. YUWILER, S. PLOTKIN, E. GEUER and E. R. RITVO, *Biochem. Med.* 3, 426 (1970).
- F. ROSNER, B. H. ONG, R. S. PAINE and D. MAHANAND, *Lancet* 7, 1191 (1965).
- Y. CHAUVEL, Y. OLLIVIER, P. JOUAN and S. SAMPEREZ, *Annls Biol. clin.* 37, 231 (1973).
- M. DA PRADA, J. P. TRANZER and A. PLETSCHER, *Experientia* 28, 1328 (1972).
- H. WEISSBACH, T. P. WAALKES and S. UDEFRIEND, *J. biol. Chem.* 230, 865 (1958).
- C. DREUX, *Annls Biol. clin.* 37, 283 (1973).
- J. H. THOMPSON, C. A. SPEZIA and M. ANGULO, *Analyt. Biochem.* 37, 321 (1969).
- S. UNDERFRIEND, D. F. BOGDANSKI and H. WEISSBACH, *Science* 72, 972 (1955).
- J. J. BLUM and N. S. LING, *Biochem. J.* 73, 530 (1959).
- J. B. TU and M. W. PARTINGTON, *Cerebr. Palsy Bull.* 14, 457 (1972).

## Isolement de fragments nucléés et anucléés d'œufs de l'oursin *Sphaerechinus granularis*

De nombreuses expériences biologiques et biochimiques ont été faites sur des fragments nucléés et anucléés d'œufs d'oursin. Elles ont toutes été effectuées sur le même genre d'oursin, *Arbacia*; en effet, il est facile de couper en deux

moitiés les œufs vierges de cette espèce par centrifugation, comme l'a montré HARVEY dès 1936<sup>1</sup>. Il serait, évidemment, souhaitable d'étendre ces expériences à d'autres espèces, afin de savoir si on est en droit de généraliser les

conclusions qui en ont été tirées. En outre, l'œuf d'*Arbacia* est fortement pigmenté; au cours de la centrifugation, le pigment (échinochrome) s'accumule dans les moitiés lourdes, énucléées qui présentent une intense coloration rouge. Ce pigment est gênant pour certaines mesures biochimiques et il empêche l'observation précise, au microscope, des changements qui se produisent lorsque les fragments anucléés sont fécondés ou soumis à un traitement parthénogénétique.

Nous avons donc essayé de couper en deux moitiés (nucléée et anucléée) des œufs d'autres espèces d'oursin bu'*Arbacia*, en utilisant le principe découvert par HARVEY<sup>1</sup>. De nombreux essais sur des œufs de *Paracentrotus* se sont tous soldés par un échec. Par contre, des résultats satisfaisants ont été obtenus dans le cas de *Sphaerechinus granularis*, en utilisant la technique qui est décrite ci-dessous.

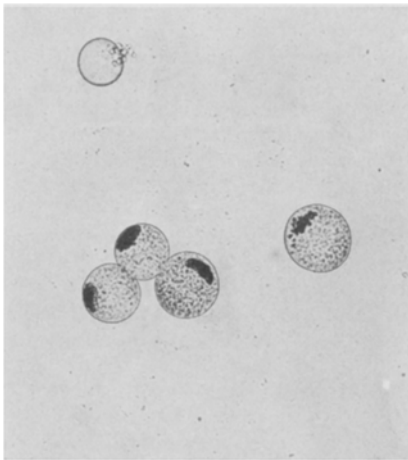


Fig. 1. Fragments nucléés d'œufs vierges de *Sphaerechinus granularis*. A noter, l'accumulation des graisses en une coiffe centripète.  $\times 100$ .

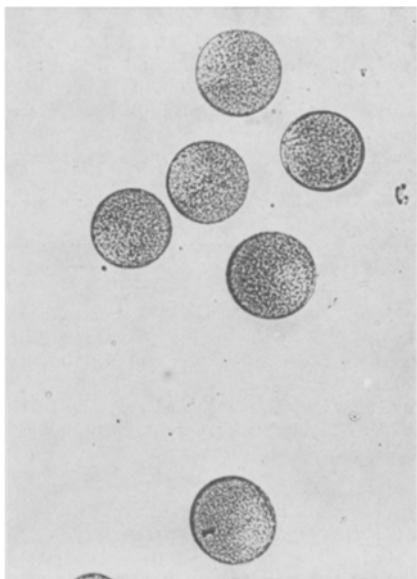


Fig. 2. Fragments anucléés d'œufs vierges de *Sphaerechinus granularis*. Ils sont plus volumineux et plus homogènes que les fragments nucléés.  $\times 100$ .

Les oursins provenaient de la Station zoologique de Naples et avaient été récoltés par plongée sous-marine. Les ovaires étaient disséqués et placés dans de l'eau de mer stérile, puis filtrés sur 4 épaisseurs de gaze. Les œufs vierges étaient ensuite lavés, à plusieurs reprises, par décantation dans de l'eau de mer additionnée de pénicilline (100.000 U/100 l) et de streptomycine (0.1 g/100 l). C'est cette eau de mer additionnée d'antibiotiques qui a été utilisée pour toutes les opérations ultérieures. Seules les pontes qui étaient fécondables avec une efficacité dépassant 85% ont été utilisées.

La technique utilisée pour séparer les fragments nucléés et anucléés est celle de SELVIG et al.<sup>2</sup> avec quelques modifications. Son principe est de déposer les œufs vierges sur un gradient de saccharose et de les centrifuger à 12.000 rpm pendant 20 min, dans le rotor SW 27 d'une ultracentrifugeuse Spinco.

Les gradients étaient préparés de la manière suivante: 3 ml de saccharose 0.72 M, 15 ml de saccharose 0.6 M, 15 ml de saccharose 0.514 M et 3 ml de saccharose 0.4 M étaient délicatement superposés. Les gradients étaient ensuite laissés pendant une nuit à 4°C (LANYON et al.<sup>3</sup>), afin de leur permettre d'atteindre leur équilibre. 2 ml d'une suspension concentrée d'œufs vierges lavés étaient disposés au dessus de chaque gradient, puis centrifugés dans les conditions indiquées ci-dessus.

Après centrifugation, les moitiés nucléées, plus légères, sont localisées dans la partie supérieure du gradient; leur faible densité est due à l'abondance des lipides, qui forment une coiffe à l'extrémité centripète de chaque fragment (Figure 1). Les moitiés nucléées sont recueillies à l'aide d'une seringue munie d'une grosse aiguille; afin de ne pas les briser, on les transfère ensuite délicatement dans un grand volume d'eau de mer.

Des œufs entiers se trouvent dans la portion centrale du gradient; ils sont éliminés par le même procédé. Quant aux moitiés anucléées, lourdes, elles se localisent à la partie inférieure du gradient, à environ 3 cm du fond du tube. Elles sont recueillies de la même manière que les fragments nucléés. Comme le montre la Figure 2, elles sont plus volumineuses et plus homogènes au microscope que ceux-ci.

Finalement, les deux types de fragments sont lavés 4 à 5 fois par décantation avec de l'eau de mer, de façon à éliminer complètement le saccharose. Le rendement en fragments nucléés et anucléés varie d'une ponte à l'autre; mais ce rendement est suffisant, à condition d'utiliser quelques oursins femelles, pour permettre des études enzymologiques qui sont actuellement en cours.

*Summary.* A method for the isolation of nucleate and anucleate fragments of *Sphaerechinus granularis* unfertilized eggs is described. It is based on centrifugation in a sucrose gradient; its yield is sufficient to allow enzymatic studies to be made.

J. AIMI

Laboratorio di Embriologia molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche,  
Arco Felice (Napoli, Italie),  
1 février 1974.

<sup>1</sup> E. B. HARVEY, Biol. Bull. mar. Biol., Woods Hole 77, 101 (1936).

<sup>2</sup> S. E. SELVIG, P. R. GROSS et A. L. HUNTER, Devel. Biol. 22, 343 (1970).

<sup>3</sup> W. G. LANYON, J. PAUL et R. WILLIAMSON, Eur. J. Biochem. 37, 38 (1972).