

Purification and recovery of AChE after affinity chromatography

AChE (units applied)	Protein (mg)	Specific activity	AChE (% bound)	AChE units recovered (%)	Protein recovered (mg)	Recovered specific activity
0,200 (4)	2.85	70	99.0	0,144 (72)	0.152	0,950
0,400 (2)	5.72	70	99.0	0,300 (75)	0.309	0,970
2,400 (1)	34.32	70	99.4	2,160 (90)	2.16	1,000
4,800 (1)	68.64	70	99.2	4,320 (90)	4.42	0,980

One unit is 1 mM ACh hydrolyzed/h. Numbers in parentheses under AChE units applied represent the No. of experiments. Specific AChE activity is expressed in mM ACh hydrolyzed/mg protein/h. Specific activity applied in each case was 70 mM ACh hydrolyzed/mg protein/h.

graphy shows a single protein band exhibiting AChE activity (Figure 2). Since the limit of detection of a protein in PAGE is 1 μ g or less¹⁵, the AChE obtained after affinity chromatography is more than 97% pure.

The effectiveness of the affinity gel is evidenced by the fact that the enzyme could not be eluted from the gel

with 500 ml of 600 mM NaCl at pH 8.0 but complete elution (99%) was effected with 3–4 bed volumes of 10 mM edrophonium chloride in 100 mM NaCl.

By using a 10 ml bed volume of affinity gel, we have obtained 4.5 mg of purified AChE in a single run. In agreement with previous studies¹⁷, the purified eel enzyme appears not to aggregate or dissociate as freely as purified brain AChE⁹. The M.W. of the enzyme as determined by gel filtration was 265,000, a value similar to that previously reported¹⁸. Two reports have since appeared^{5,6} in which affinity chromatography was used in a similar manner for AChE purification. Enzyme recovery averaged 63% in one case⁶ and 40% in the other⁶. In the present study, recovery ranged between 70 and 90% which may be due to our method of coupling the ligand to the agarose and/or the use of edrophonium as a more specific elutant¹⁹.

Résumé. Une méthode basée sur d'affinité chromatographique nous a permis de purifier complètement l'acétylcholinestérase des organes électriques du gymnote (*Electrophorus electricus*). L'activité spécifique de l'acétylcholinestérase ainsi établie en milligrammes dépasse 950 mM de substrat hydrolysé (acétylcholine)/mg protéine/h et sa pureté a été vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

S. L. CHAN, E. GARDNER and
A. J. TREVOR

Department of Pharmacology,
University of California, San Francisco
(California 94122, USA), 26 September 1972.

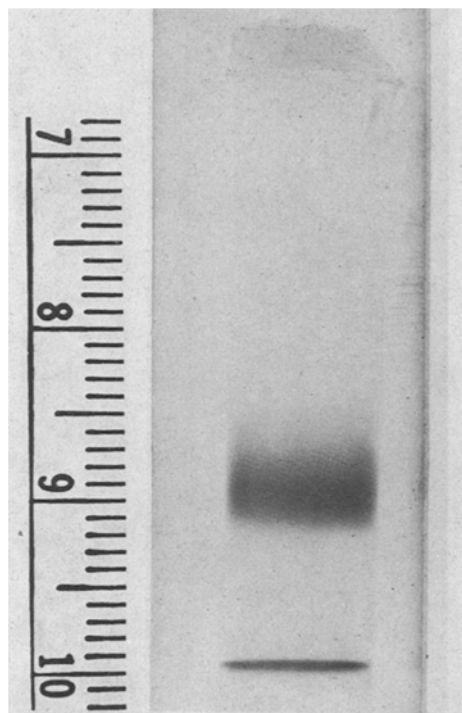


Fig. 2. Page of purified EE1 AChE. Sample contained 30 μ g of protein. Lower band shows the tracking dye, Bromthymol blue.

¹⁷ R. J. KITZ, *Molecular Pharmacology* (Ed. R. M. FEATHERSTONE; Marcel Dekker, N.Y. 1972), in press.

¹⁸ W. LEUZINGER, M. GOLDBERG and E. CAUVIN, *J. molec. Biol.* 40, 217 (1969).

¹⁹ This work was performed between January and March 1972.

A Technique for Improving Salivary Chromosome Preparations¹

Since the initial work of PAINTER² with the polytene chromosomes of *Drosophila*, the salivary-gland chromosome smear technique has been improved by many workers^{3–5}. A new modification of methods currently in use for the chromosomes makes it possible to prepare slides having better resolution and clear background. This method has been successfully employed in the studies of many genera in the family Drosophilidae⁶.

The major modifications of the usual procedures are:

1. Overstaining of the chromosomes (30 ~ 40 min in

lacto-acetic-orcein), and 2. Washing the chromosomes with lacto-acetic acid at least 3 times before squashing to remove excess stain and other dirt particles.

When the preparations are analyzed by phase contrast microscopy, the main advantages of this new method are especially evident. The overstaining (longer than usual) causes the bands to darken and the thinner (faint) bands to be stained, thus improving the fine detail of the bands (Figure 1). The 'washing technique' removes excess stain especially between light bands as well as in the neighbor-

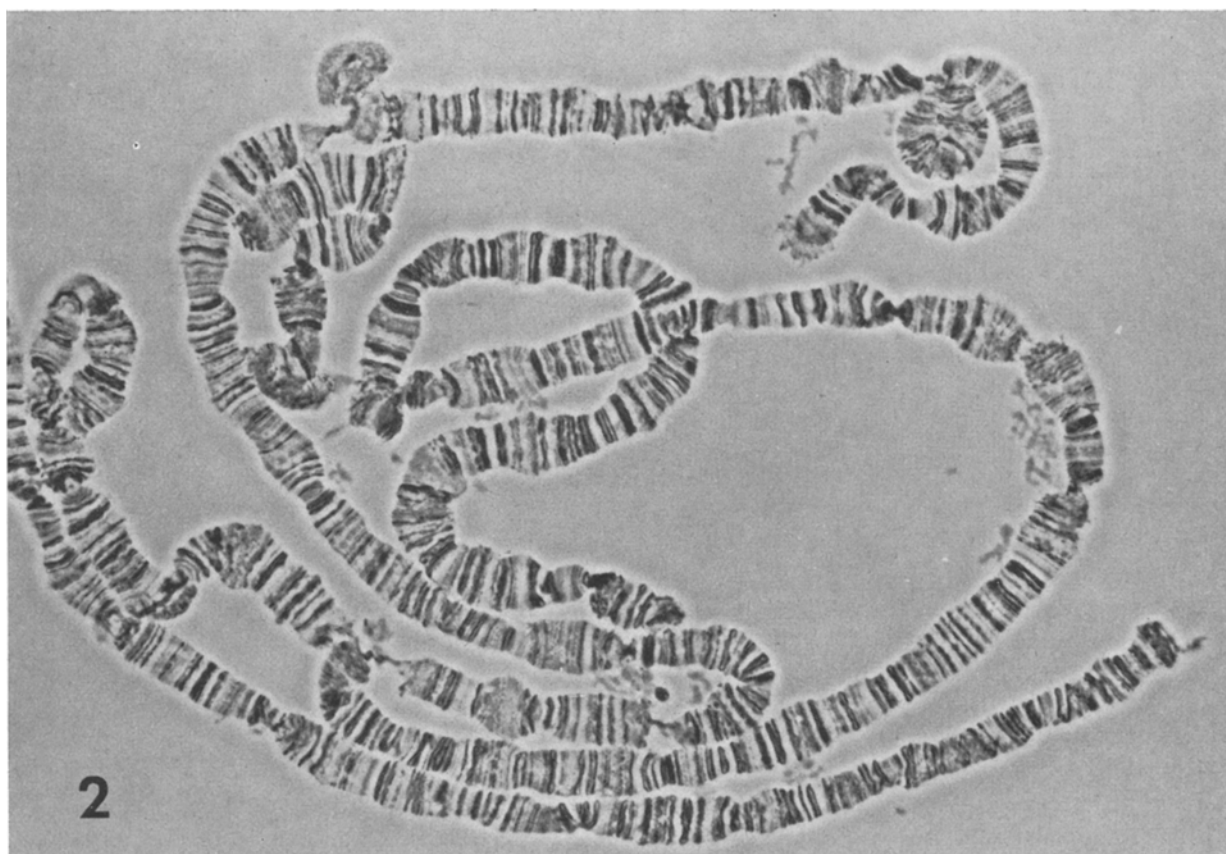


Fig. 1. A segment of a polytene chromosome of *Drosophila primaeva*. Notice the fine banding detail. $\times 1600$. Fig. 2. Chromosomes of *Drosophila hystricosa*. Notice the clear background and the general contrast produced by the 'washing technique'. $\times 700$.

hood of the chromosomes, thus providing a clear and even background (Figure 2). Consequently, this technique not only improves the fine banding detail and the contrast, but it is also a very useful methodology for new techniques of cytological analyses, such as by computer recognition of polytene chromosome banding patterns.

The procedure is as follows (for beginners): 1. Quickly dissect third instar larvae in physiological saline. 2. Put the salivary gland in 45% acetic acid for 5–7 sec. 3. Fix in 1N HCl for ~30 sec. 4. Stain in lacto-aceto-orcein for 30 ~ 40 min on a slide. 5. Warm (~35°C) the slide for 10 sec. 6. Transfer the excessively stained gland to lacto-acetic acid (1 part lactic acid and 1 part 60% acetic acid) on a siliconized slide. 7. Wash the gland at least 3 times in lacto-acetic acid, and mount it in lacto-acetic acid. 8. Cover with a siliconed cover slip and squash with thumb pressure. 9. Seal with nail polish for storage.

Preparation of lacto-aceto-orcein stain. A) 1 part saturated 'Gurr's orcein natural' (Esbe laboratory supplies, Toronto, Canada) in concentrated lactic acid. B) 1 part saturated Gurr's orcein natural in concentrated glacial acetic acid. C) 1 part distilled H₂O. Solutions A) and B) should be heated (not boiled) and filtered separately before combining. Add distilled water for a 1:1:1 ratio.

Zusammenfassung. Es wird eine verbesserte Methode zur Herstellung von Quetschpräparaten von Speicheldrüsenchromosomen beschrieben. Die Methode gibt scharfe Bilder der feinsten Chromosomenbänder auf klarem Hintergrund.

JONG SIK YOON, R. H. RICHARDSON and
M. R. WHEELER

*Department of Zoology, University of Texas,
Austin (Texas 78712 USA), 6 November 1972.*

¹ Research supported by U.S. Public Health Service Research Grants No. GM-11609 and GM-19616 from the National Institute of General Medical Sciences.

² T. S. PAINTER, *Science*, N.Y. 78, 585 (1933).

³ H. D. STALKER, *Drosoph. Inf. Serv.* 42, 119 (1967).

⁴ R. J. SCHUELLEIN, *Drosoph. Inf. Ser.* 34, 119 (1950).

⁵ B. NICOLETTI, *Drosoph. Inf. Serv.* 33, 181 (1959).

⁶ J. S. YOON, K. RESCH and M. R. WHEELER, *Genetics*, Princeton 71, 70 (1972).

Zur Bestimmung der Saccharaseaktivität in Bodenproben

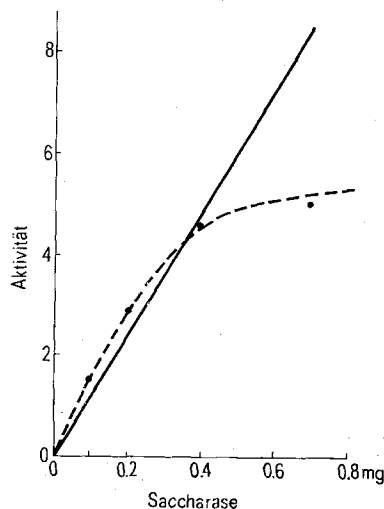
Zu den oft angewendeten Aktivitätsuntersuchungen von im Boden vorkommenden Enzymen gehört die Bestimmung der Saccharaseaktivität^{1,2}. Man misst dabei die Wirksamkeit des Enzyms unter Vermeidung einer natürlichen Mikroorganismenvermehrung in einem spezifischen Substrat, einer Saccharoselösung, durch Bestimmung der in einer Zeiteinheit anfallenden Reaktionsprodukte.

Die von den oben genannten Autoren beschriebene Methode wurde in einigen Einzelheiten, auf die dann im weiteren eingegangen werden soll, geändert. Im einzelnen wurde so verfahren, dass die zu untersuchende Probe, 2 g lufttrockener und auf 2 mm gesiebter Boden, bzw. eine

Saccharaselösung, in 10 ml Phosphatpuffer (pH 5,4) gegeben werden. Als Substrat wird 2 ml einer 20%igen Saccharoselösung hinzugefügt und anschliessend bei 37°C bebrütet. 1 h vor Ablauf der gewählten Inkubationszeit wird 10 ml aqua dest. zugegeben und die Probe weiter bei 37°C belassen. Zur Messung wird die Probe etwa 10 min bei 2500 g zentrifugiert und anschliessend filtriert. 10 ml dieses Filtrats werden zusammen mit 4 ml Fehlingscher Lösung und 5 ml aqua dest. zum Sieden gebracht. Nach dem Abkühlen werden 5 ml 15%iger H₂SO₄ und 3 ml 20%iges KJ zugegeben. Titriert wird mit einer Mikrobürette gegen 0,1 n Na₂S₂O₃ mit Stärke als Indikator.

Zunächst wurde die Saccharaseaktivität einer Bodenprobe einerseits in der Bodensuspension gemessen und zum anderen wurde die Suspension nach der Inkubationszeit zur Titration zentrifugiert und filtriert. Dabei zeigt sich, dass die Aktivität im Filtrat geringer ist als in der Suspension, da vermutlich ein Teil der Reaktionsprodukte an Bodenpartikeln adsorbiert werden. In beiden Fällen besteht jedoch eine lineare Abhängigkeit der Saccharaseaktivität von der Inkubationsdauer für den untersuchten Zeitraum vom 2 bis 24 h. Dies bedeutet auf der einen Seite eine methodische Verbesserung, denn die Titration ist im Filtrat erheblich genauer durchzuführen als in der Bodensuspension, auf der anderen Seite ist demnach auch eine Verkürzung der Inkubationszeit von den bisher üblichen 24 h auf 2 h möglich. Damit wird der Einfluss unerwünschter Effekte, wie z.B. die Neuproduktion von Enzym und die Verwertung von Reaktionsprodukten während der Inkubation durch in der Probe lebende Mikroorganismen weitgehend eingeschränkt.

Wird bei 2stündiger Inkubation die Bodeneinwaage, und damit die Enzymmenge variiert, so zeigt sich die zufordernde direkte Proportionalität zwischen gemessener Aktivität und Bodeneinwaage (Tabelle I).



Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Enzymmenge. ○—○, theoretische Aktivität des verwendeten Präparates; ○---○, gemessene Aktivität. Die Aktivität der Saccharase wurde in ml Na₂S₂O₃ gemessen.

¹ E. HOFMANN und A. SEEGERER, *Biochem. Z.* 322, 174, (1951).

² E. HOFMANN, *Z. Pfl. Ernähr. Düng. Bodenkd.* 56, 68 (1952).