

SZINAPTIKUS VEZIKULUMOK ÜVEGGYÖNGY KROMATOGRÁFIÁS TISZTÍTÁSA

NAGY ÁGNES

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ, Biokémiai Intézet

Bevezetés

A szaharózos ill. fikollos sűrűség grádienseken izolált szinaptikus vezikulumok különböző mértékben szennyezettek nagyobb mikroszómális vezikulumokkal, membrán töredékekkel, oldékony fehérjékkel és más komponensekkel (23, 7, 9, 13).

A kontrollált pórus méretű üvegyönggyel történő kromatográfia új lehetőséget nyújtott molekulák, vírusok, különböző sejt alkotórészek, sejt-szervecskék gyors, hatékony elválasztására és tisztítására 10^3 – 10^9 molekulasúlyú tartományban (5, 6, 17).

MORRIS egy 1971-ben megjelent rövid közleményben (14) beszámolt arról, hogy Torpedo elektromos szervéből izolált, acetilkolin és ATP tartalommal jellemzett szinaptikus vezikulumok elválaszthatók a kizárási térfogattal eltávozó acetilkolineszteráztól 2000 Å pórus méretű üvegyöngy segítségével. A két frakció között azonban jelentős átfedés volt.

Jelen munkánkban kimutattuk, hogy a közelmúltban kereskedelmi forgalomba került 3000 Å-ös üvegyönggyel sokkal nagyobb fokú tisztítást lehet elérni, nemcsak a viszonylag homogén állományú Torpedo szinaptikus vezikulumokkal, de a jóval „szennyezettebb” emlős agykéreg szinaptikus vezikulumokkal is.

Anyag és módszer

Speciális vegyszerek és reagensek; DTNB, tetraizopropil-pirofoszforamid, ATP (dinátrium só), liofilizált szentjánosbogár potroh kivonat (luciferáz enzim tartalmú), acetilkolin jodid, NADH (dinátrium só) a Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA; NADPH (tetranátrium só), kristályos ló szív citokrom c és a piroszőlősav (Na só) a Boehringer-Mannheim, Mannheim, NSZK; borjú szérum albumin és Dow polistírol latex gyöngy (481 nm átmérőjű) a SERVA, Heidelberg, NSZK; acetilkolin perklorát a BDH Chemicals, Ltd., Poole, Anglia; kontrollált pórus méretű üvegyöngy, CPG-10—3000 (3125 ± 150 Å valódi pórus méretű), 120—200 mesh, az Electro-Nucleonics, Inc., Clifton, N. J., USA cégektől származnak. A többi felhasznált vegyszer analitikai tisztaságú volt.

Szinaptikus vezikulumok izolálása. A teljes preparálás 0—4 °C-on, hideg-szobában történt. Tengeri malac cerebrális neocortex szinaptoszóma (P_2) frakció kinyerése és hipoozmotikus sokkal történő feltárása a már korábban WHITTAKER és mtsai által leírt módszerrel történt (24). A szinaptoszomális alkotórészek további szétválasztása folyamatos szaharóz grádiensen (0,2 M—0,8 M) zonal rotorban (Ti-14-es) történt (15). A szinaptikus vezikulum frakció helyének meghatározása az ACh tartalom alapján történt. A legnagyobb ACh tartalommal rendelkező frakciókat (ZVP) tisztítottuk tovább kromatográfiás úton. *Torpedo Marmorata* elektromos szervéből a vezikulumok izolálása a már leírt módszerek szerint történt (22).

Kontrollált pórus méretű üvegyöngy kromatográfia. A kromatográfiás oszlopot (1,2 cm × 100 cm) levegő mentesített vízzel nedvesített üvegyöngy-gyel töltöttük. Az üvegfelület adszorbeáló helyeinek blokkolását egy nagy molekulasúlyú polietilén-glikol, a Carbowax 20 M 1%-os oldatával végeztük (8). A kromatográfia 0—4 °C-on, 1 atm. pozitív N_2 nyomás alatt történt, 3 ml/perc folyási sebességgel. Az eluáló oldatokat (0,2 M szaharóz az emlős ill. 0,3 M-os szaharóz a *Torpedo* vezikulumok esetében) vákuum kezeléssel levegő-mentesítettük. Az oszlopról lejövő frakciókat Zeiss PMQ III-as spektrofotométeren 280 nm-nél átfolyós abszorpciós küvetta segítségével közvetlenül regisztráltuk.

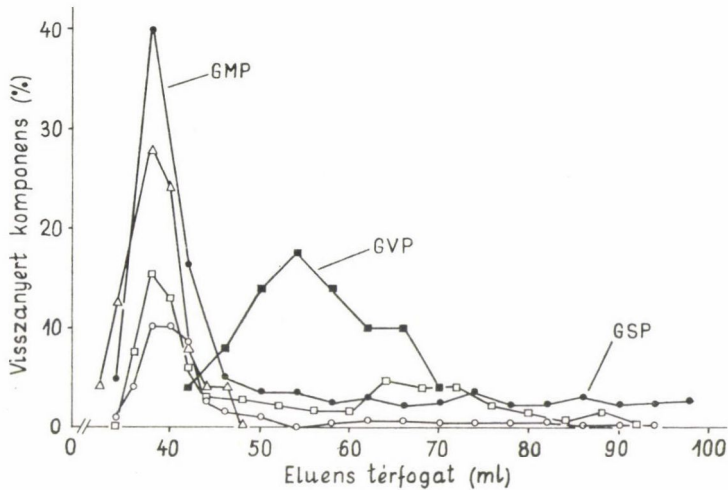
Oszlop kalibráció. A kalibráció a következő anyagok segítségével történt: kizárási térfogat, V_0 (38 ml): polistirol latex gyöngy (481 nm átmérőjű); belső hasznos térfogat, V_i (46 ml) brómfenolkék és hemoglobin (mol. súly: 6700); 4.3×10^5 dalton méretű részecskék eluciósi megjelenési helye: jack bean ureázzal.

Enzim mérések: A következő marker enzimeket mértük spektrofotometrián Bausch Lomb Automatikus enzim analizátor (Model: 400) segítségével: L-laktát: NAD oxidoreduktáz (lactate dehydrogenase EC 1.1.1.27)¹⁰, acetilkolin hidroláz (acetylcholinesterase, EC 3.1.1.7)², NADPH-citrokróm c oxidoreduktáz (NADPH: cytochrome c reductase, EC 1.6.2.3)¹⁶.

Egyéb analitikai mérések. Az ATP meghatározása a luciferin-luciferáz módszerrel történt (19). Az ACh mennyiségét biológiai teszttel, pióca dorzális izom segítségével határoztuk meg (20, 23). A fehérjemérést a LOWRY féle eljárás szerint végeztük (11).

Eredmények

Tengeri malac cortex szinaptikus vezikulumok tisztítása CPG kromatográfiával. Az első ábrán látható egy zonal sűrűség grádiensen elválasztott szinaptikus vezikulum frakció CPG-10—3000-es oszlopon történt kromatográfiájának az eredménye. A felvitt minta mennyisége 4,0 ml, a futtatás kb. 20 percig tartott.



1. ábra. Tengeri malac cortex szinaptikus vezikulumok tisztítása CPG kromatográfiával. A vezikulum frakció (ZVP) (4,0 ml térfogatú, 2,5 mg protein tartalmú) kromatográfálása egy $1,2 \times 100$ cm-es CPG-10-3000 120–200 mesh üveggöngy oszlopon történt. Az eluálási sebesség: 3 ml/perc. Az eluáló elegy 0,2 M szaharóz oldat volt. Az ábrán egy tipikus kromatográfiás kép látható, minden pont egyetlen mérésből származik. Egyéb mérési körülmények is a szövegben: Jelmagyarázat: ● protein; ■ ACh; ○ laktátdehidrogenáz; □ acetilkolinesteráz; Δ NADPH citokrom c redukáz aktivitás. Az értékek az összprotein mennyiség ill. az összenzimaktivitás %-ában kifejezett mennyiségek, GMP – nagy molekulásúlyú szennyeződések, GVP – vezikulumokat és GSP- az oldékony protein szennyeződések tartalmazó kromatográfiás csúcsok.

A fehérjék és a marker enzimek többsége a kizárási térfogatban jött le (GMP), amely a részecskékhez kötött ACh-nak kevesebb mint 30%-át tartalmazta. A szabad ACh-t az ebben a frakcióban igen magas koncentrációban jelenlevő acetilkolinesteráz enzim teljesen elbontotta. A második csúcs (GVP), amely a vezikulumszerű részecskéket tartalmazta, igen jól elvált az első (GMP), azaz nagyobb membrán szennyeződések és a harmadik (GSP), azaz főleg oldékony proteineket tartalmazó kromatográfiás csúcsoktól. Azok a mérések, amelyekkel meghatároztuk a plazma membrán ill. az endoplazmatikus retikulum töredékek jelenlétét, azt mutatták, hogy az említett szennyeződések igen kis mennyiségben vannak csak jelen a vezikulum frakcióban. A rendkívül alacsony tejsavdehidrogenáz szint az oldékony fehérje szennyeződés gyakorlatilag elhanyagolható mennyiségére utal a tisztított preparátumban. Az enzim, a fehérje és az acetilkolin visszanyerése 90–95% körüli volt.

A tisztítási eljárás menetét az 1. táblázat összegzi. Az enzim tisztítási sémák analógiájára az acetilkolin specifikus koncentrációját használtuk fel a preparátum tisztaságának fokmérőjeként. A tisztított emlős vezikulum ACh koncentrációja 14 nmol/mg fehérje, kb. 70-szerese volt a kiindulási anyag és 10-szerese a zonal sűrűség grádienssel tisztított preparátum ACh tartalmának. Az üveggöngy kromatográfiás úton nyert tiszta vezikulum frakció fehérje

1. táblázat

Tengeri malac cortex szinaptikus vezikulumok tisztítása

Frakció	Össz- térfogat (ml)	Fehérje koncentráció* (mg/ml)	Összmenyiség (nmol)	Hozam (%)	ACh* specifikus koncentráció (nmol/mg fehérje)	Tisztulás mértéke
Ws	47	8,1 ± 0,4	70,1 ± 25,1	—	0,19 ± 0,08	—
ZVP	30	0,2 ± 0,08	4,7 ± 2,2	6,9 ± 2,2	1,3 ± 0,6	7
GVP	60	8,2 ± 2,4**	3,6 ± 0,7	2,9 ± 0,7	13,9 ± 2,4	73

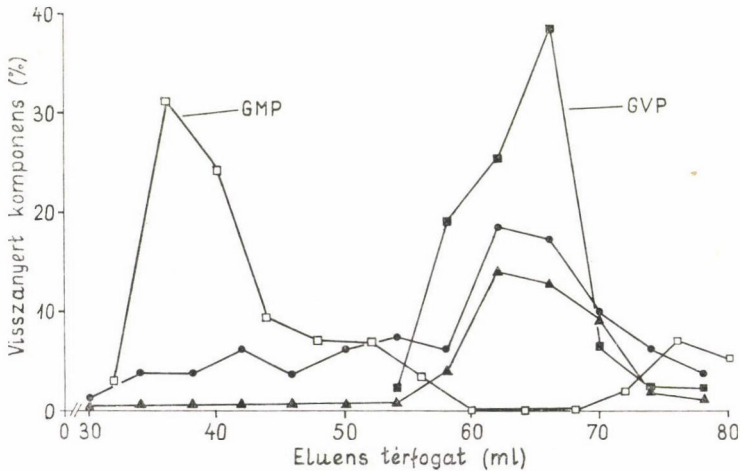
Az ACh meghatározása biológiai mérés (pióca háztizom) történt. Ws = ozmotikus sokkal kezelt nyers szinaptoszomális frakció felülúszója; ZVP = zonal sűrűség gradienssel elválasztott vezikulum frakció; GVP = üveggyöngy kromatográfiával tisztított vezikulum frakció.

* Az értékek 6 kísérlet átlagát jelentik ± σ

** Egységek: μg/ml

tartalma meglehetősen alacsony, 10 μg/ml volt. Az egész tisztítási eljárás egy napon elvégezhető.

Kolinerg szinaptikus vezikulumok tisztítása Torpedo Marmorata elektromos szervéből CPG kromatográfiával. A 2. ábra egy 4,0 ml-es Torpedo szinaptikus vezikulum mintával végzett CPG-10—3000-es kromatográfia elució képét mutatja be. Az egyes frakciók enzim analízise azt mutatta, hogy az acetilkolinesteráz aktivitás főleg az első, kizárási térfogattal lejövő csúcsban (GMP), valamint egy kevés az oldékony fehérje frakcióban (GSP) jelent meg, de teljesen hiányzott a középű, vezikulumokat tartalmazó (GVP) frakcióból. Ez a vezi-



2. ábra. *Torpedo Marmorata* elektromos szervéből izolált kolinerg szinaptikus vezikulumok tisztítása üveggyöngy kromatográfiával. A zonal sűrűség gradiensben kapott vezikulum frakció (VP) tisztítása (4,0 ml, 0,4 mg összprotein tartalmú) az 1. ábránál leírt üveggyöngy oszlopon történt, az előbbiekkal teljesen azonos kromatográfiai körülmények között. Eluáló elegy 0,3 M szaharóz oldat volt. Jelmagyarázat: ▲, ATP; az összes visszanyert ATP tartalom %-ban kifejezve. A többi jel megegyezik az 1. ábrán közöltekével.

2. táblázat

Kolinerg szinaptikus vezikulumok tisztítása *Torpedo marmorata* elektromos szervéből

Frakció	Össz- térfogat (ml)	Fehérje koncentráció* ($\mu\text{g/ml}$)	Összmenyiség (μmol)	Hozam (%)	ACh* specifikus koncentráció (nmol/mg fehérje)	Tisztulás mértéke
S ₁₂	56	6,9 \pm 0,4**	10,9 \pm 3,6	—	28,3 \pm 3,4	—
VP	60	95,0 \pm 19,2	1,4 \pm 0,2	12,8 \pm 5,1	286,7 \pm 83,7	10
GVP	60	7,7 \pm 2,3	0,33 \pm 0,03	3,0 \pm 1,2	788,7 \pm 113,6	28

S₁₂ = Fagyasztott elektromosszerv citoplazmatikus extraktuma; VP = zonal sűrűség grádiensen előállított vezikulum frakció; GVP = üvegyöngy kromatográfiás úton tisztított vezikulum frakció.

* Az értékek 4 kísérlet átlagát jelentik $\pm \sigma$

** Egységek: mg/ml

kulum csúcs, amelyet meglehetősen magas ACh és ATP tartalmával jellemezhetünk, igen jól elválasztható volt a membrán töredékektől is (GMP). 0,2 M-os, puffer mentes szaharózt alkalmazva eluáló oldatként, a protein és acetilkolin visszanyerés 90% felett volt. A tisztításnak ezen utolsó lépése után a vezikulum minták ACh specifikus koncentrációja kb. 30-szorosa a *Torpedo* elektromos szervből előállított extraktumának (S₁₂) és 3-szorosa a zonal sűrűség grádiensen hagyományosan tisztított prepatáriumokénak (2. táblázat). A végső kitermelés 3%-os volt. Az üvegyöngy kromatográfiás tisztítás során a vezikulum minták ATP tartalma ugyanekkor csak 1,5-szeresére nőtt. Az általunk meghatározott ATP tartalom az ún. vezikulumhoz kötött ATP mennyiségével volt azonos, amelyet az ATP hidrolizáló enzimek keveréke (burgonya apiráz és nyúl izom miokináz enzim 4 : 1 arányú elegye) nem tudott elbontani, partikulumhoz való kötöttsége miatt. Az ACh/ATP moláris arányban mutatkozó enyhe növekedés nem nevezhető szignifikánsnak (3. táblázat). Feltehetőleg az ATP-nek a tisztítási eljárás során mutatott nagyobb mértékű instabilitásából adódott.

3. táblázat

Torpedo elektromos szervéből tisztított kolinerg szinaptikus vezikulumok ATP tartalma

Frakció	Össz- térfogat (ml)	Fehérje konc.* ($\mu\text{g/ml}$)	Összmenyiség (nmol)	Hozam (%)	ATP* Specifikus konc. (nmol/mg fehérje)	ACh/ATP moláris arány
VP	60	65,7 \pm 11,8	5,5 \pm 3,0	—	93,0 \pm 16,3	3,1
GVP	60	9,5 \pm 3,1	1,5 \pm 0,6	27,3 \pm 8,4	152,8 \pm 54,1	5,2

Az ATP tartalom meghatározása a luciferin-luciferáz rendszer segítségével történt. A II. táblázatban közölt ACh adatokat használtuk fel az ACh/ATP moláris arány kiszámításához. VP = zonal sűrűség grádienssel előállított vezikulum frakció; GVP = üvegyöngy kromatográfiásan tisztított vezikulum frakció.

* Az értékek 4 kísérlet átlagai $\pm \sigma$

4. táblázat

Különböző szöveteredetű szinaptikus vezikulumok szennyezettségének jellemzése

Jelző enzim	Aktivitás (egység*/mg fehérje tartalom)			
	Tengeri malac cortex		Torpedo elektromos szerv	
	ZVP	GVP	VP	GVP
Laktát dehidrogenáz	752,0 ± 97,5	12,0 ± 1,3	0,8 ± 0,1	nem mérhető
NADPH citokróm c reductáz	8,4 ± 3,2	1,7 ± 0,1	4,4 ± 1,6	nem mérhető
Acetilkolineszteráz	162,0 ± 29,2	5,6 ± 0,1	49,6 ± 9,4	nem mérhető
ACh/NADPH citokróm c reductáz	0,2	8,2	65,2	> 1530

* Egység: nmol termék/perc

Citoplazmatikus és mikroszomális szennyeződések mértékének a jellemzése.

A 4. táblázat összefoglaló adatokkal jellemzi a zonal sűrűség gradiens centrifugális és az üvegyöngy kromatográfiás eljárások hatását a vezikulum preparátumok oldékony protein és mikroszomális szennyeződésének mértékére, a megfelelő marker enzimek felhasználásával. Az emlős agykéregből származó preparátumokból az oldékony fehérjét jelző tejsavdehidrogenáz és a kolinerg neuronok endoplazmatikus és plazma membránját jellemző acetilkolineszteráz enzim teljesen eltávolítható az üvegyöngy kromatográfia segítségével. Ezekben a frakciókban azonban a kiindulási mikroszóma marker enzim (NADPH citokróm c reductáz) aktivitásának kb. 20%-a jelen volt. A Torpedo mintákban mindezek a marker enzimek gyakorlatilag a kimutathatósági szint alatt voltak. A vezikulum ACh és a mikroszóma jelző NADPH citokróm c reductáz enzim aránya messze a legnagyobb a Torpedo preparátumokban, összehasonlítva akár a kiindulási Torpedo mintákkal, akár pedig bármelyik emlős agykéreg vezikulum preparátummal.

Megvitatás

A kontrollált pórus méretű üvegyöngy kromatográfiát több szerző sikeresen alkalmazta tisztított vírusok, fágok és különböző sejt organellumok gyors előállítására (5, 6, 3, 4). *Torpedo marmorata* szinaptikus vezikulumainak 2000 Å-ös üvegyöngyön történő kromatográfiája azt mutatta, hogy ezzel az eljárással talán ezek a rendkívül labilis kis képződmények is megtisztíthatók az eddig eltávolíthatatlannak látszó szennyeződésektől (14). Az általunk jelenleg alkalmazott eluáló eleggyel és 3000 Å-ös pórus méretű üvegyöngy alkalmazásával kapott frakciók tisztasága azonban messze felülmúlják az eddig közölt preparátumokét.

A Torpedo szinaptikus vezikulumok átlagos átmérője elektromikroszkópos felvételek alapján 840 Å-nak adódott (18). Ha az egyszerűség kedvéért az üvegyöngy pórusait kúposnak tételezzük fel, az adott pórus méretnek meg-

felelő nyílással, akkor egy 840 Å-ös vezikulum legalább félig be tud jutni a 2000 Å-ös, és kétharmadig a 3000 Å-ös csatornácskákba. A tényleges pórusméretet (1890 Å ill. 3235 Å) tekintetbe véve ez a különbség még csak nő. Mivel a valóságos vezikulum átmérő nagyobb az elektromikroszkóppal megállapítottánál a beágyazáskor jelentkező zsugorodási jelenségek ill. a natív állapotban meglévő hidrát burok jelenléte miatt — azt lehetne hinni, hogy a 3000 Å pórus méretű üvegyöngy nagyobb felbontó képessége az üvegyöngy fizikai saját-ságaiból ered. Azonban a kisebb méretű emlős vezikulumok (450—500 Å) (23) következetesen korábbi frakciókban jöttek le az elució során, mint a Torpedo vezikulumok. Ez az ellentmondás arra enged következtetni, hogy a Carbowaxszal történő kezelés ellenére a vezikulumok és az üvegyöngy felülete között enyhe kölcsönhatás léphet fel. Mivel az üvegfelület elég jelentős negatív töltéssel rendelkezik, érdekesnek látszik az a feltevés, hogy a Torpedo kolinerg vezikulum membránjai nagyobb pozitív töltéssel rendelkeznek, mint az emlős vezikulumok.

Az általunk előállított Torpedo vezikulum preparátum ACh/ATP moláris aránya megegyezik az irodalomban korábban leírtakéval (1), azonban mindkét vegyület specifikus koncentrációja lényegesen nagyobb a tiszta preparátumokban, mint a sűrűség grádiensen előállított mintákban. Az ACh/ATP arány növekedése magyarázható lenne a preparálás során az ATP tartalomban mutatkozó nagyobb mértékű csökkenéssel. Azonban más fajta stressz hatások (mint pl. az ozmotikus sokk, vagy a detergens hatás, stb.), elsősorban az ACh vesztéséget fokozzák (21). Ismeretes, hogy a Torpedo vezikulumok állománya igen heterogén mind méret, mind pedig ACh/ATP moláris arány tekintetében, elképzelhető, hogy ezen arány megváltoztatását a tiszta preparátumokban egy adott vezikulum típus feldúsulása okozza.

A tengeri malac cortexből származó vezikulum preparátum gyakorlatilag mentes a szokásos marker enzimekkel jellemezhető szennyeződésektől. Kis mennyiségű acetilkolineszteráz jelenléte összhangban van korábbi közleményekben közltekkel (12).

Az üvegyöngy kromatográfia alkalmas módszer lehet különböző transzmitter tartalmú vezikulumok szétválasztására is. Ezáltal olyan preparátumokhoz lehetne jutni, melyek alkalmasak lennének immunológiai módszerekkel történő azonosításra is és olyan kérdések eldöntésére, hogy egy adott transzmitter anyag vagy enzim teljes bizonyossággal hozzárendelhető-e egy adott vezikulum típushoz.

Összefoglalás

Kontrollált pórus méretű üvegyöngy oszlopon történő kromatográfiai eljárással (Controlled Pore Glass, CPG-10—3000) igen nagymértékben tisztított szinaptikus vezikulum frakciót sikerült előállítani. A kromatográfiahoz

CPG-10—3000 Å (3135 Å valódi pórus méretű) 120—200 mesh üvegyöngyöt alkalmaztunk. Az üvegfelületen történő adszorpció elkerülése végett az üvegyöngyöt 1%-os Carbowax 20M-el kezeltünk.

Torpedo marmorata elektromos szervéből és tengeri malac agykéregből zonal sűrűség grádiens módszerrel elválasztott vezikulumokat 0,3 M ill. 0,2 M-os levegőmentesített szaharóz oldattal eluáltuk az üvegyöngy oszlopról.

A specifikus transzmitter tartalom és a marker enzimek specifikus aktivitásai alapján kimutattuk, hogy a szinaptikus vezikulumok a különböző kis és nagy molekula súlyú szennyeződésektől igen jól elválaszthatók. A tisztított tengeri malac vezikulum kitermelése 0.15 mg/g cortex. Az enzim markerek mérése alapján a frakciók tisztasága jól reprodukálhatóan 95% körül mozgott.

IRODALOM

1. DOWDALL, M. J., BOYNE, A. F. and WHITTAKER, V. P.: *Biochem J.* **140**, 1 (1974).
2. ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V. and FEATHERSTONE, R. M.: *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 (1961).
3. GSCHWENDER, H. H. and HOFSCHEIDER, P. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **190**, 454 (1969).
4. GSCHWENDER, H. H., HALLER, W. and HOFSCHEIDER, P. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **190**, 460 (1969).
5. HALLER, W.: *Nature* **206**, 693 (1965).
6. HALLER, W.: *Virology* **33**, 740 (1967).
7. HARWOOD, J. L. and HAWTORNE, J. N.: *J. Neurochem.* **16**, 1377 (1969).
8. HIATT, C. W., SHELOKOV, A., ROSENTHAL, E. V. and GALLIMORE, J.: *J. Chromat.* **56**, 362 (1971).
9. ISRAËL, M., GAUTRON, J. and LESBATS, B.: *J. Neurochem.* **17**, 1441 (1970).
10. JOHNSON, M. K.: *Biochem. J.* **77**, 610 (1960).
11. LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
12. MORGAN, I. G., VINCENDON, G. and GOMBOS, G.: *Biochim. Biophys. Acta* **320**, 671 (1973).
13. MORGAN, I. G., WOLFE, L. S., MANDEL, P. and GOMBOS, G.: *Biochim. Biophys. Acta* **241**, 737 (1971).
14. MORRIS, S. J.: *J. Neurochem.* **21**, 713 (1973).
15. NAGY, Á., BAKER, R. R., MORRIS, S. J. and WHITTAKER, V. P.: *Brain Res.* **109**, 285 (1976).
16. OMURA, T. and TAKESUE, S.: *J. Biochem. (Tokyo)* **67**, 249 (1970).
17. ROBINSON, P. J., DUNNILL, P. and LILLY, M. D.: *Biochim. Biophys. Acta* **242**, 659 (1971).
18. SHERIDAN, M. N., WHITTAKER, V. P. and ISRAËL, M.: *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **74**, 291 (1966).
19. STANLEY, P. E. and WILLIAMS, S. G.: *Anal. Biochem.* **29**, 381 (1969).
20. SZERB, J. C.: *J. Physiol. (London)* **158**, 8 p (1962).
21. WHITTAKER, V. P. and DOWDALL, M. J.: In „La transmission cholinergique de l'excitation” Editions INSERM, Paris pp. 101—117 (1972).
22. WHITTAKER, V. P., ESSMAN, W. E. and DOWE, G. H. C.: *Biochem. J.* **128**, 833 (1972).
23. WHITTAKER, V. P., MICHAELSON, L. A. and KIRKLAND, R. J. A.: *Biochem. J.* **90**, 293 (1964).
24. WHITTAKER, V. P. and SHERIDAN, M. N.: *J. Neurochem.* **12**, 363 (1965).