

Mediums. Bis zu 100 belegte Zuchtdöschen werden in mehreren Lagen in durchsichtige Polystyrendosen (gleiches Format wie Dose B, unten) eingefüllt und bei 26°C (bis 29°C möglich) und Dauerlicht (zur Verhinderung der Diapause) inkubiert. Die Luftfeuchtigkeit in der Klimakammer spielt keine Rolle. Falls für bestimmte Versuche frisch gehäutete L_5 benötigt werden, ist eine gewisse Synchronisation dadurch erreichbar, dass die Zuchtdöschen, sobald die ersten L_4 kurz vor der Häutung stehen, 2–3 Tage lang auf 15°C gekühlt werden. Wenn diese Tiere auf 26°C zurückgebracht werden, häuten sich die meisten innerhalb eines halben Tages⁵.

Nach Ablauf von 14 Tagen (bei höherer Temperatur entsprechend früher) werden die Döschen geöffnet und in einfacher Lage in flache Polystyrendosen gelegt (140 × 75 × 35 mm; Art. Nr. 4554, Brac AG), die auf einer der Breitseiten ein Loch von ca. 10 mm Durchmesser aufweisen (Figur 1, Dose A). Die Luftfechtigkeiten in diesen Dosen wird relativ hoch, was wiederum ein stärkeres Austrocknen des Mediums verhindert.

Je 2 der Dosen A werden in eine durchsichtige Polystyrendose gelegt (190 × 90 × 80 mm; Art. Nr. 3871, Brac AG), die auf allen Seiten grosse, mit Organdi überspannte Lüftungsöffnungen besitzt (Figur 1, Dose B). In den freien Raum zwischen den Dosen A und Dose B werden 20 mm breite Streifen von Wellkarton gelegt. Die Verpuppungsdosen halten wir in einer Klimakammer von 26°C und 50% rel. Feuchtigkeit (R.H. bis 70% können toleriert werden).

Die verpuppungsbereiten Larven verhalten sich negativ hygrotaktisch und suchen trockene Verpuppungsnischen. Sie folgen daher dem abnehmenden Feuchtigkeitsgradienten durch das Loch in Dose A und verpuppen sich in den Wellkartonstreifen in Dose B.

Nachdem sich alle Larven in den Wellkartonstreifen eingesponnen und verpuppt haben, werden die Streifen in gut gelüftete Dosen gebracht oder sie werden geöffnet und die Puppen nach Geschlechtern getrennt in Joghurtbechern bei 26°C und 50–70% R.H. bis zum Schlüpfen der Falter aufbewahrt. Ein Hinauszögern des Schlüpftermins mittels tieferer Temperaturen lohnt sich in der Regel nicht, da die so behandelten Puppen oft Falter mit geringer Fertilität und Fekundität ergeben.

Die Zucht der Falter und die Eigewinnung erfolgt in Joghurtbechern, die innen mit 2 mm starkem Schaumstoff ausgekleidet sind. Der Schaumstoffbelag wird nicht angeklebt, damit er für die Reinigung leicht herausgenommen werden kann. Im Boden des Bechers befindet sich ein Loch von 15 mm Durchmesser, durch das ein Schaumstoffpfropfen (30 × 20 mm) eingezogen ist. Er dient den Faltern als Tränke und ragt in einen darunter geschachtelten zweiten Joghurtbecher, der ca. 10 mm

hoch mit Wasser gefüllt ist. Statt Wasser kann auch 10%ige Saccharoselösung mit 0,3% Sorbinsäure verwendet werden, was bei gewissen Stämmen von *L. pomonella* die Fekundität erhöht. Die obere Öffnung der Zuchtbecher wird mit einer Cellophanfolie verschlossen, die von einem Gummiband festgehalten wird (Figur 2). Durch die Schaumstoffauskleidung der Becher wird erreicht, dass praktisch alle Eier auf die glatte Cellophanfolie abgelegt werden, die je nach Bedarf gewechselt werden kann.

Je Zuchtbecher werden 1–2 Falterpaare angesetzt. Wir halten die Becher in einer Glashaushaltskabine bei 26–28°C, 80–90% R.H. und natürlicher Abenddämmerung. Hohe Luftfeuchtigkeit ist notwendig, damit die Eier auf der Cellophanfolie nicht austrocknen; hingegen ist Dämmung nicht notwendig für den Zuchterfolg².

Für die fortlaufenden Zuchten lassen wir die Eierfolien auf den Falterbechern, bis die ersten Embryonen das Schwarzkopfstadium erreicht haben. Falls hingegen genau datierte Eier benötigt werden, wechselt man die Folien täglich. Sie werden samt den Eiern in einer 10%igen Formalinlösung während 2–3 min desinfiziert, mit dest. Wasser gut gespült und hierauf soweit getrocknet, bis kein freies Wasser mehr sichtbar ist. Die nicht vollkommen trockenen Eierfolien werden dann locker in Polystyrendosen (Typ B) geschichtet und diese, zusammen mit einem Ballen nassen Filterpapiers, in Polyäthylensäcke eingeschlossen. Falls das Schlüpfen der Eiräupchen verzögert werden soll, werden die Eier bis zu 7 Tage bei 13°C aufbewahrt, sonst bei 26°C. Die geschlüpften Räupchen müssen täglich mindestens einmal abgelesen und auf Nährmedium angesetzt werden.

Nach der oben beschriebenen Methode wurden an unserem Institut bisher mehr als 30 fortlaufende Generationen von *L. pomonella* gezüchtet, wobei durchschnittliche Aufwuchsraten vom L_1 bis zur Puppe von 70–80% erreicht werden.

Summary. A method for the individual rearing of the codling moth *Laspeyresia pomonella* is described. The method allows the collection of exactly dated eggs and the rearing of a large number of larvae in a small space. By using the second medium described, it is possible to watch all developmental stages at any time without disturbing them. The average larval survival rate is 70–80%.

J. HUBER, G. BENZ und KÄTHE SCHMID

Entomologisches Institut, Eidg. Technische Hochschule Zürich, CH-8006 Zürich (Schweiz), 8. Juni 1972.

⁵ R. WÄGER, persönl. Mitteilung.

Properties of Hexokinase Bound to Glass

It has been shown previously¹ that hexokinase in solution is capable of effecting the phosphorylation of the D-glucose and D-fructose present in formose sugars. In order to operate continuously, it would be desirable to utilize the enzyme bound to an insoluble support. We present here some of our results with hexokinase bound to glass.

Previous reports^{2–4} have described the covalent attachment of several enzymes to porous glass. The procedure used here for hexokinase is as follows: Porous 96% silica

glass particles (Corning Glass Works, Corning, N.Y.), 40–60 mesh, pore diameter 55 ± 4.4 μ m, pore volume 1.4 ml/g, were cleaned in boiling 5% HNO₃ in an ultrasonic bath, washed with water and dried at 150°C. A silyl derivative was prepared⁵ by refluxing with 10% γ -aminopropyltriethoxysilane in toluene. The product was reacted with *p*-nitrobenzoyl chloride and the aryl nitro group was subsequently reduced⁶ to an amino group. Binding of yeast hexokinase (Gallard-Schlesinger Co., Long Island,

N.Y., Grade I) was accomplished by diazotizing the aryl amine glass⁷ and then adding 50 mg of enzyme per g of glass derivative in a pH 8.5 (0.1M) NaHCO_3 buffer and then holding the mixture at 0°C for 3 h. A protein determination by a modified LOWRY method⁸ as described by WELIKY⁹ revealed that 5.6 mg of protein was bound per gram of glass derivative.

The hexokinase activity of the glass bound enzyme was determined by a modified JOSHI and JAGANNATHAN procedure¹⁰. The glucose-6-phosphate (G-6-P) produced in the presence of hexokinase and saturating concentrations of glucose and adenosine triphosphate (ATP) was measured by the increase in absorbance at 340 nm due to the formation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced NADP⁺). A stock solution of reactants was prepared by mixing 3 ml of ATP (Na^+ , 0.03M) and 9 ml each of glucose (0.15M), MgCl_2 (0.2M), tris(hydroxymethyl)aminoethane buffer (0.2M, pH 8.0), ethylenediamine tetraacetic acid (disodium salt, 0.001M), NADP⁺ (0.0013M) and 42 ml of water.

The immobilized enzyme was usually assayed by the column technique^{3,4}. Approximately 125 mg (dry weight) of the material was placed in a 0.5 cm glass column and prior to each assay, was washed with water. G-6-P dehydrogenase (Boehringer Co., Mannheim, New York, N.Y., 4 μl , 1 mg/ml) was added to 6 ml of the stock solution and the mixture was passed through the column at a rate of 1 ml/min. The first 2 ml of eluate was discarded and the next 3 ml were collected in a spectrophotometer cuvette. From the increase in O.D. determined 15 min later at 340 nm, the amount of NADP⁺ utilized and therefore the amount of G-6-P which formed was calculated.

The glass bound hexokinase had an activity of 0.5 units per g of glass at 21°C (1 unit catalyzes the formation of 1 μm of G-6-P per min). This corresponds to a retention of 0.3% of the original activity. Assay by the column technique may not yield an accurate reflection of the total amount of active enzyme bound to the glass. In a batch analysis, 58 mg of immobilized hexokinase was stirred for 10 min with the reaction mixture, filtered rapidly and the O.D. of the filtrate determined as before. The activity was calculated to be 0.9 units per g of glass. We ascribe the difference to the greater rate of diffusion of reactants and products in the stirred mixture as compared with the column situation.

The Michaelis constant (K_m) for glucose was determined using glucose in concentrations from 8×10^{-5} to 4×10^{-4} M and was found to be 2.2×10^{-4} M. Soluble hexokinase from yeast was 1.0×10^{-4} M¹¹.

When the glass column containing immobilized enzyme was stored at 21°C and the activity determined periodically, about $\frac{1}{2}$ the activity remained after 1 month. A solution of hexokinase stabilized with albumen and maintained at 21°C lost $\frac{1}{2}$ its activity in 10 days. When the

glass bound enzyme was stored at 4°C, there was no detectable loss of activity in 1 month.

The optimum pH for the immobilized enzyme was 8. This was determined by adjusting the pH of the initial buffer to 5.8, 7.0, 8.0 and 9.0, omitting the dehydrogenase and passing the solutions through the column of bound hexokinase. To 3 ml of the eluate was immediately added 0.3 ml of buffer (0.3M, pH 8), and the dehydrogenase. It was found that the activity of the enzyme at pH 5.8, 7.0 and 9.0 was 46, 66, and 78%, respectively, of that observed at pH 8.0.

Hexokinase was not irreversibly attached to the porous glass. The first evidence that there was 'leakage' was the observation that the absorbance of the final mixture never reached a terminal stable value as was observed when a known amount of G-6-P was assayed, but rather increased at a slow rate for extended periods. To eliminate the possibility that this was due to fine particles of the glass-enzyme complex, the eluate was both filtered and centrifuged, with no effect.

An experiment designed to quantify the amount of enzymatic activity eluted from a column at different pHs was performed. Mixtures of MgCl_2 (0.6 ml, 0.2M), EDTA (0.6 ml, 0.001M), ATP (3.6 ml, 0.166M) and NADP⁺ (0.6 ml, 0.0013M) were adjusted to pH 6.2, 7.0 and 7.8 with NaOH and made up to a total volume of 6.0 ml with water. After passing these solutions through a freshly prepared column at a rate of 1 ml/min, 4.8 ml of the eluate was combined with 0.6 ml of buffer (pH 8.0, 0.3M), the dehydrogenase added, the reaction started by the addition of glucose (0.3 ml, 0.15M) and the increase in O.D. determined periodically for 1 h. The rate of change in O.D. was used to calculate the units of enzyme in the eluate. It was found that 0.25, 0.30 and 0.37% of the activity on the column was found per ml of eluate at pH 6.2, 7.0 and 7.8, respectively. The pH dependence which parallels the solubility properties of glass suggests the possibility that the surface layer of the glass is being dissolved¹².

Résumé. De l'hexokinase soluble a été liée et rendue insoluble par réaction avec une amine aryle dérivée du verre poreux. L'enzyme garde sa fonction, mais avec une activité moindre et une constante de Michaelis différente. L'usage prolongé d'une colonne où l'enzyme est enrobée dans du verre montre que l'enzyme se sépare lentement du verre poreux.

J. SHAPIRA, J. LECOCQ¹³, A. FURST¹³ and H. H. WEETALL¹⁴

Ames Research Center, NASA, Environmental Control Research Branch, Moffett Field (California 94035, USA), and University of San Francisco, San Francisco (California 94117, USA), and Corning Glass Works, Corning (New York 14830, USA), 4 April 1972.

¹ L. TIDWELL, J. LECOCQ, H. B. CHERMSIDE and J. SHAPIRA, *Proc. west. Pharmac. Soc.* 73, 30 (1970).

² H. H. WEETALL and L. S. HERSH, *Biochim. biophys. Acta* 185, 464 (1969).

³ H. H. WEETALL, *Nature, Lond.* 223, 959 (1969).

⁴ H. H. WEETALL, *Science* 166, 615 (1969).

⁵ R. A. MESSING, P. F. WEISZ and G. BAUM, *J. biomed. Material Res.* 3, 425 (1969).

⁶ N. WELIKY and H. H. WEETALL, *Immunochemistry* 2, 293 (1965).

⁷ D. H. CAMPBELL, E. LUESCHER and L. S. LERMAN, *Proc. natn. Acad. Sci., USA* 37, 575 (1951).

⁸ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).

⁹ N. WELIKY, F. S. BROWN and E. C. DALE, *Archs Biochem. Biophys.* 137, 1 (1969).

¹⁰ M. D. JOSHI and V. JAGANNATHAN, in *Methods in Enzymology* (Eds. S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN; Academic Press, New York 1966), vol. 9, p. 371.

¹¹ *Biochemists' Handbook* (Ed. C. LONG; Van Nostrand Co. Inc., Princeton, New Jersey 1961), p. 402.

¹² This work was partially supported by grant No. NGR-50-029-005 from the NASA and was conducted at the Ames Research Center. We would like to thank Mr. CARL HANSON for his help in the work.

¹³ University of San Francisco, San Francisco (California 94117, USA).

¹⁴ Corning Glass Works, Corning (New York 14830, USA).