nem sog. „Brückenfaden“ entlang läuft und dabei immer wieder neue Fäden auf die bereits vorhandenen auflegt und sie in gewissen Abständen daran befestigt. Es mag sein, daß man bei der Analyse der submikroskopischen Struktur fibrilläre Untereinheiten an Spinnfäden entdecken wird, obwohl diese un-

ter dem gewöhnlichen Lichtmikroskop homogen erscheinen. Aber es ist sicher falsch, so etwas anzunehmen wie der alte Réaumur, der z. B. meinte, die Kokonfäden setzten sich aus 18 Einzelfäden zusammen, weil sie achtzehnmal so dick seien wie Netzfäden.

Vergleichende chemische Untersuchungen über die Fibroine von *Bombyx mori* und *Nephila madagascariensis*

VON GERHARD BRAUNITZER UND DIETER WOLFF

Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung (Biochemische Abteilung)
und dem Zoophysologischen Institut der Universität, Tübingen

(Z. Naturforschg. 10 b, 404—408 [1955]; eingegangen am 4. Juli 1955)

Die Aminosäure-Zusammensetzung der Fibroine von *Nephila madagascariensis* und *Bombyx mori* wurde vergleichend untersucht. Weiterhin wurden bei beiden Fibroinen die Endgruppen nach der Dinitrophenyl-Methode bestimmt. Beim *Bombyx*-Fibroin ergibt sich im festen Faden und nach Lösung in LiJ-Lösung ein durchschnittliches Mol.-Gew. von max. 200 000—300 000. In Cupriäthylendiamin-Lösung findet ein Abbau zu einem Mol.-Gew. von etwa 60 000 statt. Beim Faden aus *Nephila*-Fibroin, bei dem keine Entbastung notwendig ist, ergibt sich ebenfalls ein durchschnittliches Mol.-Gew. von max. 200 000—300 000. In der Spinndrüse hat das Fibroin jedoch ein Mol.-Gew. von nur 30 000. Es wird daher angenommen, daß beim Ausscheiden des Fadens neue Peptidbindungen geknüpft werden. Die Fibroine von *Nephila* und *Bombyx* sind hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung und des Mol.-Gew. sowie auf dem elektronenmikroskopischen Bild einander sehr ähnlich.

Die vorliegende Arbeit steht in Zusammenhang mit den funktions-anatomischen Untersuchungen von Peters am Spinn-Apparat der Webespinnen¹. Sie will einen ersten Beitrag über die biochemischen Grundlagen der Bildung von Spinnfäden geben. Durch Vergleich der Spinnen-Seide mit dem *Bombyx*-Fibroin möchte sie die Behandlung der Frage von vornherein auf eine breitere Grundlage stellen.

Der Seidenspinner, *Bombyx mori*, bildet zwei Proteine in derselben Spinndrüse: im hinteren Teil der langen, paarigen Drüsenschläuche wird das Fibroin sezerniert, im mittleren Teil das Sericin. Nach Erreichung des Reifestadiums wird durch Kontraktion der hinteren Partien das Fibroin in das Sericin eingepreßt, das Tier produziert beim Einspinnen in den Kokon einen Doppelfaden aus Fibroin, der von der Kittsubstanz aus Sericin umhüllt und zusammengehalten wird. Um das saubere Fibroin zu erhalten, muß durch das Verfahren der Entbastung das Sericin entfernt werden.

Bei den Spinnen liegen die Verhältnisse völlig anders. Dort sind eine große Anzahl verschiedener

Spinndrüsen mit getrennten Ausführgängen vorhanden, welche unterschiedliche Fadensorten liefern¹. Nach seinem Verhalten gegenüber Picrocarminlösung (Merck) zu urteilen, ist das Kokongespinnst chemisch nicht einheitlich, die Fäden selbst färben sich bräunlich, die Kittstellen rot (vgl. Abb. 2 und 3 bei Peters). Während erstere aus Fibroin bestehen, dürften letztere aus einer sericin-ähnlichen Kittsubstanz bestehen. Wegen ihrer Uneinheitlichkeit sind die Kokonfäden zur Analyse wenig geeignet. In gewissen anderen Spinnfäden hat man aber reines Fibroin vor sich. Es ist dies das von den *Glandulae ampullaceae* gelieferte Sekret. Diese Fäden braucht die Spinne zur Herstellung ihres Fangnetzes, wobei sie nur für die sogenannten Klebfäden andere Sekrete verwendet. Da die Spinne die oben genannte Fadensorte auch als „Sicherheitsfaden“ ausscheidet, wenn sie umherwandert, kann man dieses Material leicht in genügender Menge gewinnen. Es läßt sich nämlich künstlich aus den Spinnwarzen herausziehen („abspulen“).

Dieses Spinnenfibroin ist für chemische Untersuchungen ein sehr geeignetes Ausgangsmaterial, da hier keine Entbastung notwendig ist. Beim Seiden-

¹ H. M. Peters, Z. Naturforschg. 10 b, 395 [1955].

Abb. 1. Fibroin von *Bombyx mori* in LiJ-Lösung gelöst und dialysiert, bedampft mit Pt-Rh, Vergrößerung 1 : 60 000.

Abb. 2. Fibroin von *Nephila madagascariensis*, Präparation wie bei Abb. 1. Vergrößerung 1 : 60 000.

G. Gerber, Vermehrungsweise beim A-Organismus aus der Pleuropneumonie-Gruppe (S. 382)

Abb. 2. Elektronenmikroskopische Abbildung von A-Organismen in Zuckerlösung. Fixierung: Osmiumsäure.

Fibroin	Relative Molzahlen bezogen auf Gly = 100							Autor
	Gly	Ala	Ser	Val + Leu	Glu + Asp	Threo	Pro	
<i>Bombyx mori</i>	100	57,5	26,5	6,5	4,4	2,3	1,1	Tristam ⁷
<i>Bombyx mori</i>	100	62	22,5	5	3,3	1,7	0,7	Br. u. W.
<i>Nephila</i>	100	80	8,75	10	8,75	2	2,5	Br. u. W.

Tab. 1. Aminosäuren-Zusammensetzung verschiedener Fibroine.

fibroin bringt dieses Verfahren eine beträchtliche Unsicherheit mit sich, da bei energischem Vorgehen ein Abbau erfolgen kann, bei unvollständiger Entbastung dagegen ein Teil des Sericins beim Fibroin verbleibt^{2, 3, 4}.

Wir benützten für unsere Experimente das Fibroin von *Nephila madagascariensis*, das bereits im Jahre 1907 von Fischer⁵ einer qualitativen Analyse unterworfen wurde. Durch Papierchromatographie sollten zunächst die in beiden Fibroinen vorkommenden Aminosäuren qualitativ und die wichtigsten auch quantitativ bestimmt werden. Weiterhin sollten durch eine vergleichende Bestimmung der Endgruppen die Art der endständigen Aminosäuren und die Mol.-Gew. ermittelt werden.

Die qualitative Untersuchung durch zweidimensionale Papierchromatographie ergab, daß die Fibroine hinsichtlich ihrer Zusammensetzung sehr ähnlich sind. Beide enthalten Glykokoll und Alanin als Hauptkomponenten, ferner Tyrosin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Prolin, Phenylalanin, Valin, Lysin, Arginin, Histidin, Glutamin- und Asparaginsäure. Einige Aminosäuren wurden auch quantitativ bestimmt. Hierzu werden sie nach der Hydrolyse in die Dinitrophenyl- (DNP-) Derivate übergeführt, in Anlehnung an das von Levy⁶ angegebene Verfahren durch zweidimensionale Papierchromatographie getrennt und ihre Extinktion im Beckman-Spektralphotometer gemessen.

Um die Ergebnisse übersichtlich darzustellen, sind in Tab. 1 die Molzahlen der einzelnen Aminosäuren relativ zur Menge des Glykokolls angegeben. Glykokoll wurde willkürlich gleich 100 gesetzt. Man er-

kennt zunächst, daß die von uns mit der DNP-Methode durchgeführte Analyse des *Bombyx*-Fibroins recht gut mit den in der Literatur⁷ angegebenen Werten übereinstimmt. Das *Nephila*-Fibroin unterscheidet sich nur wenig vom *Bombyx*-Fibroin. Es besitzt einen höheren Alanin- und einen niedrigeren Seringehalt. Weiterhin scheint auch der Gehalt an sauren Aminosäuren etwas höher zu sein als bei *Bombyx*. Nach Abschluß unserer Versuche wurde uns eine von Lucas, Shaw und Smith⁸ durchgeführte Analyse des Fibroins von *Nephila* bekannt, die mit unseren Werten recht gut übereinstimmt. Das Sericin aus *Bombyx* enthält nach einer orientierenden Analyse sehr viel Serin, daneben aber auch eine große Menge saurer Aminosäuren. Es ist daher unwahrscheinlich, daß der höhere Seringehalt des *Bombyx*-Fibroins allein auf einer Verunreinigung mit Sericin beruht, da sonst beim *Bombyx*-Fibroin auch der Gehalt an Glutamin- und Asparaginsäure erhöht sein müßte, was nicht der Fall ist. Das Gemeinsame bei den beiden Fibroinen ist das Vorherrschen der Aminosäuren mit kurzer Seitenkette. Nach Pauling ist die geringe Raum-Beanspruchung der Seitenkette die Vorbedingung für das Zustandekommen der typischen β -Struktur der Peptidkette, die wiederum die charakteristischen mechanischen Eigenschaften der Fibroine zur Folge hat.

Die Bestimmung des Mol.-Gew. stößt bei den Fibroinen auf Schwierigkeiten, da bei der Entbastung und Überführung in den löslichen Zustand ein Abbau erfolgen kann. Die günstigen Verhältnisse bei dem *Nephila*-Fibroin sowie die Verbesserung der Methodik der Endgruppenbestimmung ließen es angezeigt erscheinen, gerade dieser Frage etwas genauer nachzugehen.

² R. Signer u. R. Strässle, Helv. chim. Acta XXX, 155 [1947].

³ R. Signer u. R. Glanzmann, Makromol. Chemie 5, 257 [1951].

⁴ R. Glanzmann u. R. Signer, Makromol. Chemie 6, 134 [1952].

⁵ E. Fischer, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 53, 126 [1907].

⁶ A. L. Levy, Nature [London] 174, 126 [1954].

⁷ C. R. Tristam, Advances in Protein Chemistry 5, 83 [1949].

⁸ F. Lucas, J. T. B. Shaw u. S. G. Smith, Shirley Institute Memoirs XXVIII, 77 [1955].

Material	Behandlung	Serin	Glu + Asp	Ala	Gly	Threo	Gesamt
<i>Bombyx mori</i> -Fibroin	Faden	0,233 0,211	0,059 0,073	0,024 0,027	0,020 0,035	0,017 —	0,353 0,346
<i>Bombyx mori</i> -Fibroin	1 d in LiJ-Lösung	0,291	0,043	0,037	0,055	0,014	0,440
<i>Bombyx mori</i> -Fibroin	10 d in LiJ-Lösung	0,204 0,118	0,026 0,042	— —	— —	— —	0,230 0,160
<i>Bombyx mori</i> -Fibroin	in Kupfer (II)-äthylendiamin fest	0,289	0,044	0,605	0,543	0,022	1,5
<i>Bombyx</i> -Sericin		0,427	0,07	—	0,08	0,029	0,61
<i>Nephila</i> -Fibroin	Faden	0,06	0,088	0,098	0,013	—	0,26
<i>Nephila</i> -Fibroin	Drüseninhalt	0,199 0,30	0,044 0,046	2,67 2,97	0,023 0,041	— 0,041	2,9 3,4

Tab. 2. Amino-Endgruppen verschiedener Fibroine in μMol je 100 mg DNP-Protein.

Bergmann und Niemann⁹ schlossen aus der Aminosäure-Zusammensetzung, insbesondere dem Gehalt an Histidin auf ein Mol.-Gew. des Seidenfibroins von 217 000. Coleman und Howitt¹⁰ führten osmotische Messungen an einer Seide durch, die zunächst in Cupri-äthylendiamin gelöst und dann gegen Wasser dialysiert worden war. Sie fanden ein Mol.-Gew. von etwa 30 000. Zahn¹¹ berichtet über Versuche zur Endgruppenbestimmung bei Seidenfibroin. Er fand einen Endgruppengehalt von 0,10—0,14%, was einem Mol.-Gew. von 80 000 bis 100 000 entsprechen würde. Als Endgruppen wurden Glykokoll und Alanin gefunden. Signer² führte Viskositätsmessungen in LiSCN-Lösung durch. Es ergab sich für das Molekül die Form eines Rotationsellipsoids mit den beiden Halbachsen von 460 und 6 Å, was einem Mol.-Gew. von 50 000 entsprechen würde. Allerdings sind die theoretischen Grundlagen der Berechnung recht unsicher.

Für die Endgruppenbestimmung benützten wir das von Sanger¹² angegebene Dinitrophenyl-Verfahren, bei dem die endständigen Aminosäuren mit Dinitrofluorbenzol umgesetzt werden und nach anschließender Hydrolyse die Menge an α -DNP-Aminosäuren quantitativ auf spektroskopischem Wege gemessen wird.

Wir untersuchten zunächst das Seidenfibroin, und zwar sowohl in Form von entbasteten Fäden als auch nach Lösung in LiJ und Kupfer(II)-äthylendiamin und anschließender Dialyse. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengestellt. Man erkennt zunächst, daß bei der Umsetzung des festen Fadens und des in LiJ gelösten Fibroins annähernd die gleiche Anzahl an Endgruppen erhalten wird. Dies bedeutet, daß bei

der Auflösung in LiJ keine Spaltung von α -Peptidbindungen erfolgt. Dieser Befund wurde dadurch unterstrichen, daß bei Seidenfibroin, das 10 Tage in LiJ-Lösung aufbewahrt worden war, die gleiche Endgruppenzahl gefunden wurde wie bei Bestimmung sofort nach dem Auflösen in LiJ. Von den Endgruppen entfallen 60—80% auf das Serin. Die Endgruppen der einzelnen Moleküle sind also nicht völlig gleichartig. Da der Anteil des Serins an der Gesamtmenge der Aminosäuren relativ gering ist, während er bei den Endgruppen überwiegt, besteht aber doch die Möglichkeit, daß der größere Teil der Fibroinmoleküle wie andere Eiweißstoffe nach einem einheitlichen Plan gebaut ist. Aus der Gesamtzahl der Endgruppen berechnet sich ein durchschnittliches Mol.-Gew. (Zahlenmittel) von max. 200 000—300 000. Wegen der Unbeständigkeit des DNP-Serins und Glykokolls unter den Bedingungen der Hydrolyse stellt dieser Wert ein Maximum dar. Er könnte auch bis zu 20% niedriger sein.

Bei geraden unverzweigten Peptidketten muß die Zahl der Amino-Endgruppen mit der der Carboxyl-Endgruppen übereinstimmen. Es wurde daher auch ein vorläufiger Versuch zur Bestimmung der Carboxyl-Endgruppen durch Hydrazinspaltung nach Akabori¹³ unternommen. Wir fanden als C-terminale Gruppen Serin, Alanin, Glykokoll, insgesamt 0,3—0,4 μMol je 100 mg Protein. Die Übereinstimmung mit der Zahl der Amino-Endgruppen ist also

⁹ R. Bergmann u. C. Niemann, J. biol. Chemistry **122**, 577 [1938].

¹⁰ D. Coleman u. F. O. Howitt, Proc. Roy. Soc. London **190 A**, 145 [1947].

¹¹ H. Zahn, Textil Rundschau **9**, 119 [1954] u. priv. Mitt.

¹² F. Sanger, Biochem. J. **39**, 507 [1945].

¹³ S. Akabori, K. Ohno u. K. Narita, Bull. Chem. Soc. Japan **25**, 214 [1952].

befriedigend. Allerdings ist bei dieser Analyse der Korrekturfaktor für die Berechnung gerade bei den gegebenen Aminosäuren ziemlich hoch, so daß die Analyse nicht sehr sicher ist.

Nach Lösung des Fibroins in Kupfer(II)-äthylen-diamin und Dialyse nach dem Verfahren von Coleman und Howitt¹⁰ fanden wir ein Durchschnitts-Mol.-Gew. von 60 000, die Größenordnung ist also dieselbe wie bei diesen Autoren. Die Zahl der Serin-Endgruppen bleibt in diesem Falle konstant, während zusätzlich Alanin- und Glykokoll-Endgruppen auftreten. Es ergibt sich also eindeutig, daß in diesem Lösungsmittel ein Abbau stattfindet, wie es auch schon von Signer² festgestellt wurde.

Parallel zu dem *Bombyx*-Fibroin wurde auch das Sericin untersucht, für das sich ein mittleres Mol.-Gew. von 160 000 ergab.

Bei dem *Nephila*-Fibroin wurde aus Mangel an Material nur der feste Faden untersucht. Die Art der Endgruppen unterscheidet sich vom *Bombyx*-Fibroin, da bei *Nephila* Serin, Glutaminsäure + Asparaginsäure und Alanin in etwa gleichen Mengen auftreten. Wir fanden jedoch etwa das gleiche mittlere Mol.-Gew. von etwa 300 000. Da das *Nephila*-Fibroin weder entbastet noch einem Lösungsmittel ausgesetzt wurde, ist dieser Wert als besonders zuverlässig anzusehen.

Mit dem hohen Mol.-Gew. steht in Übereinstimmung, daß man in den gelösten Fibroinen von *Nephila* und *Bombyx* elektronenmikroskopisch gut ausgebildete Fäden erkennt, die einen Durchmesser von etwa 100 Å besitzen. Es handelt sich vermutlich um Aggregate von Peptidketten, eine Beziehung zu den Dimensionen der Grundmoleküle konnte bisher noch nicht festgelegt werden (Abb. 1* und 2).

Neben dem abgespulten fertigen Fibroin wurde auch der Inhalt der betreffenden Drüsen (*Glandulae ampullaceae*) untersucht¹⁴. Überraschenderweise ergab sich bei diesem ein etwa 10-mal höherer Gehalt an Endgruppen, die zu 90% aus Alanin bestehen, und damit ein durchschnittliches Mol.-Gew. von nur 30 000. Da der Fibroinfaden unmittelbar aus dem Drüseninhalt stammt, müßten sich Verunreinigungen bei beiden Bestimmungen in gleicher Weise auswirken. Zur Erklärung des überraschenden Befunds ist man zur Annahme gezwungen, daß beim Ausschei-

den des Fadens neue Peptidbindungen hauptsächlich am Alaninrest geknüpft werden. Theoretisch wäre eine derartige Peptidsynthese möglich, da ja die Proteinkonzentration sehr hoch ist und auch die Mitwirkung von Proteinasen oder Peptidasen an dem Vorgang nicht ausgeschlossen ist. Es wäre daher wünschenswert, wenn der Spinnvorgang und die dabei erfolgenden Veränderungen an den Fibroinmolekülen näher untersucht würden**.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Fibroine von *Bombyx* und von *Nephila* einander auffallend ähnlich sind. Die Ähnlichkeit erstreckt sich auf die wesentlichen Kennzeichen der chemischen Zusammensetzung, auf das Mol.-Gew. und auf das elektronenmikroskopische Bild. Zu beachten bleibt dabei, daß es sich bei den untersuchten Fäden des Seidenspinners um Kokon-Gespinnst handelt, bei denen der Spinne jedoch um Fäden, die zur Herstellung des Netzes oder als „Sicherheitsfäden“ benützt werden.

Experimenteller Teil

Fibroin von *Nephila*

Über die Herkunft unseres Spinnen-Materials hat bereits Peters¹ berichtet. Durch „Abspulen“ der Tiere konnten wir in einem Fall bis 70 mg Spinnfäden gewinnen. Der abgespulte Faden besteht mikroskopisch aus mehreren, bis vier, Einzelfäden, zwei etwa 6 µ stark, zwei von etwas geringerem Durchmesser.

Um den Drüseninhalt selbst zu gewinnen, wurden die *Glandulae ampullaceae* durch Präparation freigelegt. Dann wurde der bauchige Teil der Drüsen (der Sammelbehälter) herausgenommen und sofort in 10-proz. Kaliumcarbonat-Lösung gegeben. Das Sekret stellt eine glasklare, zähe Masse dar. Sie ist von der sehr dünnen Wandung der Drüsenampulle umgeben. Auch wenn diese platzt, behält die Sekretmasse ihre Form und kann mit der Pinzette erfaßt und in das Gefäß mit der Lösungsflüssigkeit übergeführt werden. Wenn das Wandepithel nicht schon bei der Präparation abgegangen war, wurde es belassen, da es im Verhältnis zum Sekret mengenmäßig überhaupt nicht ins Gewicht fällt. Nach 3–4 Stdn. war das Sekret zu einer orangegelben Flüssigkeit gelöst. Schütteln auf der Schüttelmaschine ist zu vermeiden, der Drüseninhalt darf auch nicht an der Luft getrocknet oder erstarrt sein, da er sich sonst nicht mehr mit Carbonat in Lösung bringen läßt.

Fibroin von *Bombyx*

Zur Entbastung wurden die gelben Kokons von *Bombyx mori* 2–3-mal in 4-proz. Sodalösung kurzzeitig auf teilchen aus dem Sammelbehälter der Drüse auf dem Weg zur Düse zu höheren Einheiten zusammentreten, vielleicht unter der Wirkung von Fermenten, die der Wandung des Ausführorgans entstammen***. Diese Annahme würde die auffallende Länge des ausleitenden Kanals verständlich machen (vgl. Peters S. 398 u. Abb. 5).

*** Vgl. Peters Fußnote 16.

¹⁴ Zwischen dem *Gl. amp. majores* und *minores* wurde kein Unterschied gemacht.

* Abb. 1 u. 2. s. Tafel S. 404 a.

** Anmerkung Peters: Nach dem anatomischen Bau der *Glandulae ampullaceae* mit ihren Ausführgängen könnte man sich sehr gut vorstellen, daß die Elementar-

70° erwärmt. Das Sericin und ein gelber Farbstoff ließen sich auf diese Weise leicht entfernen. Nach Auswaschen mit Wasser, Äthylalkohol und Äther sowie 24-stdg. Trocknen erhält man ein weißes Fibroin, das nur noch wenig Sericin enthält, wie die mikroskopische Kontrolle mit Picrocarmin zeigte.

Sericin von *Bombyx*

Zerschnittene Kokons wurden in Wasser eine Stde. auf 50° erhitzt, das Sericin wird dann abfiltriert und lyophilisiert. Man erhält einen voluminösen, leicht gelb gefärbten Stoff, der bei Zimmertemperatur in Wasser nur schlecht löslich ist.

Auflösung der Fibroine

Um eine wäßrige Lösung von Fibroin zu erhalten, benutzten wir konzentrierte Lösungen von LiJ oder Kupfer(II)-äthylendiamin, die anschließend dialysiert wurden. 100 g LiJ wurden in 100 ccm Wasser gelöst, schwach erhitzt und das Fibroin hineingegeben, das sich sofort zu einer 1—2-proz. Lösung auflöst. Die Dialyse dauerte 10 bis 20 Stunden. Die Kupfer(II)-äthylendiamin-Lösungen wurden nach der Vorschrift von Coleman und Howitt¹⁰ hergestellt. Das Fibroin löst sich hierin schnell. Die entstandene Lösung wurde dann ohne Neutralisation dialysiert. Ein Teil des Fibroins fiel hierbei aus, er wurde verworfen.

Bestimmung der Aminosäure-Zusammensetzung

Zur qualitativen Analyse wurde das Protein im allgemeinen 16 Stdn. bei 110° C mit 6-n. HCl im verschlossenen Rohr hydrolysiert. Anschließend wurde in der üblichen Weise zweidimensional chromatographiert. Wir verwendeten in der einen Dimension Butanol/Essigsäure/Wasser 4:1:5, in der anderen Phenol/Wasser 8:2.

Zur quantitativen Bestimmung wurde das wie oben hergestellte Hydrolysat nach dem Abdampfen der Salzsäure mit Fluordinitrobenzol nach Sanger¹² umgesetzt, und zwar in wäßrig-alkoholischer Lösung. Die Reaktionsdauer betrug 2 Stdn., anschließend wurde die alkalische Lösung ausgeäthert, dann angesäuert und die DNP-Aminosäuren durch 3-maliges Schütteln mit Essigester extrahiert. Zur weiteren Reinigung wurden die DNP-Aminosäuren nochmals in Bicarbonatlösung übergeführt, die nach dem Ansäuern wiederum mit Essigester extrahiert wurde. Nach dem Abdampfen des Essigesters wurde das bei dem Umsatz gebildete Dinitrophenol nach Mills¹⁵ im Vakuum abdestilliert. Dann wurden nach einem Verfahren ähnlich dem von Levy⁶ die DNP-Aminosäuren durch zweidimensionale Papierchromatogra-

phie getrennt. In der einen Richtung wurde Butanol/0,1-proz. NH₃, in der anderen 1,5-m. Phosphatpuffer benützt.

Bestimmung der Amino-Endgruppen

Für die Umsetzung mit Dinitrofluorbenzol wurde das feste Fadenmaterial in gesättigter Bicarbonatlösung suspendiert (etwa 50 mg Fibroin in 1 ccm). Bei den gelösten Fibroinen wurde nach der Dialyse festes Bicarbonat bis zur Sättigung hinzugefügt. Dann wurden zwei Volumina Äthanol, das 5% Dinitrofluorbenzol enthielt, zugegeben. Hierbei fällt ein Teil des Bicarbonats aus. Die Mischung wurde mit Glaskugeln versetzt und auf einer Schüttelmaschine 2 Stdn. kräftig geschüttelt. Am Ende der Reaktion war das DNP-Fibroin vollständig ausgefallen, es wurde abfiltriert und mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen, bis das Filtrat farblos war. Auf diese Weise wird das während der Reaktion entstehende Dinitrophenol vollständig entfernt. Das DNP-Fibroin wurde dann bei 70° C im Vakuum getrocknet.

Zur Hydrolyse wurde ein Teil mit 100 Teilen 6-m. HCl im Einschlußrohr 8—16 Stdn. auf 110° erhitzt. Das Hydrolysat wurde mit dem 4—6-fachen Volumen an Wasser verdünnt und die DNP-Aminosäuren durch 3-malige Extraktion mit Äther extrahiert. Unter diesen Umständen könnten in der wäßrigen Phase nur DNP-Histidin und DNP-Arginin zurückbleiben, sie waren jedoch beide nicht nachweisbar. Der Ätherextrakt wurde 3-mal mit 1-n. HCl gewaschen, die Salzsäureanteile wurden vereinigt und 1-mal mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherextrakte wurden eingedampft und die DNP-Aminosäuren nach dem oben beschriebenen Verfahren in Anlehnung an Levy⁶ quantitativ bestimmt.

Die Bestimmung der Carboxyl-Endgruppen

100 mg Fibroin wurden in 1 ccm Hydrazin gelöst und 8 Stdn. auf 100° C erhitzt. Die Lösung des Proteins vollzog sich nur schwer und war auch nach der Beendigung der Reaktionszeit nicht vollständig. Das Reaktionsgemisch wurde mit einigen Tropfen Wasser in eine flache Schale gespült, im Exsikkator über H₂SO₄ bei 1 mm Hg Druck das überschüssige Hydrazin entfernt, der Rückstand in 5 ccm m/15-Phosphat aufgelöst und mit 2 ccm Benzaldehyd 1/2 Stde. geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde 3-mal ausgeäthert, filtriert und das Filtrat wie oben mit Dinitrofluorbenzol umgesetzt.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Arbeiten, insbesondere für das D. W. erteilte Stipendium.

Herrn Prof. Dr. G. Schramm danken wir für die Förderung der Arbeit, Herrn Prof. Dr. H. Zahn, Chemisches Institut, Heidelberg, für wertvolle Hinweise.

¹⁵ G. L. Mills, Biochem. J. 50, 707 [1952].