

DNP-derivative was detected on these chromatograms. Shorter reaction periods increased the latter, and yielded less alanine. The highest yield of the unknown material was obtained after 4 h of hydrazinolysis (see Table I). The U.V. absorption spectrum suggested that this material was related to, but not identical with, proline. The observed maximum of 375 $m\mu$ would be characteristic for a DNP-prolyl-peptide⁸; the disappearance of the material during longer hydrazinolysis is in accord with such an hypothesis. The material, after elution from a chromatogram, was therefore subjected to acid hydrolysis (5.7 *N* HCl, 5 h reflux). Dinitrophenol and traces of both DNP-proline and the unhydrolyzed DNP-peptide were found in the ether extract. In contrast, chromatographic analysis of the aqueous phase indicated the presence of equimolecular amounts of two free amino acids, proline and alanine; these were identified by their R_F values (Butanol-acetic acid: 0.35, 0.33; standards 0.35, 0.33. Buffered phenol-cresol: 0.80, 0.33; standards 0.80, 0.33), and differentiated by the isatin and ninhydrin test. It thus appears, that prolyl-alanine is split rapidly from the C-terminal position of the dethreoninated virus protein and can be isolated as the DNP-derivative. Its spectral characteristics and its lability in acid and hydrazine are in full accord with this interpretation⁸. Longer hydrazinolysis decomposes this peptide and yields only the C-terminal alanine in the acid fraction.

Thus, the C-terminal sequence in the TMV protein is -prolyl-alanyl-threonine.

Virus Laboratory, University of California, Berkeley,
Calif. (U.S.A.)

CHING-I. NIU*

H. FRAENKEL-CONRAT**

¹ J. I. HARRIS AND C. A. KNIGHT, *Nature*, 170 (1952) 613.

² J. I. HARRIS AND C. A. KNIGHT, *J. Biol. Chem.*, (in press).

³ C. A. KNIGHT, *Advances in Virus Research*, Vol. II, (1954) p. 153.

⁴ S. AKABORI, K. OHNO AND K. NARITA, *Bull. Chem. Soc. of Japan*, 25 (1952) 214.

⁵ K. OHNO, *J. Biochem. (Japan)*, 41 (1954) 345.

⁶ A. LEVY, *Nature*, 174 (1954) 126.

⁷ During the preparation of this manuscript, a paper by G. BRAUNITZER (*Z. Naturforsch.*, 9b (1954) 675) came to our attention, which also demonstrates the C-terminal position of threonine in TMV protein by hydrazinolysis. Other conclusions contained in that paper appear not valid. No N-terminal groups are found in repeated reinvestigations of this problem in this laboratory (see H. FRAENKEL-CONRAT AND B. SINGER, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 180).

⁸ H. FRAENKEL-CONRAT, J. I. HARRIS AND A. L. LEVY, in *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. II, Ed. . . GLICK, Interscience Publ., N.Y., 1955.

Received February 3rd, 1955

* Aided by a grant from the Rockefeller Foundation.

** Aided by a grant from the National Foundation for Infantile Paralysis.

Répartition de la radioactivité sur le D-ribose biosynthétique

Dans une publication antérieure¹, nous avons montré que le ribose de l'acide nucléique de *Torula utilis* cultivée sur D-glucose-²¹⁴C comme unique source de carbone possède une radioactivité par molécule très voisine de celle du glucose. On en retrouve environ 93 % sur un fragment qui groupe les carbones 1, 2, 3. Le carbone 5 est inactif. Nos nouvelles expériences montrent que l'activité est entièrement portée par le carbone aldéhydrique du ribose.

Réduction du D-ribose en D-ribitol

A une solution de D-ribose (250 mg) dans l'eau (5 ml) on ajoute une solution de borohydrure de sodium (35 mg) dans l'eau (2.5 ml). On laisse une nuit à température ambiante, puis on décompose l'excès de réactif par addition d'acide acétique jusqu'à neutralité, on déionise sur une colonne mixte Duolite-Zeo-Karb et on évapore à sec sous vide à 30-40°. Par cristallisation dans l'alcool on obtient le D-ribitol (186 mg — 75 % F. 97-98°, s'élevant à 99-101° après une recristallisation). On n'a pas observé la formation parasite d'esters boriques.

Isolement du D-ribose à l'état de D-ribitol

Nous avons opéré exactement de la façon décrite¹ pour la culture de *Torula utilis*, avec les mêmes poids de composés, mais après hydrolyse de l'acide nucléique et déionisation, au lieu de séparer le ribose biosynthétique à l'état d'osazone, nous avons d'abord vérifié par chromatographie sur papier que le résidu ne contenait pas d'autre sucre que le ribose.

On ajoute alors du D-ribose inactif comme entraîneur (20.0 mg) et l'ensemble, dissous dans l'eau (0.5 ml) est réduit par le borohydrure de sodium (10 mg) dans l'eau (1 ml). On procède comme

ci-dessus, et on recristallise le ribitol jusqu'à point de fusion constant (20 mg — F. 99–101° — Activité mesurée en couche mince: 3,200 c.p.m./millimole).

Oxydation périodique du D-ribitol actif

On ajoute à une solution de ribitol (17 mg) et de bicarbonate de soude (42 mg) dans l'eau (2 ml) une solution de métapériodate de sodium (106 mg) dans l'eau (2 ml). On laisse une nuit, puis on acidifie (pH 2) avec SO_4H_2 N/10 et on ajoute une solution à 20 % d'iodure de potassium (1 ml). On ajoute ensuite de l'anhydride arsénieux jusqu'à disparition de l'iode, puis on traite par la soude N/10 jusqu'au virage de la phthaléine. Par entraînement à la vapeur, on recueille le formol, précipité par le dimédon (dérivé: 54 mg — 80 % — Recristallisé: F. 187–188° — L'activité a été déterminée par un comptage en couche limite: 1,750 c.p.m./millimole).

Le résidu est rendu acide au rouge Congo par SO_4H_2 N/10, et l'acide formique distillé avec entraînement à la vapeur. Le distillat est exactement neutralisé à la soude, évaporé à sec et oxydé par l'acétate mercurique (solution à 10 % dans l'acide acétique 0.3 N: 10 ml) une demi-heure à chaud dans un appareil à combustion liquide. Le gaz carbonique est recueilli dans la baryte, et le carbonate de baryum centrifugé et lavé (48.5 mg — 73 % — Pas d'activité décelable par comptage en couche limite).

L'acide formique correspond aux carbones 2, 3, 4 du D-ribose. Donc ceux-ci sont inactifs. Le formol provient des carbones 1 et 5 et le carbone 5 étant inactif, son activité ne peut être due qu'à la contribution du carbone 1. Dans ces conditions l'activité moléculaire du formal-dimédon doit être la moitié de celle du ribitol. C'est ce que l'on constate, à la précision des mesures.

Ces résultats montrent que le squelette carboné du D-ribose se forme par élimination du carbone aldéhydrique du D-glucose.

S. DAVID

J. RENAUT

*Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences,
Nancy (France)*

¹ S. DAVID ET J. RENAUT, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 1311.

Reçu le 26 janvier 1955

The application of Edman's peptide degradation method to horse myoglobin and haemoglobin

A number of attempts has recently been made to degrade certain peptides and proteins in a stepwise manner by the phenylisothiocyanate procedure of EDMAN¹. In the case of insulin² the expected amino-acids were liberated from the two chains for a few steps, but soon complex mixtures were obtained and the sequence was no longer clear. FRAENKEL-CONRAT³ applied a micro-modification of this procedure to a number of proteins and found that the method gave unambiguous results only for the first 4–5 amino acids.

Horse myoglobin has one N-terminal amino acid group, glycine⁴, and it seemed worth while to apply EDMAN's method to this protein to see how far it could be degraded. FRAENKEL-CONRAT³ with his micro method has obtained results with myoglobin (presumably from horse) which are in agreement with those reported here.

In connection with X-ray studies in this laboratory on horse haemoglobin, it became desirable to confirm by the EDMAN method that the protein has six valines as N-terminal groups⁴, and this was found to be the case.

The method for preparing horse myoglobin was based on that described by SCHMID⁵ for whale myoglobin. Instead of treating the crude myoglobin extract with lead acetate to remove non-haeme proteins, it was given two fractionations with ammonium sulphate between 65 % and full saturation and afterwards between 75 % and full saturation. The protein was crystallised four times from 3 M phosphate buffer pH 6.3 to which solid phosphate buffer⁵ had been added. Horse haemoglobin was prepared as described previously⁶ and the haeme was removed from the two proteins by the method of ANSON AND MIRSKY⁷.

The reaction between the proteins and phenylisothiocyanate was carried out at pH 9 in aqueous pyridine (1:1) and at room temperature. As reported by other workers the uptake of NaOH never ceased completely, but the reaction was discontinued when the rate of alkali consumption became very slow. Addition of acetone precipitated the phenylthiocarbamyl-(PTC-)-protein and this was extracted with ether. The N-terminal amino acid was split off as its phenylthiohydantoin by allowing a solution of the PTC-protein in anhydrous formic acid to stand at room temperature. From time to time samples were precipitated with acetic acid and ether and the liberated phenylthiohydantoin could be estimated spectrophotometrically in the supernatant³. The amino acid was identified by