

## Die gelösten Stoffe in der Hämolymphe einer Spinne, *Cupiennius salei* Keyserling

RENATE LOEWE, BERNT LINZEN und WOLFHART VON STACKELBERG\*  
Zoologisches Institut und Physiologisches Institut der Universität München

Eingegangen am 5. September 1969

### *Hemolymph Solutes in a Spider, Cupiennius salei*

*Summary.* Cell-free hemolymph of females of the spider, *Cupiennius salei* Keyserling, has been analyzed for its main inorganic and organic constituents.

1. The hemolymph pH is in the range 8.1—8.3, as measured in vivo by a micro glass electrode and in vitro by indicator paper. Total dry matter amounts to 76.9 mg/ml, 21.5 mg/ml of which can be extracted by an alcohol/ether mixture.

2. Quantitative analyses are summarized in Table 1. The sum of all components is slightly higher than total dry matter. Separate determinations of nitrogen and phosphate fractions are in good agreement with the sum totals. Soluble phosphate is entirely inorganic.

3. The major solute is protein (48 mg/ml), which at least partly consists of hemocyanin as judged from absorption spectra. The main blood sugar of *Cupiennius* is glucose, but two more components have been detected by thin layer chromatography.

4. The hemolymph composition of *Cupiennius* is of the same type as that of the scorpion, *Heterometrus*, of *Limulus*, and of Crustacea.

Über die Hämolymphe der Arachniden ist — im Gegensatz zu derjenigen anderer Arthropoden — bisher kaum gearbeitet worden. Die vorliegenden Untersuchungen beschreiben hauptsächlich die Hämolymphezellen (Millot, 1926) oder befassen sich — z. T. aus systematischen Gründen — nur mit der Proteinfraction (Boyd, 1937; Rabaey und Verriest, 1957—58; McCrone, 1967). Die einzige ausführliche, uns bekannte chemische Untersuchung behandelt die Zusammensetzung der Hämolymphe des Skorpions *Heterometrus fulvipes* (Padmanabhanaidu, 1966a). Schließlich hat Rathmeyer (1965) eine Ringerlösung auf der Basis des Ionengehaltes im Blut von *Eurypelma hentzi* Girard angegeben. Eine Gesamtanalyse der Hämolymphe einer Spinne scheint jedoch zu fehlen.

In der vorliegenden Arbeit sollen die wichtigsten Stoffgruppen der zellfreien Spinnenhämolymphe quantitativ erfaßt, ihre Bilanz aufgestellt und eine nähere Charakterisierung begonnen werden. Die von uns untersuchte Art, *Cupiennius salei* Keyserling, wurde seit vielen Jahren am

\* Wir danken Herrn Prof. H. Autrum für die Förderung der Arbeit, Herrn W. Kuschinsky für seine Hilfe bei den Kaliumbestimmungen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Leihgaben.

Institut gezüchtet (Melchers, 1963). Sie ist wegen ihrer Körpergröße und der Möglichkeit, sie unter kontrollierten Bedingungen zu halten, für biochemische Untersuchungen besonders geeignet. Allerdings stand uns nur eine beschränkte Zahl von Tieren zur Verfügung.

## Material und Methoden

### *Chemikalien*

Alle verwendeten Reagenzien waren von p.a. Qualität. Zur Herstellung von Cu- bzw. Ca-Standardlösungen wurden Merck Titrisol Nr. 9936/0001 und Nr. 9976/0001 verwendet. Die übrigen Standardlösungen wurden aus bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Eichsubstanzen hergestellt.

### *Tiere*

Die Tiere wurden nach den Angaben von Melchers (1963) gehalten und je nach ihrer Größe mit verschiedenen *Drosophila*-Stämmen, mit *Phormia regina*, *Calliphora erythrocephala* oder *Periplaneta americana* gefüttert. Es wurden nur alte Weibchen untersucht, die schon längere Zeit das Futter nicht mehr angenommen hatten.

### *Entnahme der Hämolymphe und Aufteilung in Proben*

Die Spinnen wurden 1 Std bei 4° C gehalten. Die Hämolymphe wurde aus den Gelenkhäuten mit einer Glaskapillare entnommen, in einem Zentrifugengläschen von 1,5 ml Inhalt gesammelt und sofort 15 min bei ca. 1000 g zentrifugiert. Alle Operationen erfolgten bei + 4°. Die sonst sehr schnell einsetzende Gerinnung wurde so weitgehend verhindert.

Von der zellfreien Hämolymphe — bei Abtötung der Tiere bis zu 500 µl — wurden 100 µl zur Bestimmung der Trockenmasse eingesetzt. Aus dem getrockneten Material wurde durch dreimalige Extraktion mit Äthanol/Äther (3:1) die Lipidfraktion gewonnen; ihr Anteil wurde durch Wägung nach Verdampfen des Lösungsmittels bestimmt und ihr Phosphatgehalt ermittelt.

An nicht enteweißter, zellfreier Hämolymphe wurden folgende Analysen durchgeführt: Messung von Absorptionsspektren, pH-Wert, Chlorid, Natrium, Kalium, Calcium, Kupfer, Phosphat, Stickstoff und Protein.

Proben von 100 µl wurden mit Trichloressigsäure (TCE) enteweiß (Endkonzentration 10%, 2mal ausgewaschen mit 10%iger TCE). Wenn nötig (enzymatische Glucosebestimmung), wurde die TCE aus dem Überstand durch Ausäthern mit peroxidfreiem, wassergesättigtem Äther entfernt (bis zu 12mal), der Äther mit Stickstoff vorsichtig abgeblasen, und das Volumen der Lösung durch Wägung ermittelt. Im TCE-Überstand wurden bestimmt: Chlorid, Stickstoff, Phosphat, anorganisches Phosphat, Kohlenhydrate und Glucose. Mit einigen Proben wurden chromatographische Untersuchungen durchgeführt. Im TCE-Niederschlag wurden bestimmt: Kupfer, Phosphat, Protein-Stickstoff, Protein nach Lowry und gebundene Kohlenhydrate.

### *Quantitative Bestimmungen*

*pH-Wert.* Bestimmung mit einer Mikro-Glaselektrode (v. Stackelberg, 1969).

*Chlorid.* Mikrotitration nach Ramsay et al. (1955).

*Natrium.* Bestimmung mit einer Mikro-Glaselektrode aus Na-empfindlichem Glas (v. Stackelberg, 1969).

*Kalium* wurde mit einem Mikroflammenphotometer bestimmt, das nach dem Prinzip von Mueller (1958) gebaut war.

*Calcium.* Titration mit Äthylendiamin-tetraacetat nach Mattenheimer (1966) im verkleinerten Ansatz: 1 ml Probe (1—10  $\mu\text{g}$  Ca), 0,2 ml 0,1 N NaOH, 50  $\mu\text{l}$  30%iges Murexid; titriert wurde mit 0,02 M EDTA mittels einer DESAGA-Mikroinjektionsspritze.

*Kupfer.* Kolorimetrische Bestimmung nach Eden und Green (1940) mit geringfügigen Modifikationen. Die Probe (0,5—5  $\mu\text{g}$  Cu) wurde mit 0,25 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. und 0,25 ml  $\text{HClO}_4$  im Sandbad während 30 min bei ca. 300° C verascht. Nach dem Abkühlen wurden 0,25 ml  $\text{HNO}_3$  conc. zugegeben und nochmals 1 Std bei 300° verascht. Zur veraschten Probe wurden 1 ml 4%iges Natriumpyrophosphat, 1 ml  $\text{NH}_3$  ( $D=0,91$ ), 1 ml Natriumdiäthylthiocarbaminat und 1,5 ml Amylalkohol gegeben.

*Gesamtposphat* wurde nach Lowry et al. (1954) bestimmt.

*Anorganisches Phosphat.* Bestimmung nach Martin und Doty (1949). Die Volumina wurden im Verhältnis 1:15, z.T. 1:30 verringert.

*Stickstoff.* Die Proben (10—50  $\mu\text{g}$  N enthaltend) wurden nach Lang (1958) verascht und der Stickstoff nach Jacobs (1959) mit Ninhydrin bestimmt. Zur Farbreaktion wurden 0,25 ml der Citratpufferlösung eingesetzt, und die Volumina der Reagenzien entsprechend gewählt. Als Eichlösungen dienten Lösungen von Leucin und Ammoniumsulfat.

*Protein* wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt.

*Kohlenhydrate.* Bestimmung mittels der Anthron-Reaktion nach Mokrasch (1954). Der Ansatz enthielt 0,2 ml der Probe (5—20  $\mu\text{g}$  Glucose) und 1,2 ml Anthron-Reagenz.

*Gebundene Kohlenhydrate* wurden nach Björnesjö (1955) bestimmt. Die Volumina wurden im Verhältnis 8:1 verringert.

*Glucose* wurde enzymatisch nach Slein (in Bergmeyer, 1962) bestimmt. Abweichend von der Vorschrift wurde mit TCE enteiweißt. Eichlösungen, die mit TCE versetzt und anschließend ausgeäthert wurden, und unbehandelte Eichlösungen ergaben gleiche Meßwerte. Das gebildete NADPH wurde fluorimetrisch mit einem Aminco-Bowman Spektrofluorimeter bestimmt (Anregung bei 350 nm, Messung bei 460 nm, Spaltanordnung 3, 2, 3, 3, 2, 3, 2; Verkleinerung des Ansatzes im Verhältnis 1:2, Meßbereich 0,2—2  $\mu\text{g}$  Glucose).

### *Papier- und Dünnschichtchromatographie*

Papierchromatogramme wurden aufsteigend mit dem System Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) auf dem Papier Nr. 2043 b von Schleicher u. Schüll angefertigt, Dünnschichtchromatogramme auf Cellulose Nr. 300 von Macherey, Nagel u. Co. in Ameisensäure/Butanon/t-Butanol/Wasser (3:6:8:3); zweimalige Entwicklung bei Raumtemperatur und Kammersättigung (Vomhof und Tucker, 1965). Die Chromatogramme wurden unter kurz- und langwelligem UV-Licht, durch Besprühen mit Ninhydrin, Ehrlichs Reagenz und Folin-Reagenz ausgewertet. Zum Nachweis von Zuckern dienten p-Aminohippursäure, 0,3%ig in Äthanol (Sattler und Zerban, 1952) und  $\text{AgNO}_3/\text{NaOH}$  (Trevelyan et al., 1950).

## Ergebnisse und Diskussion

### *Absorptionsspektrum*

Das Absorptionsspektrum der unverdünnten, bzw. mit Wasser verdünnten Hämolymphe zeigt drei Maxima: bei 278, 340 und 560—570 nm. Ihre Extinktionen verhalten sich wie 170:30:1. Während das Maximum

bei 278 nm auf hohen Proteingehalt der Hämolymphe hinweist, lassen die beiden anderen Maxima auf das Vorliegen von Hämocyanin schließen. Dieses respiratorische Pigment ist schon bei anderen Spinnenarten gefunden worden (Griffiths, zit. bei Rabaey und Verriest, 1957—1958; Boyd, 1937; van Bruggen, 1968).

#### *pH-Wert*

Der pH-Wert wurde *in vivo* durch Einstechen einer Mikro-Glas-elektrode in die Gelenkhaut zwischen Femur und Tibia bestimmt. Dabei wurden die Werte 8,05 und 8,22 erhalten. Zellfreie Hämolymphe zeigte auf Lyphan-Papieren einen pH-Wert zwischen 8,2 und 8,3. Diese Werte stimmen mit dem von Millot (1926) für verschiedene Arten angegebenen Wert von 8,2—8,3 gut überein. Die Hämolymphe der marinen und im Süßwasser lebenden Dekapoden und die von *Limulus* reagiert ebenfalls schwach basisch (Maluf, 1939; Andrews, 1967), die des Skorpions *Heterometrus fulvipes* hat pH 7,3 (Padmanabhanaidu, 1966b).

#### *Gelöste Stoffe*

Papier- und dünnschichtchromatographische Untersuchungen wiesen zunächst darauf hin, daß der Bestand an gelösten organischen Stoffen außerordentlich niedrig ist. Weder Ninhydrin-, noch Ehrlich- oder Folin-positive Substanzen traten auf den Chromatogrammen hervor. Dagegen lassen sich mit p-Aminohippursäure und mit Silberionen 3 Zucker nachweisen. Der unterste, am deutlichsten erkennbare Fleck ist lagegleich mit Glucose ( $R_G = 1,0$ ); die Identität wird durch die enzymatische Bestimmung bewiesen (s. u.). Die beiden anderen Flecken ( $R_G = 1,6$  und  $R_G = 2,2$ ) treten erst beim Auftragen größerer Substanzmengen hervor.

Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Der hohe Anteil der *Lipoidfraktion* an der Trockensubstanz (28%, entsprechend ca. 2% der frischen Hämolymphe) ist überraschend: Diese Fraktion ist nach der Proteinfraction die mengenmäßig wichtigste. Es ist zwar denkbar, daß bei der Extraktion der Trockensubstanz mit Alkohol/Äther in geringem Umfange auch andere Stoffe als Lipide gelöst wurden, was dadurch an Wahrscheinlichkeit gewinnt, daß die Summe der bestimmten Stoffe höher ist als die Trockensubstanz. Der Befund wird dadurch aber nicht prinzipiell verändert. Das Vorkommen von Lipoidtröpfchen in Spinnenhämolymphe wird bereits von Millot (1926) beschrieben; das Fett soll an die Hämolymphe abgegeben werden, wenn die Tiere lange Zeit keine Nahrung aufgenommen haben — Verhältnisse, die auf die von uns untersuchten Tiere sicher zutreffen.

Die Bilanz der anorganischen *Ionen* ergibt ein Kationendefizit von 19,8  $\mu\text{Val/ml}$ . Dies könnte durch Magnesium gedeckt werden, das von

Tabelle 1. Der Stoffbestand der Hämolymphe von *Cupiennius*; Übersicht über die verschiedenen Bestimmungen

Bestimmung	$\bar{x}$	$\sigma$	$n$
Trockensubstanz (mg/ml)	76,87 ± 6,83		13
Mit Äther/Äthanol extrahierbar (mg/ml)	21,50 ± 7,44		11
Chlorid ( $\mu$ Val/ml)	257,60 ± 22,20		5
Natrium ( $\mu$ Val/ml)	223,00 ± 29,80		5
Kalium ( $\mu$ Val/ml)	6,79 ± 1,37		5
Calcium ( $\mu$ Val/ml)	8,00 ± 0,88		5
Kupfer ( $\mu$ g/ml)	57,70 ± 4,10		4
Gesamtphosphat ( $\mu$ M/ml)	4,97 ± 2,78		10
Säurelösliches Phosphat ( $\mu$ M/ml)	1,12 ± 0,24		10
Anorganisches Phosphat ( $\mu$ m/ml)	1,07 ± 0,30		12
Phosphat im TCE-Niederschlag ( $\mu$ M/ml)	3,72 ± 1,82		10
Lipoidphosphat ( $\mu$ m/ml)	2,30 ± 1,62		11
Gesamtstickstoff (mg/ml)	8,47 ± 1,78		14
Protein-Stickstoff (mg/ml)	7,63 ± 2,23		10
säurelöslicher Stickstoff (mg/ml)	0,78 ± 0,36		4
Protein in zellfr. Hämol. (Lowry) (mg/ml)	47,04 ± 12,02		10
Protein im TCE-Niederschlag (Lowry) (mg/ml)	48,86 ± 10,28		10
Säurelösliche Kohlenhydrate (mg/ml)	0,45 ± 0,07		13
Säurelösliche Glucose (mg/ml)	0,39 ± 0,06		11
Kohlenhydrate im TCE-Niederschlag (mg/ml)	0,4 ± 0,1		3

uns noch nicht bestimmt wurde. Die Mg-Konzentration beträgt bei *Heterometrus* 20,8  $\mu$ Val/ml (Padmanabhanaidu, 1966a), bei *Orconectes* 5,5  $\mu$ Val/g H<sub>2</sub>O (Andrews, 1967). Die Summe der anorganischen Ionen in der Spinnenhämolymphe ist etwa halb so groß wie die der marinen Arthropoden, liegt aber über der von Insekten und Süßwasser-Crustaceen (Prosser u. Brown, 1961).

Der Kupfergehalt der Hämolymphe wurde zu 57,7  $\mu$ g/ml bestimmt. Bezogen auf den Proteingehalt ergibt sich für Kupfer ein Anteil von 0,12%. Bei *Heterometrus* wurde ein fast identischer Wert gefunden (0,13%, Padmanabhanaidu, 1966a). Der Cu-Gehalt gereinigten Hämocyanins wird für verschiedene Mollusken mit 0,25%, für *Limulus* mit 0,19%, für *Palinurus vulgaris* mit 0,15% angegeben (Werte bei Prosser u. Brown, 1961).

Den größten Anteil am Gesamtphosphat (4,97  $\mu$ M/ml) hat mit 3,72  $\mu$ M/ml (75%) das Phosphat im TCE-Niederschlag. Dieses wiederum besteht zu 62% (2,30  $\mu$ M/ml) aus Lipoidphosphat (46% des Gesamtphosphats). Das säurelösliche Phosphat (1,12  $\mu$ M/ml, 23% des Gesamtphosphats) liegt praktisch vollständig in Form anorganischen Phosphats vor (1,07  $\mu$ M/ml).

Die starke Streuung der Werte für Gesamtphosphat und für Phosphat im TCE-Niederschlag ist nicht methodisch bedingt. Bei Doppelbestimmungen betragen die Abweichungen vom Mittelwert durchschnittlich 2,3% ( $\sigma = \pm 1,2\%$ ) für Gesamt-

phosphat und 2,4% ( $\sigma = \pm 1,7\%$ ) für Phosphat im TCE-Niederschlag ( $n=10$  in beiden Fällen). Die Differenz zwischen Gesamtphosphat und der Summe von „gebundenem“ und säurelöslichem Phosphat betrug im Mittel 6,5% ( $\sigma = 3,2\%$ ,  $n=10$ ).

Den mengenmäßig wichtigsten Bestandteil der gelösten Stoffe stellt das *Protein* dar. Der säurelösliche Stickstoff fällt mit 0,78 mg/ml dagegen wenig ins Gewicht. Der aus der Stickstoffbestimmung berechnete Proteingehalt von 47,7 mg/ml stimmt im Mittel mit dem Ergebnis der Bestimmung nach Lowry gut überein. Allerdings ergeben sich bei den einzelnen Tieren Differenzen bis zu 11 mg/ml zwischen den beiden Bestimmungen, für die außer methodischen Ursachen auch Unterschiede in der Proteinzusammensetzung verantwortlich sein können. Zum Vergleich mit *Cupiennius* (48 mg/ml) seien die Werte von *Heterometrus* (76 mg/ml, Padmanabhanaidu, 1966a), der Spinne *Latrodectus* (30–50 mg/ml, Boyd, 1937), von *Limulus* (25 mg/ml, nach Maluf, 1939) und von *Orconectes* (66 mg/ml, Andrews, 1967) herangezogen. Ob die Hämolymphe von *Cupiennius* neben Hämocyanin in wesentlichem Umfang auch andere Proteine enthält, soll demnächst untersucht werden. Der im Vergleich zu Crustaceen niedrige Cu-Gehalt würde dies an sich nahelegen. Jedenfalls dürfte das Protein der Hämolymphe neben seiner möglichen respiratorischen Funktion auch eine Funktion als Puffersubstanz und als Reservesubstanz haben.

Durch Dünnschichtchromatographie und enzymatische Bestimmung mit Hexokinase/Glucose-6-phosphat-dehydrogenase wurde *Glucose* als wichtigster Blutzucker ermittelt (89% des Anthron-positiven Materials). Bei *Orconectes* werden dagegen nur 36–55% der säurelöslichen Hexose von Glucose bestritten (Andrews, 1967). Der Gehalt an löslichen Kohlenhydraten zeigt bei den alten *Cupiennius*-Weibchen eine relativ kleine Streuung. Bei einem Tier, dessen Abdomen prall mit Eiern gefüllt war, fanden wir jedoch den zehnfachen Wert (4,40 mg/ml, davon 2,58 mg/ml Glucose).

Der Gehalt an Kohlenhydraten im TCE-Niederschlag ließ sich nur näherungsweise ermitteln. Eine Überprüfung der Bestimmung nach Björnesjö (1955) ergab, daß die Höhe der Absorptionsbande bei 520 nm, die bei der Reaktion des Proteins allein gegeben wird, nicht nur von der Konzentration des Proteins bestimmt, sondern auch vom Typ des Proteins beeinflusst wird. Der Anteil der Extinktion, der bei der Meßwellenlänge 620 nm als Anteil der „Proteinbande“ von der „Kohlenhydratbande“ abgezogen werden muß, läßt sich also durch Vergleich z.B. mit kristallisiertem Rinderserumalbumin nicht bestimmen, sondern muß aus dem Kurvenverlauf abgeschätzt werden.

Bei vier Tieren, für die vollständige Analysen vorliegen, lassen sich die *Bilanzen* zwischen Trockensubstanz und einzeln bestimmten Feststoffen aufstellen (Tabelle 2). Man erkennt aus der Gegenüberstellung, daß die Summe der Feststoffe den Betrag der Trockensubstanz immer

Tabelle 2. Bilanzen der quantitativen Bestimmungen bei 4 Tieren. Nicht eingerechnet sind die proteingebundenen Kohlenhydrate; säurelöslicher Stickstoff wurde als Ammoniak berechnet, in Wirklichkeit dürfte dieser Posten einen höheren Wert haben.

Alle Werte in mg/ml

„Lipoide“	6,00	28,00	18,00	37,00
Chlorid	7,70	9,10	9,50	9,70
Natrium	4,37	6,20	4,95	5,40
Kalium	0,27	0,24	0,23	0,35
Calcium	0,17	0,17	0,14	0,18
Kupfer	0,05	0,06	0,06	—
Phosphat	0,30	0,44	0,29	0,29
Protein	22,40	49,00	43,50	73,00
Säurelöslicher Stickstoff	0,70	0,90	0,61	1,56
Säurelösliche Kohlenhydrate	0,59	0,47	0,42	0,46
Summe	42,55	94,58	77,70	127,94
Trockensubstanz	36,00	85,00	69,50	125,00

übersteigt. Daß der größte Fehler in der Bestimmung der Lipoide durch Extraktion mit Alkohol/Äther liegen dürfte, wurde oben bereits erwähnt. Andererseits geht aus den Bilanzen hervor, daß wir keine quantitativ wichtige Komponente der *Cupiennius*-Hämolymphe übersehen haben.

Die Untersuchung zeigt, daß die Hämolymphe von *Cupiennius* in ihrem Stoffinventar der Hämolymphe des Skorpions *Heterometrus*, des Pfeilschwanzkrebse und der Crustaceen sehr ähnlich ist. Dieser Typ zeichnet sich durch hohen Proteingehalt bei einem niedrigen Gehalt an niedermolekularen organischen Stoffen aus. Der Gehalt an Ionen entspricht im großen und ganzen dem der terrestrischen und im Süßwasser lebenden Arthropoden. Die Hämolymphe von *Cupiennius* kann darüberhinaus beträchtliche Fettreserven aufweisen. Inwieweit die gefundenen Werte als artcharakteristisch angesehen werden können oder die besondere Situation der Tiere widerspiegeln, müssen weitere Untersuchungen zeigen, wie man überhaupt von einer Analyse der einzelnen Entwicklungsstadien noch Modifikationen des hier erhaltenen Bildes erwarten darf.

#### Literatur

- Andrews, P.: Über den Blutchemismus des Flußkrebse *Orconectes limosus* und seine Veränderung im Laufe des Jahres. Z. vergl. Physiol. **57**, 7—43 (1967).
- Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie 1962.
- Björnesjö, K. B.: Analysis of protein-bound serum polysaccharides with anthron reagent. Scand. J. clin. Lab. Invest. **7**, 147—152 (1955).
- Boyd, W. C.: Cross-reactivity of various hemocyanins with special reference to the blood proteins of the black widow spider. Biol. Bull. **73**, 181—183 (1937).
- Bruggen, E. F. J. van: Electron microscopy of hemocyanins. In: Physiology and biochemistry of haemocyanins (F. Ghirelli, ed.), p. 37—48. London and New York: Academic Press 1968.

- Eden, A., Green, H. M.: Microdetermination of copper in biological material. *Biochem. J.* **34**, 1202—1203 (1940).
- Jacobs, S.: Determination of nitrogen in proteins by means of indanetrione hydrate. *Nature (Lond.)* **183**, 262 (1959).
- Lang, C. A.: Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological materials. *Analyt. Chem.* **30**, 1692—1694 (1958).
- Lowry, O. H., Roberts, N. R., Leinen, K. Y., Wu, M. L., Farr, A. L.: The quantitative histochemistry of brain. I. Chemical methods. *J. biol. Chem.* **207**, 1—17 (1954).
- Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193**, 265—275 (1951).
- Maluf, N. S. R.: The blood of arthropods. *Quart. Rev. Biol.* **14**, 149—191 (1939).
- Martin, J. B., Doty, D. M.: Determination of inorganic phosphate. Modification of the isobutyl alcohol procedure. *Analyt. Chem.* **21**, 965—967 (1949).
- Mattenheimer, H.: Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium. Berlin: Walter de Gruyter 1966.
- McCrone, J. D.: Biochemical differentiation of the sibling black widow spiders, *Latrodectus mactans* and *L. variolus*. *Psyche* **74**, 212—217 (1967).
- Melchers, M.: Zur Biologie und zum Verhalten von *Cupiennius salei* (Keyserling), einer amerikanischen Ctenide. *Zool. Jb., Abt. System., Ökol. u. Geogr.* **91**, 1—90 (1963).
- Millot, J.: Contribution à l'histophysiologie des Aranéides. *Bull. biol. France Belg., Suppl.* **8**, 1—238 (1926).
- Mokrasch, L. C.: Analysis of hexose phosphates and sugar mixtures with anthrone reagent. *J. biol. Chem.* **208**, 55—59 (1954).
- Mueller, P.: Experiments on current flow and ionic movements in single myelinated nerve fibers. *Exp. Cell Res.* **5**, 118—146 (1958).
- Padmanabhanaidu, B.: Ionic composition of the blood and the blood volume of the scorpion *Heterometrus fulvipes*. *Comp. Biochem. Physiol.* **17**, 157—166 (1966a).
- Influence of size, sex, pH and temperature on heart beat of the scorpion, *Heterometrus fulvipes*. *Indian J. exp. Biol.* **4**, 206—208 (1966b).
- Prosser, C. L., Brown, F. A.: Comparative animal physiology. Philadelphia: W. B. Saunders 1961.
- Rabaey, M., Verriest, G.: Etude comparative de l'hémolymphe de 33 espèces d'araignées par microélectrophorèse sur gélose. Interêt systématique de cette méthode. *Ann. Soc. Zool. Belg.* **88**, 373—383 (1957—58).
- Ramsay, J. A., Brown, R. H., Croghan, P. C.: Electrometric titration of chloride in small volumes. *J. exp. Biol.* **32**, 822—829 (1955).
- Rathmeyer, W.: Neuromuscular transmission in a spider and the effect of calcium. *Comp. Biochem. Physiol.* **14**, 673—687 (1965).
- Sattler, L., Zerban, F. W.: New spray reagents for paper chromatography of reducing sugars. *Analyt. Chem.* **24**, 1862 (1952).
- Stackelberg, W. v.: Dissertation (in Vorbereitung).
- Trevelyan, W. E., Procter, D. P., Harrison, J. S.: Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature (Lond.)* **166**, 444—445 (1950).
- Vomhof, D. W., Tucker, T. C.: The separation of simple sugars by cellulose thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* **17**, 300—306 (1965).

Doz. Dr. Bernt Linzen  
 Dipl.-Biol. Renate Loewe  
 Zoologisches Institut der Universität  
 8000 München 2  
 Luisenstr. 14

Dipl.-Phys. W. v. Stackelberg  
 Physiologisches Institut der Universität  
 8000 München 15  
 Pettenkoferstr. 12