

## 개 심실 형질막의 분리 및 그 方向性에 관한 연구

李 神 雄·具 貞 沃·李 正 秀

嶺南大學校 藥學大學

(Received January 15, 1986)

### Purification and Sidedness of Sarcolemma from Canine Ventricle

Shin-Woong Lee, Jeung-Ok Ku and Jeung-Soo Lee

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 632, Korea

**Abstract**—Sarcolemmal membrane fraction from canine ventricle was isolated from the discarded pellet after the first homogenization in the isolation procedure of sarcoplasmic reticulum (Method 1) and the protein yield, purity, and sidedness of this preparation were compared to those of sarcolemmal fraction prepared by method of Lee *et al.* (Method 2) and a slight modification of original protocol of Jones *et al.* (Method 3). Method 1 differed from Method 2 essentially only in that vigorous homogenization was carried out by omnimixer and homogenization medium containing 30mM Tris-maleate was used in the first step. The sarcolemmal fraction was enriched from 45 to 50 and 29-fold in [<sup>3</sup>H] ouabain, [<sup>3</sup>H] DHA, [<sup>3</sup>H] QNB binding and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, respectively, compared to homogenate. Total Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity of highly sarcolemma enriched fraction was 144.6±16.4μmol Pi/mg protein/hr, which was about 85% of total ATPase activity, and the yield of the preparation was 15.7 mg protein per 100g of starting ventricular tissue. The sarcolemmal preparation supported <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-uptake in the presence of ATP but this uptake was not dependent on oxalate. Sarcolemmal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and detectable [<sup>3</sup>H] ouabain binding were increased about 32% and 35%, respectively, by pretreatment of sarcolemmal fraction with optimal concentration of sodium dodecylsulfate (0.3-0.4mg/mg protein), suggesting that this preparation contained about 24% of sealed rightside-out vesicles, 26% of sealed inside-out vesicles, and 50% of freely permeable (leaky) form. This procedure showed the highest protein yield and leaky population, compared to Method 2 and 3. On the other hand, sarcolemmal fraction prepared by Method 2 and 3 showed low value in protein yield but contained high population of inside-out (46%) and rightside-out (49%) vesicles, respectively, compared to present procedure (Method 1). The results indicate that vigorous homogenization decreases the population of sealed sarcolemmal vesicles but increases the sarcolemmal protein yield per gram tissue and that this procedure is available for further purification of sarcolemmal fraction and for the receptor binding study of sarcolemma.

세포내에서 일어나는 여러가지 생리적 현상 및 약물반응은 세포분획(subcellular fraction)을 분리하여 그 분획에 대한 연구를 시행함으로써 더욱 정확히 이해될 수 있으므로 근래에 와서 순수한 세포분획을 분리하기 위하여 많은 노력을 기울이고 있다. 특히 형질막은 세포기능조절에 매우 중요한 일차적 관문으로서 막을 통한 이온이동을 조절할 뿐 아니라 형질막에는 여러 가지 약물의 수용체가 존재하므로 막을 통한 이온이동<sup>1-5)</sup> 및 약물과 수용체와의 결합<sup>6-10)</sup>을 연

구하는데 흔히 이용되고 있다.

형질막의 분리는 1957년<sup>11)</sup>과 1960년<sup>12)</sup> Skou에 의하여 시도된 이래 Schwartz 등<sup>13)</sup>도 원심분리 과정을 달리하여 형질막을 분리, 정제한 바 있으나 이들이 분리한 형질막은 수율이 적고 상당량의 미토콘드리아 및 筋 소포체가 오염되어 있었다. 그 후 1979년 Jones 등<sup>14)</sup>은 분리한 분획에 Ca<sup>2+</sup>-oxalate를 가하여 density gradient centrifugation을 시행함으로써 형질막에 오염되기 쉬운 筋 소포체를 분리제거, 비교적 순수한 형

질막을 분리하였고, 근래에 와서 Van Alstyne 등<sup>15)</sup>은 Schwartz 등<sup>13)</sup>의 방법을 기초로 하고  $\text{Ca}^{2+}$ -oxalate를 부하시키는 번거로움을 피하면서 균질화와 원심분리를 반복하는 방법으로 개 심장으로부터 마이크로솜을 분리한 다음 이 마이크로솜을 24% (w/v) discontinuous sucrose gradient로 하여 원심분리함으로써 형질막을 분리하였다. 그러나 이러한 개선된 여러 방법으로 비교적 순수한 형질막을 분리하였다 할지라도 형질막의 수율이 낮거나 그 방향성이 적합하지 않아 특정한 실험에 적합하고 수율이 높은 형질막 분리방법이 요구되고 있다. 특히 형질막의 방향성 차이는 실험에 따라 실험결과의 해석에 매우 큰 영향을 미치므로 분리한 형질막의 방향성 결정은 정확한 결과 해석을 위하여 매우 중요하다.

본 실험에서는 筋 소포체 분리시 이용되지 않는 분획으로부터 형질막 분리를 시도하고 여기서 얻은 형질막의 수율, 정제정도 및 방향성을 Lee 등의 방법<sup>16)</sup>과 Jones 등의 방법<sup>14)</sup>을 수정한 방법으로 분리한 형질막 분획과 비교 검토하였다.

### 실 험 방 법

시약— $[^3\text{H}]$  Dihydroalprenolol ( $[^3\text{H}]$  DHA, 35 Ci/mmol),  $[^3\text{H}]$  ouabain (19.5 Ci/mmol),  $[^3\text{H}]$  quinuclidinyl benzilate ( $[^3\text{H}]$  QNB, 67 Ci/mmol),  $^{45}\text{CaCl}_2$  (10mCi/ml)은 New England Nuclear Corporation으로부터, ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethyl ether) N,N'-tetraacetic acid (EGTA), sodium dodecylsulfate (SDS), ouabain, atropine sulfate, alprenolol은 Sigma Chemical Co.로부터 adenosine triphosphate disodium salt ( $\text{Na}_2\text{ATP}$ , vanadium free)는 Boehringer Co.로부터 구입 사용하였고 이 외 모든 시약은 특급 또는 1급품을 사용하였다.

개 심실 형질막의 분리—형질막의 분리는 筋 소포체 분리시<sup>17)</sup> 버리는 first pellet를 이용하는 방법 (Method 1), Lee 등의 방법<sup>16)</sup> (Method 2) 및 Jones 등의 방법<sup>14)</sup>을 수정한 방법 (Method 3)에 의하였다.

Method 1은 자용 구별없이 외관상 건강한 개 심장을 적출하고 심방 및 기타 주위조직을 제거, 무게를 단 후 가위로 細切하였으며, 세질된 심실근을 무게의 4배가 되는 medium (30mM Tris-maleate, pH 7.0)에 넣고 Sorvall omnimixer로 15초동안 4번 균질화한 다음 5,500×g에서 10분 동안 원심분리하였다. Pellet에 5배 용량의 medium A (10mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5mM  $\text{NaN}_3$ , pH 7.0)를 가하고 glass homogenizer 중에서 teflon pestle을 1번 통과 (80% max. 140w), 원심분리 (20min, 8,700×g)한 후 pellet의 6배 용량이 되는 medium B (10mM Tris-Cl, pH 7.4)를 가하고 teflon pestle을 4번 통과시킨 후 원심분리 (20min, 8,700×g)하였다. 이 과정을 3회 반복하고 매회 상정액을 모아 35,000×g에서 30분 동안 원심분리한 후 마이크로솜을 얻었으며, medium B에 부유시킨 마이크로솜 7~10ml를 20ml의 24% sucrose (w/v) 용액표면에 섞이지 않도록 조심하면서 가하여 마이크로솜층이 되게 한 후 73,400×g에서 30분간 원심분리 하였다. Sucrose용액과 medium B 사이에 생긴 우유빛의 형질막층을 채취하고 약 10배 용량의 medium B를 가한 후 73,400×g에서 30분간 다시 원심분리하였으며, 형질막 단백질의 농도가 1.5~2mg/ml되도록 pellet에 소량의 medium B를 가하여 균질화한 다음 실험에 사용하였다.

Method 2에서는 적출한 개 심실을 Method 1에서와 같이 조작처리하고 심실근 무게의 5배가 되는 10mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5mM  $\text{NaN}_3$ , pH 7.0 용액 (medium A)중에 가하고, polytron (PT-20)으로 5초동안 2번 (0.5max) 균질화한 다음 8,700×g에서 20분 동안 원심분리하였다. Pellet에 5배 용량의 medium A를 가하는 2번째 과정부터는 Method 1과 동일하였다.

Method 3에서는 Jones 등의 방법<sup>14)</sup>으로 마이크로솜까지 분리하고 마이크로솜으로부터 형질막의 분리는 Lee 등의 방법<sup>16)</sup>에 따랐다. 간략하면, 細切된 심근을 무게의 4배되는 0.75M KCl, 5mM 히스티딘, pH 7.4 용액중에 가하고, polytron (PT-20)으로 5초동안 3번 (0.5max) 균질화한 다음 14,000×g에서 20분동안 원심분리하였

다. Pellet에 4배되는 10mM NaHCO<sub>3</sub>, 5mM 히스티딘, pH 7.4 용액을 가하여 원심분리 (20min, 14,000×g)한 후, 다시 pellet에 4배의 10mM NaHCO<sub>3</sub>, 5mM 히스티딘을 가하여 polytron (PT-20)으로 30초동안 3회 (0.5max) 균질화한 다음 원심분리 (20min, 14,000×g)하였다. 각 상정액을 모아 45,000×g에서 30분간 원심분리하고 pellet에 4배의 0.25M sucrose, 5mM 히스티딘을 가하여 원심분리 (20min, 17,000×g) 한 후 상정액을 105,000×g에서 30분간 원심분리하였다. 여기서 얻은 마이크로솜을 Method 1의 마이크로솜과 같은 방법으로 처리하여 형질막 분획을 얻었다.

분리한 형질막분획의 단백질농도는 Lowry 등의 방법<sup>18)</sup>에 의하여 측정하였다.

**ATPase활성 측정**—ATPase활성은 Fiske 등의 방법<sup>19)</sup>에 의하여 측정하였다. 즉 25mM L-히스티딘, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 100mM NaCl, pH 7.4를 함유하는 medium중에 단백질 10~20μg을 가하고 10분간 배양한 후 5mM Na<sub>2</sub>ATP를 넣어 최종용적이 1ml되게 하였다. 10분간 반응시킨 후 병냉의 10% TCA 1ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음 발색제 (50mg FeSO<sub>4</sub>/1.25% ammonium molybdate in 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)를 가하고 30분간 방치하였다가 원심분리, 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 5mM Na<sub>2</sub>ATP를 가하기 전에 10% TCA 1ml를 먼저 가하고 10분간 배양시킨 후 5mM Na<sub>2</sub>ATP를 가하여 나타나는 흡광도를 대조로 간주하였다.

Mitochondrial ATPase활성은 총 ATPase활성에서 5mM NaN<sub>3</sub>존재 하에서 나타나는 ATPase활성을 뺀 값으로 하였으며, ouabain sensitive ATPase활성은 총 ATPase활성에서 2.5×10<sup>-4</sup>M ouabain 존재하에서 측정된 ATPase활성을 뺀 값으로 하였다. 또 5mM NaN<sub>3</sub>, 2.5×10<sup>-4</sup>M ouabain 및 250μM EGTA존재 하에서 나타나는 ATPase활성을 residual ATPase활성으로, residual ATPase활성에서 200μM CaCl<sub>2</sub>를 가함으로써 증가되는 ATPase활성을 Ca<sup>2+</sup>-ATPase활성으로 간주하였다. SDS처리후의 ATPase활성은 형질막 단백질 μg당 SDS 일정량이 되도록 SDS를 가하

고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 상술한 방법으로 측정하였다.

**[<sup>3</sup>H] Ouabain 결합 실험**—[<sup>3</sup>H] Ouabain 결합실험에서는 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM Tris-Pi, 50mM Tris-Cl (pH 7.4)를 함유하는 용액중에 5×10<sup>-8</sup>M [<sup>3</sup>H] ouabain을 넣고 단백질을 가하여 최종용적이 2ml되게 하였다. 반응액을 37°C에서 90분간 배양한 후 혼합액 0.9ml를 취하여 0.45μm 메칠셀룰로오스 필터 (Gelman)상에서 흡인여과하였다. 여지를 병냉의 증류수로 3회 세척하고 10ml의 scintillation액 (Budgetsol, Fisher)중에 넣어 10시간 이상 방치한 후 liquid scintillation counter (Beckman L.S. 200B)로 방사능을 측정하였다. 비특이성 방사능은 같은 조건에서 10<sup>-3</sup>M 비표지 ouabain존재하에서 측정하였으며 [<sup>3</sup>H] ouabain 특이결합에 의한 특이성 방사능은 총 방사능에서 비특이성 방사능을 뺀 값으로 하였다. SDS처리 후의 [<sup>3</sup>H] ouabain결합은 형질막 단백질을 SDS와 37°C에서 10분간 반응시킨 후 상술한 방법으로 측정하였다.

**[<sup>3</sup>H] Dihydroalprenolol (DHA) 및 [<sup>3</sup>H] quinuclidinyl benzilate (QNB) 결합 실험**—형질막의 [<sup>3</sup>H] DHA 및 [<sup>3</sup>H] QNB 결합은 50mM Tris-Cl (pH 7.4), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 20~25μg의 단백질 및 10nM [<sup>3</sup>H] DHA 또는 0.2nM [<sup>3</sup>H] QNB 존재하에서 시행하였다. [<sup>3</sup>H] DHA결합의 경우 30°C에서 20분간, [<sup>3</sup>H] QNB결합의 경우 37°C에서 60분간 배양한 후 50mM Tris-Cl (pH 7.4), 10mM MgCl<sub>2</sub>를 함유하는 병냉의 세척액 5ml를 가하여 반응을 종료시키고 즉시 Whatmann GF/F glass fiber filter상에서 여과하였으며 필터를 5ml의 세척액으로 3회 세척한 다음 방사능을 측정하였다. 이때 [<sup>3</sup>H]DHA와 [<sup>3</sup>H]QNB의 비특이결합은 각각 10<sup>-4</sup>M alprenolol 또는 10<sup>-6</sup>M atropine 존재하에서 측정하였다.

**ATP 의존성 Ca<sup>2+</sup> 섭취 실험**—160mM KCl로 미리 부하시킨 형질막 부유액 2μl (2mg protein/ml)를 160mM KCl, 20mM MOPS/Tris-Cl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10μM <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> 및 5mM Tris·ATP와 3mM potassium oxalate를 함유하거나 함유하지 않는 medium 100μl에 가하고 37°C에서 10분간 배양

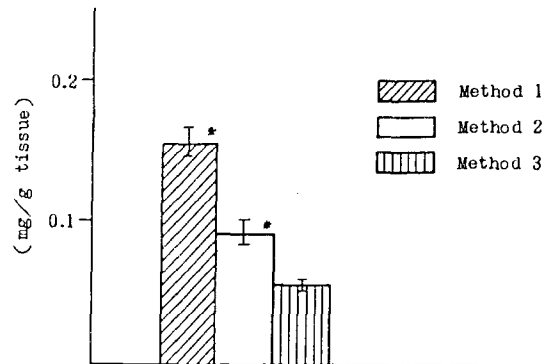
하였다. ATP 의존성  $\text{Ca}^{2+}$ 섭취는 전체  $\text{Ca}^{2+}$ 섭취에서 ATP가 없을 때의  $\text{Ca}^{2+}$ 섭취를 뺀 값으로 하였으며 이때 ATP에 의존하지 않는  $\text{Ca}^{2+}$ 섭취는 전체  $\text{Ca}^{2+}$ 섭취의 10% 미만이었다.

### 실 험 결 과

**형질막 분획의 정제도**— $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, adrenergic 및 cholinergic receptor<sup>6-10,20,21</sup>)가 형질막에 존재하므로 이들을 marker로 하여 형질막 분획이 homogenate로부터 얼마나 정제되었는가를 알아보았다. Table I은 筋小胞體 분리시의 first pellet를 이용하는 Method 1의 과정중에서 first homogenate와 형질막분획을 일정량 취하고 단백질 mg당 SDS 0.3mg으로 미리 처리한 다음  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성, [<sup>3</sup>H]ouabain, [<sup>3</sup>H]DHA 및 [<sup>3</sup>H]QNB결합실험을 시행한 결과로서 형질막분획은 homogenate보다  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성에서 약 30배, radioligand결합에서 약 45배 컸다. 본 실험에서 homogenate의 ouabain insensitive ATPase활성이 ouabain sensitive ATPase활성 즉  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성의 약 5배에 달하였으므로 homogenate에서 정확하고 의의있는  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성측정이 어려웠다. 따라서  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성으로 계산된 purification factor보다는 상호 그 상대순도가 잘 일치하는 radioligand 결합실험에서 구해진 purification factor 45가 더

타당한 것으로 생각된다.

**형질막 분획의 단백질 수율**—본 실험에서 분리 시도한 형질막분획의 상대순도가 대단히 높았으므로 이의 단백질 수율을 기존방법인 Method 2 및 3으로 제조한 형질막분획과 비교하여 보았다(Fig. 1). 심실조직 g당 형질막 분획의 단백질수율은 Method 1에서  $0.157 \pm 0.019\text{mg}$ ( $n=4$ )으로 가장 많았으며 이는 Method 2와 3에 비해 각각 약 2배 또는 3배에 해당하는 양이었다. 즉 omnimixer로 심실조직을 강하게 균질화



**Fig. 1**—Sarcolemmal protein yield per gram wet heart tissue. Sarcolemmal fractions were prepared by method 1, 2 or 3 described in method. Vertical bar represents standard error of mean from four different preparations.

\* Significantly different from protein yield of sarcolemmal fraction prepared by method 3 ( $p < 0.01$ ).

**Table I**— $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity and radioligand binding of subcellular fractions from canine heart.

	$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase activity ( $\mu\text{mol pi}/\text{mg}/\text{hr}$ )	Radioligand binding ( $\text{p mol}/\text{mg}$ )		
		[ <sup>3</sup> H]Ouabain	[ <sup>3</sup> H]DHA	[ <sup>3</sup> H]QNB
Homogenate	$5.0 \pm 0.2$	$4.2 \pm 0.2$	$0.04 \pm 0.003$	$0.16 \pm 0.03$
Sarcolemma	$144.6 \pm 16.4$	$185.0 \pm 22.1$	$1.92 \pm 0.25$	$7.91 \pm 0.84$
Purification (fold)	$28.9 \pm 5.2$	$44.1 \pm 7.4$	$48.1 \pm 6.8$	$49.4 \pm 5.8$

Subcellular fractions were treated with an optimal concentration of SDS (0.3~0.4mg SDS/mg protein) for unmasking latent activity and binding.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity was determined by measuring the difference between total ATPase activity and activity present after addition of  $2.5 \times 10^{-4}\text{M}$  ouabain. Ouabain binding was carried out for 90min at 37°C in the presence of 50mM Tris-Cl (pH 7.4), 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 5mM Tris-Pi and  $5 \times 10^{-8}$  [<sup>3</sup>H] ouabain. Binding of [<sup>3</sup>H] DHA and [<sup>3</sup>H] QNB was carried out in the presence of 50mM Tris-Cl (pH 7.4), 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 20~25 $\mu\text{g}$  of protein and 10nM [<sup>3</sup>H] DHA or 0.2nM [<sup>3</sup>H] QNB. Temperature and incubation times were 30°C and 20 min for [<sup>3</sup>H] DHA, and 37°C and 60 min for [<sup>3</sup>H] QNB. [<sup>3</sup>H] DHA and [<sup>3</sup>H] QNB concentrations were about 5 fold above  $K_D$ , hence the binding data do not represent  $B_{max}$ . The data represent the mean  $\pm$  S.E. of four separate preparations.

**Table II**—ATPase activity of sarcolemma enriched preparation ( $\mu\text{mol pi/mg protein/hr}$ ).

ATPase activity	Method 1	Method 2	Method 3
Total	170.1 $\pm$ 16.5	155.6 $\pm$ 10.5	97.9 $\pm$ 7.8
Azide sensitive (Mitochondrial)	12.9 $\pm$ 2.6	13.3 $\pm$ 1.5	11.1 $\pm$ 0.7
Ouabain sensitive ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -)	144.6 $\pm$ 16.4	130.9 $\pm$ 5.3	73.5 $\pm$ 4.4
EGTA sensitive ( $\text{Ca}^{2+}$ -)	4.5 $\pm$ 2.2	2.9 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.2
Residual	8.1 $\pm$ 3.4	8.5 $\pm$ 2.2	10.7 $\pm$ 1.11

Sarcolemma (80 $\mu\text{g}$ ) was incubated with 0.3 to 0.4 $\mu\text{g}$  of sodium dodecyl sulfate per  $\mu\text{g}$  of sarcolemmal protein for 10min at 37°C in a final volume of 0.16ml before measurement of ATPase activity. Aliquots of sarcolemma (10 $\mu\text{g}$ ) were used to determine ATPase activities, as described in method. Values are the means  $\pm$  S.E. of four separate preparations.

하고 원심분리한 다음 그 pellet로 부터 분리한 형질막 분획의 단백질 수율이 가장 높았고 다음이 polytron으로 균질화하고 glass-teflon pestle로 균질화를 반복하는 Lee 등의 방법<sup>16)</sup>이었으며 처음 균질화 시에만 polytron을 사용하고 다음부터는 g force만 달리하여 원심분리를 반복하는 방법에서 가장 낮았다.

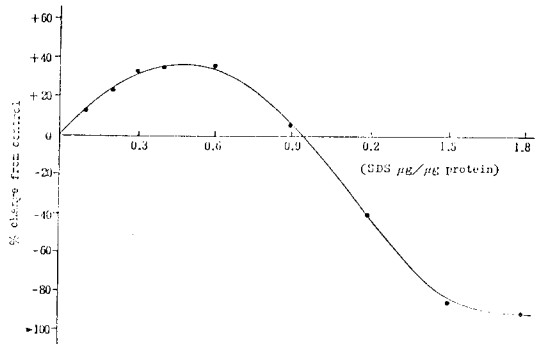
**형질막의 ATPase활성**—각 방법으로 분리한 형질막 분획중에 형질막 이외의 subcellular fraction의 오염정도를 mitochondrial ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase(EGTA sensitive) 및 residual ATPase활성으로 추정하였던 바 Method 1과 2에서는 total ATPase활성에 대한 mitochondrial ATPase활성 및 residual ATPase활성 비가 상호 유사하였고  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성 역시 각각 total ATPase활성의 약 85%를 차지하고 있어 Method 1과 2로 분리한 형질막 분획은 그 순도에 있어서는 큰 차이가 없음을 알 수 있었다(Table II). 그러나 Method 3으로 분리한 형질막의  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성은 Method 1과 2의 약 50%에 불과하였고 total ATPase활성에 대한  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성의 비도 Method 1과 2에서 보다 약 10% 낮았다.

한편, 본 실험에서 측정된  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase활성이 형질막  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase에 기인한 것인지 또는 근 소포체 오염에 의한 근소포체  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase에 기인한 것인지를 알아보기 위하여 형질막 분획의 ATP의존성  $\text{Ca}^{2+}$ 섭취에 미치는 oxalate의 영향을 조사하였던 바 ATP존재하에서 Method 1으로 분리한 형질막 분획의  $\text{Ca}^{2+}$ 섭취는 oxalate

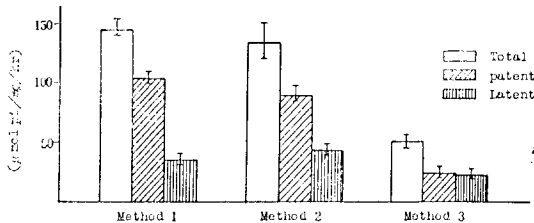
가 없는 medium 중에서는 8.2  $\pm$  0.4 nmol/mg protein( $n=5$ )이었고, 3mM oxalate를 가한 medium 중에서는 7.6  $\pm$  0.5 nmol/mg protein( $n=5$ )으로서 oxalate에 전혀 영향을 받지 않았다.

**형질막의  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성에 미치는 SDS의 영향**— $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase의 ATP에 의한 인산화 부위는 세포질쪽이고<sup>22,23)</sup> ATP가 형질막을 통과할 수 없으므로 분리한 형질막의  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성은 inside-out vesicles 또는 leaky form에서만 나타나고 rightside-out vesicles에서는 나타나지 않는다. 따라서 형질막의 총 ATPase활성을 측정하기 위해서는 형질막을 inside-out 또는 leaky form으로 만들어야 하며 본 실험에서는 이를 위하여 분리한 형질막을 SDS로 처리하였다. Fig. 2는 Method 1으로 제조한 형질막 분획을 각 농도의 SDS로 처리한 후  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성을 대조치의 백분율로 표시한 것으로 형질막 단백질  $\mu\text{g}$ 당 SDS 0.1 $\mu\text{g}$ 되게 처리했을 때부터 효소 활성이 증가되기 시작하여 0.3~0.4 $\mu\text{g}$ 되게 처리했을 때 그 활성 증가가 약 32%로 최대에 달하였다가 그 이상 농도를 증가시키면 점차 억제되어 단백질  $\mu\text{g}$ 당 1.5 $\mu\text{g}$ 일 때 거의 활성이 소멸되었다. 여기서 SDS에 의한  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 활성증가는 rightside-out vesicles의 leaky form으로의 전환에 기인했다고 볼 수 있으므로 Method 1에서 분리한 형질막 분획중에는 rightside-out vesicles이 약 24% 함유되어 있는 것으로 추정된다.

각 방법으로 분리한 형질막 분획 중 rightside-out vesicles이 얼마나 되는지 알아보기 위하여



**Fig. 2**—A typical curve of the effect of SDS on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity of canine cardiac sarcolemma prepared by method 1. Sarcolemma protein was treated with SDS for 10 minutes at  $37^\circ\text{C}$ .  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity was measured as described in methods.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity of control sarcolemma which was not treated with SDS was  $108 \mu\text{mol pi/mg protein/hr}$ .



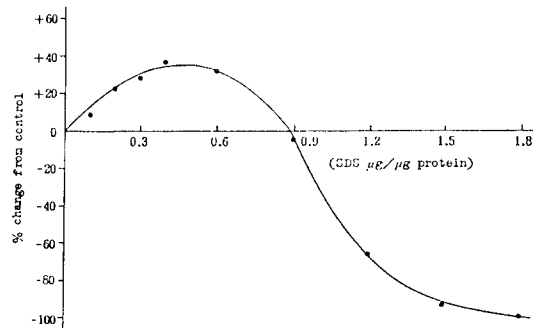
**Fig. 3**—Patent, latent and total  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity of sarcolemma enriched preparation. Latent  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity was calculated by subtraction patent activity from total  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity measured after SDS-treatment. Vertical bar represents the standard error of mean from four different preparations.

각 분획을 전술한 SDS 최적농도인 형질막 단백질  $\mu\text{g}$ 당  $0.3 \sim 0.4 \mu\text{g}$ 으로 처리한 후  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성을 측정하여 보았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 SDS처리된 patent  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성은 Method 1에서  $111.0 \pm 4.8 \mu\text{mol Pi/mg protein/hr}$ 로 가장 컸고, latent  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성 즉 SDS에 의하여 증가된  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성은 Method 2에서 가장 컸으며 Method 1과 3에서는 유사한 값을 보였다. 그러나 Method 3에서는 patent와 latent활성이 비슷한 데 비해 Method 1과 2에서는 patent활성이 latent활성보

다 2배 이상 높았다. 따라서 total  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성에 대한 latent  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성의 백분율 즉 rightside-out vesicles은 Method 1, 2 및 3에서 각각 23%, 32.2%, 및 48.6%로서 Method 3의 형질막 분획중에 total population에 대한 rightside-out vesicles의 비가 가장 컸다.

형질막의  $[^3\text{H}]\text{ouabain}$ 결합에 미치는 SDS의 영향— $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase에 강심 배당체가 결합하는 부위는 extracellular face이며<sup>24,25</sup> 강심배당체의 일종인 ouabain은 형질막을 잘 통과하지 못하므로<sup>26</sup> 분리한 형질막의  $[^3\text{H}]\text{ouabain}$ 결합은 rightside-out vesicles 또는 leaky form에서 가능하고 inside-out에서는 불가능하다. 본 실험에서는 형질막 분획중 inside-out population을 알아보기 위하여 Method 1으로 분리한 형질막을 각 농도의 SDS로 처리한 후  $[^3\text{H}]\text{ouabain}$  결합실험을 시행하여 보았다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 형질막의  $[^3\text{H}]\text{ouabain}$ 결합은 형질막 단백질  $\mu\text{g}$ 당  $0.3 \sim 0.4 \mu\text{g}$ 의 SDS를 처리했을 때 최대로 증가되었다가 이 농도를 더욱 증가시키면 점차 감소되어 SDS농도가  $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{g protein}$ 일때 거의 ouabain결합이 일어나지 않았다. SDS에 의한 ouabain 결합의 최대증가가 약 35%이었으므로 여기서 사용한 Method 1의 형질막 중 약 26%가 inside-out인 것으로 추정된다.

전술한 바와 같이  $[^3\text{H}]\text{ouabain}$  결합실험으로 inside-out vesicles의 비율계산이 가능하므로 각



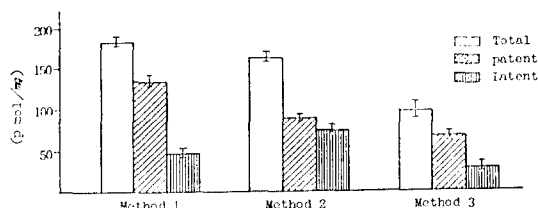
**Fig. 4**—Effect of SDS on  $[^3\text{H}]\text{ouabain}$  binding of canine cardiac sarcolemma prepared by method 1. Legends are the same as described in Table III.

**Table III**— $[^3\text{H}]$  ouabain equilibrium binding of canine cardiac sarcolemma.

Method	$[^3\text{H}]$ ouabain binding (p mol/mg)		% from total
	Patent	Total	
1	138.8±3.5	187.6±4.5	74.0±4.0
2	90.2±1.3	166.4±5.3	54.2±3.5
3	69.6±3.7	98.6±8.2	70.6±6.7

Ouabain binding was carried out in the presence of 50mM Tris-Cl, 5mM MgCl<sub>2</sub> and 5mM Tris-Pi. After incubation of sarcolemmal membranes (20~30 µg/ml) for 90min at 37°C with 0.1µM  $[^3\text{H}]$  ouabain, the reaction mixture was rapidly filtered on 0.45µm methylcellulose filter (Gelman). Nonspecific binding was measured by the inclusion of 1mM unlabeled ouabain in the above medium. Total  $[^3\text{H}]$  ouabain binding represents the ouabain binding of sarcolemma treated with SDS (0.3~0.4 µg/µg protein) (for SDS treatment of sarcolemma, see Methods). Values are mean±SEM of four different preparations.

방법으로 분리한 형질막 분획을 최적농도의 SDS로 처리한 후  $[^3\text{H}]$ ouabain 결합실험을 시행하였던 바 Method 2로 분리한 형질막에서 SDS처리에 의한 ouabain 결합증가가 가장 컸다. 한편, Method 1으로 분리한 형질막의 patent ouabain 결합이 Method 3의 2배에 달하였으나 total ouabain결합 역시 Method 1에서 2배가 크므로 total ouabain결합에 대한 patent ouabain결합의 비는 서로 유사하였다(Table III). Total ouabain결합에서 patent ouabain 결합을 감한 latent ouabain 결합은 Method 1, 2, 및 3에서 각각 total ouabain



**Fig. 5**—Patent, latent and total  $[^3\text{H}]$  ouabain equilibrium binding of canine cardiac sarcolemma. Legends are the same as described in Table III. Latent  $[^3\text{H}]$  ouabain equilibrium binding was calculated by substraction the patent binding from total  $[^3\text{H}]$  ouabain binding measured after SDS-treatment.

결합의 약 26%, 46% 및 29%로 계산되었으며 이 비율은 각 방법에서 분리한 형질막 분획의 inside-out vesicles의 비율에 해당된다. 따라서 inside-out vesicles은 Method 2로 분리한 형질막 중에 가장 많이 함유되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 5).

## 고 찰

본 실험에서 분리한 형질막 분획은 미토콘드리아와 근소포체의 오염이 극히 적은 비교적 순수한 형질막으로서 그 정제도에 있어서는 Van Alstyne 등의 방법<sup>15)</sup>이나 Lee 등의 방법<sup>16)</sup>으로 분리한 것과 유사하였으나 단백질 수율에 있어서는 이들의 방법보다 훨씬 양호하였고 leaky form이 많았다.

분리한 형질막 분획중에는 형질막이 homogenate보다 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase활성으로 볼때는 약 30배, radioligand결합으로 볼때는 약 45배 더 많이 함유되어 있었다. 그러나 homogenate중에는 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 이외에 mitochondrial ATPase, 근소포체의 Ca<sup>2+</sup>-ATPase, myosin ATPase 등 다른 ATPase가 다량 함유되어 있기 때문에 이들의 활성이 높은 반면 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 활성이 낮아 측정의 오차가 크므로 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase활성을 기준으로 homogenate로 부터 형질막 분획까지의 형질막의 정제정도를 판정하기는 어려운 것으로 사료된다. 한편 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase에 선택적인 ouabain결합이나 막에 존재하는 자율신경 수용체 결합은 비특이결합이 적을 뿐 아니라 본 실험결과 3종류의 radioligand결합실험에서 다같은 정제정도를 보였으므로 여기서 계산된 purification factor 45가 더욱 정확한 값이 될 것으로 추정되며 이 purification factor는 Philipson 등<sup>26)</sup>과 Van Alstyne 등<sup>15)</sup>이 보고한 값과는 유사하나 Hui 등<sup>27)</sup>, Velema 등<sup>28)</sup>의 10~20보다는 훨씬 큰 수치였다.

형질막 분리에 있어서 형질막 분획의 정제정도도 중요하겠지만 지속적이고 효과적인 형질막 기능의 추구하고 더 이상의 정제를 시도하기 위해서는 형질막의 수율이 높아야 한다. 본 실험에

서 분리한 형질막 분획의 심실조직 100g당 단백질 수율은 약 16mg으로서 Van Alstyne 등<sup>15)</sup>, Kuwayama 등<sup>20)</sup>의 방법에서 보고된 수율보다 각각 1.6배, 8배 높았으며 Lee 등<sup>16)</sup>의 방법(Method 2) 및 Jones 등의 방법<sup>14)</sup>을 수정해서(Method 3) 분리한 분획의 수율보다는 각각 2배와 3배가 높았다. Method 1으로 분리한 형질막 분획의 total ATPase 및  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 활성이 Method 2로 분리한 것과 유사하고 total ATPase활성에 대한  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성 역시 약 85%로 두 방법에서 유사하였음은 Method 1에서의 수율증가가 형질막 이외의 다른 subcellular fraction의 오염증가에 기인했다기 보다는 형질막 회수율의 증가에 기인하였음을 시사한다. 한편, Method 3에서 형질막 수율이 낮고 총 ATPase활성에 대한 mitochondrial ATPase 및 residual ATPase활성의 비가 Method 1과 2에서 보다 컸음은 분리과정 중에 형질막의 소실이 많았을 뿐 아니라 분리한 분획중에 미토콘드리아와 수축성 단백질의 오염도 Method 1 및 2에 비하여 상대적으로 많음을 의미한다. 그러나 분리한 형질막 분획의 ATP의존성  $\text{Ca}^{2+}$  섭취가 oxalate의 영향을 전혀 받지 않았다는 점으로 미루어 근소포체의 오염은 거의 없는 것으로 생각되고 형질막 분획중에서 측정된  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase활성은 형질막  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase에 기인한 것으로 추측된다. 이는 근소포체의 ATP의존성  $\text{Ca}^{2+}$  축적은 oxalate로 촉진되는데 반해 형질막의 ATP의존성  $\text{Ca}^{2+}$  섭취는 oxalate에 영향을 받지 않는다는 점<sup>30)</sup>으로 뒷받침 될 수 있다.

전술한 바와 같은 형질막 분획의 정제도 및 형질막의 수율 이외에도 형질막분리에 중요한 것은 목적하는 실험에 적합한 방향성을 갖게 하는 것이다. 즉, 물질이동실험을 위해서는 sealed vesicles form이 많아야 하며 radioligand결합을 위해서는 leaky form이 sealed vesicles보다 유리하다. Sealed vesicles일 경우 대부분 생체내와 같은 조건인 rightside-out vesicles이 요구되나 형질막의  $\text{Na}^+$ -pump나 ATP의존성  $\text{Ca}^{2+}$  섭취실험은 ATP결합부위가 cytosol쪽이고<sup>22,23)</sup> medium 중에 가한 ATP가 세포막을 통과할 수 없으므로

inside-out vesicles에서만 가능하다. 그러나 radioligand 결합실험에서는 radioligand의 결합부위가 세포막 바깥쪽에 존재하고 radioligand가 막을 통과하지 못할 경우 sealed inside-out vesicles에서는 그 측정이 불가능하다. 따라서 목적하는 실험을 원만하게 수행하고 그 결과를 정확하게 해석하기 위해서는 반드시 분리한 형질막의 방향성이 결정되어야 한다.

형질막의 방향성은 막외부 혹은 내부의 어느 한 쪽에만 결합 또는 활성부위가 있는 물질을 선정하고 이의 결합 또는 활성을 막 투과성 증가물질의 처리 전후에서 비교함으로써 결정될 수 있다. 실제로  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성은 ATP가 결합할 수 있는 inside-out vesicles이나 leaky form에서 측정되고 ouabain결합은 rightside-out vesicles이나 leaky form에서 측정되므로 detergent처리 후 증가되는  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성과 ouabain결합은 각각 rightside-out과 inside-out에 해당된다고 볼 수 있다. Sodium dodecyl sulfate(SDS)는 sealed vesicles의 막을 붕괴시켜 latent  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성이나 ouabain결합을 unmasking하는 강력한 음이온 계면활성제로 잘 알려져 있다.<sup>31,32)</sup> 본 실험의 Method 1에서 분리한 형질막 분획을 SDS최적농도로 처리했을 때  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성과 [ $^3\text{H}$ ] ouabain결합이 각각 31% 및 35% 증가되었음은 이 분획중에 rightside-out과 inside-out vesicles이 각각 24% 및 26% 함유되어 있고 나머지 50%는 leaky form으로 존재함을 시사한다. 한편, Jones 등의 방법<sup>14)</sup>을 수정한 방법, 즉 처음 polytron으로 균질화하고 g force만 달리하여 형질막을 분리하는 방법에서 leaky form이 적고(22%) rightside-out vesicles이 많은 점(49%)으로 미루어 균질화 과정의 반복은 sealed vesicles을 줄이고 leaky form을 증가시키는 것으로 생각된다. 따라서 처음 조직을 omnimixer로 강하게 균질화한 후 형질막을 분리하는 본 실험의 형질막 분리방법(Method 1)은 비록 sealed vesicles이 적어 이온 이동실험에는 부적합하나 그 정제도가 양호하고 형질막 수율이 높아 형질막 분획을 더욱 정제하고자 할 때 또는 막에 존재하는 일반적인 수용체



결합실험을 위한 형질막 분리에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각되며 동일 심장에서 형질막과 근소포체를 동시에 분리할 수 있어 두 subcellular fraction에 대한 비교실험 및 실험재료 절약에도 매우 효과적일 것으로 사료된다.

## 결 론

형질막 분획의 정제정도와 그 방향성은 형질막을 대상으로 하는 실험에 매우 중요하므로 본 실험에서는 근소포체 분리 시 이용되지 않는 first pellet로부터 형질막 분리를 시도하고(Method 1) 이 형질막 분획의 수율, 정제도 및 방향성을 Lee 등의 방법(Method 2) 및 Jones 등의 방법을 수정한 방법(Method 3)으로 분리한 형질막 분획과 비교 검토하였다.

1. 분리한 형질막 분획의  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성과 [ $^3\text{H}$ ] ouabain, [ $^3\text{H}$ ] DHA 및 [ $^3\text{H}$ ] QNB결합은 homogenate보다 각각 약 29배와 45~50배 많았다.

2. 심실조직 100g당 형질막 분획의 단백질 수율은 Method 1에서 약 15.7mg으로 가장 높았으며 Method 2와 3에서는 이보다 2배~3배가 낮았다.

3. Method 1로 분리한 형질막 분획의  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성은  $144.6 \pm 16.4 \mu\text{mol Pi/mg protein/hr}$  ( $n=4$ )로서 총 ATPase활성의 약 85%를 차지하였고 Method 2에서도 이와 유사하였으나 Method 3에서는  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성이 Method 1의 50%에 불과하였을 뿐 아니라 Method 1과 2에 비하여 미토콘드리아와 수축성 단백질의 오염이 상대적으로 많았다.

4. 형질막 분획의 ATP의존성  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  섭취는 5레에서  $8.2 \pm 0.4 \text{ nmol/mg protein}$ 으로 oxalate의 영향을 받지 않았다.

5. SDS처리(0.3~0.4mg SDS/mg protein) 전후의 [ $^3\text{H}$ ] ouabain결합과  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성 비교로 제조된 Method 1, 2 및 3 형질막 분획의 rightside-out 및 inside-out vesicles와 leaky form의 비는 각각 24 : 26 : 50, 32 : 46 : 22 및 49 : 29 : 22이었다.

6. 이상 실험결과 본 실험에서 분리한 형질막 분획은 비교적 잘 정제되었을 뿐아니라 수율이 높고 leaky form이 많아 막의 수용체 결합실험에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 문 헌

- 1) Reeves, J.P., and Sutko, J.L.: Sodium-calcium ion exchange in cardiac membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 590 (1979).
- 2) Caroni, P., Reinlib, L., and Carafoli, E.: Charge movements during the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange in heart sarcolemmal vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6354 (1980).
- 3) Bartschat, D.K., Cyr, D.L., and Lindenmayer, G.E.: Depolarization-induced calcium uptake by vesicles in a highly enriched sarcolemma preparation from canine ventricle. *J. Biol. Chem.* **255**, 10044 (1980).
- 4) Bers, D.M., Philipson, K.D., and Nishimoto, A.Y.: Sodium-calcium exchange and sidedness of isolated cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **601**, 358 (1980).
- 5) Gilbert, J.R., and Meissner, G.: Sodium-calcium ion exchange in skeletal muscle sarcolemmal vesicles. *J. Membrane Biol.* **69**, 77 (1982).
- 6) Aronstam, R.S., Abood, L.G., and Baumgold, J.: Role of phospholipids in muscarinic binding by neural membrane. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 1689 (1977).
- 7) Mooney, J.J., Horne, W.C., Handin, R.I., Schildkraut, J.J., and Alexander, R.W.: Sodium inhibits both adenylate cyclase and high-affinity [ $^3\text{H}$ ]-labeled p-aminoclonidine binding to  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in purified human platelet membranes. *Mol. Pharmacol.* **21**, 600 (1982).
- 8) Heitz, A., Schwartz, J., and Velly, J.:  $\beta$ -adrenoceptors of the human myocardium: determination of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  subtypes by radioligand binding. *Br. J. Pharmac.* **80**, 711 (1983).
- 9) Schwartz, J., and Velly, J.: The  $\beta$ -adrenoceptor of pig coronary arteries: determination of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  subtype by radioligand binding. *Br. J. Pharmac.*

- 79, 409 (1983).
- 10) El-Fakahany, E.E., Triggle, D.J., Eldefrawi, A. T., and Eldefrawi, M.E.: Distinction between high-affinity [ $^3\text{H}$ ]-phencyclidine binding sites and muscarinic receptors in guinea pig ileum muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **229**, 447 (1984).
  - 11) Skou, J.C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 394 (1957).
  - 12) Skou, J.C.: Further investigations on a  $\text{Mg}^{2+} + \text{Na}^{+}$  activated adenosine triphosphatase possibly related to the active linked transport of  $\text{Na}^{+}$  and  $\text{K}^{+}$  across the nerve membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **42**, 6 (1960).
  - 13) Schwartz, A., Allen, J.C., and Harigaya, S.: Possible involvement of cardiac  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ -ATPase in the mechanism of action of cardiac glycosides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **168**, 31 (1969).
  - 14) Jones, L.R., Besch, Jr., H.R., Fleming, J.W., McConnaughey, M.M., and Watanabe, A.M.: Separation of vesicles of cardiac sarcolemma from vesicles of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **254**, 530 (1979).
  - 15) Van Alstyne, E., Burch, R.M., Knickelbein, R. G., Hungerford, R.T., Gower, E.J., Webb, J.G., Poe, S.L., and Lindenmayer, G.E.: Isolation of sealed vesicles highly enriched with sarcolemma makers from canine ventricle. *Biochim. Biophys. Acta*, **602**, 131 (1980).
  - 16) Lee, S.W., Schwartz, A., Adams, R.J., Yamori, Y., Whitmer, K., Lane, L.K., and Wallick, E.T.: Decrease in  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ -ATPase activity and [ $^3\text{H}$ ]-ouabain binding sites in sarcolemma prepared from hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **5**, 682 (1983).
  - 17) Kranias, E.G., Schwartz, A., and Jungmann, R. A.: Characterization of cyclic 3',5'-AMP-dependent protein kinase in sarcoplasmic reticulum and cytosol of canine myocardium. *Biochim. Biophys. Acta*, **709**, 28 (1982).
  - 18) Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
  - 19) Fiske, C.H., and Subbarow, Y.: Phosphocreatine. *J. Biol. Chem.* **81**, 629 (1929).
  - 20) Schwartz, A., Lindenmayer, G.E., and Allen, J.C.: The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* **27**, 3 (1975).
  - 21) Wallick, E.T., Lane, L.K., and Schwartz, A.: Biochemical mechanism of the sodium pump. *Ann. Rev. Physiol.* **41**, 397 (1979).
  - 22) Schatzmann, H.J.: Intracellular phosphate release by the  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$  activated membrane ATPase. *Experientia (Basel)*, **20**, 551 (1964).
  - 23) Hoffman, J.F.: The red cell membrane and the transport of sodium and potassium. *Am. J. Med.* **41**, 666 (1966).
  - 24) Koefoed-Johnson, V.: The effect of g-strophanthin (ouabain) on the active transport of sodium through the isolated frog skin. *Acta. Physiol. Scand.* **42**, 87 (1958).
  - 25) Whittam, R.: The asymmetrical stimulation of a membrane adenosine triphosphatase in relation to active cation transport. *Biochem. J.* **84**, 110 (1962).
  - 26) Philipson, K.D., and Nishimoto, A.Y.:  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange in inside-out cardiac sarcolemmal vesicles. *J. Biol. Chem.* **257**, 5111 (1982).
  - 27) Hui, C.W., Drummond, M., and Drummond, G.I.: Calcium accumulation and cyclic AMP-stimulated phosphorylation in plasma membrane-enriched preparations of myocardium. *Arch. Biochem. Biophys.* **173**, 415 (1976).
  - 28) Velema, J., and Zaagma, J.: Purification and characterization of cardiac sarcolemma and sarcoplasmic reticulum from rat ventricle muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **212**, 678 (1981).
  - 29) Kuwayama, H., and Kanazawa, T.: Purification of cardiac sarcolemmal vesicles: High sodium pump content and ATP-dependent, calmodulin-activated calcium uptake. *J. Biochem.* **91**, 1419 (1982).
  - 30) Wei, J.W., Janis, R.A., and Daniel, E.E.: Isolation and characterization of plasma membrane from rat mesenteric arteries. *Blood Vessels*, **13**, 279 (1976).
  - 31) Bers, D.M., Philipson, K.D., and Nishimoto, A.Y.: Sodium-calcium exchange and sidedness of isolated

- cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **601**, 358 (1980).
- 32) Jones, L.R., Maddock, S.W., and Besch, Jr., H.R.: Unmasking effect of alamethicin on the ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase,  $\beta$ -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase, and cAMP-dependent protein kinase activities of cardiac sarcolemmal vesicles. *J. Biol. Chem.* **255**, 9971 (1980).