

사람 적혈구막 Band 3의 정제 및 Liposome으로의 도입

영남대학교 의과대학 생화학교실
김재룡 · 김정희 · 이기영

서 론

사람의 적혈구막은 약 52%의 단백질, 40%의 지방, 8%의 탄수화물로 구성되어 있다.¹⁾ 특히 단백질은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동후 coomassie brilliant blue에 염색되는 7종류와 Periodic-Schiff시약에 염색되는 4종류의 주단백질과 그외 20종정도의 minor 단백질로 이루어져 있다.^{2,3)} Band 3는 coomassie brilliant blue에 염색되는 사람의 적혈구막(ghost) 단백질들중에서 가장 많은 약 25%를 차지하며, ghost한개당 1×10^6 개이상 존재하는 major intrinsic glycoprotein으로 분자량은 약 95,000 dalton 정도로 알려져 있다. 작용은 Cl^- , HCO_3^- 및 SO_4^{2-} 등의 음이온과 포도당의 수송에 관여하며, spectrin, ankyrin, actin 등의 세포골격물질 및 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, phosphofructokinase, aldolase, 혈색소등과 결합하고 있으며 적혈구막에서는 dimer로 존재한다. 특히 적혈구에서의 Band 3의 음이온 수송기능은 세포막 단백질들의 수송기능을 이해하는데 큰 기여를 했다.²⁻¹¹⁾

적혈구막의 분리 및 Band 3의 정제에 있어서 Dodge등¹²⁾과 Steck등¹³⁾은 적혈구를 약알칼리 저장액으로 용혈시켜 원심분리하여 ghost을 분리하였으며, Tanner등²⁾은 이 막으로부터 Band 3을 분리하여 그 특징을 규명하고자 하였다. Yu등은 ghost를 Triton X-100으로 처리하여 Band 3를 막의 지방층으로부터 추출한 후, aminoethyl-cellulose ion exchange column chromatography 방법¹⁴⁾ 및 sucrose density gradient ultracentrifugation에 의한 방법¹⁵⁾으로 물리 화학적 및 기능적

특징을 연구하는데 적합한 변성되지 않은 Band 3의 분리정제법을 보고하였다.

한편 인지질을 수화시킴으로 자발적으로 형성되는 lipid vesicle인 liposome은 1965년 Bangham등¹⁶⁾에 의해 multilamellar vesicle형태로 처음 만들어진 이래 Papahadjopoulos등은 sonicated unilamellar vesicle로, Szoka등은 reverse-phase evaporation vesicle¹⁷⁾로 발전시켰고, 최근 Gruner등은 새로운 형태의 multilamellar vesicle인 stable plurilamellar vesicle¹⁸⁾을 소개하였다. 이러한 liposome은 생체막의 model로써 막의 물리적 성질 및 막융합현상을 이해하는데 큰 기여를 했으며, 핵산, 약제, 단백질 및 기타 생체물질들을 특정 세포내 및 조직으로 운반시켜주는 운반체로 이용될 수 있다.¹⁹⁻²²⁾ 사람 적혈구막의 Band 3가 도입된 liposome을 사람 적혈구 및 malaria를 일으키는 *Plasmodium falciparum* 과 같이 섞고 방치하였을 때 *P. falciparum*의 적혈구 내 침입이 억제되는 현상이 보고되었다.²³⁾ 이러한 사실은 liposome으로 도입된 Band 3가 *P. falciparum*과 결합함으로써 *P. falciparum*의 적혈구 내 침입을 억제한다고 할 수 있으므로 단백질의 기능 및 작용을 연구하는데도 liposome이 이용될 수 있다.

본 실험은 Dodge등¹²⁾과 Steck등¹³⁾의 방법으로 사람의 적혈구로부터 ghost를 분리하고, Yu등¹⁴⁾의 방법으로 Band 3를 분리정제한 후, 이것을 liposome에 도입시켜 확인함으로써 liposome과 protein-Band 3-과의 관계 및 Band 3의 기능을 밝히는데 도움을 얻고자 하며, liposome에 핵산 및 다른 물질들을 도입시켜 세포내로 운반시켜 주기위한 운반체로써 이용하고자 한다.

재료 및 방법

재 료

실험재료로는 Sigma로부터 N, N'-methylene-bisacrylamide(Bis), N, N, N', N'-tetramethylenediamine(TEMED), sodium dodecyl sulfate(SDS), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), pronase type V from *Streptomyces griseus*, bovine serum albumin, molecular weight standard proteins, phosphatidyl L-serine 등을 구입하여 사용했고, 전기영동급 acrylamide는 Nakarai, coomassie brilliant blue R250은 Colab lab., ammonium persulfate는 Bio · Rad로부터 구입하여 사용했으며, 기타 시약들은 시판 특급시약을 사용하였다.

방 법

1. 사람 적혈구에서 ghost의 분리

Dodge등¹²⁾과 Steck등¹³⁾의 방법에 의해 적혈구에서 ghost를 분리하였다.

젊은 성인남자에게 채취한 신선한 혈액 25 ml에 0.2 M EDTA 용액 0.1 ml를 가하고 동일량의 찬 5 mM sodium phosphate(pH 8.0) - 0.15 M NaCl 용액으로 희석하였다. Beckman J2-21 refrigerated high speed centrifuge의 JA20 fixed angle rotor를 사용하여 4,700 rpm으로 10분동안 원심분리한 후, 상청액과 buffy coat를 제거하였다. 침전된 적혈구를 50 ml의 5 mM sodium phosphate(pH 8.0) - 0.15 M NaCl에 부유시켜 3번 세척 및 원심분리하면서 적혈구 상층에 있는 buffy coat를 철저히 제거하여 원래 적혈구량의 1/4정도가 줄어들게 하였다. 40 ml의 5 mM sodium phosphate(pH 8.0)에 적혈구를 1.0 - 1.2 ml씩 빨리 섞어 용혈시킨 후, 15,000 rpm으로 10분동안 원심분리하였다. 붉은 상청액을 제거한 후 ghost가 옅은 분홍빛이 될 때까지 5 mM sodium phosphate(pH 8.0) 용액으로 여러번 세척 후 원심분리하였다. 위의 모든 과정은 4°C 이하에서 시행하였다.

2. Band 3의 분리정제

Yu 등의 방법으로 ghost에서 Band 3를 분리하였다.¹⁴⁾

● Step 1 : Band 6-depleted ghost의 조제

ghost로부터 Band 6-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase - 를 제거하기 위하여 ghost를 20 volumes의 찬 51 mM sodium phosphate(pH 8.0) ($\mu = 0.15$) 용액에 섞은 후 20분동안 얼음속에 방치하였다. 4°C에서 15,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 상청액을 제거하고 침전물을 36 mM sodium phosphate(pH 7.5) ($\mu = 0.1$) 용액으로 세척하였다.

● Step 2 : Triton X-100을 이용한 분리

Band 6-depleted ghost에 5 volumes의 0.5% Triton X-100이 포함된 36 mM sodium phosphate(pH 7.5) 용액을 가하고 충분히 섞은 후 얼음속에 20분간 방치하고, 4°C에서 15,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상청액을 회수하였다.

● Step 3 : p-chloromercuribenzoate 처리 및 sucrose density gradient ultracentrifugation.¹⁵⁾

Triton X-100 추출액 10 ml에 신선한 50 mM p-chloromercuribenzoate-0.01 N NaCl-0.1% Triton X-100 용액 0.3 ml를 가하고 20분동안 얼음속에 방치하였다. 초원심분리관의 상부에서부터 10 ml의 5-20% (w/v) sucrose density gradient 용액을 만들고 p-chloromercuribenzoate로 처리된 단백질 용액 0.5 ml를 중첩시킨 후 Sorvall OTD758 ultracentrifuge의 T875 fixed angle rotor를 사용하여 4°C에서 50,000 rpm으로 6시간동안 초원심분리하였다.

관바닥을 주사바늘로 뚫은 후, LKB Uvicord spectrophotometer를 사용하여 280 nm에서 단백질 흡광도를 연속적으로 측정하면서 0.5 ml씩 fraction collector(LKB)로 회수하였다.

3. Liposome의 조제 및 Band 3의 도입

Szoka 등의 reverse-phase evaporation 방법¹⁷⁾으로 liposome을 만들면서 Band 3를 도입시켰다.

분리정제된 Band 3 용액을 Amberite XAD 2 column을 통과하여 Triton X-100을 제거하였다. liposome의 조제를 위하여 phosphatidyl L-serine과 cholesterol을 각각 10 umole씩 chloroform에 용해시킨 후, 25°C에서 200 rpm으로 진공회전증발기를 사용하여 chloroform을 제거하였다. 질소기체로 시험관을 충전시킨 후 diethylether 1.2 ml를 가하여 지질을 용해시키고 Triton X-100을 제거한 Band 3 용액 0.2 ml를 가하였다. 혼합액이 homogeneous opalescent dispersion 또는 clean one phase dispersion이 되도록 2~4분동안 so-

nication하였다. 유기용매를 회전증발시켜 제거한 후 liposome으로 도입되지 않은 Band 3를 분해시키기 위하여 pronase를 1 mg/ml되게 첨가하고 37 °C에서 1시간 방치한 후 phenylmethylsulfonylfluoride를 0.4 mM되게 가하였으며, Eppendorf microcentrifuge를 사용하여 20분동안 원심분리하여 침전물을 회수하였다.

4. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동

Eppendorf tube에 단백용액과 동일한 양의 2x sample load buffer(0.12 M Tris, pH 7.2, 20 % glycerol, 4 % sodium dodecyl sulfate, 10 %-mercaptoethanol and 0.002 % bromophenol blue)를 넣고 잘 섞은 후 65 °C에서 10분간 방치하여 Hamilton microsyringe로 0.1 % sodium dodecyl sulfate가 포함된 polyacrylamide slab gel(16×18×0.5cm)에 적용하였다.

LKB 2001 vertical electrophoresis unit을 사용하여 10 % 또는 7.5 % acrylamide slab gel에서 continuous buffer system²⁴⁾으로 5 V/cm의 일정전압을 유지시키며 5시간동안 전기영동하였다. 전기영동 후 coomassie brilliant blue 염색용액에 gel을 3시간이상 방치한 후 탈색용액으로 24시간동안 탈색시키고 7 % acetic acid에 보관하였다.

5. 단백질 측정

단백질 측정은 Lowry²⁵⁾의 방법을 이용하였고 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

성 적

1. Ghost 및 Band 3의 분리

사람의 적혈구를 5 mM sodium phosphate(pH 8.0) 로 용혈시켜 원심분리한 결과, 붉은 상청액, 적혈구막 그리고 관바닥에 부착된 작고 흰 침전물이 관찰되었으며, 처음 붉은 색의 적혈구막을 5 mM sodium phosphate(pH 8.0)으로 3번 반복세척한 결과 옅은 분홍색이 되었다. 이 ghost의 단백질량은 3~4 mg/ml였다.

Band 3의 분리과정에 따른 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동 결과는 Fig.

1과 같다. ghost를 0.1 % sodium dodecyl sulfate가 포함된 7.5 % polyacrylamide gel에서 전기영동하여 coomassie brilliant blue로 염색한 결과 전형적인 7가지 주단백질들이 확인되었다(Fig. 1, lane a). Band 1, 2는 뚜렷이 분리되지 않았고, Band 3는 sharp leading edge와 diffuse tail을 가지면서 넓게 염색되었으며 molecular weight standard protein과 비교하여 분자량을 측정²⁴⁾ 결과 93,500 dalton이었다. 주단백질의 minor 단백질들도 10~20개정도 관찰되었다. Band 6는 이온강도(μ) 0.15의 용액에 ghost를 방치함으로 제거되었다(Fig. 1, lane b). Band 6-depleted ghost를 Triton X-100으로 처리한 결과 Band 3과 Band 4가 동시에 추출되었으며 Band 1, 2, 5, 7등은 관찰되지 않았다(Fig. 1, lane c). p-chloromercuribenzoate로 처리한 lane d는 Triton X-100추출액의 lane c와 전기영동상에서 별다른 차이가 없었다.

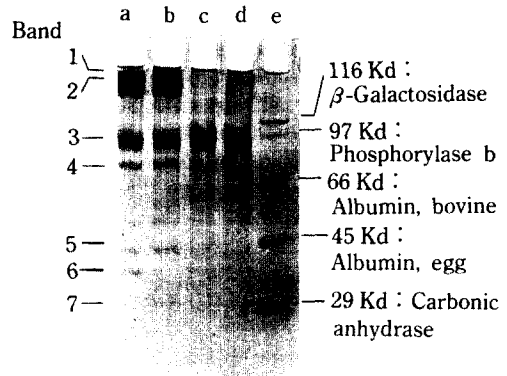


Fig. 1. Steps in the isolation of Band 3 on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel(7.5 %) electrophoresis with coomassie brilliant blue staining. lane a ; ghosts, lane b ; Band 6-depleted ghosts lane c ; Triton X-100 extract, lane d ;Triton X-100 extract treated with p-chloromercuribenzoate, lane e ; Molecular weight standard proteins.

2. Band 3의 정제

p-chloromercuribenzoate 처리한 Triton X-100 추출액을 sucrose density gradient ultracentrifugation하고, 280 nm에서 단백질 흡광도를 연속적으로 측정하면서 fractionation한 결과 19번째 분획에서 최대 흡광도가 나타났고, 각 분획을 so-

dium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동함으로 정제된 Band 3를 확인하고 이를 회수하였다(Fig. 2).

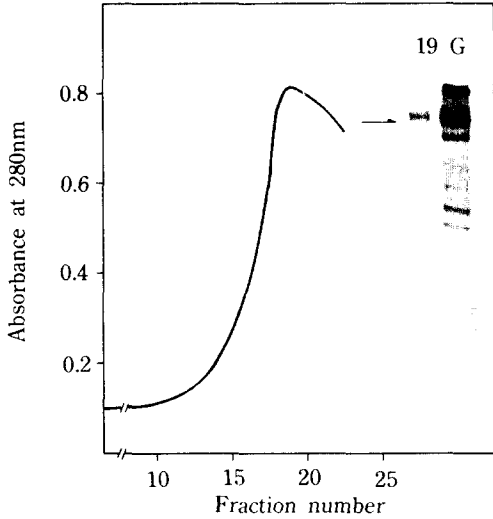


Fig. 2. Fractionation of purified Band 3 from sucrose density gradient ultracentrifugation and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel(10 %) electrophorogram of ghosts(G) and peak fractionate(19). The absorbance for protein was continuously registered by LKB Uvicord spectrophotometer. The arrow indicates the single band of Band 3.

3. Liposome의 조제 및 Band 3의 도입

Phosphatidyl L-serine과 cholesterol을 1 : 1 molar ratio로 혼합하여 reverse-phase evaporation 방법으로 조제한 liposome들은 그 크기와 모양이 다양했으며, 중앙에 aqueous space를 가진 lipid vesicle들이 독립적(S)으로 또는 큰 vesicle내에 포함되어(M) 존재함이 광학현미경으로 관찰되었다(Photo. 1).

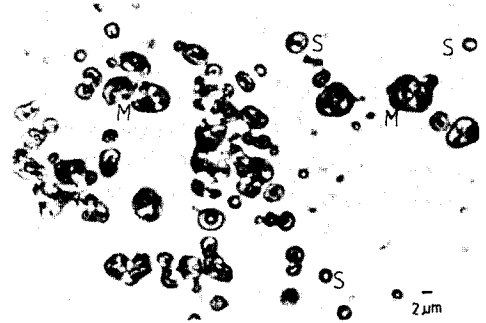
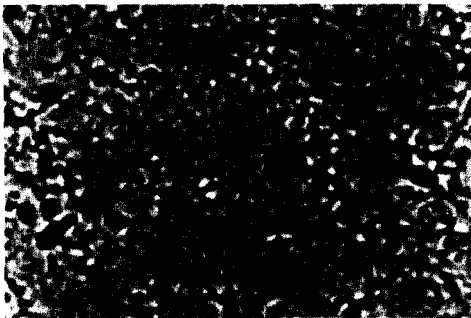


Photo. 1. Liposomes encapsulated with Band 3 prepared by reverse-phase evaporation(x1,000). S : single vesicle, M : multivesicle upper plate : photographed on color film, lower plate : photographed on black and white film.

이 liposome을 파괴시켜 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동한 결과 Band 3을 재확인할 수 있어 Band 3가 liposome으로 도입되었음이 확인되었다(Fig. 3).

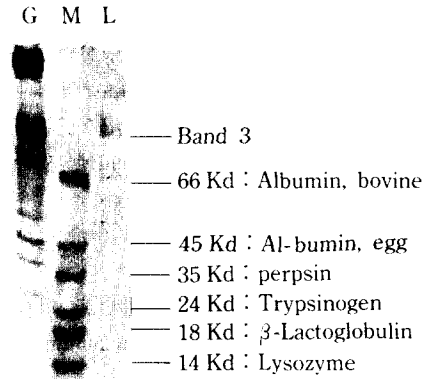


Fig. 3. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel(7.5 %) electrophorogram of ghosts (G), molecular weight standard proteins(M) and Band 3-incorporated liposomes(L).

고 찰

세포막은 주위 환경으로부터 세포를 보호하는 단순한 기능외에 specific molecular pump 또는 gate를 가진 선택적 투과막으로서, 세포와 세포 사이, 세포와 주위 환경 사이의 정보흐름을 조절

하는 조절자로서 생명의 유지 및 조절에 중요하다. 세포막의 기능은 그 분자구조가 명백히 밝혀짐으로 더 잘 이해될 수 있음으로 세포막의 분자구조를 밝히고자 함은 세포생물학의 주요 과제이다. 이러한 목적을 위해 사람의 적혈구는 쉽게 이용할 수 있고 의학에 있어서 중요한 기능을 하는 세포라는 사실 이외에도, 그 막을 완전하게, 다른 세포나 세포내 소기관 및 세포질 내용물과 섞이지 않게 쉽게 분리할 수 있다는 점에서 세포막의 구조를 밝히는데 중요한 재료가 되어왔다.

특히 적혈구막 단백질들은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동 후 coomassie brilliant blue로 염색하여, Fairbanks 등은 6종류,³⁾ Yu 등은 7종류,⁴⁾ Dzandu 등은 8종류²⁶⁾의 주단백질과 기타 10~20종류의 minor 단백질들로 관찰됨을 보고하였다. 본 실험에서도 역시 7종류의 선명한 주단백질들과 그의 10~20종류의 minor 단백질들이 관찰되었다.

Yu 등은 Band 3의 분리과정중, Band 6와 Band 3는 molar ratio 1:1로 결합되어 있기 때문에 ghost를 저이온강도 용액으로 먼저 처리하여 Band 6를 제거할 필요가 있다고 보고하였으며,¹⁴⁾ p-chloromercuribenzoate로 처리하지 않은 Triton X-100 추출액에서보다 p-chloromercuribenzoate 처리한 Triton X-100 추출액에서 Band 3과 Band 4를 더 쉽게 분리할 수 있었으므로 Band 3분리에 p-chloromercuribenzoate 처리가 더 유효하다고 보고하였다.^{4,15)}

본 실험에서 추출 및 정제한 Band 3를 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동 후 coomassie brilliant blue로 염색한 결과, sharp leading edge와 diffuse tail을 가지는 넓은 band로 관찰되었는데, 이러한 양상은 전기영동시 생길 수 있는 단백질 분자들의 가역적인 association-dissociation process에 의해 생길 수 있는 artifactual profile인 것으로 Fairbanks 등은 제안하였으나,³⁾ Yu 등¹⁴⁾과 Markowitz 등²⁷⁾은 동일한 Band 3 polypeptide에 결합된 탄수화물량, 즉 glycosylation 차이로 인한 분자량 차이 때문에 생긴 것임을 규명하였다. ghost와 Band 3 분리과정의 전기영동상에서 가끔 주단백질 band들과 구별되는 60 kd 정도의 band가 관찰되었는데 이는 백혈구 및 혈소판에서 유래된 단백질 분해효소로 인한 Band 3의 분해산물로 밝혀졌다.³⁾ 따라

서 단백질 분해효소로부터 Band 3를 보호하기 위해서는 ghost를 분리하는 과정에서 적혈구 상층에 있는 buffy coat를 철저히 제거해야 하며, 적혈구를 용혈시킨 후 관찰되는 관바닥의 작고 흰 침전물에 단백질 분해효소가 많은 것으로 보고된 바 ghost를 이 침전물과 섞이지 않게 분리하고, 또 단백질 분해효소 억제제인 phenylmethylsulfonyl fluoride 등의 사용도 Band 3의 분리에 중요할 것으로 생각된다.

Okoye 등²³⁾은 DEAE-cellulose ion exchange chromatography 방법으로 Triton X-100 추출액에서 Band 3를 분리하였다. 본 실험에서도 역시 이 방법으로 Band 3분리를 시도하였으나, DEAE-cellulose를 거쳐 나온 단백질들이 희석되어 농축된 단백질을 얻는데 많은 시간이 소비됨으로 인한 단백질 분해 때문에 기대되는 Band 3의 분리가 어려웠다. 그러나 sucrose density gradient ultracentrifugation을 이용한 방법은 간편하고 신속히 Band 3를 분리할 수 있고 기대되는 많은 양을 얻을 수 있어 더 효과적인 것으로 생각된다.

한편 인공적으로 만들어진 phospholipid vesicle인 liposome은 세포막의 model 로써 세포막의 물리적 성질 및 세포융합 현상을 이해하는데 크게 기여했으며, 약제, 효소 및 항암제 등을 도입시켜 in vivo에서는 특별한 표적조직으로 운반하기 위한 수단으로, in vitro에서는 세포내로 비투과성 물질의 더 많이 넣기 위한 수단으로 많이 연구되어졌다.²²⁾ 특히 Szoka 등은 reverse-phase evaporation법에 의해 만들어진 liposome이 multilamellar vesicle, sonicated unilamellar vesicle보다 vesicle내 aqueous space가 더 넓어 핵산 약제 및 단백질 등을 더 많이 encapsulation 할 수 있어 이러한 물질들의 세포내 운반에 더 유용한 것으로 보고하였으며,¹⁷⁾ Schaeffer-Ridder 등은 liposome을 이용하여 thymidine kinase gene을 진핵세포내로 도입시켜 형질발현을 관찰한 결과 지금까지 사용된 몇가지 유전자 도입 방법보다 더 효과적이었음을 보고한 바¹⁹⁾ 운반체로서 liposome의 효용성이 밝혀졌으며, 약제 등을 liposome에 도입시켜 생체내 특정장소로 운반하여 그 효과를 관찰함도 많이 연구 보고되고 있다.²⁰⁾

또 Yu 등은 완전 분리정제 및 부분 분리정제된 Band 3와 지방질을 재조합하여 만든 recombi-

nant Band 3-lipid complex의 Band 3는, 저이온 강도용액으로 추출되지 않으며, 지방층내에서 dimer로 존재하고, spectrin, actin등과 결합하는 성질을 관찰함으로써, 또 이 복합체를 freeze fracture시켜 관찰한 전자현미경 소견등으로 적혈구 및 ghost에 존재하는 Band 3의 특징을 나타냄을 보고하였다.²⁸⁾

Reverse-phase evaporation방법외에 Calcium-EDTA chelation방법²⁹⁾을 이용한 liposome의 제조도 시도하였으나 앞의 방법보다 더 좋은 liposome을 얻을 수 없었다.

본 실험에서 우리는 Band 3를 ghost로부터 분리하여 liposome에 도입시켜 확인 관찰해 봄으로써, 앞으로 liposome에 핵산, 약제, 단백질및 기타 생체 물질등을 도입시켜 세포내로 운반하여 그 작용을 관찰할 수 있을 것으로 기대되며 아울러 적혈구에서의 Band 3의 기능및 작용을 연구하는데 도움이 될 것이다.

요 약

사람의 적혈구막으로부터 Band 3를 분리정제하고 이를 liposome내로 도입시켜 그 결과를 관찰하였다. 적혈구를 약알칼리 저장액으로 용혈시켜 막을 분리한 후, 저이온강도 용액으로 처리하여 Band 4를 추출하였다. Triton X-100 추출액에 p-chloromercuribenzoate를 가하고 sucrose density gradient ultracentrifugation후 fractionation하여 Band 3를 정제하였다. phosphatidyl L-serine과 cholesterol을 1:1 molar ratio로 섞고 진공회전 증발기를 사용하여 chloroform을 제거한 후 Triton X-100을 제거한 Band 3용액을 가하고 sonication함으로 liposome(reverse-phase evaporation vesicle)을 만들면서 Band 3를 도입시켰다.

Band 3의 분리정제및 liposome에 도입되었음은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동 후 coomassie brilliant blue 염색으로 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Steck, T. L. : The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *J. Cell Biol.*, 62 : 1-18, 1974.
- Tanner, M. J. A. and Boxer, D. H. : Separation and some properties of the major proteins of the human erythrocyte membrane. *Biochem. J.*, 129 : 333-347, 1972.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. and Wallach, D. F. H. : Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10 : 2606-2617, 1971.
- Bander, W. W., Garan, H. and Berg, H. C. : Proteins of the human erythrocyte membrane as modified by pronase. *J. Mol. Biol.*, 58 : 783-797, 1971.
- Bretscher, M. S. : Human erythrocyte membranes : specific labelling of the surface proteins. *J. Mol. Biol.*, 58 : 775-781, 1971.
- Jay, D. G. : Glycosylation site of Band 3, the human erythrocyte anion exchange protein. *Biochemistry*. 25 : 554-556, 1986.
- Tsuji, T., Irimura, T. and Osawa, T. : The carbohydrate moiety of Band 3 glycoprotein of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.*, 256 : 10497-10502, 1981.
- Bennett, V. and Stenbuck, P. J. : Human erythrocyte ankyrin. *J. Biol. Chem.*, 255 : 2540-2548, 1980.
- Houslay, M. D. and Stanley, K. K. : Dynamics of biological membrane. John Wiley and Sons Ltd., N. Y., 1980, pp. 171-178.
- Cuppoletti, J., Goldinger, J., Kang, B., Jo, I., Berenski, C. and Jung, C. Y. : Anion carrier in the human erythrocyte exists as a dimer. *J. Biol. Chem.*, 260 : 15714-15717, 1985.
- Hsu, L. and Morrison, M. : A new variant of the anion transport protein in human erythrocyte, *Biochemistry*, 24 : 3086-3090, 1985.
- Hanahan, D. J. and Ekholm, J. E. : The preparation of red cell membrane. *Methods in Enzymology*. 31 : 168-172, 1974.
- Steck, T. L. and Kant, J. A. : Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membrane. *Methods in Enzymology*, 31 : 172-180, 1974.

- 74.
14. Yu, J. and Steck, T. L. : Isolation and characterization of Band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. chem.*, 250 : 9170-9175, 1975.
 15. Yu, J. and Steck, T. L. : Association of Band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.*, 250 : 9176-9184, 1975.
 16. Banghaam, A. D., Standish, M. M. and Watkins, J. C. : Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, 13 : 238-252, 1965.
 17. Szoka, F. and Papahadjopoulos, D. : Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. atl. Acad. Sci. USA*, 75 : 4194-4198, 1978.
 18. Gruner, S. M. : novel multilayered lipid vesicles : comparison of physical characteristics of multilamellar liposomes and stable plurilamellar vesicles. *Biochemistry*, 24 : 2833-2842, 1985.
 19. Schaeffer-ridder, M., Wang, Y. and Hofschneider, P. H. : Liposome as gene carrier : efficient transformation of mouse L cell by thymidine kinase gene. *Science*, 215 : 166-168, 1982.
 20. Gregoriadis, G. : Tailoring liposome structure. *ature*, 283 : 814-815, 1980.
 21. Bangham, A. D. : Preparation of liposomes and methods for measuring their permeabilities. *Techniques in the life sciences*, B 420 : 1-25, 1982.
 22. Papahadjopoulos, D., Fraley, R., Heath, T. D. and Streaubinger, R. M. : Liposomes : recent advances in methodology for introducing macromolecules into eukaryotic cells. *Techniques in cellular physiology*, P114 : 1-18, 1982.
 23. Okoye, V. C. . and Bennett, V. : Plasmodium falciparum Malaria : Band 3 as a possible receptor during invasion of human erythrocytes. *Science*, 227 : 169-171, 1985.
 24. Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244 : 4406-4412, 1969.
 25. Lowry, O. H., Rosebrugh, . J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 275, 1951.
 26. Dzandu, J. K., Deh, M. E., Barratt, D. L. and Wise, G. E. : Detection of erythrocyte membrane proteins, sialoglycoproteins and lipids in the same polyacrylamide gel using a double staining technique. *Proc. atl. Acad. Sci. USA*, 81 : 1733-1737, 1984.
 27. Markowitz, S. and Marchesi, V. J. : The carboxyl-terminal domain of human erythrocyte Band 3. *J. Biol. Chem.*, 256 : 6463-6468, 1981.
 28. Yu, J. and Branton, D. : Reconstruction of intramembrane particles in the recombinants of erythrocyte protein Band 3 and lipid : effects of spectrin-actin association. *Proc. atl. Acad. Sci. USA*, 73 : 3891-3895, 1976.
 29. Papahadjopoulos, D., Vail, W., Jacobson, K. and Poste, G. : Cocholate lipid cylinders : formation by fusion of unilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, 394 : 483-491, 1975.

- Abstract -

Purification of Band 3 from the Human Erythrocyte Membrane and its Incorporation into Liposome

Jae Ryong Kim, Jung Hye Kim, and Ki Yung Lee

*Department of Biochemistry
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea*

Band 3, the predominant 95,000 dalton anion transport protein, is the major intrinsic glycoprotein of the human erythrocyte membrane. This anion carrier exists as a dimer and binds the cytoskeletons such as spectrin, ankyrin and actin. And the liposomes are vesicular structures which form spontaneously upon hydration of phospholipids. These artificial lipid vesicles have been investigated as model of the biological membranes and as a mean of improving the delivery of nucleic acids, drugs, proteins and biological substances to specific target tissues and cells.

In this study, we were purified Band 3 from the human erythrocyte membrane(ghost) was prepared by hemolysis of intact human erythrocyte with weak alkali-hypotonic solution. Band 6 was removed from ghost by extracting with solution of an ionic strength of 0.15. Band 3 and Band 4 were solubilized selectively by extracting Band 6-depleted ghosts with Triton X-100 under nondenaturing conditions. Band 3 was then purified from Triton X-100 extract treated with p-chloromercuribenzoate by sucrose density gradient ultracentrifugation.

This purified Band 3 was incorporated into liposomes prepared by reverse-phase evaporation. Phosphatidyl L-serine and cholesterol(1:1 molar ratio) were dissolved in chloroform and then chloroform was removed by rotatory evaporation under reduced pressure. Band 3 solution without Triton X-100 was introduced into a mixture of lipids and diethylether. Diethylether was subsequently removed by evaporation.

This purified Band 3 and its incorporation into liposomes were confirmed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.