

TABLE 1

PURIFICATION OF THE NaK ATPase FROM THE RECTAL GLANDS OF TEN DOGFISH

Fraction	Total Units (μ moles Pi/hr)	Total protein (mg)	Specific activity (μ moles Pi/mg protein/hr)
Homogenate	75,500	1,830	41
Crude membranes	34,500	203	170
Purified membranes	24,000	60	400
NaI-treated membranes	19,500	17.3	1,130

gland is about 60% homogeneous. Since further stages of purification (dependent on a zonal centrifuge not available at M.D.I.B.L.) not used here purify the brain enzyme an additional sevenfold there is a reasonable probability that the use of these procedures will achieve complete or almost complete homogeneity. It has been found that the rectal gland NaK ATPase is completely stable on freezing the glands at -70° and storage at that temperature for at least 4 months. Membranes with a specific activity of 200 μ moles Pi/mg protein/hr can be prepared from stored frozen rectal glands in a yield of about 20-30%. In summary, purification of the NaK ATPase from the rectal gland of the dogfish appears to be highly feasible and offers the real hope that homogeneous enzyme will be obtained in the not too distant future. This work was aided by grants from the National Institute of Neurology and Stroke (NS-01730) and the National Science Foundation (GB-30852).

1971 #20

THE EFFECT OF CO₂ AND CARBONIC ANHYDRASE INHIBITION ON SODIUM ACCESSION TO CSF IN *Squalus acanthias*

Michel Istin and Thomas H. Maren; Commissariat a l'energie Atomique, Station Zoologique, Villefranche-sur-mer, France, and Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida

In previous work (Bull Mount Desert Island Biol. Lab 10, 49, 1970 and Am. J. Physiol., Feb. 1972) it has been shown that hypercapnia increases the rate of HCO₃⁻ formation in CSF. In this Bulletin (Maren, Welliver, and Istin) hypercapnia (5% CO₂) increased the Na⁺ concentration of CSF. In the following experiment we show the effect of hypercapnia and the carbonic anhydrase inhibitor methazolamide on the rate of transfer of ²²Na from plasma to CSF.

The fish are prepared in the laboratory according to the technique described by Pierce & Kent (Bull. MDIBL 8, 49, 1968) and used in our previous experiments cited above. The brain is made accessible by opening a window one cm wide in the cranial cavity. One hour after injection of radioactive sodium (50-70 microcuries of Na^{22} per fish) 20 μl of CSF per sample are collected each 12 minutes with a Hamilton microsyringe. After the fourth collection period the animal is rendered hypercapnic by admitting 5% CO_2 to the sea water perfusing the gills. In another experiment after 5 control collection periods, 50 mg/kg of methazolamide is injected into the fish and collection of CSF made for another 5 periods. The plasma concentration of radioactive sodium declined only slightly during the course of an experiment (Bull. Mount Desert Island Biol. Lab 10, 44, 1970).

Results obtained are shown by the curves of Figure 1. The results for two experiments of this type agree well. The augmentation of entry flux of Na^{22} during hypercapnia is 20%. The reduction

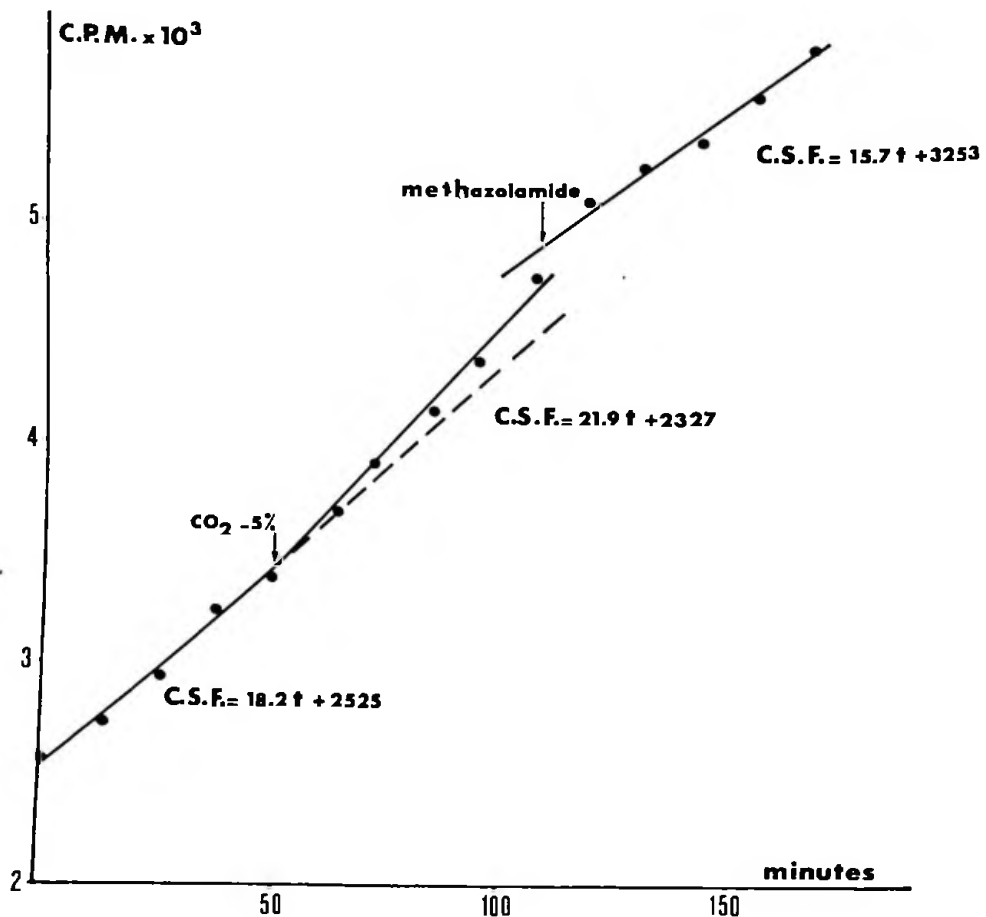


Figure 1: Effect of hypercapnia and Carbonic Anhydrase inhibition on the entry of sodium to CSF. The equations are those of linear regression calculated for each experimental period. The first four periods are controls, and apply to both CO_2 and methazolamide experiments

of ^{22}Na entry by methazolamide is 14%. The results agree with the effects of hypercapnia and carbonic anhydrase inhibition on the concentration of cold Na^+ in CSF of *S. acanthias* (Maren, Welliver and Istin, This Bulletin).

1971 #21

pH MEASUREMENT AND BICARBONATE FORMATION IN THE FROG SKIN (*Rana clamitans*)

Michel Istin. Commissariat à l'Energie Atomique, Station Zoologique, Villefranche-sur-mer, France, and Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida.

Les amphibiens compensent leurs pertes rénales d'ions à partir du milieu extérieur à travers la peau. Garcia Romeu et col. (J. Gen. Physiol., 53 (1969), 816-835) ont montré que dans la grenouille, la peau "in vivo", absorbe du sodium et du chlore indépendamment, H^+ et HCO_3^- étant échangés respectivement contre du sodium et du chlore. Il devient toutefois difficile d'expliquer dans la peau les échanges ioniques sans la présence d'anhydrase carbonique dont le rôle est suggéré par Motais et Garcia Romeu (dans "Transport mechanisms in the Teleostean gill and amphibian skin," sous presse A.R. Physiology, 1972.). Le manque de succès dans la recherche de cette enzyme pour ce tissu pourrait être dû à des artéfacts expérimentaux, comme cela a été le cas pour la vessie de tortue dans laquelle elle a fini par être décelée (Scott et col., Biochem. Biophys. Acta, 219 (1970), 248-250).

Il a paru intéressant, dans ces conditions, d'approfondir l'étude des mécanismes d'échange des bicarbonates dans la peau de grenouille. Cette étude est restée jusqu'à ce jour imprécise pour deux raisons qui compliquent l'interprétation des résultats. La première est en rapport avec la fonction respiratoire de la peau qui s'ajoute à la fonction d'échanges d'ions. La seconde est liée aux difficultés techniques rencontrées pour déterminer tous les éléments de la réaction d'équilibre du CO_2 et des bicarbonates quand l'on n'a pas accès au pH intracellulaire. Le but de ce travail est la mise au point d'une méthode simple permettant la détermination des pH intracellulaires.

I-Détermination du pH cellulaire moyen, de la concentration des bicarbonates et du CO_2 de la peau de grenouille:

La partie ventrale de la peau d'une grenouille (*Rana Clamitans*) est prélevée, rapidement séchée par tamponnement avec du papier filtre et immédiatement séparée en deux fractions aliquotes. Après pesée, un premier fragment est congelé et placé dans le vide pendant 2 à 3 heures à -20°C . L'autre fraction est plongée dans une solution alcaline ($\text{HONa } .3\text{ N}$, $\text{CNK } 10^{-2}\text{ M}$), puis désagrégée à l'aide d'un broyeur cellulaire. Le CO_2 total qu'elle contient est déterminé sur l'homogenat par la méthode manométrique de Nathelson. Après une cryodessiccation de 2 à 3 heures le premier fragment est traité comme le précédent et la quantité de CO_2 déterminée correspond au CO_2 des bicarbonates du tissu. En effet la basse température maintenue durant la dessiccation est suffisante pour arrêter pratiquement la réaction de décomposition des bicarbonates cellulaires, le CO_2 dissous dans les cellules, diffusant, est entraîné par le vide. Des essais préliminaires ont montré qu'un vide de 2 à 3