Purification and Characterization of Lactate Dehydrogenase Isozymes in *Channa argus*

Eun Mi Park and Jung Joo Yum*

Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea

Received January 4, 2010 / Accepted January 22, 2010

The lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH) isozymes in tissues from *Channa argus* were purified and characterized by biochemical, immunochemical and kinetic methods. The activity of LDH in skeletal muscle was the highest at 380.4 units and those in heart, eye and brain tissues were 13.4, 3.5 and 5.4 units, respectively. Citrate synthase (EC 4.1.3.7, CS) activity in heart tissue was the highest at 20.7 units. LDH/CS in skeletal muscle, heart, eye and brain tissues were 172.9, 0.6, 0.32 and 0.47. Protein concentration in skeletal muscle tissue was 14.7 mg/g and specific activities of LDH in skeletal muscle, heart, eye and brain tissues were 25.88, 0.79, 0.31 and 1.38 units/mg, respectively. Therefore, skeletal muscle tissue was anaerobic and heart tissue was aerobic. The LDH isozymes in tissues were identified by polyacrylamide gel electrophoresis, immunoprecipitation and Western blot with anti-serum against A₄, B₄, and eye-specific C₄. LDH A₄, A₃B, A₂B₂, AB₃ and B₄ isozymes were detected in every tissue, C₄, AC₃, A₂C₂ and A₃C were detected in eye tissue, and A₃C was found in brain tissue. LDH A₄, A₃B, A₂B₂, AB₃, B₄, eye-specific C₄ isozymes were purified by affinity chromatography and Preparative PAGE Cells. The LDH A₄ isozyme was purified in the fraction from elution with NAD⁺ containing buffer of affinity chromatography. Eye-specific C₄ isozyme was eluted right after A₄, after which B₄ isozyme was eluted with plain buffer. As a result, one part of molecular structures in A₄, B₄ and eye-specific C₄ were similar, but were different from each other in B₄ and C₄. Therefore the subunit A may be conservative in evolution, and the evolution of subunit B seems to be faster than that of subunit A. The activity of LDH A₄, A₂B₂, B₄, and eye-specific C₄ isozymes remained at 39.98, 21.28, 19.67 and 16.87% as a result of the inhibition by 10 mM of pyruvate, so the degree of inhibition was very high. The Km^{pyr} values were 0.17, 0.27 and 0.133 mM in A₄, B₄ and eye-specific C₄ isozymes, respectively. The optimum pH of LDH A₄, B₄, eye-specific C₄, A₂B₂, A₃B, and AB₃ were pH 6.5, pH 8.5, pH 5.5, pH 6.0-6.5, pH 5.0 and pH 7.5. The A₄ and heterotetramer isozymes stabilized a broad range of pH. Especially, LDH activities in skeletal muscle tissue were high, resulting in a high degree of muscle activity. LDH metabolism in eye tissue seems to be converted faster from pyruvate to lactate by eye-specific C₄ isozyme as eye-specific C₄ have the highest affinity for pyruvate, and right after the conversion, oxidation of lactate was induced by A₄ isozyme. It was found that expression of *Ldh-C* affinity to substrate and reaction time of C₄ isozyme were different according to the ecological environmental and feeding capturing patterns.

Key words : *Channa argus*, lactate dehydrogenase isozyme, eye-specific C₄ isozyme, Km, Vmax

서 론

변온척추동물인 경골어류의 경우 환경 내 온도와 산소의 유용정도는 종의 분포, 밀도 및 생존에 영향을 미쳐 세포 내 분자계에 영향을 미치므로 효소의 역학 특성에서 보상을 나타내고 생리학적·진화학적 적응에 중요한 역할을 한다[30]. 어류는 저산소 조건의 환경에 순응하는 과정에서 대사를 줄이거나 혐기적 대사를 활성화하므로 젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH)로 연구되었다[4,5,13]. 또한 호기적 조건에서 피루브산이 아세틸 CoA로 전환되고 시트르산합성효소(EC 4.1.3.7, citrate synthase, CS)에 의해 시트르산을 생성

하므로 CS는 산화적 대사의 지표로 사용된다[3,22]. 따라서 조직에서 혐기적 대사와 호기적 대사의 정도는 LDH/CS로 연구되었다[8,36].

LDH는 NAD⁺-oxidoreductase로서 *Ldh-A, B* 및 *C* 유전자에 의한 하부단위체 A, B 및 C로 구성된 사량체이며 피루브산과 젖산의 상호전환 반응을 촉매한다[33]. LDH A₄ 동위효소는 pyruvate reductase로서 혐기적 조직에서 우세하고, B₄ 동위효소는 lactate oxidase로서 호기적 조직에서 우세하므로, 동위효소는 대사생리학적 수준에서 적응 양상을 밝히는 좋은 수단이 되어왔다. 조직 내 피루브산 농도가 높을 경우, 호기적 조직에서는 LDH B₄ 동위효소의 기능이 억제되어 젖산 축적이 제한되지만 혐기적 조직에서는 A₄ 동위효소의 활성이 증가되어 젖산이 축적된다[3]. 젖산은 활성대사물질로서 monocarboxylate transporter (MCT) 계를 통해 세포로 들어가 피루브산으로 산

*Corresponding author

Tel : +82-43-229-8527, Fax : +82-43-229-8525

E-mail : jjyum@cju.ac.kr

화될 수 있다는 새로운 가설이 보고되었다[27]. *Ldh-C* 유전자의 경우 경골어류 농어목은 눈과 뇌 조직에서 eye-specific *C₄*가 발현되고, 잉어목은 간 조직에서 liver-specific *C₄* 동위효소가 발현되며[29], 포유류 특정 종의 정소에서 *Ldh-C*가 발현되어 젖산을 우선적으로 반응하므로 고농도 젖산에 의해 억제되지 않고 피루브산에 의해 더 민감하게 억제된다고 보고되었다[17]. 그러나 난자의 발생 과정 중에도 *Ldh-C*가 발현되고, 암세포의 초기 발생에서도 *Ldh-C* 유전자가 발현되어 젖산을 사용하는 대사회생경로로서 ATP를 생성하고, 종양의 대사 유지에 LDH-A가 중요 역할을 하므로 종양의 표지자로서 LDH 활성을 확인하였다[16,21]. 또한 동위효소는 어류의 유전적, 진화적 위치를 연구하기 위한 좋은 표지자로, 동위효소의 조직 특성은 유전자간의 분화정도를 나타낸다고 하였다[34]. 그리고 공기호흡 어류의 경우 여름철에 각 조직의 필요에 따라 호기적 대사는 줄이고 LDH 동위효소를 조절하여 혐기적 대사를 증가시켰다[4]. 그러나 공기호흡을 하는 *Channa punctatus*는 공기가 부족하면 유생의 경우 LDH *B₄*를 일시적으로 발현하지만 성체는 심장에서 *A₄*를 증가하고 *B₄*는 감소하였다[2]. 모래무지를 상승된 온도에 순응시킨 경우에 골격근에서는 *A₄*, 심장에서는 *B₄*가 감소하였고, *Ldh-C*가 발현된 간 조직은 *C₄*를 증가시켜 조절하는 것으로 나타났다[19]. 또한 담수, 기수 및 해양에서 서식하는 *Gasterosteus aculeatus*는 심장에서 *B₄*가 나타나지 않고 눈과 뇌 조직에서만 *B₄*가 나타나므로[37], 혐기적 조건에서 *A₄*가 우세하고, 호기적 조건에서 *B₄*가 우세하다는 보고와 다른 결과를 나타냈다. 따라서 어류의 경우 서식지의 생태환경, 먹이 종류 및 획득 행동에 따라 다른 에너지 양상을 나타내므로 특수한 환경에 서식하고 *Ldh-C*가 발현되는 종의 LDH 동위효소의 특성을 연구함으로써 LDH 동위효소의 기능을 알아보고 임상에서의 LDH 동위효소의 활용에 대해 고찰할 수 있을 것으로 보인다.

본 연구에서는 눈 조직에서 *Ldh-C* 유전자가 발현되고, 연못이나 늪 또는 흐름이 거의 없고 피어 있는 하천에서 살며 육식성이고, 수온이 높은 곳에서는 아가미 호흡보다 주로 상해기관을 이용하여 공기호흡을 하므로 수온의 변화에 대한 내성이 강한 것으로 보고된 농어목 가물치를 실험 종으로 선택하였다[18]. 가물치 조직의 LDH 동위효소의 발현 양상을 확인하고, LDH 동위효소들을 정제하여 면역학적 실험에 의해 진화정도를 확인하고, 역학적 특성을 확인하여 환경에 적응되어 진화된 가물치 LDH 동위효소의 특성 및 기능을 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 조직 추출액의 준비

경골어류 농어목 가물치과 가물치(Perciformes Channidae *Channa argus*)는 판매상에서 구입하여 얼음에 채워 실험실로 운반하였다. 골격근, 심장, 신장, 눈, 뇌 및 간 조직을 떼어내어

혈액을 충분히 제거한 다음, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85, 4°C)를 2배(v/w) 가하여 4°C를 유지시키면서 glass homogenizer로 파쇄하였다. 조직 파쇄액은 4°C, 20,000×g에서 1시간씩 2회 원심분리(Mega 17R, Hanil)하였으며 상등액을 시료로 사용하였다.

LDH와 CS의 활성 측정 및 단백질 정량

LDH의 활성은 1.50 mM 피루브산과 0.14 mM NADH를 포함한 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85) 3 ml에 시료를 가한 다음 NADH로 부터 NAD^+ 로 산화되는 정도를 분광광도계(Shimadzu UV-160A)를 사용하여 25°C, 340 nm에서 측정하였다. 활성의 단위(unit)는 1분 동안 기질 1 μM 을 전환시키는 효소의 양으로, millimolar extinction coefficient 6.22를 사용하였다[33]. CS의 활성은 0.2 mM acetyl-CoA, 0.1 mM DTNB[5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)], 0.5 mM oxaloacetic acid를 포함한 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) 3 ml에 시료를 가한 후, DTNB가 전환되는 정도를 25°C, 412 nm에서 분광광도계에서 측정하였다. 활성의 단위(unit)는 1분 동안 기질 1 μM 을 전환시키는 효소의 양으로 millimolar extinction coefficient 13.6을 사용하여 계산하였다[33]. 단백질은 BSA를 표준단백질로 사용하여 분광광도계로 595 nm에서 Bradford의 방법[7]에 따라 정량하였고, LDH의 특이활성도는 단백질 양에 대한 효소의 활성(units/mg)으로 나타냈다[33].

Native-polyacrylamide gel 전기영동: Western blotting 및 면역침강반응

가물치 조직의 LDH 동위효소를 확인하고, Western blotting 및 면역침강반응 후 동위효소를 확인하기 위하여 native-polyacrylamide gel 전기영동(native-PAGE)을 실시하였다. Native-PAGE는 polyacrylamide vertical slab system (SE 250, Hoefer)으로 thermostatic circulator (CA-1100, EYELA)를 사용하여 4°C로 유지시키면서 실시하였다[14]. Slab gel은 6.5% acrylamide separation gel 및 2.5% acrylamide stacking gel을 만들었고, 시료에는 sucrose와 bromophenol blue 용액을 1:1(v/v)로 가한 후 5 mM Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 100 V에서 20분간, 200 V에서 4시간 전기영동하였다. LDH는 DL-lactate, NBT, PMS 및 NAD^+ 를 혼합한 용액으로 37°C에서 염색한 후, 15% 초산용액에서 고정하였다[33].

조직액 및 정제 후 동위효소는 native-PAGE 후 semi-dry transfer system (Trans-blot SD, Bio-Rad)에서 0.015 M Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 25 V에서 30분간 nitrocellulose 막에 전이시켰다. 5% nonfat skim milk/Tris buffered saline (0.01 M TBS, pH 7.5) 용액에 막을 넣고 25°C에서 1시간 반응시킨 후, 0.05% tween 20/TBS 용액으로 10분씩 3회 세척하였다. 0.8% nonfat skim milk/TBS로 희석한 검지 *A₄* (1:1,000), 소 *B₄* (1:800)[11], 및 조직불락 eye-specific *C₄* (1:800)

[9,11]에 대한 항혈청에서 25°C, 1시간 반응시킨 후 TBS 용액으로 10분씩 2회 세척하였다. 0.8% nonfat skim milk/TBS로 희석시킨 토끼 IgG 항체 용액(1:1,000)에서 1시간 반응시키고 TBS 용액으로 10분씩 3회 세척한 후 chloronaphtol과 H₂O₂의 혼합액으로 반응시키고 증류수로 세척한 후 확인하였다.

골격근, 심장, 눈, 뇌 및 간 조직액에 LDH A₄, LDH B₄, 및 LDH eye-specific C₄에 대한 항혈청을 각각 1:0.5, 1:1, 1:2(v/v)로 가하고 25°C에서 1시간, 4°C에서 12시간 면역침강반응 후 4°C, 15,000×g에서 원심분리하였으며, 상등액을 native-PAGE하여 항원-항체 복합체를 이루지 않은 동위효소를 확인하였다.

Affinity chromatography와 Preparative PAGE Cells에 의한 LDH 동위효소의 정제

Oxamate-agarose gel은 O'Carra의 방법[24,25]을 변형하여 준비하였고 column (25×85 mm)은 0.20 mM NADH를 함유한 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 6.85, buffer)로 평형시킨 후 affinity chromatography (Econo System, Bio-Rad)를 실시하였다[20]. Pyruvate와 유사한 oxalate를 sepharose에 결합시킨 oxamate-linked sepharose gel에 0.5 M KCl과 0.2 mM NADH를 첨가한 골격근, 심장, 눈 및 뇌 조직을 합한 조직액 10 ml를 유입시키고, 0.2 mM NADH를 함유한 buffer 100 ml로 씻었다. 이어 1.6 mM NAD⁺를 함유한 buffer 80 ml를 유입시키고, 이어 buffer 110 ml를 유입시켰으며, 용출액을 1.6 ml씩 분획하였다[20]. 각 분획은 cellulose acetate strip에 점적하여 LDH 활성이 있는 분획을 확인한 후 LDH 동위효소의 활성을 측정하고, 단백질을 정량하여 정제 그래프를 그렸다. LDH 활성이 확인된 분획은 native-PAGE하였고, 단일 동위효소가 확인된 분획은 Amicon (PM-10)으로 농축한 후 전기영동으로 재확인하고 정제 용액으로 사용하였다. 그리고 동위효소가 섞인 분획들은 합하여 농축시킨 후 Preparative PAGE Cells로 동위효소를 분리하였다.

Preparative PAGE Cells (Prep Cell Model 491, Bio-Rad)은 4% acrylamide separation gel과 stacking gel을 5:1로 섞어 만든 gel (28×50 mm)에 시료 5 ml와 buffer (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 0.025% bromophenol blue)를 1:1(v/v)로 섞은 용액을 가하고, 0.025 M Tris-glycine buffer (pH 8.3)로 460 V, 40 mA에서 실시하였다. Buffer를 0.75 ml/min로 유입

시키면서 2 ml씩 분획하였고, 각 분획에 대해 효소활성 측정 및 단백질 정량을 실시하였고, elution profile을 작성하였으며 LDH 활성이 확인된 분획은 native-PAGE하고 동위효소가 정제된 분획만 농축시켜 시료로 사용하였다.

LDH 동위효소들의 기질의존성 측정

정제한 LDH A₄, A₂B₂, B₄ 및 eye-specific C₄ 동위효소를 피루브산 0.1-10 mM에서 LDH 활성을 측정한 후, 최대 활성에 대한 상대 활성(%)을 구하여 기질농도에 의해 저해되는 정도를 확인하였다. 또한 피루브산 10-500 μM에서 LDH 활성을 구하여 Lineweaver-Burk plot에 의해 Km^{PVR}을 구하였다.

LDH의 최적 pH

정제한 LDH A₄, A₃B, A₂B₂, AB₃, B₄ 및 eye-specific C₄ 동위효소를 4°C, 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.0, 4.5, 5.0), 0.1 M sodium citrate buffer (pH 5.5), 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.0, 6.5, 7.0), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5, 8.0, 8.5), 0.1 M Tris-glycine buffer (pH 9.0) 및 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.5, 10.0, 10.5)에 12시간 반응시킨 후 LDH 활성을 측정하였고, 최대 활성에 대한 상대 활성(%)을 구하여 최적 pH를 확인하였다.

결과 및 고찰

LDH와 CS 활성 및 단백질 정량

LDH 활성은 골격근이 380.4 units로 가장 높았고 심장 13.4, 눈 3.5, 뇌 조직 5.4 units로 낮게 확인되었다(Table 1). 쏘가리 골격근 358.83 units보다 높으나 심장 142.37 units, 뇌 17.32 units[10], 폴망둑 눈 53.25, 뇌 조직 28.79 units [35]와 비교시 활성이 매우 낮았다. CS 활성은 심장 20.7, 뇌 11.6, 눈 10.9, 골격근이 2.2 units로 낮았으나, 폴망둑 심장 조직의 CS 3.66 units [35]에 비해 높게 확인되었다. LDH/CS는 골격근 172.9, 심장 0.6, 눈 0.32, 뇌 0.47이었다(Table 1). Cichlidae *Satanoperca aff. jurupari* 골격근과 심장의 LDH/CS 173.36, 6.1과 비교하면 골격근은 유사하나 심장은 낮았다[8]. 단백질 양은 골격근 14.7 mg/g, 뇌 조직 3.9 mg/g으로, 쏘가리 골격근 31.30 mg/g, 뇌 조직 12.73 mg/g에 비해 낮았지만 폴망둑 골격근 5.92

Table 1. Lactate dehydrogenase activity, citrate synthase activity and protein concentration in various tissues from *Channa argus*

Tissue	LDH activity (units/g)	CS activity (units)	Protein (mg/g)	LDH/CS	Specific activity (units/mg)
Skeletal muscle	380.4	2.2	14.7	172.9	25.88
Heart	13.4	20.7	16.9	0.6	0.79
Kidney	22.8	16.6	16.0	1.4	1.43
Liver	1.0	11.3	15.2	0.09	0.07
Eye	3.5	10.9	11.3	0.32	0.31
Brain	5.4	11.6	3.9	0.47	1.38

mg/g 보다 높았다[10,35]. 특이활성(units/mg)은 골격근 25.88, 심장 0.79, 눈 0.31, 뇌 1.38 units/mg으로, 쏘가리 골격근 11.46, 심장 5.93, 눈 0.49, 뇌 1.36, 폴망둑 골격근 11.04, 심장 8.26, 눈 30.04, 뇌 56.45 units/mg [10,35], 잉어 골격근 2.65 units/mg 및 송어 골격근 3.95 units/mg[32]에 비해 가물치 골격근은 특히 높아 혐기적이고 심장은 호기적이었으며, 눈과 뇌 조직도 낮아 쏘가리와 유사하지만 폴망둑에 비해서는 특히 낮았다.

Polyacrylamide gel 전기영동: Western blotting과 면역침강반응에 의한 동위효소 분석

Native-PAGE한 결과 조직별 LDH 활성의 차이가 나타났고, 동위효소 간의 이동거리도 크게 확인되었다(Fig. 1a). LDH A₄, B₄, eye-specific C₄에 대한 항혈청을 사용하여 Western blotting과 면역 침강반응을 실시하여 LDH A₄, B₄, C₄ 동위효소 및 진화 양상을 확인하였다. 골격근에 A₄-항혈청을 사용하여 Western blotting (Fig. 1b)한 결과 A₄ 동위효소가 강하게 확인되고, A₃B, A₂B₂, AB₃도 흐리게 나타났다. 심장 조직에 B₄-항혈청을 가한 경우 음극 쪽에 B₄ 동위효소는 강하고 AB₃는 흐리게 나타났다. 또한 눈 조직에 C₄-항혈청을 반응시킨 결과 양극 쪽 부터 C₄, C hybrid, A₄ 및 A hybrid가 모두 나타났으나 B₄는 확인되지 않았다. 그리고 골격근과 눈 조직에 A₄-항혈청을 가하여 면역침강 후 PAGE 한 결과 밴드가 나타나지 않았고(Fig. 1c), 심장에 A₄-항혈청을 가한 경우 B₄ 동위효소만 나타났다. 심장과 눈 조직에 B₄-항혈청을 가한 경우 B₄와 B를 포함한 동위효소는 나타나지 않았고 A와 C를 포함한 동위효소는 약하게 확인되었다. 심장 조직에 C₄-항혈청을 반응시킨 경우 A를 포함한 동위효소는 흐려지나 모두 확인되었고, 눈 조직에 C₄-항혈청을 가한 경우 C₄와 C hybrid가 없어지고 A₄는 약간 흐려지나 B를 포함한 밴드는 확인되었으므로 양극쪽 밴드는 CA hybrid였다(Fig. 1c). 반응 결과 A₄는 B₄ 또는 C₄와 분자구조의 일부가 유사하였지만 B₄와 C₄는 서로 다른 것으로 나타났으므로, 하부단위체 A는 보존적이고, 하부단위체 B가 A보다 더 빠르게 진화된 것으로 보인다. 따라서 가물치 경우 5개의 동위효소, A₄, A₃B, A₂B₂, AB₃, B₄가 모든 조직에서 확인되었고,

눈 조직에서 A₂C₂, AC₃, C₄가 확인되고 뇌 조직에서 A₃C가 확인되었다.

그러나 가물치 속 4종의 LDH를 7.5% PAGE로 연구한 결과 *Channa punctata*는 5개 동위효소가 나타났으나, 다른 종은 *Ldh-A*가 우세하게 2-3개의 동위효소가 확인되었고 *C. gachua*와 *C. marulius*에서만 eye-specific C₄가 확인되고 *C. marulius*에서 B₁C₃, B₂C₂가 약하게 확인되어 물의 유용 정도에 따라 이중 공기호흡양식의 비율도 다르게 나타내 중 간, 중 내 호기적/혐기적 대사가 다르게 나타난다고 보고했으나[1], 본 실험의 가물치와는 큰 차이를 보였다. 본 실험에서는 7.5% gel에서 LDH B₄ 동위효소가 분리되지 않고 6.5% gel에서 분리되어 5개 동위효소와 CA hybrid가 뚜렷이 나타났으며, *C. marulius*에서 BC hybrid라는 결과와 Cichlidae *Satanoperca aff. jurupari*는 조직에서 A₄, B₄, C₄, BC hybrid라는 보고[8]와 차이를 나타냈다. 또한 *C. punctata* 경우 공기가 부족하면 유생은 LDH B₄를 일시적으로 발현하고 AB₃와 A₃B도 활성이 나타났으며, 30일된 유생에서 A₃B와 A₄가 증가되었고, 공기호흡 성체는 혐기적 대사가 활성화되어 심장에서 A₄가 증가하고 회복단계에서 B₄와 AB₃와 A₂B₂, AB₃가 증가되므로 이질사량체가 중요한 역할을 하였고, 회복 단계의 골격근에서 A₂B₂가 조절에 관여되고[2] 근육 양과 저 산소 내성이 증가됨에 따라 LDH A 활성이 증가된다는 보고[6]와 같이 본 실험의 가물치에서 LDH A 활성이 강하고 이질사량체가 확인되었다. 또한 담수, 기수, 해양에 서식하는 *Gasterosteus aculeatus* 눈과 뇌 조직에서만 B₄가 나타나고[37], 저서성 어류에서 A₄와 B₄ 또는 A₄, A₂B₂ 및 B₄ 동위효소가 나타날 뿐 이질사량체 동위효소는 나타나지 않았으며, A₄와 B₄동위효소의 이동거리도 가까이 분리되어, 기능이 유사하게 진화되었다는 보고[12,35]와 차이를 보였다. 즉, 생명체가 어떤 조건의 환경에 적응되었는지에 따라 습성과 행동 양식이 다르고, LDH 유전자의 발현이 조절되어 LDH 동위효소가 다양하게 나타나는 것으로 볼 수 있다. 그리고 큰 입우력은 혐기적 대사인 LDH를 사용하는 젖산 경로로 에너지를 더 빠르게 공급하여 매복행동과 급작스런 추적 행동으로 먹이를 포획한다고 보고하였다[28]. 이러한 결과로 미루어 볼 때 가물치 경우 다른 종에 비해 골격근의 LDH 활성이 특히

Fig. 1. Native-polyacrylamide electrophoresis zymograms of LDH isozymes in tissues of *Channa argus* and Western blotting (b) or immunoprecipitation (c) with *Coreoperca herzi* A₄ antiserum (anti-A₄), *Bos taurus* B₄ antiserum (anti-B₄), *Sebastes schlegeli* eye-specific C₄ antiserum (anti-eye C₄). (a) M, skeletal muscle; H, heart; K, kidney; L, liver; E, eye; B, brain; (b) m, M+anti-A₄; h, H+anti-B₄; e, E+anti-C₄; (c) M, skeletal muscle; 1, M+anti-A₄ (1:0.5); 2, H+anti-A₄ (1:0.5); 3, H+anti-A₄ (1:1); 4, H+anti-A₄ (1:2); 5, H+anti-B₄ (1:1); 6, H+anti-B₄ (1:2); 7, H+anti-C₄ (1:1); 8, H+anti-C₄ (1:2); E, eye; 9, E+anti-A₄ (1:0.5); 10, E+anti-A₄ (1:1); 11, E+anti-B₄ (1:1); 12, E+anti-B₄ (1:2); 13, E+anti-C₄ (1:0.5); 14, E+anti-C₄ (1:2).

크므로 활동성이 크고 혐기적 대사를 통해 에너지를 공급하는 것으로 볼 수 있으며, 심장 조직은 호기적 대사를 하고, 눈 조직은 LDH 활성은 적지만 eye-specific C₄와 AC hybrid가 나타나므로, 골격근을 활용하여 활발한 유영행동을 하며 먹이 포획 시 눈 조직의 C₄가 빠르게 에너지를 공급하는 것으로 사료된다.

Affinity chromatography와 Preparative PAGE Cells에 의한 LDH 동위효소들의 정제

LDH 동위효소는 affinity chromatography와 Preparative PAGE Cells에 의해 정제되었다. LDH는 NADH와 함께 oxamate-linked Sepharose gel에 가하면 결합된다. 따라서 시료를 가한 후 0.2 mM NADH가 함유된 buffer를 유입하면 LDH 이외의 단백질이 용출되고, NAD⁺를 함유한 buffer를 유입하면 LDH-NAD⁺-피루브산 복합물을 형성하는 정도의 차이로 인해 oxamate에 대한 친화 정도가 다르므로 A₄ 동위효소가 용출되었고, 이어 평형 buffer를 유입하면 B₄ 동위효소가 용출되었다[24,25]. 그리고 종에 따라 LDH 역학적 특성의 차이로 인해 정제 양상이 다르므로, 동위효소의 기능은 물론 진화상의 유연관계를 고찰할 수 있다[36].

LDH 동위효소들을 정제하기 위해서 골격근, 심장, 눈 및 뇌 조직을 합한 시료를 가한 후 affinity chromatography를 실시하여, 정제 그래프를 작성하였고(Fig. 2), 전기영동을 실시하여 동위효소를 확인하였다(Fig. 3). NAD⁺를 함유한 buffer를 유입한 후 107분획부터 용출되기 시작하여 108-112(56-64 ml)분획에서 A₄ 동위효소가 용출되었고, 113-121분획에는 A₄, A₃B, A₂B₂가 함께 용출되었고, 132-138분획은 LDH 활성은 낮지만 A₄, A₂B₂와 함께 C₄와 AC hybrid가 용출되기 시작하여(Fig. 3.4) 동위효소가 섞여 용출되었고, 153 분획부터 AB₃와 C₄가 용출되었으며(Fig. 3.7), 181-195분획에서는 B₄만 용출되

Fig. 2. Affinity chromatography of LDH isozymes in skeletal muscle, heart, eye and brain from *Channa argus* on the sepharose-linked oxamate gel (25×85 mm). Fractions of 1.6 ml were collected at a flow rate 0.4 ml/min and chromatography was performed at 4°C. ○, Protein; ●, Enzyme activity.

Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis zymograms of purified LDH by affinity chromatography (Fig. 2). C, LDH isozymes in skeletal muscle, heart, eye and brain of *Channa argus*; 1, fraction numbers: 108-112; 2, fraction numbers: 113-121; 3, fraction numbers: 122-130; 4, fraction numbers: 132-138; 5, fraction numbers: 140-146; 6, fraction numbers: 147-151; 7, fraction numbers: 153-161; 8, fraction numbers: 162-170; 9, fraction numbers: 171-178; 10, fraction numbers: 181-195.

어(Fig. 3.10), A₄와 B₄동위효소가 정제되었다. 그리고 LDH 동위효소들이 섞인 분획을 모아 농축한 후, Prep Cell을 실시하였다(Fig. 4). PAGE하여 LDH를 확인하였으며(Fig. 5), 9-15분획에서 eye-specific C₄동위효소만 정제되었고(Fig. 5.1), 22-48분획에서 A₄가 정제되고, 111-124 분획에서 A₃B, 139-158 분획에서 A₂B₂, 183-210 분획에서 AB₃, 220-272 분획에서 B₄ 동위효소가 각각 정제되었다. 정제된 A₄에 A₄-항혈청, B₄에 B₄-항혈청, 및 eye-specific C₄ 동위효소에 eye-specific C₄-항혈청을 사용하여 Western blotting한 결과 각각 단일 밴드가 확인되어 정제되었음이 확인되었다(Fig. 5. 7-9). 그리고 affinity chromatography와 Prep Cell로 동위효소를 정제한 후 LDH 활성, 단백질 정량 및 특이활성을 측정하였으며(Table 2), affinity chromatography 결과 A₄ 732.75 units, B₄ 6.50 units를 정제하였고 수득률이 81.5%였다. Prep Cell 후 A₄ 1168.85 units, A₃B

Fig. 4. Purification of LDH A₄, A₃B, A₂B₂, AB₃, B₄ and C₄ isozymes by Prep Cell from pooled LDH sol. after chromatography (Fig. 2). Fractions of 2 ml were collected at flow rate 1ml/min.

Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis zymograms of purified LDH isozymes by Prep Cell. 1, fraction numbers: 9-15; 2, fraction numbers: 22-48; 3, fraction numbers: 111-124; 4, fraction numbers: 139-158; 5, fraction numbers: 183-210; 6, fraction numbers: 220-272; 7, Western blot analysis of purified A₄ isozyme with anti-A₄; 8, Western blot of purified B₄ with anti-B₄; 9, Western blot of purified eye-C₄ with anti-eye C₄.

10.70 units, A₂B₂ 14.30 units, AB₃ 10.70 units, C₄, 10.80 units 가 각각 정제되었다. 그리고 affinity chromatography 과정에서 다른 종의 LDH 동위효소가 용출되는 양상을 보면 NAD⁺ 유입 후 고등어 A₄는 40-56 ml [26], 폴망둑 A₄는 54-96 ml에서 용출되었고 eye-specific C₄도 A₄ 동위효소에 인접하여 용출되었다[35]. 꺾지 A₄는 68-120 ml [11]에서 용출되었고, buffer 유입 후 고등어 eye-specific C₄는 20-45 ml [36], 모래무지 A₄는 44-52 ml [20], 칠성장어 LDH 46-76 ml, 소 B₄는 66-72 ml[11]에서 용출된 것으로 보고되었다. 따라서 본 실험에서 가물치 A₄는 NAD⁺ 유입 후 56-64 ml에서 정제되었고, 고등어 A₄와 꺾지 A₄ 동위효소 사이에서 분리되어 폴망둑과 유사하였으며, buffer 유입 후 용출되는 모래무지 A₄와 칠성장어 LDH와는 차이를 나타냈다. Eye-specific C₄는 A₄와 함께 용출되다 B₄와 용출되므로 A₄에 역학적으로 더 유사하다고 볼 수 있으므로, 폴망둑과 유사하였다[35]. 그러므로 면역침강반응 후 전기영동 결과 A₄와 C₄가 유사하고 C₄와 B₄가 유사하지 않다는 결과와 일치하였다.

Lactate dehydrogenase 동위효소의 피루브산에 대한 역학

LDH 동위효소의 기질에 대한 역학적 실험은 하부단위체의 분자 구조를 이해하고 대사과정을 이해하는데 유용하다[23]. 본 실험에서 피루브산 10 mM에서 LDH 활성을 측정된 경우 정제된 A₄ 동위효소 39.98%, A₂B₂ 21.28%, B₄ 19.67%, 및 eye-specific C₄ 16.87% 활성이 남아있어 저해 정도가 큰 것으로 확인되었다(Fig. 6). 꺾지의 A₄ 동위효소 72%, 소의 B₄ 동위효소는 22%의 활성이 남아있다는 보고[11]와 비교할 때 본 실험의 LDH A₄ 동위효소는 A₄와 B₄ 저해 정도의 중간으로 나타났으나 폴망둑 A₄ 동위효소 43.47% [35]와 유사하였고, 메기류인 *Hypostomus plecostomus* A₄ 29.9% [10]보다는 약간 높았으나, 다른 동위효소의 저해 정도는 소 B₄보다 낮았다. 또한 eye-specific C₄ 동위효소는 16.87%로 폴망둑 eye-specific C₄ 동위효소 36.53% [35], 고등어 eye-specific C₄ 동위효소의 30% [26]보다 저해 정도가 크게 나타났다. 그러나 메기류인 *H. plecostomus* 조직별 저해정도 38.3-47.3%는 유사하여 동위효소들이 상당히 유사하게 진화되어졌다는 보고[12,35]와는 차이를 보였다. 공기호흡어류 *C. punctatus* 경우 피루브산 12.5 mM까지 심장 LDH 활성이 크고, 12.5 mM 이상에서는 골격근 LDH가 증가하다 26 mM에서 최대 활성을 나타내고, 심장은 피루브산 60 mM에서 최대활성을 나타내어 이후 저해되었지만[2] 본 실험에서는 C₄ 동위효소 활성이 피루브산 0.01 mM-0.3 M까지 먼저 증가하고 A₄가 증가하여 1 mM에서 최대로 나타난 후 저해되므로, C₄에 의해 반응이 우선 일어나고, 이후 A₄, B₄에 의하므로 다른 가물치 종보다 피루브산 대사가 빠르게 일어나고, 협기적 반응이 빠르게 진행되는 것을 확인 할 수 있었다.

그리고 가물치 LDH 동위효소들의 피루브산에 대한 Km^{pyr}은 A₄ 0.17 mM, B₄ 0.27 mM, eye-specific C₄ 0.133 mM이었고 Vmax은 A₄ 666.67, B₄ 1.25, C₄ 0.38이었으므로 C₄ 동위효소는 피루브산과 NADH에 친화성이 가장 높았지만 Vmax이 낮게 나타났다(Table 3). 잉어 A₄ Km 0.173 mM, 송어 A₄ Km 0.209 mM와 비교시 잉어와 유사하였다[32]. 그러나 저산소 환경에 적응되어 협기적 반응이 우세한 폴망둑 골격근 Km 0.083, 눈

Table 2. Purification of LDH isozymes from the skeletal muscle, heart, eye and brain of *Channa argus*

Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	3472.55	664.00	5.23	100.0
Affinity chromatography	A ₄ , 732.75	3.05	240.25	81.5
	A ₄ +A ₃ B+AB ₃ +A ₂ B ₂ +B ₄ +C ₄ , 2091.55	8.65	241.80	
	B ₄ , 6.5	0.1	65.00	
Preparative PAGE Cells	1568.66	7.95	197.32	35.0
Ultrafiltration	A ₄ , 1168.85	4.30	271.83	
	A ₃ B, 10.70	0.15	71.33	
	A ₂ B ₂ , 14.30	0.50	28.60	
	AB ₃ , 10.70	0.15	71.33	
	C ₄ , 10.80	0.20	54.00	

Table 3. Apparent Michaelis-Menten constant values for lactate dehydrogenase isozymes from *Channa argus*

LDH isozyme	Km (mM pyruvate)	Vmax
LDH A ₄	0.17	666.67
LDH B ₄	0.27	1.25
LDH C ₄	0.13	0.38

Fig. 6. Effect of pyruvate concentrations on the activity of LDH isozymes in *Channa argus*. ●, A₄ isozyme; ○, A₂B₂; ▲, B₄ isozyme; ■, C₄ isozyme.

0.089, 심장 0.098[35], Cichlidae *Oreochromis mossambicus* B₄ Km 0.032 mM, C₄ Km 0.014 mM[15]과 비교하면 가물치 LDH는 기질친화성이 낮게 나타났지만, C₄ 동위효소의 친화성이 가장 큰 것은 다른 종과 일치하였다. 또한 Cichlidae *Satanoperca aff. jurupari*는 피루브산 1 mM/10 mM 골격근 0.66, 심장 0.34로 10 mM에서 억제되지 않고, 저산소 기간동안 심장도 혐기적 대사를 하는 것으로 보고되어[8] 가물치와 다른 것을 볼 수 있었다. 가물치 경우 저서성 어류보다는 혐기적 대사 반응이 느린 것으로 확인되었다.

pH 안정성 및 최적 pH

pH에 대한 LDH의 활성 및 최적 pH를 확인하였다. LDH A₄ 동위효소는 pH 5.0-10.5에서 50% 이상의 활성을 나타내 넓은 pH 영역에서 안정하였으며 pH 6.5에서 최대 활성을 나타냈고, B₄ 동위효소는 pH 7.0-9.0에서 50% 이상의 활성을 나타내고 pH 8.5에서 최대 활성을 나타내 알칼리 조건에서 안정하였다. Eye-specific C₄ 동위효소는 pH 5.0-6.5 사이에서 50% 이상의 활성을 나타내고 pH 5.5에서 최대 활성을 나타내 산성 쪽에서 안정하였다. 따라서 A₄, B₄ 및 eye-specific C₄의 최적 pH는 각각 pH 6.5, pH 8.5, pH 5.5였다(Fig. 7). A₂B₂ 동위효소는 최적 pH 6.0-6.5였고, pH 8.0-10.0에서 50% 이상의 활성을 나타냈다. A₃B 동위효소는 최적 pH 5.0이었고, pH 6.0-9.0에서 50% 이상의 활성을 나타내 안정하였다. AB₃ 동위효소는 최적 pH 7.5였고 pH 4.0-10.5에서 50% 이상이 나타나므로 넓은 pH

Fig. 7. Effect of pH on the activity of LDH isozymes in *Channa argus*. ●, LDH A₄ isozyme; ○, B₄ isozyme; ■, C₄ isozyme. Fig. 8. Effect of pH on the activity of LDH isozymes in *Channa argus*. ●, LDH A₃B isozyme; ○, A₂B₂ isozyme; ■, AB₃ isozyme.

영역에서 안정하였다(Fig. 8). 따라서 동질사랑체 A₄ 동위효소와 이질사랑체 A₂B₂, A₃B, AB₃는 넓은 pH 영역에서 안정하여 적응과정에서 역할을 하는 것으로 사료된다. 모래무지 골격근 LDH의 최적 pH 6.5[36], 쏘가리 A₄ pH 7.5[10]와 본 실험의 결과와 유사하지만 칠성장어 골격근 LDH의 최적 pH 5.5이고 염기성에서 활성이 감소된다는 결과[11]와 고등어 eye-specific C₄ 최적 pH 8.5[26]와도 다른 결과를 얻었다. 따라서 최적 pH의 경우 어류 종들이 어떤 서식지에 적응되어졌는가에 따라 다르게 나타나는 것으로 사료된다.

가물치는 공기호흡을 하며 하천에 서식하지만 저서성 어류보다는 혐기적 대사 반응이 느린 것으로 사료되고, 육식성 어류로서 다른 종에 비해 골격근의 LDH 활성이 특히 크므로 활동성이 크며 혐기 대사를 통해 에너지를 공급하는 것으로 확인되었다. 또한 심장 조직은 LDH 활성이 낮지만 주로 호기 대사를 하고, 눈 조직에서 eye-specific C₄가 나타나지만 활성이 낮으므로 유영생활을 하다 급작스런 행동으로 먹이를 획득하며, 이때 순간적으로 필요한 에너지를 피루브산 친화력이

가장 강한 eye-specific C₄ 동위효소가 공급하고 이 후 A₄에 의해 혐기적으로 생성하는 것으로 사료되므로 LDH 대사를 통해 어류의 생태 및 행동학적 양식을 고찰할 수 있다. 육식성 어류의 경우 모두 *Ldh-C*에 의한 eye-specific C₄에 의해 에너지를 순간적으로 사용한다고 생각했으나, 서식지의 생태환경, 먹이 종류, 밀도에 따른 먹이 획득 행동 양식에 따라 *Ldh-C* 발현 정도의 차이가 나타나고, 기질에 대한 친화 정도와 대사 시간도 다른 것으로 사료되므로, 다양한 환경 조건에 적응시키면서 LDH 대사를 확인하고, monocarboxylate system에 의한 기질 수송과의 연관관계도 연구할 경우 병증과 관련된 에너지 대사 연구도 가능하리라 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2008-2009학년도 청주대학교 산업과학연구소가 지원한 학술연구조성비(특별연구과제)에 의해 연구되었음.

References

- Ahmad, R. 2009. Functional and adaptive significance of differentially expressed lactate dehydrogenase isoenzymes in tissues of obligatory air-breathing *Channa* species. *Section Cellular and Molecular Biology* **64**, 192-196.
- Ahmad, R. and A. U. Hasnain. 2005. Ontogenetic changes and developmental adjustments in lactate dehydrogenase isozymes of an obligate air-breathing fish *Channa punctatus* during deprivation of air access. *Comp. Biochem. Physiol. B* **140**, 271-278.
- Almeida-Val, V. M. F. and A. L. Val. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B* **105**, 21-28.
- Almeida-Val, V. M. F. and P. W. Hochachka. 1995. Air-breathing fishes: metabolic bio-chemistry of the first diving vertebrates. pp. 45-55, In Hochachka, P. W. and T. Mommsen (eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Almeida-Val V. M. F., M. N. Paula-Silva, W. P. Duncan, N. P. Lopes, A. L. Val, and S. Land. 1999. Increase of anaerobic potential during growth of an Amazonian cichlid, *Astronotus ocellatus*. Survivorship and LDH regulation after hypoxia exposure. pp. 437-448, In Val A. L. and Almeida-Val V. M. F. (eds.), *Biology of Tropical Fishes*. INPA, Manaus.
- Almeida-Val, V. M. F., A. L. Val, W. P. Duncan, F. C. A. Souza, M. N. Paula-Silva, and S. Land. 2000. Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comp. Biochem. Physiol. B* **125**, 219-226.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**, 248-254.
- Chippari-Gomes, A. R., M. A. B. Leitao, M. N. Paula-Silva, L. S. B. Mesquita-Saad, and V. M. F. Almeida-Val. 2003. Metabolic adjustments in *Satanoperca aff. jurupari* (Perciformes: Cichlidae). *Genet. Mol. Evol.* **26**, 27-32.
- Cho, S. K. 2000. Mitochondrial lactate dehydrogenase in tissues of vertebrate. Ph. D. Thesis Cheongju Univ., Korea.
- Cho, S. K., B. Ku, H. An, E. M. Park, S. Y. Park, J. B. Kim, and J. J. Yum. 2009. Purification and characterization of lactate dehydrogenase A₄ isozyme in mandarin fish (*Siniperca scherzeri*). *J. Life Sci.* **19**, 256-263.
- Cho, S. K., S. Y. Park, and J. J. Yum. 1993. Purification and immunochemistry of lactate dehydrogenase in *Lampetra japonica*. *Korean J. Zool.* **36**, 505-513.
- Cho, S. K. and J. J. Yum. 2004. Lactate dehydrogenase isozyme of hypoxia tropical catfish (*Pangasius polyuranodon*, *Hypostomus plecostomus*). *J. Life Sci.* **14**, 702-707.
- Dalla Via, J., G. V. den Thillart, O. Cattani, and A. de Zwaan. 1994. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. II. Intermediary metabolism in blood, liver and muscle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **111**, 17-27.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
- Einarsson, J. M., P. Joyce, and Y. W. Kunz. 1995. Kinetic and immunological differences between the retinal specific C₄- and B₄-lactate dehydrogenase of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **112**, 589-598.
- Fantin, V. R., J. St-Pierre, and P. Leder. 2006. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* **9**, 425-434.
- Goldberg, E. C., E. R. Gagliano, and M. C. G. Passeggi. 1985. Correlation effects in dynamical charge-transfer processes. *Phys. Rev. B* **32**, 4375-4381.
- Kim, I. S. and E. J. Kang. 1993. *Coloured Fishes of Korea*. pp. 406, Academy. Korea.
- Kim, J. B., S. K. Kim, and J. J. Yum. 2003. Changes of activities and isozymes of lactate dehydrogenase in *Pseudogobio esocinus* acclimated to acute change of temperature. *J. Ind. Sci., Cheongju Univ.* **21**, 37-44.
- Kim, M. O. and J. J. Yum. 1989. Purification, kinetics and immunochemistry of two homotetrametric lactate dehydrogenase isozyme in *Pseudogobio esocinus* (Cypriniformes). *Korean J. Zool.* **32**, 420-428.
- Koslowski, M., O. Tureci, C. Bell, P. Krause, H. A. Lehr, J. Brunner, G. Seitz, F. O. Nestle, C. Huber, and U. Sahin. 2002. Multiple splice variants of lactate dehydrogenase C selectively expressed in human cancer. *Cancer Res.* **62**, 6750-6755.
- Moyes, C. D., O. A. Mathieu-Costello, R. W. Brill, and P. W. Hochachka. 1992. Mitochondrial metabolism of cardiac and skeletal muscle from a fast (*Katsuwonus pelamis*) and a slow (*Cyprinus carpio*) fish. *Can. J. Zool.* **70**, 1246-1253.
- O'Brien, J., K. M. Kla, I. B. Hopkins, E. A. Malecki, and M. C. McKenna. 2007. Kinetic parameters and lactate dehydrogenase isozyme activities support possible lactate uti-

- lization by neurons. *Neurochem Res.* **32**, 597-607.
24. O'Carra, P. and S. Barry. 1972. Affinity chromatography of lactate dehydrogenase: model studies demonstrating the potential of the technique in the mechanistic investigation as well as in the purification of multi-substrate enzymes. *FEBS Letters* **21**, 281-295.
 25. O'Carra, P., S. Barry, and E. Corcoran. 1974. Affinity chromatographic differentiation of lactate dehydrogenase isozymes on the basis of differential abortive complex formation. *FEBS Letters* **43**, 163-168.
 26. Park, S. Y. and J. J. Yum. 1997. Purification and characterization of lactate dehydrogenase eye- and testis- specific C₄ isozyme. *J. Ind. Sci., Cheongju Univ. Korea.* **15**, 263-268.
 27. Philp, A., A. L. Macdonald, and P. W. Watt. 2005. Lactate-a signal coordination cell and system function. *J. Exp. Biol.* **208**, 4561-4575.
 28. Selch, T. M. and S. R. Chipps. 2007. The cost of capturing prey: measuring largemouth bass (*Micropterus salmoides*) foraging activity using glycolytic enzymes (lactate dehydrogenase). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **64**, 1761-1769.
 29. Shaklee, J. B. and G. S. Whitt. 1981. Lactate dehydrogenase isozymes of Gadiform fishes: divergent patterns of gene expression indicate a heterogeneous taxon. *Copeia* **3**, 567-578.
 30. Somero, G. N. 2004. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". *Comp. Biochem. Physiol. B* **139**, 321-33.
 31. Srere, P. A., H. Brazil, and L. Gonen. 1963. Citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle. *Acta Chem. Scand* **17**, S129-134.
 32. Tylicki, A., D. Masztaleruk, and S. Strumilo. 2006. Differences in some properties of lactate dehydrogenase from muscles of the carp *Cyprinus carpio* and trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Onto. Biochem.* **42**, 143-147.
 33. Whitt, G. S. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175**, 1-36.
 34. Whitt, G. S. 1987. Species differences in isozyme tissue patterns: their utility for systematic and evolutionary analysis. pp. 1-26, In Current topics in biological and medical research. Alan Liss Inc. N.Y.
 35. Yum, J. J. 2008. Characterization of lactate dehydrogenase in *Acanthogobius hasta*. *J. Life Sci.* **18**, 264-272.
 36. Yum, J. J. and M. O. Kim. 1989. Biochemical properties of lactate dehydrogenase isozymes in *Pseudogobio esocinus*. *J. Ind. Sci., Cheongju Univ. Korea* **7**, 151-162.
 37. Zietara, M., J. Grouczewska, and E. F. Skorkowski. 1997. Purification and properties of the Threespine Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) lactate dehydrogenase LDH-B₄ and LDH-C₄ isoenzymes-Properties and evolutionary relationship. *Comp. Biochem. Physiol. B* **117**, 571-577.

초록 : 가물치(*Channa argus*) 젖산탈수소효소 동위효소들의 정제 및 특성

박은미 · 염정주*

(창주대학교 생명유전통계학부 생명과학전공)

가물치(*Channa argus*) 조직의 젖산탈수소효소 동위효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH)를 정제하고 생화학적, 면역학적 및 역학적 방법으로 특성을 연구하였다. LDH 활성은 골격근이 380.4 units로 가장 높고 심장 13.4, 눈 3.5, 뇌 조직 5.4 units이었으며, 심장의 CS 활성은 20.7 unit로 가장 높고, LDH/CS는 골격근 172.9, 심장 0.6, 눈 0.32, 뇌 0.47이고, 단백질 양은 골격근 14.7 mg/g이며, 특이활성(units/mg)은 골격근 25.88, 심장 0.79, 눈 0.31, 뇌 1.38 units/mg이었으므로 골격근은 혐기적이고, 심장은 호기적이었다. LDH A₄, B₄, eye-specific C₄에 대한 항혈청을 사용한 Western blot, 면역침강반응 및 native- polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 A₄, A₃B, A₂B₂, AB₃ 및 B₄가 모든 조직에서 확인되었고, 눈 조직에서 C₄와 AC₃, A₂C₂, AC₃, 뇌 조직에서 A₃C도 확인되었다. LDH A₄, A₃B, A₂B₂, AB₃, B₄, eye-specific C₄ 동위효소는 affinity chromatography와 Preparative PAGE Cell에 의해 정제되었다. LDH A₄ 동위효소는 NAD⁺ 유입 후 정제되었고, eye-specific C₄는 A₄에 이어 용출되기 시작하였으며 B₄는 buffer 유입 후 용출되었다. 정제한 결과 A₄는 B₄ 및 eye-specific C₄와 분자구조의 일부가 유사하였지만 B₄와 C₄는 서로 다른 것으로 나타났으므로, 하부단위체 A는 보존적이고, 하부단위체 B는 A보다 더 빠르게 진화된 것으로 보인다. 피루브산 10 mM에서 A₄ 동위효소 39.98%, A₂B₂ 21.28%, B₄ 19.67% 및 eye-specific C₄ 16.87%의 활성이 남아있었고, 피루브산에 대한 Km^{PYR}은 A₄ 0.17 mM, B₄ 0.27 mM, eye-specific C₄ 0.133 mM였다. A₄, B₄, eye-specific C₄, A₂B₂, A₃B 및 AB₃의 최적 pH는 각각 pH 6.50, pH 8.5, pH 5.5, pH 6.0-6.5, 5.0 및 pH 7.5였고, 동질사랑체 A₄와 이질사랑체 동위효소들은 넓은 pH 영역에서 안정하였다. 특히 골격근은 LDH 활성이 크므로 활동성이 크며, 눈조직에서 피루브산 친화력이 강한 eye-specific C₄에 의해 피루브산 대사가 빠르게 일어나고, 이어서 A₄에 의해 젖산이 산화되어지는 것으로 사료되므로, 종의 생태환경 및 먹이 획득 양식에 따라 LDH-C 발현, 기질에 대한 친화도 및 대사 시간이 다른 것으로 사료된다.