

척추동물의 Isozyme에 관한 비교연구 III.  
한국산 뱀목의 Lactate 및 Malate  
Dehydrogenase Isozyme

김 순 옥 · 조 동 혜 · 박 상 윤  
(성균관대 · 대학원)

Comparative Studies of Isozymes in Vertebrate. III.  
Lactate and Malate Dehydrogenase Isozymes of Korean squamata

Soon Ok Kim, Dong Hyun Cho and  
Sang Yoon Park

(Graduate School, Sung Kyun kwan University)  
(1973. 1. 29 수리)

SUMMARY

MDH and LDH isozymes of various tissues of several snakes which belong to Colubridae, Crotalidae and Viperidae were studied. MDH isozymes were appeared as two bands in all species.

Four LDH isozymes were found in all species of Colubridae, Crotalidae and Viperidae. LDH isozymes of muscle and liver had fundamentally the same pattern. On the other hand, there were two LDH isozymes in the heart of all species and the pattern of heart LDH isozyme was reverse of the pattern in muscle. The pattern of LDH isozymes of stomach tissue can be thought as the same pattern with that of heart in all species, but in the stomach tissue of Crotalidae and Viperidae there were four LDH isozymes.

서 론

척추동물의 isozyme 중에서 가장 잘 알려진 것이 lactate dehydrogenase (LDH)이다. (Moyer *et al.*, 1968; Wroblewski, 1961). Haupt and Giersberg (1958)는 척추동물 수종의 LDH isozyme pattern을 밝히면서 진화 및 계통학적인 연구에 좋은 작료가 될 것임을 주장하였다. Wieland *et al.* (1959)은 아파치 전기영동벌으로, Markert and Möller (1959)는 전문·겔 전기영동벌으로 대부분의 포유동물 조직이 다섯 가지 isozyme으로 구성되어 있음을 증명하였으나 이들 LDH isozyme pattern의 종에 따른 특이성을 분명히 하였다.

Kaplan *et al.* (1960)은 LDH를 크게 H형과 M형으로 나누어 볼 수 있으며 이들은 2개의 독립된 유전인자의 지배를 받고 있다고 보고 한 바 있다. 따라서 동일 개체인자라도 각 장기에 특이적인 isozyme형이 나타나는데 개체의 생리적 또는 병적인 상태에 따라서도 그 pattern은 달라진다(Allen, 1961; Rosa and Schapira, 1964; Cohn *et al.*, 1964). 대부분의 조류 및 포유류에서 체조직의 LDH는 다섯 가지 isozyme으로 구성되었음이 분명한데(Markert and Möller, 1959; Plagmen et al., 1960; Wicland *et al.* 1959; 박·김·조, 1972) 어류, 양서류 및 파충류에 있어서는 LDH isozyme의 조류나 포유류와는 크게 다르다(Markert, 1968; 박·홍·조, 1971). 지금까지 파충류의 LDH isozyme에 관한 연구는 거의 없다. 따라서 본 연구는 우리나라에 서식하고 있는 뱀목 수종을 대상으로 각 장기의 lactate 및 malate dehydrogenase isozyme을 조사하기 위하여 시도하였다.

### 실험재료 및 방법

실험동물은 서울 근교에서 채집한 것과 서울 시내에서 구입한 건강한 동물성체를 사용하였다. 즉 무자치(*Elaphe rufodorsata*), 능구렁이(*Dinodon rufozonatum rufozonatum*), 대록유혈목이(*Natrix vibakari ruthveni*), 유혈목이(*Natrix trigrina lateralis*), 북살모사(*Vipera berus sachalinensis*) 살모사(*Agkistrodon halys brevicaudus*), 까치살모사(*Agkistrodon halys intermedius*)를 단두도살한 즉시 심장, 간, 꿀격근, 위를 적출하여 각각을 실험재료로 택하였다.

조직 homogenates는 조직 : 중류수를 1:6 (W/V)의 비로 하여 어름에 체운 glass homogenizer로서 마련하였으며 LDH (lactate dehydrogenase, L-lactate: NAD oxidoreductase, E.C., 1.1.1. 27) 및 MDH (malate dehydrogenase, L-malate: NAD oxidoreductase, E.C., 1.1.3.3) isozyme은 Cellulose acetate 전기영동법으로 분리하였는데 그 방법은 박·조(1972)에 따랐다.

그리고 CAM (Cellulose acetate membrane) strip은 Separax (Fuji photo Co.) 및 Celotape (Millipore)를 사용하였고 완충용액은 pH 8.6의 barbitone buffer(이온강도 0.075)를 사용하였다.

### 실험 결과

#### MDH의 소견

유혈목이의 뇌, 심장, 근, 간, 위등에서 얻은 MDH는 2개의 band로 분리되어 균분적으로 그 pattern이 동일하다(Fig. 1). 특히 심장과 간은 거의 같은 pattern이고 나머지 뇌, 근, 위에서는 느린 band의 활성이 강하고 빠르게 움직이는 band는 약간 약하게 나타나는 것이 다르기는 하나 실험한 뱀목의 모든 개체에 있어서 MDH isozyme은 균분적으로 같다고 볼 수 있다.

간과 근조직의 MDH isozyme은 Fig. 2, 3과 같이 isozyme의 이동 거리로 보아 까치살모사의 것은 대록유혈목이, 유혈목이, 무자치, 능구렁이에 비하여 약간 빠르게 이동하는 점이 다르나 균분적으로는 동일하다.

몇 가지 예외가 있기는 하나 대체적으로 근조직 MDH isozyme의 활성은 느리게 이동하는 band에서 강하고, 빠르게 이동하는 band는 약하게 염색되는데 간조직에서는 두 band 모두가 유사한 강도로 나타난다.

위의 MDH isozyme은 Fig. 4와 같이 비슷한 pattern이지만 약간의 종간변이가 있다.

#### LDH의 소견

뱀파, 살모사파, 북살모사파 동물의 LDH isozyme은 근파·간조직에서 4개의 band로 분리되어 (Fig. 5, 6), 위에서도 살모사파·북살모사파에서는 4개의 band로 분리 됐다(Fig. 7).

근조직에서는 대록유혈목이, 유혈목이 및 능구렁이는 LDH<sub>5</sub>가 강하게 나타나지만 무자치는 4개의 isozyme이 거의 비슷하게 나타나는 점이 다른 뿐 4개의 isozyme이 뚜렷하다(Fig.5).

간조직의 LDH isozyme pattern은 근조직과 근본적으로 같아서 LDH<sub>5</sub>가 가장 강하게 나타나며 능구렁이에서는 4개의 band가 거의 비슷하게 나타난다. 까치살모사에서는 LDH<sub>5</sub>, LDH<sub>3</sub>, LDH<sub>2</sub>, LDH<sub>1</sub>의 차례로 점차 강도가 약하여 지는것이 관찰된다. 그러나 대록유혈목이에서는 LDH<sub>5</sub>가 가장 강하고 LDH<sub>3</sub>, LDH<sub>1</sub>의 차례로 강도가 약하고 LDH<sub>2</sub>는 거의 나타나지 않는다. 유혈목이에서는 LDH<sub>5</sub>와 LDH<sub>1</sub>만이 뚜렷하게 나타나고 무자치에서는 LDM<sub>5</sub>, LDH<sub>3</sub>, LDH<sub>1</sub>만이 뚜렷하였다(Fig.6).

위의 LDH isozyme은 대록유혈목이, 유혈목이, 무자치에서 LDH<sub>5</sub> 단일 band만이 강하게 나타나는데 능구렁이에서는 LDH<sub>2</sub>가 약하게 나타난다. 그러나 살모사와 북살모사에서는 LDH<sub>1</sub>, LDL<sub>2</sub>, LDH<sub>3</sub>가 거의 유사한 강도로 나타나고 LDH<sub>5</sub>는 아주 얕게 나타난다(Fig.7). 근과 위조직의 LDH isozyme을 비교하면 그 pattern이 정반대임을 알 수 있다.

근과 간조직 및 심장조직의 LDH isozyme형을 비교하면(Fig.5,6) 일반적으로 간과 근조직의 LDH isozyme은 같으나 심장은 이들과 정반대임을 알 수 있다. 북살모사, 유혈목이, 까치살모사, 대록유혈목이, 능구렁이, 살모사의 심장에서는 LDH<sub>1</sub>만이 강하고 LDH<sub>2</sub>가 희미하게 나타나는데 전반적으로 심장에서는 2개의 LDH isozyme이 분리된다.

즉 뱀목 동물의 기관별 LDH isozyme은 근조직에서는 4개이며 심장에서는 2개의 band가 있으나 각각 종간별이는 없어 그 pattern이 동일하였고 간조직의 LDH isozyme pattern은 근조직의 그 것과 비슷하여 심장과 위는 이와 정반대 pattern을 갖고 있음을 알 수 있다.

## 고 찰

Agrell and Kjellberg (1965)은 척추동물 및 무척추동물 조직에서 malate dehydrogenase isozyme는 2개의 isozyme으로 구성되어 있으나 종에 따라서는 2개이상의 band로 구성된 경우도 볼 수 있다고 했다. 그러나 cellulose acetate 전기영동법으로는 개구리의 조직에서 2개의 MDH isozyme만을 발견할 수 있었고 (박·조·고, 1972), 본 실험결과도 MDH은 2개의 band로 구성되어 있고 종에 따른 변이는 별로 없었다. 이처럼 각 연구자들의 연구결과가 틀리는 것은 서로 다른 전기영동법의 해상력에 의한 차이 때문이라고 하겠다. 더욱이 Whitt (1970a)은 경골이 *Fundulus heteroclitus*의 MDH isozyme은 2개의 band로 구성된 dimer라고 하였다. 만약 모든 척추동물의 MDH isozyme이 dimer라고 하면 본 실험결과도 이와 일치한다고 하겠다.

박·홍·조(1971)는 무자치, 구렁이, 유혈목이 및 살모사에서 근과 간조직의 LDH isozyme은 4개의 band가 뚜렷하나 심장에서는 2개의 isozyme만을 확인 할 수 있었다고 하였다. 또한 Markert (1968)는 *Dryadophis melanolumus*의 여러조직에서 LDH<sub>4</sub>가 없는 4개의 LDH isozyme을 발견하였는데 이는 본 실험결과와도 일치된다. 특히 본 실험에서 LDH isozyme은 LDH<sub>4</sub>가 없는 것으로 나타난 점은 Markert (1968)의 실험결과와 일치하였다. 이러한 현상은 아마도 LDH를 구성하는 subunit사이의 어떤 선택성이 기인하는 듯하다.

일반적으로 뱀파와 살모사와 및 북살모사과의 구성원들 각 장기에서 나타나는 LDH isozyme은 대체로 그 pattern이 동일하였으나 위장에서 만은 뱀파와 살모사파, 북살모사파 사이에서 틀리게 나타난다.

조류와 포유류의 LDH는 5개의 isozyme으로 구성되어 있는데 (Vesell, 1968; Wróblewski, 1961) 뱀과 살모사파 및 북살모사파에서는 LDH<sub>4</sub>가 없는 독특한 pattern이 나타난다. 그러나 각장기 사이에서 보이는 LDH isozyme pattern은 조류나 포유류에서 나타나는 것과 같은 경향을 볼 수 있다.

즉 뼈파, 살모사과 그리고 복살모사과를 구성하는 각 종에서 심장과 근조직의 LDH isozyme pattern은 서로 정반대이데, 조류와 포유류에서도 같은 현상을 볼수 있다.

뱀파, 살모사과 및 복살모사과에서 발견되는 LDH isozyme pattern은 이류(Markert and Faulhaber, 1955; Whitt, 1970b) 및 양서류(Moyer, et al. 1968)와도 크게 다르다 한가지 흥미 있는 점은 *Rana temporaria*에서도 본 실험결과와 같이 LDH<sub>4</sub>가 없는 4개의 LDH isozyme이 나타난다(Agrell and Kjellberg, 1965). 이같이 서로 다른 강의 동물사이에도 유사한 LDH isozyme pattern이 보이는 사실은 양서류와 파충류사이에 제통학적인 관계를 밝히는 좋은 증거가 될 수 있음을 암시하고 있다.

적 요

한국에서 서식하는 뱀과, 살모사과 및 북살모사파에 속하는 몇 종의 파충류에서 각 장기별로 MDH 및 LDH isozyme을 조사하였던 바 MDH는 2개의 isozyme으로 구성되어 있는 점이 동일하였다. 그러나 대륙유형목이의 MDH isozyme은 이동속도가 빠른 점이 다른 종과 다르다.

뱀파, 살모사과 및 복살모사과의 구성원 각 종에서 4개의 LDH isozyme을 확인할 수 있었다. 근과 간조직의 LDH isozyme은 근본적으로 같은 pattern이었고 LDH<sub>4</sub>가 없는 것이 뱀파, 살모사과 및 복살모사과의 특징이었다. 한편 심장에서는 2개의 LDH isozyme이 발견되는데 근조직과는 반대되는 pattern이었다. 위 homogenate에서 나타나는 LDH isozyme은 심장의 pattern과 동일하다고 볼 수 있는데 살모사과와 복살모사과에서는 4개의 isozyme이 나타나는 점이 독특하였다. 따라서 실험 동물의 MDH 및 LDH isozyme pattern에서 의미 있는 다양성을 밝힐 수 있었다.

참 고 문 헌

- Agrell, I. and B. Kjellberg, 1955. A comparative analysis of the isozyme pattern of dehydrogenases. *Comp. Biochem. Physiol.* **16** : 515—521.

Allen, J.M., 1951. Multiple forms of lactate dehydrogenase in tissues of the mouse: their specificity, cellular localization, and response to altered physiological conditions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **94**(3) : 937—951.

Cohen, L., J. Djordjevich and V. Ornitse, 1954. Serum lactate dehydrogenase isozyme pattern in cardiovascular and other diseases, with particular reference to acute myocardial infection. *J. Lab. Clin. Med.* **64** : 355—376.

Haupt, F. and H. Giersberg, 1958. Unterschungen über die Heterogenität und Organspezifität von Enzymen, Spezill der Milchsäuredehydrogenase, innerhalb der Wirbeltierreiche. *Naturwiss.* **45** : 268—269.

Kaplan, N.O., M.M. Ciotti, M. Hamolsky and R.E. Bieber, 1960. Molecular heterogeneity and evolution of enzymes. *Science* **131** : 392—397.

Markert, C.L. and F. Møller, 1959. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenic, and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **45** : 753—763.

Markert, C.L. and I. Faulhaber, 1965. Lactate dehydrogenase isozyme patterns of fish. *J. Expt. Zool.* **159**(3) : 319—332.

Markert, C.L., 1958. The molecular basis for isozymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **151**(1) : 14

—40.

- Moyer, F.H., C.B. Speaker and D.A. Wright, 1968. Characteristics of lactate dehydrogenase isozymes in amphibians. In: Multiple molecular forms of enzymes (edited by E.S. Vessel) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 151(1) : 650—669.
- 박상윤, 흥사우, 조동현, 1971. 척추동물의 isozyme에 대한 비교연구. I. 수종동물의 뇌조직내 lactate dehydrogenase에 관한, 성대 논문집, 16 : 1—11.
- 박상윤, 조동현, 1972. Cellulose acetate 전기영동에 의한 수소이탈효소 isozyme의 분리, 동, 학, 지, 15 : 101—104.
- 박상윤, 조동현, 고정식, 1972. 척추동물의 isozyme에 관한 비교연구. II. 개구리목 뇌조직의 lactate 및 malte dehydrogenase isozyme. 동, 학, 지, 15 : 105—110.
- 박상윤, 김창환, 조동현, 1972. 조류의 젖산 및 말산수소이탈효소 아이소자임. 동, 학, 지, 15 : 193—206.
- Plageman, P.G., K.E. Gregory and F. Wróblewski, 1960. The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase. II. Properties and interrelationship of rabbit and human lactic dehydrogenase isozymes. *J. Biol. Chem.* 235 : 2288—2293.
- Rosa, J. and F. Schapira, 1964. Lactic dehydrogenase isozymes and aging of erythrocytes. *Nature* 204 : 883.
- Whitt, G.S., 1970a Genetic variation of supernatant and mitochondrial malate dehydrogenase isozymes in the teleost *Fundulus heteroclitus*. *Experientia* 26 : 734—736.
- Whitt, G.S., 1970b Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* 175 : 1—36.
- Wieland, T.H., G. Pfleiderer, I. Haupt and W. Wörner, 1959. Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen. IV. Quantitative Ermittlung einiger Enzymverteilungsmuster. *Biochem. Z.* 332 : 1—10.
- Wróblewski, F., 1961. Multiple molecular forms of enzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 94(3) : 655—1030.

#### Explanation of Figures

**Fig. 1.** Malate dehydrogenase isozymes of *Natrix tigrina lateralis*. S. Stomach, L.

liver, M. muscle, H. heart, B. brain.

**Fig. 2.** Malate dehydrogenase isozymes in the liver homogenates.

1. *Natrix vibakari ruthveni*, 2. *Natrix tigrina lateralis*, 3. *Elaphe rufodorsata*, 4. *Dinodon rufozonatum rufozonatum*, 5. *Agkistrodon halys intermedius*.

**Fig. 3.** Malate dehydrogenase isozymes in the muscle homogenates.

1. *Agkistrodon halys intermedius*, 2. *Dinodon rufozonatum rufozonatum*, 3. *Elaphe rufodorsata*, 4. *Natrix tigrina lateralis*, 5. *Natrix vibakari ruthveni*,

**Fig. 4.** Malate dehydrogenase isozyme of stomach homogenates.

1. *Natrix tigrina lateralis*, 2. *Natrix vibakari ruthveni*, 3. *Elaphe rufodorsata*, 4. *Dinodon rufozonatum rufozonatum*, 5. *Agkistrodon halys brevicaudus*, 6. *Vipera berus sachalinensis*.

**Fig. 5.** Lactate dehydrogenase isozymes in muscle(M) and heart(H) homogenates.

1. *Agkistrodon halys brevicaudus*, 2. *Vipera berus sachalinensis*, 3. *Dinodon rufozonatum rufozonatum*, 4. *Elaphe rufodorsata*, 5. *Natrix vibakari ruthveni*, 6. *Natrix tigrina lateralis*, 7. *Agkistrodon halys intermedius*.

**Fig. 6.** Lactate dehydrogenase isozymes of liver homogenates.

1. *Agkistrodon halys brevicaudus*, 2. *Vipera berus sachalinensis*, 3. *Agkistrodon halys intermedius*, 4. *Dinodon rufozonatum rufozonatum*, 5. *Elaphe rufodorsata*, 6. *Natrix tigrina lateralis*, 7. *Natrix vibakari ruthveni*.

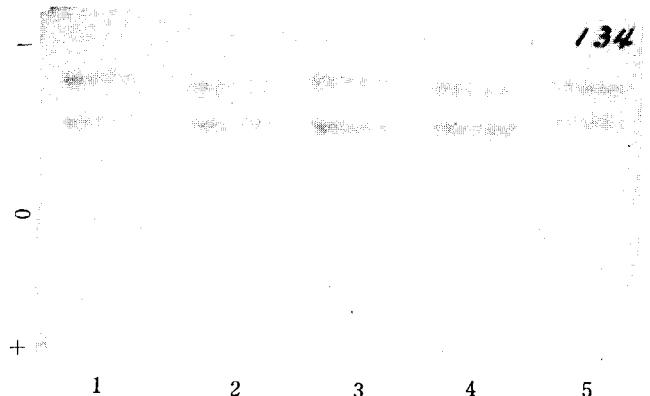
**Fig. 7.** Lactate dehydrogenase isozymes of stomach homogenates.

1. *Natrix tigrina lateralis*, 2. *Natrix vibakari ruthveni* 3. *Elaphe rufodorsata*, 4. *Dinodon rufozonatum rufozonatum*, 5. *Agkistrodon helys brevicaudus*, 6. *Vipera berus sachalinensis*.

Fig. 1



Fig. 2



**Fig. 3**

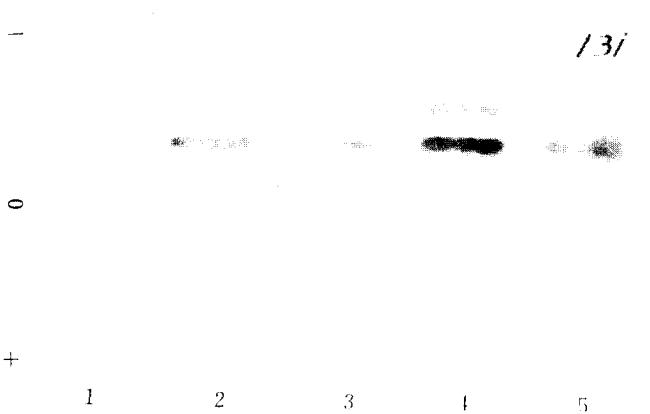




Fig. 4

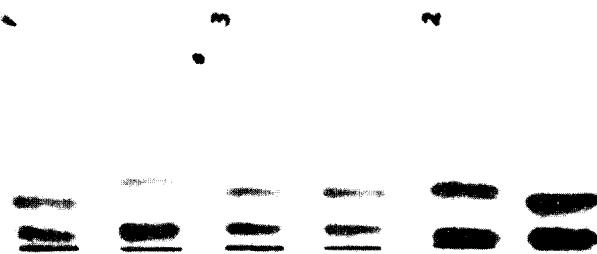
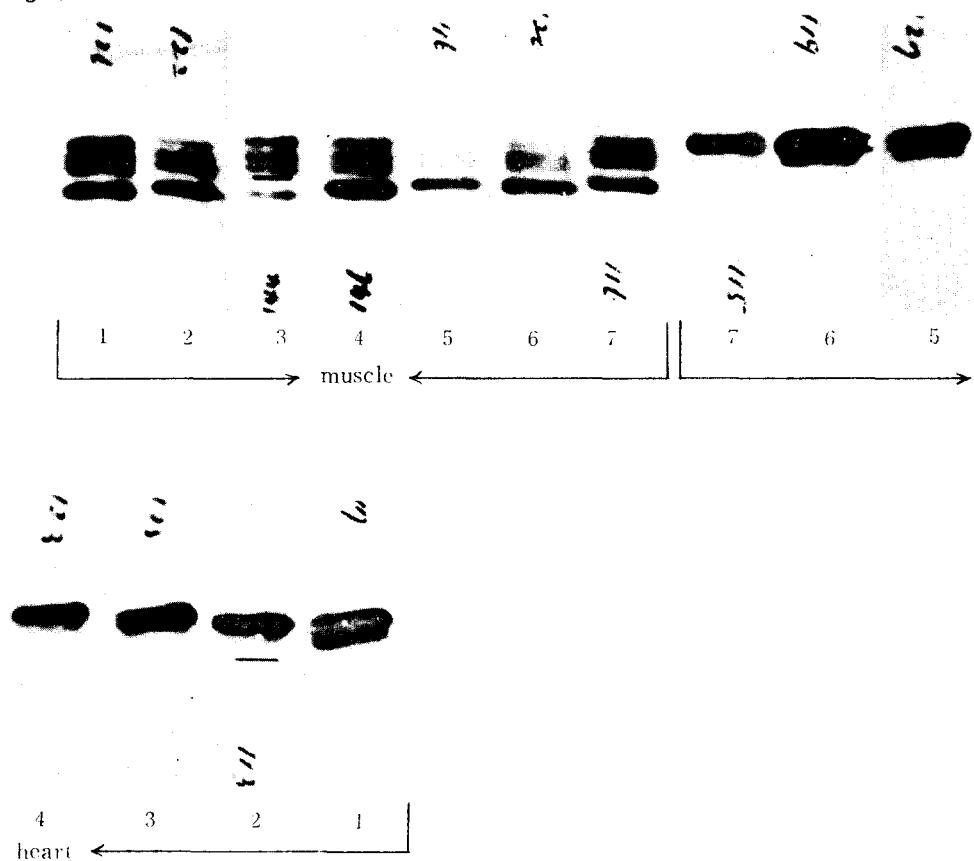
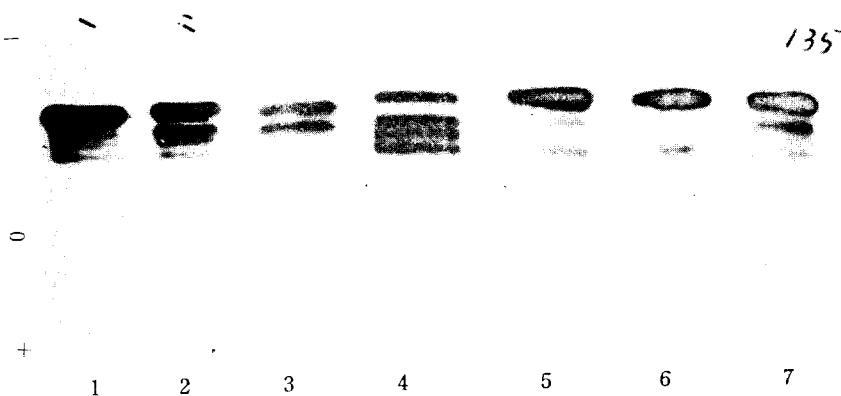


Fig. 5





**Fig. 6****Fig. 7**