

돼지체조직 및 난포구성분에 있어 Lactate Dehydrogenase Isozyme 양식

이중한 · 변태호 · 유형진 · 이상호
고려대학교 자연자원대학 축산학과

Isozyme Patterns of Lactate Dehydrogenase in Follicular Components

Lee, J. H., T. H. Byun, H. J. Yoo and S. H. Lee

Department of Animal Science, College of Natural Resources, Korea University, 136-701 Seoul

SUMMARY

Various tissues and follicular components were analysed for the determination of lactate dehydrogenase(LDH) isozyme patterns by electrophoretic technique with chromogen reaction in the pig. Optimum conditions for the tissue homogenate and the storage were finally established. Small quantities of follicular components were analysed for the typing of LDH isozymes by microelectrophoresis. Microelectrophoretic analysis showed that only LDH-1 was visible in the oocytes, all isozymes in cumulus masses, and LDH-1, 2 and 3 in follicular fluid. The results provide critical information on the LDH activity of various tissues and follicular components. Furthermore, the developed methods should be useful for the analysis of LDH in the small quantity of samples, especially in the oocyte, and easily applicable to the oocyte and early embryos of other domestic species.

I. 서 론

Lactate dehydrogenase(LDH, L-lactate : NAD⁺ oxidoreductase, EC 1.1.1.27)는 유용한 단백질 표지의 하나로 여러 종 혹은 종내에서 특이하게 발현되는 것으로 잘 알려져 있다. LDH는 분자량 약 135,000 dalton으로 대부분의 종에서 다섯가지의 isozyme이 존재하는 것이 밝혀져 있다(Moss, 1982). 즉, 약 35,000 dalton 되는 A, B 두 가지의 LDH subunits가 각기 상이하게 tetramer를 구성하고 있어 subunit의 구성비율에 따라 5개의 isozyme 형태로 체

내에 존재하며 에너지 대사작용과 관련하여 대사경로에 있어 중요한 효소, 중의 하나로 lactate와 pyruvate의 상호전환을 촉매하는 기능을 가지고 있다(Auerbach and Brinster, 1967; Bergel et al., 1989). LDH는 2개의 다른 subunits, A와 B의 중합으로 이루어져 있으며 이들의 구성비율에 따라 각각 LDH-1(BBBB), LDH-2(ABBB), LDH-3(AABB), LDH-4(AAAB) 및 LDH-5(AAAA)의 isozyme을 가지고 있으며, B-subunit tetramer인 LDH-1은 자성생식세포와 초기배에서 가장 일반적으로 나타난다(Everse and Kaplan, 1973; Stevens et al., 1982).

*본 실험은 ERC 동물자원연구의 자원에 의하여 수행되었음

각종 조직에서의 폭넓은 연구와는 달리 자성생식세포인 난자와 수정후의 초기배발생 및 배세포 분화 중의 LDH 발현에 대한 연구는 이들 세포의 수직 제한으로 대조적인 경향을 보이고 있다. 특히 난자는 난자형성 중에 모계(maternal)의 m-RNA 및 단백질을 이미 축적하여 수정에 이은 초기배 발생중에 소비되거나, 일부는 초기배 유전자에 의해 생산되므로 초기배 발생중에 LDH 유전자의 발현 및 LDH 활성의 출현시기에 대한 기초지식의 확립은 여러 유전자발현에 대한 model을 제시해 주어 매우 중요하다고 할 수 있겠다(Brinster, 1967). 실제로 마우스의 경우 배양체계가 확립되어 현재 수정란부터 배반포까지 초기배 발생을 체외에서 유도할 수 있는 유일한 종으로 알려져 있는 것도 그 동안의 대사연구에 의한 성과로 볼 수 있을 것이다(Brinster, 1965).

따라서 본 연구는 가축 중에서도 생식세포의 확보가 비교적 용이한 돼지를 모델로 하여 체조직, 난포 구성분인 난포액, 난구세포 및 난자의 성숙분화 중에 일어나는 LDH의 발현 및 활성을 조사하였다. 한편 물질대사에 관여하는 LDH의 발현시기를 결정함으로써 이들 결과가 다른 대가축에도 적용되어 난자 및 배세포의 체외배양액 개발에 이용될 수 있도록 그 기초자료를 제공하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시 약

전기영동에 이용되는 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A) 또는 Bio-Rad Laboratories (South Richmond, CA, U.S.A)에서 구매하였으며, 난자의 배양 및 취급에 이용되는 배양의 구성분은 BDH Chemicals Ltd. (Poole, U.K.)로부터 구매하였으며 그 외의 시약은 그 구매처를 아래에 표시하였다.

2. 체조직, 난자의 준비

1) 체조직

도살 직후의 돼지에서 근육, 심장, 정소, 신장의 각 조직을 도살장에서 채취하여 0.9% 생리식염수로 수세한 후, 액체질소(-196℃)에 넣어 실험실로 운반하였다. 각 조직의 추출물을 제조하기 위하여 액체질소에

저장중인 조직을 증류수(distilled water, DW)와 다양한 비율로 혼합하여 0℃의 냉각시킨 용기내에서 조직균질기(tissue homogenizer, Ace homogenizer, Nihonseikikaisha, Japan)로 5분간 5,000rpm으로 균질화시키고 microcentrifuge(Vision Sci. Co., Seoul, Korea)로 15,000rpm, 4℃에서 5분간 원심분리시킨 후 상정액을 다시 5회 반복하여 분리하였다. 조직균질물은 0.22μm membrane filter(Millipore U.S.A.)로 여과시켜 1% bromophenol blue(BB)를 첨가시킨 후, 4℃냉장고에 보관하여 전기영동 시료로 이용하였다(Allred and Keutel, 1968).

2) 난포구성분의 준비

돼지 미성숙난자는 도축장에서 채취한 난소로부터 난포란을 채취하여 난구세포는 hyaluronidase(300 IU/ml, type IV, Sigma)를 이용하여 제거하였으며 투명대는 acid Tyrode-용액(pH 2.5)으로 제거한 후 4mg/ml의 polyvinylpyrrolidone (PVP, BDH)이 들어있는 인산완충용액(phosphate buffered saline, pH 7.4, PBS) (PBS+PVP)으로 3회 세척하고 Eppendorf tube안으로 난자를 옮겨 PVP가 없는 PBS(PBS-PVP)로 옮겨 2,000rpm에서 3분간 원심분리시켜 잔여 PVP를 제거시켰다. 난자 50개당 5μl의 증류수를 넣어 전기영동을 실시하기 전에 3회의 동결 및 용해과정을 반복하여 난자가 완전히 파괴된 것을 확인한 후 전기영동을 실시하였다.

3. 체조직 LDH의 전기영동 분석

Byun 등 (1991)의 방법에 의해 polyacrylamide gel 전기영동을 실시한 후 gel상에 분리된 LDH isozyme typing을 위해 LDH 활성탐지 반응액을 tris-citrate 완충용액에서 정색반응을 실시하였다.

4. 난포구성분의 미세전기영동

난자 및 난포액과 같은 극미량의 시료를 분석하기 위한 방법으로 체조직을 이용하여 미세전기영동법을 이용 3.75%의 stacking gel 용액 8~10μl를 gel이 굳기 전에 parafilm위에서 조직균질물 2μl와 신속하게 혼합하여 loading시킨 후 tube를 1ml 주사기를 이용하여 제작한 adaptor에 끼워 등전점 전기영동 unit에 조립시켜 100V 일정한 전압으로 약 1.5시간 전기영동

시켰다. 각 미세관을 -20°C 에서 동결 및 용해시킨 다음, 주사기를 이용하여 gel을 미세관으로부터 분리하였다. 분리된 gel은 반응액이 들어있는 Eppendorf tube에 넣어서 정색반응을 실시하였다(Gossbach, 1965; Felgenhauer, 1967).

III. 결과 및 고찰

1. 체조직에 있어 LDH의 분석

체조직에서의 LDH분석 방법을 확립시키기 위해 기존의 여러가지 추출방법 및 균질물의 보존에 대한 적정조건의 선택을 예비실험을 통하여 결정하였다. 특히, 최종적으로 LDH isozyme을 조직별로 동일 gel상에서 뚜렷하게 하기 위해서 조직의 신선도, 조직의 균

질화, 상징액의 보존 및 시료의 적정 loading 량 등을 고려하였다.

첫째, 조직과 증류수와의 혼합비율의 선택결정은 Table 1에 표시한 혼합비율에 의해 준비된 조직추출물의 상징액 대부분의 경우, 조직과 증류수의 혼합비율이 1:1(w/v)로 LDH의 각 isozyme 양식을 극대화시켜 균일하게 보여주었다.

둘째, 균질물의 millipore filtering으로 일부 응집된 단백질입자들 및 증식 가능한 오염 bacteria를 제거하여 동결보존 없이 4°C 에 저장하였다.

셋째, 실험 목적상 여러가지 이유로 비교를 위해 동일시료의 보관이 필요한 경우가 상당히 존재한다. 그러므로 조직균질물 상징액의 예비실험 결과, 동결 및 용해에 따르는 단백질의 응집현상 및 LDH의 손실을

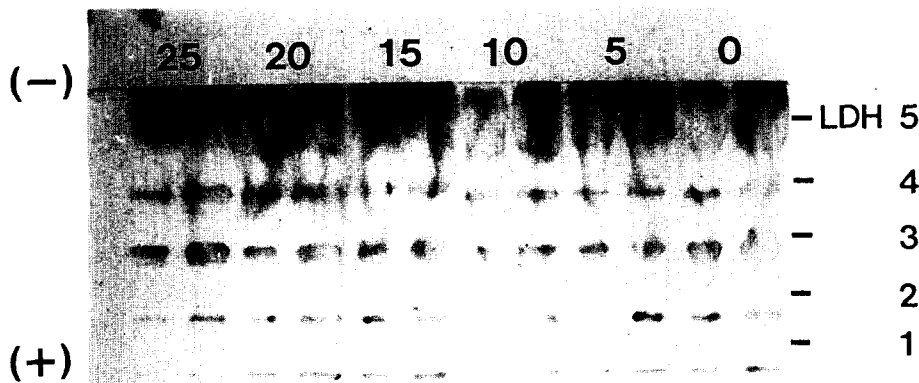


Fig. 1. Localization of porcine LDH isozymes during storage. Twenty μl of muscle homogenate sample was loaded and electrophoresed after appropriate period of storage at 4°C . The periods of storage were indicated on the top of the gel. The LDH activity did not change very much during least 25 days of storage at 4°C .

Table 1. Selected ratios of tissue and distilled water for the preparation of tissue homogenates giving maximum resolution of LDH isozymes

Tissues	The ratios(w/v) used for homogenate	
	Tissues(g)	DW (μl)
Muscle	1	2
Heart	1	1
Testes	2	1
Kidney	2	1

1. The final ratios were determined by analysing LDH activity in various dilutions.

최소화 하기 위해 동결시키지 않고 4°C에 냉장보존시 일어나는 LDH 활성의 변화를 전기영동에 의해 검토한 결과, 최소 25일간은 뚜렷한 LDH 활성의 감소를 찾아보기 어려웠다(Fig. 1).

2. 미세전기 영동법에 의한 LDH의 분리

전통적인 크기의 전기영동법에 의해 시료의 양이 적은 경우에 LDH의 활성을 분석한다는 것은 매우 어렵다. 그러므로 이와 같은 경우 LDH isozyme 분리를 위해 새로운 접근방식이 요구된다. 따라서 본 실험에서는 gel의 크기를 최소한으로 줄여 미세 유리관에 의한 LDH의 분리를 시도하였다. 그 결과 각 isozyme의 분리양식이 전통적인 전기영동방법과 마찬가지로 뚜렷하게 나타났으나(Fig. 2a), 사진기록에 의한 분리양식을 극대화 하기 위해 물을 채운 유리관을 통해

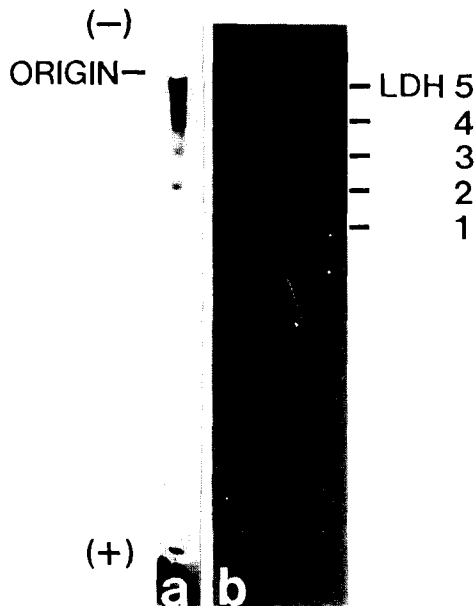


Fig. 2. LDH localization in micro-poly acrylamide gel electrophoresis system showing appearance of 5 LDH isozymes separated by microelectrophoresis. Four μ l of muscle homogenate was loaded and electrophoresed in a microcapillary(a). By using a glass tube filled with water, the separated bands were magnified to demonstrate LDH isozyme patterns(b)

LDH band 확대 및 좌우확장효과를 얻음으로써 정상 크기의 전기영동 gel에서 얻을 수 있는 결과와 대등한 수준의 해상도를 얻을 수 있었다(Fig. 2b). 유사한 미세전기 영동법으로 glass slide를 이용한 방법(Allred and Keutel, 1968)이 보고되었으나 표시량이 많이 요구되므로 포유동물 난자와 같이 수석·양적으로 매우 작은 시료의 분석에 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

3. 난포구성물 LDH의 미세전기영동 분석

앞서 체조직에서 확립된 microelectrophoresis 방법을 난포구성분과 같이 소량의 시료에 직접 응용시켜 이들의 LDH isozyme typing을 실시하였다. 특히 전통적인 정상크기의 전기영동 gel 및 agarose gel에서 비록 양을 증가시켰지만 각 isozyme의 활성이 전혀 나타나지 않거나 거의 사진기록에 의한 정상분석이 곤란하므로 소량의 매우 미세한 microtube gel에 의해 분석하였다. 난포액의 2.5, 0.5 및 1 μ l, 난자는 5, 10 및 10개, 난구세포는 2.5~50 $\times 10^4$ 개를 loading 하여 정확하게 각 isozyme을 분석할 수 있었다.

난구세포는 5개의 난구세포피를 시료로 이용하였을 경우 LDH isozyme 활성을 보였으나 LDH-3, 4 및 5의 활성이 매우 큰 것으로 나타났으며(Fig. 3a와 3b), 난포액에서는 시료량 1~4 μ l를 이용한 경우가 대개 LDH-1, 2 및 3의 활성이 매우 큰 것으로 나타났다(Fig. 3c와 d). 그러나 난자는 불과 5개의 난자를 이용한 경우에도 LDH-1 isozyme의 활성을 보였다(Fig. 3e와 f). 그 후 난자의 수를 2~4배까지 증가시켜도 LDH-1 isozyme 이외에 isozyme의 활성은 탐지되지 않았다. 돼지의 난자에서도 마우스 등의 실험 동물에서 알려진 난자 특히 LDH isozyme인 LDH-1만이 존재하는 것을 알 수 있었다(Rapolla and Koskimies, 1967). 한편, 토끼에서 미수정란과 난구세포를 분리시키지 않고 이용한 실험결과에서는 LDH-1, 2 및 3 isozyme이 나타나지만 난구세포가 분리된 토끼 난자 자체에서는 LDH-1 및 2만이 나타남을 보여주었다(Schultz and Borwder, 1975).

한편, 난자의 경우, 분리에 많은 수가 필요하였던 것은 돼지의 난자세포가 난구세포와는 상이하고, 마우스의 난자와 비교할 때 정량분석의 경우에서도 활성이 적었던 사실로 미루어 보아 단백질의 추출성이 매우

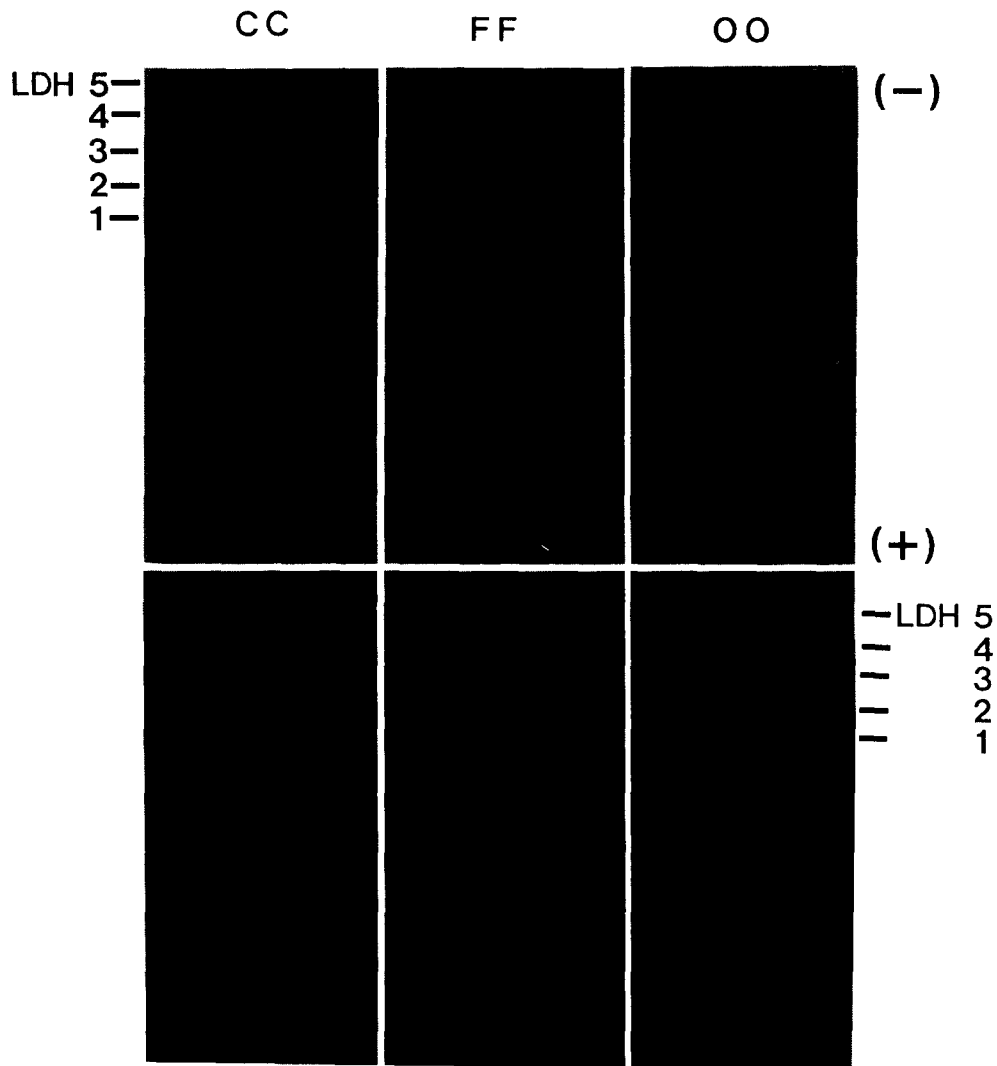


Fig. 3. LDH isozyme typing in cumulus cells, follicular fluid and the oocyte using microelectrophoresis. Three isozymes (LDH-3, 4 and 5) are major LDH in cumulus cells (a and b). In contrast, follicular fluid demonstrated LDH-1, 2 and 3 (c and d). The oocyte showed only LDH-1 isozyme in the microgel using 5 oocytes. Microtube gels (a, c and e) were photographed under a magnifying device (b, d and f). Abbreviations are CC, cumulus cells; FF, follicular fluid and OO, oocytes.

저조하기 때문인 것으로 생각된다. 결론적으로 돼지 난자 및 유사한 세포질 성분을 갖는 대부분의 가축 난자의 생화학적 분석을 위해서는 난자 세포로부터 단백질을 추출을 극대화 할 수 있는 방법, 즉 난자세포의 파괴방법, 이용완충액의 선택, carrier protein 등에 대

한 집중적인 연구가 요구된다.

IV. 요약

돼지에 있어서 여러가지 체조직과 난포내용물 즉,

난자, 난구세포 및 난포액에서의 lactate dehydrogenase (LDH) isozyme 양식과 활성을 결정하기 위해 미세전기영동법에 의해 LDH 활성을 분석하여, 조직균질물의 조제 및 저장의 적정조건을 최종적으로 확립시켰다. 난자, 난구세포 및 난포액과 같은 소량의 시료에서 LDH를 분석한 경우 미세전기영동 분석에서는 불과 5개의 난자를 이용하여 LDH-1의 분석이 가능하였으며, 5개의 난구세포로 5개의 LDH isozyme 양식을 모두 보여 주었으며, 한편 난포액의 경우 LDH-1, 2 및 3을 보여주었다. 이 같은 결과는 난포를 형성하고 있는 각 난포구성분의 LDH 활성이 각기 특정한 LDH isozyme 발현양식을 갖고 있으며, 난포내의 미세환경에서 상호보완적으로 대사작용에 관여하고 있음을 암시하는 것이다. 아울러 이용된 미세전기영동법에 의해 시료의 확보가 어려운 다른 대가축의 난자 및 초기배에서도 용이하게 이용될 수 있을 것이다.

V. 인용문헌

- Allred, R. J. and H. J. Keutel. 1968. Microslide acrylamide gel electrophoresis technique for tissue lactic dehydrogenase. *J. Lab. Clin. Med.* 71:179-182.
- Auerbach, S. and R. P. Brinster. 1967. Lactate dehydrogenase isozymes in the early mouse embryo. *Exp. Cell Res.* 46:89-92.
- Bergel, A. et al. 1989. Enzymatic aification for spectrophotometric and electrochemical assays of NAD⁺ and NADH. *Anal. Biochem.* 179:382-388.
- Brinster, R. L. 1965. Lactate dehydrogenase activity in the preimplanted mouse embryo. *Biochim. Biophys. Acta* 110:439-441.
- Brinster, R. L. 1967. Lactate dehydrogenase activity in preimplantation rat embryo. *Nature* 214:1246-1247.
- Byun, T. H. 1992. Analysis of protein patterns of cellular and fluidal components in the porcine follicular contents. *Korean J. Anim. Reprod.* 16:289-299.
- Everse, J. and N.O. Kaplan. 1973. Lactate dehydrogenase:structure and function. *Adv. Enzymol.* 37:61-133.
- Felgenhauer, K. 1967. Microelectrophoresis on polyacrylamide gel. *Biochim. Biophys. Acta* 133:165-167.
- Grossbach, U. 1965. Acrylamide gel electrophoresis in capillary columns. *Biochim. Biophys. Acta* 107:180-182.
- Lapola, J. and O. Koskimies. 1967. Embryonic enzyme patterns:characterization of the single lactate dehydrogenase isozyme in preimplanted mouse ova. *Science* 148:1311-1312.
- Moss, D.W. 1982. Isoenzymes. Chapman and Hall Ltd., Bristol, U.K.
- Schultz, G.A. and L.W. Browder. 1975. Lactate dehydrogenase in preimplantation rabbit embryo. *Biochem. Genet.* 13:19-23.
- Stevens, S.L, Li, W.M. Fitch, Y.C.E. Pan and S.F. Sharief. 1982. Evolutionary relationships of vertebrate lactate dehydrogenase isozymes A₁(muscle), B₁(heart), and C₁(testis). *J. Biol. Chem.* 258:7029-7032.