

## 저산소 환경에 서식 하는 열대성 catfish (*Pangasius polyuranodon*, *Hypostomus plecostomus*)의 젖산탈수소효소 동위효소

조성규 · 염정주\*

청주대학교 생명유전통계학부 생명과학전공

Received July 24, 2004 / Accepted August 19, 2004

**Lactate Dehydrogenase Isozyme of Hypoxia Tropical Catfish (*Pangasius polyuranodon*, *Hypostomus plecostomus*).** Sung Kyu Cho and Jung Joo Yum\*. *Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea* – In native-polyacrylamide gel electrophoresis of *Pangasius polyuranodon*, the lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH) A<sub>4</sub>, A<sub>3</sub>B, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, AB<sub>3</sub> and B<sub>4</sub> isozymes were expressed in various tissues. The LDH A<sub>4</sub> and liver-specific C<sub>4</sub> isozymes were expressed in the tissues of *Hypostomus plecostomus*. The bands of LDH in skeletal muscle, heart and eye tissues were not detected while one band was detected in kidney and liver, and four bands were detected in brain. The detected one band in liver was identified as alcohol dehydrogenase and an anodal band of skeletal muscle was identified as nothing dehydrogenase. The LDH in skeletal muscle, heart and eye might function as pyruvate reductase. The degree of inhibitions of LDH in skeletal muscle and heart of *P. polyuranodon* by 10 mM pyruvate were measured 57.6% and 73.8%, respectively. However, those of LDH in tissues of *H. plecostomus* were measured 52.7-61.8% so tissue specificity did not appear. Therefore, *H. plecostomus* might be more acclimated to hypoxic environment by anaerobic metabolism of LDH isozymes than *P. polyuranodon*.

**Key words** – lactate dehydrogenase, isozymes, *Pangasius polyuranodon*, *Hypostomus plecostomus*.

젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH)는 NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase 활성을 갖는 효소들 중의 하나로 피루브산과 젖산의 상호환반응을 촉매하며[11], 독립적인 세 유전자 *Ldh-A*, *Ldh-B* 및 *Ldh-C*에 의하여 만들어지는 하부단위체 A, B 및 C로 구성된 분자량 140,000 정도의 사량체이다[17,22,24]. LDH 동위효소들은 혐기적인 조건과 호기적인 조건에서 각각 다른 대사상의 특성을 보여주고 있으므로 LDH 동위효소의 연구는 대사 생리학적 수준에서 적응 양상을 밝히는 좋은 수단이 되어왔다[2]. LDH A<sub>4</sub> 동위효소는 피루브산을 젖산으로 환원시키는데 유용하며 거의 모든 조직에 존재하지만 골격근 같은 혐기적 조직에서 강한 활성을 보이고, B<sub>4</sub> 동위효소는 젖산을 피루브산으로 산화시키는데 유용하며 심장과 같은 호기적 조직에서 강한 활성을 보인다[15].

하부단위체 C를 포함하는 동위효소는 포유류와 조류의 경우 정소에서[10], 고등한 경골어류의 경우 눈, 뇌 및 간 조직에서 주로 나타나지만[12] 하등한 경골어류에서는 여러 조직에서 나타나며[12,17], 일부 중간어류군의 경우는 조직발현이 조절되지 않아 *Ldh-C* 유전자의 발현이 없는 것으로 보고되었다[19]. LDH C<sub>4</sub> 동위효소는 눈과 뇌조직의 경우, 강한 음하전을 띠어 양극쪽에서 나타나고, 간조직의 경우 강한 양

하전을 나타내어 음극 쪽에서 나타난다[22].

아마존 어류의 경우 계절에 따라 산소 유용성이 다르므로 장소에 따라 여러 달 동안 저 산소 상태에 있을 수 있다. 이러한 환경에 적응하기 위해서 대사가 조절되어 체내에서 요구되는 전체 ATP는 감소하고 혐기적 해당과정에 의해 유지된다[1]. 메기목에 속하는 경골어류는 *Ldh-A* 및 *Ldh-B*만 발현되고 *Ldh-C*는 발현되지 않은 것으로 보고 되었으나[19], 메기(*Silurus asotus*)에서 *Ldh-C*가 발현되는 것으로 확인되었고[13], LDH 동위효소들은 혐기적 또는 호기적 대사의 분화가 뚜렷하지 않으며 기능면에서 고등한 경골어류에 비해 진화가 덜 된 것으로 보고 되었다. Catfish는 저산소환경에 적응된 특이한 어류이므로 산소 유무와 관련된 대사에 관여하는 LDH 동위효소의 발현 양상을 연구하는데 유용하리라 생각되어 시료로 선택하였으며, 환경에 순응하는 과정에서의 대사를 확인하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

Catfish 두 종, *Pangasius polyuranodon* 및 *Hypostomus plecostomus*는 열대어 도매상에서 구입하여 사용하였다. Acrylamide, N,N'-methyl-bisacrylamide, DL-lactic acid, nitro blue tetrazolium (NBT), methyl thiazolyl blue (MTT), phenazine methosulfate (PMS), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), NAD reduced form (NADH), pyruvic

\*Corresponding author

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

E-mail : jjyum@cju.ac.kr

acid, bovine serum albumin (BSA), coomassie brilliant blue G-250 및 anti-rabbit IgG (peroxidase conjugate)는 Sigma (USA)사의 제품을 사용하였고, 나머지 시약은 GR (guaranteed reagent)급 시약을 사용하였다.

#### 조직추출액의 준비

골격근, 심장, 신장, 간, 눈 및 뇌 조직을 떼어낸 후 증류수로 혈액을 충분히 제거한 다음, 시료 조직에 4°C로 유지시킨 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85)를 3배 또는 7배(v/w) 가하여 얼음에 채운 glass homogenizer (Wheaton)로 파쇄하였다. 조직파쇄액은 4°C, 20,000×g refrigerated centrifuge (Hitachi 20 PR-52D, Japan)에서 1시간씩 2회 원심분리 하였으며 상등액을 시료로 사용하였다.

#### LDH의 활성측정

LDH 동위효소의 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<sup>+</sup>로 전환되는 정도를 spectrophotometer (Shimadzu UV-160A, Japan)로 25°C, 340 nm에서 측정하였다. 활성의 단위는 1분 동안 감소되는 흡광도 1.0을 1 unit로 하였다.

#### 단백질 정량

단백질은 Bradford의 방법[4]으로 정량하였다. Coomassie brilliant blue G-250 100 mg을 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 ml에 세계 저어주면서 섞은 후 95% ethanol 50 ml를 첨가한 다음 증류수로 1 l를 만든 후 사용하였다. BSA (µg/µl)를 표준 단백질로 사용하여 595 nm에서 표준정량곡선을 얻었으며 시료의 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다.

#### 전기영동(native-PAGE) 및 동위효소의 분석

Polyacrylamide gel은 Davis의 방법[8]에 따라 7.5%T, 2.65%C acrylamide separation gel과 3%T, 2.65% acrylamide stacking gel이 되도록 만들었다. Polyacrylamide vertical slab system (Hoefer SE250, USA)으로 thermostatic circulator (Rikakikai CA-1100, Japan)를 사용하여 4°C로 유지시키면서 전기영동하였다. 시료에 50% sucrose, 0.05% bromophenol blue 용액을 1:1(v/v)로 가하였고, Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 100V에서 20분간 전개시킨 후 200V에서 2시간 10분 동안 전기영동 하였다. 전기영동 후 LDH 동위효소는 Whitt의 방법[24]에 의해 NAD<sup>+</sup>, DL-lactic acid, PMS, NBT의 혼합물을 첨가하여 37°C에서 염색하였으며, MTT를 사용하는 경우, NAD<sup>+</sup> 대신에 MTT를 사용하여 염색하였다 [16]. 염색된 gel은 15% acetic acid로 고정한 후 동위효소를 확인하였다. LDH 동위효소의 활성 정도는 PAGE gel을 Bio-profile image analysis system (Vilber Lourmat, France)으로

사진을 찍은 후 BIO-ID++ 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 밀도계에 의해 정량한 동위효소들의 밀도 또는 양은 각 동위효소 밴드를 구성하는 모든 점들의 합,  $V = \sum_{i=1}^n I_i$  로 계산되었으며, 각 동위효소의 밀도는 동위효소들을 이룬 모든 점들의 합을 기준으로 하여 상대농도(%)로 재 측정하였다.

#### 면역화학적 분석

##### Western blotting

LDH를 polyacrylamide gel 전기영동한 후 gel상의 단백질을 semidry blotting system (Trans-blot SD, Bio-rad)에서 15 mM Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 25V에서 30분 동안 nitrocellulose membrane에 transfer시켰다. Membrane을 3% BSA/TBS (0.01M Tris buffered saline, pH 7.5) 용액에 넣고 25°C에서 1시간 동안 blocking시킨 후 TBS용액에서 10분간씩 3회 세척하였다. 0.5% BSA/TBS를 사용하여 anti-LDH A<sub>4</sub>는 1:1,000, 나머지 항체는 1:500으로 희석한 1차 항체용액에 membrane을 넣고 25°C에서 1시간 동안 shaking시킨 후 TBS용액으로 10분간씩 2회 세척하여 membrane에 결합하지 않은 1차 항체를 씻어주었다. 실험에 사용된 1차 항체는 anti-LDH A<sub>4</sub>[6], B<sub>4</sub>[5,14], liver-specific C<sub>4</sub>[20] 및 eye-specific C<sub>4</sub>[5] 혈청을 사용하였다. Anti-rabbit IgG (2차 항체)를 0.5% BSA/TBS를 사용하여 1:1,500으로 희석시킨 용액에 membrane을 넣고 1시간 동안 shaking시킨 후 항원과 결합하지 않은 2차 항체를 TBS용액으로 10분간씩 3회 세척하였다. Chloronaphtol 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 혼합액으로 반응시킨 후 증류수로 세척하여 반응을 정지시킨 다음 판정도를 확인하였다.

#### 항체 특이성

Catfish (*H. plecostomus*) 조직의 동위효소를 확인하기 위하여 눈조직에 대해 소 심장 LDH B<sub>4</sub>, 생쥐 신장 LDH B<sub>4</sub>, 대구 간 LDH C<sub>4</sub> 및 조피볼낙 눈 LDH C<sub>4</sub>에 대한 항혈청을 각각 가한 후 37°C에서 30분, 4°C에서 12시간 방치시킨 다음 4°C, 20,000g에서 원심분리 하였으며 상등액을 전기영동 하였다.

#### Alcohol dehydrogenase (ADH) 및 nothing dehydrogenase (NDH) 분석

전기영동 후 ADH는 NAD<sup>+</sup>, ethanol, PMS, NBT의 혼합물을 첨가하여 37°C에서 염색하였으며, NDH 반응은 기질을 사용하지 않고 NAD<sup>+</sup>, PMS, NBT의 혼합물을 첨가하여 37°C에서 염색하였다. 염색된 gel은 15% acetic acid로 고정하였다.

#### LDH의 기질의존성 측정

각 조직별 LDH의 활성이 기질농도에 의해 저해되는 정도를 알아보기 위해 catfish 두 종의 골격근, 심장, 신장, 간, 눈 및 뇌조직 LDH를 각각 피루브산 농도 100 µM에서 10 mM 까지 증가시키면서 활성의 변화를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**Catfish 조직의 LDH 활성 및 단백질 정량**

*P. polyuranodon* 조직의 LDH 활성을 측정된 결과 골격근의 활성이 가장 높았고, 신장, 눈, 뇌, 심장 및 간조직의 순서로 나타났으며, 단백질양은 신장, 심장, 눈, 뇌, 골격근 및 간조직의 순서로 나타났다(Table 1). 이러한 결과는 골격근 조직의 LDH 활성이 가장 크게 나타나는 모래무지의 결과[12] 및 7월에 채집된 풀망둑의 결과[25]와 일치하였다. *H. plecostomus* 조직의 LDH 활성을 측정된 결과 활성의 강도는 골격근, 뇌, 심장, 눈, 신장 및 간조직의 순서로 나타났으며, 단백질양은 심장, 신장, 뇌, 간, 눈 및 골격근조직의 순서로 나타났다(Table 2). 골격근의 활성이 가장 크게 나타난 점은 *P. polyuranodon*의 결과와 유사하였으나 심장 및 뇌조직의 활성이 비교적 크게 나타났다. 메기(*Silurus asotus*)를 10°C에 적응시킨 경우 간조직에서 LDH 활성이 가장 높았고 골격근조직도 높았다[13]. 그러나 20°C에 적응시킨 경우는 골격근 조직의 LDH 활성이 간조직에서보다 더 높아 본 실험에서 사용한 catfish 두 종은 열대어이므로 근육에서 LDH 활성이 더욱 높은 것은 유사하였다. 그러나 *P. polyuranodon*는 *S. asotus*에 비해 심장의 LDH 활성이 낮고, 두 종 모두 LDH 활성이 간조직에서 상당히 낮았으며, *H. plecostomus*의 경우 뇌조직에서 활성이 크게 나타나 뇌조직의 에너지공급과 밀접한 관련이 있는 것으로 보인다.

**전기영동을 이용한 LDH 동위효소들의 분석**

Catfish의 조직을 polyacrylamide gel 전기영동한 결과, *P. polyuranodon*의 경우 모든 조직들에서 5개 동위효소, A<sub>4</sub>,

A<sub>3</sub>B, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, AB<sub>3</sub>, 및 B<sub>4</sub> 동위효소들이 뚜렷하게 나타났고, 5개 동위효소 이외의 band가 신장과 간조직에서는 양극쪽에서 나타나고, 뇌조직에서는 음극쪽에서 나타났다(Fig. 1A). A<sub>4</sub>, A<sub>3</sub>B, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, AB<sub>3</sub> 및 B<sub>4</sub> 동위효소들의 전기영동상의 이동거리는 잉어목의 돌고기(*Pungtungia herzi*) 및 모래무지(*Pseudogobio esocinus*) LDH의 양상과 유사하게 나타났다[21]. 그러나 신장 및 간조직에서 나타나는 5개 동위효소 이외의 band는 음하전을 띠어 양극쪽에서 나타나 음극쪽에서 주로 확인되는 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소와는 다르고, 뇌조직에서 나타나는 5개 동위효소 이외의 band도 양하전을 띠어 음극쪽에서 나타나므로 양극쪽에서 확인되는 eye-specific C<sub>4</sub> 동위효소와 다른 것으로 생각되어 이는 잉어목과 농어목과는 다른 것으로 사료된다.

*H. plecostomus*의 경우 골격근, 심장 및 눈조직에서는 동위효소의 band가 나타나지 않았고, 신장 및 간조직에서 각각 하나의 band가 나타났으며, 간조직에서의 하나의 동위효소가 나타난 결과는 catfish (*Clarias batrachus*) 간조직에서의 결과와 일치하였으며[18], 뇌조직에서는 4개의 동위효소 band들이 나타났다(Fig. 1B). 따라서 메기(*S. asotus*)에서 A<sub>4</sub>와 B<sub>4</sub> 동위효소가 나타나는 결과[13]와는 달랐다. 골격근, 심장 및 눈조직에서 LDH 활성은 높게 측정되었으나 동위효소의 band가 나타나지 않은 것은 LDH의 활성은 pyruvate reductase로서 활성을 측정된 것이고, 전기영동상은 lactate oxidase의 활성을 측정된 것이므로 이들 조직에서 LDH는 pyruvate reductase로서 기능을 하는 것으로 생각된다. 또한 NBT 보다 더 높은 환원력을 가진 MTT를 사용하여 native-PAGE gel의 LDH 염색을 실시한 결과(Fig. 2) 골격근, 눈 및 뇌조직에서 A<sub>4</sub>와 liver specific C<sub>4</sub> 동위효소가 나타났으며 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소가 음극쪽으로 나타나는 잉어목어류의

Table 1. LDH activities and protein concentrations of various tissues in *Pangasius polyuranodon*

Tissue	Activity (unit/g)	Protein conc. (mg/g)
Skeletal muscle	401.4	88.7
Heart	62.6	296.5
Kidney	78.5	331.8
Liver	25.2	65.6
Eye	68.4	296.3
Brain	67.0	130.2

Table 2. LDH activities and protein concentrations of various tissues in *Hypostomus plecostomus*

Tissue	Activity (unit/g)	Protein conc. (mg/g)
Skeletal muscle	336.6	12.0
Heart	153.6	21.6
Kidney	56.9	18.4
Liver	13.4	12.8
Eye	61.9	12.3
Brain	171.6	15.6

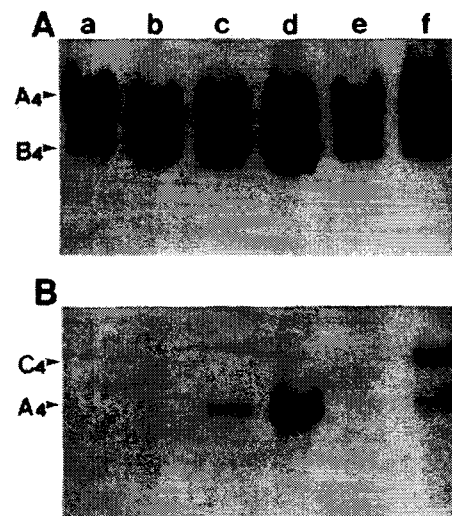


Fig. 1. Native-PAGE of LDH isozymes in catfishes. A, *Pangasius polyuranodon*; B, *Hypostomus plecostomus*; a, Skeletal muscle; b, heart; c, kidney; d, liver; e, eye; f, brain.

결과[21]와 같았다.

*P. polyuranodon* LDH 동위효소들의 상대적 활성을 분석한 결과(Table 3) 혐기적 조직인 골격근조직에서는 A<sub>4</sub> 동위효소의 상대적 활성이 47.8%로 가장 강한 활성을 보였고, 호기적 조직인 심장에서는 AB<sub>3</sub> 및 B<sub>4</sub> 동위효소의 상대적 활성이 각각 24.2%와 23.48%로 5가지 동위효소의 활성이 모두 나타났다. 그러나 눈과 뇌조직의 경우 호기적인 조직임에도 불구하고 상대적으로 A<sub>4</sub> 동위효소의 활성이 강하게 나타났으며, B<sub>4</sub> 동위효소의 활성도 눈조직의 경우 강하게 나타났으므로 저산소 환경에 적응하여 나타나는 현상으로 사료된다(Table 3). *H. plecostomus* LDH 동위효소들의 경우(Table 4) 골격근조직에서 A<sub>4</sub> 동위효소의 상대적 활성이 33.0%로 가장 높았고, B<sub>4</sub> 동위효소의 활성은 나타나지 않았으며, 눈 및 뇌조직의 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소의 활성이 각각 55.9% 및 66.9%로

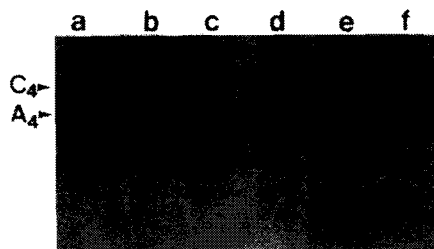


Fig. 2. Native-PAGE of LDH isozymes in catfish (*Hypostomus plecostomus*) stained with MTT. a, Skeletal muscle; b, heart; c, kidney; d, liver; e, eye; f, brain.

Table 3. Relative activity (%) of LDH isozymes in tissues of *Pangasius polyuranodon*

	Muscle	Heart	Kidney	Liver	Eye	Brain
Band	-	-	-	-	-	3.8
Band	-	-	-	-	-	5.3
A <sub>4</sub>	47.8	11.8	19.0	9.8	29.9	21.3
A <sub>3</sub> B	20.7	19.1	21.3	14.1	18.6	20.2
A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	7.7	21.5	14.1	16.3	13.9	20.0
AB <sub>3</sub>	7.7	24.2	13.0	17.6	15.3	15.7
B <sub>4</sub>	16.1	23.4	25.7	28.9	22.4	13.8
Band	-	-	4.2	7.6	-	-
Band	-	-	2.8	5.7	-	-

Table 4. Relative activity (%) of LDH isozymes in tissues of *Hypostomus plecostomus*

	Muscle	Heart	Kidney	Liver	Eye	Brain
C <sub>4</sub>	12.6	-	-	-	55.9	66.9
Band	10.8	-	-	-	-	-
Band	8.6	-	-	-	-	-
A <sub>4</sub>	33.0	100.0	-	-	44.1	33.1
Band	9.5	-	100.0	100.0	-	-
Band	25.7	-	-	-	-	-

나타났다.

간조직의 경우 LDH band는 Fig. 2에서 강하게 나타났으나, Fig. 5A에서 ADH로 확인되었으므로 간조직에는 LDH와 ADH band가 함께 나타나는 것으로 생각된다(Table 4).

### 면역화학적 분석

*P. polyuranodon* 눈조직의 LDH를 격자 A<sub>4</sub>와 소 B<sub>4</sub> 동위효소에 대한 항체와 Western blotting을 실시하여 반응시킨 결과, 격자 A<sub>4</sub>에 대한 항체와 반응하여 A<sub>4</sub> 동위효소가 확인되었고, 소 B<sub>4</sub>에 대한 항체와도 반응하여 B<sub>4</sub> 동위효소의 위치가 확인되었다(Fig. 3b, c). 따라서 A<sub>4</sub>, A<sub>3</sub>B, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, AB<sub>3</sub> 및 B<sub>4</sub> 동위효소들의 위치를 확인 할 수 있었다(Fig. 3a). *H. plecostomus*의 경우 여러 동위효소를 분명하게 확인 하기위해 골격근조직과 뇌조직을 혼합한 조직액을 사용하여 A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub> 및 C<sub>4</sub>에 대한 항체와 Western blotting을 실시하였다. 실험결과 격자 A<sub>4</sub> 동위효소에 대한 항체와 반응하여 A<sub>4</sub> 동위효소의 위치가 확인되었으나(Fig. 3f) B<sub>4</sub> 및 C<sub>4</sub>에 대한 여러 항체들과는 반응이 불분명하게 나타나서(Fig. 3g-j), 면역침전반응을 실시하게 되었다(Fig. 4). 면역침전 반응 후 전기영동을 실시하여 MTT를 이용한 LDH 동위효소 염색을 실시한 결과, 음극쪽의 LDH band가 LDH B<sub>4</sub>에 대한 항혈청(Fig. 4b-e) 및 조피불낙 눈 C<sub>4</sub>에 대한 항혈청(Fig. 4h, i)과는 반응하지 않아 전기영동결과 band가 나타나고, 대구 간 C<sub>4</sub>에 대한 항혈청과는 항원-항체 복합체를 형성하여 전기영동결과 나타나지 않았다(Fig. 4g). 따라서 음극쪽에서 나타난 LDH band는 liver-specific LDH C<sub>4</sub> 동위효소로 확인되었다(Fig. 4g). *H. plecostomus*의 A<sub>4</sub> 동위효소 보다 양극쪽의 band는 Fig. 3의 Western blotting 상에서 A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>에 대한 항체들과 모두 반응하여 나타나므로 어떤 동위효소인지 결과 해석이 불분명하므로 ADH 및 NDH 염색을 실시하였다.

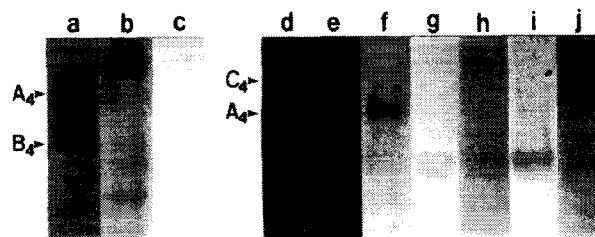


Fig. 3. Immunoblotting of LDH isozymes. LDH isozymes were detected by Western blotting after polyacrylamide gel electrophoresis. a, Catfish (*Pangasius polyuranodon*) eye; b, Western blot of eye tissue with the anti-A<sub>4</sub> isozyme; c, anti-B<sub>4</sub> isozyme; d, catfish (*Hypostomus plecostomus*) skeletal muscle; e, brain; f, Western blot of mixture of skeletal muscle and brain with the anti-A<sub>4</sub> isozyme; g, anti-*Bos taurus* B<sub>4</sub> isozyme; h, anti-*Mus musculus* B<sub>4</sub> isozyme; i, anti-liver-specific C<sub>4</sub> isozyme; j, anti-eye-specific C<sub>4</sub> isozyme.

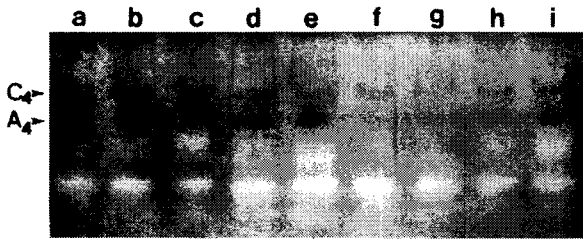


Fig. 4. Effect of *Bos taurus* B<sub>4</sub> antiserum (anti-BB<sub>4</sub>), *Mus musculus* B<sub>4</sub> antiserum (anti-MB<sub>4</sub>), *Gadus macrocephalus* liver-specific C<sub>4</sub> antiserum (anti-liver C<sub>4</sub>) and *Sebastes Schlegeli* eye-specific C<sub>4</sub> antiserum (anti-eye C<sub>4</sub>) on catfish (*Hypostomus plecostomus*) eye isozymes. a, *Hypostomus plecostomus* eye extract (HE); b, HE + anti-BB<sub>4</sub> (1:0.5); c, HE + anti-BB<sub>4</sub> (1:1); d, HE + anti-MB<sub>4</sub> (1:0.5); e, HE + anti-MB<sub>4</sub> (1:1); f, HE + anti-liver C<sub>4</sub> (1:0.5); g, HE + anti-liver C<sub>4</sub> (1:1); h, HE + anti-eye C<sub>4</sub> (1:0.5); i, HE + anti-eye C<sub>4</sub> (1:1).

**ADH 및 NDH 분석**

농어목어류는 LDH 염색 시 ADH 및 NDH가 나타나는 경우가 있다[3,9]. 따라서 대조군으로 *H. plecostomus*의 각 조직을 전기영동한 후 ADH (Fig. 5A) 및 NDH (Fig. 5B) 염색을 실시한 결과 간조직에서 각각 ADH 및 NDH band가 나타났다(Fig. 5Ad, Bd). ADH가 간조직에서 강하게 나타난 것은 Basaglia의 결과[3]와 같았고, NDH가 LDH 보다 양극쪽에 나타난 것은 de Ligny 등의 결과[9]와 같으므로 이 band는 NDH로 볼 수 있다(Fig. 5Ba). NDH 반응은 동위효소분석 시 일어나는 인위적 현상으로 tetrazolium을 사용하여 염색할 때 발생하는 비 특이적인 반응이다. 실험 시 큰 적용부피, 염색시간의 연장, 강한 염기성조건 또는 PMS의 과다사용 등에 의하여 현저하게 나타나는 현상으로 단백질에 결합된 sulphhydryl기들로 인한 것으로 알려져 있다[23].

**LDH의 기질의존성**

근육 같은 혐기적 조직내에 많이 존재하는 LDH A<sub>4</sub> 동위효소는 고농도의 피루브산에 의해서 약간 저해되지만, 심장 및 뇌조직 같은 호기적 조직에 많은 B<sub>4</sub> 동위효소는 저농도의 피루브산에서도 저해 된다. 또한 C<sub>4</sub> 동위효소는 A<sub>4</sub>와 B<sub>4</sub> 동위효소의 중간의 역학특성을 나타낸다[7].

*P. polyuranodon* 조직의 LDH 활성이 피루브산 농도에 의해 저해되는 정도를 측정된 결과, 10 mM 피루브산에서 골격근은 57.6%, 심장은 73.8% 정도 저해되어, 각각 A<sub>4</sub>와 B<sub>4</sub> 동위효소가 많이 존재하는 골격근과 심장의 특성으로 인한 결과와 일치 하였다(Fig. 6). *H. plecostomus* 조직의 LDH 활성은 피루브산에 의해 52.7-61.8%로 저해되므로 조직특이성이 크게 나타나지 않았다(Fig. 7).

본 연구 결과 LDH 동위효소의 분화가 잘되어 있는 *P. polyuranodon* 보다 *H. plecostomus*가 더욱 운동성이 낮고, 더 저

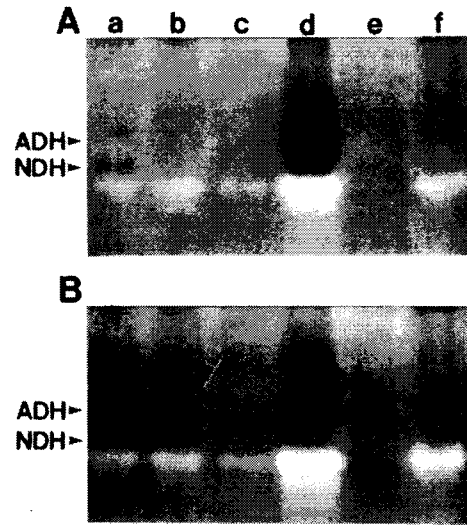


Fig. 5. Native-PAGE of alcohol dehydrogenase (A) and nothing dehydrogenase (B) in catfish (*Hypostomus plecostomus*). a, Skeletal muscle; b, heart; c, kidney; d, liver; e, eye; f, brain. ADH, alcohol dehydrogenase; NDH, nothing dehydrogenase.

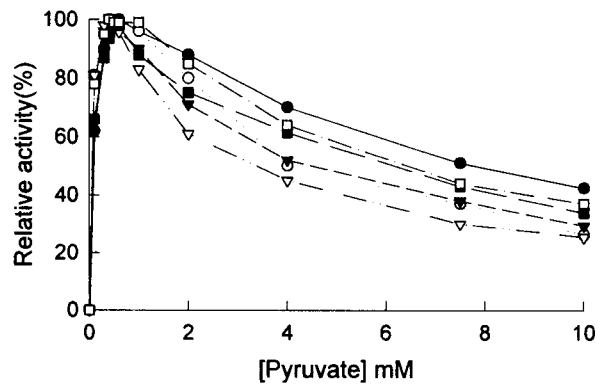


Fig. 6. Effect of pyruvate concentration on the LDH activity of various tissues in *Pangasius polyuranodon*. ●, Skeletal muscle; ○, heart; ▼, kidney; ▽, liver; ■, eye; □, brain.

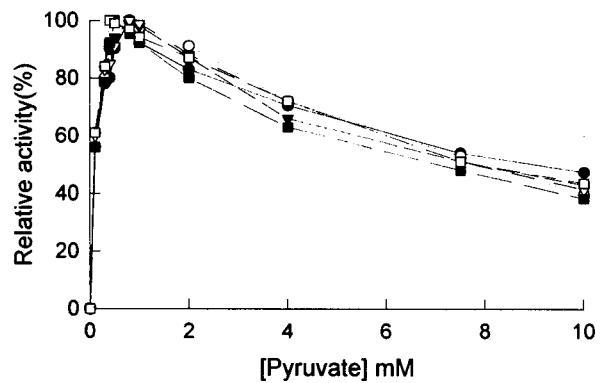


Fig. 7. Effect of pyruvate concentration on the LDH activity of various tissues in *Hypostomus plecostomus*. ●, Skeletal muscle; ○, heart; ▼, kidney; ▽, liver; ■, eye; □, brain.

서성이므로 동위효소의 분화가 덜되어 있으며, 저산소 환경에서 혐기적 대사에 의해 순응되어졌다고 생각된다.

## 요 약

*Pangasius polyuranodon* 조직의 젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH)는 A<sub>4</sub>, A<sub>3</sub>B, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, AB<sub>3</sub> 및 B<sub>4</sub> 동위효소들이 모두 발현되었다. *Hypostomus plecostomus* LDH의 경우 A<sub>4</sub>와 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소가 발현되었다. 골격근, 심장 및 눈조직에서는 동위효소의 band가 나타나지 않았고, 신장 및 간조직에서 각각 하나의 band가 나타났으며, 뇌 조직에서는 4개의 동위효소 band들이 나타났다. 간조직의 band는 alcohol dehydrogenase로 확인되었고, 골격근에서 양극쪽 band는 nothing dehydrogenase로 확인되었다. 따라서 골격근, 심장 및 눈조직에서 LDH는 pyruvate reductase로서 기능을 하는 것으로 생각된다. *P. polyuranodon* 조직별 피루브산에 의한 저해정도는 10 mM 피루브산에서 골격근은 57.6%, 심장은 73.8%로 측정되었으나 *H. plecostomus*의 조직들은 52.7-61.8%로 측정되어 조직특이성이 나타나지 않았다. 따라서 *H. plecostomus*가 *P. polyuranodon* 보다 더욱 저산소 환경에서 혐기적 대사에 의해 순응되어졌다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Almeida-Val, V. M. F. and I. P. Farias. 1996. *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*. pp. 257-271, INPA, Manaus.
- Almeida-Val, V. M. F. and A. L. Val. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **105B**, 21-28.
- Basaglia F. 1991. Lactate dehydrogenase isozymes and their genetic variation in fifteen Sparidae species (Perciformes, teleostei). *Comp. Biochem. Physiol.* **98B**, 1-8.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Cho, S. K. 2000. Mitochondrial lactate dehydrogenase in tissues of vertebrate. Ph.D. Thesis Cheongju Univ., Korea 88pp.
- Cho, S. K., S. Y. Park and J. J. Yum. 1993. Purification and immunochemistry of lactate dehydrogenase isozyme in *Lampetra japonica*. *Korean J. Zool.* **36**, 505-513.
- Cho, S. K. and J. J. Yum. 1993. Heterogeneity of lactate dehydrogenase isozymes in tissues of *Lampetra japonica*. *Korean J. Zool.* **36**, 319-328.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis- II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
- De Ligny W., H. Hogendoorn, B. L. Verboom and J. Willemsen. 1975. Functional aspects of "nothing dehydrogenase" polymorphism in the pike-perch (*Lucioperca lucioperca* L.), pp. 681-697, In Markert C. L. (eds.), *The Isozymes II*, Academic Press Inc., New York.
- Goldberg, E. 1972. Amino acid composition and properties of crystalline lactate dehydrogenase X from mouse testes. *J. Biol. Chem.* **247**, 2044 -2048.
- Holbrook, J. J., A. Liljas, S. J. Steindel and M. G. Rossmann. 1975. Lactate dehydrogenase, pp. 191-292, In Boyer P. D. (eds.), *The Enzymes*, Academic Press Inc., New York.
- Kim, M. O. and J. J. Yum. 1989. Purification, kinetics and immunochemistry of two homotetrameric lactate dehydrogenase isozymes in *Pseudogobio esocinus* (Cypriniformes). *Korean J. Zool.* **32**, 420-428.
- Kim, J. B. and J. J. Yum. 1997. Acclimation of lactate dehydrogenase in *Silurus asotus* to acute environmental variations. *J. Ind. Sci. Cheongju Univ.* **15(2)**, 381-388.
- Lee S. H. 1995. Biochemical characterization of mitochondrial lactate dehydrogenase in *Gadus macrocephalus* liver. M.S. Thesis Cheongju Univ., Korea 40pp.
- Li, S. S-L., W. M. Fitch, Y-C. E. Pan and F. S. Sharief. 1983. Evolutionary relationships of vertebrate lactate dehydrogenase isozymes A<sub>4</sub> (muscle), B<sub>4</sub> (heart) and C<sub>4</sub> (testis). *J. Biol. Chem.* **258**, 7029-7032.
- Manchenko, G. P. 1994. *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. 3p., CRC Press Inc., Florida.
- Markert, C. L., J. B. Shaklee and G. S. Whitt. 1975. Evolution of a gene. *Science* **189**, 102-114.
- Mishra R. and S. P. Shukla. 1997. Impact of endosulfan on lactate dehydrogenase from the freshwater catfish *Clarias batrachus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **57**, 220-234.
- Panepucci, L. L. L., M. L. Schwantes and A. R. Schwantes. 1984. Loci that encode the lactate dehydrogenase in 23 species of fish belonging to the orders Cypriniformes, Siluriformes and Perciformes: Adaptive features. *Comp. Biochem. Physiol.* **77B**, 867-876.
- Park, S. Y. 1994. Characterization and evolution of lactate dehydrogenase C<sub>4</sub> isozyme. M.S. Thesis Cheongju Univ., Korea 48pp.
- Park, S. Y. and J. J. Yum. 1993. Lactate dehydrogenase isozymes of Cypriniform and Perciform fishes : Expression of the *Ldh-C* gene. *J. Ind. Sci. Cheongju Univ.* **11**, 265-277.
- Shaklee, J. B., K. L. Kepes and G. S. Whitt. 1973. Specialized lactate dehydrogenase isozymes: the molecular and genetic basis for the unique eye and liver LDHs of teleost fishes. *J. Exp. Zool.* **185**, 217-240.
- Somer, H. 1975. 'Nothing dehydrogenase' reaction as an artefact in serum isoenzyme analyses. *Clinica Chimica Acta* **60**, 223-229.
- Whitt, G. S. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175**, 1-36.
- Yum, J. J. 2003. Coexpression of liver-specific and eye-specific lactate dehydrogenase isozymes in *Acanthogobius hasta*. *J. Ind. Sci. Cheongju Univ.* **21(1)**, 45-51.