

쏘가리(*Siniperca scherzeri*) 젖산탈수소효소 A₄ 동위효소의 정제 및 특성

조성규* · 구보라¹ · 안효정¹ · 박은미¹ · 박선영¹ · 김재범² · 염정주¹

청주대학교 산업과학연구소, ¹청주대학교 생명유전통계학부 생명과학전공, ²성균관대학교 의과대학 해부학교실

Received December 15, 2008 / Accepted January 5, 2009

Purification and Characterization of Lactate Dehydrogenase A₄ Isozyme in Mandrin Fish (*Siniperca scherzeri*). Sung Kyu Cho*, Bora Ku¹, Hyojung An¹, Eun Mi Park¹, Seon Young Park¹, Jae-Bum Kim² and Jung Joo Yum¹. *Industrial Science Research Institute, Cheongju University, Cheongju 360-764, Republic of Korea, ¹Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 360-764, Republic of Korea, ²Department of Anatomy, School of Medicine, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Republic of Korea* - The lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH) A₄ isozyme in skeletal muscle of mandrin fish (*Siniperca scherzeri*) was successfully purified by affinity chromatography and ultrafiltration. The molecular weight of the purified LDH A₄ isozyme was 140.4 kDa and its isoelectric point (pI) was 7.0. Optimal pH for enzymatic reaction was 7.5. K_m^{PYR} and V_{max} value of the purified LDH A₄ isozyme were 4.86×10^{-5} M and 13.31 mM/min using pyruvate as a substrate, respectively. These kinetic properties of the purified LDH A₄ isozyme supported the fact that the mandrin fish was a warm-adapted species. The antibody against the purified LDH A₄ isozyme may be used in the metabolic physiological studies of ectothermic vertebrates and in the diagnosis of several human diseases.

Key words : Mandrin fish (*Siniperca scherzeri*), lactate dehydrogenase (LDH), A₄ isozyme, purification, antibody

서 론

척추동물에서 젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH)는 피루브산과 젖산의 상호전환반응을 촉매하며[18], 하부단위체 A, B 및 C로 구성된 사량체의 동위효소 형태로 존재한다[29]. LDH 동위효소들은 혐기적인 조건과 호기적인 조건에서 각기 다른 대사상의 특성을 보여 주고[1] 있으므로 종별 조직 내의 LDH 동위효소들의 분포 및 특성을 조사하면 분자진화적 유연관계 및 대사생리학적 적응양상을 밝히는데 유용하다[5]. 다른 한편으로 LDH 동위효소들은 주로 세포질에 존재하므로 세포손상 시 체액으로 배출되어 조직의 손상정도를 알아내는 지표로 활용되며[38], 혈액에서 LDH 동위효소들의 발현 양상은 바이러스성 감염에서 급성 간괴사가 나타날 경우 A₄ 동위효소의 급격한 증가 후 감소가 수반되고[2], 급성 심근경색 같은 심장병 및 중증 급성호흡기증후군의 경우 B₄ 동위효소가 증가되며[28,32], 비호지킨 림프종, 골수증식증후군 및 만성 림프성 백혈병에서는 AB₃ 동위효소가 증가되는 등[3] 변화양상을 보여주어 여러 가지 병증에서 진단방법의 하나로 이용되고 있다[38].

LDH A₄ 동위효소는 주로 피루브산을 젖산으로 전환하는 pyruvate reductase로 작용하는 효소로 산소의 공급에 비해 많은 에너지를 갑자기 필요로 하는 골격근 같은 혐기적 조직

에 많이 분포한다[9,10,24]. 또한 중앙세포를 유지함에 있어 산소 의존성이 낮은 대사과정을 필요로 하는 암세포의 경우 LDH A₄ 동위효소가 피루브산을 젖산으로 원활히 환원시켜 효과적인 혐기적 해당과정을 수행한다[13,25]. LDH A₄ 동위효소는 일반적으로 B₄ 동위효소보다 열에 불안정하고[42,43], 피루브산에 의한 저해정도가 낮은 것으로 알려져 있으며[7], 낮은 온도에 적응하여 서식하는 동물 종일수록 A₄ 동위효소의 피루브산에 대한 Michaelis-Menten 상수(K_m^{PYR})값은 증가한다[14,17]. 그러므로 LDH A₄ 동위효소의 역학특성에 관한 실험들은 대사과정에서의 기능을 추정하는데 용이하고, 각각의 LDH 동위효소들에 대한 항체를 만든다면 환자의 혈액 및 조직에서 빠르게 LDH 동위효소들을 검출 할 수 있으므로 그 유용성이 매우 크다[24,26]. 그러나 시중에 제품화되어 있는 LDH 동위효소들에 대한 항체는 없고, 시판되고 있는 LDH 동위효소들을 항원으로 사용하여 항체를 생산하려해도 대부분의 경우 LDH 동위효소가 아닌 포유류 및 조류에서 부분 정제된 LDH만 판매되므로 항원을 완전 정제하는 과정이 추가되어야 한다. 또한 이렇게 정제된 LDH 동위효소를 포유류 및 조류에 주입하여 항체를 생산하면 숙주와 진화적 유연관계가 가깝기 때문에 생성되는 항체의 역가에 많은 문제점이 있게 된다.

따라서 본 연구에서는 LDH A₄ 동위효소가 많고 정제가 용이한 쏘가리 골격근 조직에서 A₄ 동위효소를 정제하여 역학특성을 조사 대사생리학적 특성을 알아보고 여러 가지 병증의 진단에 유용하게 사용할 목적으로 A₄ 동위효소에 대한 항체를 생성하고자 하였다.

*Corresponding author

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

E-mail : skcho@cju.ac.kr

재료 및 방법

실험 재료

쏘가리(*Siniperca scherzeri*)는 충청북도 괴산군 청천면에서 채집하였고, 뉴질랜드 화이트 순종토끼는 Samtako사로부터 구입하여 사용하였다. Pyruvic acid, acrylamide, N,N'-methylene-bis-acrylamide, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), DL-lactic acid, nitro blue tetrazolium (NBT), phenazine methosulfate (PMS), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), NAD reduced form (NADH), ω -amino-hexyl-agarose, potassium oxalate, N-(3-dimethylamino-propyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), sodium dodecyl sulfate (SDS), Freund's complete adjuvant, Freund's incomplete adjuvant 및 anti-rabbit IgG (peroxidase conjugate)는 Sigma사의 제품을 사용하였고, Coomassie brilliant blue G-250 및 R-250은 Fluka사 제품을 사용하였으며, 나머지 시약은 GR (guaranteed reagent)급을 사용하였다.

조직 추출액의 준비

쏘가리의 골격근, 심장, 신장, 간, 눈 및 뇌조직을 적출한 후 증류수로 씻어 혈액을 제거한 다음 4°C로 유지시킨 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85)를 3배(v/w) 가한 후 얼음에 채운 Dounce homogenizer 및 Potter-Elvehjem homogenizer로 파쇄하여 조직파쇄액을 얻었다. 이 파쇄액은 20,000×g (Refrigerated centrifuge, Hitachi 20 PR-52D)에서 1시간씩 2번 원심분리 하여 상등액을 시료로 사용하였다.

LDH의 활성 측정

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 NADH로부터 NAD⁺로 산화되는 정도를 spectrophotometer (Shimadzu UV-160A)로 25°C, 340 nm에서 측정하였다. 효소활성의 단위는 기질 1 μ mole을 생성물로 전환시키는데 필요한 효소의 양을 1 unit로 하였다.

단백질 정량

단백질은 Bradford의 방법[4]으로 정량하였다. Coomassie brilliant blue G-250 100 mg을 85% H₃PO₄ 100 ml에 세계 저어주면서 섞은 후 95% 에탄올 50 ml를 첨가한 다음 증류수로 1 l를 만든 후 사용하였다. 표준단백질로 BSA를 사용하여 분광광도계로 595 nm에서 정량하였다.

Native-polyacrylamide gel 전기영동(native-PAGE)

Polyacrylamide gel은 항온기(Rikakikai CA-1100)를 사용

하여 4°C로 유지시킨 polyacrylamide vertical slab system (Hoefler SE250)으로 실시하였다. Davis의 방법[11]에 따라 7.5%T, 2.67%C acrylamide separation gel과 3%T, 2.67%C acrylamide stacking gel이 되도록 slab gel을 만들었다. 시료에는 50% sucrose, 0.05% bromophenol blue 용액을 1:1(v/v)로 가한 후 5 mM Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 100 V에서 20분간 전개시킨 다음 200 V에서 2시간 10분 동안 전기영동 하였다. LDH 효소염색은 Whitt의 방법[40]에 따라 DL-lactic acid, NBT, PMS 및 NAD⁺ 혼합용액에 gel을 넣어 37°C에서 염색한 후 15% 초산용액 내에서 고정시켰다.

LDH A₄ 동위효소의 정제

Oxamate-agarose gel의 준비와 affinity chromatography는 O'Carra와 Barry의 방법[30] 및 O'Carra 등의 방법[31]을 변형하여 실시하였다. ω -Amino-hexyl-agarose 100 ml를 Büchner funnel에 넣고 0.5 M NaCl (200 ml/4 ml)로 씻어 준 후 증류수로 씻어서 NaCl을 제거한 다음 Büchner funnel의 gel을 beaker로 옮긴다. 30 g의 potassium oxalate를 증류수 160 ml에 용해시킨 후 EDC 10 g을 증류수 80 ml에 용해시켜 potassium oxalate 용액에 빠르게 한 방울씩 가해주며 저어주었다. 5분 후, ligand 및 EDC 혼합용액을 gel 현탁액과 섞은 후, pH를 4.5~6.0 사이로 조절한 다음 8°C의 회전식 진탕기에서 45시간 동안 진탕시켰다. Ligand-spacer-agarose 결합이 완료된 후 gel을 Büchner funnel로 옮긴 다음 증류수 5 l, 1 M NaCl을 포함하는 0.05 M KH₂PO₄ 용액 2 l 및 1 M NaCl을 포함하는 0.05 M K₂HPO₄ 용액 2 l로 충분히 씻어서 잉여 ligand, 요소유도체 및 반응되지 않은 EDC를 제거하였다. 0.5 M KCl을 포함하는 0.05 M potassium phosphate buffer (column buffer) 2 l로 평형시킨 후 Büchner funnel의 gel을 column에 채우고 다시 column buffer로 평형시킨 다음 4°C에서 저장하였다. Oxamate-agarose column은 사용하기 전에 0.20 mM NADH를 함유한 column buffer로 평형시킨 후 0.50 M KCl과 0.20 mM NADH를 첨가한 쏘가리 골격근 조직 추출액 5 ml를 가하였다. Column으로부터 단백질이 용출되지 않을 때까지 0.20 mM NADH를 함유한 column buffer로 씻어 준 후 1.6 mM NAD⁺를 함유한 column buffer와 column buffer를 차례로 유입시키면서 용출액을 3.2 ml씩 분획하였다. 각 분획에 대하여 LDH 활성 측정 및 단백질 정량을 실시하여 elution profile을 작성하고 LDH A₄ 동위효소를 함유한 분획은 모아서 PM-10 membrane으로 농축시킨 후 역학실험 및 항원으로 사용하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE) 및 분자량 측정

LDH A₄ 동위효소의 정제정도와 분자량의 측정은 SDS-PAGE로 이루어졌다. 전기영동은 Laemmli의 방법[27]에 따

라 12.5%T, 2.67%C acrylamide separation gel과 5%T, 2.67%C acrylamide stacking gel이 되도록 slab gel을 만들었다. 시료와 0.06 M Tris-HCl (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue 용액을 4:1(v/v)로 섞어 100°C에서 10분간 가열한 후 1초정도 원심분리 한 다음 상등액을 전기영동 시료로 사용하였다. 전기영동은 0.1% SDS를 포함하는 0.025 M Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 4°C, 100 V에서 2시간 동안 실시하였다. 단백질 염색은 45% 메탄올과 10% 초산에 녹인 0.1% Coomassie brilliant blue R-250에서 25°C, 10분간 염색한 후 10% 메탄올, 10% 초산용액에서 탈색시켰다. 분자량 측정 시 표준 단백질로는 bovine serum albumin (MW 66,000), ovalbumin (MW 45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (MW 36,000), carbonic anhydrase (MW 29,000), trypsinogen (MW 24,000), trypsin inhibitor (MW 20,000) 및 α -lactalbumin (MW 14,200)을 사용하였다.

Isoelectric focusing (IEF)

정제된 LDH A₄ 동위효소들의 pI값을 구하기 위해 IEF를 실시하였다. Vertical polyacrylamide slab gel isoelectric focusing은 2.39% ampholine 용액(40%, pH 3-10), 0.17% TEMED, 0.05% ammonium persulfate를 포함하는 7.5%T, 2.67%C의 acrylamide slab gel을 만들었다. 음극에는 0.02 M NaOH 용액을 넣고 양극에는 0.01 M H₃PO₄ 용액을 넣은 후 60% glycerol을 함유한 4% ampholine 용액을 시료와 1:1로 섞어 gel위에 가하였다. 25°C, 200 V에서 2시간, 400 V에서 2시간 동안 전기영동 한 다음 Coomassie brilliant blue R-250으로 단백질 염색을 실시하여 이동거리에 대한 표준곡선을 작성한 후 pI값을 정하였다. 등전점 측정을 위한 표준 단백질로는 carbonic anhydrase II (pI 5.9), myoglobin (pI 6.8, 7.2), lentil lectin (pI 8.2, 8.6, 8.8)을 사용하였다.

LDH A₄ 동위효소의 최적 pH

LDH A₄ 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)에서 반응시킨 후 LDH 활성을 측정하였고 최대 활성을 기준으로 상대적 활성(%)을 구하였으며 최적 pH를 확인하였다.

LDH A₄ 동위효소의 기질의존성 측정

LDH A₄ 동위효소의 기질 농도에 의한 효소활성 저해정도를 알아보기 위해 피루브산 농도를 100 μ M에서 10 mM까지 증가시키면서 활성의 변화를 측정하였다. K_m^{PYR} 값과 V_{max} 값

은 피루브산 농도 10 μ M에서 80 μ M까지 LDH 활성을 측정 한 후 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 구하였다.

LDH A₄ 동위효소에 대한 항혈청 조제

정제한 쏘가리 LDH A₄ 동위효소는 0.58 mg, 0.68 mg 및 0.73 mg의 순서로 0.01 M phosphate buffered saline (pH 7.4, PBS)에 녹여 1차 면역은 동량의 Freund's complete adjuvant를 사용하고, 2차 면역부터는 동량의 Freund's incomplete adjuvant를 사용하여 완전히 유희 시킨 후, 뉴질랜드 화이트 순종토끼에 7일 간격으로 3회 근육에 주사하였다. 최종 면역주사 5일 후 항응고제를 첨가하지 않고 심장천자 [12]로 채혈하였고, 혈액은 실온에서 1시간, 4°C에서 6시간 방치 후 혈병을 제거한 다음 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였으며 상등액을 다시 15,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 항혈청으로 사용하였다. 항혈청은 동량의 PBS를 가한 후 (NH₄)₂SO₄로 50% 포화시켜 0°C에서 1시간 동안 방치한 다음 4°C, 20,000 \times g에서 30분간 원심분리 하여 침전물을 얻었다. 침전물은 초기 단계의 항혈청과 동량으로 PBS에 녹여 전과 동일한 과정으로 2회 반복하였다. 이 때 침전물은 처음 항혈청 양의 1/3이 되도록 PBS에 녹여 4°C, PBS 내에서 36시간 동안 투석한 후 4°C, 20,000 \times g에서 30분간 원심분리 하여 상등액을 항체 용액으로 사용하였다.

Western blot analysis

쏘가리 골격근 조직의 LDH를 native-PAGE한 후 gel상의 단백질을 semidry blotting system (Trans-blot SD, Bio-rad)에서 15 mM Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 25 V에서 30분 동안 nitrocellulose membrane에 transfer시켰다. Membrane을 5% skim milk/TBS (0.01 M Tris buffered saline, pH 7.5) 용액에 넣고 25°C에서 1시간 동안 blocking시킨 후 TBS용액에서 10분간씩 3회 세척하였다. 5% Skim milk/TBS를 사용하여 1:1,000으로 희석한 1차 항체(LDH A₄ 동위효소에 대한 항체)용액에 membrane을 넣고 25°C에서 1시간 동안 shaking 시킨 후 TBS용액으로 10분간씩 2회 세척하여 membrane에 결합하지 않은 1차 항체를 씻어주었다. Anti-rabbit IgG (2차 항체)를 5% skim milk/TBS를 사용하여 1:2,000으로 희석시킨 용액에 membrane을 넣고 1시간 동안 shaking 시킨 후 항원과 결합하지 않은 2차 항체를 TBS용액으로 10분간씩 3회 세척하였다. Chloronaphtol 및 H₂O₂의 혼합액으로 반응시킨 후 증류수로 세척하여 반응을 정지시킨 다음 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

쏘가리 조직의 LDH 활성 및 단백질 정량

쏘가리 각 조직에서 LDH의 효소활성을 측정 한 결과 골격

Table 1. Lactate dehydrogenase activities and protein concentrations of various tissues in mandrin fish (*Simiperca scherzeri*)

Tissue	LDH activity (units/g)	Protein (mg/g)	Specific activity (units/mg)
Skeletal muscle	358.83	31.30	11.46
Heart	142.37	23.99	5.93
Kidney	86.62	33.98	2.55
Liver	1.12	33.11	0.03
Eye	5.44	11.16	0.49
Brain	17.32	12.73	1.36

근, 심장, 신장, 뇌, 눈 및 간 조직의 순서로 효소활성이 높게 나타났다. 조직 내 단백질의 양은 골격근, 신장 및 간 조직이 각각 31.30, 33.98 및 33.11 mg/g으로 유사하게 나타났고, 심장 조직은 23.99 mg/g으로 나타났으며, 눈 및 뇌 조직이 각각 11.16 및 12.73 mg/g으로 유사하게 나타났다(Table 1). 골격근 조직에서 LDH 활성이 가장 크게 나타난 점은 모래무지[23], 열대성 catfish [9] 및 풀망둑[42]의 결과와 같았다.

LDH 동위효소의 전기영동 상

쏘가리 골격근, 심장, 신장, 간, 눈 및 뇌 조직의 LDH를 native-PAGE한 결과 골격근 및 뇌 조직을 제외한 모든 조직에서 LDH B₄ 동위효소가 A₄ 동위효소보다 강한 활성을 보였다. 하부단위체 C를 포함하는 LDH 동위효소는 눈 및 뇌 조직에서 나타났다(Fig. 1). LDH A₄ 동위효소가 B₄ 동위효소보다 양극쪽에 나타나고, 눈 조직에서 eye-specific LDH C₄ 동위효소가 발현되는 것은 꺾지[21,35], 얼룩동사리 및 가물치의 경우[34]와 같아서 전형적인 농어목 어류의 LDH 동위효소 형태를 보여주었다.

LDH A₄ 동위효소의 정제

조직추출액을 피루브산의 유사물인 oxamate를 이용한 oxamate-linked Sepharose gel (affinity gel)로 chromatography 할 때 NADH를 함유한 buffer를 유입하면 LDH는 단계적 역학기전에 따라 NADH와 먼저 결합한 후 피루브산 유사물인 oxamate가 고정된 gel에 결합하고 gel에 결합하지 않은 나머지 단백질들은 용출된다고 알려져 있다[30,31]. 본 실험에서도 쏘가리 골격근을 oxamate-agarose gel로 chromatography한 결과 NADH를 함유한 buffer를 유입 시 LDH를 제외한 대부분의 단백질이 용출되었다(Fig. 2).

LDH 동위효소들은 NAD⁺ 및 피루브산과 abortive complex를 형성하는 정도에 차이를 보이므로 각 동위효소들은 affinity gel에 결합하는 힘이 서로 다르게 나타난다[31]. LDH A₄ 동위효소는 NAD⁺를 함유한 buffer의 유입 시 B₄ 동위효소보다 먼저 용출되거나[6,31], 기질억제정도가 B₄ 동위효소와 유사한 경우 plain buffer 유입 시 용출되기 시작한다

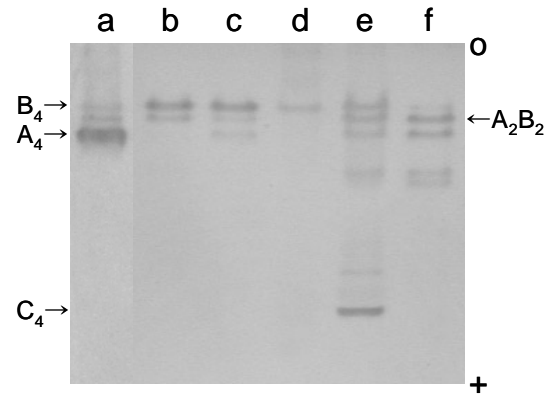


Fig. 1. Native-polyacrylamide gel electrophoresis zymograms of LDH isozymes in mandrin fish (*S. scherzeri*). a, Skeletal muscle; b, heart; c, kidney; d, liver; e, eye; f, brain; o, origin.

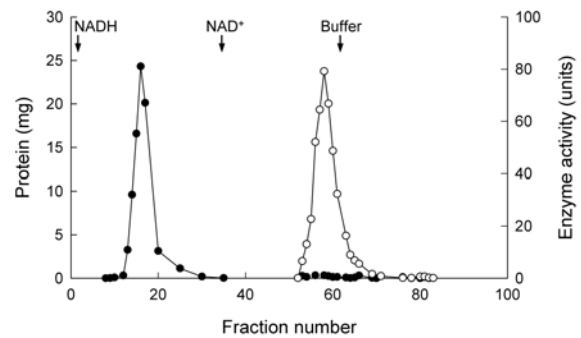


Fig. 2. Affinity chromatography of LDH isozymes in skeletal muscle from mandrin fish (*S. scherzeri*) on a column (25×90 mm) of oxamate-linked agarose gel. Fractions of 3.2 ml were collected at a flow rate 0.4 ml/min. LDH A₄ isozyme was found to be in the fraction numbers 54-68. ●, Protein concentration; ○, enzyme activity.

고 알려져 있고[23], 이에 근거하여 LDH 동위효소들을 분리할 수 있다.

본 실험에서 LDH A₄ 동위효소는 NAD⁺를 함유한 buffer 유입 후 20번째 분획부터 용출되기 시작하여 plain buffer 유입 후 4번째 분획까지 용출되었고, LDH B₄ 및 A₂B₂ 동위효소는 plain buffer 유입 후 17번째 분획부터 22번째 분획에 걸쳐 용출되었다. 이 결과는 NAD⁺를 함유한 buffer와 plain buffer를 차례로 유입 시 LDH A₄ 동위효소가 B₄ 동위효소보다 먼저 용출된다는 결과들[6,31]과 일치하였다. 본 정제과정에서는 최종적으로 47.4%의 LDH 수율을 얻었고, 32.8배로 정제된 A₄ 동위효소를 얻을 수 있었다(Table 2).

LDH A₄ 동위효소의 분자량, 등전점 및 최적 pH

LDH A₄ 동위효소의 정제도를 확인하고 분자량을 측정하기 위해 SDS-PAGE를 실시한 결과, 하부단위체 A가 단일밴드로 나타나 A₄ 동위효소가 순수하게 정제되었음을 확인하

Table 2. Purification of LDH A₄ isozyme in mandarin fish (*S. scherzeri*) muscle

Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	1,443	240.8	5.99	1.0	100.0
Affinity chromatography	982	5.4	180.85	30.2	68.0
Ultrafiltration	684	3.5	196.66	32.8	47.4

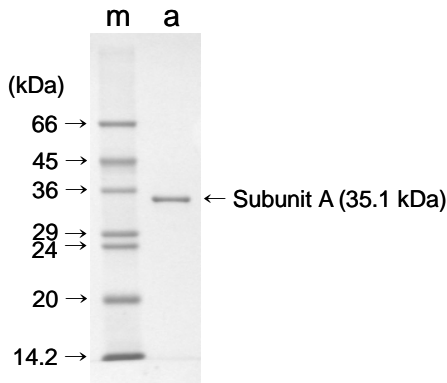


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified LDH A₄ isozyme in mandarin fish (*S. scherzeri*). m, Marker; a, purified LDH A₄ isozyme.

였고(Fig. 3), 정제된 A₄ 동위효소는 역학실험 및 항체생성을 위한 항원으로 사용하였다. 하부단위체 A의 분자량이 35.1 kDa으로 측정되어 LDH A₄ 동위효소의 분자량은 140.4 kDa 이라고 추정하였고(Fig. 3), 이는 돛발상어, 넙치, 참치, 황소 개구리, 오리, 칠면조, 꿩 및 타조 같은 척추동물들의 일반적 LDH A₄ 동위효소 분자량과 유사하였다[36]. 또한 LDH A₄ 동위효소를 IEF한 결과 등전점은 7.0으로 나타났는데(Fig. 4), 이는 생활환경이나 서식지가 유사한 꾀지 A₄ 동위효소의 등전점 7.1[5]과 거의 일치하였다. LDH A₄ 동위효소에 대한 pH 안정성을 측정한 결과 pH 7.0~8.5에서 70% 이상의 LDH 활성이 유지되어 좁은 범위의 pH 안정성을 보였고,

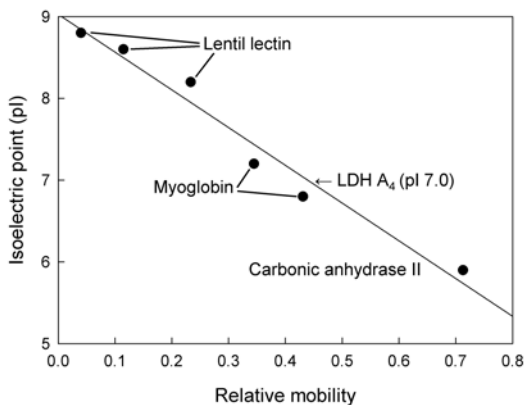


Fig. 4. Isoelectric point of LDH A₄ isozyme in mandarin fish (*S. scherzeri*). The isoelectric point of the LDH A₄ isozyme was pI 7.0.

pH 5.5~8.5에서는 50% 이상의 LDH 활성이 유지되었으며, A₄ 동위효소가 최적 반응활성을 나타내는 pH 조건은 7.5로 나타났다(Fig. 5).

LDH A₄ 동위효소의 기질의존성 및 K_m^{PYR} , V_{max} 값

LDH A₄ 동위효소는 피루브산에 대한 저해반응이 B₄ 동위효소와 달라서 고농도의 피루브산에서 비교적 저해정도가 작다[7,37,39]. 본 실험에서 LDH A₄ 동위효소의 피루브산에 대한 기질의존성을 측정한 결과, 10 mM 피루브산에서 A₄ 동위효소는 29.9%의 활성이 남아있었다(Fig. 6). 이는 10 mM 피루브산에서 소 심장 LDH B₄ 동위효소의 활성이 22% 남은 경우[7]와 비교 할 때 차이는 작지만 A₄ 동위효소가 B₄ 동위효소보다 피루브산에 저해되는 정도가 작게 나타난다는 경향[7]과 일치하였다.

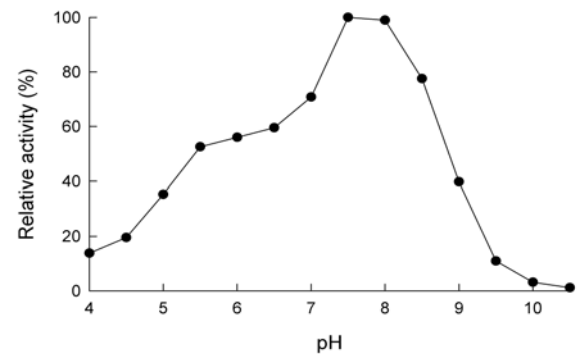


Fig. 5. Effect of pH on a LDH A₄ isozyme in mandarin fish (*S. scherzeri*). The optimum pH for the LDH A₄ isozyme was pH 7.5.

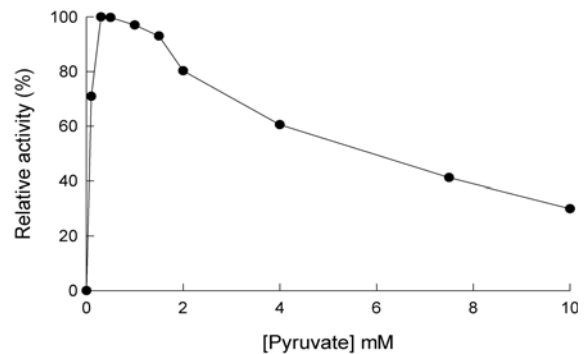


Fig. 6. Effect of pyruvate concentration on a LDH A₄ isozyme in mandarin fish (*S. scherzeri*).

효소의 기능은 온도에 의해 강하게 영향을 받고, 여러 다른 온도 환경에 적응한 종들에서 나타나는 같은 종류의 효소들은 대체로 역학특성에서 온도를 보정하는 현상을 보여준다[15]. 일련의 연구 결과들을 살펴보면 변온 척추동물들에서 LDH A₄ 동위효소의 역학특성들은 온도환경과 강력한 연관이 있어서[8,16,19-22,41], K_m^{PYR} 값이 증가하면 서식지의 온도는 감소된다[14,17]. 또한 K_m^{PYR} 값은 기질결합친화성의 경향과 반대이기 때문에 LDH A₄ 동위효소의 K_m^{PYR} 값을 같은 온도에서 측정하는 경우 A₄ 동위효소의 기질결합친화성은 저온에 적응한 종이 따뜻한 온도에 적응한 종에서 보다 낮게 나타난다[15]. 본 실험 결과 쏘가리 LDH A₄ 동위효소의 K_m^{PYR} 값은 4.86×10^{-5} M, V_{max} 값은 13.31 mM/min로 나타났고(Fig. 7), 이는 송어 근육 LDH의 K_m^{PYR} 값 2.09×10^{-4} M보다 낮은 수치로서 쏘가리가 온수성 어종이고 송어가 냉수성 어종이라는 점[33]과 일치하여, A₄ 동위효소의 K_m^{PYR} 값 측정 및 비교는 변온 척추동물의 서식온도환경을 분자수준에서 이해하는데 유용하리라고 사료된다.

LDH A₄ 동위효소의 면역화학적 특성

쏘가리 LDH A₄ 동위효소에 대한 항체의 생성여부 및 생성된 항체의 항원과의 반응특이성을 확인하기 위하여 쏘가리 골격근 조직을 A₄ 동위효소에 대한 항체로 Western blotting 시켰다(Fig. 8). 그 결과 LDH A₄ 동위효소에 대한 항체가 쏘가리 골격근의 LDH A₄ 및 하부단위체 A를 포함한 A₂B₂ 동위효소와 반응하므로 항체가 높은 역가로 생성되었음을 확인 할 수 있었고, B₄ 동위효소에는 반응하지 않아서 반응특이성이 높은 항체를 얻었음을 알 수 있었다.

본 연구 결과 LDH A₄ 동위효소의 역학특성들은 변온 척추동물의 온도환경에 대한 적응에서 중요한 요인으로 작용한다는 결과를 얻었고, 생성된 LDH A₄ 동위효소에 대한 항

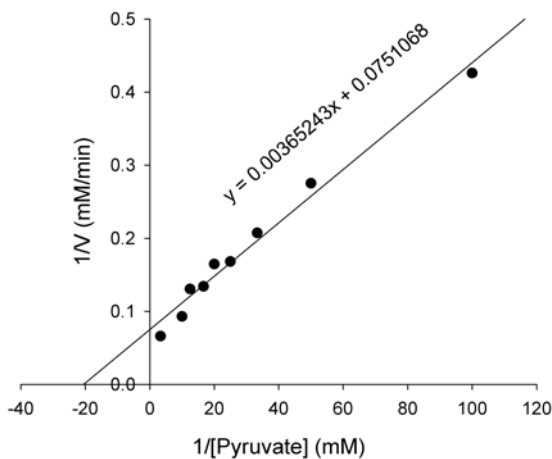


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of the initial velocity versus pyruvate concentration of LDH A₄ isozyme in mandrin fish (*S. scherzeri*).

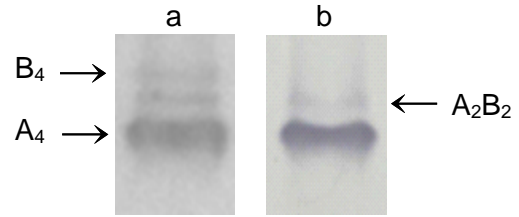


Fig. 8. Western blot analysis of the LDH isozymes in skeletal muscle from mandrin fish (*S. scherzeri*). a, Native-polyacrylamide gel electrophoresis zymograms of the LDH isozymes in skeletal muscle; b, Western blotting of the LDH A₄. The LDH isozymes which contain the subunit A were detected by Western blotting after polyacrylamide gel electrophoresis.

체는 여러 가지 병증의 진단에 유용하게 사용되리라고 생각된다. 따라서 비교생리학적 관점에서 앞으로 다른 생물 종들에서 A₄ 동위효소의 정제 및 역학특성에 대한 많은 연구가 이루어져야 하고 임상적 관점에서도 좀 더 광범위한 병증들에서 LDH 동위효소들에 관한 연구가 이루어져야 한다고 사료된다.

요 약

쏘가리 젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH) A₄ 동위효소를 affinity chromatography 및 ultrafiltration으로 정제하였다. 정제된 LDH A₄ 동위효소의 분자량은 140.4 kDa이었고 등전점(pI)은 7.0이었다. 효소반응의 최적 pH는 7.5로 나타났다. 피루브산을 기질로 하였을 때 LDH A₄ 동위효소의 K_m^{PYR} 값은 4.86×10^{-5} M, V_{max} 값은 13.31 mM/min로 나타났다. LDH A₄ 동위효소의 역학실험은 쏘가리가 온수성어류라는 점을 보여주었고 정제된 LDH A₄ 동위효소에 대한 항체는 변온 척추동물의 대사생리학적 특성을 연구하거나 여러 가지 병증의 진단에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2007-359-C00033).

References

- Almeida-Val, V. M. F. and A. L. Val. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B* **105**, 21-28.
- Andriutsa, K. A. and A. K. Andriutsa. 1987. Diagnostic and pathogenetic significance of determining lactate de-

- hydrogenase isoenzyme activity in various biological media in patients with viral hepatitis. *Ter. Arkh.* **59**, 89-94.
3. Bouafia, F., J. Draï, J. Bienvenu, C. Thieblemont, D. Espinouse, G. Salles, and B. Coiffier. 2004. Profiles and prognostic values of serum LDH isoenzymes in patients with haematopoietic malignancies. *Bull. Cancer* **91**, E229-240.
 4. 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.
 5. Cho, S. K. 2000. *Mitochondrial lactate dehydrogenase in tissues of vertebrate*. 88pp., Ph.D. Thesis Cheongju Univ., Korea.
 6. 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.
 7. Cho, S. K. and J. J. Yum. 1993. Heterogeneity of lactate dehydrogenase isozymes in tissues of *Lampetra japonica*. *Korean J. Zool.* **36**, 319-328.
 8. Cho, S. K. and J. J. Yum. 1996. The adaptational phenotype of lactate dehydrogenase isozymes in *Pseudogobio esocinus* by the environmental variation. *J. Ind. Sci., Cheongju Univ. Korea* **14**, 333-343.
 9. 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.
 10. Cho, S. K. and J. J. Yum. 2005. Changes of activities and isozymes of lactate dehydrogenase in *Coreoperca herzi* and *Pseudogobio esocinus* acclimated to rapid increase of dissolved oxygen. *J. Life Sci.* **15**, 71-79.
 11. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
 12. Donovan, J. and P. Brown. 1991. Cardiac Puncture of Rabbit, Unit 1.7.6., In Coligan, J. E. et al. (eds.), *Current Protocols in Immunology*, Vol. **1**, John Wiley & Sons Inc., New York.
 13. 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.
 14. Fields, P. A. 2001. Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp. Biochem. Physiol. A* **129**, 417-431.
 15. Fields, P. A. and D. E. Houseman. 2004. Decreases in activation energy and substrate affinity in cold-adapted A₄-lactate dehydrogenase: evidence from the Antarctic notothenioid fish *Chaenocephalus aceratus*. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 2246-2255.
 16. Fields, P. A. and G. N. Somero. 1998. Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A₄ orthologs of Antarctic notothenioid fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11476-11481.
 17. Hochachka, P. W. and G. N. Somero. 2002. *Biochemical adaptation*. pp. 466, Oxford Univ. Press Inc., New York.
 18. Holbrook, J. J., A. Liljas, S. J. Steindel, and M. G. Rossmann. 1975. Lactate Dehydrogenase, pp. 191-192, In Boyer P. D. (ed.), *The Enzymes*, 3rd eds., Vol. **XI**, Academic Press Inc., New York.
 19. Holland, L. Z., M. McFall-Ngai, and G. N. Somero. 1997. Evolution of lactate dehydrogenase-A homologs of barracuda fishes (genus *Sphyræna*) from different thermal environments: differences in kinetic properties and thermal stability are due to amino acid substitutions outside the active site. *Biochemistry* **36**, 3207-3215.
 20. Johns, G. C. and G. N. Somero. 2004. Evolutionary convergence in adaptation of proteins to temperature: A₄-lactate dehydrogenases of Pacific damselfishes (*Chromis spp.*). *Mol. Biol. Evol.* **21**, 314-320.
 21. Kim, J.-B., S. K. Cho, and J. J. Yum. 2004. Changes of activities and isozymes of lactate dehydrogenase in *Coreoperca herzi* to acute increase of temperature for short-term period. *J. Ind. Sci. Cheongju Univ. Korea* **22**, 43-50.
 22. 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. Korea* **21**, 37-44.
 23. 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.
 24. Kolev, Y., H. Uetake, Y. Takagi, and K. Sugihara. 2008. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: association with hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis. *Ann. Surg. Oncol.* **15**, 2336-2344.
 25. Koukourakis, M. I., A. Giatromanolaki, C. Simopoulos, A. Polychronidis, and E. Sivridis. 2005. Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **22**, 25-30.
 26. Koukourakis, M. I., M. Pitiakoudis, A. Giatromanolaki, A. Tsarouha, A. Polychronidis, E. Sivridis, and C. Simopoulos. 2006. Oxygen and glucose consumption in gastrointestinal adenocarcinomas: correlation with markers of hypoxia, acidity and anaerobic glycolysis. *Cancer Sci.* **97**, 1056-1060.
 27. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685.
 28. Lam, C. W., M. H. Chan, and C. K. Wong. 2004. Severe acute respiratory syndrome: clinical and laboratory manifestations. *Clin. Biochem. Rev.* **25**, 121-132.
 29. Markert, C. L., J. B. Shaklee, and G. S. Whitt. 1975. Evolution of a gene: multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* **189**, 102-114.
 30. 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**, 281-285.
31. O'Carra, P., S. Barry, and E. Corcoran. 1974. Affinity chromatographic differentiation of lactate dehydrogenase isoenzymes on the basis of differential abortive complex formation. *FEBS Letters* **43**, 163-168.
 32. Painter, P.C., S. Van Meter, R. L. Dabbs, and G. E. Clement. 1994. Analytical evaluation and comparison of Dupont aca lactate dehydrogenase-1 (LD1) isoenzyme assay diagnostic efficiency for acute myocardial infarction detection with other LD1 methods and aca CK-MB. A two-site study. *Angiology* **45**, 585-595.
 33. Park, H. Y. et al. 1995. *Fish Biology*. pp. 478, Jungmunkag Co., Korea.
 34. 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. Korea* **11**, 265-277.
 35. Park, S. Y. and J. J. Yum. 1995. Acclimation of lactate dehydrogenase isozymes in *Coreoperca herzi* by environmental variation. *Korean J. Environ. Biol.* **13**, 121-130.
 36. Pesce, A., T. P. Fondy, F. Stolzenbach, F. Castillo and N. O. Kaplan. 1967. The comparative enzymology of lactic dehydrogenases. III. Properties of the H₄ and M₄ enzymes from a number of vertebrates. *J. Biol. Chem.* **242**, 2151-2167.
 37. Pesce, A., R. H. Mckay, F. Stolzenbach, R. D. Cahn, and N. O. Kaplan. 1964. The comparative enzymology of lactic dehydrogenases. I. Properties of the crystalline beef and chicken enzymes. *J. Biol. Chem.* **239**, 1753-1761.
 38. Sevinc, A., R. Sari, and E. Fadillioglu. 2005. The utility of lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in the diagnostic evaluation of malignant and nonmalignant ascites. *J. Natl. Med. Assoc.* **97**, 79-84.
 39. Sidell, B. D. and K. F. Beland. 1980. Lactate dehydrogenases of Atlantic hagfish: physiological and evolutionary implications of a primitive heart isozyme. *Science* **207**, 769-770.
 40. Whitt, G. S. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175**, 1-35.
 41. Yancey, P. H. and J. F. Siebenaller. 1987. Coenzyme binding ability of homologs of M4-lactate dehydrogenase in temperature adaptation. *Biochim. Biophys. Acta* **924**, 483-491.
 42. Yum, J. J. 2008. Characterization of lactate dehydrogenase in *Acanthogobius hasta*. *J. Life Sci.* **18**, 264-272.
 43. 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.