

Purification and Characterization of Eye-Specific Lactate Dehydrogenase C₄ Isozyme in Greenling (*Hexagrammos otakii*)Sung Kyu Cho^{1*} and Jung Joo Yum²¹Industrial Science Research Institute, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea²Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea

Received August 31, 2011 / Revised October 27, 2011 / Accepted November 8, 2011

Eye-specific lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH) C₄ isozyme in the eyes of greenlings (*Hexagrammos otakii*) was successfully purified by affinity chromatography and continuous-elution electrophoresis. The molecular weight of the purified eye-specific LDH C₄ isozyme was 154.8 kDa, as determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Optimal pH for enzymatic reaction of the eye-specific LDH C₄ isozyme was pH 8.5. K_m^{PYR} value of the purified eye-specific LDH C₄ isozyme was 1.88×10^{-5} M using pyruvate as a substrate. These results indicate that we must consider pH when measuring eye-specific LDH C₄ isozyme activity. The eye-specific LDH C₄ isozyme had a higher binding affinity for the substrate as a pyruvate than LDH A₄ isozyme. Antibodies produced against the purified eye-specific LDH C₄ isozyme may be used in the diagnosis of several human diseases and in comparative physiological studies of fishes.

Key words : Greenling (*Hexagrammos otakii*), lactate dehydrogenase (LDH), eye-specific LDH C₄ isozyme

서 론

척추동물의 젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH)는 피루브산과 젖산의 상호전환반응을 촉매하는 진화상 상당히 보존적인 효소로[22,29] 독립된 세 유전자인 *Ldh-A*, *Ldh-B* 및 *Ldh-C*에 의해 각각 만들어지는 하부단위체 A, B 및 C로 구성되며 분자량이 140 kDa 내외인 사량체의 동위효소 형태로 존재한다[29,40,41]. 이러한 LDH 동위효소 발현양상은 사람에서 LDH A₄ 동위효소의 증가양상을 보이는 바이러스성 간염[3]과 위암[25], B₄ 동위효소의 증가양상을 나타내는 급성심근경색[32]과 중증급성호흡기증후군[28], testis-specific LDH C₄ 동위효소의 제한된 발현양상을 보이는 악성종양[26] 등 여러 병증의 진단 및 어류의 진화, 계통학적 분석[1,29,42]에 다양하게 이용된다.

LDH 동질사량체 중 A₄ 및 B₄ 동위효소는 거의 모든 척추동물에서 발견되고[29] C₄ 동위효소는 발현기관에 따라 testis-, liver- 및 eye-specific LDH C₄ 동위효소 세 가지가 있는데 testis-specific LDH C₄ 동위효소는 포유류와 조류의 정소[19,20] 및 포유류의 난모세포[13] 등에서 발견되고 liver-specific LDH C₄ 동위효소는 주로 잉어목과 대구목 어류의 간 조직에서 발견되며[33,34,40] eye-specific LDH C₄ 동위효소는 주로 농어목 어류의 눈 및 신경 조직에서 발견된다[34,40]. 또한 면역화학적 분석 결과 LDH C₄ 동위효소가 A₄ 동위효소보다 B₄

동위효소와 구조적으로 유사하거나[18,42] B₄ 동위효소보다 A₄ 동위효소와 구조적으로 유사하다는[43] 보고가 있다.

현재 testis-specific LDH C₄ 동위효소의 기능은 많이 밝혀져 있지 않으며[20] eye-specific LDH C₄ 동위효소는 testis-specific LDH C₄ 동위효소보다 구조, 역학 및 기능적 연구가 더 많이 미흡하다. 단지 알려진 바로는 eye-specific LDH C₄ 동위효소가 주로 농어목 어류의 눈 조직에서 시홍 재생성에 관여함이 보고되어 있으며[14] lactate oxidase로서 기능이 알려져 있다[2].

따라서 본 연구는 사람의 testis-specific LDH C₄ 동위효소와 진화적으로 유사하다고 알려진 어류의 eye-specific LDH C₄ 동위효소[4,5]가 발견되고 정체가 비교적 용이하다고 생각되는 쥐노래미를 선택하여 eye-specific LDH C₄ 동위효소를 정제한 후 역학실험을 실시하였고 이에 대한 항체를 만들어 면역조직화학, Western blotting 및 ELISA 등을 이용한 사람의 여러 병증 진단 및 어류의 비교생리학적 연구에 도움을 주고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

횃대목 쥐노래미과(Scorpaeniformes, Hexagrammidae)에 속하는 쥐노래미(*Hexagrammos otakii*)는 충청남도 보령시 대천항에서 구입하였고, 뉴질랜드 화이트 순종토끼는 Samtako사로부터 구입하여 사용하였다. Pyruvic acid, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), NAD reduced form (NADH),

*Corresponding author

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

E-mail : skcho@cju.ac.kr

bovine serum albumin (BSA), acrylamide, N,N'-methylene-bis-acrylamide, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), bromophenol blue (BPB), DL-lactic acid, nitro blue tetrazolium (NBT), phenazine methosulfate (PMS), 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 사용하였다.

조직 파쇄액의 준비

쥐노래미의 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 3-7배(v/w) 가한 후 얼음에 채운 Dounce homogenizer 및 Potter-Elvehjem homogenizer로 파쇄하여 조직 파쇄액을 얻었다. 이 파쇄액은 20,000× g (20 PR-52D, Hitachi Koki Co. Ltd., Tokyo, Japan)에서 1시간씩 2번 원심분리 하여 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 NADH로부터 NAD⁺로 산화되는 정도를 spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan)로 25°C, 340 nm에서 측정하였다. 효소활성의 단위는 기질 1 μM을 생성물로 전환시키는데 필요한 효소의 양을 1 unit로 하였다.

단백질 정량

단백질은 Bradford [6]의 방법으로 정량하였다. 정량시약은 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(EYELA CA-1100, Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 4°C로 유지시킨 polyacrylamide vertical slab system (SE250, Hoefer Sci. Instr., San Francisco, CA)으로 실시하였다. Davis [16]의 방법에 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% BPB 용액을 1:1(v/v)로 가한 후 5 mM Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 100 V에서 20분간 전제시킨 다음 200 V에서 2시간 10분 동안 전기영동 하였다. LDH 효소염색은 Whitt [41]의 방법에 따라 DL-lactic acid, NBT, PMS 및 NAD⁺ 혼합용액에 gel을 넣어 37°C에서 염색한

후 15% 초산용액 내에서 고정시켰다.

Eye-specific LDH C₄ 동위효소의 정제

Oxamate-agarose gel을 이용한 affinity chromatography는 O'Carra와 Barry [30] 및 O'Carra 등[31]의 방법을 변형한 Kim과 Yum [24]의 방법으로 실시하였다. Oxamate-agarose column은 0.5 M KCl을 포함하는 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 6.85, 이하 buffer로 칭함)로 평형 시킨 후 사용 전에 0.2 mM NADH를 함유한 buffer로 평형 시킨 다음 0.5 M KCl과 0.2 mM NADH를 첨가한 쥐노래미 눈 조직 추출액 5 ml를 가하였다. Column으로부터 단백질이 용출되지 않을 때까지 0.2 mM NADH를 함유한 buffer로 씻어 준 후 1.6 mM NAD⁺를 함유한 buffer와 buffer를 차례로 유입시키면서 용출액을 3.2 ml씩 분획하였다. 각 분획은 LDH 활성 측정 및 단백질 정량을 실시하여 elution profile을 작성하고 native-PAGE 상에서 eye-specific LDH C₄ 동위효소가 확인된 분획은 모아서 PM-10 membrane으로 농축시킨 후 다음 단계의 정제시료로 사용하였다.

부분 정제된 시료는 continuous-elution electrophoresis system (Model 491 Prep Cell, Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA)으로 4% acrylamide separation gel 20 ml를 만들어 정제하였다. 0.025 M Tris, 0.192 M glycine buffer (pH 8.3) 400 ml는 upper electrophoresis buffer reservoir에, 2 l는 lower buffer chamber에, 800 ml는 elution buffer reservoir에 채웠다. 시료와 sample buffer (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 0.025% BPB)를 1:1(v/v)로 섞은 eye-specific LDH C₄ 동위효소를 포함한 시료를 gel의 상부에 가하였다. 12 W에서 전제한 후 track marker가 separation gel을 빠져나갈 때 elution buffer를 0.75 ml/min의 flow rate로 유입시키면서 용출액을 2 ml씩 분획하였다. 각 분획은 LDH 활성 측정과 단백질 정량을 실시하여 elution profile을 작성하고 native-PAGE 상에서 eye-specific LDH C₄ 동위효소의 활성만 나타나는 분획을 모아 PM-10 membrane으로 농축시킨 다음 역확실험 및 항원으로 사용하였다.

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

Eye-specific LDH C₄ 동위효소의 정제도와 분자량의 측정은 SDS-PAGE로 이루어졌다. 전기영동은 Laemmli [27]의 방법에 따라 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% BPB 용액을 4:1(v/v)로 섞어 100°C에서 10분간 가열한 후 1초 정도 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. 단백질을 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.

Eye-specific LDH C₄ 동위효소의 최적 pH 측정

정제된 eye-specific LDH C₄ 동위효소는 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 LDH 활성을 측정하였고 최대 활성을 기준으로 상대적 활성(%)을 구하였으며 최적 pH를 확인하였다.

Eye-specific LDH C₄ 동위효소의 기질의존성 측정

Eye-specific LDH C₄ 동위효소의 기질 농도에 의한 효소활성 저해 정도를 알아보기 위해 피루브산 농도를 100 μ M에서 10 mM까지 증가시키면서 활성의 변화를 측정하였다. K_m^{PYR} 값은 피루브산 농도 10 μ M에서 80 μ M까지 LDH 활성을 측정 후 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 구하였다.

Eye-specific LDH C₄ 동위효소에 대한 항혈청 조제

정제한 쥐노래미 eye-specific LDH C₄ 동위효소는 0.013 mg, 0.012 mg 및 0.013 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 유화시킨 후, 뉴질랜드 화이트 순종토끼에 7일 간격으로 3회 근육에 주사하였다. 최종 면역주사 5일 후 항응고제를 첨가하지 않고 심장천자[17]로 채혈하였고, 혈액은 실온에서 1시간, 4°C에서 6시간 방치 후 혈병을 제거한 다음 4°C, 790 \times g에서 20분간 원심분리 하였으며 상등액을 다시 4°C, 23,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 항혈청으로 사용하였다. 항혈청은 동량의 PBS

를 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 1/5이 되도록 PBS에 녹여 4°C, PBS 내에서 36시간 동안 투석한 후 4°C, 20,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 항체 용액으로 사용하였다.

Western blot 분석

쥐노래미 눈 조직의 LDH를 native-PAGE한 후 gel상의 단백질을 semi-dry transfer system (Trans-Blot SD cell, Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA)에서 15 mM Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 25 V에서 30분 동안 nitrocellulose membrane (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA)에 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 1:100으로 희석한 1차 항체 (eye-specific LDH C₄ 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 1:1,000으로 희석시킨 용액에 membrane을 넣고 1시간 동안 shaking시킨 후 항원과 결합하지 않은 2차 항체를 TBS용액으로 10분간씩 3회 세척하여 씻어주었다. Chloronaphthol 및 H₂O₂의 혼합액으로 반응시킨 후 증류수로 세척하여 반응을 정지시킨 다음 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

쥐노래미 조직의 LDH 활성 및 단백질 정량

쥐노래미 각 조직에서 LDH 활성을 측정한 결과 골격근, 심장, 뇌, 눈, 신장 및 간 조직의 순서로 높게 나타났다(Table 1). 조직 내 단백질량은 골격근 및 간 조직이 각각 41.26 및 41.16 mg/g으로 유사하게 나타났고 심장 조직은 35.12 mg/g으로 나타났으며 눈, 뇌 및 신장 조직이 각각 19.87, 22.31 및 24.89 mg/g으로 비교적 유사하게 나타났다(Table 1). LDH 활성이 골격근 조직에서 가장 높게 나타나고 간 조직에서 가장

Table 1. Lactate dehydrogenase (LDH) activities and protein concentrations of various tissues in greenling (*H. otaki*)

Tissue	LDH activity (units/g)	Protein (mg/g)	Specific activity (units/mg)
Skeletal muscle	377.93	41.26	9.16
Heart	110.74	35.12	3.15
Kidney	2.43	24.89	0.10
Liver	0.64	41.16	0.02
Eye	10.90	19.87	0.55
Brain	14.24	22.31	0.64

낮게 나타난 점은 쏘가리[8] 및 가물치[36]의 결과와 같았다. 이는 젖산대사 시 다른 조직보다 골격근 조직에서 LDH가 중요한 역할을 한다는 결과들[11,12]과 일치하였다.

LDH 동위효소들의 전기영동 상

쥐노래미 골격근, 심장, 신장, 간, 눈 및 뇌 조직의 LDH를 native-PAGE한 결과 eye-specific LDH C₄ 동위효소 및 하부단위체 C를 포함하는 LDH 동위효소가 눈 조직에서 양극쪽으로 나타났고 뇌 조직에서는 하부단위체 C를 포함하는 동위효소가 나타났다(Fig. 1). 눈 조직에서 eye-specific LDH C₄ 동위효소가 양극쪽으로 나타나는 것은 껍지, 쏘가리, 얼룩동사리 및 가물치 등의 육식성 농어목 어류와 같았다[8,23,34,36,37]. 골격근, 심장 및 신장 조직에서는 LDH A₄ 동위효소가 나타나서 조직특이성을 보이지 않았는데 역학적 및 면역화학적 추가실험이 필요하다고 사료된다(Fig. 1).

Eye-specific LDH C₄ 동위효소의 정제

피루브산 유사물인 oxamate를 이용한 oxamate-linked Sepharose gel로 조직추출액을 affinity chromatography 할 때 NADH를 함유한 buffer를 가하면 LDH는 단계적 역학기전에 따라 NADH와 먼저 결합한 후 피루브산 유사물인 oxamate가 고정된 gel에 결합하고 나머지 단백질들은 용출된다[30,31]. 이때 LDH 동위효소들은 NAD⁺ 및 oxamate와 복합체를 형성하는 정도에 차이가 있어 각 동위효소들이 gel에 결합하는 힘이 다르고[31], 이에 따라 NAD⁺를 함유한 buffer 및 buffer를 차례로 유입 시 동위효소들의 용출 순서에 차이가 나타나서 동위효소들을 분리 할 수 있다[9,31].

본 실험에서 쥐노래미 눈 조직 추출액을 oxamate-agarose gel로 affinity chromatography한 결과 NADH를 함유한 buffer 유입 시 LDH를 제외한 대부분의 단백질이 용출되었다(Fig. 2). LDH는 NAD⁺를 함유한 buffer 유입 후 19번째 분획부

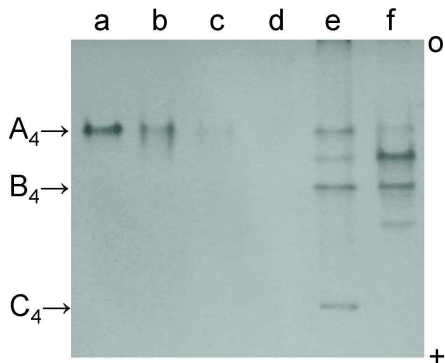


Fig. 1. Native-polyacrylamide gel electrophoresis zymograms of LDH isozymes in greenling (*H. otaki*). a, Skeletal muscle; b, heart; c, kidney; d, liver; e, eye; f, brain; o, origin; A₄, LDH A₄ isozyme; B₄, LDH B₄ isozyme; C₄, eye-specific LDH C₄ isozyme.

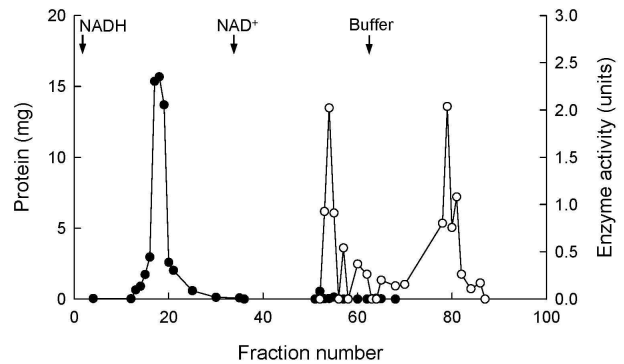


Fig. 2. Affinity chromatography of LDH isozymes in eye from greenling (*H. otaki*) on a column (25×90 mm) of oxamate-linked agarose gel. Fractions of 3.2 ml were collected at a flow rate 0.4 ml/min. Eye-specific LDH C₄ isozyme was found to be in the fraction numbers 57-69. ●, Protein concentration; ○, enzyme activity.

터 용출되기 시작하여 buffer 유입 후 24번째 분획까지 용출되었다(Fig. 2). 특히, 본 연구에서는 native-PAGE 상에서 골격근과 심장 조직 사이에 동위효소의 발현양상이 차이를 보이지 않았다(Fig. 1). 따라서 LDH A₄ 동위효소와 B₄ 동위효소의 구별을 위해서 affinity chromatography 상에서의 모델이 되는 정제양상[31]을 참고 하여 NAD⁺를 함유한 buffer 유입 후 용출되는 동위효소를 A₄ 동위효소로 보았고 buffer에서 용출되는 동위효소를 B₄ 동위효소로 보았다(Fig. 2). LDH A₄ 동위효소는 NAD⁺를 함유한 buffer 유입 후 19-27번째 분획에서 용출되었고 B₄ 동위효소는 buffer 유입 후 15-24번째 분획에서 용출되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 NAD⁺를 함유한 buffer 및 buffer를 차례로 유입할 때 LDH A₄ 동위효소가 용출된 후 B₄ 동위효소가 용출되는 고등어, 생쥐[35] 및 쏘가리[6]의 경우와 같았다. Eye-specific LDH C₄ 동위효소를 포함한 LDH 분획은 NAD⁺를 함유한 buffer 유입 후 23번째 분획부터 용출되기 시작하여 buffer 유입 후 7번째 분획까지 용출되었다(Fig. 2). LDH A₄ 동위효소에 이어서 eye-specific LDH C₄ 동위효소가 용출되는 점은 eye-specific LDH C₄ 동위효소가 B₄보다 A₄ 동위효소와 유사하다는 점을 시사하며 이는 풀망둑[43]과 같은 결과이고 buffer 유입 시 eye-specific LDH C₄가 B₄ 동위효소와 같이 용출되는 고등어[35]와는 다른 결과이다. 이러한 결과는 결국 쥐노래미 눈에서 eye-specific LDH C₄ 동위효소가 관여하는 대사가 고등어 보다는 풀망둑 눈 조직과 유사함을 나타낸다. Eye-specific LDH C₄ 동위효소를 포함한 LDH 분획은 농축하여 continuous-elution 전기영동 시료로 사용하였다. Continuous-elution 전기영동을 실시한 결과 eye-specific LDH C₄ 동위효소만 용출된 분획은 track marker가 용출된 후 10-12번째 분획까지였다(Fig. 3). 본 정제과정에서는 최종 2.4%의 LDH 수율을 얻었고 45.4배로 정제된 eye-specific LDH C₄ 동위효소를 얻을 수 있었다(Table 2).

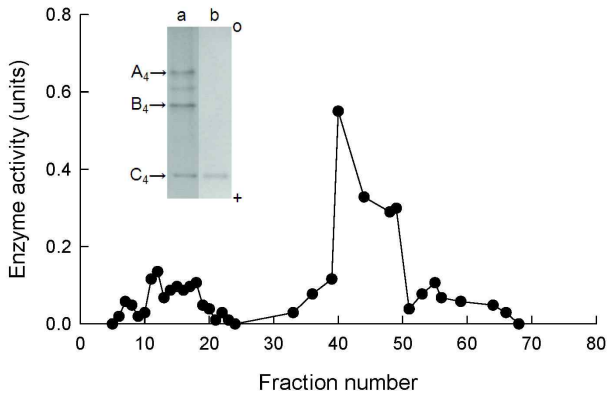


Fig. 3. Continuous-elution electrophoresis of eye-specific LDH C₄ isozyme in eye from greenling (*H. otaki*) by Prep Cell. Fractions of 2 ml were collected at a flow rate 0.75 ml/min. Eye-specific LDH C₄ isozyme was found to be in the fraction numbers 10-12. a, Native-polyacrylamide gel electrophoresis of LDH isozymes in eye; b, purified eye-specific LDH C₄ isozyme.

Eye-specific LDH C₄ 동위효소의 분자량 및 최적 pH

Eye-specific LDH C₄ 동위효소의 정제도를 확인하고 분자량을 측정하기 위하여 SDS-PAGE를 실시한 결과, 하부단위체 C가 단일밴드로 나타나 eye-specific LDH C₄ 동위효소가 정제되었음을 확인하였고 정제된 eye-specific LDH C₄ 동위효소는 역학실험 및 항체생성을 위한 항원으로 사용하였다(Fig. 4). 하부단위체 C는 분자량이 38.7 kDa로 측정되어 eye-specific LDH C₄ 동위효소의 분자량은 154.8 kDa으로 나타났다(Fig. 4). 이는 각각 폴망둑과 쏘가리 LDH A₄ 동위효소의 분자량인 136.0 및 140.4 kDa보다는 크고 조피볼락의 eye-specific LDH C₄ 동위효소의 분자량 154.0 kDa과는 유사하게 나타났다 [7,8,43]. Eye-specific LDH C₄ 동위효소에 대한 최적 pH를 구한 결과 효소활성은 pH 4.0에서 pH 5.5까지 증가하다 pH 6.5까지 급격히 감소하였고 다시 증가하여 pH 8.5에서 최고 활성을 나타낸 후 급격히 감소하였다. 따라서 eye-specific LDH C₄ 동위효소의 최적 pH는 8.5로 중성보다는 약염기성 조건시 효소활성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 5). 이는 LDH C₄ 동위효소의 α-keto acid들에 대한 넓은 기질특이성에 기인하는 효소촉매부위의 이온화정도 차이 때문이라고 생각된다 [15,21,38]. 따라서 LDH 활성측정 시 일반적으로 사용하는 중성조건이 eye-specific LDH C₄ 동위효소의 활성측정 시에는

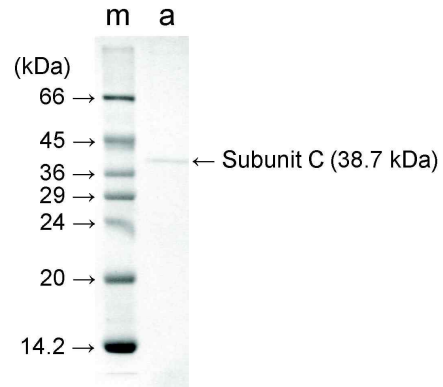


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified eye-specific LDH C₄ isozyme in greenling (*H. otaki*). m, Marker; a, purified eye-specific LDH C₄ isozyme. The molecular weight of the purified eye-specific LDH C₄ isozyme was 154.8 kDa.

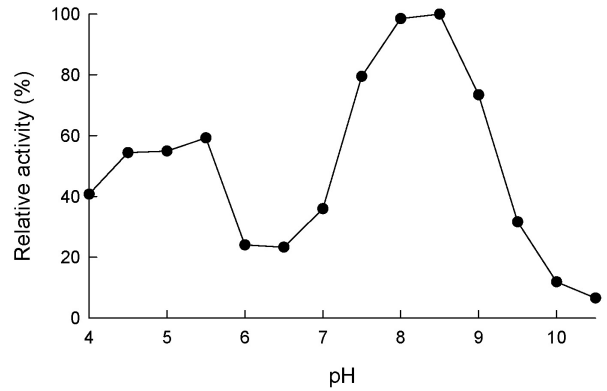


Fig. 5. Effect of pH on a eye-specific LDH C₄ isozyme in greenling (*H. otaki*). The optimum pH for the eye-specific LDH C₄ isozyme was pH 8.5.

최적 조건이 아니며 이는 앞으로 eye-specific LDH C₄ 동위효소의 활성측정 시 고려 할 부분이라고 생각된다.

Eye-specific LDH C₄ 동위효소의 기질의존성 및 K_m^{PYR} 값

LDH 동위효소들의 기질에 대한 촉매특성실험은 동위효소들의 구조적, 진화적 특성을 규명하는데 효과적이다[39]. 일반적으로 10 mM의 고농도 피루브산에서는 LDH A₄ 동위효소가 B₄ 동위효소보다 피루브산에 의한 저해정도가 낮으며[10,41] eye-specific LDH C₄ 동위효소의 경우 B₄ 동위효소보다 조금

Table 2. Purification of eye-specific LDH C₄ isozyme in greenling (*H. otaki*)

Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	55	154.5	0.36	1.0	100.0
Affinity chromatography	21	0.6	34.16	95.5	38.3
Continuous-elution electrophoresis	2	0.4	4.17	11.6	2.7
Ultrafiltration	1	0.1	16.25	45.4	2.4

더 저해되었다[41]. 본 실험에서 eye-specific LDH C₄ 동위효소의 피루브산에 대한 기질의존성을 측정된 결과, 10 mM 피루브산에서 6.5%의 효소활성이 남아(Fig. 6) 소 심장[10] 및 고등어 망막[41]의 B₄ 동위효소보다 피루브산에 의한 저해정도가 더 높게 나타나 같은 결과를 보였다. 또한 eye-specific LDH C₄ 동위효소의 K_m^{PYR} 값은 1.88×10^{-5} M로 나타났는데 (Fig. 7) 이는 쏘가리 LDH A₄ 동위효소의 K_m^{PYR} 값 4.86×10^{-5} M [8] 및 가물치 A₄ 동위효소의 K_m^{PYR} 값 1.7×10^{-4} M [36]보다 낮은 값으로서 eye-specific LDH C₄ 동위효소가 A₄ 동위효소보다 피루브산에 대한 기질결합친화성이 큰 것으로 나타났다.

Eye-specific LDH C₄ 동위효소의 면역화학적 특성

쥐노래미 eye-specific LDH C₄ 동위효소에 대한 항체 생성 여부 및 생성된 항체의 항원과의 반응특이성을 확인하기 위하여 쥐노래미 눈 조직을 eye-specific LDH C₄ 동위효소에 대한

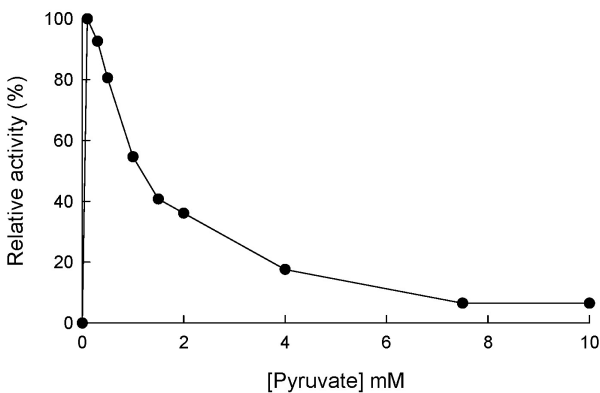


Fig. 6. Effect of pyruvate concentration on a eye-specific LDH C₄ isozyme in greenling (*H. otaki*).

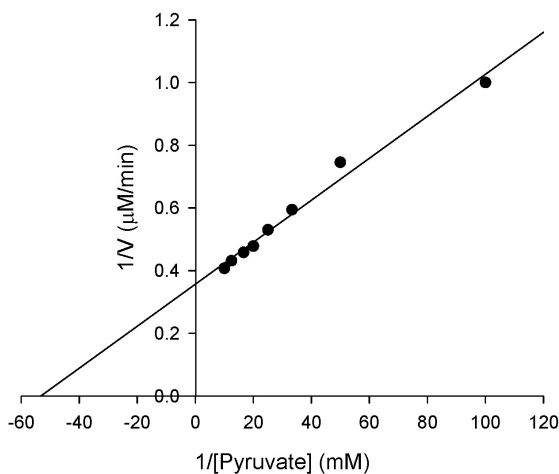


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of the initial velocity versus pyruvate concentration of eye-specific LDH C₄ isozyme in greenling (*H. otaki*). The K_m^{PYR} value of eye-specific LDH C₄ isozyme was 1.88×10^{-5} M.

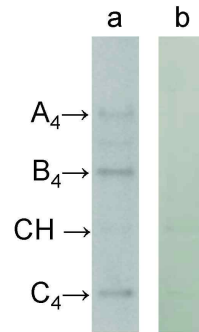


Fig. 8. Western blot analysis of the LDH isozymes in eye from greenling (*H. otaki*). a, Native-polyacrylamide gel electrophoresis zymogram of the LDH isozymes in eye; b, Western blotting of eye-specific LDH C₄ isozyme; A₄, LDH A₄ isozyme; B₄, LDH B₄ isozyme; C₄, eye-specific LDH C₄ isozyme; CH, hybrid of subunit C. LDH isozymes which contain the subunit C were detected by Western blotting after native-polyacrylamide gel electrophoresis.

항체를 사용 Western blotting시켰다(Fig. 8). 그 결과 eye-specific LDH C₄ 동위효소에 대한 항체가 쥐노래미 눈 조직의 eye-specific LDH C₄ 동위효소 및 하부단위체 C를 포함한 동위효소(C hybrid, CH)와 반응하므로 반응특이성이 있는 항체가 생성되었음을 확인하였다. Native-PAGE 상에서 거의 나타나지 않은 CH 밴드가 Western blot 상에서 나타난 이유는 효소염색보다 Western blot 상에서 이미지가 증폭되었기 때문으로 생각된다.

본 연구 결과 쥐노래미 eye-specific LDH C₄ 동위효소는 정제과정에서의 특성이 B₄ 동위효소보다 A₄ 동위효소와 유사하였고, 약염기성 조건에서 효소활성이 높게 나타난 점은 다른 LDH 동위효소들과 달리 효소활성 측정 시 약염기성에서의 측정도 필요함을 시사한다. 또한 생성된 eye-specific LDH C₄ 동위효소에 대한 항체는 면역조직화학, Western blotting 및 ELISA 등에 이용되어 eye-specific LDH C₄ 동위효소 및 이와 유사한 LDH C₄ 동위효소를 보유하는 생물 종들의 병증진단, 진화 및 비교생리학적 연구에 폭넓게 사용 될 것이라고 생각된다. 앞으로 다른 동물에 비하여 상대적으로 다양한 조건의 서식지를 갖는 어류에서 eye-specific LDH C₄ 동위효소에 대한 정제 및 역학특성에 관한 연구가 더 많이 이루어진다면 eye-specific LDH C₄ 동위효소의 기능에 관한 이해의 폭이 넓혀질 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2007년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임[NRF-2007-359-C00033].

References

1. Almeida-Val, V. M. F. and A. L. Val. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B* **105**, 21-28.
2. An, C. S., S. K. Cho, and J. J. Yum. 2010. Variation of lactate dehydrogenase isozymes in angelfish (*Pterophyllum scalare*) according to acute environmental change. *J. Life Sci.* **20**, 416-423.
3. Andriutsa, K. A. and A. K. Andriutsa. 1987. Diagnostic and pathogenetic significance of determining lactate dehydrogenase isoenzyme activity in various biological media in patients with viral hepatitis. *Ter. Arkh* **59**, 89-94.
4. Baldwin, J. and P. S. Lake. 1987. Lactate dehydrogenase homopolymer of hagfish heart and the single lactate dehydrogenase of lampreys display greater immunochemical similarity to LDH C₄ than to LDH B₄ of teleost fish. *J. Exp. Zool.* **242**, 99-102.
5. Baldwin, J., K. Mortimer, and A. Patak. 1988. Do ascidians possess the ancestral subunit type of vertebrate lactate dehydrogenase. *J. Exp. Zool.* **246**, 109 - 114.
6. 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.
7. Cho, S. K. 2000. Mitochondrial lactate dehydrogenase in tissues of vertebrate. Ph. D. Thesis, Cheongju University, Cheongju, Korea.
8. 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.
9. 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.
10. Cho, S. K. and J. J. Yum. 1993. Heterogeneity of lactate dehydrogenase isozymes in tissues of *Lampetra japonica*. *Korean J. Zool.* **36**, 319-328.
11. 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.
12. 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.
13. Coonrod, S., A. Vitale, C. Duan, S. Bristol-Gould, J. Herr, and E. Goldberg. 2006. Testis-specific lactate dehydrogenase (LDH-C₄; Ldh3) in murine oocytes and preimplantation embryos. *J. Androl.* **27**, 502-509.
14. Coppes, Z. 1992. Lactate dehydrogenase in teleosts: the role of LDH-C₄ isozyme. *Comp. Biochem. Physiol. B* **102**, 673-677.
15. Coronel, C. E., C. Burgos, N. M. Gerez de Burgos, L. E. Rovai, and A. Blanco. 1983. Catalytic properties of the sperm-specific lactate dehydrogenase (LDH X or C₄) from different species. *J. Exp. Zool.* **225**, 379-385.
16. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
17. 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.
18. Fisher, S. E., J. B. Shaklee, S. D. Ferris, and G. S. Whitt. 1980. Evolution of five multilocus isozyme systems in the chordates. *Genetica* **52/53**, 73-85.
19. Goldberg, E. 1972. Amino acid composition and properties of crystalline lactate dehydrogenase X from mouse testes. *J. Biol. Chem.* **247**, 2044-2048.
20. Goldberg, E., E. M. Eddy, C. Duan, and F. Odet. 2010. LDHC: the ultimate testis-specific gene. *J. Androl.* **31**, 86-94.
21. Higuti, I. H., S. W. Grande, R. Sacco, and A. J. Nascimento. 2003. Isolation of alkalophilic CGTase-producing bacteria and characterization of cyclodextrin-glycosyltransferase. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **46**, 183-186.
22. 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.
23. Kim, J. B., S. K. Cho, and J. J. Yum. 2004. Changes of activities and isozymes of lactate dehydrogenase in *Coreoperca herzi* acclimated to acute increase of temperature for short-term period. *J. Ind. Sci.*, Cheongju Univ., Korea. **22**, 43-50.
24. 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.
25. 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.
26. Koslowski, M., Ö. Türeci, 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.
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, S. Y., S. K. Cho, and J. J. Yum. 2004. Characterization and evolutionary relationship of lactate dehydrogenase in liver of *Lampetra japonica* and liver-specific C₄ isozyme in *Gadus macrocephalus*. *J. Life Sci.* **14**, 708-715.
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. 1997. Purification and characterization of lactate dehydrogenase eye- and testis-specific C₄ isozyme. *J. Ind Sci.*, Cheongju Univ., Korea. **15**, 263-270.
36. Park, E. M. and J. J. Yum. 2010. Purification and characterization of lactate dehydrogenase isozymes in *Channa argus*. *J. Life Sci.* **20**, 260-268.
37. Park, E. M. and J. J. Yum. 2011. Activities of lactate dehydrogenase and ratios of lactate dehydrogenase/citrate synthase in tissues of *Odontobutis interrupta*. *J. Ind Sci.*, Cheongju Univ., Korea. **28**, 15-24.
38. Rehse, P. H. and W. S. Davidson. 1986. Purification and properties of a C-type isozyme of lactate dehydrogenase from the liver of the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. B* **84**, 145-150.
39. Sensabaugh, G. F. and N. O. Kaplan. 1972. A lactate dehydrogenase specific to the liver of gadoid fish. *J. Biol. Chem* **247**, 585-593.
40. 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.
41. Whitt, G. S. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175**, 1-35.
42. Whitt, G. S. 1981. Evolution of isozyme loci and their differential regulation, pp. 271-289, In Scudder, G. G. E. and J. L. Reveal (eds.), *Evolution today: proceedings of second international congress of systematic and evolutionary biology*. Hunt Institute for Botanical Documentation, Carnegie-Mellon Univ. Press, Pittsburgh.
43. Yum, J. J. 2008. Characterization of lactate dehydrogenase in *Acanthogobius hasta*. *J. Life Sci.* **18**, 264-272.

초록 : 쥐노래미 eye-specific LDH C₄ 동위효소의 정제 및 특성

조성규^{1*} · 염정주²

(¹청주대학교 산업과학연구소, ²청주대학교 자연과학부 생명과학전공)

쥐노래미(*Hexagrammos otakii*) 눈 조직의 젓산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH) eye-specific C₄ 동위효소를 affinity chromatography 및 continuous-elution electrophoresis system으로 정제하였다. 정제된 eye-specific LDH C₄ 동위효소의 분자량은 154.8 kDa이었다. 효소반응의 최적 pH는 8.5로 나타났다. 피루브산을 기질로 하였을 때 eye-specific LDH C₄ 동위효소의 K_m^{PYR} 값은 1.88×10^{-5} M로 나타났다. 본 실험결과 eye-specific LDH C₄ 동위효소의 활성 측정 시 pH를 고려해야만 하고 eye-specific LDH C₄ 동위효소는 LDH A₄ 동위효소보다 피루브산에 대한 기질결합친화성이 큰 것으로 나타났다. 생성된 eye-specific LDH C₄ 동위효소에 대한 항체는 사람에서의 병증진단 및 어류에서의 비교생리학적 연구에 폭 넓게 사용될 것이라고 생각된다.