

## 칠성장어(*Lampetra japonica*) 젖산수소이탈효소 동위효소의 정제 및 면역화학

조성규 · 박선영 · 염정주

청주대학교 이공대학 생물학과

칠성장어(*Lampetra japonica*) 골격근의 젖산수소이탈효소(EC 1.1.1.27, Lactate dehydrogenase: LDH) 동위효소, 썩지(*Coreoperca herzi*)의 LDH A<sub>4</sub> 동위효소 및 소(*Bos taurus*)의 LDH B<sub>4</sub> 동위효소를 affinity chromatography로 정제하였고, 대구(*Gadus macrocephalus*)의 LDH C<sub>4</sub> 동위효소를 affinity chromatography와 DEAE-Sephacel chromatography로 정제하였다.

칠성장어 골격근 LDH 동위효소는 affinity chromatography에서 buffer를 유압한 후 용출되는 분획에서 모두 확인되었고, 정제한 칠성장어 골격근의 LDH에 대한 항체는 썩지 LDH A<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> 및 B<sub>4</sub> 동위효소, 대구 LDH A<sub>4</sub> 및 B<sub>4</sub> 동위효소 그리고 생쥐(*Mus musculus*) LDH A<sub>4</sub> 동위효소와 복합체를 형성하였다.

칠성장어 골격근조직에서는 *Ldh-A* 및 *Ldh-B*가 발현되고 하부단위체 A의 구조는 하부단위체 B의 구조와 유사하며, 하부단위체 A는 진화상 보존적이지만 하부단위체 C는 진화속도가 상당히 빠른 것으로 사료된다.

**KEY WORDS:** Lamprey (*Lampetra japonica*), Lactate dehydrogenase, Purification, Immunochemistry

척추동물의 젖산수소이탈효소(EC 1.1.1.27, Lactate dehydrogenase, LDH) 동위효소들은 lactate와 pyruvate의 상호전환반응을 촉매하는 효소로써 *Ldh-A*, *Ldh-B* 및 *Ldh-C*에 의하여 만들어지는 하부단위체 A, B 및 C로 구성되는 분자량 140,000정도의 사량체이다 (Wilson *et al.*, 1964; Markert *et al.*, 1975). 진화 역사상 3 억 년 동안 진화가 정지되어 조상형의 원시적 형태와 분자구조를 유지하고 있어 살아있는 화석으로 간주되고 있는 (Hardisty, 1982) 칠성장어류(*Petromyzon marinus*, *Lampetra lamottei*)의 모든 조직에서 LDH는 한 개의 유전자로 이루어진 단일 동위효소이며 척추동물 LDH A<sub>4</sub>와 유사하므로 현존 척추동물 LDH의 조상형은 LDH A<sub>4</sub>로 생

각되어왔다. 따라서 LDH의 진화경로는 칠성장어와 먹장어가 진화상에서 갈라지기 전에 *Ldh-A* 유전자가 복제되어 *Ldh-B*를 만들고, 이 유전자들이 각기 하부단위체 A 및 B를 만든 후 *Ldh-B*가 독립적으로 *Ldh-C*를 복제하여 어류, 조류 및 포유류의 하부단위체 C를 만들었고 현재의 칠성장어는 하부단위체 B를 상실한 것이다 (Wilson *et al.*, 1964; Holmes and Scopes, 1974; Markert *et al.*, 1975; Whitt *et al.*, 1975). 그러나 칠성장어류에 속하는 *Petromyzon marinus*, *Mordacia mordax* 및 *Geotria australis*의 LDH는 한 개의 동위효소이지만 면역화학적으로 먹장어 LDH B<sub>4</sub>와 유사하였으며(Baldwin *et al.*, 1987) 대구(*Pseudophycis barbata*) LDH B<sub>4</sub>보다 LDH C<sub>4</sub>와 면역화학적으로 유사하므로 C 하부단위체가 B 하부단위체보다 진화상 더욱 먼저 만들어

본 연구는 1990년도 학술진흥재단 자유공모과제 학술연구조성비로 수행되었음.

진 것으로 보고되었다(Baldwin and Lake, 1987). 멧게류에 속하는 *Pyura stolonifera*의 LDH도 한 가지 하부단위체로 이루어진 단일 동위효소이며 아미노산 조성 및 면역학적 특성을 비교할 때 경골어류의 하부단위체 A 및 B 보다 하부단위체 C에 더욱 유사하므로 멧게류의 LDH와 경골어류의 하부단위체 C가 척추동물의 조상형이라고 하였다(Baldwin *et al.*, 1988). 따라서 여러 동물로부터 정제한 A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub> 및 C<sub>4</sub> 동위효소의 아미노산 서열 및 아미노산 조성의 분석으로 하부단위체 A보다 하부단위체 C가 척추동물 LDH의 조상형이며 *Ldh-C* 유전자가 *Ldh-A* 및 *Ldh-B*를 만든다는 보고와 일치하였다(Li *et al.*, 1983; Rehse and Davidson, 1986). 그러므로 하등 척추동물의 LDH 하부단위체간의 진화 관계는 상기와 같이 불확실하게 제시되고 있다.

본 연구는 하등어류인 칠성장어(*Lampetra japonica*)의 LDH 동위효소를 정제하고, 정제된 척추동물의 LDH A<sub>4</sub> 및 B<sub>4</sub> 동위효소, 경골어류 및 포유류의 LDH C<sub>4</sub> 동위효소와 면역화학적으로 비교하여 LDH 동위효소들의 분자구조의 유사정도를 이해함으로써 LDH의 진화론적인 측면에서의 변화과정을 이해하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

칠성장어(*Lampetra japonica*)는 강원도 인제군 오색에서, 곱지(*Coreoperca herzi*)는 충북 괴산군 청천에서 채집하였다.

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide,  $\omega$ -aminohexyl-sepharose 4B 및 DEAE-Sephacel은 Sigma 제품을, Freund's complete adjuvant는 Difco 제품을 사용하였다.

### 조직추출액의 준비

칠성장어의 골격근, 곱지의 골격근, 심장 및 눈조직, 대구(*Gadus macrocephalus*)의 간조

직, 생쥐(*Mus musculus*)의 심장 및 정소조직 그리고 소(*Bos taurus*)의 심장조직은 적출한 후 지방 및 혈액을 충분히 제거한 후 4°C의 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.85)를 시료 조직의 3배(V/W) 가한 다음 얼음에 채운 glass homogenizer로 파쇄하였으며, 이 용액을 4°C, 20,000g refrigerated centrifuge (Hitachi 20 PR-52D)에서 1시간씩 2번 원심 분리하여 그 상등액을 정제 및 면역반응 시료로 사용하였다.

### 효소의 활성측정 및 단백질 정량

LDH 동위효소의 활성은 1.5mM pyruvate와 0.13mM NADH를 함유한 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.85) 3ml에 시료를 가한 다음 NADH의 감소율을 spectrophotometer(Bausch & Lomb)로 340nm에서 측정하였고, 1 unit는 1분당 감소되는 optical density 1.0으로 정하였다. 정제과정 중 column에서 용출되는 각 분획의 단백질은 BSA를 표준 단백질로 사용하여 Bradford (1976)의 방법에 의해 spectrophotometer로 595nm에서 정량하였다.

### 전기영동

Polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli (1970)의 방법에 의해 thermostatic circulator(LKB 2219)를 사용하여 4°C로 유지시킨 polyacrylamide vertical slab system(LKB 2001)으로 실시하였다. 7.5% acrylamide separation gel과 2.5% acrylamide stacking gel이 되도록 slab gel을 만들고, 시료에는 50% sucrose와 0.05% bromophenol blue용액을 1:1(V/V)로 가하였다. Tris-glycine buffer(pH 8.3)를 사용하여 200V에서 30분간 전개시킨 후 300V에서 3시간 30분 동안 전기영동하였다. 효소 염색은 Whitt (1970)의 방법에 의해 실시하였으며, 단백질 염색은 Wray등(1981)의 방법에 따라 silver nitrate를 사용하여 실시하였다.

## LDH 동위효소의 정제

### 1) 칠성장어(*L. japonica*) LDH 동위효소의 정제

Oxamate gel의 준비와 chromatography는 O'Carra와 Barry(1972) 그리고 O'Carra 등(1974)의 방법을 변형한 Kim과 Yum(1989)의 방법에 의해 실시하였다.

Oxamate column은 사용하기 전에 0.2mM NADH를 함유한 0.05M potassium phosphate buffer(pH 6.85, 이하 buffer로 칭함)로 평형시킨 다음 0.5M KCl과 0.2mM NADH를 첨가한 칠성장어 골격근 추출액 10ml를 가하였다. Column으로부터 단백질이 용출되지 않을 때까지 0.2mM NADH를 함유한 buffer로 씻어 준 후, 1.6mM NAD<sup>+</sup>를 함유한 buffer와 plain buffer를 차례로 유입시키면서 용출액을 2ml씩 분획하였고, 각 분획에 대하여 LDH 동위효소의 활성 측정 및 단백질 정량을 실시하여 elution profile을 작성하였다. 이때 LDH 동위효소를 함유한 분획은 모아서 ultrafiltration에 의해 농축시킨 후 항원 및 시료로 사용하였다.

### 2) LDH A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub> 및 C<sub>4</sub> 동위효소의 정제

격지 골격근 추출액을 oxamate affinity chromatography 한 후 용출액은 2ml씩 분획하였으며 LDH 활성 및 단백질 정량을 하여 elution profile을 작성하였다. LDH분획은 전기영동한 후 LDH A<sub>4</sub>를 함유한 분획만을 모아 ultrafiltration에 의하여 농축시킨 다음 전기영동하였으며, LDH 효소염색 및 단백질 염색을 하여 정제되었음을 확인하였고 항원 및 시료로 사용하였다. 소 심장 추출액으로부터 LDH B<sub>4</sub>의 정제과정은 상기과정과 동일하게 실시하여 B<sub>4</sub> 동위효소만을 함유한 분획을 모아서 사용하였다.

대구 간조직 추출액은 oxamate affinity chromatography하여 LDH를 함유한 분획들을 모아 ultrafiltration에 의해 농축시킨 다음 0.05M Tris-HCl buffer(pH 8.5)에 투석 한 후 DEAE-Sephacel chromatography 시료로 사용하였다. 0.05M Tris-HCl buffer(pH 8.5)

로 평형시킨 DEAE-Sephacel column(15 × 200mm)에 affinity chromatography를 실시하여 모은 LDH 동위효소들을 가하였으며 0.05M Tris-HCl buffer를 0.3M NaCl까지 농도구배를 만들어서 bed volume의 5배 정도 흘려주었다. 용출액은 1ml씩 분획하여 각 분획의 LDH 활성을 측정하고 전기영동 후 확인된 LDH C<sub>4</sub> 동위효소를 포함한 분획은 농축시킨 후 정제 시료로 사용하였다.

## 항혈청 조제 및 면역반응

정제한 칠성장어 골격근 LDH 동위효소는 0.65, 0.8, 2.5 및 4.3mg, 정제한 격지 LDH A<sub>4</sub> 동위효소는 0.8, 0.65, 2.0 및 4.1mg의 순서로 0.1M potassium phosphate buffer에 녹여 동량의 Freund's complete adjuvant에 완전히 유화시킨 후, 뉴질랜드 화이트 순종 토끼의 thigh muscle과 dorsal muscle에 10일 간격으로 4회 주사하였다. 최종 면역주사 4일 후 항응고제를 사용하지 않고 심장 천공법(Campbell et al., 1970)으로 채혈하였으며 혈액은 4°C에서 1시간 방치시킨 후 혈병을 제거하고 4°C, 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 항혈청으로 사용하였다.

항혈청은 동량의 0.1M phosphate-buffered saline(pH 7.1, PBS)을 가한 후 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 포화용액을 사용하여 50% 포화시켜 4°C에서 3시간 동안 방치하였으며 4°C, 20,000g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 침전물은 PBS에 녹여 초기 단계의 항혈청과 동량으로 만들어 전과 동일한 과정으로 2회 반복하였다. 이때 침전물은 처음 항혈청 양의 1/3이 되도록 PBS에 녹여 4°C에서 48시간 동안 투석 한 후 원심분리하여 상등액을 항체 용액으로 사용하였다.

일정한 비를 이루게 한 항원용액과 항혈청의 혼합물은 25°C에서 1시간, 4°C에서 12시간 방치 후 4°C, 20,000g에서 원심분리하여 상등액을 전기영동하였으며 항원-항체 복합체를 이루지 않은 동위효소는 전기영동상에서 LDH 효소염색을 하여 확인하였다.

## 결과 및 고찰

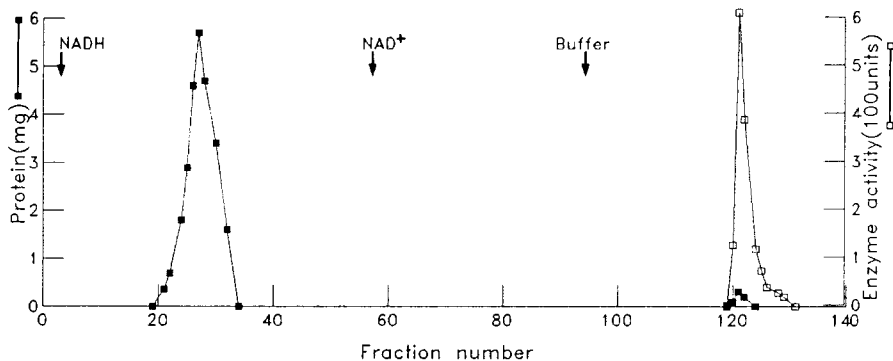
LDH 동위효소의 정제 및 chromatography 상에서의 behavior

LDH 동위효소들은 역학적 특성에 의해  $\text{NAD}^+$  및 pyruvate와 abortive ternary complex(LDH- $\text{NAD}^+$ -pyruvate)를 형성하는 정도에 차이가 있으므로 이를 이용하여 LDH 동위효소를 분리할 수 있다.(Kaplan *et al.*, 1968; O'Carra and Barry, 1972; O'Carra *et al.*, 1974). 고등척추동물의 경우 pyruvate와 유사한 oxalate를 sepharose와 결합시켜 만든 oxamate-linked sepharose gel에 NADH가 포함된 buffer를 가하여 평형시킨 후 NADH를 포함하는 시료를 유입시키면 LDH만 gel에 결합되고 나머지 단백질은 용출되게 된다. 그 후  $\text{NAD}^+$ 를 포함한 buffer를 유입시키면 하부단위체 B를 포함한 동위효소가  $\text{NAD}^+$ 의 nicotinamide ring의 4번 위치에서 enol-pyruvate와 결합체를 형성하므로  $\text{A}_4$ 만 용출되며(Gutfreund *et al.*, 1968; Kaplan *et al.*, 1968; Everse *et al.*, 1971) plain buffer를 계속 유입시키면 하부단위체 B를 포함한 동위효소가 용출된다.

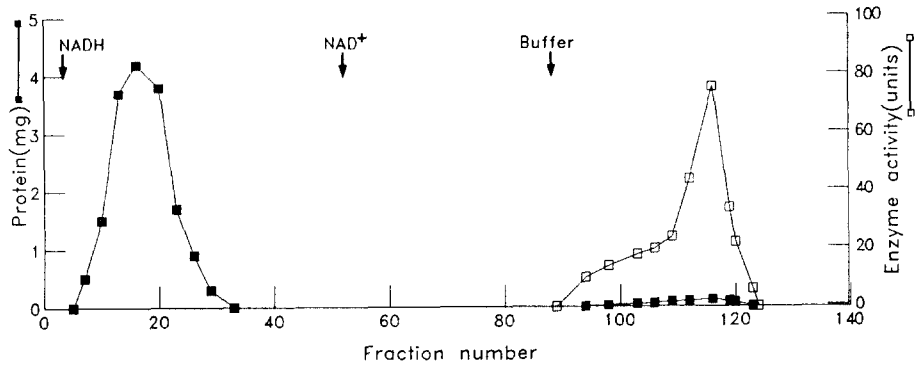
본 실험에서 oxamate-linked sepharose gel column에 0.5M KCl과 0.2mM NADH

를 함유한 조직 추출액을 각각 가하고 0.2mM NADH를 함유한 buffer로 씻어 줄 경우 LDH를 제외한 단백질이 완전히 용출되었다. 칠성장어 골격근에 존재하는 LDH는  $\text{NAD}^+$ 를 함유한 buffer를 유입시켰을 때는 LDH가 용출되지 않고 plain buffer를 유입시킨 후 23-38번째 분획인 119-134번째 분획에서 동위효소들이 모두 용출되는 것이 확인되었다(Fig. 1). 격지의 LDH 동위효소는  $\text{NAD}^+$  유입 후 34번째 분획(88번째 분획)에서부터 용출되기 시작하여 plain buffer 유입 후 계속 용출되므로, 각 분획을 전기영동한 후  $\text{A}_4$  동위효소만 존재하는 88-114번째 분획들을 모았다(Fig. 2). 칠성장어 LDH와 격지의 LDH  $\text{A}_4$  분획들만 모아서 ultrafiltration에 의하여 농축시킨 후(Table 1) 주사용 항원 및 실험에 사용하였다. 소의 LDH  $\text{B}_4$  동위효소는 affinity chromatography에서 plain buffer 유입 후 33-36번째 분획에서 용출되었다. 대구의 LDH  $\text{C}_4$ 를 포함하는 동위효소는  $\text{NAD}^+$  유입 후 26번째 분획부터 모두 용출되었으므로 LDH가 확인된 분획들만 모아서 0.05M Tris-HCl을 가하면서 농축하여 DEAE-Sephacel chromatography용 시료로 사용하였다. 칠성장어 LDH 동위효소들, LDH  $\text{A}_4$ ,  $\text{B}_4$  및  $\text{C}_4$  동위효소는 전기영동상에서 정제된 것으로 확인되었다(Fig. 3).

Affinity chromatography 상에서 LDH



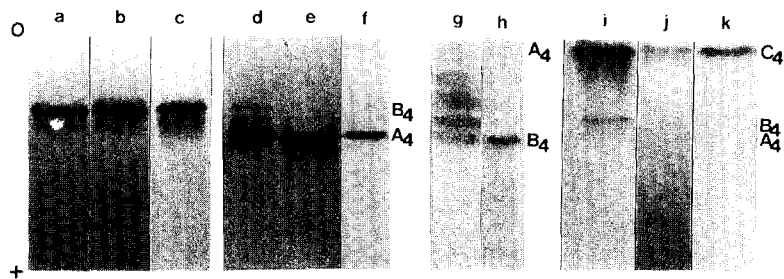
**Fig. 1.** Affinity chromatography of LDH isozymes in *Lampetra japonica* skeletal muscle on a column (25 × 85mm) of oxamate-linked sepharose gel. Fractions of 2ml were collected at a flow rate 0.4ml/min. LDH isozymes were found to be in the fractions of the plain column buffer.



**Fig. 2.** Affinity chromatography of LDH isozymes in *Coreoperca herzi* skeletal muscle on a column (25 × 85mm) of oxamate-linked sepharose gel. Fractions of 2ml were collected at a flow rate 0.4ml/min. LDH A<sub>4</sub> isozyme was found to be in the fraction numbers 88-114.

**Table 1.** Purification of LDH isozymes from the skeletal muscle of *Lampetra japonica* and *Coreoperca herzi*

Step	Volume (ml)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Total protein (mg)	Purification (fold)	Yield (%)
<i>L. japonica</i> skeletal muscle						
Crude extract	70	11,620	22	529	1	100
Affinity chromatography	6	10,690	1,070	10	49	92
<i>C. herzi</i> skeletal muscle						
Crude extract	110	9,328	16	571	1	100
Affinity chromatography	8	5,313	590	9	38	57



**Fig. 3.** Polyacrylamide gel electrophoresis of LDH isozymes. a, LDH isozymes of skeletal muscle *Lampetra japonica*; b, the purified LDH isozymes after the affinity chromatography; c, the purified LDH isozymes after the affinity chromatography stained with silver nitrate d, LDH isozymes of skeletal muscle extract in *Coreoperca herzi*; e, the purified LDH A<sub>4</sub> isozyme after the affinity chromatography; f, the purified LDH A<sub>4</sub> isozyme after the affinity chromatography stained with silver nitrate; g, LDH isozymes of heart extract in *Bos taurus*; h, the purified LDH B<sub>4</sub> isozyme after the affinity chromatography; i, LDH isozymes of liver extract in *Gadus macrocephalus*; j, LDH isozymes after the affinity chromatography; k, the purified LDH C<sub>4</sub> isozyme after the DEAE-Sephacel chromatography.

A<sub>4</sub> 동위효소는 NAD<sup>+</sup>를 함유한 buffer를 유입시 용출된다(Kaplan *et al.*, 1968; Everse *et al.*, 1971). 그러나 모래무지 (*Pseudogobio esocinus*)의 LDH A<sub>4</sub> 동위효소는 NAD<sup>+</sup>를 유입시 용출되지 않고 plain buffer를 유입한 후 22번째 분획에서부터 용출되었다. 이는 모래무지 LDH A<sub>4</sub> 동위효소가 기질에 의한 억제정도가 다른 척추동물 중에 비해 상당히 크고, LDH B<sub>4</sub> 동위효소의 억제정도와 유사하여 plain buffer를 유입시 용출된 것으로 보고된 바 있다 (Kim and Yum, 1989).

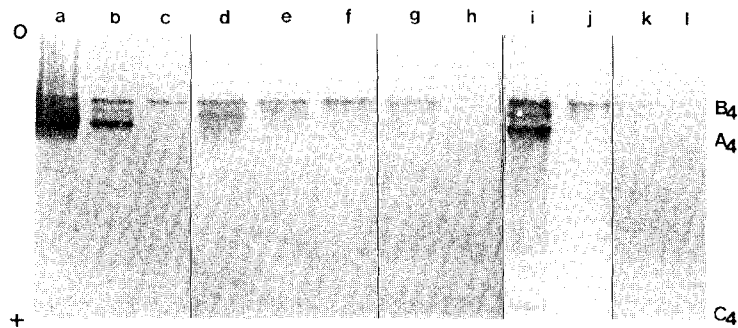
본 실험에서 칠성장어 골격근 LDH 동위효소들의 affinity chromatography 상에서의 행동을 정제한 LDH A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub> 및 C<sub>4</sub> 동위효소 그리고 모래무지 A<sub>4</sub>동위효소의 행동과 비교하면 동위효소들은 *Ldh-A* 및 *Ldh-B*에 의해 발현되어졌으며 동위효소들 모두가 동일 분획에서 확인되므로 하부단위체 A 및 B의 구조가 서로 상당히 유사한 것으로 사료된다.

#### 면역화학적 특성

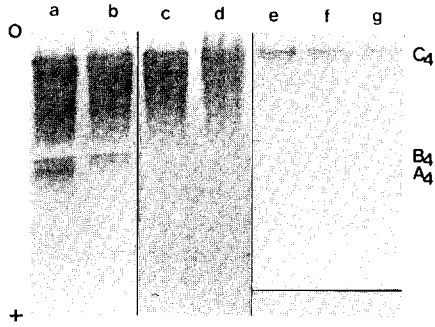
정제한 칠성장어 골격근 LDH 동위효소들과 꺾지 A<sub>4</sub> 동위효소를 토끼에 주사하여 항혈청을 얻었다. 꺾지 골격근과 심장 추출액에 일정비의 꺾지 LDH A<sub>4</sub> 동위효소에 대한 항혈청을 가한 후 polyacrylamide gel 전기영동으로 확인한 결과 LDH A<sub>4</sub> 동위효소에 대한 항체가 생성되었음이 확인되었다(Fig. 4a-f). 꺾지 눈조직 추

출액에 LDH A<sub>4</sub> 동위효소에 대한 항혈청을 가하여 항원-항체 반응을 시킬 경우 하부단위체 A와 C를 포함한 동위효소는 항체와 복합체를 형성하여 침전되었으므로 전기영동상에는 음극쪽에 위치한 하부단위체 B를 포함한 동위효소만이 확인되었다(Fig. 4i, j). 대구 간조직 추출액에 LDH A<sub>4</sub> 동위효소에 대한 항혈청을 가한 경우는 하부단위체 A를 포함한 동위효소만이 항체와 복합체를 형성하였고, 정제한 LDH C<sub>4</sub>의 경우는 복합체가 형성되지 않았다(Fig. 5b, g).

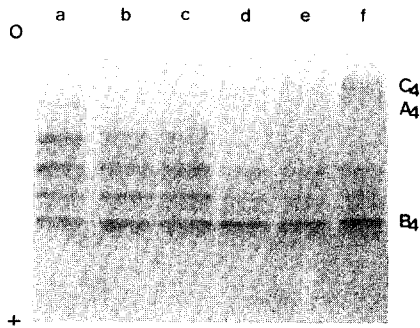
칠성장어 LDH 동위효소에 대한 항혈청과의 반응에서는 꺾지의 경우 심장조직에서 하부단위체 A, B가 모두 복합물을 형성하였고(Fig. 4g, h), 눈 조직에서 하부단위체 B보다 하부단위체 A, C가 복합물을 형성하므로 더욱 관련이 있는 것으로 보이나 항혈청의 비율을 높임에 따라 하부단위체 A, B, C가 모두 침전되었다(Fig. 4k, l). 대구의 경우 간조직에서는 하부단위체 A, B만 반응하고 하부단위체 C는 반응하지 않았으며 정제한 LDH C<sub>4</sub>에 대해서도 역시 복합체를 형성하지 않았다(Fig. 5c, d, f). 생쥐 신장조직에 대한 반응에서는 A<sub>4</sub> 동위효소만 항체와 복합체를 형성하고 B<sub>4</sub> 동위효소는 복합체를 형성하지 않았다. LDH C<sub>4</sub>를 포함한 정소조직과의 반응에서는 A<sub>4</sub> 동위효소만 복합체를 형성할 뿐 C<sub>4</sub> 동위효소는 복합체가 형성되지 않았다(Fig. 6). 칠성장어와의 면역 반응 결과 *Ldh-C*의 조직 발현이 특수하게 조절되지 않는



**Fig. 4.** Reactivity of anti-*Coreoperca herzi* LDH A<sub>4</sub> antiserum (anti-A<sub>4</sub>) and anti-*Lampetra japonica* LDH isozymes antiserum (anti-LI) to the isozymes of *Coreoperca herzi* tissue extract. a, *C. herzi* muscle extract (CM); b, CM + anti-A<sub>4</sub> (4:1); c, CM + anti-A<sub>4</sub> (2:1); d, *C. herzi* heart extract (CH); e, CH + anti-A<sub>4</sub> (4:1); f, CH + anti-A<sub>4</sub> (1:1); g, CH + anti-LI (2:1); h, CH + anti-LI (1:2); i, *C. herzi* eye extract (CE); j, CE + anti-A<sub>4</sub> (1:1); k, CE + anti-LI (4:1); l, CE + anti-LI (2:1); o, origin; (Ag: Antiserum, V/V).



**Fig. 5.** Reactivity of anti-*Lampetra japonica* LDH isozymes antiserum (anti-LI) to the isozymes of *Gadus macrocephalus* liver extract. a, *G. macrocephalus* liver extract (GL); b, GL + anti-A<sub>4</sub> (1:2); c, GL + anti-LI (1:2); d, GL + anti-LI (1:4); e, the purified LDH C<sub>4</sub> isozyme of *G. macrocephalus* liver extract (GC); f, GC + anti-LI (2:1); g, GC + anti-A<sub>4</sub> (2:1); o, origin; (Ag: Antiserum, V/V).



**Fig. 6.** Reactivity of anti-*Lampetra japonica* LDH isozyme (anti-LI) to the isozymes of *Mus musculus*. a, *Mus musculus* kidney extract (MK); b, MK + anti-LI (1:3); c, MK + anti-LI (1:6); d, MT + anti-LI (1:3); e, MT + anti-LI (1:6); f, *Mus musculus* testis extract (MT); (Ag: Antiserum, V/V).

격지 *Ldh-C* 유전자가 분화가 적게 이루어져 하부단위체 A, C 그리고 B와 복합체를 형성하였다. 그러나 대구 및 생쥐의 *Ldh-C*는 분화되어 대구의 LDH A<sub>4</sub> 및 B<sub>4</sub> 동위효소, 생쥐의 LDH A<sub>4</sub> 동위효소만 반응하였다.

칠성장어의 일종인 *Petromyzon marinus*, *Mordacia mordax* 및 *Geotria australis*에 대한 항체와 먹장어 LDH A<sub>4</sub> 및 B<sub>4</sub>를 면역화학적으로 반응한 결과 칠성장어 LDH와 먹장어

B<sub>4</sub> 동위효소의 구조가 유사한 것으로 보고하였다(Baldwin *et al.*, 1987). 먹장어는 *Ldh-A* 및 *Ldh-B*가 조직에서 발견되어 LDH A<sub>4</sub>와 B<sub>4</sub> 동위효소만이 합성되었으나, A<sub>4</sub> 및 B<sub>4</sub> 동위효소는 생리적으로 적응한 결과 기능상의 분화가 이루어지지 않았다(Dahl and Korneliussen, 1977; Sidell and Beland, 1980). 세 종의 칠성장어의 LDH와 먹장어 B<sub>4</sub> 동위효소가 대구 (*Pseudophycis barbata*) LDH B<sub>4</sub>보다 C<sub>4</sub>에 면역화학적으로 유사하므로 *Ldh-C*가 *Ldh-B*보다 먼저 만들어졌다고 하였으며(Baldwin and Lake, 1987) 아미노산 서열의 비교 연구에 의하여 LDH의 조상형 유전자가 *Ldh-C*라고 보고하였다(Li *et al.*, 1983; Rehse and Davidson, 1986).

본 실험결과 칠성장어 LDH들에 대한 항혈청이 생쥐의 LDH A<sub>4</sub>와 반응한 것으로 미루어 척추동물 LDH의 하부단위체 A는 진화과정에서 상당히 보존적임을 알 수 있고, 칠성장어 LDH와 격지의 하부단위체 C가 하부단위체 B보다 더욱 유사하므로 *Ldh-C*가 조상형 유전자라고 보고한 상기의 결과와 마찬가지로 *Ldh-C*에서 *Ldh-A* 및 *Ldh-B*가 만들어지지만 하부단위체 C는 특수하게 빨리 진화되어진 것으로 볼 수 있으며 하부단위체 B도 A보다 진화속도가 빠른 것으로 사료된다.

이러한 결과들로부터 칠성장어 골격근조직의 LDH 동위효소들은 *Ldh-A* 및 *Ldh-B*가 발견되고 하부단위체 A의 구조는 B의 구조와 유사하며, 고등동물과 면역화학적으로 비교할 경우 LDH A<sub>4</sub>와 유사하지만 하등동물로 갈수록 LDH 동위효소의 분화가 이루어지지 않아 동위효소들의 특성이 비슷한 것으로 나타났다.

### 인용문헌

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 C<sub>4</sub> than to LDH B<sub>4</sub> of teleost fish. *J. Exp. Zool.* **242**: 99-102.

- Baldwin, J., P.S. Lake and T.W. Moon, 1987. Immunochemical evidence that the single lactate dehydrogenase of lampreys is more similar to LDH B<sub>4</sub> than LDH A<sub>4</sub> of hagfish. *J. Exp. Zool.* **241**: 1-8.
- 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.
- 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.
- Campbell, D.H., J.S. Garbey, N.E. Cremer and D.H. Sussdorf, 1970. In: *Methods in Immunology*. W.A. Benjamin. pp.16-18.
- Dahl, H.A. and H. Korneliusen. 1977. Lactate dehydrogenase isoenzymes in different types of muscle fibres in the Atlantic Hagfish (*Myxine glutinosa*). *Comp. Biochem. Physiol.* **55B**: 381-385.
- Everse, J., R.E. Barnett, C.J.R. Thorne and N.O. Kaplan, 1971. The formation of ternary complexes by diphosphopyridine nucleotide-dependent dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **143**: 444-460.
- Gutfreund, H., R. Cantwell, C.H. McMurray, R.S. Criddle and G. Hathaway, 1968. The kinetics of the reversible inhibition of heart lactate dehydrogenase through the formation of the enzyme oxidized nicotinamide adenine dinucleotide-pyruvate compound. *Biochem. J.* **106**: 683-687.
- Hardisty, M.W., 1982. Lampreys and hagfishes: analysis of cyclostome relationships. In: *The Biology of Lamprey*, Vol.4B (M.W. Hardisty and I.C. Potter, eds.) Academic Press, London pp.165-259.
- Holmes, R.S. and R.K. Scopes, 1974. Immunochemical homologies among vertebrate lactate dehydrogenase isozyme. *Eur. J. Biochem.* **43**: 167-177.
- Kaplan, N.O., J. Everse and J. Admiral, 1968. Significance of substrate inhibition of dehydrogenase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **151**: 400-412.
- 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.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**: 680-685.
- 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.
- Markert, C.L., J.B. Shaklee and G.S. Whitt, 1975. Evolution of a gene. *Science* **189**: 102-114.
- 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.
- 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.
- Rehse, P.H. and W.S. Davison, 1986. Evolutionary relationship of a fish C type lactate dehydrogenase to other vertebrate lactate dehydrogenase isozymes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **43**: 1041-1051.
- Sidell, B.D. and K.F. Beland, 1980. Lactate dehydrogenase of Atlantic Hagfish: physiological and evolutionary implication of a primitive heart isozyme. *Science* **207**: 769-770.
- Whitt, G.S., 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175**: 1-36.
- Whitt, G.S., J.B. Shaklee and C.L. Markert, 1975. Evolution of the lactate dehydrogenase isozymes of fishes. In: *Isozymes.: Genetics and Evolution*(Edited by Markert C.L.), Academic Press. N.Y. 381-400.
- Wilson, A.C., N.O. Kaplan, L. Levine, A. Pesce, M. Reichlin and W.S. Allison, 1964. Evolution of lactic dehydrogenase. *Fed. Proc.* **23**: 1258-1265.
- Wray, W., T. Beulhas, V.P. Wray and R. Hancock, 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **118**: 197-203.

(Accepted September 1, 1993)



---

**Purification and Immunochemistry of Lactate Dehydrogenase Isozyme in *Lampetra japonica***

Sung Kyu Cho, Seon Yong Park and Jung Joo Yum (Dept. of Biology, Chongju University, Chongju 360-764, Korea)

The LDH isozymes of skeletal muscle in *L. japonica*, LDH A<sub>4</sub> isozyme of *Coreoperca herzi* and LDH B<sub>4</sub> isozyme of *Bos taurus* were purified by affinity chromatography. The LDH C<sub>4</sub> isozyme of *Gadus macrocephalus* was purified by affinity and DEAE-Sephacel chromatography. The LDH isozymes of skeletal muscle in *L. japonica* were detected in the fractions from elution with column buffer of affinity chromatography. The antibodies against the purified LDH isozymes of skeletal muscle in *L. japonica* made complexes with LDH A<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> and B<sub>4</sub> isozymes of *C. herzi* tissues. Also the LDH A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub> isozymes of *G. macrocephalus* and LDH A<sub>4</sub> isozyme of *Mus musculus* were obtained the same results. The *Ldh-A* and *Ldh-B* are expressed in *L. japonica* tissues. The structure of subunit A is similar to that of subunit B. The subunit A of vertebrate LDH may be conservative in evolution, but the evolution rate of subunit C seems to be faster than that of subunit A.