

# 어류 Metallothionein에 대한 특이적 면역 호소 측정법의 확립에 관한 연구

황 갑 수

군산대학교 공과대학 환경공학과

## The Study on the Establishment of Specific ELISA for the Detection of Fish Metallothionein

Gap-Soo Hwang

*Dept. of Environmental Engineering, Kunsan National Univ.*

### ABSTRACT

The purpose of this experiment is to establish the sensitive and specific ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) system for the detection of fish metallothionein (MT). Silver carp were injected with Cd of 1~8 mg/kg body wt. 4 times during 10 days.

Silver carp was very tolerant species to Cd. Cd induced MT in liver was separated and purified by gel filtration chromatography and ion exchange chromatography and identified by spectrophotometry, native gel electrophoresis and western blot analysis. The rabbit antiserum was produced by immunizing rabbit with lyophilized MT, and the competitive ELISA system was established for the detection of fish MT. In the present ELISA system, the detection limit was about 33 ng/ml. When this ELISA system was employed to determine the MT level in the supernatant sample of fish liver homogenate, the reaction curve showed a good parallel corelationship with the calibration curve over a certain dilution range.

The results indicate that the competitive ELISA can be a useful tool for the detection of fish MT in the toxicological study and the evaluation of water pollution.

### 서 론

Metallothionein (MT)은 생체의 간장 또는 신장에서 널리 발견되는 저분자량 (M.W. 6500~7000)의 세포 가용성단백질로서 Cd, Hg, Zn, Cu 등의 중금속과 특이한 결합력 및 친화성을 가지고 있어 이들 중금속의 대사와 무독화 (Detoxification)에 중요한

역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있으며 특이하게 높은 cystein함량으로 인해 MT의 항산화제 (Antioxidant)로서의 생체방어작용에 관한 연구가 현재까지 지속적으로 진행되고 있고 최근에는 실험동물의 뇌로부터 Alzheimer disease의 관련물질로서 MT III가 단리되어 많은 관심을 끌고있다<sup>1)~7)</sup>. 또한 MT는 Cd, Hg, Cu, Zn, Bi, Co, Ag 및 Mn 등의 각종 금

속에 의해 생체내 합성이 유도되며 더우기 최근 hexane, benzene, ethanol 등의 유기용매, paraquat 등의 농약, 저온 및 감염 등에 의한 MT의 체내 합성이 발견됨에 따라 MT는 환경분야에 있어 한층 그 중요성을 더해가고 있다<sup>20-22)</sup>.

1957년 Margoshes와 Vallee에 의해 MT의 존재가 확인된 이래<sup>10)</sup> MT에 관한 많은 연구결과가 보고되어 왔으나 이들은 주로 rat와 mouse 등을 실험동물로 사용한 연구결과들로 수생생물을 대상으로 한 보고들은 이들에 비하면 극히 미미한 실정이라 할 수 있다. 그럼에도 불구하고 수종의 어류와 mussel, crab 등에 있어 MT의 존재와 중금속 폭로에 의한 유도현상이 알려져 있는데<sup>11-14)</sup> 이는 환경분야에 있어 MT연구의 중요성을 인식하고 MT를 생물모니터링 등의 실제 환경평가에 응용할수 있는 지표물질로서 개발하고자하는 노력으로서 이해 될 수 있다. 어패류에 있어서도 유기물질에 의해 MT가 체내에서 유도생성되는지는 아직 확실치 않으나 다수의 연구결과로부터 MT는 적어도 어패류가 서식하고 있는 환경수중의 중금속 오염에 대한 지표가 될 수 있을 것으로 생각되어지고 있다. 이상으로부터 환경오염에 있어 특히 수질오염과 관련하여 중금속 오염 등의 생물학적 지표로서 MT를 활용할수 있다면 물리화학적 자료와 함께 오염평가에 많은 유익을 제공받을 수 있을 것으로 기대된다.

현재 생체내 MT의 정량에는 Cd-hem법, Ag-saturation법 및 방사성 동위원소 측정법 등이 일반적으로 이용되고 있는데<sup>15-16)</sup> 이들 중 Cd-hem법과 Ag-saturation법은 수회의 열처리, 세정 및 분리과정을 포함하고 있어 처리조작이 번잡하고 오염물질의 생체에 대한 영향을 고감도로 분별평가하기에는 어려움이 있다고 할 수 있으며 방사성 동위원소 측정법은 안전관리에 대한 위험성을 내포하고 있다. 따라서 본 연구자는 어류 MT에 대한 특이적 고감도 정량법의 개발에 대한 필요성을 인식하고 면역학적 기법인 효소면역측정법(ELISA)을 담수어인 붕어를 대상으로하여 정립함으로써 환경분야에 있어 MT에 관한 연구와 실제 생물모니터링의 효율적 수행을 도모하고자 하였다.

## 실험 방법

### 1. 실험동물 및 MT의 유도

실험동물로서는 잉어과에 속하는 은붕어(*Carassius*

*Auratus*)를 구입하여 실험실 수조에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. MT의 유도는 각 실험동물당 Cd 1~8 mg/kg. body wt.의 용량을 순차적으로 증가시키며 10일동안 4회에 걸쳐 복강주사 함으로써 행하였다.

### 2. MT의 분리 및 정제

카드뮴투여 24시간후 실험동물로부터 간을 채취하여 0.9% 생리식염수로 세척하고 중량을 칭량한 후 등배의 0.25 M sucrose용액을 가하여 homogenization을 행한다. Homogenization 후 18,000 r.p.m에서 60분동안 원심분리하여 상등액을 취하고 sephadex G-75 column을 사용하여 gel filtration chromatography를 행하였다. Column은 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)로 용출하며 각 분획에 대해 280 nm흡광도 및 Cd에 대한 원자흡수흡광도를 구하였다. Gel filtration chromatography의 결과로부터 MT분획시료를 pool한 후 DEAE sepharose column에서 ion exchange chromatography를 행하여 10 mM~300 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)의 linear gradient로 용출하고 각 분획에 대해 254 nm흡광도, 280 nm흡광도 및 Cd에 대한 원자흡수 흡광도를 구하였다. 각 MT분획을 pool하고 증류수에 대해 24시간 이상의 투석을 통해 탈염을 행한 후 -90°C 이하에서 동결건조 시키고 냉동보관하였다.

### 3. Spectrophotometry, Native 겔 전기영동 및 Western blot analysis

Spectrophotometry에 의한 fish MT의 확인은 분리 정제한 은붕어 MT를 증류수에 적당농도로 용해시켜 200~300 nm의 파장범위에서 흡수 spectrum을 작성하고 동일 MT용액을 염산산성(pH 1~2)으로 하여 작성한 흡수 spectrum과 대비시켜 plotting하였다. MT의 확인을 위한 전기영동은 native법에 의해 행하였다. 10% polyacrylamide gel을 사용하며 분리후의 gel은 coomassie brilliant blue R-250염색 및 탈색과정을 통해 단백질의 존재를 확인하였다. 별도로 Cd투여에 의해 MT가 유도되어진 rat의 간으로부터 분리정제된 rat MT I과 MT II분획들이 fish MT의 확인을 위해 사용되었다. 또한 시료를 native 전기영동하여 PVDF membrane (Milli-

pore Co.)에 blotting하고 1차 항체, 2차 항체와 순차적으로 반응시킨 후 발색시약을 사용하여 MT fragment를 확인하였다. 본 실험에서 하기의 방법에 따라 생산된 fish MT에 대한 rabbit polyclonal antibody를 1차 항체로 사용하였으며 2차 항체로는 POD 표식 항rabbit IgG 항체를 사용하였고 발색반응에는 POD기질로서 DAB (3,3'-Diaminobenzidine)를 사용하였다.

#### 4. Fish MT에 대한 효소면역측정법(ELISA)

##### 1) Rabbit 항fish MT antibody의 생산

Rabbit으로부터 fish MT에 대한 polyclonal anti-body를 얻는 과정으로서 ① Fish MT의 polymerization ② 초회면역 ③ 추가면역 ④ 항 fish MT antiserum 채취의 순서에 따라 행한다. MT의 polymerization은 Habeeb의 방법에 따라<sup>17)</sup> 동결건조한 fish MT시료 적당량을 0.1M acetate buffer (pH 6.2)에 용해하고 25% glutaraldehyde를 가하여 반응시킨후 0.05 M borate buffer saline에 대해 투석을 행하였다. 면역주사용액은 투석을 행한 시료와 complete freund adjuvant를 2개의 주사기 및 연결관을 사용하여 1:1혼합, emulsion용액으로 제조하며 이를 rabbit의 배부에 적당량씩 10개소 이상 피하주사를 실시하였다. 추가면역을 위한 주사용액의 제조에는 incomplete freund adjuvant를 사용하며 주사용액의 제조와 투여방법은 초회면역시와 동일하다. 추가면역 1주후 rabbit를 처치하여 경동맥으로부터 대량채혈을 실시하고 37°C에서 1시간, 4°C에서 하루밤 정치한 후 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층의 혈청을 회수하였다.

##### 2) 경합 ELISA에 의한 fish MT 측정

Rabbit으로부터 회수한 항fish MT혈청과 분리정제한 fish MT와의 사이에서 MT의 고상화량과 항체의 사용회석배수에 대한 최적조건을 설정하여 경합 ELISA에 의한 측정계를 확립하고 검량선 작성을 행하였다. 경합법에 의한 측정순서는 먼저 96 well Nunc immunoplate에 일정농도의 fish MT를 고상화하고 0.5% gelatin용액을 가하여 37°C에서 1시간 blocking한 후 흡입세정한다. 여기에 시료와 항 fish MT 1차항체를 가하고 37°C에서 1시간 반응시킨다음 세정하고 이어서 POD표식 2차 항체를 일정량 가한후 POD기질인 2,2'-Azinobis (3-ethyl ben-

zothiazolinesulfonic acid) (ABTS)의 첨가에 의해 일어나는 발색반응을 415 nm파장에서 흡광도를 측정하였다. 이때 POD 표식 2차항체로서는 POD표식 goat 항rabbit IgG 항체를 사용하며 흡광도측정은 Bio-Rad사의 Model 450 microplate reader를 사용하였다. 이상의 확립된 경합 ELISA측정계를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 생체내 MT가 유도된 은붕어 간의 균질액을 원심분리 (18,000 r.p.m, 1 hr)한 후 취한 상등액과 동 균질액을 100°C에서 3분간 열처리하여 원심분리 (14,000 r.p.m, 20 min)한 후 취한 상등액의 회석시료들에서의 MT level을 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

MT는 생체내에서 Cd, Hg, Zn, Cu 등의 중금속 대사와 무독화, 항산화제로서의 생체방어 등의 생물학적기능을 담당하고있는 세포가용성단백질이며 각종 금속에의해 체내합성이 유도되어지는 것으로 알려져있다. 더우기 근래 이들 금속에 의해서 뿐만 아니라 유기용매, 농약 등의 각종 화학적 stress에 의해서도 체내합성이 유도되어지는 것으로 보고됨에 따라 MT는 환경분야에 있어 독성학적 연구와 오염평가에의 응용이란 측면에서 중요한 연구대상으로 인식되고 있다.

본 실험에서는 Cd 1~8 mg/kg wt.의 용량을 10 일동안 은붕어에 복강내주사함으로써 MT의 체내합성이 유도되었다. 어류에 있어 MT의 체내유도에 따른 분리정제가 간을 대상으로 행해지는 이유는 실험에 이용할수 있는 장기의 양이 충분하고 이전의 많은 연구 결과가 다수의 어류종에 있어 kidney 및 gill과 같은 다른 장기에서의 Cd축적에 의한 단백질 결합pattern이 간에서 이루어지는 pattern과 동일함을 보여주고 있기 때문이다<sup>11)</sup>. 또한 어류에 있어서의 Cd의 체내축적은 Cd의 투여경로에 따라 그 장기별 분포를 달리하는 것으로 알려진 바 본 실험에서는 어류간장내 Cd축적을 촉진하여 간내에서의 MT유도를 가장 효율적으로 수행할 수 있을 것으로 기대되는 복강내 주사를 통해 Cd를 투여하였다. Thomas 등<sup>12)</sup>은 환경수를 통해 투여한 Cd 농도와 노출기간에 관계없이 rainbow trout에 있어 축적된 Cd의 99% 이상이 gill, kidney, liver에 축적되며 투여경로에 있어 i.p주사에 의해 간에서의 Cd축적이 고농도로 이루어짐을 보고하였다. 본 실험과 본 연구실에서의 다른 실험결과들

로부터 붕어는 카드뮴에 대해 매우 내성이 강한 어종을 알 수 있었다.

Cd투여에 의해 MT가 유도된 은붕어의 간을 균질화하고 원심분리하여 그 상등액을 sephadex G-75 column에서 gel filtration chromatography를 행한 결과는 Fig. 1과 같다. Cd의 peak는 1개로서 용출되었으며 이는 Norway 등<sup>11)</sup>의 다른 어종에 대한 실험결과에서의 용출 peak와 일치하였다.

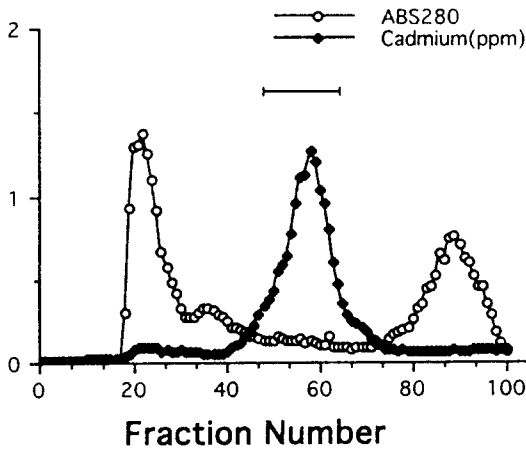


Fig. 1. Sephadex G-75 elution profile of the supernatant of liver homogenate from silver carp treated with cadmium (i.p). Sample was applied to column of Sephadex G-75 equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.6.

Gel filtration chromatography에서의 결과에 따라 MT분획을 pool하고 DEAE sepharose column에서 ion exchange chromatography를 행하여 10~300 mM Tris HCl buffuer에 의한 linear gradient로 용출한 결과는 Fig. 2와 같으며 역시 1개의 용출 peak가 얻어졌다. Mouse와 rat 등의 포유동물 간장에서 확인되고 있는 MT는 2가지 isoform들로 존재하며 각각 MT I과 MT II로 명명되어 있다<sup>18)</sup>. 이에 대해 어류의 경우는 rainbow trout에서 역시 2가지 isoform의 MT가 존재함이 보고되어 있으나 반면에 roach, stone roach, pike 등에 있어서는 1개의 MT form이 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험의 결과는 roach, stone roach, pike에서의 경우와 일치하며 은붕어의 간에 있어 MT

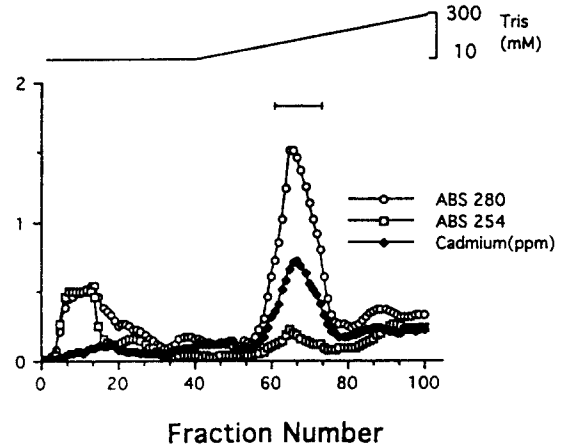


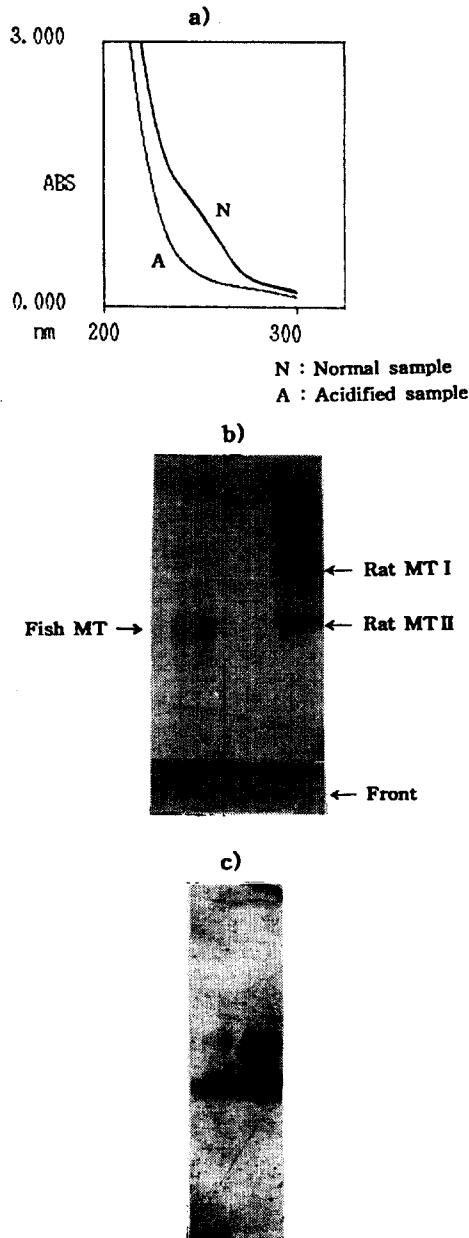
Fig. 2. Ion exchange chromatography of pooled fractions obtained after gel filtration on Sephadex G-75.

Aliquots of pools were applied to DEAE Sepharose column and a linear gradient of 10~300 mM Tris HCl (pH, 8.6) buffer was used for desorption.

Each fraction was diluted (x20) for the cadmium determination by A.A.

는 1개의 form이 존재하는 것으로 사료된다. 그러나 MT는 특성상 매우 산화에 약하기 때문에 비교적 소량의 MT가 산화에 의해 Cd의 포함능을 상실하고 polymerization을 결과할 수 있을 가능성으로부터 시료의 처리 및 보존, 분리과정에서의 조건등과 관련된 MT존재에 대한 재검토가 필요할 것으로 생각된다.

Ion exchange chromatography에 의해 얻은 MT분획을 native법에 의해 전기영동한 결과는 Fig. 3과 같으며 은붕어의 MT는 coumassie염색에 의해 rat MT II와 거의 동일한 위치에서 확인되었다. Rat등에 있어서 Cd를 포함하고 있는 MT는 250 nm 파장부근에서 특이한 흡수 pattern을 갖는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 분리정제한 은붕어 MT 적당농도의 용액에 대해 200~300 nm사이의 흡수 spectrum을 작성하고 이를 염산 산성의 동일 MT용액에 대한 spectrum과 대비 plotting한 결과 은붕어 MT에 있어서도 250 nm부근에 있어서의 특이흡수 pattern을 확인할 수 있었다. 또한 본 실험에서 ELISA 측정계의 확립을 위해 rabbit으로부터 생산된 은붕어 MT에 대한 polyclonal antibody를 사용하여 Wes-



**Fig. 3.** Identification of fish MT by a) spectrophotometry, b) Native gel electrophoresis and c) Western blot analysis. Silver carp MT in liver was separated and purified by gel filtration and ion exchange chromatography. Absorbance of fish MT was scanned in the range of 200~300 nm. Native gel electrophoresis was performed with 10% polyacrylamide gel and Western blotting on the PVDF membrane.

tern blot analysis를 행한 결과 전기영동 결과와 동일한 위치에서 protein fragment를 확인할 수 있었다. 이때 비교적 고농도의 분리정제한 은붕어 MT에 대해 실험한 경우 주 fragment 상단에 약한 반응성을 나타내는 fragment 부위를 확인할 수 있었는데 이는 역시 fish MT의 산화 및 polymerization에 기인하는 것으로 보여진다. 분리 정제한 은붕어의 MT분획을 동결건조한 후 rabbit으로부터 은붕어 MT에 대한 polyclonal항체를 얻기위해 25% glutaraldehyde를 사용, MT를 cross linking시켜 polymerization하고 complete, 또는 incomplete adjuvant와 함께 emulsion용액으로 제조한 후 rabbit 배부에 피하주사하여 초회면역 및 추가면역을 실시하였다. 추가면역 1주후 rabbit 경동맥으로부터 대량채혈을 실시하고 원심분리하여 상층의 혈청을 회수하였다. 회수한 rabbit혈청을 사용하여 fish MT의 고상화량과 항체 회석배수에 대한 최적조건을 설정한 후 이에 따라 경합 ELISA에 의한 fish MT측정계를 확립하였다 (Scheme 1).

Fish MT의 고상화용액은 80 ng/ml의 농도로 0.1 carbonate buffer (pH 9.6)에 용해하여 제조하였

- Coating
  - MT-solution, 100  $\mu$ l/well
  - 37°C, 2 hr
- (wash)
  - PBST, 200  $\mu$ l/well (2 times)
- Blocking
  - 0.5% gelatin, 200  $\mu$ l/well
  - 37°C, 1 hr
- (aspirating)
- Sampling
  - Sample solution, 50  $\mu$ l/well
  - Working solution of MT-specific antibody, 50  $\mu$ l/well
  - 37°C, 2 hr
- (wash)
  - PBST, 200  $\mu$ l/well (3 times)
- Enzyme reaction
  - ABTS solution, 100  $\mu$ l/well
  - 37°C, 15 min
- Plate reader (Absorbance at 415 nm)

**Scheme 1.** The competitive ELISA procedure for the detection of fish MT. See text for details.

으며 fish MT 특이항체는 rabbit 으로부터 회수한 혈청을 0.5% gelatin 용액으로 2,000배 희석하여 사용하였다. 또한 고상화 후 blocking은 0.05% tween 20 함유 20 mM potassium phosphate buffered saline (pH 7.6)으로 행하였고 효소표식 2차항체로는 POD 표식 goat 항 rabbit IgG 항체를 0.5% gelatin 용액으로 5,000배 희석하여 사용하였으며 발색시약으로서 2.5 mM ABTS (2,2'-Azinobis-3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid)-0.06% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-0.1 M citrate buffer (pH 4.0)을 사용하였다. 확립된 결합 ELISA 측정계를 사용하여 fish MT에 대한 검량선 작성을 행한 결과는 Fig. 4와 같으며 측정계의 최소 측정감도는 약 33 ng/ml이었다.

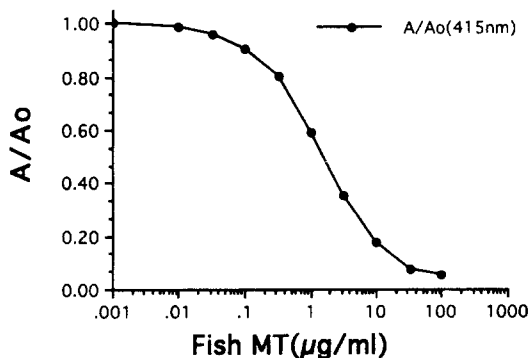


Fig. 4. The calibration curve of fish MT in the established competitive ELISA system.

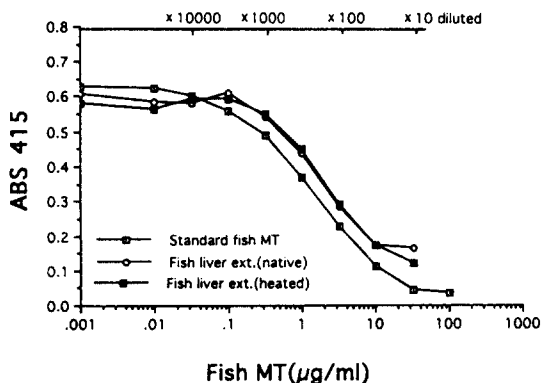


Fig. 5. Application of the competitive ELISA system to the supernatant (18,000 g, 1 hr) of liver homogenate prepared from Cd treated (i. p) silver carp.

이는 최소 측정감도가 예상보다 다소 떨어지는 것으로 rabbit 항 fish MT antibody가 polymerization MT에 대한 항체이어서 free form MT와의 반응이 약하기 때문인 것으로 생각되며 앞으로 이에 대한 많은 검토가 필요할 것이다. 또한 본 측정계를 Cd의 복강내 투여에 의해 MT생성이 유도된 은붕어 간의 균질액을 원심분리한 후 (18,000 r.p.m, 1 hr) 상등액을 취한 시료에 대해 적용해 본 결과 시료 희석 배수 33~3300배 범위에서 검량선과의 평행 상관성을 나타내었으며 동 균질액을 100°C에서 3분간 열처리하여 원심분리 (14,000 r.p.m, 20 min)한 후 취한 상등액의 경우에 있어서도 거의 동일한 결과를 나타내었다 (Fig. 5). 이는 포유동물 MT와 마찬가지로<sup>19)</sup> 어류 MT의 항원성이 단백질의 접힘도 (Folding degree) 등의 비연속적 특성보다 아미노산 배열순서에 의존됨을 보여주는 결과라 할 수 있으며 아울러 MT의 열에 강한 특성과 관련하여 볼 때 본 ELISA 측정계는 은붕어 MT의 특이적 검출을 위한 효율적 수단이 될 수 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 결합 ELISA법에 의한 어류 MT의 정량은 Cd를 비롯한 중금속에 의한 환경오염 평가 및 독성학적 연구에 실제적으로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

환경분야에 있어서 MT 관련 연구의 필요성과 중요성을 인식하고 어류 MT에 관한 특이적 고감도 정량법을 확립하여 실제 수질환경 평가 및 독성학적 연구에 활용하고자 하였다. 이에 따라 은붕어에 Cd 1~8 mg/kg body wt.를 10일 동안 복강내 주사하여 MT의 체내합성을 유도하고 간을 적출하여 MT를 분리정제 하였으며 그에 대해 rabbit antibody를 생산하고 결합법의 원리에 따라 ELISA 측정계를 확립하였다. 본 실험에서 은붕어는 Cd에 대해 강한 내성을 가지고 있음을 알 수 있었고 gel filtration chromatography와 ion exchange chromatography 결과 Spectrophotometry, Native 겔 전기영동 및 Western blot analysis에 의해 은붕어 MT를 확인할 수 있었으며 본 실험에서 확립된 ELISA 측정계에서 은붕어 MT에 관한 최소 측정감도는 약 33 ng/ml이었다. 또한 확립된 결합 ELISA 측정계를 Cd 투여에 의해 유도된 은붕어 간의 균질액을 원심분리한 후 취한 상등

액 및 동 균질액을 열처리하여 원심분리 한 후 취한 상등액에 대해 적용한 결과 거의 동일하게 일정 희석배수사이에서 검량선과 평행상관성을 나타내었다.

### 참 고 문 헌

- Hamer, D.H. Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 913-951(1986).
- Dunn, M.A., Blolock, T.L. and Cousins, R.J. Minireview (Metallothionein). Proceedings of the Society for *Exp. Biol. Med.* **185**, 107-119(1987).
- Bremner, I. Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *J. Nutrition* **117**, 19-29(1987).
- Chubatsu, L.S. and Meneghini, R. Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *J. Biochem.* **213**, 193-198(1992).
- Schwarz, M.A., et al. Cytoplasmic metallothionein overexpression protects NIH 3T3 cells from tert-butyl hydroperoxide toxicity. *J. Biolo. Chem.* **269**(21), 15238-15243(1994)
- Masters, B.A., et al. Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J. Neuroscience* **14**(10), 5844-5857(1994).
- Lohrer, H. and Robson, T. Overexpression of metallothionein in CHO cells and its effect on cell killing by ionizing radiation and alkylating agents. *Carcinogenesis* **10**(12), 2279-2284(1989).
- Itoh, N., Okamoto, H., Ohta, M., Hori, T., Min, K.S. and Tanaka, K. n-Hexane induced synthesis of hepatic metallothionein is mediated by IL-6 in mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **124**, 257-261(1994).
- Bauman, J.W., Madhu, C., McKim, J.M., Liu, Y. and Klassen, C.D. Induction of hepatic metallothionein by paraquat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **117**, 233-241(1992).
- Margoshes, M. and Vallee, B.L. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4813-4814(1957).
- Norey, C.G., Cryer, A. and Kay, J. Cadmium uptake and sequestration in the pike (*Esox Lucius*). *Comp. Biochem. Physiol.* **95C**(2), 217-221(1990).
- Thomas, D.G., Cryer, A., Solbe, J. and Kay, J. A comparison of the accumulation and protein binding of environmental cadmium in the gills, kidney and liver of rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* **76C**(2), 241-246(1983).
- Schlenk, D. and Brouwer, M. Induction of metallothionein mRNA in the blue crab (*Callinectes Sapidus*) after treatment with cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.* **104C**(2), 317-321(1993).
- Martinez, M., Torreblanca, A., Ramo, J., Pastor, A. and Diaz-Mayans, J. Cadmium induced metallothionein in hepatopancreas of *Procambarus Clarkii*: Quantification by a silver saturation method. *Comp. Biochem. Physiol.* **105C**(2), 263-267(1993).
- Eaton, D.L. and Toal, B.F. Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **66**, 134-142(1982).
- Scheuhammer, A.M. and Cherian, M.G. Quantification of metallothionein by a silver-saturation method. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **82**, 417-425(1986).
- Habeeb, A.F.S.A., and Hiramoto, R. Reaction of protein with glutaraldehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 16(1968).
- Sato, M. and Nagai, Y. Effect of zinc deficiency on the accumulation of metallothionein and cadmium in the rat liver and kidney. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **18**, 587-593(1989).
- Winge, D.R. and Garvey, J.S. Antigenicity of metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2472-2476(1983).