

[報 文]

## 어류 Metallothionein의 특성 및 수질오염 평가를 위한 생물모니터링에의 응용

황 갑 수

군산대학교 공과대학 환경공학과

### The Characteristics of Fish Metallothionein and Its Application to the Biomonitoring for the Evaluation of Water Pollution

Gap-Soo Hwang

*Dept. of Environmental Engineering, Kunsan National University*

#### ABSTRACT

This experiment was performed to examine the immuno-reactive characteristics of fish metal-binding protein, metallothionein (MT), and gain the practical understandings for the proposed use of fish MT as a biomarker. Liver MT induced by Cd in the silver carp was separated and purified by gel filtration chromatography and ion exchange chromatography. The immuno-reactivity of fish MT was examined with 3 rabbit antisera. Fish MT showed little reactivity with rabbit anti-rat MT antiserum and a weak reactivity with anti-MT peptide antiserum while showed a strong reactivity with rabbit anti-fish MT antiserum. The time-course change of liver MT in the silver carp, after waterborne exposure to 1 ppm of Cd, was checked by Cd-hem method and established competitive ELISA. In both cases, the induction of liver MT showed a good increasing relationship with the exposure days. The results indicate that the fish MT can be developed as a useful biomonitoring means in the toxicological study and for the evaluation of water pollution.

#### 서 론

Metallothionein (MT)은 세포 가용성 금속결합 단백질로서 생체내에서의 그 생물학적기능은 Zn, Cu와 같은 필수 미량금속의 대사조절과 중금속의 무독화(detoxification)에 관여하는 것으로 알려져 있으며 저분자량(M.W. 6,500-7,000), 높은 중금속 함유량(7-12 metal/molecular protein),

thiolate bond무리(clusters)들에 의한 금속의 결합, 높은 cystein함유량 및 방향족 아미노산의 부재 등과 같은 기본 특성을 갖고 있다.<sup>1-4)</sup>

또한 MT는 Cd, Hg, Cu, Zn, Co, Ag 및 Mn 등의 각종 금속의 투여 및 폭로에 의해 생체내 합성이 유도되어지는 것으로 알려져 있으며 최근까지 hexane, benzene, chloroform, carbon tetrachloride 및 ethanol 등의 유기용매, paraquat, diaquat 등의 농약, 다수의 alkylating agent, 저온

및 감염 등에 의한 MT의 체내 합성이 계속적으로 발견됨에 따라 MT는 환경분야에 있어 한층 그 중요성을 더해가고 있다.<sup>5)-7)</sup>

지표생물을 이용하여 오염을 평가하고 환경을 감시하는 생물 monitoring 기법은 오염의 상황을 실제적으로 반영할 수 있고 최신 생물학적 기법을 활용할 수 있음으로서 근래 중요한 오염평가의 수단으로서 인식되고 있는데 이와 관련하여 각종 중금속을 포함한 외부 화학물질들에 대한 생체응답물질로서의 MT의 중요성을 인식하고 MT를 생물모니터링 등의 실제 환경평가에 응용할 수 있는 지표물질로서 개발하고자 그간 많은 연구노력이 이루어져 왔다. 구체적으로 rainbow trout, pike, bluegill sunfish 와 같은 수 중의 어류와 mussel, crab 등에 있어 중금속 폭로에 의한 MT樣 protein의 유도현상이 확인되고 나아가 이를 실제 오염평가의 생체지표물질 (biomarker)로서 활용하는데 있어 제기될 수 있는 문제점들에 의한 다각적인 검토가 진행되어 왔으며 그밖에 양서류, 수중 미생물 등을 대상으로 한 관련연구들이 보고되어 왔다.<sup>8)-12)</sup>

그러나 이와 같은 지속적인 연구노력에도 불구하고 MT를 실제 오염평가를 위한 유용한 지표수단으로서 활용하기에는 아직 더 많은 연구, 검토가 요구되어지고 있는데 그 대표적 내용으로서 어종 및 장기에 따른 basal protein량의 규명, 어류에 있어 각종 stress에 따른 체내 MT생성량의 변화, 오염 상황에 따른 분별력을 제공할 수 있는 고감도 정량법의 개발 등을 들 수 있다.

따라서 본 연구에서는 환경분야에 있어 상기와 같은 MT연구의 필요성에 따라 담수어인 은붕어의 MT에 대해 그 반응특성을 규명하여 다양한 MT관련 연구에의 기여를 도모하고자하며 Cd-hem법, 효소 면역측정법 (ELISA) 등의 MT정량법을 이용하여 MT를 지표물질로서 수질오염평가에 응용하기 위한 실제적 유용성에 대해 검토하고자 한다.

## 실험방법

### 1. 실험동물

잉어과에 속하는 은붕어 (*Carassius Auratus*)를 구입하여 실험실 수조에서 1주일 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

### 2. MT의 분리, 정제 및 Spectrophotometry

Fish에 있어 MT의 유도를 위해 CdCl<sub>2</sub>로서 Cd 1~8 mg/kg. body wt.의 용량을 순차적으로 증가시키며 10일동안 4회에 걸쳐 복강주사를 실시하였다. 카드뮴투여 24시간후 fish를 처치하고 간 (liver)을 채취하여 등배의 0.25 M sucrose용액을 가해 homogenization을 행하고 18,000 rpm에서 60분 동안 원심분리하여 상등액을 취한 후 sephadex G-75 column상에서 gel filtration chromatography를 행하였다. Column은 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)로 용출하였으며 각 분획에 대해 280 nm 흡광도 및 Cd에 대한 원자흡수흡광도를 구하였다. Gel filtration chromatography의 용출결과로부터 MT분획시료를 pool하고 DEAE sepharose column에서 ion exchange chromatography를 행하여 10 mM ~ 300 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)의 linear gradient로 용출하고 해당 MT분획들을 pool한 후 투석을 통해 탈염을 행하였다. 탈염후 시료를 동결건조 시키고 -30°C 이하에서 냉동보관하였다. 분리 정제한 은붕어 MT를 증류수에 적당농도로 용해시켜 spectrophotometry에 의해 200~300 nm의 파장범위에서 흡수 spectrum을 작성하고 동일 MT용액을 염산산성 (pH 1~2)으로 하여 작성한 흡수 spectrum과 대비시켜 plotting하였으며 MT용액의 조제는 220 nm에서의 몰흡광계수 48,200를 사용하여 필요에 따라 적당농도로 조제하여 사용하였다.

### 3. MT 면역반응 특이성의 검증

#### 1) Rabbit 항 MT antibody의 생산

분리 정제한 fish MT를 rabbit에 면역주사하여 polyclonal antibody를 얻었으며 그 과정은 fish MT의 polymerization, 초회면역, 추가면역, 항 fish MT antiserum채취의 순서에 따라 수행하였다. MT의 polymerization은 Habeeb의 방법에 따라<sup>13)</sup> 동결건조한 fish MT시료 적당량을 0.1 M acetate buffer (pH 6.2)에 용해하고 25% glutaraldehyde를 가하여 반응시킨 후 0.05 M borate buffer saline에 대해 투석을 행하였다. 면역주사용액은 투석을 행한 시료와 complete freund adjuvant를 2개의 주사기 및 연결관을 사용하여 1:1 혼합, emulsion용액으로 제조하며 이를 rabbit의

배부에 적당량씩 10개소 이상 피하주사를 실시하였다. 추가면역을 위한 주사용액의 제조에는 incomplete freund adjuvant를 사용하며 주사용액의 제조와 투여 방법은 초회면역시와 동일하다. 추가면역 1주후 rabbit를 처치하여 정동맥으로부터 대량채혈을 실시하고 37°C에서 1시간, 4°C에서 하루밤 정지한 후 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층의 혈청을 회수하였다. 이와 함께 본 연구실에서 제작한 rat MT 및 MT N-말단 peptide 항원에 대해 상기와 유사한 방법으로<sup>14)</sup> rabbit 항 rat MT antibody 및 rabbit 항 peptide antibody를 각각 제작하였다.

## 2) 반응 특이성의 검증

검정을 위한 시료로서는 분리, 정제한 fish MT 및 rat MT 2, 시판 rabbit MT 1 (Sigma Co.)을 사용하였으며 이들을 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6)에 각각 일정 농도로 용해하여 고상화시료로서 사용하였다. 고상화 시료를 96 well Nunc immunoplate에 가하고 37°C에서 2시간 incubation시킨 후 0.5% gelatin용액을 가하여 37°C에서 1시간 blocking한 후 흡입세정한다. 여기에 상기에서 제작한 rabbit 항MT antibody들을 제 1차 항체로서 가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 세정하고 이어서 POD표식 2차 항체를 일정량 가한 후 POD기질인 2, 2'-azinobis (3-ethyl benzothiazolinesulfonic acid) (ABTS)의 첨가에 의해 일어나는 발색반응을 415 nm파장에서 흡광도를 측정하였다. 이때 POD 표식 2차 항체로서는 POD표식 goat 항 rabbit IgG 항체를 사용하며 흡광도측정은 Bio-Rad사의 Model 450 microplate reader를 사용하였다.

## 4. Fish MT에 대한 효소면역측정법 (ELISA)

분리 정제한 fish MT를 rabbit에 면역주사하여 얻은 polyclonal antibody와 분리정제한 fish MT와의 사이에서 MT의 고상화량과 항체의 사용희석 배수에 대한 최적조건을 설정하여 경합 ELISA에 의한 측정계를 확립하고<sup>15)</sup> 검량선 작성을 행하였다. 확립된 경합 ELISA계의 세부 내용은 Scheme 1과 같다.

## 5. 카드뮴에 의한 어류 liver MT의 생성

은붕어를 군당 3~5마리로 하여 1 ppm의 Cd에 노출시킨 후 2일, 4일, 6일 후 처치하고 간을 채취하여 Cd-hem method와 경합 ELISA계에 의해 MT를 측정함으로써 카드뮴 폭로에 의한 MT생성의 경시적 변화를 관찰하였다. Cd-hem method에 의한 MT의 측정은 채취한 은붕어 간에 4배량의 0.25 M sucrose용액을 가해 homogenization을 행하고 Onosaka 등의 방법<sup>16)</sup>에 따라 처리한 후 atomic absorption spectrophotometer (Shimadzu-660)를 사용하여 Cd를 정량하였다. 또한 경합 ELISA계에 의한 MT의 측정은 채취한 은붕어 간에 등배의 0.25 M sucrose와 0.1 M Tris-HCl 혼합용액을 가해 homogenization을 행하고 14,000 rpm에서 70분간 원심분리를 행한 후 상등액을 취해 상기의 정립된 실험계에 따라 측정을 행하였다.

## 결과 및 고찰

금속 결합단백질인 MT는 Cd를 비롯한 다수의 중금속들에 의해 그 생체내 합성이 유도되어지며 이러한 특성으로 인해 특히 수질오염평가에 있어 중금속 오염에 대한 유용한 생물학적 지표물질로서 응용될 수 있을 것으로 기대되어 왔다. 그러나 그간의 많은 연구노력에도 불구하고 MT가 수계 오염평가를 위한 생물학적 지표물질로서 확고하게 정립되기 위해서는 아직도 개별 수중생물들에 대한 더 많은 직접적인 관련연구들이 요구되어지는 바 본 연구에서는 담수어인 은붕어를 실험종으로 하여 은붕어 MT의 반응특성을 검증하고 나아가 은붕어 MT를 중금속 오염평가의 유용한 생체지표물질로서 활용할 수 있는지에 대한 실제적인 이해를 도모하고자 하였다.

본 실험에서는 어류간장내 Cd축적을 촉진하여 간내에서의 MT유도를 가장 효율적으로 수행할 수 있을 것으로 기대되는 복강내 주사를 통해 Cd 1-8 mg/kg wt.의 용량을 10일동안 은붕어에 투여함으로써 MT의 체내합성이 유도되었다. 그간의 연구보고들에 의하면<sup>17-18)</sup> rainbow trout는 환경내 Cd의 존재에 매우 민감한 반면 pike, stone roach 등은 Cd에 대한 내성이 매우 강한 것으로 알려져 있는데 본 실험을 통해 은붕어는 Cd에 대한 내성이 매우 강한 어종을 확인할 수 있었다.

Cd투여에 의해 MT가 유도되어진 은붕어의 간을

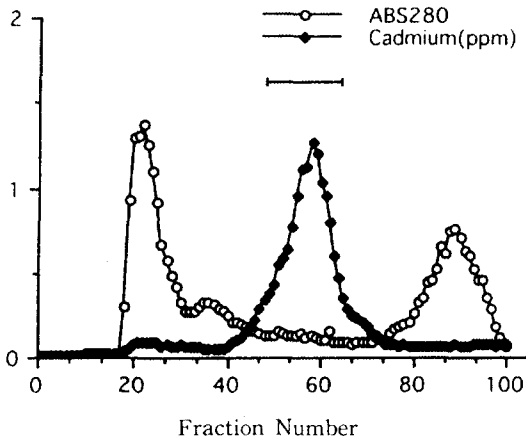


Fig. 1. Sephadex G-75 elution profile of the supernatant of liver homogenate from silver carp treated with cadmium (i.p.). Sample was applied to column of Sephadex G-75 equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.6.

균질화하고 원심분리하여 그 상등액을 sephadex G-75 column에서 gel filtration chromatography를 행한 결과는 Fig. 1과 같다. 이 때 Cd의 peak는 1개로서 용출되었으며 이는 Norway 등<sup>18)</sup>의 다른 어종에 대한 실험결과에서의 용출 pattern과 일치하였다.

Gel filtration chromatography에서의 결과에 따라 MT분획을 pool하고 DEAE sepharose column에서 ion exchange chromatography를 행하여 10~300 mM Tris HCl buffuer에 의한 linear gradient로 용출한 결과 역시 1개의 용출 peak가 얻어졌으며 해당 분획들을 pool하여 동결건조후 이하의 실험에 사용하였다. 어류 MT의 분리, 정제에 관한 그간의 연구보고들에 의하면 rainbow trout에 있어서는 2가지 isoform의 MT가 존재하는 반면 roach, stone roach, pike 등에 있어서는 1개의 MT form이 존재하는 것으로 알려져 있어 본 실험의 분리, 정제결과는 후자의 경우와 일치하나 본 연구실에서 최근 Econo High Q column (Biorad Co.)을 사용하여 ion exchange chromatography를 행한 결과 은붕어 MT에 대한 2개의 분리 peak를 발견할 수 있었기 때문에 은붕어 MT의 isoform에 대해서는 앞으로 세밀한 검토가 필요할 것으로 사료된다.

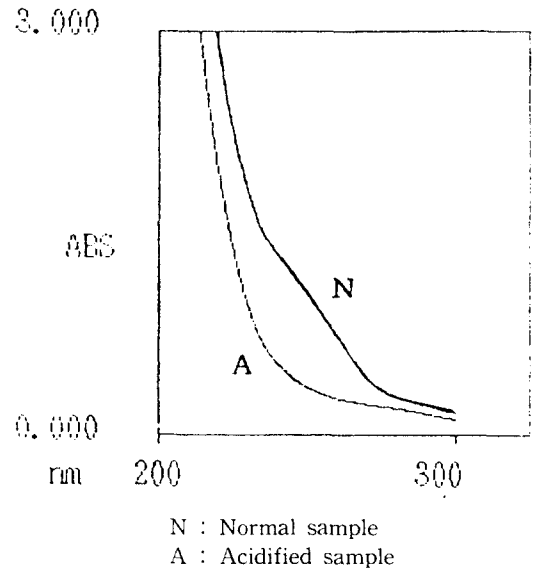


Fig. 2. Identification of fish MT by spectrophotometry. Silver carp MT in liver was separated and purified by gel filtration and ion exchange chromatography. Absorbance of fish MT was scanned in the 200~300 nm.

Rat 등에 있어서 Cd를 보지하고 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 Fig. 2에서와 같이 은붕어 MT에 있어서도 250 nm 부근에 있어서의 특이흡수 pattern을 확인할 수 있었다.

Fish MT의 면역반응 특이성을 검정하기 위하여 해당 항원을 제작하고 rabbit에 면역주사를 실시하여 항fish MT antibody, 항rat MT antibody 및 항 peptide antibody를 각각 제작하였다. 제작한 rabbit antibody들을 1차 항체로 사용하여 fish MT의 반응특이성을 검정하였으며 이때 반응특이성의 비교를 위해 rat MT 2와 Rabbit MT 1의 반응특이성도 함께 검정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 fish MT는 항fish 혈청과의 면역반응에 있어 5 ng/ml의 고상화 용량에서는 대조 고상화 용량의 경우와 비슷한 반응수준을 나타내었으나 50 ng/ml, 500 ng/ml의 고상화 용량에 있어서는 반응성이 용

량의존적으로 현저히 증가함을 보였으며 반면에 rat MT 2와 rabbit MT 1은 실험에 적용한 모든 고상화 용량에 있어 항fish MT혈청과의 반응성이 매우 미약함을 나타내었다. Fish MT의 항rat MT혈청과의 반응성은 실험에 적용한 모든 고상화 용량에 있어 극히 미약함을 보여 주었으며 이에 대해 rat MT 2는 모든 고상화 용량에 있어 가장 높은 반응성을 나타내었고 rabbit MT 1은 500 ng/ml의 고상화 용량에서 높은 반응성을 나타내었다 (Fig. 4). 또한 Fig. 5에서 fish MT는 항MT-peptide혈청과의 면역반응에 있어 저고상화 용량에 있어서는 약한 반응성을 나타내었으나 500 ng/ml의 고상화 용량에 있어서는 증가된 반응성을 나타내었으며 이에 대해 rat MT 2와 rabbit MT 1은 항MT-peptide혈청과 높은 반응성을 가지고 있음을 보여 주었다. 이상의 반응 특이성에 관한 실험결과를 종합할 때 fish MT는 항rat MT antibody와 항MT-peptide antibody에 대해 반응성이 거의 없거나 미약함을 알 수 있으며 이러한 반응성의 차이는 결국 fish MT와 rat 및 rabbit와 같은 포유류 MT와의 단백질 구조 차이에 기인된다고 할 수 있을 것이다.

이에 관해서는 현재까지 MT의 항원성이 단백질의 2차 및 3차구조에 의존되지 않고 아미노산 배열 순서에 의존하는 것으로 알려져 있는 바<sup>19)</sup> 앞으로 은붕어 MT에 관한 아미노산 분석을 통해 포유류 MT와의 반응특이성 차이를 규명함이 필요할 것이며 이에 비추어 실험결과로부터 같은 포유류인 rat MT 2와 rabbit MT 1사이에는 그들의 아미노산 배열 순서에 상당한 유사성이 있을 것으로 판단된

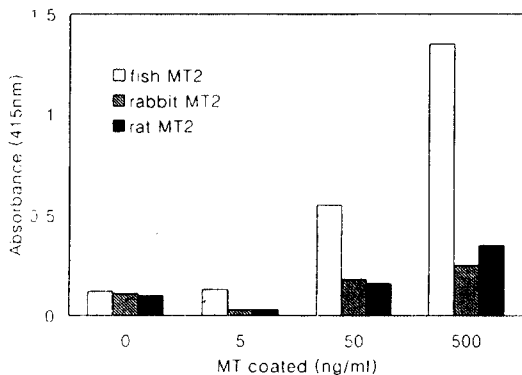


Fig. 3. Reactivity of anti-fish MT antiserum with MTs from several species.

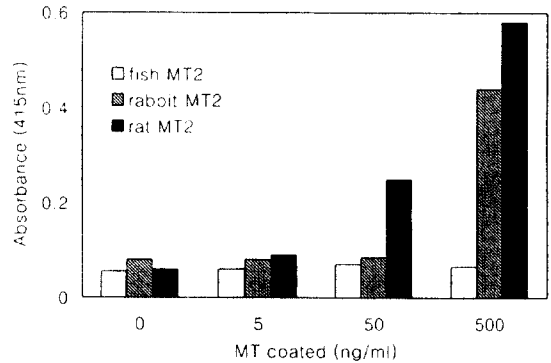


Fig. 4. Reactivity of anti-rat MT antiserum with MTs from several species.

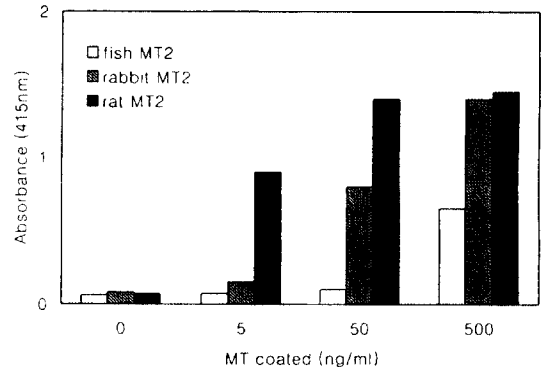
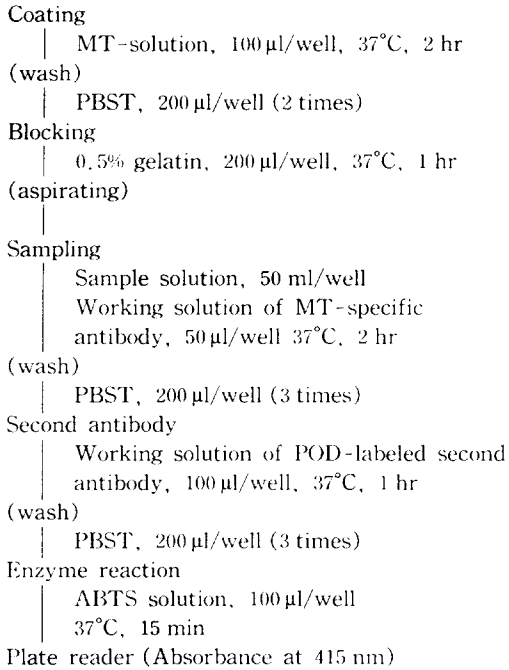


Fig. 5. Reactivity of anti-MT peptide antiserum with MTs from several species.

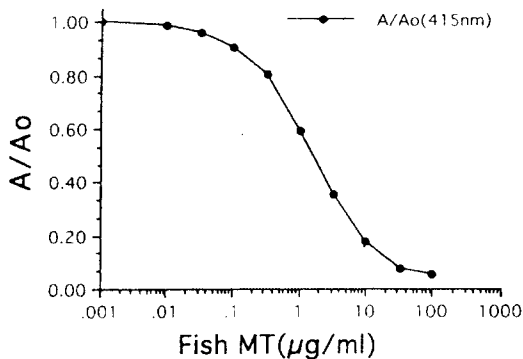
다.

상기에서 제작한 은붕어 MT에 대한 rabbit혈청을 사용하여 fish MT의 고상화량과 항체 희석배수에 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 제조하였으며 fish MT특이항체는 rabbit로부터 회수한 혈청을 0.5% gelatin용액으로 2,000배 희석하여 사용하였다. 또한 고상화 후 blocking은 0.05% tween 20함유 20mM potassium phosphate buffered saline (pH 7.6)으로 행하였고 효소표식 2차 항체로는 POD표식 goat 항 rabbit IgG항체를 0.5% gelatin용액으로 5,000배 희석하여 사용하였



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

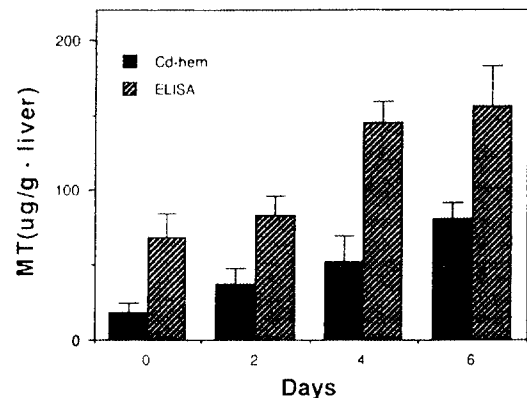


**Fig. 6.** The calibration curve of fish MT in the established competitive ELISA system.

으며 발색시약으로서는 2, 2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid)-0.06% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-0.1M citrate buffer (pH 4.0)을 사용하였다. 확립된 결합 ELISA 측정계를 사용하여 fish MT에 대한 검량선작성을 행한 결과는 Fig. 6과 같으며 측정계의 최소측정감도는 약 33 ng/ml이

었다. 이는 최소측정감도가 예상보다 다소 떨어지는 것으로 rabbit 향fish MT antibody가 polymerization MT에 대한 항체이어서 free form MT와의 반응이 약하기 때문인것으로 생각되며 앞으로 이에 대한 많은 검토가 필요할 것이다.

은붕어를 Cd 1 ppm의 환경수에 폭로시킨 후 Cd-hem method와 상기에서 정립된 결합 ELISA 계에 의해 간장의 MT농도를 측정하여 카드뮴 폭로에 의한 MT생성의 경시적 변화를 관찰함으로써 수질오염평가에 있어 fish MT의 생물학적 지표로서의 실제적 유용성에 대해 검토하고자 하였다. 실험 결과 Fig. 7에서와 같이 liver MT는 Cd-hem method나 ELISA 측정계에 의한 측정결과 모두에서 폭로기간의 증가에 따라 유의한 증가 또는 증가의 경향을 나타내었다. 이때 ELISA 측정계에 의한 측정치가 Cd-hem method에 의한 측정치에 비해 전체적으로 높은 수치를 보였으며 이는 Cd-hem method에 의한 MT측정 조작에서 MT에 결합하고 있는 Cu 등이 더 높은 MT와의 친화성으로 인해 Cd에 의해 치환되기 어려운데 기인하는 것으로 생각된다. 또한 은붕어에 있어서 수조내 Cd폭로에 의한 liver MT의 생성수준은 American red crayfish에 비해<sup>20)</sup> 전반적으로 낮은 수준을 나타내었으며 이에 대해서는 실험어종 및 정량법의 차이 등과 관련하여 자세한 검토가 필요할 것으로 사료된다. 이상의 Cd폭로에 따른 MT생성의 경시적 변화는 어류 MT가 중금속에 의한 수질오염평가에 있어 유용한 생물학적 지표로 사용될 수 있는 실제적 가능성을



**Fig. 7.** The time-course change of liver MT induction in the silver carp exposed to 1 ppm of waterborne Cd.

뒷받침하는 결과로 볼 수 있는 바 이에 대해서는 앞으로 Cd폭로농도에 따른 장기별 MT생성의 변화 등에 대한 연구결과 등과 함께 더욱 구체적인 검토가 이루어져야 할 것이다.

## 결 론

환경분야에 있어서 MT관련연구의 필요성과 중요성을 인식하고 어류 MT에 관한 반응특성과 어류 MT의 실제 수질환경 평가를 위한 실제적 유용성에 대해 검토하고자 하였다. 본 실험에서 은붕어는 Cd에 대해 내성이 강한 어종을 알 수 있었고 제작한 rabbit 혈청을 사용하여 면역반응 특이성에 대한 검정을 수행한 결과로부터 은붕어 MT는 rat MT, rabbit MT 등의 단백질과 아미노산 배열 등의 구조적 상이성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

또한 은붕어를 Cd 1 ppm의 환경수에 폭로시킨 후 liver MT 생성의 경시적 변화를 관찰한 결과 폭로기간의 증가에 따른 liver MT 생성의 증가를 관찰할 수 있었으며 앞으로의 더 많은 연구노력들과 함께 어류 MT가 수질오염평가에 있어 중금속오염에 대한 유용한 생물학적 지표로 개발될 수 있음을 확인하였다.

## 감사의 글

이 논문은 1996년도 한국 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Hamer, D.H., Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 913-951(1986).
- 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).
- Bremner, I., Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *J. Nutrition* **117**, 19-29(1987).
- Dunn, M.A., Blolock, T.L. and Cousins, R.J., Minireview (Metallothionein). *Proceedings of the Society for Exp. Biol. Med.* **185**, 107-119 (1987).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- Benson, W.H., Baer, K.N. and Watson, C.F., Metallothionein as a biomarker of environmental metal contamination. *Environmental Biomarkers*, Academic Press, 255-265 (1992).
- Cope, W.G., Wiener, J.G. and Atchison, G.J., Hepatic cadmium, metal-binding proteins and bioaccumulation in bluegills exposed to aqueous cadmium. *Environ. Contam. Chem.* **13**(4), 553-562 (1994).
- Bebiano, M.J. and Langston, W.J., Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus Galloprovincialis*. *Biochem. Physiol.* **103C**(1), 79-85 (1992).
- 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).
- Habeeb, A.F.S.A. and Hiramoto, R., Reaction of protein with glutaraldehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 16 (1968).
- Mallie, R.J.V. and Garvey, J.S., Production and study of antibody produced against rat cadmium thionein. *Immunology* **15**, 857-868 (1978).
- 角野富三郎 외, 분자세포 생물학 기초시험법. 南江堂 380-399 (1996).
- Onosaka, S. and Cherian, G., The induced

- synthesis of metallothionein in various tissues of rat in response to metals. I. Effect of repeated injection of cadmium salts. *Toxicology*, **22**, 91-101 (1981).
17. Kille, P., Kay, J. and Sweeney G.E., Analysis of regulatory elements flanking metallothionein genes in Cd-tolerant fish (pike and stone loach). *Biochimica. et Biophysica Acta* **1216**, 55-64 (1993).
  18. 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).
  19. Winge, D.R. and Garvey, J.S. Antigenicity of metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2472-2476 (1983).
  20. 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).