

카드뮴 유도 잉어 혈액으로부터의 Metallothionein 정제 및 이에 대한 다클론 항체 생산

유형석 · 강호준 · 김슬기 · 김남수¹ · 김우연*
중앙대학교 생명공학과, ¹한국식품연구원

Purification of Carp Serum Metallothionein Induced in Carp with Cadmium and Production of Polyclonal Antibody

Hyung-Seok Ryu, Ho-Joon Kang, Seul Ki Kim, Namsoo Kim¹ and Woo-Yeon Kim*

Department of Biotechnology, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

¹Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

Abstract

Metallothioneins (MTs) are low molecular weight, cysteine-rich, and heavy metal binding proteins, which could be induced with heavy metals such as Cd, Hg, Zn and Cu in liver, kidney, and in cultured cells. By using ion exchange chromatography on DE-52, MT was purified from the serum of carp induced with cadmium in order to produce antibody against MT. Polyclonal antibody produced against purified carp MT reacted well with MT in the serum of carp induced with cadmium, whereas control serum did not. This may indicate that the polyclonal antibody against the carp MT could be used for the preparation of biosensors to detect MT in fishes like carp.

Key words: carp metallothionein, purification, antibody, reactivity

Metallothionein(MT)은 Margoshes와 Vallee(1957)에 의해 말 신장 외피에서 카드뮴 함유 단백질로서 처음으로 존재가 확인되었다. MT는 저분자량(6-14 kDa)의 세포 가용성 단백질로, cysteine이 풍부하고(33%) 여러 cysteine이 금속 이온 결합에 관여하며(Dunn et al., 1987), 아미노산 서열 중 광범위한 유사성을 가진 중금속 결합단백질이다(Wu et al., 1999). MT는 간, 신장, 그리고 배양되어진 세포에서 카드뮴, 구리, 수은 및 아연과 같은 금속에 의해 생체 내 합성이 유도되어지며, 척추동물, 수중 무척추동물(Roesijadi, 1992), 특정 박테리아(Olafson et al., 1988), 그리고 효모(Hamer et al., 1985) 등에 존재한다. MT는 간과 신장, 췌장 그리고 동물의 장에 많이 존재하는 것으로 알려져 있으며 중금속에 접촉된 세포에서 중금속 농도에 비례하여 생성되며(Wu et al. 1999), 구리와 아연의 대사에 관여하는 것으로 알려졌다(Cousins, 1985). 또 MT는 구리와 아연, 카드뮴, 수은과 같은 오염물질 금속과 특이한 결

합력 및 친화성을 가지고 있어 이들 중금속의 대사와 무독화에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려졌다(Kägi & Kojima, 1987).

이들 금속 중 카드뮴은 다양한 조직과 동물들에 중독을 일으키는 원인이 된다(Järup, 2003; Yadav & Khandelwal, 2005). 이것은 글리코젠, 지질, 그리고 아미노산과 같은 세포질 고분자의 polythiol 그룹과 반응할 수 있다. 조직 내에 축적되어진 카드뮴은 효소 carboxypeptidase와 MT에 존재하는 필수적인 요소인 아연을 대신하게 된다(Price & Morel, 1995; Jensen et al., 1996). MT의 존재가 확인된 이래 MT에 관한 많은 연구결과가 보고되어 왔으나 이것은 주로 rat과 mouse 등 실험동물을 사용한 결과들로 수생 생물을 대상으로 한 보고들은 이들에 비하면 미미한 실정이라 할 수 있다. 수중물고기의 조직 내에 축적된 중금속의 독성과 이러한 독성이 생리학적인 기전에 미치는 영향에 관한 연구는 일부 되어 있으며(Mance, 1987), 낮은 농도의 중금속은 물고기를 죽이지는 않지만 그것의 크기와 무게를 감소시키는 장기간의 stress를 유도한다(Vosyliene & Jankaite, 2006). 그리고 MT는 화학적, 분자적, 세포생리학적, 그리고 독성학적 특성이 수중환경의 중금속 오염에 대하여 특이적이면서 잠재적이기 때문에 biomaker로서의 연구가 시작되고 있다(Sampath-Kuniar et al., 1996; Yeoh et

Corresponding author: Woo-Yeon Kim, Department of Biotechnology College of Industrial Sciences, Chung-Ang University Anseong, Gyunggido, 456-756, Republic of Korea
Tel: +82-31-675-3063; Fax: +82-31-675-0405
E-mail: wykim@cau.ac.kr
Received October 13, 2009; revised November 16, 2009; accepted November 16, 2009

al., 1996; Brower et al., 1995; George et al., 1996). 또한 물고기들은 중금속을 생체 내에 축적시키는 경향을 가지고 있으므로, 먹이사슬의 오염을 통해 인간은 중금속에 대한 위험에 노출될 수 있다. 생체 내 중요기관 중 하나인 간은 이물질의 생체전환, 비타민과 지질의 이동, 글리코겐의 저장, 글루코오스의 방출 등을 포함한 생명기능을 수행한다. 하지만, 중금속 축적에 의해 세포의 기능 및 구조의 특성이 붕괴되어 간 조직이 파괴될 수도 있어 생물체의 생리적 기능에 악영향을 미칠 수 있으므로 MT의 신속하고 정확한 검출은 매우 필요하다. 현재 생체 내 MT의 정량에는 Cd-hem법, Ag-saturation법 및 방사성 동위원소 측정법 등 (Eaton & Toal, 1982; Scheuhammer & Cherian, 1986)이 일반적으로 이용되고 있는데, 이들 중 Cd-hem법과 Ag-saturation법은 여러 번의 열처리, 세정 및 분리과정을 포함하고 있어 처리조작이 번잡하고 오염물질의 생체에 대한 영향을 고감도로 분별 평가 하기에는 어려움이 있다고 할 수 있으며, 방사성 동위원소 측정법은 안전관리에 대한 위험성을 내포하고 있다. 따라서 정확도가 높고 보다 간편한 MT 정량법 개발이 요청되고 있다. 간이하고 신속하면서도 정확한 MT 정량을 위해서는 MT 단백질과 이에 대한 항체가 필요하다. 특히 오염 가능 지역에서 키울 가능성이 있는 잉어와 같은 어류로부터의 중금속 유도 MT와 이에 대한 항체를 가지는 것이 필수적이다.

본 연구에서는 국내에서 유통되는 잉어에 카드뎀을 처리하여 유도된 MT를 혈청에서 정제한 후 MT biomarker에 대한 다클론 항체를 만들어, 향후 바이오센서 소자로 사용하기 위하여 이의 반응성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

Protease inhibitor cocktail, anti-rabbit IgG-Ap, goat anti-rabbit IgG, NBT, BCIP는 Sigma(USA)에서 구입하였다. DE-52는 Whatman (England)에서 그리고 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane은 PALL Corporation(USA)에서 구입하였으며, 기타 시약은 분석용 시약을 사용하였다.

MT 유도

Moon et al.(2006) 방법에 따라서 잉어를 배양하였다. 수돗물 중의 염소를 제거하기 위하여 미리 물을 받은 후 1~2 일 정도 지난 후에 양어조에 물을 옮겼고 용존 산소를 유지시켜주기 위해서 공기펌프를 설치하였으며, 수온을 일정하게 유지시켜 주기 위해 기온을 20°C로 맞추었다. 물은 식염수에 녹인 CdCl₂을 주사할 때마다 교체하여 주었다. 시장에서 구입한 건강한 잉어(600-800 g)를 양어조에서 1주일 정도 적응시킨 후 첫날에 잉어 1 kg 당 0.9% 식염

수에 녹인 2 mg의 CdCl₂, 셋째 날에 3 mg의 CdCl₂, 다섯째 날에 12.5 mg의 CdCl₂를 주사하였다. 7일 후에 잉어를 10 분간 마취하고 잉어의 옆줄을 따라 비스듬히 주사기를 찢어 넣어 대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액을 채취하자마자 protease inhibitor cocktail을 5% 되도록 첨가하고 상온에서 30분 정치하여 적혈구가 응고되도록 기다린 후, 3,000 rpm에서 30분 동안 원심분리를 하여 상등액(혈청)을 얻었다. 혈청을 300배 희석한 뒤 15% acrylamide gel을 사용하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하였다(Laemmle, 1970).

잉어 혈청 MT 정제

MT가 유도된 잉어의 혈청을 30 mL DEAE-cellulose(DE-52)를 사용하여 4°C에서 정제하였다. 완충액 A(5%의 protease inhibitor cocktail를 포함한 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0)를 40 mL 흘려준 30 mL의 DE-52 칼럼에 10배 희석된 잉어 혈청 5 ml를 1.5 mL/min의 유속으로 흘려주었다. 완충액 A 30 mL를 더 흘려주어 씻어준 후, NaCl gradient로 완충액 A와 완충액 B (0.5 M NaCl이 포함된 완충액 A)를 40 ml씩 흘려주어 MT를 정제하였다. 정제한 시료는 15% acrylamide gel을 사용하여 SDS-PAGE를 실시하여 확인하였다.

MT 항체 제작

정제한 MT를 항원으로 사용하여 항체를 제작하였다. 정제한 MT를 전기영동 한 후, 염색 용액(0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol, 10% glacial acetic acid)에서 30분간 염색하였다. 이어서 탈색 용액 (10% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 1시간 정도 탈색시킨 후 탈색 용액을 바꾸어 하룻밤 정치하였다. 탈색시킨 gel에서 MT band를 잘라 액화질소에서 얼리고 과쇄한 후 동결 건조한 항원을 600 µL의 PBS buffer (100 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 100 mM Na₂HPO₄)에 녹였다. 다음 과정의 항체 제작은 AB 프린티어(서울, 한국)에 의뢰하였다. PBS에 녹인 항원에 600 µL의 Freund's complete adjuvant를 섞어 점성이 강한 현탁액이 생길 때까지 혼합한 후, 3 mL 주사기에 옮겨 21 gauge의 바늘을 이용, 토끼의 등 부위 피하 2-3곳에 나누어 주사하였다. 2주 뒤에 항원을 Freund's incomplete adjuvant에 녹인 후 2차 주사를 놓았고, 다시 일주일 뒤에 동일한 방법으로 3차 주사를 놓은 후, 일주일 뒤에 토끼의 정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 상온에서 1시간 동안 정치한 후, 3,000 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 상등액(혈청)을 새 tube로 옮기고 4°C에서 하룻밤 정치한 후, 혈청 이외의 찌꺼기를 제거하였다. 이렇게 하여 얻어진 혈청에 0.02% NaN₃를 넣어 -70°C에서 보관하였다.

항체 확인을 위한 ELISA

Coating buffer(0.068 M NaH_2CO_3 , 0.032 M Na_2HCO_3)에 정제한 MT(Fig. 2의 fraction E6)을 $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되게 넣은 후, 96 well microplate의 각 well에 $100\ \mu\text{L}$ 씩 가하고, sealing하여 하룻밤 정치하였다. 항체를 PBS-T buffer (150 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.05% Tween 20)에 1/1,000에서부터 1/100,000까지 희석시켰다. Plate를 4°C 에서 꺼내어 coating buffer를 제거하고 well 당 $150\ \mu\text{L}$ 의 wash buffer(PBS-T)로 3회에 걸쳐 세척 한 후, 희석시킨 항체를 세로열 기준으로 각 $100\ \mu\text{L}$ 씩 넣고, sealing하여 실온에서 1시간 동안 정치하였다. 그리고 $150\ \mu\text{L}$ wash buffer로 3회에 걸쳐서 세척하였다. 2차 항체 (horseradish peroxidase-conjugated goat Ab against rabbit IgG)를 1/5,000까지 희석하여 각 well 당 $100\ \mu\text{L}$ 씩 가하고, sealing하여 실온에서 1시간 동안 정치한 후 세척하였다. 이렇게 준비된 plate에 각 well 당, $100\ \mu\text{L}$ 의 substrate mixture [$1\ \text{mg}$ tetramethyl benzidine (TMB)/mL methanol 1 mL에 $7\ \mu\text{L}$ 의 30% H_2O_2 를 넣은 후, 9 mL TMB substrate buffer (Sigma P-4809)에 첨가]를 넣어 30분간 반응시켰다. Well 당 $50\ \mu\text{L}$ 의 2 M H_2SO_4 를 가하여 반응을 멈추고 microplate reader (BIO-RAD Model 550, U.S.A.)를 이용하여 450 nm에서 측정하여 항원을 주사하기 전의 토끼의 혈청과 비교하고 항체 생성을 확인하였다.

Western blotting

MT가 유도된 잉어와 그렇지 않은 잉어의 혈청을 300배 희석하여 SDS-PAGE하고, Mini Trans-Blot Cell(BIO-RAD, U.S.A.)을 이용하여 Bio-Rad manual에 따라 PVDF membrane에 냉장실에서 14 V로 하룻밤 동안 transfer 시켰다. Transfer된 PVDF를 5분 동안 washing buffer(0.01 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.5% TX-100, 0.08% SDS)에서 씻어준 후 30분 동안 5% blocking solution(washing buffer, 5% nonfat dry milk)을 넣고 잘 섞어 항체의 비특이적 결합을 막았다. MT를 정제하여 제작한 항체를 1:10,000의 비율로 넣은 5% blocking solution에 PVDF를 담가 30분 동안 결합을 유도하고, washing buffer로 10분씩 4번 세척하였다. 그 후 PVDF를 5% blocking solution에 1:30,000 비율로 2차 항체인 anti-rabbit IgG-AP를 첨가한 용액에 넣어 결합을 유도하고, washing buffer로 10분씩 4번 세척하였다. 마지막으로 NBT solution(100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0.33 mg NBT/ml) 15 mL와 BCIP solution(2.5 mg BCIP/50 μL dimethylformamide)을 섞은 substrate buffer를 처리하여 band가 보일 때까지 반응을 시켰다.

결과 및 고찰

유도된 잉어혈청으로부터의 MT 정제

혈청을 300배 희석한 후 15% acrylamide gel을 사용하

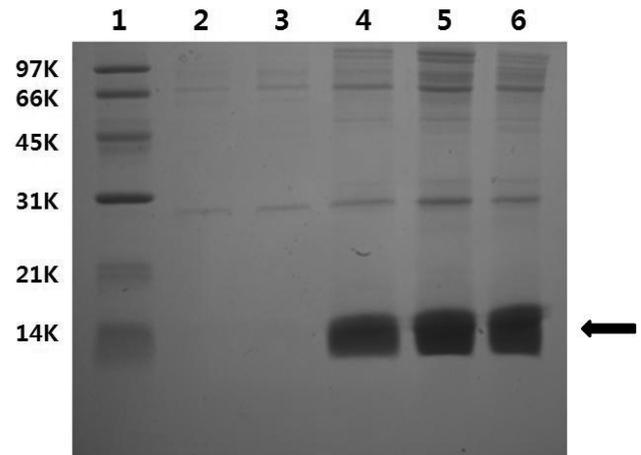


Fig. 1. SDS-PAGE for the metallothionein in carp serums.

Lane 1, molecular weight markers; lanes 2-3, 300-fold diluted serum of a carp without induction; lanes 4-6, 300-fold diluted serum of the carp induced with CdCl_2 .

여 Fig. 1과 같이 SDS-PAGE를 실시하였다. 대조구 혈청과 비교하였을 때 카드뮴을 처리한 잉어의 혈청에서 MT로 추정되는 분자량 약 14,000 단백질이 현저하게 유도된 것이 확인되었다(Fig. 1, lanes 4-6). 한편 수컷(lane 4)과 암컷(lanes 5-6) 잉어 모두에서 유도가 됨을 알 수 있었다. 따라서 MT 유도는 vitellogenin (Moon et al., 2006)과는 달리 성별에 좌우되지 않음을 알 수 있었다. 기존에 MT의 특성을 조사하고 항체를 만들기 위하여 여러 MT 정제방법이 보고되었다. Rat 간으로부터 카드뮴과 아연에 대한 MT의 HPLC에 의한 정제(Turánek et al., 1987)가 보고되었고 Sephadex G-75 gel filtration, DEAE-Sephadex ion exchange chromatography를 이용하여 메기 간세포로부터 MT가 정제되었다(Chatterjee & Maiti, 1987). 그리고 마우스와 토끼의 간으로부터 HPLC ion exchanger가 사용되어 MT가 정제되었고(Pan et al., 1991), 고슴도치 간으로부터 Sephacryl S-100, DEAE-Sepharose를 통하여 MT가 정제되었다(Pan et al., 1993). 잉어 MT 연구의 경우는 잉어 간에서 Sephadex G-75와 DEAE-Sephadex를 이용하여 MT를 정제한 실험(Kito et al., 1986)이 보고되었고, 카드뮴, 구리, 아연으로 잉어 조직의 MT를 유도한 실험(Campenhout et al., 2004)이 보고되었다. Witeska(2005)는 잉어를 낚, 구리, 카드뮴, 아연 등의 금속이온이 포함된 양어조에 키운 후 혈액 내의 금속이온의 양을 측정하는 실험을 수행하였지만, 잉어 혈청 MT에 대한 연구는 아직 수행되지 않았다. 본 연구에서는 정제의 필요성이 없을 정도로 카드뮴에 의한 MT 유도가 현저하였지만(Fig. 1), 혈청 안에 각종 호르몬, 다당류, 혈소판, 항체 등 여러 물질들을 제거하기 위해 잉어의 혈청을 DEAE-cellulose chromatography를 통해 Fig. 2와 같이 정제하였다. NaCl gradient(0-0.5 M NaCl)를 걸어 주어 MT 단백질이 분리되는 것을 알 수 있었으며, 그 중

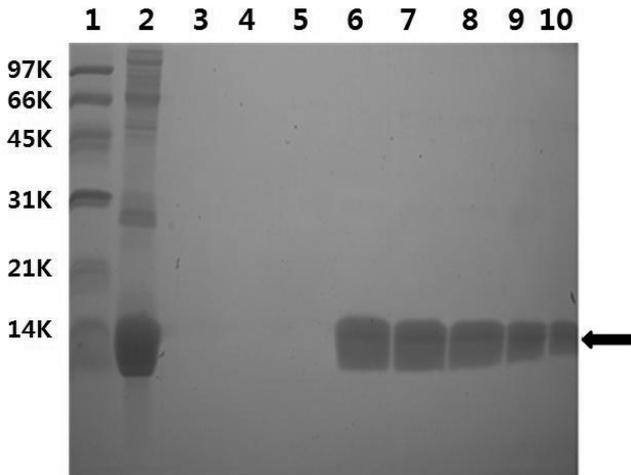


Fig. 2. SDS-PAGE for the metallothionein purified on DEAE-cellulose column from serum of the carp induced with CdCl₂. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, 300-fold diluted serum of the carp induced with CdCl₂; lanes 3-5, wash-through fractions; lanes 6-10, purified fractions

에서 가장 깨끗한 fraction (E6)의 MT 부분만을 오려서 토끼에 주사하여 항체를 제작 의뢰하였다. 정제된 MT의 분자량은 매우 다양하게 나타난다. MT는 생물 종에 따라 다르고 조직에 따라 다를 수 있다. MT 유전자 서열이 일부 밝혀진 것에 의하면 MT-1, MT-2 등이 있는 것으로 알려져 있고 약 57-63 아미노산으로 구성되어 있다고 보고되었다(Syring et al., 2000). 잉어의 경우 Sephadex G-75를 사용하여 측정 한 결과에 의하면 MT-2의 분자량은 9,800으로 나왔지만 아미노산 서열분석에 의하여 분자량 6,227의 MT-1, 6,435의 MT-2가 보고되었다(Kito et al., 1986). 정제된 MT의 분자량이 다양하게 보고되는 이유 중의 하나는 아마도 중별, 발현되는 조직, 그리고 결합하는 금속이온에 따라 달라질 것이며 공유변형 등이 관여할 가능성도 배제할 수 없어 gel filtration column과 SDS-PAGE 상에서 분자량이 다르게 나타나는 것으로 사료된다. 잉어의 알려진 MT 유전자들의 서열(NCBI Access# AAB70467)에 의거하면 MT의 분자량이 약 6,600으로 계산될 수 있으나, 본 실험에서 14,000 근처의 분자량 위치에서 전기영동이 되었다. 이는 고농도의 MT가 자신이 가지고 있는 많은 cysteine간에 *in vitro* artifact dimer가 형성되거나 단백질의 공유변형 등이 존재할 가능성을 배제할 수 없음을 나타낸다. 쏘가리 MT-2의 예상 분자량은 6,000이지만 환원제가 포함된 시료 buffer를 사용하는 Laemmli SDS-PAGE(1970) 상에서의 분자량은 14,000으로 나온 연구(Gao et al., 2009)에서처럼, cysteine이 아주 풍부한 MT 분자가 전기영동상에서 dimer로 나타날 수도 있으며 금속이온 결합에 의하여 전기영동 gel에서 14,000 근처의 퍼진 밴드로 분자량이 다르게 나타날 가능성도 존재한다 하겠다. 또 혈액내의 카드뭉을 무독화시키는 새로운 종류 MT biomarker일 가능

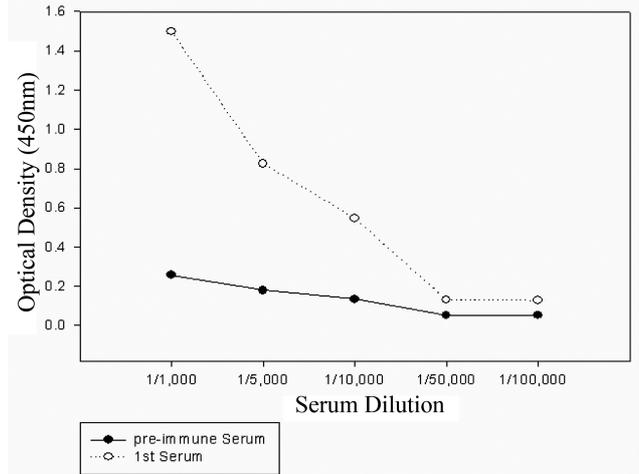


Fig. 3. ELISA for the polyclonal antibody against the purified metallothionein from the carp induced with CdCl₂. ○, CdCl₂-induced carp serum; ●, carp control serum

성도 제시될 수 있을 것이다. 앞으로 MT 유전자를 클로닝하여 발현한 후, 본 실험에서 사용한 항체와의 반응성을 조사하면 일부 그 원인을 밝힐 수 있을 것이다.

정제 MT에 대한 polyclonal antibody의 반응성

정제 MT에 대한 항체의 경우는 반응성이 좋아서 잉어 혈청 중의 MT를 ELISA와 Western blotting 실험에서 잘 인식하였다. Fig. 3의 ELISA 결과를 보면 항원을 주사하지 않은 preimmune serum에 비하여 1st serum(1차 채취 serum)의 반응도가 1,000배 희석 배율에서 약 6배 정도 반응성이 높게 나타나 항체가 잘 만들어졌음을 알 수 있었다.

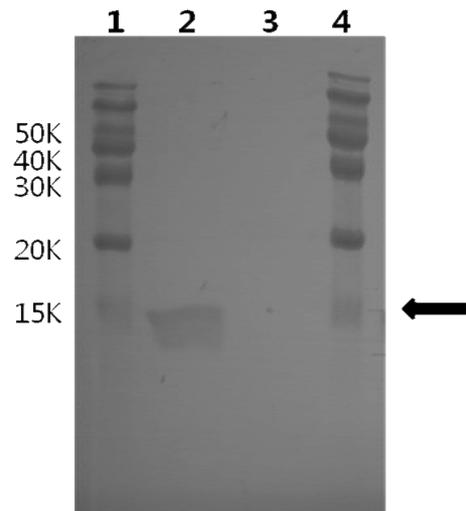


Fig. 4. Western blotting for the metallothionein in carp serums Lane 1, prestained molecular weight markers; lane 2, 300-fold diluted serum of the carp induced with CdCl₂; lane 3, 300-fold diluted serum of a carp without induction; lane 4, prestained molecular weight markers

1,000 배 희석 배율의 항체를 이용한 ELISA 실험에서 항체의 반응성이 대조구에 비하여 약 5배 정도로 나타난 잉어 vitellogenin에 대한 항체(Moon et al., 2006)를 이용한 waveguide lightmode spectroscopy biosensor 실험(Kim et al., 2008) 이 성공적으로 수행된 것을 보면, 본 실험에서 제작한 항체의 사용 가능성이 높음을 예상할 수 있다. ELISA에서 항체 역가가 확인이 되었으므로 향후 biosensor 소자 응용 가능성을 보다 정확히 확인하기 위하여 Western blotting 실험을 수행하였다. Fig. 4의 lane 3는 카드뮴으로 유도하지 않은 대조구 혈청을 시료로 사용한 것이며, lane 2는 카드뮴으로 유도한 잉어 혈청을 시료로 사용한 것이다. Lane 3에는 특별히 반응하는 밴드가 보이지 않지만, 카드뮴으로 유도한 혈청(lane 2)에서는 SDS-PAGE에서 강하게 보이는 단백질 밴드에 해당하는 자리에 반응 밴드가 나타났다. 따라서 ELISA 결과와 Western blotting 실험결과로부터 MT에 반응하는 항체가 잘 만들어졌음을 확인할 수 있었다.

Gopal 등(1997)은 오염 스트레스의 생물학적 지표로 이용하기 위하여 잉어에 수은과 납을 처리하였을 경우 혈청 내의 단백질 양의 변화를 측정하였다. 하지만 중금속에 유도되고 중금속과 결합하는 잉어 같은 어류 MT에 대한 연구는 미진한 편이다. 앞으로 정제된 MT에 대한 항체를 이용하여, 잉어를 포함한 어류로부터 채취 수월한 혈액에서 생물학적 지표인 MT의 양을 측정할 것이며, 본 항체는 수계의 중금속 오염 정도를 측정하는 다양한 면역 센서를 개발에 도움이 될 것이다.

감사의 글

본 연구는 한국식품연구원 2009년 ‘창의연구사업(E094105)’에 의해 지원되어 수행되었기에 감사를 드립니다.

참고문헌

- Brower M, Enghild J, Holxum-Browwer T, Thogersen I, Truncali A. 1995. Primary structure and tissue-specific expression of blue crab (*Callinectes sapidus*) metallothionein isoforms. *Biochem. J.* 311: 617-622.
- Campenhour KV, Infante HG, Adams F, Blust R. 2004. Induction and binding of Cd, Cu, and Zn to metallothionein in carp (*Cyprinus carpio*) using HPLC-ICP-TOFMS. *Toxicol. Sci.* 80: 276-287.
- Chatterjee A, Maiti IB. 1987. Purification and immunological characterization of catfish (*Heteropneustes fossilis*) metallothionein. *Mol. Cell. Biochem.* 78: 55-64.
- Cousins RJ. 1985. Absorption, transports and hepatic metabolism of copper and zinc : special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 65: 238-309.
- Dunn M, Blalock TL, Cousins RJ. 1987. Metallothionein. *Proc Soc Exp. Biol. Med.* 185: 107-119.
- Eaton, DL, Toal, BF. 1982. Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 66: 134-142.
- Gao D, Wnag GT, Chen XT, Nie P. 2009. Metallothionein-2 gene from the mandarin fish *Siniperca chuasti*: cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. *Comp. Biochem. Physiol.* 149C: 18-25.
- George SG, Todd K, Wright J. 1996. Regulation of metallothionein in teleosts: induction of MT mRNA and protein by cadmium in hepatic and extra hepatic tissue of a marine flat fish the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 113C: 109-115.
- Gopal V, Parvathy S, Balassubramanian PR. 1997. Effect of heavy metals on the blood protein biochemistry of the fish *Cyprinus carpio* and its use as a bio-indicator of pollution stress. *Environ. Monitor. Assess.* 48: 117-124.
- Hamer DH, Thieles DJ, Lemantt JF. 1985. Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* 228: 685-690.
- Järup L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* 68: 167-182.
- Jensen LT, Howare WR, Strain JJ, Winge DR, Culotta VC. 1996. Enhanced effectiveness of copper ion buffering by Cup1 metallothionein compared with CRS5 metallothionein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271: 18514-18519.
- Kägi JHR, Kojima Y. 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Exp. Suppl.* 52: 25-61.
- Kim N, Kim D-K, Cho Y-J, Moon D-K, Kim W-Y. 2008. Carp vitellogenin detection by an optical waveguide lightmode spectroscopy biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 24: 391-396.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Margoshes M, Vales BL. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 4813-4814.
- Mance G. 1987. Pollution threat of heavy metals in aquatic environments. Elsevier, London, UK. p. 372.
- Moon D-K, Kim N, Kim WY. 2006. Reactivity of the antibodies against purified carp vitellogenin and a synthetic vitellogenin peptide. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 49: 196-201.
- Olafson PW, McCubbin WD, Kay MC. 1988. Primary and secondary structural analysis of a unique prokaryotic metallothionein from *Synechococcus sp* cyanobacterium. *Bio. Chem. J.* 251: 691-699.
- Pan A, Wang Z, Ru B. 1991. Determination and purification of metallothionein by high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 5: 193-197.
- Pan A, Tie F, Duan Z, Ma H, Li L, Ru B. 1993. Purification and characterization of hedgehog liver metallothionein. *Biomed. Chromatogr.* 7: 94-98.
- Price NM, Morel FMM. 1995. Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *Nature* 344: 658-660.
- Roesijadi G. 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aqua. Toxicol.* 22: 81-114.
- Sampath-Kunar R, Munro AD, Lam TJ. 1996. Ontogeny of immunoreactive steroidogenic proteins (Adrenodoxin and Cytochrome p-450) in the interrenals of the teleost *Lates calcarifer*. *Gen. Comp. Endocrine.* 102: 147-155.
- Scheuhammer AM, Cherian MG. 1986. Quantification of metallothionein by a silver-saturation method. *Toxicol. Appl. Pharma-*

- col. 82: 417-425.
- Syring RA, Hoexum B, Brouwer M. 2000. Cloning and sequencing of cDNA encoding for a novel copper-specific metallothionein and two cadmium-inducible metallothioneins from the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 125: 325-332.
- Turánek J, Kováč J, Zábršová, H. 1987. Rapid purification of the isoforms of rat liver Cd, Zn-metallothionein by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 410: 470-473.
- Vosyliene MZ, Jankaite A. 2006. Effect of heavy metal model mixture on rainbow trout biological parameters. *Ekologija.* 4: 12-17.
- Witeska M. 2005. Stress in fish-hematological and immunological effects of heavy metals. *Electron. J. Ichthyol.* 1: 35-41.
- Wu SM, Weng CF, Yu MJ, Lin CC, Chen ST, Hwang JC, Hwang PP. 1999. Cadmium-inducible metallothionein in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62: 758-768.
- Yadv N, Khandelwal S. 2005. Effect of picroliv on cadmium-induced hepatic and renal damage in the rat. *Hum. Exp. Toxicol.* 25: 581-591.
- Yeoh CG, Schreck CB, Fitzpatrick MS, Feist GW. 1996. *In vivo* steroid metabolism in embryonic and newly hatched trout (*Oreorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 102: 197-209.