

# 원돌이물달팽이 (*Physa acuta*) 의 Metallothionein 유전자 클로닝 및 발현양상

조용훈, 백문기<sup>1</sup>, 강세원<sup>1</sup>, 이재봉<sup>1</sup>, 변인선<sup>2</sup>, 최상행<sup>3</sup>, 채성화<sup>4</sup>, 강정하<sup>5</sup>, 한연수, 박홍석<sup>3</sup>, 이용석<sup>1</sup>

전남대학교 농과대학 식물생명공학부, <sup>1</sup>인제대학교 의과대학 기생충학교실, <sup>2</sup>순천향대학교 의과대학 면역학교실, <sup>3</sup>한국생명공학연구원 바이오화학에너지센터, <sup>4</sup>㈜지앤시바이오, <sup>5</sup>국립수산과학원 생명공학과

## Molecular cloning and expression pattern of Metallothionein Gene from the left-handed shell, *Physa acuta*

Yong Hun Jo, <sup>1</sup>Moon Ki Baek, <sup>1</sup>Se Won Kang, <sup>1</sup>Jae Bong Lee, <sup>2</sup>Byun In-Seon, <sup>3</sup>Sang-Haeng Choi, <sup>4</sup>Sung-Hwa Chae, <sup>5</sup>Jung-Ha Kang, Yeon Soo Han, <sup>3</sup>Hong-Seog Park and <sup>1</sup>Yong Seok Lee

Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>1</sup>Department of Parasitology, Inje University College of Medicine, Busan 614-735, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Immunology SoonChunHyang University College of Medicine, CheonAn, 330-090, Korea

<sup>3</sup>Industrial biotechnology & bioenergy research center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea

<sup>4</sup>Research Institute of GnC BIO Co., LTD., Daejeon 305-150, Korea

<sup>5</sup>Biotechnology Research Division, NFRDI, Busan, Korea

### ABSTRACT

Metallothioneins (MTs) play a key role in metallic homeostasis and detoxification in most living organisms. In an attempt to study the biological functions and significance of MT in a snail, we cloned and partially characterized the MT gene from the left-handed snail, *Physa acuta* which has been regarded as a potential biomonitoring species for fresh water. The complete cDNA sequence of PaMT cDNA was identified from the expressed sequence tag (EST) sequencing project of *Physa acuta*. The coding region of 180 bp gives 60 amino acid residues including the initiation methionine and termination codon. Clustering and phylogenetic analysis of PaMT with other MT amino acid sequences show that it has some identities to *Helix pomatia* (60%), *Arianta arbustorum* (58%), *Perna viridis* (49%), *Mytilus edulis* (49%), *Bathymodiolus azoricus* (49%), *Bathymodiolus azoricus* (48%) and *Bathymodiolus* sp. FD-2002 (48%). Time dependent induction for PaMT from *P. acuta* exposed with cadmium (50 ppb) indicated that PaMT was induced at 4-8 hr after exposure. It remains to further develop PaMT as a potential biomarker for water contamination in fresh water.

**Key words:** cloning, metallothionein, *Physa acuta*, bio-monitoring

### Introduction

최근 바다와 같이 매우 넓은 지역에서의 환경모니터링에서

그 지역에 서식하는 생물의 일부 유전자를 이용하여 바이오마커를 개발하려는 시도가 많이 되고 있다. 그 대표적인 예로 mussel watch program을 들 수 있는데 이는 전 세계 거의 모든 연안에 서식하는 연체동물인 홍합과 굴을 이용하여 해양 환경을 모니터링 하는 대형 국제 프로젝트이다 (O'Connor *et al.*, 1994; Bebianno and Serafim, 2003). 또한 남극 환경과 같이 굴이나 홍합이 살지 못하는 환경에서는 환경모니터링을 위하여 남극큰띠조개 (*Laternula elliptica*) 나 남극삿갓

Received Aug 25, 2009; Revised Oct 15, 2009; Accepted October 20, 2009

Corresponding author: Dr. Yong Seok Lee

Tel: +82 (51) 890-6462 e-mail: yslee@inje.ac.kr 1225-3480/24328

조개 (*Nacella concinna*) 와 같은 종을 사용하기도 하였다 (Choi *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006). 그리고 연안환경의 환경모니터링에는 굴이나 홍합과 같은 부착생물보다는 갯벌 등에서 섭식을 하며 생활하는 조개류가 환경모니터링에 더욱 적합하다고 보고된 바 있다 (Lee *et al.*, 2006).

최근 독성물질 등에 잘 견디는 연체동물을 이용하는 환경모니터링 연구가 진행되고 있다. 이에 대한 대표적인 예로 네덜란드에서는 담수환경에서 서식하는 *Marisa cornuarietis* 와 *Pomacea bridgesi* 두 종의 달팽이에 대하여 바이오모니터링 가능성에 대한 연구가 수행된 바 있다 (Maltez *et al.*, 2009). 이와는 다르게, 남미의 브라질에서는 강어귀에 서식하는 *Cathorops spixii* 를 중금속오염에 대한 바이오마커로 활용 가능한지에 대한 연구가 수행된 바 있다 (Azevedo *et al.*, 2009). 이러한 연구 방법 중 지표동물로부터 환경모니터링을 수행할 수 있는 다양한 유전자가 개발되고 있는데, 이 중 대표적인 유전자가 본 연구에서 사용된 Metallothionein (MT) 이다. MT는 zinc, copper, cadmium 및 nickel과 같은 중금속에 binding 하는 다량의 cysteine을 포함하는 작은 분자량의 단백질로서 (Kojima *et al.*, 1976) MT의 세포 내 발현은 금속의 농축에 의해 유도되는 것으로 알려져 있으며, 또한 금속 독성에 대한 중금속의 조절과 세포보호에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Kagi and Valee, 1960; Kagi and Vallee, 1961). 이러한 MT의 세포수준에서 생물학적 기능의 이해를 통하여 중금속 오염에 대한 환경 모니터링 마커로서의 사용 가능성이 제시된 바 있으며 (Simes *et al.*, 2003), 굴 (*Crassostrea gigas*) 과 담치류 (*Mytilus galloprovincialis*) 에서 바이오마커로서 활용이 가능한 MT 유전자의 클로닝 및 기능 구명에 대한 연구가 수행 되고 있다 (Tanguy and Moraga, 2001; Tanguy *et al.*, 2001; Mourgaud *et al.*, 2002).

본 실험에 사용된 원돌이물달팽이 (*Physa acuta* Physidae, 원돌이물달팽이과) 는 제초제인 diuron (Nebeker and Schuytema, 1998), chlorpyrifos, lindane (Cuppen *et al.*, 2002), Paraquat (Bacchetta *et al.*, 2002) 에 만성 및 급성으로 노출시켰을 때 농도가 높을수록 더 오랜 시간 동안 생존하였으며, butanol에 대한 내성도 어류에 비해 2-4 배 정도 강하였고 (Stobaeus *et al.*, 1990), 매우 강한 독성을 가진 유기주석화합물 (TBT) 에 노출시켰을 때 부화율이 상승하기도 한다 (Leung *et al.*, 2004). 또한 곤충에 비해 크롬 ( $Cr^{6+}$ ) 과 비소 ( $As^{3+}$ ) 의 노출에 훨씬 잘 견디며 (Canivet *et al.*, 2001), 제초제인 fenitrothion 에 노출시킨 경우 일부는 축적되지만 체외배출 기능이 매우 뛰어나다는 연구결과도 있다 (Takimoto *et al.*, 1987). 따라서 이상

의 결과들을 통해 알 수 있듯이 원돌이물달팽이는 담수환경 모니터링에 매우 적합한 생물임을 알 수 있다.

본 연구는 담수환경에서 서식하고 있는 원돌이물달팽이의 MT 유전자를 클로닝하고 카드뮴 노출에 반응하는지 살펴보고 바이오마커로서의 활용성을 타진하기 위해 수행되었다.

## Materials and methods

### 1. Sample collection

유희아 강 기안 목 원돌이물달팽이 과에 속하는 원돌이물달팽이 (*Physa acuta*) 는 충남 아산시에서 채집하였으며, 시료는 실온상태의 담수에서 사육하였다.

### 2. In silico analysis of PaMT cDNA

기존의 *Physa acuta* expressed sequence tag (EST) 를 통해 구축된 *P. acuta* sequence 데이터베이스를 query로 하여 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 을 사용하여 분석하였다. 그 결과 MT로 동정된 크로마토그램파일 6개를 score 20 조건으로 phred 프로그램을 이용하여 base calling 한 후, cap3 프로그램을 통하여 assembly 함으로써 contig file을 추출하였다. 확보된 PaMT cDNA는NCBI에 등록되었다 (GU259686). 여기서 얻어진 contig 서열을 Emboss package의 sixpack 프로그램 사용하여 가능한 모든 아미노산 서열을 획득하였다 (Dopazo, 1994; Ewing and Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998; Huang and Madan, 1999).

확보된 PaMT 유전자의 분석을 통하여 얻어진 아미노산서열을 연체동물 전용 BLAST 서버를 이용하여 annotation을 실시하였다 (Lee *et al.*, 2004). 이때 프로그램은 blastp를 사용하였으며, option은 e-value ( $1e^{-5}$ ) 를 사용하였다 (Braun *et al.*, 2001).

확보된 MT 유전자 염기서열을 이용하여 InterProScan Sequence Search 프로그램 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) 을 이용하여 도메인 분석을 수행하였다 (Zdobnov and Apweiler, 2001). 또한 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 의 BLAST 프로그램을 이용하여 PaMT 아미노산염기서열과 유사한 단백질의 염기서열을 확보하였다 (Altschul *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 2008). 확보된 PaMT 아미노산 염기서열과 다른 알려진 종의 MT와의 상동성을 알아보기 위해 clustalX2 program (Ver. 2.0.12) 을 이용하여 분석하였다 (Larkin *et al.*, 2007). 또한 MEGA 4 program (Ver. 4.0.2) 을 이용하여 Neighbor-Joining method (1,000 bootstrap replication) 로 MT 단백질의 phylogenic 분석을 수행하였다 (Zuckerandl and Pauling, 1965; Felsenstein, 1985;

Saitou and Nei, 1987; Tamura *et al.*, 2007).

**3. Sample collection for semi-quantitative RT-PCR**

MT 유전자의 발현패턴을 확인하기 위하여 다음과 같은 샘플링을 수행하였다. Cadmium (Cd, CdCl<sub>2</sub> 원액 농도: 260mg/ml)의 노출 시간 별 MT 유전자의 발현 패턴을 확인하기 위하여 50 ppb (50 µg/l) 농도로 cadmium이 처리된 물에서 각각 4시간, 8시간, 12시간, 24시간을 처리한 후 whole body를 RNAlater solution (Qiagen, U.S.A.) 에 담긴 후 -70 °C에 보관하였다.

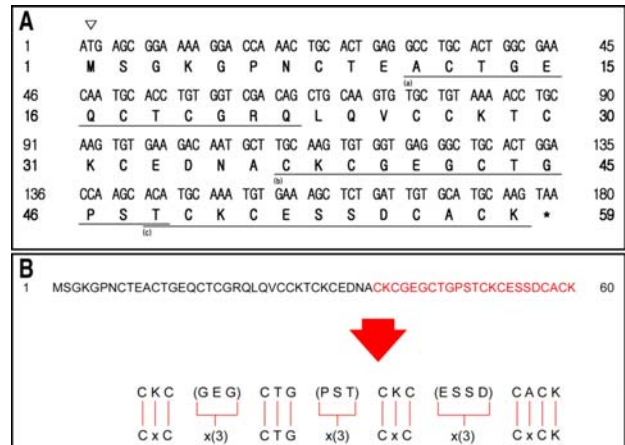
**4. RNA isolation and RT-PCR**

-70 °C에 보관된 샘플로부터 RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 또한 AccuPower RT PreMix (Bioneer, Korea) 와 oligo (dT) 12-18 primer (Invitrogen, USA) 를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Loading control은 원돌이물달팽이의 actin 유전자로부터 design된 primer set (PaActinFw 5'-GAGAAGAGCTACGAGCT -3', PaActinRev 5'-CGATCCAGACGGAGTAT -3')을 이용하였다. 또한, PaMT의 PCR을 수행하기 위하여 다음과 같은 primer를 design하였다 (PaMTFw 5'-AGCGGAAAAGGACCAACT -3', PaMTRRev 5'-TGCAGCCCTCACCACACT -3'). 모든 PCR 조건은 다음과 같다. First denaturation을 위하여 94°C에서 3분간 처리하였으며, 94°C에서 40초간 denaturation, 55°C에서 40초간 annealing, 그리고 72°C에서 1분간 extension 과정을 28 cycle로 수행하였다.

**Results and discussion**

원돌이물달팽이 (*P. acuta*) 의 대량 유전자 발굴사업 (expressed sequence tag, EST) 을 통하여 59 개의 amino acid를 코딩하는 180 bp의 metallothionein (PaMT) 유전자 염기서열을 확보하였다. 확보된 amino acid sequence를 이용한 InterProScan domain 분석을 수행한 결과 11-22 bp, 37-48 bp, 48-58 bp에 각각 Metallothionein, family 2, mollusc domain (Fig. 1. Underline (a)-(c)) 을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다.

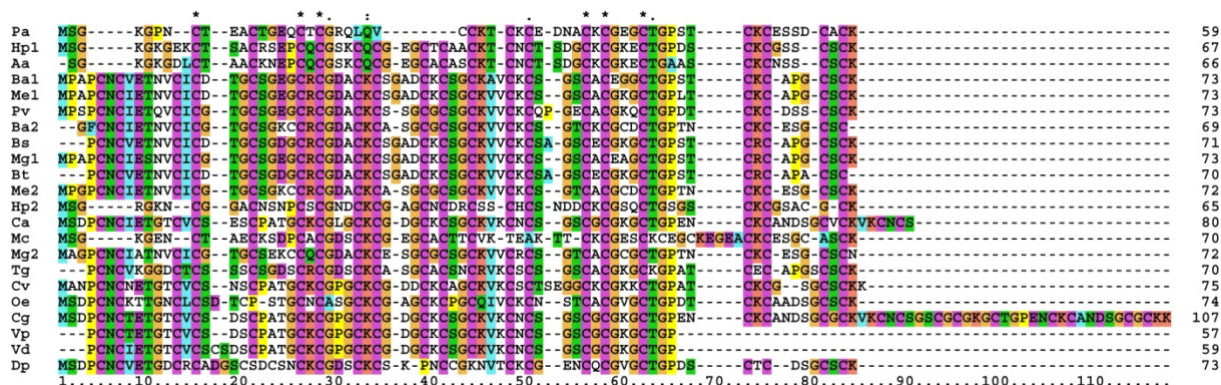
이렇게 확보된 PaMT의 아미노산 염기서열을 이용한 BLAST 분석을 통하여 21개의 참고 서열들을 선정하였다. 선정된 염기서열을 바탕으로 clustalX 프로그램으로 Multiple align 한 결과 *Helix pomatia* (Roman snail) Cd-metallothionein isoform (AF399740.1) 이 60%로 가장 높은 아미노산 유사도를 보였으며, 그 밖에 *Arianta*



**Fig. 1.** Nucleotide and deduced amino acid sequence of *P. acuta* Metallothionein gene. (A) Open triangle and asterick "\*" indicate start codon and termination codon, respectively. Underline (a)-(c) shows Metallothionein, family 2, mollusc domain from InterProScan program. (B) It has specific motifs for metallothionein such as Cys-Cys, Cys-X-Cys or Cys-X-Y-Cys.

*arbustorum* metallothionein (AAB47141.1) 이 58%, *Perna viridis* metallothionein 1, (AF092971.1) 이 49%, *Mytilus edulis* metallothionein (AJ577130.1) 이 49%, *Bathymodiolus azoricus* metallothionein, isoform MT-10b (AJ630216.1) 이 49%, *Bathymodiolus azoricus* metallothionein (AJ630218.1) 이 48%, 그리고 *Bathymodiolus* sp. FD-2002 metallothionein 10 (AJ517188.1) 이 48%로 대체적으로 낮은 유사도를 보여주는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2, Table 1). Clustalx를 통해 수행된 multiple align 결과를 토대로 Neighbor-Joining method를 통해 진화학적 분석을 실시하였다 (Saitou *et al.*, 1987). 진화학적 근연도는 Poisson correction method (Zuckerandl *et al.*, 1965)를 사용하였으며, 모든 위치의 gap과 missing데이터는 제거하였다. 이와 같은 결과는 MEGA4 프로그램의 phylogenetic 분석을 통해 수행되었다 (Tamura *et al.*, 2007). Phylodendrogram을 작성한 결과 *Arianta arbustorum* (Aa), *Helix pomatia* (Hp1, Hp2) 그리고 *Megathura crenulata* (Mc) 와 같은 군으로 묶이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). MT는 아미노산 염기서열상에 cysteine이 많이 존재하는 단백질로 높은 가변성을 지니고 있는 특징을 가지고 있다. 하지만, MT family의 계통발생학적 데이터는 꾸준히 축적되고 있어, 이를 이용한 중간 또는 종내의 분류학적 연구에 활용되고 있다. 이와 관련하여 (Lee *et al.*, 2008; Baek *et al.*, 2009) 은 MT 유전자를 이용하여 종간의 β-분류에 이용하는 연구를 수행한 적이 있으며, 본 연구 결과는 이들이 수행한 연구결과와 유사한 양상을 띄고 있는 것

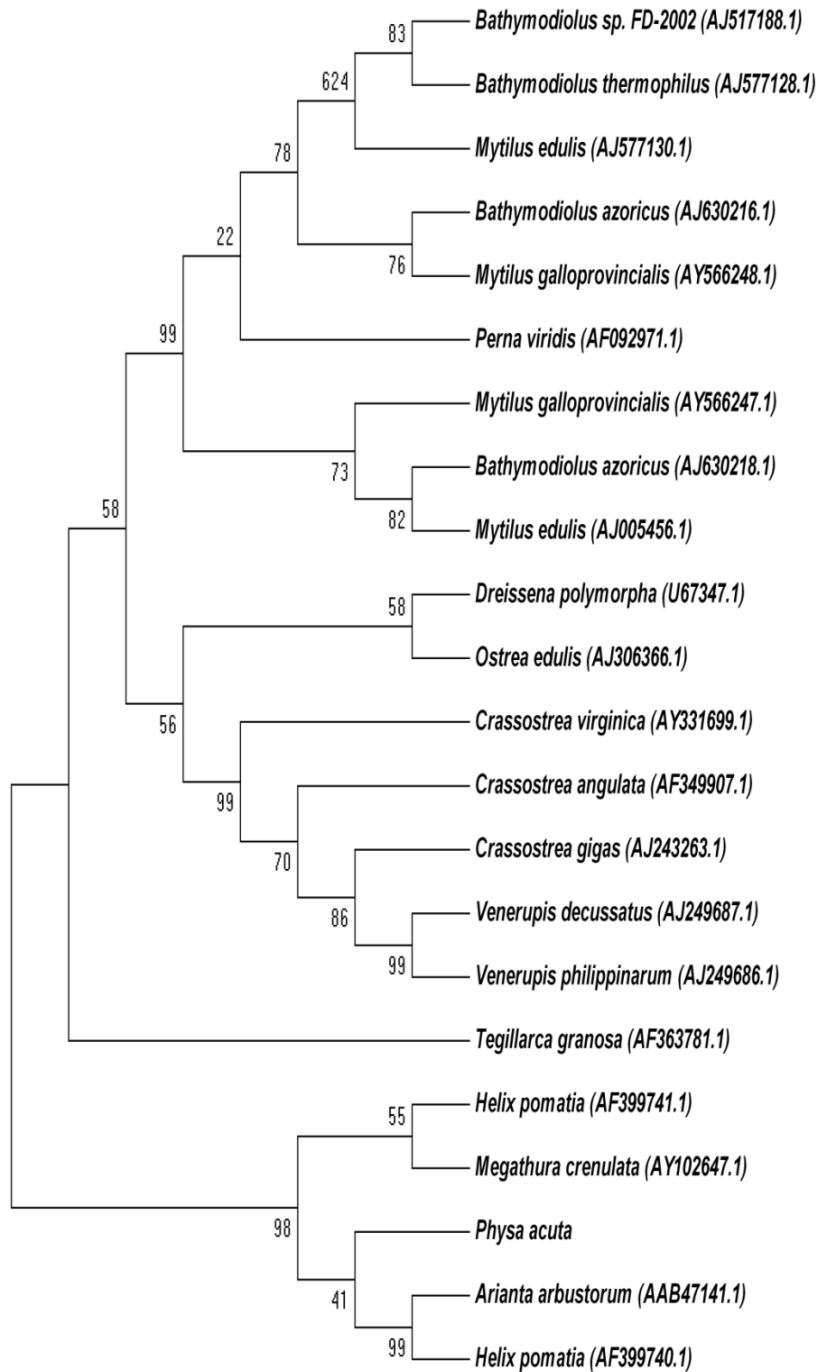
Molecular cloning and pattern of expression of a Metallothionein Gene from the left-handed shell, *Physa acuta*



**Fig. 2.** Multiple sequence alignment of *Physa acuta* metallothionein with other reference MT sequences. Pa, *Physa acuta* Hp1, *Helix pomatia* (Roman snail) Cd-metallothionein isoform, AF399740.1; Aa, *Arianta arbustorum metallothionein*, AAB47141.1; Ba1, *Bathymodiolus azoricus* metallothionein, isoform MT-10b, AJ630216.1; Me1, *Mytilus edulis* metallothionein, AJ577130.1; Pv, *Perna viridis* metallothionein 1, AF092971.1; Ba2, *Bathymodiolus azoricus* metallothionein, AJ630218.1; Bs, *Bathymodiolus* sp. FD-2002 metallothionein 10, AJ517188.1; Mg1, *Mytilus galloprovincialis* (Mediterranean mussel) metallothionein 10-III, AY566248.1; Bt, *Bathymodiolus thermophilus* metallothionein, AJ577128.1; Me2, *Mytilus edulis* metallothionein 20 II, AJ005456.1; Hp2, *Helix pomatia* (Roman snail) Cu-metallothionein isoform, AF399741.1; Ca, *Crassostrea angulata* metallothionein, AF349907.1; Mc, *Megathura crenulata* metallothionein, AY102647.1; Mg2, *Mytilus galloprovincialis* (Mediterranean mussel) metallothionein 20-IV, AY566247.1; Tg, *Tegillarca granosa* metallothionein-like protein, AF363781.1; Cv, *Crassostrea virginica* (eastern oyster) metallothionein IB, AY331699.1; Oe, *Ostrea edulis* metallothionein, AJ306366.1; Cg, *Crassostrea gigas* (Pacific oyster) metallothionein, AJ243263.1; Vp, *Venerupis philippinarum* metallothionein, AJ249686.1; Vd, *Venerupis decussatus metallothionein*, AJ249687.1; Dp, *Dreissena polymorpha* metallothionein, U67347.1.

**Table 1.** Percentage identities of *P. acuta* metallothionein with other known MT sequences.

	Hp1	Aa	Ba1	Me1	Pv	Ba2	Bs	Mg1	Bt	Me2	Hp2	Ca	Mc	Mg2	Tg	Cv	Oe	Cg	Vp	Vd	Dp
Pa	60	58	49	49	49	48	48	47	47	47	47	45	45	44	44	44	44	43	40	40	39
Hp1		85	43	46	51	48	44	42	43	48	59	48	52	48	47	54	48	48	47	47	43
Aa			41	44	47	47	42	39	41	45	56	46	54	45	47	52	44	46	45	45	37
Ba1				93	76	71	91	92	90	75	41	58	35	68	64	59	59	58	61	61	51
Me1					82	75	93	92	91	79	43	64	37	72	67	63	61	63	67	68	53
Pv						78	76	78	75	82	44	61	38	74	61	61	59	60	61	63	54
Ba2							74	72	72	97	47	58	40	88	59	55	51	57	58	60	48
Bs								90	99	75	42	62	37	70	68	62	59	62	67	67	55
Mg1									88	76	41	58	33	69	64	57	56	57	61	63	50
Bt										74	41	62	36	69	66	61	58	62	67	67	55
Me2											46	60	40	89	62	56	55	58	60	61	50
Hp2												45	52	44	42	44	46	45	45	45	39
Ca													38	58	59	77	64	95	95	96	56
Mc														38	47	38	40	38	35	35	34
Mg2															58	54	54	57	60	61	47
Tg																59	51	59	63	63	51
Cv																	61	78	84	84	53
Oe																		64	61	60	59
Cg																			100	98	56
Vp																				98	52
Vd																					50

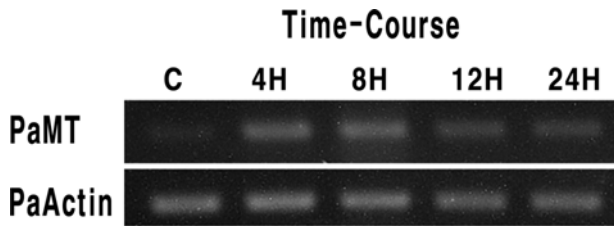


**Fig. 3.** Phylogenetic analysis on evolutionary relationships between *Physa acuta* and 21 taxa. branch length = 3.55540928

을 확인할 수 있었는데, 본 연구에서 사용된 원돌이물달팽이는 이들이 제시한 group A에 속함을 확인할 수 있었다.

마지막으로 cadmium을 50 ppb 로 처리한 후 시간에 따른

*PaMT*의 발현양상을 RT-PCR방법을 이용하여 확인하였다. 그 결과 control에 비하여 4시간과 8시간에서 과발현되는 것을 확인할 수 있었으며, 12시간 이상이 지나면, 점차 감소하는



**Fig. 4.** Time dependent expression pattern of PaMT mRNA in *P. acuta* exposed with Cd. PaActin was used as loading control.

것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 이와 유사한 다양한 연구가 전 세계적으로 수행된 바 있는데, 그 중 Tanguy and moraga (2001)는 *C. gagas*의 MT2 유전자가 중금속에 의한 스트레스로 인하여 유도된다고 보고하였다 (Tanguy et al., 2001). 이와 유사하게 Butler and Roesijadi (2001)는 RT-PCR 방법을 이용하여 *Crassostrea uirginica*에서 유래한 MT 유전자가 Cd에 의해 유도됨을 확인하였다 (Butler and Roesijadi, 2001). 본 연구팀은 미세구조연구 및 MT monoclonal antibody를 이용한 면역조직화학적 연구방법을 이용하여 남극큰따조개 (*Laternula elliptica*), 남극삿갓조개 (*Nacella concinna*) 및 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)의 환경모니터링을 위한 바이오마커 개발 가능성 검증에 대한 기초 연구를 수행한 바 있다. 면역조직화학적 연구방법에 의하면, Cd에 노출된 개체의 전 기관에서 MT 유전자가 노출 시간에 따라 점차적으로 과발현되는 것을 확인할 수 있었다 (Choi et al., 2001; Lee et al., 2002; Lee et al., 2006; Lee et al., 2006). 이 결과는 Cd 노출 초기에 과발현되는 본 연구의 연구결과와 조금 상이한 결과를 보여주고 있는데, 이에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

### Conclusions

본 연구는 담수환경모니터링에 원동물물달팽이를 지표동물로 활용하기 위한 기초자료 확립을 목적으로 수행되었다.

1. 원동물물달팽이의 EST 연구를 통하여 59 개의 아미노산을 코딩하는 180 bp의 MT 유전자를 클로닝할 수 있었다. 확보된 유전자는 3개의 Metallothionein, family 2, mollusc domain과 Cys-Cys, Cys-X-Cys or Cys-X-Y-Cys motifs와 같은 MT 유전자 특유의 아미노산서열을 가지고 있었다.

2. 확보된 MT 유전자와 근연종의 MT 유전자를 이용하여 *in silico* analysis를 수행하였다. 그 결과 PaMT는 *Helix pomatia* (Roman snail) Cd-metallothionein isoform (60%) 과 가장 높은 유사도를 가지고 있었으며, 대체적으로 다른 종과 39-60%의 낮은 유사도를 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

3. 마지막으로 Cd (50 ppb) 에 대한 노출 시간별 MT 유전자의 발현 패턴을 확인한 결과 4시간과 8시간의 노출 초기시기에 과발현되는 것을 확인할 수 있었다.

이와 같은 연구는 추후 담수환경의 환경모니터링을 수행하기 위한 지표동물의 발굴 및 환경모니터링의 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

### Acknowledgement

이 논문은 2009년도 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다 (No. 2009-0073975). 또한 교과부에서 시행하는 유전체정보생산 연구사업 (2007-04269) 의 도움으로 추가로 다량의 유전체정보 생산을 할 수 있었으며 이에 감사드립니다.

### References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**: 403-410.
- Azevedo, J.S., Serafim, A., Company, R., Braga, E.S., Favaro, D.I., and Bebianno, M.J. (2009) Biomarkers of exposure to metal contamination and lipid peroxidation in the benthic fish *Cathorops spixii* from two estuaries in South America, Brazil. *Ecotoxicology* **18**: 1001-1010.
- Bacchetta, R., Mantecca, P., and Vailati, G. (2002) Oocyte Degeneration and Altered Ovipository Activity Induced by Paraquat in the Freshwater Snail *Physa Fontinalis* (Gastropoda: Pulmonata). *Journal of Molluscan Study* **68**: 181-186.
- Baek, M.K., Lee, J.-S., Kang, S.W., Lee, J.B., Kang, H.J., Jo, Y.-H., Noh, M.-Y., Han, Y.S., Choi, S.-H., Chae, S.-H., Park, H.-S., Lee, J.-S., and Lee, Y.S. (2009) Phylogenetic analysis based on metallothionein gene sequence of an indigenous species *Pisidium (Neopisidium) coreanum* in Korea. *Korean Journal of Malacology* **25**: 153-160.
- Bebianno, M.J., and Serafim, M.A. (2003) Variation of metal and metallothionein concentrations in a natural population of *Ruditapes decussatus*. *Archives of environmental contamination and toxicology* **44**: 53-66.
- Braun, R.C., Pedretti, K.T., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Birkett, C.L., and Roberts, C.A. (2001) Parallelization of local BLAST service on workstation clusters. *Future Generation Computer Systems* **17**: 745-754.
- Butler, R.A., and Roesijadi, G. (2001) Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of a molluscan metallothionein mRNA. *Aquatic toxicology* **54**: 59-67.
- Canivet, V., Chambon, P., and Gibert, J. (2001) Toxicity and bioaccumulation of arsenic and chromium in epigeal and hypogean freshwater macroinvertebrates. *Archives of environmental*

- contamination and toxicology* **40**: 345-354.
- Choi, H.J., Ahn, I.-Y., Ryu, S.-K., Lee, Y.-S., Lee, I.-S., and Jeong, K.-H. (2001) Preliminary Evidence for a Metallothionein-like Cd-binding Protein in the Kidney of the Antarctic Clam *Laternula elliptica*. *Ocean and Polar Research* **23**: 337-345.
- Cuppen, J.G., Crum, S.J., Van den Heuvel, H.H., Smidt, R.A., and Van den Brink, P.J. (2002) Effects of a mixture of two insecticides in freshwater microcosms: I. Fate of chlorpyrifos and lindane and responses of macroinvertebrates. *Ecotoxicology* **11**: 165-180.
- Dopazo, J. (1994) Estimating errors and confidence intervals for branch lengths in phylogenetic trees by a bootstrap approach. *Journal of molecular evolution* **38**: 300-304.
- Ewing, B., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* **8**: 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* **8**: 175-185.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Huang, X., and Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* **9**: 868-877.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., and Madden, T.L. (2008) NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research* **36**: W5-9.
- Kagi, J.H., and Valee, B.L. (1960) Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *The Journal of biological chemistry* **235**: 3460-3465.
- Kagi, J.H., and Vallee, B.L. (1961) Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. II. Physico-chemical properties. *The Journal of biological chemistry* **236**: 2435-2442.
- Kojima, Y., Berger, C., Vallee, B.L., and Kagi, J.H. (1976) Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-1B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**: 3413-3417.
- Lee, J.-S., Min, B.-J., Kang, S.W., Lee, J.B., Baek, M.K., Hwang, S.Y., Kim, S.H., Kho, W.-G., Choi, S.-H., Chae, S.-H., Park, H.-S., Han, Y.S., Lee, J.-S., Jeong, K.-H., and Lee, Y.S. (2008) Molecular Phylogenetic Study of *Nesiohelix samarangae* Based on Metallothionein Gene. *Korean Journal of Malacology* **24**: 73-80.
- Lee, Y.-S., Jo, Y.-H., Han, Y.-S., Kho, W.-G., Ahn, I.-Y., and Jeong, K.-H. (2006) Bioaccumulation of Heavy Metals in Intestine of *Nacella concinna*. *Korean Journal of Malacology* **22**: 83-91.
- Lee, Y.-S., Jo, Y.-H., Kim, D.-S., Kim, D.-W., Kim, M.-Y., Choi, S.-H., Yon, J.-O., Byun, I.-S., Kang, B.-R., Jeong, K.-H., and Park, H.-S. (2004) Construction of BLAST Server for Mollusks. *Korean Journal of Malacology* **20**: 165-169.
- Lee, Y.S., Ahn, I.-Y., Kim, W.J., and Jeong, K.H. (2002) An immunohistochemical and ultrastructural study of the heavy metals accumulated in the kidney of an antarctic clam, *Laternula elliptica*. *Korean Journal of Malacology* **18**: 15-21.
- Lee, Y.S., Jo, Y.H., Byun, I.S., Kang, S.W., Cho, E.M., Han, Y.S., Choi, S.-H., Park, H.-S., Kho, W.-G., Ahn, I.-Y., and Jeong, K.-H. (2006) Bioaccumulation of Heavy Metals in *Ruditapes philippinarum*. *Korean Journal of Malacology* **22**: 157-165.
- Leung, K.M.Y., Morley, N.J., Grist, E.P.M., Morrill, D., and Crane, M. (2004) Chronic toxicity of tributyltin on development and reproduction of the hermaphroditic snail *Physa fontinalis*: Influence of population density. *Marine Environmental Research* **58**: 157-162.
- Maltez, H.F., Villanueva Tagle, M., Fernandez de la Campa Mdel, R., and Sanz-Medel, A. (2009) Metal-metallothioneins like proteins investigation by heteroatom-tagged proteomics in two different snails as possible sentinel organisms of metal contamination in freshwater ecosystems. *Analytica chimica acta* **650**: 234-240.
- Mourgaud, Y., Martinez, E., Geffard, A., Andral, B., Stanisiere, J.Y., and Amiard, J.C. (2002) Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. *Biomarkers* **7**: 479-490.
- Nebeker, A.V., and Schuytema, G.S. (1998) Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms, and snails. *Archives of environmental contamination and toxicology* **35**: 441-446.
- O'Connor, T.P., Cantillo, A.Y., and Lauenstein, G.G. (1994) Monitoring of Temporal trends in chemical contamination by the NOAA National Status and Trends Mussel Watch Project. In: *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. (ed. by Kramer, K.J.M.)
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* **4**: 406-425.
- Simes, D.C., Bebianno, M.J., and Moura, J.J. (2003) Isolation and characterisation of metallothionein from the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquatic toxicology* **63**: 307-318.
- Stobaeus, J.K., Heath, G.E., Parkhurst, R.M., Jones, W.O., and Webster, J.E. (1990) A laboratory study of the toxicity of the butanol extract of endod (*Phytolacca dodecandra*) on two species of freshwater fish and two species of aquatic snails. *Veterinary & Human Toxicology* **32**: 212-216.
- Takimoto, Y., Ohshima, M., and Miyamoto, J. (1987)

Molecular cloning and pattern of expression of a Metallothionein Gene from the left-handed shell, *Physa acuta*

- Comparative metabolism of fenitrothion in aquatic organisms. II. Metabolism in the freshwater snails, *Cipangopaludina japonica* and *Physa acuta*. *Ecotoxicology and environmental safety* **13**: 118-125.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution* **24**: 1596-1599.
- Tanguy, A., and Moraga, D. (2001) Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? *Gene* **273**: 123-130.
- Tanguy, A., Mura, C., and Moraga, D. (2001) Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). *Aquatic toxicology* **55**: 35-47.
- Zdobnov, E.M., and Apweiler, R. (2001) InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* **17**: 847-848.
- Zuckermandl, E., and Pauling, L. (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins pp. Academic Press. New York