

# 기수갈고둥 (*Clithon retropictus*) Metallothionein 유전자를 이용한 분자계통분류학적 연구

정준양<sup>1,3</sup>, 상민규<sup>1,3</sup>, 박지은<sup>1,3</sup>, 송대권<sup>1,3</sup>, 홍찬의<sup>1</sup>, 김용태<sup>1</sup>, 신현준<sup>2</sup>, 황희주<sup>3</sup>, 정상목<sup>3</sup>, 박소영<sup>4</sup>, 강세원<sup>5</sup>,  
이준상<sup>6</sup>, 한연수<sup>7</sup>, 박홍석<sup>8</sup>, 이용석<sup>1,3</sup>, 김완중<sup>1</sup>

<sup>1</sup>순천향대학교 자연과학대학 생명과학과, <sup>2</sup>대구대학교 생명과학과, <sup>3</sup>순천향대학교 한국자생동물자원활용  
융복합연구소, <sup>4</sup>국립낙동강생물자원관 전략기획실 혁신성과부, <sup>5</sup>한국생명공학연구원 생물자원센터,  
<sup>6</sup>순천향대학교 자연과학대학 기초과학연구소, <sup>7</sup>전남대학교 농업생명과학대학 식물생명공학부, <sup>8</sup>(주)지앤시바이오

## Molecular Phylogenetic Study of *Clithon retropictus* using metallothionein gene

Jun Yang Jeong<sup>1,3</sup>, Min Kyu Sang<sup>1,3</sup>, Jie Eun Park<sup>1,3</sup>, Dae Kwon Song<sup>1,3</sup>, Chan-Eui Hong<sup>1,3</sup>, Yong  
Tae Kim<sup>1,3</sup>, Hyun Jun Sin<sup>2</sup>, Hee Ju Hwang<sup>3</sup>, Sang-Mok Jung<sup>3</sup>, So Young Park<sup>4</sup>, Se Won Kang<sup>5</sup>,  
Jun Sang Lee<sup>6</sup>, Yeon Soo Han<sup>7</sup>, Hong Seog Park<sup>8</sup>, Yong Seok Lee<sup>1,3</sup> and Wan-Jong Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam 31538, Korea

<sup>2</sup>Department of Biological science, Daegu University, Gyeongsan 38453, Korea

<sup>3</sup>Korea Native Animal Resources Utilization Convergence Research Institute

<sup>4</sup>Performance Management Division, Strategic Planning Department, Nakdonggang National Institute of Biological Resources

<sup>5</sup>Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Jeongseup, Jeonbuk 56212, Korea

<sup>6</sup>Institute for Basic Sciences, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam, 31538, Korea

<sup>7</sup>Department of Applied Biology, Institute of Environmentally-Friendly Agriculture (IEFA), College of Agriculture and Life  
Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

<sup>8</sup>Research Institute, GnC BIO Co., LTD., 621-6 Banseok-dong, Yuseong-gu, Daejeon, 34069, Korea

### ABSTRACT

*Clithon retropictus* is a small gastropod belonging to Neritidae that lives in gravel areas of the brackish water zone. Due to these limited habitat conditions and indiscriminate coastal development, it has been designated as a second-class endangered species since 2005. Although its continued interest is low, it is important to investigate the endangered species-specific characterization and analysis of its genetic information. As of June 2021, genetic information of *C. retropictus* registered in the NCBI was 78 cases, and related studies are also insufficient. In addition, it has not yet been studied the identification and functional characterization of MT gene, which plays a critical role in controlling metal toxicity and oxidative stress, in *C. retropictus*. In this context, we analyzed basic structure and specific domains of MT sequence of *C. retropictus* (CrMT) and the taxonomic location of CrMT with its orthologs registered in NCBI. As a result, CrMT gene containing with mollusca-specific MT pattern was identified in *C. retropictus*. In addition, phylogenetic analysis through the maximum-likelihood method indicates that *C. retropictus* was closely related to the order Lepetelida inhabiting the sea. Taken together, our results may support basic information of endangered species living in brackish water zone.

**Keyword:** *Clithon retropictus*, Metallothionein, phylogenetic tree

### INTRODUCTION

Received: June 15, 2021; Revised: June 23, 2021; Accepted:  
June 30, 2028

Corresponding author: Wan-Jong Kim

Tel: +82 (10) 5455-8942, e-mail: 3c94c3275d@gw.sch.ac.kr  
1225-3480/24792

This is an Open Access Article distributed under the terms  
of the Creative Commons Attribution Non-Commercial  
License with permits unrestricted non-commercial use,  
distribution, and reproducibility in any medium, provided  
the original work is properly cited.

1957년 말의 신장에서 최초로 발견된 단백질인  
Metallothionein (MT) (Margoshes, 1957) 는 중금속, 산화  
제, 열과 냉기, pH 변화 등 다양한 환경과 생물, 비생물적 스  
트레스 요인에 의해 유도될 수 있는 것으로 알려져 있으며  
(Carpene *et al.*, 2007) 다양한 종류의 생물체에 존재하는 가  
장 대표적이고 광범위한 protein superfamily로 알려져 있다.  
Protein superfamily는 일반적으로 구조적, 기계학적 유사성

을 통한 공통조상을 추론 가능하도록 하는 단백질로서 MT의 protein superfamily 로서의 작용은 특징적인 시스테인 서열 패턴으로 잘 알려져 있다. 이러한 서열패턴은 서열을 통해 활용되고 있다. 연체동물에서 C-X-C-X (3) C-T-G-X (3) C-X-C-X- (3) -C-X-C-K 로 나타난다 (Capdevila and Atrian, 2011).

MT는 아미노산 조성에서 시스테인 잔기를 특이적으로 풍부하게 포함하며 특이적으로 풍부한 시스테인 잔기를 가지며 이러한 시스테인 잔기는 금속과 만나 금속-티올레이트 클러스터를 구성하여 아연, 셀레늄과 같은 필수 이온들 뿐만 아니라 생체 이물질인 납과 수은 등과 같은 금속에 큰 친화성을 가진다 (Yutaka Kojima and Kaigi, 1978). 이러한 MT의 금속 친화성은 금속 독성에 대한 보호 (Viarengo *et al.*, 2000) 에 작용하며 산화 스트레스 제어 (Viarengo *et al.*, 2000), 생리적 항상성 조절을 포함하여 다양한 생물학적 기능을 가진다. 최근에는 MT는 금속 독성에 대한 보호 외에도 암 (Yukihiko *et al.*, 1995) 및 신경 질환에 관한 연구보고 등이 매우 많다.

기수갈고둥 (*Clithon retropictus*) 은 멸종위기 야생생물 2급으로 연체동물문, 복족강, 고리갈고둥목, 갈고둥과에 속한다. 크기는 약 1-1.5 cm의 소형 복족류이다. 패각 형태는 둥근 난형이며 나층은 4층으로 성패 대부분의 각층은 주로 체층만 남아있다. 체색은 녹갈색 바탕의 삼각형 노란색과 검은색 반점이 있으며, 체층에는 황갈색 띠가 2열 또는 3열 나타나며 약한 성장맥이 존재한다. 각구는 반원형이고 가장자리는 약간 두꺼우며 비스듬한 내순 중앙에 작은 치상돌기가 여러 개 흔적으로 나타난다. 내순과 축순은 발달된 백색 활층으로 덮여있고, 뚜껑은 석회질이다. 뚜껑의 외순 가장자리를 따라 황색 선이 나타난다. 일정한 유속이 유지되는 기수지역의 크고 작은 돌들이 있는 자갈지대에 서식하며 이러한 까다로운 서식조건과 해안선 개발로 인해 멸종위기에 처해있는 실정으로 그에 대한 생태 및 분류학적 인지도가 낮고 매우 한정된 수계에 분포함으로써 사소한 환경변화에도 큰 피해를 볼 수 있는 종이다 (Lee and son, 2012). 2021년 6월 기준 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 에 등록된 기수갈고둥 (*C. retropictus*) 의 유전정보는 78건이 등록되어있지만 타겟 대부분이 mitochondrion과 microsatellite로 조직 전체의 MT와 관련한 연구가 매우 부족함을 알 수 있다.

따라서 본 연구는 NCBI에 등록된 연체동물 MT (Chung *et al.*, 2018) 서열과 본 실험실에서 진행한 제주배꼽달팽이 (*Aegista chejuensis*) (Park *et al.*, 2018), 산민달팽이 (*Inciliaria fruhstorferi*) (Sang *et al.*, 2017), 귀이빨대칭이 (*Cristaria plicata*) (Chung *et al.*, 2017), 거제외줄달팽이 (*Satsuma myomphala*) (Sang *et al.*, 2016) 를 포함한 기수갈고둥 (*C. retropictus*) 전사체에서 발굴된 MT 서열을 이

용해 분자계통학적 연구를 수행함으로써 이 종의 분류학적 위치를 파악하고 기초적인 분자계통학적 정보를 확보하고자 수행되었다.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Materials

본 연구의 실험에 사용된 종은 기수갈고둥 (*C. retropictus*) 으로 연체동물문 복족강 고리갈고둥목 갈고둥과에 속한다. 대 상종은 일정한 유속이 유지되는 기수지역 자갈지대에 서식하며 영산강유역환경청의 허가를 받아 2014년 경북 울진군에서 채집되었다.

### 2. Methods

#### 1) cDNA library 구축과 염기서열 분석

채집 후 -80°C deep-freezer에서 냉동보관시킨 기수갈고둥 (*Clithon retropictus*) 의 내장낭을 추출한 뒤 Trizol (Thermo Fisher Scientific, USA) 기반 RNA extraction 방법으로 total RNA의 농도와 quality를 확인하였다. 추출된 total RNA를 mRNA로 정제하고, cDNA library 구축을 위해 TruSeq Standard mRNA Library Prep KIT (Illumina, USA) 를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA library에서 fragment를 추출하여 Illumina Hiseq 2500 Sequencer를 이용해 전사체 분석을 실시하였다.

#### 2) Transcriptome data의 생물정보학적 분석 및 Metallothionein 서열 확보

기수갈고둥 (*C. retropictus*) 의 Transcriptome raw data 에 포함된 adapter sequence와 low quality sequence를 제거하기 위해 Cutadapt (Martin, 2011) 와 Sickle (Joshi and Fass, 2011) 을 사용하였다. 그 결과로서 확보된 clean reads를 Trinity program을 사용하여 De novo assembly (Haas *et al.*, 2013) 를 진행한 뒤, clustering 하기 위해 TGICL (TIGR Gene Indices Clustering tools. Ver. 2.1) 를 이용하여 전사체 분석에 사용할 수 있는 unigene 서열들을 얻었다. 얻어낸 unigene 서열을 PANM DB (ver. 2.0) 에 BLAST 프로그램을 이용하여 annotation 한 결과, MT 서열을 포함하는 unigene 을 확보하였다. EMBOSS package의 sixpack program을 사용하여 예측 가능한 6-frame의 모든 아미노산 서열들을 추출하였다. 추출된 서열들의 재검증을 위해 NCBI non-redundant database에서 BLAST (R.C. Braun *et al.*, 2001) 분석을 다시 수행하였다. 이후 family 로 나누어진 15개의 MT 패턴 중 Mollusca 와 일치도가 높은 패턴을 확인 및 비교하여 서열을 선정하였다.

```

3   CAC AAT GCT GTC ACA AAT AAA ATC TCT GAG AAT AGT GTT CAC GTC 47
1   H N A V T N K I S E N S V H V 15
48  ACA CGA GAT CCG TGT GCA TCA CGC TGW TCG TAC CGT GTG CAA ACA 92
16  T R D P C A S R W S Y R V Q T 30
93  ATA ATT AGT TCC GTC AGC GTT GGA GAG GTG AAG CCA TTC GAG AAT 137
31  I I S S V S V G E V K P F E N 45
138 CGT CAC TTG GTA TCG GGG TTT TCT TCG ACT GAT AGC CGT TTC CCA 182
46  R H L L S G R F S L D T R F F 60
183 ACA TCT GAC CTG TTC ACA ATG CCT GAT CCC AAG GGC CAG TGC TGC 227
61  T S D L F T M P D P K G Q C C 75
228 ACT GAG GAG TGC AAG GCC AGC TCC TGC CAG TGT GGT GCC AAC TGC 272
76  T E E C K A S S C Q C G A N C 90
273 AAG TGT GGG GGT GAC TGC CCC TGC AAG GAC TGC CAT AAA CCC ACC 317
91  K C G G D C F C K D C H K P T 105
318 TGC AAC TGC TCA GGC TCG TGT GCC TGT GGC AAG GGC TGC ACA GGG 362
106 C N C S G S C A C G K G C T G 120
363 CCC GAG ACA TGC AAG TGC GGT GAC GAC TGC TCC TGC CAC TAG CTT 407
121 P E T C K C G D G C D G C T C S H * L 135
408 GCC TGG ACT TGG GGA GGC AGC AGT CTG TCT GCT GTC CAC CTG GAC 452
136 A W T W G G S S L S A V H L D 150
453 CTC TCT CCA GTG GAA CTT GGA CCA AAN TGC CAC GCC TGT ATG TGG 497
151 L S S P V E L G P F C H A C M W 165
498 CAT GCA GGT GGC AGA GGA TTT TTG TAA ATG TGA CTT AGG ATA 542
196 H A G G R G D F L * M * L R I 180
543 TAA TAT TAT TGT TGG AAT CTC AGA CTT GAT TTT TGC CGG TGC TCT 587
181 * Y Y C W N L R L D F C R C S 195
588 AGT CCT TTG GCT TTA TCA CGT CTT GAG CTG GTC TTC GTC TTG TCA 632
196 S P L A L S R L E L V F V L S 210
633 GCT ATG AAC AAA TAA AGC AAC TTA CCC TTA AAA AAA AA- 671
211 A M N K * S N L P L K K XXX 223
    
```

Fig. 1. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Clithon retropictus* (A) red box : coding sequence (B) "\*" indicate termination codon.

```

> Clithon retropictus_Metallothionein
MPDPKGCCTEACKASSCQCGANCKCGGDCPCCKDCHKPTC
NCSGS CACGKGTGTPETCKCGDDCSCH
    
```

↓

```

CAC (GKG) CTG (PET) CKC (GDD) CSCH
||| | | | | | | | | | | | | | | | | |
CXC X(3) CTG X(3) CXC X(3) CXCK
    
```

Fig. 2. Specific structural motif for Mollusca MT sequence pattern.

### 3) Multiple alignment 및 phylogenogram 분석

(Chung et al., 2018) 등에 의해 선행 연구된 58개의 full length standard MT 아미노산 서열에서 대상종인 기수갈고둥 (*C. retropictus*) 과 서열 유사도가 높은 MT서열을 찾아낸 뒤 FASTA 형식으로 아미노산 서열을 얻어냈다. 이후 대상 종 및 확보된 MT 서열들의 multi-FASTA file을 MEGAX (Kumar et al., 2018) 의 ClustalX (Larkin et al., 2007) 엔진을 활용하여 multiple alignment를 수행한 후, molecular phylogenetic analysis를 통해 계통수를 구성하였다.

## RESULT AND DISCUSSION

기수갈고둥 (*C. retropictus*) 의 MT 유전자 coding 영역은 총 201 bp로 67개의 아미노산으로 구성되어 있다. Coding region의 GC함유량은 62.7%로 총 126 bp이며 시스테인 잔기는 19개, 라이신 잔기는 7개인 것으로 확인되었다.

Mollusca MT 특이 패턴서열인 CXC- X (3) - CTG - X (3) - CXC - X (3) - CXCK 와 본 연구 대상종인 기수갈고둥 (*C. retropictus*) 에서 확보한 MT 서열을 비교분석한 결과, 특이 패턴에서 lysine으로 나타나는 부위에 histidine이 나타나는 한부분을 제외한 다른 패턴 서열들과는 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

기수갈고둥 (*C. retropictus*) 의 분자계통분류학적 위치를 확인하기 위해 선행연구에서 확보한 31개의 MT 서열중 partial 및 short 서열을 제외한 29개의 서열과 기수갈고둥 (*C. retropictus*) 의 MT 서열로 이루어진 data set을 만들고 MEGAX program을 이용하여 multiple sequence alignment 진행하였다.

이 후 동일한 data set을 이용하여 Maximum-likelihood 방법을 이용해 phylogenogram을 도식하였다. 그 결과 크게는 북극강과 이매패강으로 나뉘었으며 유연관계가 속한 목

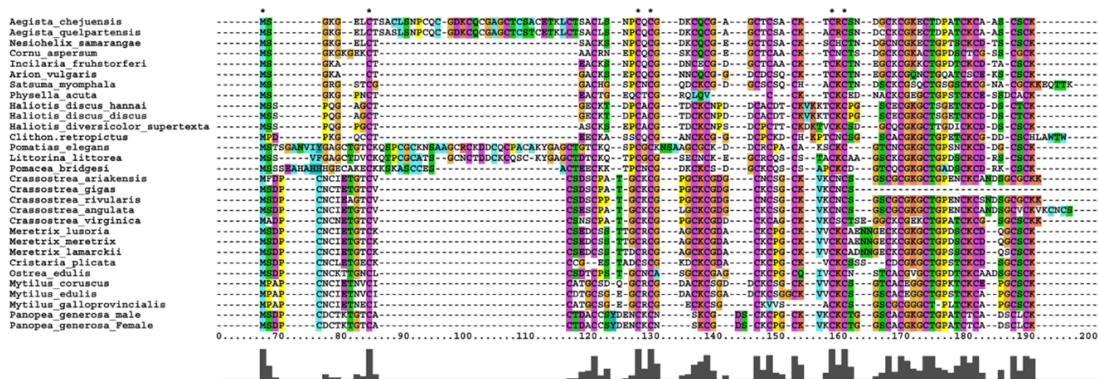


Fig. 3. Multiple sequence alignment of *C. retropictus* and 29 reference MT protein sequence.

**Table. 1.** the dataset used for phylogenetic analysis of MT. (Unregistered is a species that is not registered with the NCBI.)

Accession Number	Species	Category
ALX35069.1	<i>Meretrix lamarekii</i>	
AAS92877.1	<i>Meretrix lusoria</i>	Venerida
ADM96223.1	<i>Meretrix meretrix</i>	
unregistered	<i>Cristaria plicata</i>	Unionida
ATD87395.1	<i>Mytilus coruscus</i>	
CAE11855.1	<i>Mytilus edulis</i>	Mytiloida
ADV56675.1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	
CAC83770.1	<i>Ostrea edulis</i>	
AAK15581.1	<i>Crassostrea angulata</i>	
AEF33388.1	<i>Crassostrea ariakensis</i>	Ostreida
CAC48045.1	<i>Crassostrea gigas</i>	
AEL97645.1	<i>Crassostrea rivularis</i>	
ANU06197.1	<i>Crassostrea virginica</i>	
unregistered	<i>Panopea generosa Female</i>	Myida
unregistered	<i>Panopea generosa male</i>	
ARA71541.1	<i>Pomatias elegans</i>	Littorinimorpha
AST14862.1	<i>Littorina littorea</i>	
AST14869.1	<i>Pomacea bridgesi</i>	Architaenioglossa
APT40583.1	<i>Haliotis discus discus</i>	
AMS38479.1	<i>Haliotis discus hannai</i>	Lepetellida
ABW04628.1	<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	
ADB29127.1	<i>Physella acuta</i>	Hygrophila
AWD77146.1	<i>Arion vulgaris</i>	
ABL73910.1	<i>Cornu aspersum</i>	
ACC17831.1	<i>Nesiohelix samarangae</i>	
unregistered	<i>Satsuma myomphala</i>	Stylommatophora
unregistered	<i>Incilaria fruhstorferi</i>	
unregistered	<i>Aegista chejuensis</i>	
unregistered	<i>Aegista quelpartensis</i>	

(order) 에 따라 grouping 이 된 것을 확인 할 수 있었다. 이 때 목 (order) 수준 뿐만 아니라 서식환경에 따른 육상 gastropoda group과 수생 gastropoda group, 수생 gastropoda group 에서는 민물 group과 해양 group 으로 나뉘며 기수역에 서식하는 기수갈고둥은 해양 group가 가까운 관계로 나타남을 확인 할 수 있다. 이러한 결과는 서식환경에 따른 MT 발현 차이의 가능성을 보여주며 (Lozupone and

Knight, 2005). 이를 통하여 선행 연구사례와 같이 MT서열을 이용한 Phylogenetic dendrogram은 중간 분류에 활용될 수 있음을 재확인 하였다.

#### ACKNOWLEDGEMENT

본 논문은 교육부에서 지원하는 지역대학 우수과학자 (한국

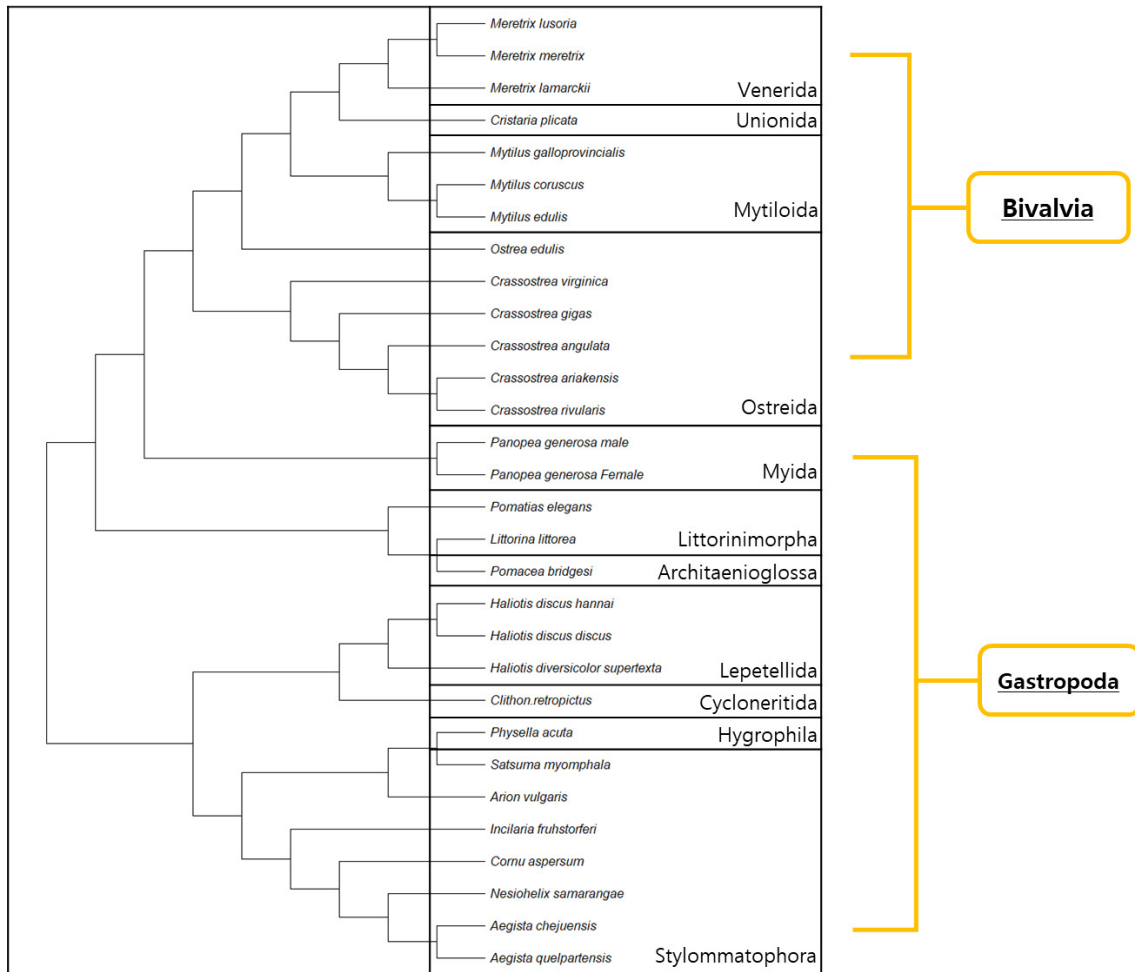


Fig. 4. Molecular phylogenetic analysis on evolutionary relationship by Maximum-likelihood method.

연구재단, NRF-2017R1D1A3B06034971) 및 중점연구소 (NRF-2021R1A6A1A03039503), 2017학년도 순천향대학교 교수 연구년제에 의하여 수행되었습니다.

REFERENCE

A. Viarengo, B. Burlando, N. Ceratto, and I. Panfoli. (2000) Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, **46**: 407-417.

B. J. Haas, A. Papanicolaou, M. Yassour, M. Grabherr, P. D. Blood, J. Bowden, M. B. Couger, D. Eccles, B. Li, M. Lieber, M. D. MacManes, M. Ott, J. Orvis, N. Pochet, F. Strozzi, N. Weeks, R. Westerman, T. William, C. N. Dewey, R. Henschel, R. D. LeDuc, N. Friedman, and A. Regev. (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.*, **8**: 1494-1512.

C. Lozupone, and R. Knight. (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 8228-8235.

E. Carpenne, G. Andreani, and G. Isani. (2007) Metallothionein functions and structural characteristics. *J. Trac. Elem. Med. Biol.*, **21**(1): 35-39.

J. E. Park, H. C. Cho, H. J. Hwang, J. M. Chung, M. K. Sang, H. R. Min, S. W. Kang, S. Y. Park, B. B. Patnaik, W. J. Kim, Y. S. Han, J. S. Lee, and Y. S. Lee. (2018) Molecular Phylogenetics of Korean endemic land snail, *Aegista chejuensis* inferred from Metallothionein gene sequence. *The Korean Journal of Malacology*, **34**: 59-65.

J. M. Chung, H.-J. Hwang, H. R. Min, J. E. Park, M. K. Sang, S. Y. Park, Y.-S. Park, M. Y. Noh, Y. H. Jo, Y. S. Han, J. S. Lee, S.-H. Park, S. W. Kang, C. S. Kang, and Y. S. Lee. (2017) Molecular Phylogenetic Analysis based on Metallothionein Gene Sequence of an Endangered Species *Cristaria plicata* in Korea. *The Korean Journal of Malacology*, **33**: 35-40.

J. M. Chung, H. J. Hwang, M. K. Sang, H. R. Min, J.

- E. Park, H. C. Cho, S. W. Kang, S. Y. Park, W. J. Kim, K. Y. Jung, C. Y. Choi, Y. S. Han, J. S. Lee, and Y. S. Lee. (2018) Reanalysis of molluscan metallothionein genes registered in NCBI. *The Korean Journal of Malacology*, **34**: 157-167.
- Joshi NA, Fass JN. (2011). Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. Available at <https://github.com/najoshi/sickle>.
- Lee, J.S., and Son, M.H. (2012) 한국의 멸종위기 야생생물 적색자료집 6 (연체동물).
- M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**: 2947-2948.
- M. Capdevila, and S. Atrian. (2011) Metallothionein protein evolution: a miniassay. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **16**: 977-989.
- M. K. Sang, H.-J. Hwang, S. W. Kang, S.-H. Park, S. Y. Park, J. M. Chung, J. E. Park, H. R. Min, J. S. Lee, Y. S. Han, H. S. Park, R. Won, and Y. S. Lee. (2017) Molecular phylogenetic study of *Incilaria fruhstorferi* based on Metallothionein gene. *The Korean Journal of Malacology*, **33**: 259-265.
- M. K. Sang, S. W. Kang, H.-J. Hwang, J. M. Chung, D. K. Song, H. R. Min, J. E. Park, H. C. Ha, H. J. Lee, C. E. Hong, Y. M. Ahn, S. Y. Park, Y.-S. Park, H. S. Park, Y. S. Han, J. S. Lee, and Y. S. Lee. (2016) Molecular Phylogenetic Study of the Endangered Land Snail *Satsuma myomphala* Based on Metallothionein Gene. *The Korean Journal of Malacology*, **32**: 263-268.
- M. Margoshes, and Vallee. (1957) A Cadmium protein from equine kidney cortex. *Communications to the Editor*, **79**: 4813-4814.
- M. Martin. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal.*, **1**: 10-12.
- R.C. Braun, K.T. Pedretti, T.L. Casavant, T.E. Scheetz, C.L. Birkett, and C. A. Roberts. (2001) Parallelization of local BLAST service on workstation clusters. *Future Generation Computer Systems*, **17**: 745-754.
- S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.*, **35**: 1547-1549.
- Yukihiro Kondo, Elizabeth S. Woo, Anna E. Michalska, and a. J. S. L. K. H. Andy Choo. (1995) Metallothionein Null Cells Have Increased Sensitivity to Anticancer Drugs. *CANCER RESEARCH*, **55**: 2021-2023.
- Yutaka Kojima, and J. H. R. Kaigi. (1978) Metallothionein. *Trends in Biochemical Sciences*: 90-93.