

인간 구강상피세포를 활용한 카탈라아제 활성조사 실험

채윤경¹, 조원호², 이준규^{2*}

¹정신여자중학교, 서울특별시 138-227

²서울대학교, 서울특별시 151-742

Experiment of the Catalase Activity Assay Using the Epithelial Cells from Human Oral Cavity

Yun-Gyeong Chae¹, Won-Ho Cho² and Joon-Kyu Lee^{2*}

¹Chungshin Girl's Middle School, Seoul 138-227, Korea

²Department of Biology Education, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

요약

본 연구는 고등학교 또는 대학교 일반생물학 수준에서 효소의 활성 조사 등과 같은 생화학 실험에 인간의 구강상피세포를 재료로 사용할 수 있는지를 확인하기 위해 수행하였다. 인간의 구강상피세포는 특별한 준비 없이 실험에 참여하는 학생들로부터 쉽게 얻을 수 있으며, 또한 자신의 몸에서 직접 얻은 세포를 대상으로 실험을 수행함으로써 참여 학생들에게 실험에 대한 흥미를 진작시키는 효과를 기대할 수 있다. 한 사람으로부터 1회에 얻은 구강상피세포에 계면활성제의 농도, NaCl의 농도, 그리고 세포막 분해시간을 다양하게 조작하여 세포추출액을 제조한 후, 추출된 단백질의 양을 조사하고, 그 안에 존재하는 카탈라아제 효소의 활성을 확인하였다. 그 결과 추출 조건에 따라 약 90~190 μg 의 단백질이 추출되었으며, 비이온성 계면활성제의 농도, NaCl의 농도 및 추출액 처리시간을 증가시킬수록 추출된 단백질의 양이 증가하였다. 이렇게 얻은 추출액에서 고등학교 교과서에 많이 등장하는 효소인 카탈라아제의 활성을 조사한 결과 과산화수소를 분해하는 카탈라아제의 활성을 분광광도계를 이용한 흡광도 측정 방법으로 확인할 수 있었다. 여러 세포액 추출 조건에 따라 추출된 단백질의 양은 달랐지만 추출액 내의 카탈라아제 양은 큰 차이를 나타내지 않았으며, 단백질 단위당 효소의 활성도는 추출된 단백질의 양이 적을수록 오히려 높음을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 인간의 구강상피세포로부터 얻은 세포추출액을 이용하여 효소의 활성 조사 실험이 가능함을 확인할 수 있었으며, 이 추출액은 이외에도 단백질 정량, 전기영동, 크로마토그래피, 효소의 특성 조사 등의 다양한 생화학실험에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

주제어 : 인간 구강상피세포, 세포추출액, 카탈라아제 활성

서론

과학 교육은 과학에 관한 지식과 태도를 가르침으로써 현상을 과학적으로 관찰하고 처리하는 능력을 길러 주는 것이라 정의할 수 있다. 따라서 과학 교육에서는 다양한 수단과 방법을 통하여 과학 탐구 능력을 체득하게 하는 일이 매우 중요하다. 과학 수업에 있어서 실험 수업은 과학적 사고력을 개발하는데 효과적인 뿐만 아니라 학생들의 과학에 대한 내적 동기를 유발

할 수 있기 때문에 과학 교수-학습에 있어 필수적인 교수전략이자 학습수단이다(조희형, 박승재, 1995).

국내 청소년의 과학 선호도에 관한 연구(박승재 등, 2002)에 의하면 학생들이 과학을 가장 좋아하는 이유로 '실험 때문'이라는 응답이 가장 많으며, 그 다음으로 '재미있어서'와 '논리적이어서'가 차지하고 있다. 한편으로 과학을 싫어하는 이유로 가장 많은 것은 '어려워서'와 '재미없어서'이며, 또한 '실험 때문'도 싫어하는 이유 중의 하나가 되고 있다. 과학 교육에서 실험 활동의 장점으로는 과학 법칙 및 이론을 시각화할 수 있기 때문에 학생들의 개념발달을 증진시키고, 실험실습을 통해 이론을

*교신저자: joonlee@snu.ac.kr, Tel:02-880-1424, Fax:02-886-2117.

*이 논문은 초청논문임.

증명하거나 확증할 수 있다는 것이다. 또한 실험활동은 학생들에게 동기를 부여하고 흥미와 열정을 불러일으키며, 학습자가 기억하는 것을 돕는 역할도 한다. 따라서 실제로 많은 교사들은 흥미를 불러일으킬 목적으로 실험수업을 하기도 한다 (Henderson and Wellington, 1998).

본 연구에서는 학교 현장에서 쉽게 얻을 수 있으며 실험에 대한 학생들의 흥미와 참여도를 높일 수 있는 좋은 실험재료를 개발하기 위하여 수행되었다. 인간의 구강상피세포는 특별한 준비 없이 실험에 참여하는 학생들로부터 쉽게 얻을 수 있으며, 또한 자신의 몸에서 직접 얻은 세포를 대상으로 실험을 수행하게 되면 참여 학생들에게 실험에 대한 흥미를 진작시키는 효과를 기대할 수 있다. 따라서 구강상피세포가 효소의 활성 등을 비롯한 생화학 실험에 손쉽게 사용될 수 있는지 여부를 조사하고자 하였다. 생명 현상은 일련의 화학반응에 의해 일어나며, 따라서 생체 내 화학반응들과 이를 조절하는 효소의 역할 및 특성을 이해하는 것은 다양한 생명현상을 이해하는데 필수적이다. 제 7차 과학과 교육과정에서 의한 교과서들에서는 10학년 과학의 「물질 대사」 단원과 생물Ⅱ의 「세포의 특성」 단원에서 효소와 관련된 생화학 실험들이 다루어져 있다. 이들 교과서의 효소 관련 단원에서는 주로 소간 또는 감자에 들어 있는 카탈라아제나 아밀라아제 등의 소화효소들이 실험재료로 주로 사용되고 있으며, 실험 방법은 대부분 정량적인 방법이 아니라 효소 반응의 결과를 단순히 관찰하는 실험 방법이 주로 소개되어 있다(교육인적자원부, 2001). 본 연구에서는 학교 현장에서 손쉽게 얻을 수 있는 다양한 생화학 실험재료를 개발하기 위하여, 인간의 구강상피세포에 다양한 조성의 세포용해용액을 처리하여 세포추출액을 제조하였다. 이를 재료로 다양한 생화학실험이 가능한지를 확인하기 위하여 현재 교과서에서 많이 소개되고 있는 카탈라아제의 활성이 이 세포추출액에 얼마나 있는지를 과산화수소의 분해에 따른 흡광도 변화를 측정하여 조사하였다. 이러한 연구를 통하여 인간의 구강상피세포로부터 손쉽게 세포추출액을 제조할 수 있으며, 이를 다양한 생화학실험에 활용할 수 있음을 확인하였다.

연구 재료 및 방법

실험 재료 및 시약

정제된 카탈라아제(Sigma)는 소간에서 추출된 것을 구입하여 사용하였다. 분말 형태의 구입한 카탈라아제를 50 mM 인산

완충용액(pH 7.0)에 녹여 사용하였다. 일반적으로 효소는 저농도에서 활성이 빨리 감소하기 때문에 처음 카탈라아제를 녹일 때는 작은 부피의 용액에 녹였으며, -20 °C에 보관하다 실험하기 직전에 원하는 농도로 희석하여 사용하였다. Bradford 방법을 사용한 단백질 정량에는 Protein Dye Reagent(Bio-Rad)를 사용하였다.

50 mM 인산완충용액(pH 7.0) 1 L를 만들기 위해서는 Na₂HPO₄ 4.68g과 KH₂PO₄ 2.28g을 3차 증류수에 녹이고, HCl로 pH를 7.0으로 맞춘 다음 부피를 1L가 되게 한다. 세포막을 분해하여 세포추출액을 얻기 위해서는 0 mM, 50 mM, 또는 150 mM 농도의 NaCl과 0.25 % 또는 0.5 %의 Nonidet P-40 (NP-40)을 가지는 50 mM 인산완충용액(pH 7.0)을 사용하였다 (Dawson et al., 1986). 비이온성계면활성제로는 NP-40 대신에 Triton X-100 등을 같은 농도로 사용할 수도 있다.

인간의 구강상피세포 수거 및 세포추출액 제조

인간의 구강상피세포를 얻기 위해서 먼저 멸균된 0.9 % 생리식염수 20~25 ml을 입에 넣고 3분 정도 입 운동을 계속하여 구강 내의 상피세포가 떨어져 나오도록 한 후, 입 안의 생리식염수를 50 ml 원심분리튜브에 회수하고 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 구강상피세포를 모은다. 수거된 세포를 1 ml의 50 mM 인산완충용액에 풀어준 다음 1.5 ml 원심분리용 튜브에 넣은 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 모은다.

일반적으로 효소는 세포 밖으로 추출되면 서서히 효소 활성을 잃게 된다. 따라서 효소 활성 실험을 위해 세포추출액을 제조하기 위해서는 낮은 온도를 유지하고, 단백질을 변성시키지 않는 조건에서 신속하게 세포막을 파괴해야 한다. 이를 위해서 본 연구에서는 비이온성 계면활성제인 NP-40이 들어있는 중성의 완충용액을 이용하여 세포막을 파괴하였다. 위에서 설명한 것과 같은 방법으로 모은 세포를 NaCl(0, 50, 또는 150 mM)과 NP-40(0.25 또는 0.5%)를 가지고 있는 50 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 잘 풀어준 다음 10~30분 동안 얼음 속에 보관한다. 이 시간 동안 세포막이 분해되며, 이 시료를 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액, 즉 단백질이 추출된 세포추출액을 새 튜브로 옮긴다(Deutscher, 1990).

단백질 정량

추출된 단백질의 양은 Bradford법을 사용하여 확인하였다.

산성용액에서 Coomassie brilliant blue 염료는 단백질과 결합하게 되고 이로 인해 염료의 최대 흡광도(λ max)는 465nm에서 595nm로 이동하게 된다. 따라서 595nm에서의 흡광도는 단백질의 농도에 비례한다(Bradford, 1976). 이 반응은 발색반응이 2분 내에 완결되고 1시간까지 실온에서 안정하며 비단백질 성분들에 의한 방해도 거의 없다. 또한 실험이 매우 간단하므로 학교 현장에서 사용하기에 용이하다. 단백질 정량을 위해서는 먼저 물에 희석된 시료 0.8 ml와 Dye reagent 0.2 ml을 잘 섞어준 다음 실온에서 약 2분간 방치한 후 595 nm 파장에서 흡광도를 구한다. 이 값으로부터 양을 아는 단백질 시료를 이용하여 만든 표준곡선을 이용하여 단백질의 양을 계산한다. 흡광도를 구할 때 영점은 물 0.8 ml과 Dye reagent 0.2 ml을 섞은 시료로 맞추어 준다.

카탈라아제 효소의 활성도 측정

카탈라아제의 효소 활성은 반응용액 중에 있는 과산화수소 양의 변화를 240 nm에서 흡광도를 측정하여 조사하였다. 카탈라아제의 기질로 사용되는 과산화수소는 240 nm에서 높은 흡광도를 나타내기 때문에 카탈라아제가 작용하여 분해되면 시료의 흡광도가 감소하게 된다(Bergmeyer, 1974). 흡광도를 측정하여 반응용액 속의 과산화수소의 양을 구하기 위하여 먼저 기질로 사용되는 과산화수소를 여러 농도로 희석하고 240 nm에서의 흡광도를 측정하여 과산화수소의 농도와 흡광도 사이의 관계를 나타내는 표준곡선을 구하였다(그림 1). 이 표준곡선을 이용하여 반응 후 측정된 시료의 흡광도로부터 남아있는 과산화수소의 양과 분해된 과산화수소의 양을 구했다.

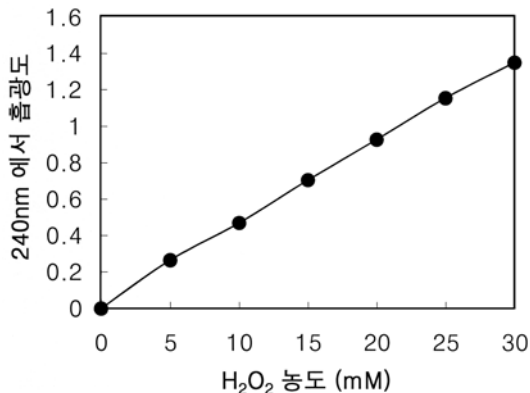


그림 1. 과산화수소의 농도와 흡광도 사이의 관계를 보여주는 표준곡선.

카탈라아제 효소의 활성을 조사하기 위해서 먼저 50 mM 인산완충용액(pH 7.0)에 희석한 50 mM 과산화수소수용액 0.16 ml과 50 mM 인산완충용액으로 희석한 카탈라아제 용액 또는 같은 용액으로 희석한 구강상피세포 추출액 0.24 ml을 섞은 후 상온(25 °C)에서 1 분 간격으로 240 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 이 때 240 nm에서 흡광도를 측정하기 위해서는 자외선이 통과할 수 있는 특별한 분광광도계용 큐벳을 사용하여야 하며, 위의 경우 과산화수소수용액과 희석된 효소용액이 섞인 0.4 ml 용액의 반응 전 과산화수소 농도는 20 mM 이다. 일부의 실험에서는 과산화수소의 최종 농도를 25 mM로 사용하였다. 측정된 흡광도 값으로부터 앞에서 준비한 과산화수소와 흡광도의 표준곡선을 이용하여 과산화수소의 농도 및 양을 구한다. 구강상피세포 추출액을 첨가한 경우에는 그 자체가 첨가된 양에 따라 흡광도의 약간의 증가를 나타내게 되며, 따라서 이 경우에는 완충용액에 동일한 양의 추출액을 첨가하였을 때 증가하는 만큼의 흡광도 값을 보정해 준 후 표준곡선을 이용하여 과산화수소의 양을 계산하여야 한다.

연구 결과 및 논의

인간 구강상피세포의 세포추출액 제조

사람의 구강으로부터 앞서 설명한 방법으로 구강상피세포를 수거하고, 수거된 세포의 수를 혈구계(hemocytometer)로 측정 한 결과 한 번에 얻을 수 있는 구강상피세포의 수는 최대 약 5×10^5 개였다. 이 때 한 번에 얻을 수 있는 세포의 수는 생리식 염수를 입에 담고 있는 동안에 입 운동을 하지 않는 경우에는 크게 감소하였으며, 따라서 실험에 사용할 충분한 숫자의 세포를 확보하기 위해서는 3분 동안 입 운동을 계속하도록 지도하여야 한다.

이렇게 얻은 구강상피세포에 비이온성 계면활성제가 들어 있는 인산 완충용액을 처리하여 세포 추출액을 얻은 결과 표 1에 나타난 바와 같이 세포용해 용액의 조성이나 처리 시간에 따라 87 ~ 192 μ g의 단백질이 추출되었으며, 이들 세포추출액의 단백질 농도는 0.6 ~ 1.3 mg/ml 사이였다. 이 결과로부터 구강상피세포로부터 추출되는 단백질의 양은 계면활성제의 농도와 염의 농도가 높을수록, 그리고 용해용액을 오래 처리할수록 증가함을 알 수 있었다. 따라서 계면활성제의 농도와 염의 농도를 더 높여주고 충분한 시간동안 처리한다면 추출되는 단백질의 양은 더 많아질 수 있을 것으로 예상된다. 그러나 NP-40

표 1. 다양한 세포막 용해 조건에 따라 구강상피세포에서 추출되는 단백질의 양. (A) 150 mM의 NaCl과 0.25 % 또는 0.5 %의 NP-40을 가지고 있는 세포용해 용액을 10분간 처리한 경우 추출된 단백질의 양. (B) 0.25 %의 NP-40과 0 mM, 50 mM, 또는 150mM의 NaCl을 가지고 있는 세포용해 용액을 10분간 처리한 경우 추출된 단백질의 양. (C) 0.25 %의 NP-40과 150 mM의 NaCl을 포함하고 있는 세포용해용액을 10, 20, 또는 40 분간 처리한 경우 추출되는 단백질의 양.

계면활성제의 농도	0.25% NP-40	0.5% NP-40
단백질 양(μ g)	127.8	192

NaCl의 농도 (mM)	0	50	150
단백질 양(μ g)	87.6	135	153

세포막 분해 시간(분)	10	20	40
단백질 양(μ g)	100.8	118.8	153

의 농도를 1 %로 처리한 경우에는 카탈라아제 활성 조사 시 흡광도에 영향을 미쳤으며, 따라서 NP-40의 양은 0.5 % 보다 더 높이지 않는 것이 좋다.

정제된 카탈라아제의 효소활성 분석

구강상피세포 추출액 안에 있는 카탈라아제 효소의 활성을 조사하기 전에 먼저 정제된 카탈라아제를 이용하여 대조군 실험을 수행하였다. 소간에서 추출되어 정제된 카탈라아제를 구입하여, 인산완충용액으로 적절히 희석한 후 과산화수소를 분해하는 카탈라아제의 활성을 앞서 설명한 흡광도 측정 방법으로 조사하였다. 그 결과 그림 2와 같이 효소 처리시간에 따른 과산화수소의 분해량과 기질 농도에 따른 과산화수소의 초기 분해속도 등 효소의 활성을 손쉽게 구할 수 있었다. 그림 2A에서 0.75 unit(1 unit는 25 °C에서 1분 당 1 μ mole의 과산화수소를 분해하는 활성 정도)를 처리한 경우 0.5 unit를 처리한 경우에 비해 반응속도가 많이 증가하지 않게 나타난 것은 효소를 많이 처리할수록 반응용액 내의 과산화수소가 빨리 분해되기 때문에 기질의 농도가 감소하고, 따라서 반응속도가 시간에 따라 급격히 감소되기 때문이다. 따라서 효소의 양에 따른 분해량의 차이를 명확히 보기 위해서는 지나치게 많은 양의 효소를 첨가하지 않아야 한다. 기질 농도에 따른 카탈라아제의 반응

속도를 조사한 결과 여기서 사용한 실험조건 하에서는 기질 농도가 25 mM까지 증가될수록 계속 반응속도가 증가하였다. 따라서 이후 구강상피세포로부터 추출한 단백질에서 카탈라아제의 활성을 실험할 때는 반응용액의 과산화수소 농도를 25 mM로 사용하였다.

구강상피세포 추출액의 카탈라아제 활성 조사

먼저 구강상피세포로부터 얻은 세포추출액에 카탈라아제 활성이 있는지를 확인해 보았다. 이를 위하여 25mM 과산화수소 용액에 0.25 %의 NP-40과 150 mM의 NaCl을 가지고 있는 세포 용해용액을 이용하여 추출한 구강상피세포 추출액 50 μ l를 섞고 상온(25 °C)에서 흡광도를 240 nm 파장에서 측정하였다(그림 3A). 그 결과 반응시간의 증가에 따라 분해된 과산화수소의 양이 점차 증가함을 알 수 있었으며, 약 10분이 경과한 이

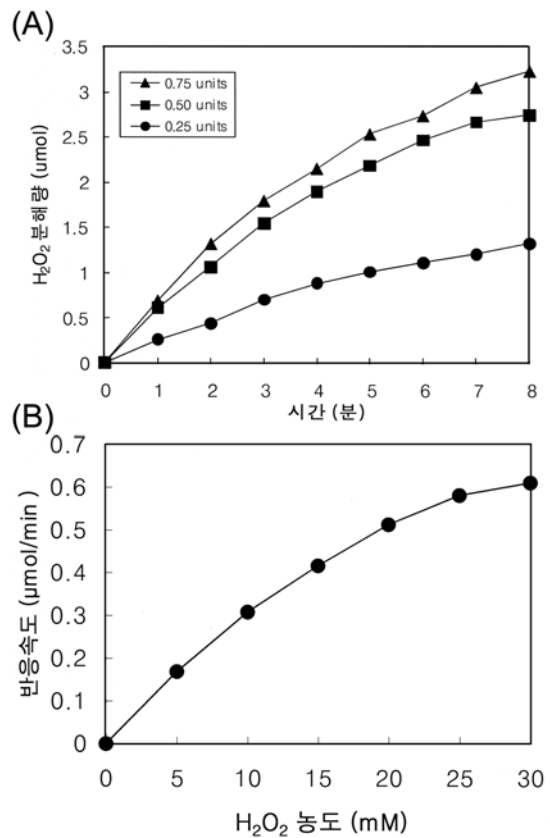


그림 2. 정제된 카탈라아제의 효소 활성 분석. (A) 다양한 양의 카탈라아제를 처리한 경우의 시간에 따른 과산화수소 분해량. (B) 기질인 과산화수소의 농도에 따른 초기 반응속도.

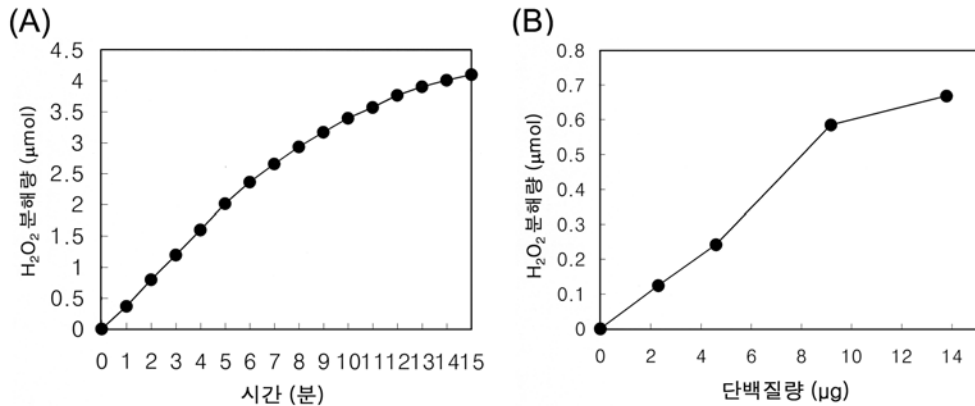


그림 3. 구강세포 추출액의 카탈라아제 활성 조사. (A) 반응시간에 따른 과산화수소의 분해량. (B) 구강상피세포 추출액의 양에 따른 과산화수소의 분해량

후에는 과산화수소가 분해되는 속도가 점차 감소함을 알 수 있었다. 반응속도가 점차 감소하는 이유는 반응용액 내의 과산화수소가 분해됨에 따라 남아있는 과산화수소의 농도가 낮아져 효소의 반응속도가 점차 낮아지기 때문인 것으로 여겨진다. 또한 반응에 사용된 구강상피세포 추출액의 양을 증가시킨 결과 그림 3B와 같이 2.3 μg, 4.6 μg, 9.2 μg, 13.2 μg으로 단백질 양이 증가함에 따라 초기 반응속도, 즉 1 분당 분해된 과산화수소의 양이 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 구강상피세포 추출액 내에 과산화수소를 분해하는 카탈라아제의 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

한편 구강상피세포 추출액은 앞서 살펴본 바와 같이 세포용해용액의 조성 및 처리시간에 따라 추출된 단백질의 양이 다르기 때문에, 추출조건에 따라 추출액의 카탈라아제 활성이 변화하는지 여부를 살펴보았다. 이를 위하여 앞서와 같이 계면활성제의 농도, 염의 농도 또는 처리시간을 달리하여 추출된 구강상피세포 추출액을 대상으로 각각 카탈라아제 활성을 측정하였고, 이를 사용된 단백질 양으로 나누어 각 추출액의 특이활성도 (specific activity, 단백질 단위량 당 효소의 활성)를 조사하였다 (그림 4). 그 결과 추출액의 특이활성도는 세포용해용액의 처리시간에 따라 각각 4.64 unit/mg, 4.17 unit/mg, 4.18 unit/mg으로 큰 차이를 보이지 않았다. 반면에 염을 처리하지 않은 경우에는 카탈라아제 특이활성도가 9.33 unit/mg으로 염을 50 mM이나 150 mM로 처리한 경우(5.16 unit/mg, 5.02 unit/mg)에 비해 오히려 높음을 알 수 있었다. 또한 계면활성제의 농도도 0.5%로 처리한 경우(5.31 unit/mg)보다 0.25%로 낮게 처리한 경우(9.39 mg/ml)에 오히려 특이활성도가 높음을 알 수 있었

다. 이러한 결과로부터 구강상피세포에 있는 카탈라아제 활성은 계면활성제나 염의 농도가 낮은 경우나 용해용액을 짧게 처리한 경우에도 잘 추출됨을 알 수 있었다.

이상에서 살펴본 바와 같이 구강상피세포 추출액의 제조는 세포의 수거에서 추출액 분리까지 전체의 세포추출액 제조 과정이 30분 이내에 끝날 수 있음을 확인할 수 있었으며, 또한 비이온성 계면활성제를 포함하고 있는 용액을 사용하기만 하면 비교적 다양한 조건에서도 모두 카탈라아제 효소 활성을 가지는 세포추출액을 얻을 수 있음을 알게 되었다. 본 연구에서는 이 구강상피세포 추출액을 카탈라아제 효소 활성 실험에만 한정적으로 이용하였지만, 이것은 쉽고 빠르게 어떤 곳에서도 얻을 수 있기 때문에 단백질 정량, 전기영동이나 크로마토그래피

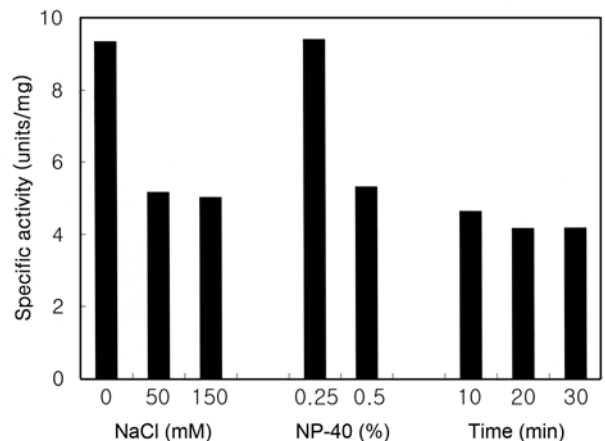


그림 4. 다양한 조건에서 제조된 구강세포추출액의 단백질 단위량 당 카탈라아제 활성도.

등과 같은 다양한 생화학 실험에서도 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 한편 본 실험에서 사용한 과산화수소수의 흡광도 측정용 카탈라아제 활성 조사 방법은 먼저 과산화수소 농도와 흡광도 사이의 관계를 나타내는 표준곡선을 구해야 한다는 번거로움이 있기는 하지만, 이후의 실험과정이 간단하고 매우 빠르며, 무엇보다도 실험 결과의 정량적 분석이 가능하다는 장점을 지니고 있다. 따라서 이러한 효소 활성 조사방법을 사용한다면 효소 또는 기질의 양 변화나 온도의 변화 등과 같이 다양한 반응 조건에 따른 반응속도의 차이 등을 관찰하고 분석하는데 크게 도움이 될 수 있을 것으로 여겨진다.

ABSTRACT

This study was performed to examine the usefulness of epidermal cells from human oral cavity for biochemical experiments such as enzyme assay in high school or undergraduate level biology courses. Epidermal cells from human oral cavity are easy to obtain from participating students in any type of classroom activities, and the use of their own cells in experiments would be helpful to increase the students' interest about experiments. We prepared crude cell extracts from human epidermal cells using various conditions, and examined the catalase activity of these extracts. About 90 to 190 μ g of proteins were extracted from the epidermal cells obtained from a single person, and the amount of extracted proteins depended on the concentrations of non-ionic detergents and salts in extraction buffer. The increase of extraction time also affected the amount of proteins in extracts. When we examined the catalase activities by spectrophotometric analysis of the degradation of hydrogen peroxide, the significant levels of catalase activities were detected from these extracts. Although the amounts of total proteins in extracts were different depending on the extraction conditions, catalase activities were detected from any extracts regardless of the conditions of extraction, and the highest specific activity of catalase was obtained from the extracts showing the lowest level of protein

extraction. From these results we found that the catalase activity in epidermal cells can be extracted very easily and rapidly by various extraction conditions. Although we have not tested other applications in this study, we firmly believe that the extracts from epidermal cells of human oral cavity would be very useful for many other biochemical experiments such as the quantitation of proteins, characterization of enzyme properties, chromatography, and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Key words : Epidermal cells from human oral cavity, crude cell extracts, catalase activity

참고문헌

교육인적자원부 (2001) 고등학교 교육과정 해설. (주)대한교과서 주식회사. p24-25, 192.

박승재, 임성민, 김희백, 박종윤, 유준희, 윤진, 전우수 (2002) 초중등 학생의 과학 선호도 증진 정책연구, 국가과학기술자문위원회.

조희영, 박승재 (1995) 과학 교수-학습. 교육과학사.

Bergmeyer HU (1974) Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, p438.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-54.

Dawson RMC, Elliott DC, Elliott WH and Jones KM (1986) Data for Biochemical Research. Clarendon press · Oxford. 3rd Ed, Chap18:426-448.

Deutscher MP (1990) Guide to Protein Purification. Academic Press, p38-89.

Henderson J and Wellington J (1998) Lowering the language barrier in learning and teaching science. The School science review 79(288):35-46.