
순창고등학교 미소 동아리 보고서

〈김치 속 마이크로바이옴 분석〉

(2023.03.15.~2023.03.26.)

강○정, 김○은, 김○라, 송○진, 김○진, 박○빈, 최○나

강○정, 최○나

목 차

I. 서론	3
II. 본론	4
1. 실험 설명	
가. DNA 추출	4
나. PCR(Polymerase chain react, 중합효소 연쇄 반응)	4
2. 탐구	
가. 디지털 PCR 테스트(Digital Polymerase Chain Reaction)	6
나. Real-Time PCR(qPCR)과 Conventional PCR 비교 분석	7
다. 성매개감염 병원체 검출을 위한 실시간중합효소연쇄반응 검사법	9
라. 유사실험 (브로콜리 DNA 추출 실험)	10
III. 결론	12
1. 순창고 과학동아리 미소 실험 결과 (DNA 농도 및 순도 분석)	12
2. 결론 및 제언	17
3. 출처	17

I. 서론

1) 실험일

: 3월 29일

2) 보고서 작성자

: 강민정, 최라나

3 실험 장소

: 순창 발효미생물산업진흥원

4) 실험 동기

: PCR 실험을 하기위해 DNA를 추출하였고, PCR 과정이 어떻게 이루어지는지 이해하기 위해 실험을 하게 되었다.

5) 실험 목표

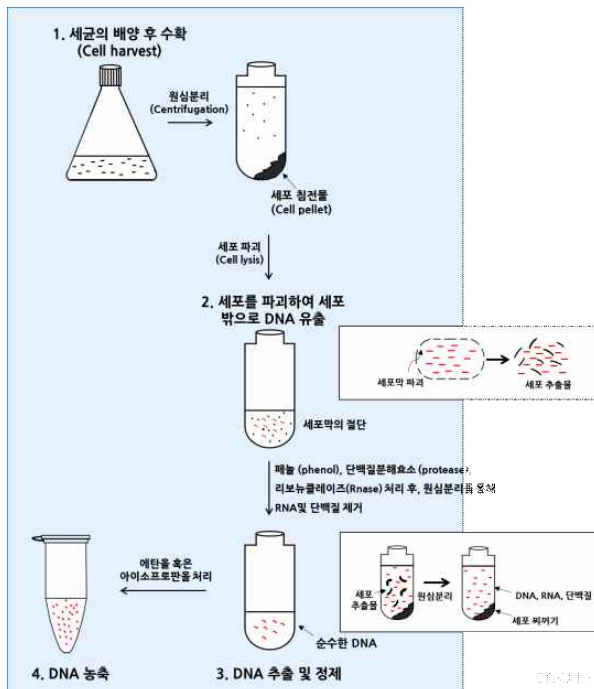
: DNA를 추출하고 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 DNA의 특정 영역을 증폭시키기, 추출한 DNA의 특징을 분석하기 위해서 DNA QC(Quality control) 품질분석 실험을 진행하여 추출한 김치 DNA의 특성 파악하기.

II. 본론

1. 실험 설명

가. DNA 추출

- ① 세포 내 DNA가 세포 밖으로 유출될 수 있도록 세포벽 및 세포막을 제거(화학 약품을 사용하여 세포벽 용해)한다.
- ② 원심분리를 이용하여 밀도차에 따른 층을 나눈다. (미생물 위, 고분자(검치) 밀) 미생물이 있는 위 층을 분리하여 다시 세포벽을 제거(Bead를 넣고 Vortex mixer를 사용하여 미생물을 때림)한다.
- ③ 다시 원심분리를 하여 층을 나눈다. (DNA 위, 세포 소기관 등 불순물 밀)
- ④ 이후 핵산 자동화 추출 장비를 이용하여 DNA를 추출한다.



나. PCR(Polymerase chain react, 중합효소 연쇄 반응)

: DNA 또는 RNA의 특정 영역을 시험관 내에 대량으로 증폭시키는 기술

1) PCR의 과정

① DNA의 변성(Denaturation)

92°C ~ 95°C로 가열하여 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리시킨다.

② 프라이머의 결합(Annealing)

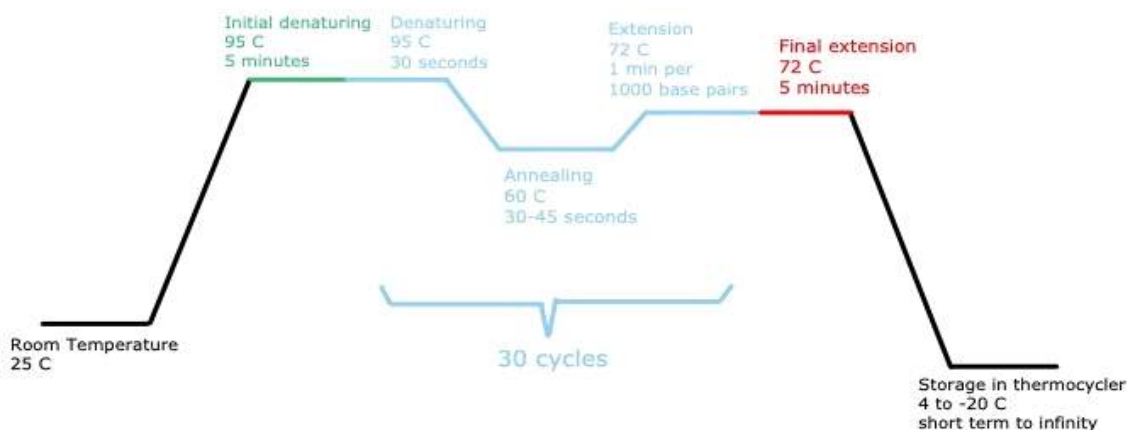
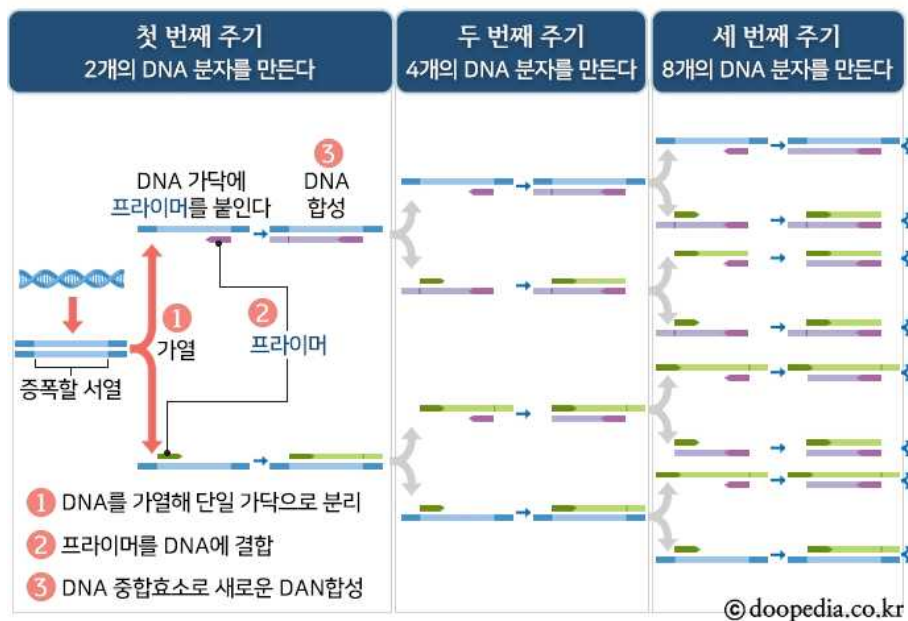
50 ~ 60에서 진행되며, 프라이머가 자신의 염기서열과 상보적인 염기서열을 갖고 있는 DNA에 결합한다. 보통 30초 가량 진행된다.

③DNA의 신장(Elongation)

70 ~ 74에서 시행하며 원하는 PCR 산물의 크기가 크거나 반응 효소의 농도가 낮을 때에는 시간을 연장시킬 수 있다. 보통 원하는 PCR 산물의 크기 1kb마다 1분 정도의 시간을 배당하면 충분히 반응이 일어나며, 마지막 Cycle에는 약 10분 정도 시간을 충분히 주는 것이 적당하다.

이 3단계의 과정이 1cycle이고, cycle이 반복되면서 증폭되는 DNA양은 기존 DNA에 2배가 된다.

중합효소 연쇄 반응(PCR) 과정



2) PCR의 반응 조건

1- DNA 변성(Denaturation)

이중가닥을 단일가닥으로 분리시키는 과정에서 온도가 너무 높아지거나 처리 시간을 지나치게 늘리면 내열성 DNA Polymerase라 해도 활성을 잃게 된다.

2- Primer의 결합(Annealing)

Annealing하는 과정에서 Annealing 온도를 높이면 Primer-주형 DNA의 Mismatch가 감소되어 반응 특이성이 높아진다.

3- 신장반응(Extension)

신장에 필요한 시간은 주형 DNA의 농도, 증폭단편의 크기, 반응 온도에 따라 좌우된다.

4- Cycle의 수

PCR의 경우 n 회의 cycle로 표적배열은 2^n 배가 되지만 실제로는 이보다 낮다.

효율이 저하되는 이유로는

- ① DNA polymerase의 실활 및 증폭단편(주형DNA)의 증가로 인한 효소분자/주형비의 부족
- ② 증폭단편간의 annealing되는 속도가 빨라짐에 따른 primer의 anneal과 주형 DNA 간 결합 장애
- ③ Pyrophosphate 축적으로 인한 효소반응 저해 등이 있다.

2. 탐구

가. 디지털 PCR 테스트(Digital Polymerase Chain Reaction)

: 3세대 PCR로, 절대 정량으로 측정하여 정확한 수치로 유전자의 양을 알 수 있다. 디지털 PCR은 코로나 바이러스와 같은 바이러스 정량 검출, 변이종 바이러스의 구분, 암 유전자 및 변이 유전자 검출, 유전자 변형 농작물 검사(GMO: Genetically Modified Organism), 유전자 서열 분석 등에 활용할 수 있다.

- BEAMing

: 비드(Beads), 에멀전(Emulsion), 증폭(Amplification), 자기(Magnetic)를 의미하는 고감도의 Digital PCR을 이용한 에멀전 PCR과 유세포 분석법(Flow Cytometry)을 결합하여 DNA에 존재하는 특정 체세포 돌연변이를 식별하고 정량화하는 방법

환자의 혈액 또는 혈장에서 DNA를 분리하는 것을 시작으로 하여 PCR로 관심있는 타겟 DNA부분을 증폭시킨다. 증폭된 DNA 주형은 스트렙-비오틴 상호작용을 통해 유증수(Water-in-oil)에멀전의 수성 미세방울로 나누어진다. 수성상(Aqueous Phase)을 오일로 유화시켜, 독립된 물방울(Water Droplet)을 만든다. 각 액적(Droplet)에서 독립적인 PCR 반응이 수행된다.

-> BEAMing은 암 연구에서 종종 액체 생검으로 알려진 순환 종양 DNA (ctDNA)의 평가를 수행하는 데 사용된다. 또한 샘플의 돌연변이 분획을 정량화할 수 있으며, 이는 직렬 플라즈마 측정을 사용하여 시간이 지남에 따라 추적될 수 있다.

나. Real-Time PCR(qPCR)과 Conventional PCR 비교 분석

(1) Conventional PCR

1. DNA 증폭 이후 결과확인

DNA가 증폭을 모두 마친 후 결과확인이 가능하다. 증폭 중에는 아무것도 확인할 수 없다.

2. PCR 후 확인과정 필요

증폭을 마친 PCR product를 전기영동한 뒤 UV하에서 관찰하는 확인과정이 별도로 필요하다. 따라서 PCR Thermal Cycler 이외에 전기영동장치와 Gel documentation system 장비가 필요하며 소요시간도 긴 단점이 있다.

3. DNA probe가 필요하지 않음.

주형 DNA가닥에 Forward primer와 Reverse primer가 붙어 반응이 일어나므로 별도의 probe가 필요하지 않다.

4. PCR Product의 Size(bp)를 알 수 있음

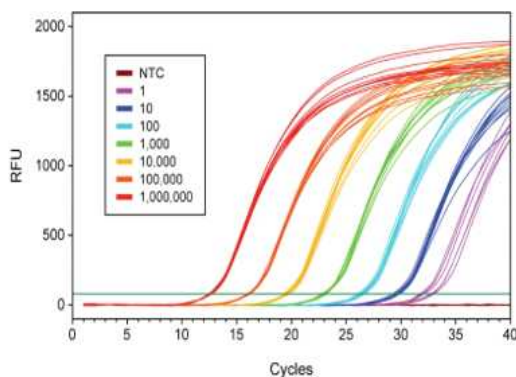
증폭산물의 크기를 알 수 있는 큰 장점이 있다. 전기영동 결과 밴드두께로 증폭산물의 양을 대략적으로 알 수 있다. 또한, Product를 얻을 수 있으므로 Sequencing 등 추가적인 실험이 가능하다. 반면에 정량이 불가능하며 결과가 숫자로 나타나지 않는다.

5. 낮은 민감도

Conventional PCR은 Real-time PCR에 비해 Extention time이 길어 민감도가 떨어진다. 따라서 비특이적인 반응이 발생할 확률이 상대적으로 높다.

(2) Real time PCR

Real time PCR법은 PCR 증폭산물의 증가를 실시간으로 모니터링하여 해석하는 기술이다.



1. DNA 증폭 중 확인가능

DNA가 증폭하는 cycle마다 실시간으로 증폭곡선 확인이 가능하다.

2. PCR 후 확인 과정 불필요

실시간으로 결과 확인이 가능하므로 PCR 반응 후 별도의 확인 과정이 필요하지 않다. PCR 반응이 끝남과 동시에 수치화된 여러 값들을 통해 결과 분석이 가능하다. 따라서 PCR 장비 외에 필요한 기기는 없으며 소요시간이 짧다는 장점을 갖는다.

3. DNA probe가 필요함 (또는 SYBR Green)

Forward primer와 Reverse primer 이외에 DNA probe가 필요하다.

(형광 dye가 결합 되어있는 probe가 있어야 형광 값을 읽을 수 있기 때문)

4. 정량분석이 가능하나 PCR Product의 Size(bp)를 알 수 없음

농도를 알고 있는 DNA를 이용하여 Standard curve를 그린 후 DNA샘플의 Ct value를 대입하여 정량분석이 가능하다.

5. 높은 민감도

Probe의 특이도가 높기 때문에 Conventional PCR에 비해 높은 정확도를 갖는다.

Real time PCR의 형광 물질의 종류

Real-time PCR 장비는 기본적으로 다양한 파장대의 형광값을 측정하여 결과로 산출해내는 방식이다. 이를 바탕으로 파장의 범위별로 다른 형광값을 띄는 형광 dye를 종류별로 선정하여 이를 각 target probe 에 붙여주는 것이다. 다양한 종류의 형광 dye 가 존재하며, 크게는 6 종류로 나누어진다. (아래 표 참고)

FLUOROPHORE	ALTERNATE DYES	DYE-S-T ₁₈		RECOMMENDED QUENCHER	BHQ Dye QUENCHING RANGE
		EX	EM		
Biosearch Blue™		352	447	BHQ-1	BHQ-1 430-520 nm
FAM		495	520	BHQ-1	
TET		521	536	BHQ-1	
CAL Fluor® Gold 540	VIC/TET/JOE	522	544	BHQ-1	
JOE		529	555	BHQ-1	BHQ-1 480-580 nm
VIC		538	554		
HEX		535	556	BHQ-1	
CAL Fluor Orange 560	VIC/HEX/JOE	538	559	BHQ-1	
Quasar® 570	CY3	548	566	BHQ-2	BHQ-2* 559-670 nm
Cy™ 3		549	566		
NED		546	575		
TAMRA		557	583	BHQ-2	
CAL Fluor Red 590	TAMRA	569	591	BHQ-2	BHQ-2* 559-670 nm
Cy 3.5		581	596		
ROX		586	610	BHQ-2	
CAL Fluor Red 610	TEXAS RED/ROX/ALEXA FLUOR® 594	590	610	BHQ-2	
Texas Red®		597	616		BHQ-2* 559-670 nm
CAL Fluor Red 635	LC RED® 640	618	637	BHQ-2	
Pulsar® 650		460	650	BHQ-2	
Cy 5		646	669		
Quasar 670	CY5	647	670	BHQ-2*, BHQ-3	BHQ-3 610-730 nm
Cy 5.5		675	694		
Quasar 705	CY5.5	690	705	BHQ-2*, BHQ-3	

다. 성매개감염 병원체 검출을 위한 실시간중합효소연쇄반응 검사법

① 성매개 감염(sexually transmitted infection, STI)이란?

성매개감염(sexually transmitted infection, STI)은 흔한 감염성 질환으로, 사람과 사람 사이에 성접촉을 통해 전파되는 감염을 말한다. 성매개 감염은 심각한 합병증 및 후유증을 유발할 수 있으며, 임신 및 출산에도 영향을 주어 태아와 신생아 건강에도 영향을 미치기 때문에 정확한 진단과 적절한 치료가 매우 중요하다. 성매개감염은 원인 병원체가 세균, 바이러스, 원충, 진균 등으로 다양하다. 원인 병원체 또는 질환별로 다양한 진단법이 존재하는데, 기존 방법으로는 검사가 어려운 병원체들이 많아, 최근에는 분자생물학적 진단법으로 검출하는 방법이 추천되고 있다.

② 성매개 감염과 실시간 중합효소연쇄반응

실시간중합효소연쇄반응(real-time PCR)은 중합효소연쇄반응 이후 전기영동 또는 부합 반응과 같은 추가 과정 없이 결과 분석이 가능하므로, 기존 중합효소연쇄반응보다 증폭산물에 의한 오염 가능성이 개선되고 검사소요시간도 단축되는 장점이 있다. 따라서 다중 실시간중합효소연쇄반응(multiplex real-time PCR) 방법은 성매개 감염의 여러원인 병원체들을 동시에 검출할 수 있는 민감하고 비용 효과적인 검사법이라고 할 수 있다.

성매개감염에 대한 검사실 진단 검사는 증상이 있는 환자에서 정확한 원인 병원체를 진단하는 데 필수적이다. 또한, 특히 임신부를 포함한 성적으로 활동적인 여성에서의 CT와 NG를 비롯한 성매개감염 검진은, 합병증을 억제하고 성매개감염을 예방하는 데 효과적이므로, 선별검사를 시행하는 것이 권고되고 있다. 따라서, 성매개감염의 진단 검사는 정확하고 효율적으로 진행되어야 한다. 이를 위해 최근 다양한 병원체를 한번에 민감하게 검출할 수 있는 다중 실시간중합효소연쇄반응 검사법이 유용하게 쓰이고 있으며, 최근 GeneFinder assay와 Real-Q assay 등의 검사가 국내 검사실에 도입되었다.

라. 유사실험 (브로콜리 DNA 추출 실험 - 생명과학II)

목표 : 브로콜리 DNA를 추출하여 확인할 수 있다.

준비물 : 브로콜리, 바나나, 100% 에탄올(차갑게 보관), 아세트올세인 용액, 소금, 주방용 세제, 증류수, 막사발, 눈금실린더, 페트리 접시, 비커, 거즈, 돋보기, 저울, 가위, 붓, 거름종이, 유리 막대, 나무젓가락, 1.5ml e-tube, 알코올램프, 삼발이, 쇠그물, 핀셋, 피펫, 장갑.

1) 실험 과정

[브로콜리 DNA 추출하기]

1. 브로콜리(바나나)를 50g을 준비한다.

2. 준비한 브로콜리(바나나)를 막자 사발에 넣고 으갠다.

* 으깨는 이유

동물세포와 다르게 식물세포에는 단단한 세포벽이 있기 때문에 물리적인 힘을 가해 세포벽을 파괴해주어 DNA가 빠져나올 수 있게 해줘야 한다.

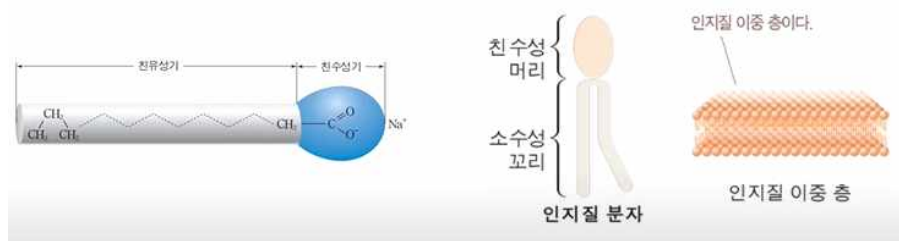


3. 증류수 150ml, 소금 2g, 세제 7ml을 넣어 소금-세제액을 만든다.

4. 소금-세제액 100ml을 과정 2의 막자사발에 넣고 10분 동안 조심스럽게 으갠다.

* 계면활성제 역할

세포벽을 파괴하는 역할을 한다. 계면활성제는 머리 부분은 친수성, 꼬리부분은 소수성의 구조를 가진다. 이때 계면활성제는 세포막 인지질층에 있는 머리 부분을 분리시켜서 세포막을 파괴하게 되고, 따라서 DNA가 세포벽 밖으로 빠져나올 수 있게 된다.



* 염화나트륨 역할

염화 나트륨은 물에 녹으면 염화이온과 나트륨이온으로 분리된다. 이때 알코올을 넣어주면 양전하를 띤 나트륨 이온은 음전하를 띤 DNA와 결합하여 흰색을 띠게 되고 DNA는 덩어리게 된다.

5. 과정 4의 용액 100ml을 거즈를 이용하여 비커에 거른다.

6. 과정 5의 비커에 유리 막대를 대고 에탄올 200ml을 조심스럽게 붓는다.

*에탄올 역할

에탄올은 물에 녹아있는 DNA의 용해도를 낮추어 에탄올 층에서 육안에 보이도록 해준다. 이때 차가운 에탄올을 사용해야하는데 에탄올이 차가워야 DNA의 손상을 최소화 할수 있으며 DNA의 응축을 도울 수 있다.

7. 흰색의 가는 선 모양의 물질이 생기면 돋보기로 관찰한 후, 나무젓가락으로 여러 번 휘감아 올린다.

2) 실험 결과

[브로콜리 DNA 확인하기]

1. 추출한 DNA를 1.5ml e-tube에 넣고 증류수 1ml과 섞는다.

2. e-tube 용액의 일부를 붓에 묻혀 거름종이에 DNA라 쓴 후 거름종이를 말린다.

3. 거름종이를 아세트올세인 용액에 15분 정도 넣어 두 자.

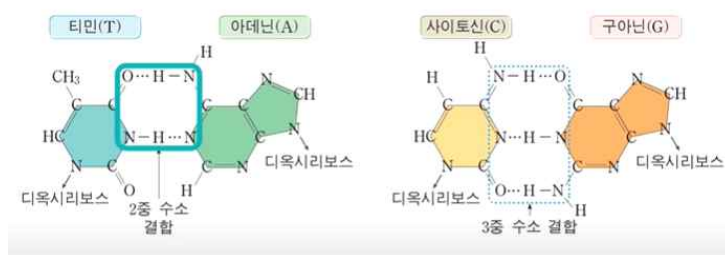
4. 거름종이를 끓는 물에 5분간 넣었다가 꺼내어 거름종이의 색 변화를 관찰한다.



3) 실험 분석 및 탐구

DNA란?

DNA는 디옥시리보핵산(Deoxyribo nucleic acid)의 줄임말이다. 유전정보를 가지고 있고 이중 나선 구조로 존재한다. DNA는 뉴클레오타이드의 사슬로 4개의 염기인 아데닌(A), 티민(T), 구아닌(G), 사이토신(C)으로 구성되어 있다. 아데닌은 티민과, 구아닌은 사이토신과 짝을 이루고 있다. 이 염기들이 나열된 염기 서열이 생물의 특성을 결정하는 정보를 가지고 있는 것이다. DNA는 모든 생물체의 핵에 존재하는 일종의 설계도라고 볼 수 있다.



Ⅲ. 결론

순창고등학교 과학동아리 교육 실험 결과 김치 DNA 추출 및 품질 분석(QC, Quality Control)

실험 방법

김치 시료

- 본 연구에 사용된 김치 시료는 배추김치 2종, 석박지 1종이 사용되었음

DNA 추출

- 김치 시료로부터 DNA를 추출하기 위한 kit로 QIAGEN사의 DNeasy PowerFood Microbial Kit를 사용하여 사용자 매뉴얼에 따라 추출하였으며, lysis 이후의 과정(DNA binding, Wash, Elution)은 QIAGEN사의 핵산자동추출장비를 이용하였음



< DNeasy PowerFood Microbial Kit >



< 핵산자동화추출장비 >

DNeasy PowerFood Microbial Kit Procedure

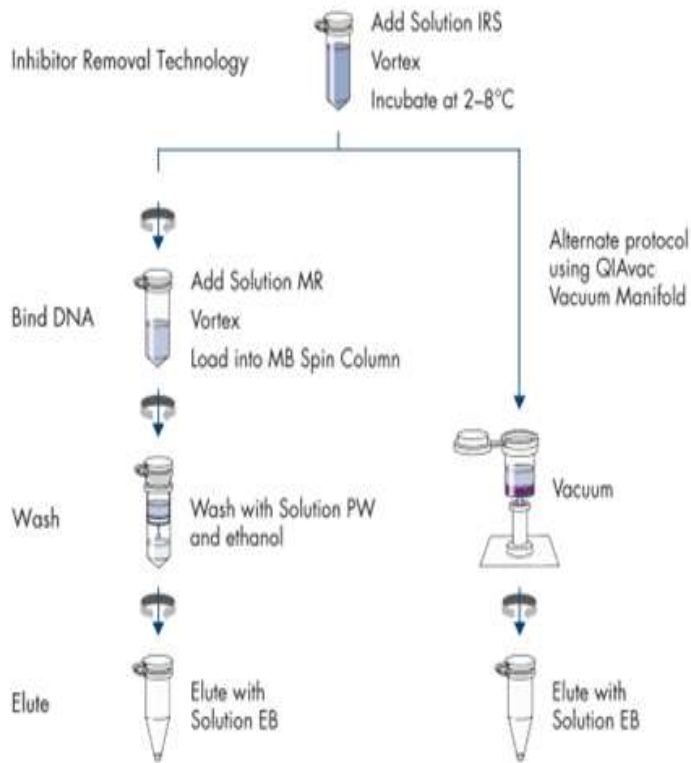
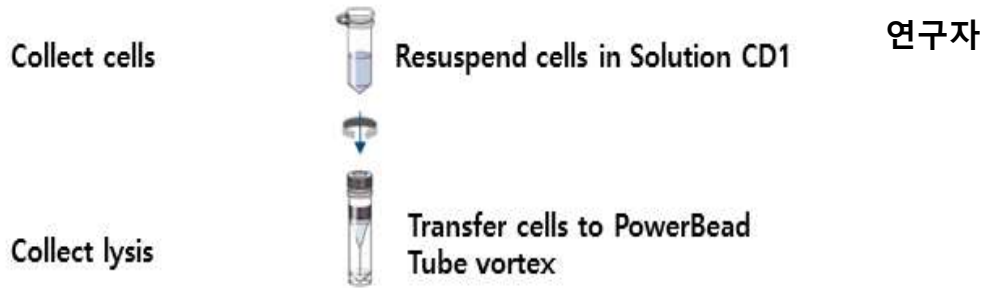
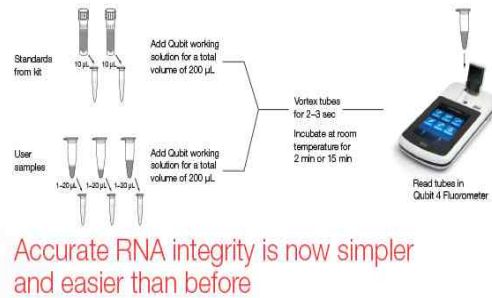


Figure 1. DNeasy PowerFood Microbial Kit Procedure.

< DNA 추출 과정 모식도 >

DNA 품질 분석 <DNA 농도(Concentration) 분석>

- 김치 시료로부터 추출한 DNA의 농도 측정을 위해 Qubit 4 장비를 이용하였음
- 김치 시료로부터 추출한 DNA의 정확한 dsDNA (double strand DNA)의 농도를 측정하기 위한 형광 kit로는 Qubit™ dsDNA HS and BR assay kit를 사용하였음



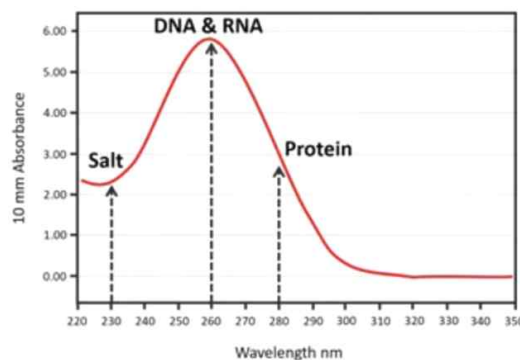
< Qubit™ dsDNA HS and BR assay kit >

< Qubit 4 장비 >

- 추출한 DNA 2 uL과 Qubit working solution (형광물질) 198 uL을 혼합한 후 2분간 상온에서 반응하였음
- dsDNA 농도를 Qubit 4 Fluorometer로 측정하였음
- 16S rRNA 유전자 library 제작을 위해서는 dsDNA의 농도가 **5 ng/uL** 이상 필요

DNA 품질 분석 <DNA 순도(Purity) 분석>

- 김치 시료로부터 추출한 DNA의 순도 측정을 위해 Nano drop 장비를 이용하였음
- 16S rRNA 유전자 library 제작을 위해서는 260nm/280nm 값이 **1.8** 이상 필요

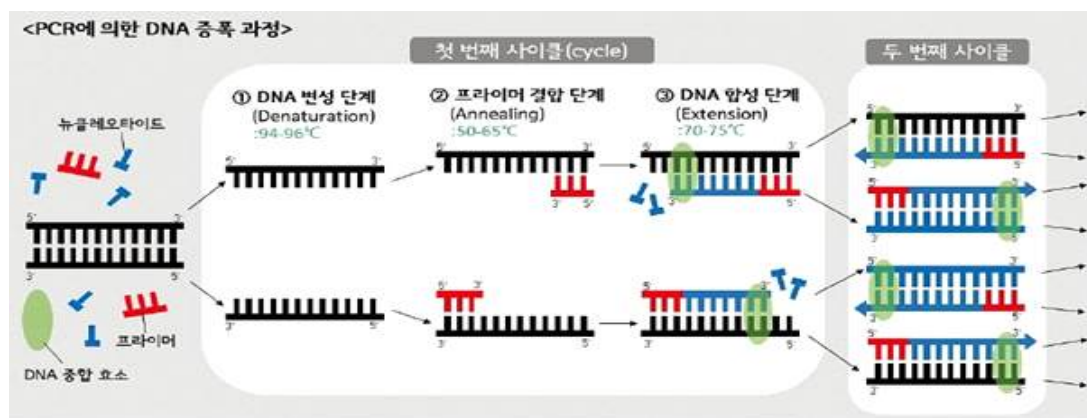


- 자외선 흡수 복사량은 그 양과 비례하며, 고유의 구조에 의해 흡수가 극대화되는 파장이 다름
- 230nm : 페놀, EDTA, salt 등 / 260nm : 핵산(DNA&RNA) / 280nm : 단백질
- 230nm, 260nm, 280nm의 파장의 흡광도를 측정하여 불순물 대비 DNA의 양(=260nm/280nm)을 측정하여 DNA 순도를 결정함

16S rRNA 유전자 증폭을 위한 PCR(Polymerase Chain Reaction, 중합효소 연쇄반응)

- QC를 완료한 DNA를 주형으로 16S rRNA 유전자를 증폭하였음
- PCR을 위한 PCR kit로는 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix를 사용하였음
- 추출한 DNA 2.5 uL, forward primer 5 uL, reverse primer 5 uL, 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix 12.5 uL을 혼합하여 총 25 uL volume의 PCR mix를 제작하였음
- PCR을 수행하기 위한 조건은 아래와 같음

Steps	Temp (°C)	Time	cycle
Pre-Denaturation	95	3 min	1
Denaturation	95	30 sec	25
Annealing	55	30 sec	
Polymerization	72	30 sec	
Final extension	72	5 min	1



< PCR에 의한 DNA 증폭 과정 >

Procedure

- 1 Set up the following reaction of DNA, 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix, and primers:

	Volume	
Microbial DNA (5 ng/μl)	2.5 μl	→ DNA
Amplicon PCR Forward Primer 1 μM	5 μl	→ Forward primer
Amplicon PCR Reverse Primer 1 μM	5 μl	→ Reverse primer
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5 μl	→ NT, Polymerase, etc...
Total	25 μl	

- 2 Seal plate and perform PCR in a thermal cycler using the following program:
 - 95°C for 3 minutes
 - 25 cycles of:
 - 95°C for 30 seconds
 - 55°C for 30 seconds
 - 72°C for 30 seconds
 - 72°C for 5 minutes
 - Hold at 4°C

< 16S rRNA 유전자 증폭을 위한 PCR mix 조성 및 조건 >

※ 16S rRNA 유전자 증폭 이후의 실험 step 및 마이크로바이옴 분석은 진흥원에서 수행하였음

실험 결과

DNA 품질 분석 (DNA 농도 및 순도 분석)

- 배추김치 2종과 석박지 1종의 김치로부터 추출한 DNA의 농도와 순도를 측정한 결과는 아래와 같음

Sample	DNA 농도 (ng/uL)	순도 (Abs260 _{nm} /280 _{nm})
배추김치 1	14.1	1.86
배추김치 2	13.7	1.85
석박지	29.5	1.85

- 3종의 김치시료로부터 추출한 DNA가 16S rRNA 유전자 library를 제작하기 위한 DNA의 조건(**농도 5 ng/uL 이상, 순도 1.8 이상**)을 모두 만족하는 것으로 나타남

※ DNA 순도 측정을 위한 Nanodrop에서 또한 핵산의 양을 측정할 수 있으나, Nanodrop에서 나타나는 농도는 dsDNA 외에 ssDNA 또는 다양한 RNA가 포함되어 있어 Qubit 4 장비에서 측정한 농도보다 일반적으로 높게 나타남

Sample	DNA 농도 (ng/uL)	
	Qubit 4 (only dsDNA)	Nano drop (dsDNA + ssDNA + RNA)
배추김치 1	14.1	196.6
배추김치 2	13.7	288.4
석박지	29.5	222.6

1, 결론 및 제언

DNA를 추출하고 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 DNA의 특정 영역을 증폭시켰고, 추출한 DNA의 특징을 분석하기 위해서 DNA QC(Quality control) 품질분석 실험을 진행하여 추출한 김치 DNA의 특성을 파악하였다. 이 실험을 통해 중합효소 연쇄반응의 실험과정을 이해할 수 있었다. 나아가 Real-Time PCR(qPCR)과 Conventional PCR을 비교분석 하며 국내에 도입된 실시간 중합효소 연쇄반응의 효과에 대해 고찰하였다. 2020년 3월 세계 보건기구에서 세계적인 전염병 대유행으로 선언된 '심각한 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스 2(SARS-CoV-2)'에 의한 질병인 코로나-19는 대부분의 나라에서 선별 및 확진을 위한 진단검사법으로 실시간 중합효소 연쇄반응 검사를 시행한다. 이 사례를 통해 과학기술의 발전에 따른 의료기술의 발전이 코로나 감염병 등 질병의 치료에 도움을 주며 인간의 삶의 질 향상과 수명연장에 기여하고 있다는 것을 알 수 있고 앞으로도 보건의료 기술의 발전을 도모해 국민들의 생명과 건강에 직결되는 질병 진단의 정확도를 높이고 치료의 기회를 증가시켜 새로운 혁신을 이끌어 내야한다.

2. 출처

<https://terms.naver.com/entry.naver?docId=5894586&cid=61232&categoryId=61232>

<http://compbio.korea.ac.kr/wiki/images/8/82/TakarPCRprotocol.pdf>

https://ko.wikipedia.org/wiki/%EC%A4%91%ED%95%A9%ED%9A%A8%EC%86%8C_%EC%97%B0%EC%87%84_%EB%B0%98%EC%9D%91

<https://terms.naver.com/entry.naver?docId=6628099&cid=42346&categoryId=42346>

https://ko.wikipedia.org/wiki/BEAMing#cite_note-3

<https://youtu.be/5acN6fxok6o>

<https://www.kci.go.kr/kciportal/ci/sereArticleSearch/ciSereArtiView.kci?sereArticleSearchBean.artId=ART002206582>