

臺灣二〇〇三年國際科學展覽會

科 別：生物化學科

作品名稱：雞胰臟去氧核糖核酸水解？多型性之探討

學 校：臺北市立第一女子高級中學

作 者：陳一帆

作者簡介



就讀北一女中三年級，課餘時間喜愛聽聽音樂、運動等。高二開始進行這份生物科的專題研究，曾經爲了專研，學校課業都拋至一旁；曾經爲了專研，不知道多少個晚上坐在電腦前期待天永遠不要亮…；但也曾經因爲一點點小小的成果、進展，開心的忘了之前所有的不順遂、不愉快。對未來，我想我也會選擇爲了那一點點小小的開心而執著。

雞胰臟之去氧核糖核酸水解酶多型性之探討

摘要

去氧核糖核酸水解酶，(deoxyribonuclease, 簡稱 DNase) 為一種核酸內切酶。目前研究得最透徹的去氧核糖核酸水解酶為牛胰臟的 DNase I，有四種以上的同功酶存在。而牛和雞的 DNA 序列有極高的相似度，由之前的研究中在等電點聚焦電泳法顯示雞胰臟 DNase I 具 A、B 兩種同功酶，本實驗則希望能進一步了解兩種同功酶的差異原因。

在抽取 RNA 後，以 RT-PCR 方法合成 cDNA，將其以限制酶切割，再以大腸桿菌作為載體進行轉殖及繁殖培養，最後將其 DNA 定序後進行分析比較。目前已完成第一次定序，但因引子接合過程中有部分位置錯亂造成殖體無法進行表現。另外在此次所得之序列中有發現一個胺基酸的轉變，而其是否為多型性之表現則有待進一步的實驗證實。

Abstract

The most advanced research on deoxyribonuclease in current states is on the bovine pancreatic DNase I, more than four of which isoforms have been found. It is shown that the DNA sequences of chicken and bovine have relatively high similarity. In addition, according to the result of isoelectric focusing from previous researches, chicken pancreatic DNaseI has two isoforms (A and B.) In this research, the author expects to establish more knowledge on the differences on the isoforms and the causes.

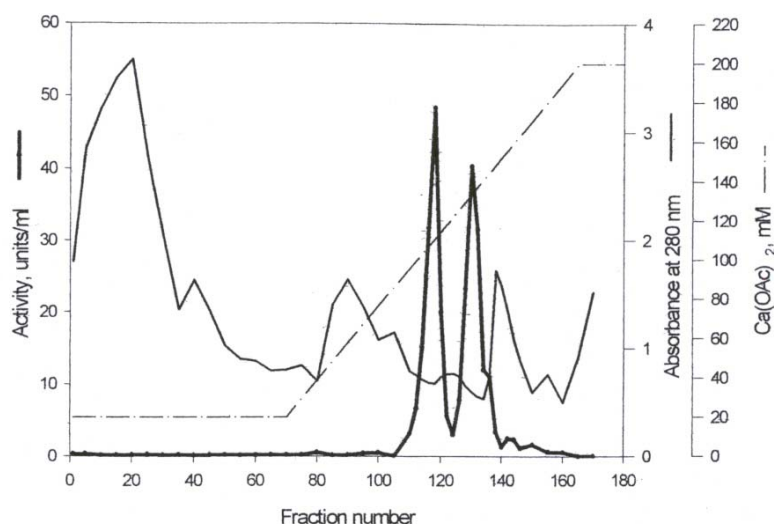
After receiving the RNA, the RT-PCR is preformed to incorporate the cDNA, which is later cleaved by restriction enzyme and inserted into the plasmid DNA of the E. coli host cell to be cloned. So far a polynucleotide sequence has been deduced from clones of the cDNA, but it cannot be expressed successfully in E.coli due to few random mistaken splicing. There is an alternation of one amino acid, and whether it is the actual state of isoform or not still requires further proof.

壹、研究動機

去氧核糖核酸水解酶(deoxyribonuclease, 簡稱 DNase)為一種核酸內切酶。由目前的研究發現兩種 DNase, 分別為 DNase I 和 DNase II。目前研究得最透徹的去氧核糖核酸水解酶為牛胰臟的 DNase I, 於 1903 在牛胰臟的萃取物中被發現。經過 phosphocellulose 做色層分析發現有四個較為明顯的活性峰, 並分別以 A、B、C、D 命名, 其差異處在於部分胺基酸序列或者附加醣鏈的不同。而後續的研究利用等電點聚焦活性染色法及其他活性染色法, 發現也有其他種 DNase (如 E、F、X) 的存在。

由於上述對牛胰臟去氧核糖核酸水解酶的認識, 又得知雞胰臟和牛胰臟的胺基酸序列相似程度高達 68%, 引發我對於雞胰臟 DNase I 的好奇。由於我所在的實驗室(台大醫學院生化所)有學長姐曾經做過此方面的探討, 由等電點聚焦電泳法顯示雞胰臟 DNase I 有等電點不同之 A、B 兩種形式(如圖一所示), 但目前對其胺基酸及附加醣鏈之組成及性質是否有差異仍不甚清楚。

本實驗之動機, 是希望能對目前所發現的雞胰臟中 DNase I 之兩種同功酶有進一步的認知與了解。



圖一、Elution profile for cation-exchange column chromatography of chicken DNase I.

(摘自：陳麗華【雞胰臟去氧核糖核酸水解酶之純化及其同功酶之研究】。台大醫學院生化所碩士論文。)

貳、研究目的

抽取雞胰臟之 RNA 以 RT-PCR 方法合成 cDNA，將其以限制酶切割，再以大腸桿菌作為殖體進行轉殖及繁殖培養，最後將其 DNA 定序後進行分析比較。

定序後的分析比較希望能找出兩種 isoforms 的差異原因，是否因為胺基酸組成序列或附加醣鏈的不同所影響，更進一步則希望能探討其為個體或品種上的差異問題。

參、實驗材料與儀器

材料：

新鮮雞胰臟

液態氮

GTC 溶液(guanidinium thiocyanate citrate)

NaOAc (sodium acetate)(pH 4.0)

DEPC-H₂O saturated phenol

CIAA

Isopropanol

Phenol chloroform

酒精

formaldehyde

50% formamide

MOPS

formaldehyde gel-loading buffer

EtBr (ethidium bromide)

1% agarose 膠體

CapSwitch oligonucleotide

oligo dT 引子(5'-(dT)₃₀N₁N-3')

DEPC-H₂O

first strand buffer

DTT (dithiothreitol)

dNTP Mix

MMLV reverse transcriptase

reaction buffer

enzyme cocktail

T4 DNA polymerase

stop solution

PCR Buffer

Taq DNA polymerase

Primer 5' & 3'

TE

Buffer Gex

Wash I Buffer

Wash II Buffer

儀器：

研钵

離心機

光度比色計

DNA 電泳槽

RNA 電泳槽

震盪機

肆、實驗方法

一、以庫存之 cDNA 進行轉殖

種菌。取實驗室庫存之 cDNA 轉殖入大腸桿菌載體，使其進行大量複製，再以 PCR 放大倍數，並以 DNA 電泳檢視其結果。

二、RNA 抽取

本實驗運用 Chomczynski 研發的方法(Chomczynski & Sacchi, 1987)進行 RNA 抽取。先取約 0.2~0.4 的新鮮雞胰臟，在每 0.1 克組織中加入 1 ml GTC 溶液(guanidinium thiocyanate citrate) [4 M guanidinium thiocyanate、25 mM sodium citrate(pH 7.0)、0.5% sarcosyl 與 0.1 M β -MSH (β -mercaptoethanol)，溶液配置均使用 DEPC (diethyl pyrocarbonate)-H₂O]以打斷 RNA 的氫鍵及硫鍵，並抑制組織中 RNase 的活性。加入液態氮使組織硬化後，以研钵磨至粉狀後倒入 15 ml 離心管中。

依序加入 2 ml GTC、1/10 體積(0.3 ml)的 2 M NaOAc (sodium acetate)(pH 4.0)、等體積(3 ml)的 DEPC-H₂O saturated phenol(可拉住蛋白質極性部分，具分層功能) 與 1/5 體積(0.6 ml) CIAA [chloroform: isoamylalcohol (24:1, v/v)]混合均勻之後，至於冰上 15 分鐘，在 4°C 下，以 5000 rpm (4200 g)速度離心 15 分鐘。

待離心分層後，將含有 RNA 的上層水溶液吸到新的離心管，加入等體積的 isopropanol 或酒精，將離心管放在-20°C 冰箱靜置 1 小時。接著在 4°C 下，以 5000rpm (4200 g)離心 15 分鐘。最後將所得的沉澱物以 200 μ l GTC 溶液溶解，並將溶液吸出置於 1.5 ml 微量離心管。

以等體積 phenol/chloroform 再萃取一次，在 25°C 以 12000rpm (12900 g)離心 3 分鐘，待分層後將上層水溶液吸到新的離心管。加入等體積的 isopropanol 後，放在-20°C 冰箱 1 小時，再取出離心管，在 4°C 下以 12000rpm (12900 g)離心 15 分鐘。所得之沉澱 RNA，加入 200 μ l 預冷於-20°C 含 DEPC-H₂O 的 70% 酒精，在稍微潤濕後，移除 70% 酒精，再將沉澱物進行室溫乾燥。最後加入 50 μ l 的 GTC 溶液溶解沉澱，若沉澱物不易溶解，則加熱至 65°C 以幫助溶解。將溶解液加入 1/10 倍體積(5 μ l)的 3 M NaOAc (pH 5.2)及 2 倍體積(100 μ l)的-20°C 絕對酒精，混合均勻，置於-20°C 靜置到隔天。

取少許 RNA 溶液做適當稀釋(1/50-1/200)，利用光度比色計測其在 260 nm 及 280 nm 之吸光值，純化的 RNA 溶液其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值應介於 1.8-2.0 之間。以 OD₂₆₀ 的吸光值作為 RNA 濃度計算依據，可得知 total RNA 濃度。當 OD₂₆₀ 吸收為 1 時，濃度約為 40 μ g/ml。

取約 10 μ g 之 total RNA 溶於含 0.22 M formaldehyde、50% formamide 與 1 x MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid)緩衝溶液 [20 mM MOPS (pH7.0)、5 mM NaOAc 與 1 mM EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) (pH 8.0)]的溶液中，置於 65°C 下加熱 15 分鐘，使 RNA 變性。再迅速移至冰上，防止 RNA renature，再加入

1/10 倍體積(2.5 μ l)的 formaldehyde gel-loading buffer [0.25% bromophenol blue 與 50% glycerol]及 1 μ l EtBr (ethidium bromide) (0.05mg/ml)混合均勻後，注入到含 0.22 M formaldehyde 與 1 x MOPS 緩衝溶液的 1% agarose 膠體中，在 1 x MOPS 的緩衝溶液中跑電泳。觀察 18S、28S rRNA 是否完整，作為品質的檢視，確定是否有被降解。

三、cDNA 合成

取 1 μ g 的 total RNA，加入 1 μ l 的 CapSwitch oligonucleotide (10 μ M) 與 1 μ l 的 oligo dT 引子(5'-(dT)₃₀N₁N-3')(10 μ M)後，加入 DEPC-H₂O，使其總體積為 5 μ l。之後至於 70°C 加熱 2 分鐘。再放於冰上 2 分鐘，然後離心。接著加入 2 μ l 的 5 x first strand buffer、1 μ l 的 DTT (dithiothreitol) (20 mM)與 1 μ l 的 dNTP Mix (10 mM)混合均勻後，再加入 1 μ l 的 MMLV reverse transcriptase (100 U/ μ l)。於 42°C 反應 1 小時，即可得 1st strand cDNA。

在 1st strand cDNA 產物中，加入 48.4 μ l 的滅菌二次水、16 μ l 的 5 x reaction buffer、1.6 μ l 的 dNTP Mix (10mM)與 4 μ l 的 enzyme cocktail (含 DNA polymerase I，DNA ligase，RNase H)以合成 2nd strand cDNA。在 16°C 下反應 1.5 小時後，加入 1 μ l 的 T4 DNA polymerase (10 U/ μ l)，於 42°C 下作用 45 分鐘。最後加入 4 μ l 的 stop solution 以停止反應，即可得合成好之雙股 cDNA。

四、聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)

1. 引子設計

雞的引子是參考雞胰臟之 cDNA 的核苷酸序列所設計。

5'-端引子：

[C5'NcoI]5'-GTG GCC ATG GCA CTG AGG ATC A-3'

3'-端引子(I)：

[C3'Xho]5'-TGG CTC GAG GCT CAG GTC TCA-3'

3'-端引子(II)：

[C3'Xho]5'-CTC TCG AGT CAG CGG GCC TTC A-3'

2. cDNA 的擴大作用

依序加入 1 μ l 的 cDNA、1 μ l 的 dNTP、5 μ l 的 10 x Buffer、1 μ l 的 10 μ M 5'-primer、1 μ l 的 10 μ M 3'-primer、1 μ l 的 Taq DNA polymerase 以及 40 μ l 的 DdH₂O。

將之置於 PCR Thermocycler 上進行聚合梅連鎖反應。反應條件如下：

1 cycle of 94°C for 5 min

35 cycle of :

94°C for 1 min

60°C for 1 min

72°C for 1 min

1 cycle of 72°C for 10 min

經過上述反應後以 1% Agrose Gel 跑電泳確認大小。

大小確定後可將 DNA 稀釋 10-100 倍後再經由 PCR 方法複製 DNA，再以 1% Agarose Gel 跑電泳確認大小。

五、產物回收

1. 酒精沉澱

在 PCR 產物中加入兩倍體積的 95% EtOH (-20°C)及 1/10 倍體積的 3M NaOAc (pH 5.2)，置於-80°C 冰箱 20 分鐘後，在 4°C 下離心(12000 轉)。之後再以 70%的 EtOH 清洗，蒸乾後回溶於 TE。

2. 產物回收(使用 Viogene Kit—Gel Extraction System)

取下電泳洋菜膠上分子量約 750bp 處，加入 0.5ml 的 Buffer Gex 中，在 60°C 下加熱 10 分鐘使洋菜膠熔化。將回收過濾管放入 collection tube 中，加入先前熔化的洋菜膠液體，離心 1 分鐘(13000 轉)，倒掉濾液。在加入 0.5ml 的 Wash I Buffer 離心 1 分鐘，倒除濾液。加入 0.7ml 的 Wash II Buffer 離心 10 分鐘，將過濾管移置心的 1.5ml tube 中，在管中央垂直加入 30 的 ddH₂O 或 TE，擺放 1 分鐘後再離心 2 分鐘，得到回收完成的 DNA，冷藏於-20°C。

六、限制酶切割

取之前回收所得產物 30 μ l，加入 4 μ l 的 10x universal buffer，以及限制酶 NcoI 5'、XhoI 3' 各 1 μ l，補入二次水 4 μ l，使得總體積為 40 μ l。置入 37°C incubator 放置一到二小時後，跑 DNA 電泳確定其限制酶切割狀況。

七、接合反應

先跑 DNA 電泳以亮度比例推算 ligation plasmid 與 S.D. cDNA 的含量。

取 Chicken DNaseI cDNA 25 λ ，加入 pET15b (plasmid for Expression by T7RNA polymerase) 0.5 λ 、liagse 3 λ 、及 ligase buffer 3 λ ，最後加入 ddH₂O 使總體積達 30 λ 。(ddH₂O 的量可視需要而有所調整。)

放置於 16°C 水浴槽約 14 到 16 小時後跑膠檢視其接合結果。

八、轉型作用

1. 勝任菌體(competent bacterial cells)的製備

從 plate 上挑出單一的大腸桿菌 DH5 α 菌落，於 3 ml 的 LB (Luria-Bertani) 培養液中，在 37°C 振盪培養約 16 小時。第二天取 200 μ l 菌液至 50ml 的 LB 培養液中，於 37°C 振盪培養 3 小時後檢測 OD₆₀₀。當 OD₆₀₀ 達 0.4，將培養液置於 4°C，以 3,000 rpm (1500 g) 離心 10 分鐘，取得菌體沉澱之後，以 10ml 的 100 mM CaCl₂ 小心懸浮菌體，在 4°C 下，2,500 rpm (1041 g) 離心 5 分鐘，最後將所得到的菌體沉澱，加入 2.5 ml 的溶液[100 mM CaCl₂ 15% glycerol 與 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝溶液]，小心懸浮菌體後，分裝置微量離心管(200 μ l)，儲存於 -70°C。

2. Transformation

取勝任菌液 100 μ l，加入 3 μ l 的 DNA 接合混合液(ligation mixture)，小心混合後，冰浴 20 分鐘，再置於 42°C 水浴中加熱 45 秒，進行熱休克反應。接著將菌液置於冰中，再加入 100 μ l 的 LB 培養液小心混合，於 37°C 培養 20 分鐘後，塗抹在含 50 μ g/ml 的 ampicillin 的 LB plate 上，最後置於 37°C 培養箱中培養 12-14 小時。

九、質體 DNA 的分離

從 plate 上挑出單一菌落，置於 3ml LB 培養液中，在 37°C 培養 14-16 小時之後倒入 1.5ml 離心管中，於 25°C 用 12000 rpm (12900 g) 離心 1 分鐘以沉澱菌體。

移去上清培養液，加入 100 μ l Solution I [50mM glucose、10mM EDTA 與 25mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝溶液]，激烈混合使菌體回溶。接著加入 200 μ l Solution II [含 0.2 N NaOH 與 1% SDS (sodium dodecyl sulfate)]，緩慢反轉 3-5 次使混濁溶液變清澈。再加入 150 μ l Solution III [3 M potassium 與 5 M acetate] 用力混合後，置於冰上 20 分鐘，在 4°C 以 12000 rpm (12900 g) 離心 10 分鐘。

移除上清液，加入 -20°C 的 70% 酒精 200 μ l 稍微潤溼後，移除 70% 酒精，將沉澱物置於室溫中自然乾燥。加入 30 μ l 含 0.1 μ g/ml RNase 的 TE 溶液將沉澱物溶

解，置於 37°C 讓 RNase 作用 1 小時，最後加入 TE 溶液至 100 μ l，做 phenol/chloroform 萃取。

在加入 50 μ l pH 8.0 的 phenol 與 50 μ l 的 CIAA 混合均勻後，於 25°C 下以 12000 rpm (12900 g) 離心 1 分鐘。待離心分層後，將含有 DNA 的上層水溶液吸到新的離心管，再做酒精沉澱。加入 1/10 倍體積的 3 M NaOAc (pH 5.2) 及 2 倍體積的 -20°C 絕對酒精混合均勻，於 -70°C 靜置 1 小時。在 4°C 下，以 12000 rpm (12900 g) 離心 15 分鐘。所得沉澱 DNA，加入 -20°C 的 70% 酒精 200 μ l 稍微潤溼後，移除 70% 酒精，將沉澱物室溫乾燥。

將 DNA 沉澱物回溶於 50 μ l 的 TE 溶液，選用適當的限制酶做水解反應。取 5 μ l 的 DNA 溶液，加入 0.5 μ l 的 EcoRI 與 0.5 μ l 的 BamHII、1.5 μ l 的限制酶 buffer，補滅菌過的二次水至 15 μ l。於 37°C 水浴中反應 1 小時。加入 1/10 倍體積的 gel-loading buffer [0.25% bromophenol blue 與 50% glycerol]，以 1% agarose 膠體進行 DNA 片段大小鑑定，選取數個插入 DNA 片段大小正確的質體，進行 DNA 定序。

十、DNA 定序之分析比較

伍、實驗結果

一、以庫存之 cDNA 進行轉殖

使用實驗室庫存之 chicken cDNA 直接將欲表現之基因片段以轉植入大腸桿菌載體，得四組 DNA 分子量皆介於 3500 到 4000，不符合預期之分子量(約為 750)，結果也不甚穩定，則必須重新抽取雞胰臟之 RNA。圖二為四組不同菌株所表現出的 DNA 型態。(由左向右第一、二組菌株選自同一培養皿，第三、四組也為同一培養皿。)



圖二、庫存之 cDNA 轉殖後 DNA 電泳照片(11/8/2001)

二、RNA 抽取

1. 抽取 RNA 後(抽四組)，計算 OD 值 (稀釋倍數=50)

$$OD \times 40 \times 10^{-3} = (\mu g / \mu l)$$

$$OD \times 40 \times 10^{-3} \times \text{稀釋倍數} = \text{原液}(\mu g / \mu l)$$

	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	原液($\mu g / \mu l$)
A	0.450	0.172	2.616	0.910
B	0.588	0.258	2.279	1.176
C	0.577	0.251	2.299	1.154
D	1.583	0.772	2.050	3.166

表一、以光度比色計波長 260 & 280 照射結果。

2. 抽取 RNA 後(抽四組)，跑電泳結果有一組有 RNA 表現。



圖三、純化雞胰臟 RNA 跑 RNA 電泳照片(12/7/2001)

三、cDNA 合成 PCR 放大結果

PCR 配置如下：

Chicken cDNA (Expected)	Bovine cDNA	Chicken Primer only Negative control	Bovine Primer only Negative control	Bovine D99 Positive control
50 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl

跑電泳後發現有 DNA 顯示(呈圖四)，量不多，但仍表示有成功合成 cDNA。



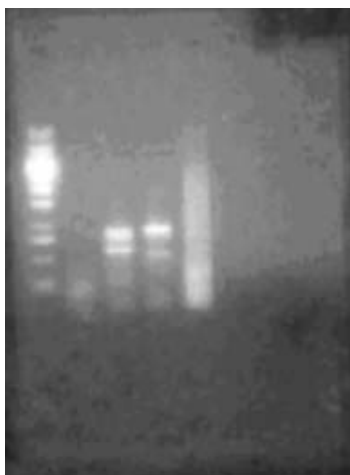
圖四、合成 cDNA 後之跑 DNA 電泳照片(12/20/2001)

四、產物回收

圖五為回收後再跑 PCR 後的 DNA 電泳照片，PCR 的配置如下：

A	B	C	D
原 cDNA (未稀釋)	12/20 回收物 primer 5' & 3'(I)	12/20 回收物 primer 5' & 3'(II)	對照組

從圖五上可發現 A、B、C 三組顯示的分子量有些微差異，之後繼續做限制酶切割時失敗，未顯示任何結果。

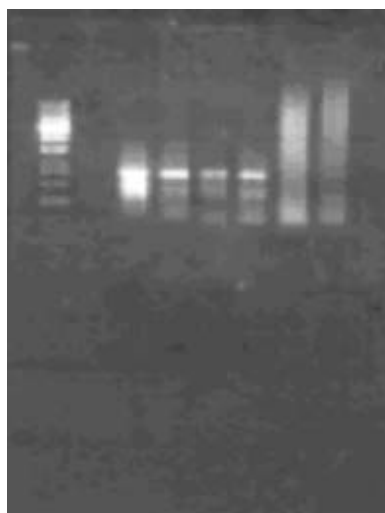


圖五、回收並跑第二次 PCR 後的 DNA 電泳照片(1/24/2002)

重新做另一次 PCR、酒精沉澱、跑膠回收，下圖六為回收產物經再次 PCR 後的 DNA 電泳照片。此次 PCR 配置如下：

A	B	C	D	E	F
2/4 回收物 primer (I)	2/4 回收物 primer (II)	2/4 回收物 (稀釋成 1/50 倍)primer (I)	2/4 回收物(稀 釋 成 1/50 倍)primer (II)	Blank primer (I)	Blank primer (II)

此次 DNA 分子量有一致性，較為成功。



圖六、回收並跑第二次 PCR 後的 DNA 電泳照片(2/5/2002)

陸、問題與討論

- 一、實驗最初使用實驗室學長姐之前合成的 chicken cDNA 做基因的選殖，但 PCR 的結果並不十分穩定，所以決定重新抽取 RNA。可能因為存放過久或冰箱冷度不足造成品質改變。
- 二、做此實驗時我們到古亭市場現取了雞胰臟(品種：珍珠雞，母)後，用液態氮急速冷凍抽取 RNA。所取的雞胰臟必須為新鮮的，因為在雞死後其體內的 RNase 會開始作用分解 RNA，而冷凍的步驟則是為了使組織硬化並且抑制 RNase 的活性。實驗的同時也必須盡量避免實驗者及環境中的 RNase 與實驗器材及胰臟組織接觸。
- 三、在操作 PCR 酒精沉澱時必須十分小心，因為 DNA 產物近乎透明且體積很小，常常會在清洗、或其他實驗過程中不慎遺失或有所損耗。
- 四、回收洋菜膠效果不佳，回收到的 DNA 量明顯減少。可能原因為操作技巧不純熟、或者為實驗時所使用的 kit 設計不良，而目前處理辦法為將其回收後再以 PCR 放大 DNA 倍數。

柒、結論

由此次實驗所得之 DNA 序列與原先已知之序列比較，發現在 NcoI 5'序列前段有些不一致之處，推斷原因可能為訂製引子時所編排選擇的片段，並未與在聚合酶連鎖反應時與預期部分接合。經查證後發現預期部分之更前段有與預期部分相似度非常高的片段存在，因而造成引子接合時位置之錯亂。

除了預期部分前段所發現之問題，其他剩餘的序列皆與已知序列吻合，但質體仍然可能因為前段不一致關係而無法進行表現。

另外，序列中有發現一個胺基酸的轉變，但目前無法確定此次參予試驗的雞是否為一突變型，或者是其他可能原因引起，仍需經由進一步做質體表現方面的探討方能得知。

目前實驗進行方向為重新訂製一組引子，繼續一個輪迴至定序的工作。另外也嘗試從之前轉型作用時種植之菌體找尋可進行表現之質體。

捌、參考文獻

- 一、Chommczynski, P, and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- 二、Passarge, Eberhard. 1995. *Color Atlas of Genetics*. Thieme Medical Publishers, Inc., New York, USA.
- 三、陳靜瑩。2001。牛去氧核糖核酸水解酶之 cDNA 選殖及兩個結構性鈣離子結合位置之功能分析。台灣大學醫學院生物化學研究所博士論文。
- 四、胡繼趙。1995。雞去氧核糖核酸水解酶之純化及性質、蛋白序列、cDNA 序列之研究。台大醫學院生化所碩士論文。
- 五、鄭兆珍。1997。雞胰臟去氧核糖核酸水解酶：鈣離子對酵素活性及雙硫鍵之打開與再結合之影響。台大醫學院生化所碩士論文。
- 六、陳麗華。1998。雞胰臟去氧核糖核酸水解酶之純化及其同功酶之研究。台大醫學院生化所碩士論文。
- 七、陳振東。2001。生物化學圖解。藝軒出版社，臺北市。
- 八、李建武。1999。生物化學實驗原理和方法。藝軒出版社，臺北市。