

中華民國第 52 屆中小學科學展覽會  
作品說明書

---

高中組 生物（生命科學）科

佳作

040708

藻生貴脂－以竹嵌紋病毒或其衛星核酸載體建  
立綠藻之高效率轉殖系統

學校名稱：國立臺中女子高級中學

作者： 高二 陳盈芸 高二 林依儒	指導老師： 呂億真
-------------------------	--------------

關鍵詞：綠藻、電穿孔法、衛星核酸

## 摘要

綠藻(*Chlorella* sp. strain DT)為含有大量油脂的球型單胞藻，容易大量培養，目前研究證明以電穿孔法能獲得最佳化的轉殖效率。而竹嵌紋病毒(Bamboo mosaic virus, BaMV)已成功發展為表現外源蛋白的載體，其衛星核酸(satellite RNA)的載體系統則仍在發展階段。本實驗目的有二，第一為比較 BaMV 及衛星核酸(satBaMV)載體，以建立較高效率的轉殖系統。第二為延伸應用生物課程中所提到的基因轉殖技術。實驗中利用電穿孔法將質體轉入綠藻中，比較篩選抗藥性細胞數、計算轉殖成功率。經 PCR 檢測後發現以 satBaMV 為載體的轉殖成功率較高。未來如能成功建立完整的衛星核酸載體轉殖系統，可將特定基因以此系統轉殖入綠藻以增加綠藻產油量，正式成為新興生質能源，以因應能源危機。

## 壹、 研究動機

報章雜誌上常常可見關於能源危機的報導。由於人類對非再生能源的大量開採，全世界面臨嚴重的能源短缺，科學界因此致力發展能成為其替代能源的生質能源。目前廣受矚目的生質能源多以糧食作物為主要原料，但若大量使用糧食作物反而會造成世界的糧食危機，於是我們把目光轉向同為生質能源綠藻。綠藻可以產生大量油脂作為生質柴油，而台灣四面環海的地理環境也非常適合綠藻產業的發展。目前綠藻產業有兩種趨勢，一種是發展產油量但不易培養的綠藻，而另一種是發展產油量低但易培養的綠藻，基於台灣的產業及地理優勢，我們朝向第二種綠藻研究。然而若就目前技術發展綠藻養殖，總體產油量仍不高，會使得相對成本過高，需進一步改良其基因或生長環境提升油脂產量，以降低成本。全世界已有許多研究正著力於此問題，希望能找出能有效提升油脂產量之基因或機制。現階段還未研發出能大量提升綠藻油脂產量的技術，卻又面臨了第二個問題：綠藻的轉殖方式多缺乏效率和準確度。基於研究提高油脂產量的基因需有龐大的研究背景及研究時間，我們選擇改善此產業面臨的第二個問題，試圖提升綠藻的轉殖效率並建立一個新的系統。

## 貳、 研究目的

比較並找出效果最佳的轉殖方法 —

- (一) 以竹嵌紋病毒 (*Bamboo mosaic virus*, BaMV) 為載體配合電穿孔法提升轉殖效率。
- (二) 以竹嵌紋病毒的衛星核酸 (satBaMV) 為載體配合電穿孔法提升轉殖效率。

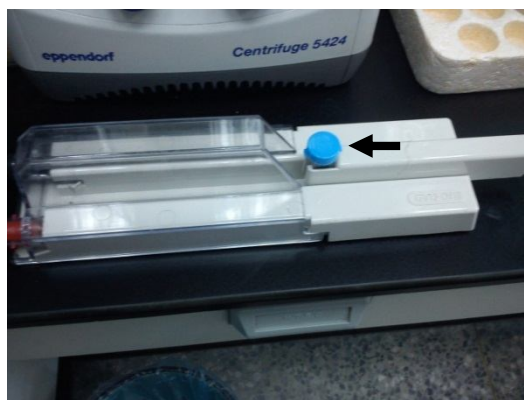
## 參、 研究設備及器材

- 一、 電穿孔儀 (electroporator) (圖一及圖二)  
將綠藻溶液置於圖二藍色蓋子的管子中，置入槽中，同時壓下圖一箭頭指向的兩個按鍵，即完成以電穿孔法殖入質體的步驟。每次電穿孔均有不同的電值，圖一中指向的紅色字體即是當次的電值。
- 二、 震盪培養儀 (shaker) (圖三)  
將繼代於培養液的綠藻放置於震盪培養儀進行震盪培養篩選。
- 三、 聚合酵素連鎖反應器 (Polymerase chain reaction)  
以聚合酵素連鎖反應器將基因增量後方可確認轉入的基因。
- 四、 高速離心機 (Centrifuge)  
以不同轉速分別執行清洗綠藻、抽取綠藻 DNA、進行溶液的混合等工作。
- 五、 凝膠成像系統 (alphaimager)  
將跑完 DNA 電泳的洋菜膠置入凝膠成像系統可以曝光效果呈現跑膠結果。
- 六、 恆溫混合器 (Vortex) (圖四)  
以恆溫混合器混合離心管中的物質。
- 七、 酒精真空揮發儀 (vacuum) (圖五)  
抽質體時以酒精真空揮發儀揮發掉洗雜質時用的酒精。

八、 DNA 水平式電泳槽 (DNA gel electrophoresis) (圖六)  
經聚合酵素連鎖反應增量的基因以 DNA 水平式電泳槽跑膠以確認轉入的基因。



圖一



圖二



圖三



圖四



圖五



圖六

## 肆、研究過程或方法

### 一、藻類來源及培養條件：

自台灣中部山區高壓電纜管線表面分離，命名為 *Chlorella* sp. strain DT。(取名為 DT 因其屬於耐乾燥型小球藻，故以 desiccation tolerance 名之)。將藻類培養於固態(圖七)和液態(圖八)培養基中(附件一)。液態是培養在離心管中，於 28°C 以 150 rpm 震盪培養；固態則是培養在鋪有培養基的培養皿中，平置於 28°C。實驗中的光強度為  $120 \mu\text{Em}^{-1}\text{s}^{-2}$ ，光週期為 24 小時。



圖七



圖八

### 二、電穿孔轉型作用(Electroporation)

取在細胞生長曲線對數中期的綠藻 10 ml ( $2 \times 10^7$  cells/ml) 以 1000g 離心 5 分鐘並以 ddH<sub>2</sub>O 清洗兩次。將洗淨的綠藻( $5 \times 10^5$  cells) 以 80  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 回溶。取 5  $\mu$ g 質體和綠藻均勻混合，放入細胞電擊管(electroporation cuvette)中，並將細胞電擊管置於冰上 5~10 分鐘，通以 25 $\mu$ F, 200 $\Omega$ , 2.5KV 電流後，將通電完的綠藻加入 1ml 含有抗生素的液體培養基(50  $\mu$ g/ml Ampicillin)，置於培養箱中，溫度 28°C 轉速 100rpm 振搖 5 小時後，將綠藻稀釋到濃度為  $10^6$  cells/ml，取 400 $\mu$ l 鋪於含有 50  $\mu$ g/ml Ampicillin、50  $\mu$ g/ml Kanamycin 及 50  $\mu$ g/ml Hygromycin 的固態培養基上，另外取轉殖的綠藻 400  $\mu$ l 鋪於只含有 50  $\mu$ g/ml Ampicillin 的固態培養基上作為對照組。暗房處理三天後再置於光照下( $120 \mu\text{Em}^{-1}\text{s}^{-2}$ ，光週期為 24 小時)並觀察生長狀況。

### 三、綠藻總量 DNA 抽取方式

取於細胞生長曲線對數中期的綠藻 10 ml ( $2 \times 10^7$  cells/ml) 以 1000g 離心 5 分鐘並以 ddH<sub>2</sub>O 清洗兩次，加入 300 $\mu$ l homogenization buffer (1% saekosyl, 0.25 M sucrose, 50 mM NaCl, 20 mM EDTA, and 50 mM Tris to pH8.0)，並加 1/2 倍體積的玻璃珠，以 vortex mixer 震盪 30 分鐘，靜置 20 分鐘，加入等體積的 PCI (phenol/chloroform/isoamylalcohol = 25:24:1, pH=8)，震盪 5 min，以高速 12000 rpm 離心 5 分鐘後，取出上清液放入新的離心管中，加入為總體積 0.1 倍量的 3 M NaOAc 和 2 倍體積量的 95% EtOH，置於 -80°C 冰箱 30 分鐘，再以 12000 rpm 轉速離心 15 分鐘，取出上清液倒掉，加入 1 ml 70% EtOH 洗沉澱物，於真空中抽乾後加入 100 $\mu$ l H<sub>2</sub>O 回溶。

#### 四、聚合酵素連鎖反應檢測

以聚合酵素連鎖反應確認轉殖後的綠藻染色體是否有成功的插入目標基因。取綠藻總量 DNA 10 ng，加入引子對(表一)，各 0.4  $\mu$ l(0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l)，與 Taq DNA polymerase(1 Unit/ $\mu$ l, PROTECH) 0.4  $\mu$ l、10  $\mu$ M dNTP 1  $\mu$ l、10X Taq DNA polymerase buffer 2  $\mu$ l 及去離子水 14.8  $\mu$ l，混合均勻進行 PCR 反應。反應條件為：94 $^{\circ}$ C，5 分鐘→(94 $^{\circ}$ C，45 秒→55 $^{\circ}$ C，45 秒→72 $^{\circ}$ C，60 秒)進行 38 個循環→72 $^{\circ}$ C，5 分鐘→25 $^{\circ}$ C。取 4  $\mu$ l 的反應後產物以 1% 洋菜水平式膠體電泳進行分析，以 100 伏特電壓進行電泳 30 分鐘，經 EtBr 染色後，置於穿透式紫外燈偵測器上，確認產物片段大小。

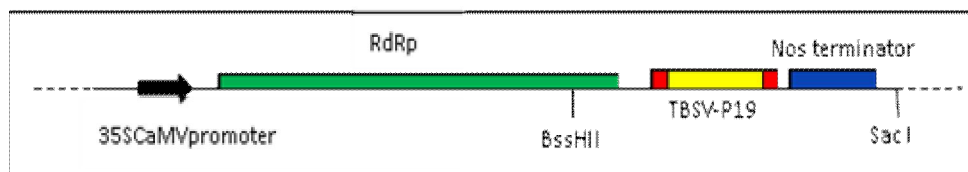
Hygromycin F	5' -ATGAAAAGCCTGAACTCACCG-3'
Hygromycin R	5' -GTCCGAGGGCAAAGGAATAG-3'
BS85	5' -CAGGCCCCGTGCGATAGGCT-3'
BS691	5' -CAGGGAGCCACGCGTCAGCG-3'
DraIII(P19) F	5' -ATGGAAAATGATCCTAGAGT-3'
DraIII(P19) R	5' -CTAAATTCTGAGTGCTTGCC-3'

表一:引子對序列

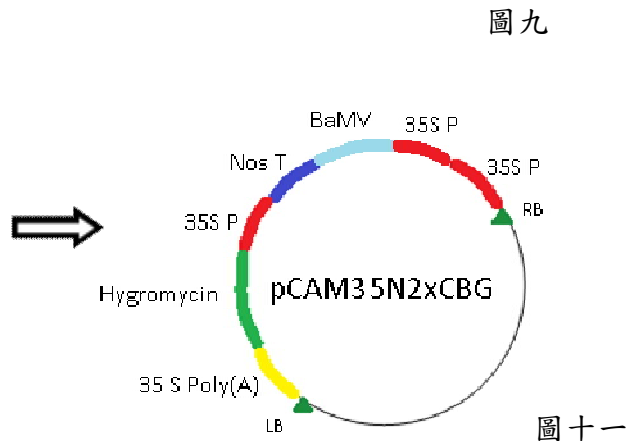
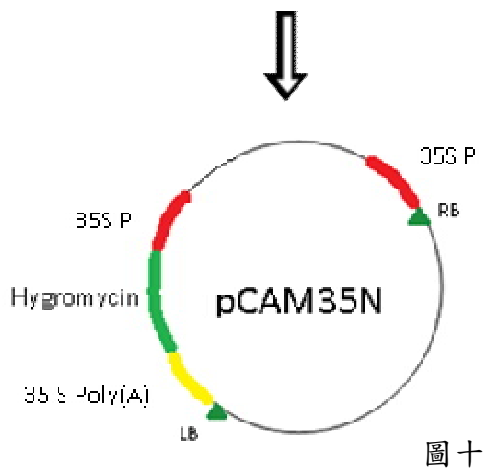
#### 五、質體構築

##### (一)pCaBdT-19Nd35mcp 質體

pCaBdT-19Nd35mcp 質體構築在有抗 Hygromycin 基因的質體 pCAM35N 上(圖九)。將 BdT-19Nd35mcp(圖十)和 pCAM35N 用 BssHII (3385) 和 Sac I (6366)切割並接合，形成 pCaBdT-19Nd35mcp(圖十一)。

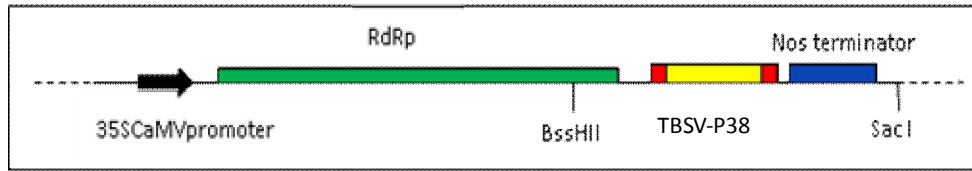


圖九

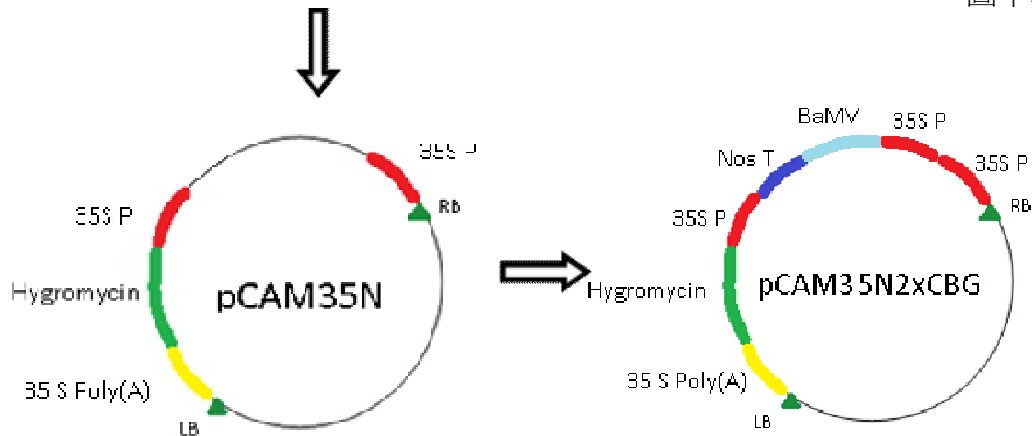


(二)pCaBdT-38Nd35mcp 質體

pCaBdT-38Nd35mcp 質體構築在有抗 Hygromycin 基因的質體 pCAM35N 上(圖十二)。將 BdT-38Nd35mcp(圖十三)和 pCAM35N 用 BssHII (3385) 和 Sac I (6366)切割並接合，形成 pCaBdT-38Nd35mcp(圖十四)。



圖十二

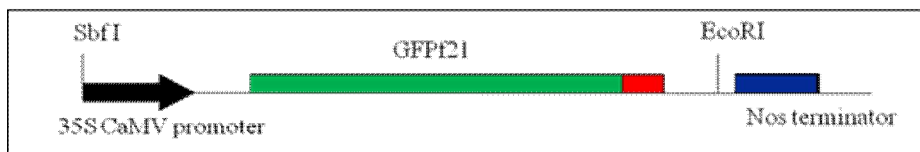


圖十三

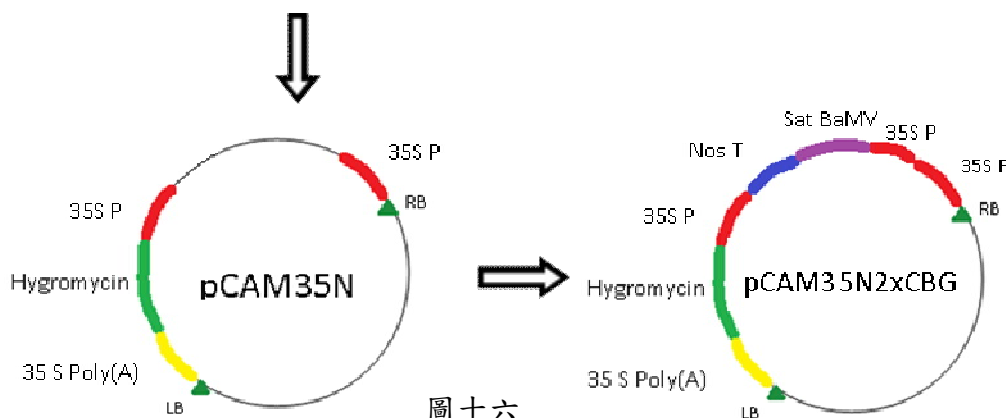
圖十四

(三)pCa-satGFP21 質體

pCa-satGFP21 質體構築在有報導基因 Hygromycin 的 pCAM35N 質體上(圖十五)。satGFP21(圖十六)為由 35SCaMV promoter 引導的一段基因序列。將 satGFP21 與質體 pCAM35N 以 Sbf I 和 EcoRI 由 35SCaMV promoter 處切割並接合，形成質體 pCa-satGFP21(圖十七)。



圖十五



圖十六

圖十七

## 六、轉入質體

本實驗主要目的為比較唯有竹嵌紋病毒載體轉入與有竹嵌紋病毒加上其衛星核酸載體共同轉入的轉型效率差異，各種類轉殖入的質體如下：

名稱	轉入質體
BdT19	pCaBdT-19Nd35mcp
BdT38	pCaBdT-38Nd35mcp
satGFP <sup>1</sup>	pCa-satGFPf21
BdT19+ satGFP	pCaBdT-19Nd35mcp+ pCa-satGFPf21
BdT38+satGFP	pCaBdT-38Nd35mcp+ pCa-satGFPf21

## 七、綠藻轉殖效率分析

與轉殖前先調整綠藻細胞濃度至  $10^8$  cells/ml，經過轉殖後，計算於固態培養基上單一藻落的數目，進而推算每毫升細胞中平均可成功轉殖的細胞數，以此計算轉殖效率。

## 八、轉殖後綠藻篩選方法

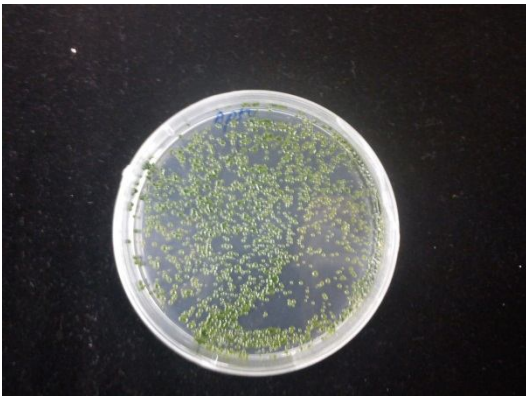
在經電穿孔後的綠藻鋪於培養基 HAK（含有 50  $\mu$ g/ml Ampicillin、50  $\mu$ g/ml Kanamycin 及 50  $\mu$ g/ml Hygromycin）的固態培養基上，做第一次篩選。長出單斑後自各單斑刮取少量綠藻，繼代於 HAK 培養基上，做第二次篩選。第二次篩選後仍有長出的綠藻以相同方式刮取單斑，繼代於 4 ml 的 HAK 培養液中，於 28°C 以 150 rpm 震盪培養，做第三次篩選。最後將第三次篩選成功長出的綠藻植株進行聚合酵素連鎖反應檢測。

<sup>1</sup> satGFP 只有轉入衛星核酸 pCa-satGFP21，並未轉入竹嵌紋病毒質體作為輔助

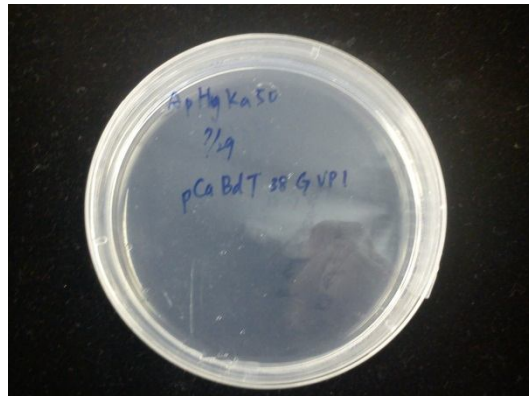




圖十七



圖十八



圖十九

圖十七為第一次篩選長出單斑的情形

圖十八為只有用 50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin 篩選的培養基

圖十九為用 50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin、50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin 及 50  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin 篩選的培養基，培養相同時間後的結果。

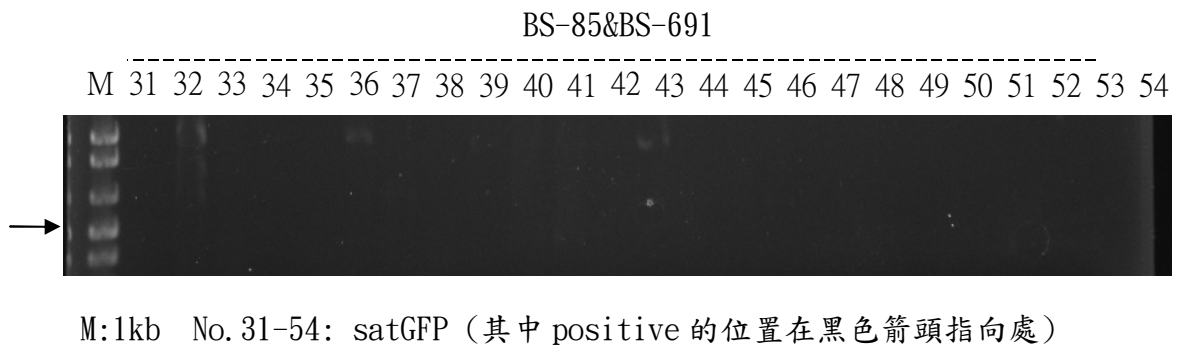
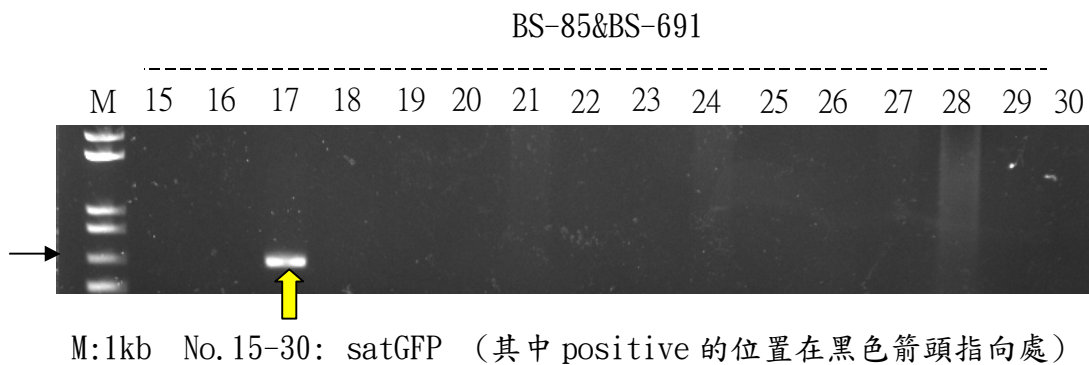
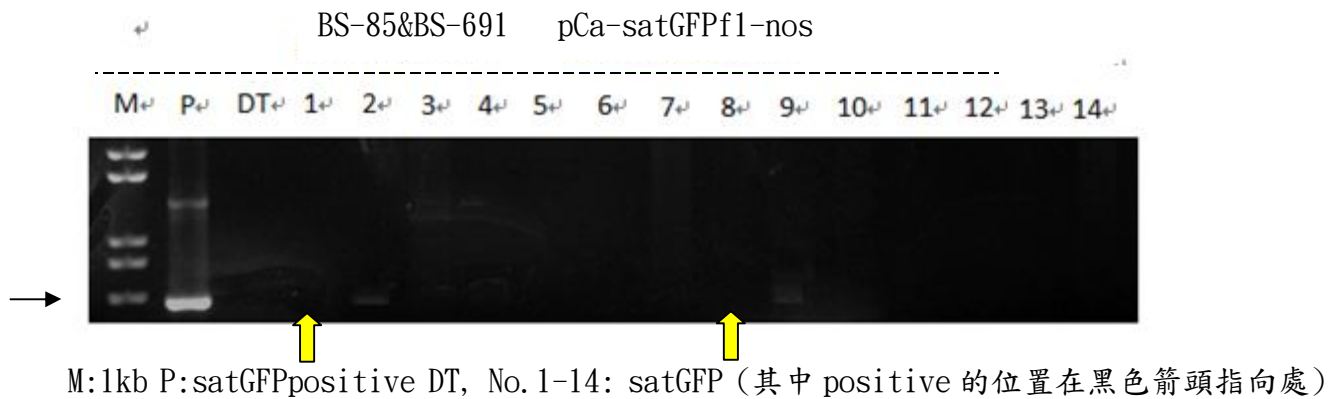
## 伍、研究結果

### 一、以 satGFP 轉殖之效率

#### (一) 篩選後成功長出綠藻株數分析

種類	盤數 (0.4ml/盤) <sup>2</sup>	第三次篩選 (株數) <sup>3</sup>	成功長出率 <sup>4</sup>
satGFP	55	70	$3.18 \times 10^{-7}$

#### (二) 膠體電泳確認轉殖效率結果

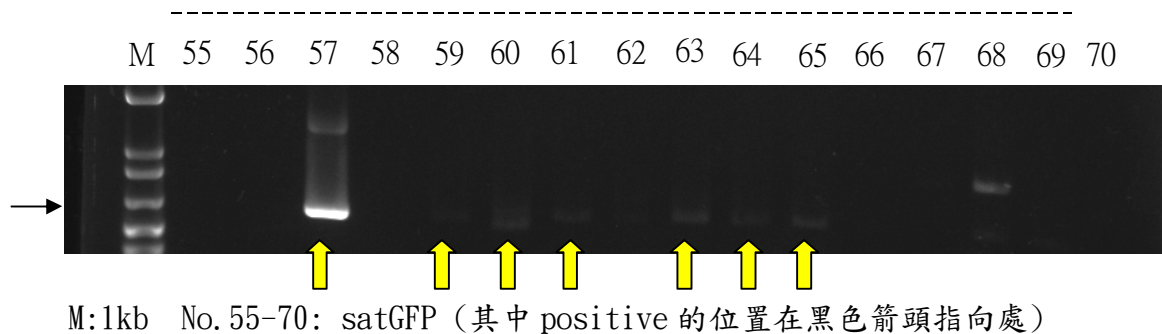


<sup>2</sup> 一個培養基上鋪 0.4 ml 的綠藻溶液( $10^7$  cells/ml)

<sup>3</sup> 第三次篩選成功長出的綠藻株數

<sup>4</sup> 第三次篩選長出株數/綠藻細胞總量

BS-85&BS-691



種類	轉殖成功株數 <sup>5</sup>	轉殖成功株數/長出株數 <sup>6</sup>	轉殖成功率 <sup>7</sup>
satGFP	10	14.29%	$4.54 \times 10^{-8}$

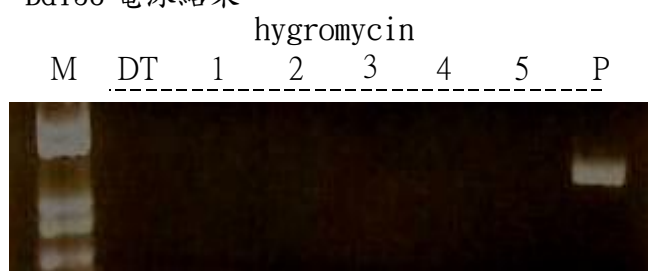
二、以 BdT38+satGFP 和以 BdT38 轉殖效率比較

(一) 篩選後成功長出綠藻株數分析

種類	盤數(0.4ml/盤) <sup>8</sup>	第三次篩選(株數) <sup>9</sup>	成功長出率 <sup>10</sup>
BdT38	20	14	$1.75 \times 10^{-7}$
BdT38+satGFP	10	11	$2.75 \times 10^{-7}$

(二) 膠體電泳確認轉殖效率結果

1. BdT38 電泳結果



M:1kb P: BdT38positive No.1-5: BdT38

<sup>5</sup> 經 PCR 確認後有成功轉入質體的藻落數

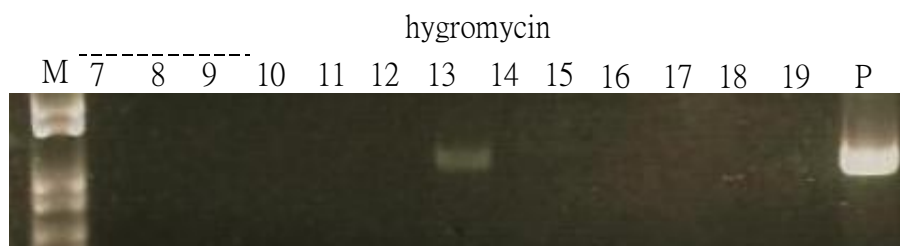
<sup>6</sup> 轉殖成功株數/第三次篩選株數

<sup>7</sup> 轉殖成功株數/綠藻細胞總量

<sup>8</sup> 一個培養基上鋪 0.4 ml 的綠藻溶液( $10^7$  cells/ml)

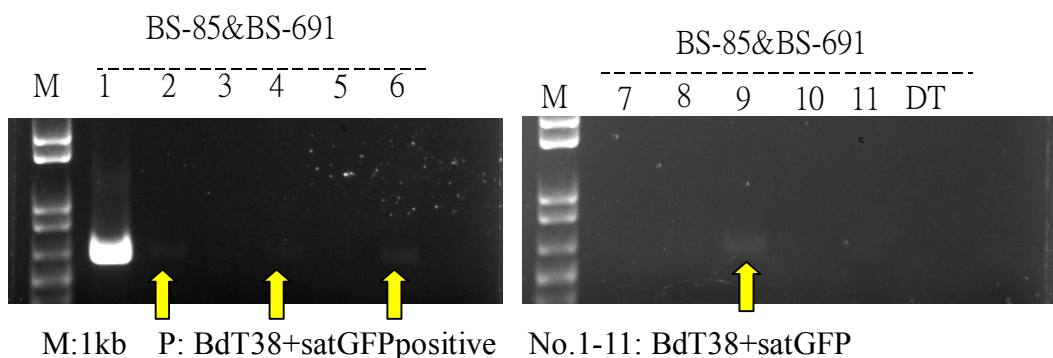
<sup>9</sup> 第三次篩選成功長出的綠藻株數

<sup>10</sup> 第三次篩選長出株數/綠藻細胞總量



M:1kb P: BdT38 positive No.7-19: BdT38

## 2. BdT38+satGFP 電泳結果



M:1kb P: BdT38+satGFP positive No.1-11: BdT38+satGFP

	轉殖成功株數 <sup>11</sup>	轉殖成功株數/長出株數 <sup>12</sup>	轉殖成功率 <sup>13</sup>
BdT38	1	7.14%	$1.25 \times 10^{-8}$
BdT38+satGFP	4	36.00%	$1.00 \times 10^{-7}$

## 三、以 BdT19+ satGFP 和以 BdT19 轉殖效率比較

### (一) 篩選後成功長出綠藻株數分析

種類	盤數(0.4ml/盤) <sup>14</sup>	第三次篩選(株數) <sup>15</sup>	成功長出率 <sup>16</sup>
BdT19	20	8	$1.00 \times 10^{-7}$
BdT19+satGFP	10	6	$1.50 \times 10^{-7}$

### (二) 膠體電泳確認轉殖效率結果

<sup>11</sup> 經 PCR 確認後有成功轉入質體的藻落數

<sup>12</sup> 轉殖成功株數/第三次篩選株數

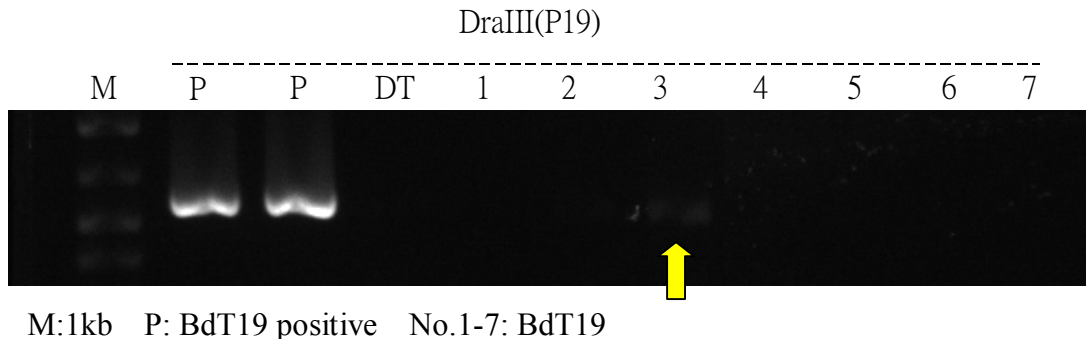
<sup>13</sup> 轉殖成功株數/綠藻細胞總量

<sup>14</sup> 一個培養基上鋪 0.4 ml 的綠藻溶液( $10^7$  cells/ml)

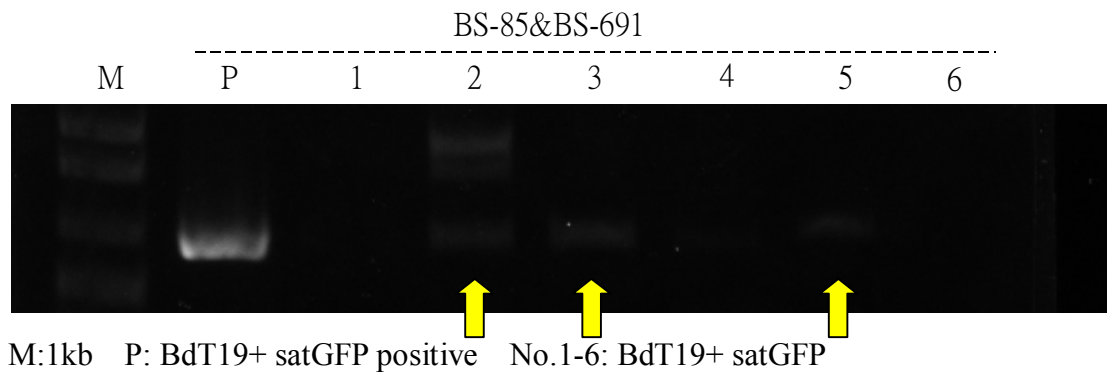
<sup>15</sup> 第三次篩選成功長出的綠藻株數

<sup>16</sup> 第三次篩選長出株數/綠藻細胞總量

1. BdT19 電泳結果



2. BdT19+ satGFP 電泳結果



	轉殖成功株數 <sup>17</sup>	轉殖成功株數/長出株數 <sup>18</sup>	轉殖成功率 <sup>19</sup>
BdT19	1	12.5%	$1.25 \times 10^{-8}$
BdT19+ satGFP	3	50.0%	$7.50 \times 10^{-8}$

<sup>17</sup> 經 PCR 確認後有成功轉入質體的藻落數

<sup>18</sup> 轉殖成功株數/第三次篩選株數

<sup>19</sup> 轉殖成功株數/綠藻細胞總量

## 陸、討論

### 一、轉殖 satGFP

- (一) 實驗結果顯示只轉殖入竹嵌紋病毒衛星核酸載體，沒有竹嵌紋病毒載體輔助，綠藻可以表現出其載體上抗 Hygromycin 基因。
- (二) 用含有抗生素培養基篩選後成功長出的藻落不一定表示其基因有成功轉入。推測原因有三，第一，長期生長後，少數綠藻會對抗生素產生抗藥性；第二，轉殖成功的藻落和沒有轉殖成功的藻落混合生長；第三，轉殖入綠藻的基因對綠藻而言是外源基因，因此綠藻可能將成功轉入的基因剔除。

### 二、轉殖 BdT38+satGFP 與轉殖 BdT38

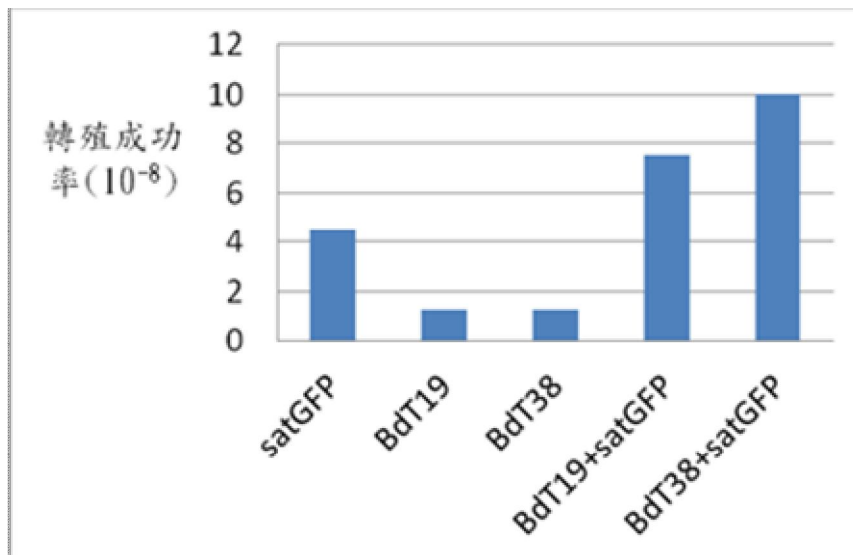
實驗結果顯示 BdT38+satGFP 轉殖的效率高於 BdT38，竹嵌紋病毒載體效率優於竹嵌紋病毒載體。又雖 BdT38 篩選後成功長出率高於 BdT38+satGFP，但在跑 PCR 和電泳確認後，發現 BdT38+satGFP 實質有轉入的個數較多。

### 三、轉殖 BdT19+satGFP 與轉殖 BdT19

結果顯示 BdT19+ satGFP 轉殖的效率高於 BdT19，竹嵌紋病毒核酸載體轉殖效率優於竹嵌紋病毒載體。

### 四、轉殖成功率比較

由實驗結果得知，BdT19+satGFP 和 BdT38+satGFP 有最佳的轉殖成功率，分別為  $7.50 \times 10^{-8}$  和  $1.00 \times 10^{-7}$ 。其次為 satGFP，轉殖成功率為  $4.54 \times 10^{-8}$ 。而 BdT19 和 BdT38 的轉殖成功率最差，均為  $1.25 \times 10^{-8}$  (表二)。



表二:轉殖成功率

## 柒、結論

- 一、 以竹嵌紋病毒衛星核酸為載體單獨轉入的轉殖成功率大於單以竹嵌紋病毒為載體的轉殖成功率。推測原因是衛星核酸的鹼基數較少，只有約836個核苷酸，較容易進入綠藻中且轉錄效率較高。而單以竹嵌紋病毒為載體的轉殖方式較差可能因為其鹼基數多約為衛星核酸的八倍，在電穿孔時相對較難進入綠藻。
- 二、 利用竹嵌紋病毒衛星核酸為載體的方法，其中以同時轉入竹嵌紋病毒為輔助的效率較高。依前人研究指出，轉殖時除主要轉殖的質體外，加入的質體可當作carrier有效增加成功轉殖的機率。推測本實驗中得到的結果，是竹嵌紋病毒在其中扮演角色為carrier，幫助衛星核酸進入綠藻中。
- 三、 總括而言，以竹嵌紋病毒衛星核酸為主要質體配合竹嵌紋病毒質體作為輔助，具有最佳的轉殖效率。其次為只轉入衛星核酸的方式，而以竹嵌紋病毒質體為主要質體的效率最差。
- 四、 由此次實驗結果，未來若要轉殖特定基因進入綠藻，可以採用竹嵌紋病毒衛星核酸作為主要載體，並以竹嵌紋病毒質體為carrier plasmid進行轉殖。一方面因為carrier plasmid，可以有效增加轉殖效率，另一方面因竹嵌紋病毒核酸可以協助衛星核酸進行複製，增加基因的表現量。

## 捌、參考資料與其他

- (一) Chow, T.-Y., Hu, C.-C., Hsu, Y.-H., Lin, B.-Y., Lin, N.-S., & Lo, N.-W. (1994). Nucleotide sequence of the genomic RNA of bamboo mosaic potexvirus. *Journal of General Virology*. 75: 2513-2518
- (二) Haiying Tang, Meng Chen, M E D Garcia, Nadia Abunasser, K Y Simon Ng, Steven O Salley. (2011). Culture of microalgae *Chlorella minutissima* for biodiesel feedstock production. *PubMed*. 108(313): 2280-2287.
- (三) Hsu, Y. H. and Lin, N. S. (1994) A satellite RNA associated with Bamboo mosaic potexvirus, *Virology*. 202, 707-714.
- (四) Jac A. Nickoloff, Richard J. Reynolds (1992) Electroporation - mediated gene transfer efficiency is reduced by linear plasmid carrier DNAs. *Analytical Biochemistry*. 205(2): 237-243.
- (五) Ming-Shiun Tsai, Yau-Heiu Hsu, and Na-Sheng Lin (1999) Bamboo mosaic potexvirus satellite RNA (satBaMV RNA)-encoded P20 protein preferentially binds to satBaMV RNA. *J. Virol.* 73( 4): 3032-3039.
- (六) Senthil Chinnasamy (2009) Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO<sub>2</sub> and temperature. *J. Mol. Sci.* 10: 518-532.
- (七) Randor Radakovits, Robert E. Jinkerson, Al Darzins, and Matthew C. Posewitz (2010) Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production; eukaryot Cell. *American Society for Microbiology*. 9(4): 486 - 501.



(八) 其他

附錄一：培養基成分

stock no.	Chemical	Formula weight	Final concentration		Stock concentration			Make-up	
1	KNO3	101.11	1011.1 mg/L	1X10 <sup>-2</sup> M	1M	101.11g/L		10mL/L	
	MgSO4	246.46	246.0 mg/L	1X10 <sup>-3</sup> M	0.1M	24.64g/L			
2	Na2HPO4	141.96	71.0 mg/L	0.5X10 <sup>-3</sup> M	0.05M	7.10g	In 1 L(pH=6.4-6.6)	10mL/L	
	NaH2PO4.H2O	137.99	621.0 mg/L	4.5X10 <sup>-3</sup> M	0.45M	62.10g			
3	CaCl2.H2O	147.02	3.0 mg/L	2X10 <sup>-5</sup> M	0.01M	0.30g/200mL		2mL/L	
4	FeSO4.7H2O	278.02	13.9 mg/L	5X10 <sup>-5</sup> M	0.05M	1.39g	In 100mL (100°C, 10 min)	1mL/L	
	EDTA.Na2.2H2O	372.24	18.6 mg/L	5X10 <sup>-5</sup> M	0.05M	1.86g			
5	H3BO3	61.83	0.062 mg/L	1X10 <sup>-6</sup> M	0.01M	0.6183g	In 100mL (5a)	1mL (5a)+	1mL(5b)/L
	MnSO4.H2O	169.02	0.169 mg/L	1X10 <sup>-6</sup> M	0.01M	1.6902g		0.25 mL	
	ZnSO4.7H2O	287.54	0.2875 mg/L	1X10 <sup>-6</sup> M	0.01M	2.8754g		H2SO4	
	CuSO4.5H2O	249.69	0.0025 mg/L	1X10 <sup>-8</sup> M	1X10 <sup>-5</sup> M	0.0250g			
	[NH4]6Mo7O24.4H2O	1235.86	0.0129 mg/L	1X10 <sup>-8</sup> M	1X10 <sup>-5</sup> M	0.1236g		100 mL(5b)	

## 【評語】 040708

想利用綠藻產生重要的蛋白，先要做出高效率的轉殖系統。作者用竹嵌紋病毒系統，有初步亮麗的成果。實驗過程有不少數據，可以選重要的呈現。實驗數據中統計的觀念應該引進，數據的結果才能解釋。