

# 乳牛短脊椎綜合症基因檢測新法開發<sup>(1)</sup>

廖仁寶<sup>(2)</sup> 陳若菁<sup>(2)</sup> 吳明哲<sup>(2)</sup> 張秀鑾<sup>(3)(4)</sup>

收件日期：105 年 12 月 23 日；接受日期：106 年 3 月 6 日

## 摘 要

本研究旨在開發乳牛短脊椎綜合症 (brachyspina syndrome, BS) 基因型檢測新法。基於原檢測法費時且電泳圖像結果不佳，故進行檢測方法改進。在 *FANCI* 基因的缺失片段中設計一特定引子，檢測新法採用多重引子 PCR 技術，進行乳牛 BS 基因型鑑別。BS 正常基因型受檢個體在電泳圖像中約 1.0 kb 處會有一條明顯 DNA 片段，而雜合型者則在約 0.4 kb 與 1.0 kb 處各有一條明顯 DNA 片段；隨後分別將 0.4 kb 與 1.0 kb 的 DNA 片段溶離定序後，確認兩 DNA 片段係屬於 *FANCI* 基因，故可確效新檢測法。以新檢測法鑑定來自 4 家乳牛場共 172 個試驗樣品結果顯示，雜合型個體 21 個，頻率 12.21%；其餘樣品皆為正常型。因雜合型頻率已超過 10%，故有必要持續監控國內進口冷凍精液與篩檢乳牛群 BS 基因型，俾利逐步篩除此不良遺傳缺陷基因。

關鍵詞：短脊椎綜合症、基因型鑑定、荷蘭乳牛。

## 緒 言

牛短脊椎綜合症病例首度在 2006 年揭露於丹麥的荷蘭乳牛 (Agerholm *et al.*, 2006)，隨後荷蘭與丹麥 (Agerholm and Peperkamp, 2007; Charlier *et al.*, 2012)、義大利 (Testoni *et al.*, 2008)、加拿大 (Agerholm *et al.*, 2010)、德國 (Buck *et al.*, 2010)、美國 (VanRaden *et al.*, 2011)、中國 (Fang *et al.*, 2013) 及波蘭 (Ruśc and Kamiński, 2015) 陸續有荷蘭牛 BS 相關研究報導。經由系譜追蹤，獲知該 BS 缺陷基因源自一頭名號為 Sweet Haven Tradition (NAAB: 023HO00206；個體號 HOUSA000001682485) 之公牛；而義大利兩頭死產之荷蘭牛仔牛，經系譜確認具同父異母半同胞之親屬關係。Charlier *et al.* (2012) 進一步指出，BS 病仔牛係因其第 21 號染色體上 *FANCI* (fanconi anemia complementation-group I) 基因發生 3.3 kb 片段缺失，導致懷孕母牛早期流產或死產，而造成酪農經濟損失，並確認其為一種隱性致死遺傳缺陷。

依據行政院農業委員會統計報告顯示，104 年我國在養荷蘭牛約有 13.2 萬頭，其中泌乳牛約 6.2 萬頭，年產乳量約 37.5 萬公噸，產值約達 98.3 億元 (行政院農業委員會統計室，2015)。基於培育我國優質種乳牛與提升生產效益，除需瞭解我國乳牛族群與繁殖性狀相關的重要遺傳缺陷基因頻率分布與來源外，亦需監控與避免引進攜帶遺傳缺陷的種原，進口冷凍精液管對我國乳牛群產能與生產效益尤其重要。BS 基因型原檢測法係應用一般 PCR 技術，意即使用一對引子進行特定 DNA 片段增幅，再配合電泳技術進行片段大小分析與基因型判別 (Fang *et al.*, 2013)。本研究室曾針對上述方法進行條件與組成改良，並將改良法應用於我國荷蘭乳牛群 BS 基因型鑑定 (廖等，2015)。為增進檢測效果與縮短檢測時間，本研究應用多重引子 PCR 技術發展 BS 基因型新檢測法，並成功地應用於我國乳牛 BS 基因型鑑定。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2551 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(3) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。

(4) 通訊作者，E-mail：hlauchang@mail.npust.edu.tw。

## 材料與方法

### I. 試驗乳牛樣品

分別自 4 家乳牛場取得 33、31、92 及 16 頭荷蘭牛生物樣品，共計 172 頭，其中前三場提供血液樣品，最後一場則提供毛囊樣品。應用 DNA 萃取套組 (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche, Germany) 與廠商提供的操作流程進行血液樣品 DNA 萃取；以 User-Developed Protocol: Purification of total DNA from nails, hair, or feathers using the DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany)，進行乳牛毛囊樣品 DNA 萃取，供檢測用。

### II. BS 新檢測法開發

參照廖等 (2015) 方法，進行 BS 基因型為正常型與雜合型樣品分析，並視為對照組；使用引子有 BSF：5'-GCTCAAGTAGTTAGTTGCTCCACTG-3' 與 BSR：5'-ATAAATAAATAAAGCAGGATGCTGAAA-3'。PCR 反應組成為 100 – 200 ng 模板 DNA、0.25 mM dNTP、每個引子 0.5  $\mu$ M、1  $\times$  反應緩衝液及 0.75 U (單位) *Taq* 聚合酶 (TaKaRa Bio Inc., Japan)，反應總體積為 20  $\mu$ L。PCR 反應條件：第一步驟變性，94°C、5 min；第二步驟循環增幅 35 次，94°C、30 s，60°C、45 s，72°C、2 min 30 s；第三步驟延長，72°C、10 min。依據 *FANCI* 基因 3.3 kb 缺失片段序列，增加設計 BSR1 引子：5'-GACTCTTCGCAGGTGTCTCTGC-3'，結合原設計 BSF 與 BSR 引子，採用三種引子 PCR 法，進行乳牛 BS 基因型檢測。PCR 反應組成為 100 – 200 ng 模板 DNA、0.25 mM dNTP、每個引子 0.5  $\mu$ M、1  $\times$  反應緩衝液及 0.75 U (單位) *Taq* 聚合酶 (TaKaRa Bio Inc., Japan)，反應總體積為 20  $\mu$ L。PCR 反應條件：第一步驟變性，94°C、5 min；第二步驟循環增幅 35 次，94°C、30 s，60°C、45 s，72°C、45 s；第三步驟延長，72°C、10 min。新檢測法中，BS 正常基因型個體在電泳圖像 1.0 kb 處有一條明顯 DNA 片段，而雜合型者則在約 0.4 kb 與 1.0 kb 處各有一條明顯 DNA 片段。

### III. BS 新檢測法確認

將新檢測法增幅出之 0.4 kb 與 1.0 kb DNA 片段，自電泳分離後之瓊脂膠片中，分別切割與溶離純化 (Clean/gel Extraction kit, Biokit, Taiwan)，再進行定序反應。以定序試劑 BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, USA) 進行定序反應，並以 BSF 為定序引子，增幅後之產物經純化步驟，再以 DNA 自動定序儀 (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems, USA) 解序後，應用序列分析軟體 (Sequencing Analysis Software v5.4, Applied Biosystems, USA) 進行分析。最後將解序與分析所得 DNA 序列上傳至 NCBI 網頁 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，以 BLASTn 程式 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 進行與 *Bos taurus* genome 資料庫比對分析。

### IV. 乳牛 BS 基因型檢測

利用上述所開發與確認的新檢測方法，進行 172 個乳牛血液或毛囊樣品 BS 基因型的 PCR 分析。取 10  $\mu$ L PCR 產物與 2  $\mu$ L 的載入染劑混合均勻後，進行 1.5% 瓊脂膠體電泳分析。電泳完成後，利用 SYBR safe (Invitrogen, USA) 染色，並在紫外線燈箱上顯像，再以數位影像分析系統存取影像 (AlphaImager System, Alpha Innotech, USA)。在電泳圖片上，BS 基因型的標的片段有 0.4 kb 與 1.0 kb 兩條，BS 正常基因型者僅具 1 kb 片段，而 BS 雜合型者則同時具 0.4 kb 與 1.0 kb 兩個片段。

## 結果與討論

### I. BS 新檢測法開發

本研究室前已參照與改良 Fang *et al.* (2013) 提出的 BS 檢測法反應條件，並獲得正常型與雜合型正確 DNA 片段電泳圖譜，意即正常型個體呈現 3,738 bp 片段，雜合型者則有 409 bp 與 3,738 bp 兩片段，且已成功應用於 BS 基因型鑑定 (廖等, 2015)。惟不論正常型或雜合型個體之 3,738 bp 片段都相當微弱 (圖 1A)，且 PCR 耗費時間相當長，且檢測成本亦較高。為提升檢測效率與降低檢測成本，乃應用 multiplex PCR 技術開發新檢測法，使得 BS 正常基因型者在電泳圖像中 1.0 kb 處有一條明顯的 DNA 片段，而雜合型者則在約 0.4 kb 與 1.0 kb 處各有一條明顯的 DNA 片段 (圖 1B)。整體而言，新檢測法較前改良法節省約 1 小時檢測時間。

### II. BS 新檢測法確認

將新檢測法增幅出之 0.4 kb 與 1.0 kb 兩 DNA 片段回收純化、定序及比對後，發現兩種片段皆屬於 *FANCI* 基因之部分序列 (圖 2)；其中 0.4 kb 片段序列比對結果分成兩個區段，第一個區段的終結點位置在 20,537,575 (圖 2A)，比對 Charlier *et al.* (2012) 報告，實際位點應在 20,537,568，此乃因比對程式容許 gap 的存在而造成的誤差，

第二區段的開始點位於 20,540,898，故兩個區段間存在 3,330 bp 片段缺失。此外，1.0 kb 片段序列比對結果發現，區域含括 *FANCI* 基因序列連續範圍，位點在 21,184,694 – 21,185,487 間 (圖 2B)。綜合上述結果，序列證明新開發的 BS 檢測法可正確地鑑別相關基因型。

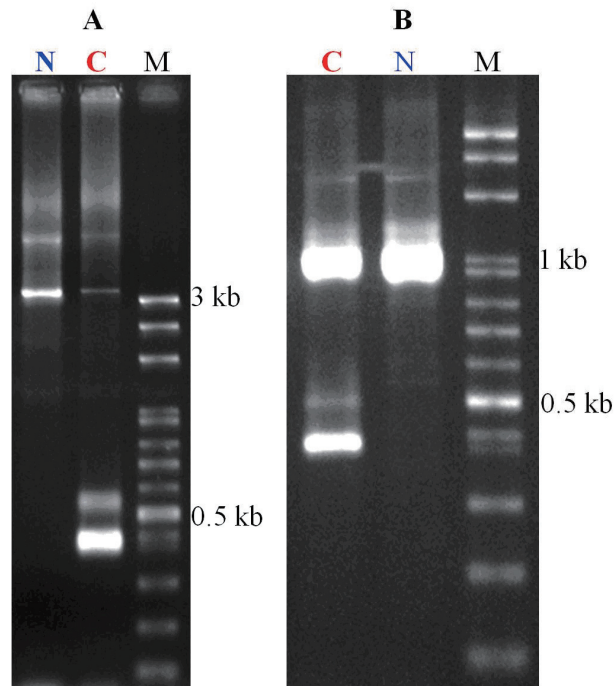


圖 1. BS 基因型檢測法比較。

A：廖等 (2015) 改良法，B：新檢測法，N：正常型，C：雜合型，M：100 bp 大小標記。

Fig. 1. Comparison of two genotyping methods for BS. A: The method was modified by Liaw *et al.*, 2015; B: The new BS genotyping method was developed. N: BS normal genotype; C: BS carrier genotype; M: 100 bp DNA ladder.

### III. 乳牛場 BS 雜合型頻率

四家乳牛場採樣牛隻樣品之 BS 基因型頻率，如表 1 所示。A 場 33 頭乳牛中有 4 頭為雜合型，頻率為 12.12%；B 場 31 頭乳牛中有 4 頭雜合型，頻率為 12.90%；C 場 92 頭乳牛中有 12 頭為雜合型，頻率為 13.04%；D 場 16 頭乳牛中有 1 頭為雜合型，頻率為 6.67%。整體而言，受測乳牛群雜合型頻率平均 12.21%；此結果較美國 (6%, VanRaden *et al.*, 2011)、荷蘭 (7.4%, Charlier *et al.*, 2012)、中國 (3.8%, Fang *et al.*, 2013)，以及波蘭 (10.26%, Ruśc and Kamiński, 2015) 報導之雜合型頻率者為高；亦較本研究室 2015 年調查篩檢結果 8.56% 高 (廖等, 2015)。同時，因 BS 為荷蘭乳牛隱性致死遺傳缺陷，故本試驗樣品中並未檢測出純合基因型個體。

綜合言之，本研究發展之 BS 基因新檢測法，僅需一般 PCR 儀器、電泳槽及影像設備，無需增購昂貴定量 PCR 儀器，而使用檢測藥劑亦屬平價範圍，且可縮短檢測時間 (Fang *et al.*, 2013；廖等, 2015)。因此，BS 基因型新檢測法應具實用性。此外，四個乳牛群檢測結果，BS 雜合型頻率高達 10% 以上，故除應持續監控與評估進口冷凍精液之重要基因型外，並須利用新檢測法繼續篩檢乳牛群之 BS 基因型，進而監控與追蹤雜合型牛隻，俾利逐步篩除此遺傳缺陷基因。

表 1. 4 個乳牛群短脊椎綜合症基因型頻率

Table 1. Frequency of brachyspina syndrome genotype in four dairy cattle herds

Selected farm	No. of cattle genotyped	BS genotype		Frequency of carrier (%)
		Normal	Carrier	
A	33	29	4	12.12
B	31	27	4	12.90
C	92	80	12	13.04
D	16	15	1	6.67
Total	172	151	21	12.21

### A

Bos indicus isolate QUIL7308 breed Nelore chromosome 21, Bos\_indicus\_1.0  
Sequence ID: **NC\_032670.1** Length: 69307409 Number of Matches: 5  
Range 1: 20537393 to 20537575

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
331 bits(179)	3e-88()	182/183(99%)	1/183(0%)	Plus/Plus	

Features:  
**Fanconi anemia group I protein isoform X1Fanconi anemia group I protein isoform X2**

Query 1	AACCCAGGTCCTGATTGGTAGGTGGATCTTTACCAC TAAGCCTCCAGGGATGCCAG	60
Sbjct 20537393	AACCCAGGTCCTGATTGGTAGGTGGATCTTTACCAC TAAGCCTCCAGGGATGCCAG	20537452
Query 61	AATTTAAACTCTGATACACTGTGACATAAATGTAAGTGGTGCAGCCACTTGGAAAAAT	120
Sbjct 20537453	AATTTAAACTCTGATACACTGTGACATAAATGTAAGTGGTGCAGCCACTTGGAAAAAT	20537512
Query 121	AATTTGTCAGTTCTTAAAAAGTTAAGCACACACCTATCTTACGGTACACCCATTCCACT	179
Sbjct 20537513	AATTTGTCAGTTCTTAAAAAGTTAAGCACACACCTATCTTACGGTACACCCATTCCACT	20537572
Query 180	CTT 182	
Sbjct 20537573	CTT 20537575	

Range 2: 20540898 to 20541072

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
324 bits(175)	5e-86()	175/175(100%)	0/175(0%)	Plus/Plus	

Features:  
**Fanconi anemia group I protein isoform X1Fanconi anemia group I protein isoform X2**

Query 177	CACCTTCTATCCGTGCTCCCATCTGTCAGTCTTCTCCCCAGTAGCTAAATATCTT	236
Sbjct 20540898	CACCTTCTATCCGTGCTCCCATCTGTCAGTCTTCTCCCCAGTAGCTAAATATCTT	20540957
Query 237	TTAGTGTCTTGTAAAGAAATCTTTTATTCTGTACAGCAATGAAATAGCTTTTA	296
Sbjct 20540958	TTAGTGTCTTGTAAAGAAATCTTTTATTCTGTACAGCAATGAAATAGCTTTTA	20541017
Query 297	TGCTCAACCCCTACCTCTTTCACACAAAAGCTTTTTCAGCATCTGCTTTATTTAT	351
Sbjct 20541018	TGCTCAACCCCTACCTCTTTCACACAAAAGCTTTTTCAGCATCTGCTTTATTTAT	20541072

### B

Bos taurus breed Hereford chromosome 21, Bos\_taurus\_UMD\_3.1.1  
Sequence ID: **AC\_000178.1** Length: 71599096 Number of Matches: 5  
Range 1: 21184694 to 21185487

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1467 bits(794)	0.0()	794/794(100%)	0/794(0%)	Plus/Plus	

Features:  
**retinaldehyde-binding protein 1Fanconi anemia group I protein**

Query 1	AACCCAGGTCCTGATTGGTAGGTGGATCTTTACCAC TAAGCCTCCAGGGATGCCAG	60
Sbjct 21184694	AACCCAGGTCCTGATTGGTAGGTGGATCTTTACCAC TAAGCCTCCAGGGATGCCAG	21184753
Query 61	AATTTAAACTCTGATACACTGTGACATAAATGTAAGTGGTGCAGCCACTTGGAAAAAT	120
Sbjct 21184754	AATTTAAACTCTGATACACTGTGACATAAATGTAAGTGGTGCAGCCACTTGGAAAAAT	21184813
Query 121	AATTTGTCAGTTCTTAAAAAGTTAAGCACACACCTATCTTACGGTACACCCATTCCACT	180
Sbjct 21184814	AATTTGTCAGTTCTTAAAAAGTTAAGCACACACCTATCTTACGGTACACCCATTCCACT	21184873
Query 181	CTTAGGTAATTTACCTAAAAGAAATGAAAGCAGATGTTTTATAAAAAGTTGTATATAGTA	240
Sbjct 21184874	CTTAGGTAATTTACCTAAAAGAAATGAAAGCAGATGTTTTATAAAAAGTTGTATATAGTA	21184933
Query 241	GTTTTACCCTGTAATAGCAAAATCTGGAACAACCTAAAGATGATAAATCGGTGACTATGC	300
Sbjct 21184934	GTTTTACCCTGTAATAGCAAAATCTGGAACAACCTAAAGATGATAAATCGGTGACTATGC	21184993
Query 301	AATCTGTGGCGTATTCATACCTGGAATACTGCTCAGCAGTGAAATGCGACAGGCTGCCA	360
Sbjct 21184994	AATCTGTGGCGTATTCATACCTGGAATACTGCTCAGCAGTGAAATGCGACAGGCTGCCA	21185053
Query 361	GTACGTGCAACAACAGACGTGAACCTCAGAGCTACATGCTGTAGCAAAGCCGGACTTCA	420
Sbjct 21185054	GTACGTGCAACAACAGACGTGAACCTCAGAGCTACATGCTGTAGCAAAGCCGGACTTCA	21185113
Query 421	AAAGCTACAGAATGAATGATACCACTTATATGATAGTTGTGAAATGTAAAACCGCTG	480
Sbjct 21185114	AAAGCTACAGAATGAATGATACCACTTATATGATAGTTGTGAAATGTAAAACCGCTG	21185173
Query 481	GGACAGGAAACAGATCGGTGGTTGCCTGGGAAATCAAAGAGAAAAGAACTGACTGCAAAGG	540
Sbjct 21185174	GGACAGGAAACAGATCGGTGGTTGCCTGGGAAATCAAAGAGAAAAGAACTGACTGCAAAGG	21185233
Query 541	AGCACATGAGAATTTGGGGTGTGGAAATACCTAGATTGAGGGGGATGAGTACACAAC	600
Sbjct 21185234	AGCACATGAGAATTTGGGGTGTGGAAATACCTAGATTGAGGGGGATGAGTACACAAC	21185293
Query 601	TGTGGAAGTGAGTCAGCAGAGCCATACAGTTACAGGATGGGAATTTACTGTATGTAAT	660
Sbjct 21185294	TGTGGAAGTGAGTCAGCAGAGCCATACAGTTACAGGATGGGAATTTACTGTATGTAAT	21185353
Query 661	TGTATCTCAGTGAACCTGACTTTAAAAATCACTTTTCCCCAGGGTCTTGCTTTGGAGATA	720
Sbjct 21185354	TGTATCTCAGTGAACCTGACTTTAAAAATCACTTTTCCCCAGGGTCTTGCTTTGGAGATA	21185413
Query 721	CACCTCAATCCCTACCTCAGTGGAAAGAGTCGGGAAAGAGAGAAAAGGAAAGAACATCTC	780
Sbjct 21185414	CACCTCAATCCCTACCTCAGTGGAAAGAGTCGGGAAAGAGAGAAAAGGAAAGAACATCTC	21185473
Query 781	GCTGCTGTGCTTGG 794	
Sbjct 21185474	GCTGCTGTGCTTGG 21185487	

圖 2. BS 基因型之兩種 DNA 片段序列比對結果。  
A : 0.4 kb 片段定序序列比對結果, B : 1.0 kb 片段定序序列比對結果。  
Fig. 2. DNA sequence alignment of two target fragments from BS genotyping.  
A: The alignment of 0.4 kb-fragment; B: The alignment of 1.0 kb-fragment.

## 誌 謝

承蒙畜產試驗所畜一殷蔡新興先生協助乳牛生物樣品採集工作，並感謝 4 家乳牛場慷慨與熱心提供試驗樣品與資料，得以完成本研究，謹申謝忱。

## 參考文獻

- 行政院農業委員會統計室。2015。農業統計年報。行政院農業委員會。臺北市。Online: <http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>。
- 廖仁寶、陳若菁、陳玟岑、蔡新興、黃金山、陳志毅、蕭宗法、李國華、周宜昌、吳明哲、張秀鑾。2015。臺灣乳牛群短脊椎綜合症基因檢測之初探。畜產研究 48：210-215。
- Agerholm, J. S. and K. Peperkamp. 2007. Familial occurrence of Danish and Dutch cases of the bovine brachyspina syndrome. BMC Vet. Res. 3: 8.
- Agerholm, J. S., F. McEvoy and J. Arnbjerg. 2006. Brachyspina syndrome in a Holstein calf. J. Vet. Diagn. Invest. 18: 418-422.
- Agerholm, J. S., J. DeLay, B. Hicks and M. Fredholm. 2010. First confirmed case of the bovine brachyspina syndrome in Canada. Can. Vet. J. 51: 1349-1350.
- Buck, B. C., R. Ulrich, A. Wöhlke, H. Kuiper, W. Baumgärtner and O. Distl. 2010. Vertebral and multiple organ malformations in a black and white German Holstein calf. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 123(5-6): 251-255.
- Charlier, C., J. S. Agerholm, W. Coppeters, P. Karlskov-Mortensen, W. Li, G. de Jong, C. Fasquelle, L. Karim, S. Cirera, N. Cambisano, N. Ahariz, E. Mullaart, M. Georges and M. Fredholm. 2012. A deletion in bovine *FANCI* gene compromises fertility by causing fetal death and brachyspina. PLOS One 7: e43085.
- Fang, L., Y. Li, Y. Zhang, D. Sun, L. Liu, Y. Zhang and S. Zhang. 2013. Identification of brachyspina syndrome carriers in Chinese Holstein cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 25: 508-510.
- Ruś, A and S. Kamiński. 2015. Detection of brachyspina carriers within Polish Holstein-Friesian bulls. Pol. J. Vet. Sci. 18: 453-454.
- Testoni, S., A. Diana, E. Olzi and A. Gentile. 2008. Brachyspina syndrome in two Holstein calves. Vet. J. 177: 144-146.
- VanRaden, P. M., K. M. Olson, D. J. Null and J. L. Hutchison. 2011. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. J. Dairy Sci. 94: 6153-6161.

# Development of a new method for rapid genotyping brachyspina syndrome in dairy cattle <sup>(1)</sup>

Ren-Bao Liaw <sup>(2)</sup> Jo-Ching Chen <sup>(2)</sup> Ming-Che Wu <sup>(2)</sup> and Hsiu-Luan Chang <sup>(3)(4)</sup>

Received: Dec. 23, 2016; Accepted: Mar. 6, 2017

The objective of this study was to develop a new method for rapid genotyping brachyspina syndrome (BS) in dairy cattle. The BS genotyping method was improved because the original identifying method was time consuming and not good enough on electrophoresis image. A specific primer was designed according to the sequence of 3.3 kb deletion fragment of *FANCI* gene. The multiplex PCR was applied in the new method. By our new genotyping method, the normal genotype possesses a clear DNA band at roughly 1.0 kb. The carrier has two clear DNA bands at roughly 0.4 and 1.0 kb. Furthermore, the new genotyping method was proved and validated by sequencing and comparing the two target bands recovered from electrophoresis gel. A total of 172 Holstein cattle samples from 4 farms were genotyped for BS. The result showed that 21 individuals were BS carriers with frequency of 12.21%. Since the carrier frequency is more than 10%, the imported frozen semen should be under surveillance and continuous genotyping is required for Taiwan dairy cattle population to eliminate the genetic defect gradually.

Key words: Brachyspina syndrome, Genotyping, Holstein cattle.

---

(1) Contribution No. 2551 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Breeding and Genetics Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 71246, Taiwan, R.O.C.

(3) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung 91201, Taiwan, R.O.C.

(4) Corresponding author, E-mail: hlachang@mail.npust.edu.tw.