

## 實驗室檢查

- ◎ **電子顯微鏡檢** 採取患羊唇部痂皮以磷鎢酸負染色後再以電子顯微鏡觀察，結果並無發現病毒顆粒(委由財團法人動物科技研究所實施)。
- ◎ **病毒核酸萃取** 使用QIAamp®DNA Mini Kit (QUIAGEN, USA) 並依其操作手冊之步驟進行，方法如下：取患病羊隻眼分泌物、唇部痂皮、肺臟、肝臟及大腦組織(重量大約10-25 mg)置入1.5 mL的微量離心管中製成乳劑，加入180 $\mu$ L Buffer ATL。再加入20 $\mu$ L Proteinase K，震盪混合均勻，置於56 $^{\circ}$ C乾浴器overnight，直到細胞完全溶解。震盪15秒後，加入200 $\mu$ L Buffer AL 震盪混合均勻，再加入200 $\mu$ L ethanol (96-100%) 混合均勻。將DNeasy Minispin column套入2 mL收集管，將液體由1.5 mL離心管中移入Mini spin column，以6,000 Xg離心1分鐘，丟棄收集管。將spin column放入新的2 mL收集管，加入500 $\mu$ L Buffer AW1，以6,000 Xg離心1分鐘，丟棄收集管。再將spin column置入新的2 mL收集管，加入500 $\mu$ L Buffer AW2，以20,000 Xg離心3分鐘，丟棄收集管。將spin column置入新的微量離心管中，加入200 $\mu$ L Buffer Ae，放在室溫下1分鐘後，以6,000 Xg離心1分鐘，收集DNA。
- ◎ **聚合酶鏈鎖反應** 參考詹於2008年博士論文中所設計發表的引子序列組合OVA32LF1: 5'-GAG GGC GCG AGCACC ATT TA-3'及OVA32LR1: 5'- CGG AGC CGG TAA TTT AGT GAC AGT-3'，以PCR偵測其A32L gene特異性產物 (詹，2008)。
- ◎ **PCR反應條件** 本反應利用循環溫控儀 ( MyCycle Thermal Cycle, Bio-Rad, USA) 進行基因之增幅，所使用試劑PCR總體積為25 $\mu$ L，包括: DNA Template 2 $\mu$ L、10 $\times$  reaction buffer 2.5 $\mu$ L、Taq DNA polymerase (5 unit/1 $\mu$ L) 1 unit、10 mM dNTP's 2 $\mu$ L，2 nmol primer，PCR反應條件略經修飾後之反應程序如下：initial denaturation 為 94 $^{\circ}$ C、4分鐘，denaturation 為 94 $^{\circ}$ C、50秒，annealing為 57 $^{\circ}$ C、33秒及extension為72 $^{\circ}$ C、10分鐘進行32個循環，最後的extension為72 $^{\circ}$ C、10分鐘完成反應。
- ◎ **PCR產物之電泳分析** 將PCR產物5 $\mu$ L及DNA size marker與6x loading dye均勻混合後，利用1.5%瓊脂凝膠置於0.5x TAE buffer之迷你電泳槽 (Mini-Gel electrophoresis) 中進行電泳分析，電泳條件為100伏特，進行電泳30分鐘後，將瓊脂置於0.5 $\mu$ g/mL ethidium bromide溶液中染色5分鐘，再以數位化影像分析系統 (GENEFLASH, SYNGENE, UK) 在紫外光下觀察，結果可得到預期的821 bp產物 (圖12)。
- ◎ **核酸定序與分析** 將PCR產物送至生物科技公司進行核酸定序，將定序後之**核酸**序列至NCBI GeneBank進行比對，結果與orf virus isolate Hoping ATPase gene有100%之相似度(表6)。
- ◎ **細菌分離與鑑定** (分別自死亡剖檢羊隻各臟器及1月齡仔羊潰爛之口唇、齒齦鈎菌)
  - 1.剖檢羊隻：由剖檢羊隻之各臟器鈎菌，進行細菌分離，培養於Blood agar平板培養基上，於37 $^{\circ}$ C恆溫箱中培養18-24小時，可觀察到自肺臟及肝臟分離的細菌在Blood agar上呈現灰白色半透明樣之菌落並具有特殊霉氣味，之後再接再種於MacConkey agar 平板培養基上，於37 $^{\circ}$ C恆溫箱中培養18-24小時，並無菌落生長。將Blood agar上的灰白色菌落經純化培養後，取獨立菌落塗抹於載玻片上烘乾固定進行革蘭氏染色(Gram's stain)，在光學顯微鏡1000倍油鏡下可觀察到呈紅色短桿狀兩端濃染之革蘭氏陰性菌。
  - 氧化酶試驗** 取Blood agar上之獨立菌落進行氧化酶試驗(Oxidase test)，結果呈陽性反應。
  - API 20NE 生化鑑定套組試驗** 使用API 20NE kit進行生化鑑定，經由APILAB電腦軟體查出結果皆為*Pasteurella multocida* 96% (表2)。
  - 2.1月齡仔羊：以無菌棉棒沾取滅菌生理食水將口唇及齒齦潰爛處稍做清潔後，以滅菌手術刀片之刀背局部輕輕刮除唇部潰爛處之表面後鈎菌，接種在添加5%脫纖綿羊血之血液培養基，在37 $^{\circ}$ C的培養箱中培養18-24小時，經純化培養後，取獨立菌落塗抹於載玻片上烘乾固定進行革蘭氏染色(Gram's stain)，以光學顯微鏡1000倍油鏡下觀察為革蘭氏陽性菌。