

構築應用於 PCR 之可辨識陽性對照 DNA

丁履紉*、劉玉彬、陳麗璇、李婉甄、陳燕萍、林育如

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction; PCR)已普遍成為傳染性疾病診斷實驗室的常規診斷技術，而偽陽性的檢驗結果為 PCR 診斷嚴重的問題之一。避免偽陽性的方法，除了從試劑、設備、實驗操作區著手外，被擴增的陽性對照核酸也可能是污染的原因之一。本實驗旨在構築應用於犬新孢子蟲 PCR 之可辨識陽性對照 DNA，即兩端為犬新孢子蟲引子序列，中間置換成家禽流行性感冒病毒序列。實驗步驟如下：設計犬新孢子蟲-禽流感引子對，以欲置換的禽流感 PCR 產物為模板進行 PCR，產物選殖至載體後，即建置完成可辨識陽性對照的犬新孢子蟲質體。構築之可辨識對照犬新孢子蟲 DNA 其序列較長 211 bp，一方面可於電泳膠片直接區別，產物也可以使用禽流感的引子再進行巢式 PCR 做為辨識用途。另外，以相同方法完成構築牛副流行感冒病毒第三型可辨識陽性對照之質體，再以 MEGAscript™ SP6 套組轉錄成 RNA 作為 RT-PCR 之可辨識陽性對照。

關鍵詞：可辨識陽性對照、聚合酶鏈反應、污染

緒言

聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)的應用非常廣泛，不僅止於基礎研究，還包括醫學診斷、分子流行病學和農業科學等各大領域[8]。PCR 經常應用於臨床實驗室微生物檢測，不同於傳統的病原培養增殖方法，僅需特異性引子增幅微生物DNA或RNA特定區域，提供了快速、靈敏的檢測感染性病原體的方法。然而，因為PCR相當靈敏，污染導致的偽陽性結果是檢驗上最大的隱憂[1,3,4,9,10]。

PCR污染的主要原因為使用被污染的試劑、分注器材、儀器、手套等器械設備和實驗操作過程不慎或動線管理不當引起。一次PCR可以產生相當於目標序列 10^9 倍的DNA產物。增幅的產物若產生霧化，即使是最小的氣溶膠仍含有 10^6 倍的擴增產物，霧化的擴增產物瀰漫於實驗空間，容易污染實驗室試劑、設備、通風系統[7]。潛在的DNA污染源，包括臨床檢體擴增後大量標的核酸片段交叉污染、實驗室曾經選殖過的

核酸片段[6]和重複擴增相同的目標序列，導致大量擴增產物積累在實驗室環境[11]。

為避免陽性對照污染檢驗結果，本實驗以犬新孢子蟲 (*Neospora caninum*) 和牛副流行性感冒病毒第三型 (bovine parainfluenza virus 3; PI3) 的檢測為對象，構築PCR診斷用之可辨識犬新孢子蟲DNA和PI3 RNA陽性對照。犬新孢子蟲 PCR之可辨識陽性對照的DNA，即兩端為犬新孢子蟲引子序列，中間置換成家禽流行性感冒病毒 (avian influenza, AI) 核酸序列。另外，以相同概念完成PI3可辨識陽性對照的DNA片段，中間置換成山羊痘 (goat pox) 病毒的核酸序列，再以轉錄套組將構築的質體轉錄出RNA，即可做為RT-PCR對照。

材料與方法

核酸萃取

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

本試驗所有樣品核酸均使用 MagNA Pure Compact System (Roche) 全自動核酸萃取機及 MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit 核酸萃取套組 (Roche) 並依其操作步驟進行。

構築犬新孢子蟲PCR之可辨識陽性對照的DNA

本實驗室常規使用之犬新孢子蟲PCR是以Neo NP4/NP7 引子對增幅Nc5 基因，再以半巢式Neo NP6/NP7 PCR引子對後續增幅DNA，以提升敏感性[12]。Neo NP4/NP7 PCR擴增產物大小為275 bp，NP4至NP6順向引子區鹼基長度67 bp，NP7 反向引子區長度18bp，非引子區長度190 bp。扣除正向及反向引子之序列，擬將中間190 bp非引子區以其它病原DNA片段置換。因考慮可辨識陽性對照DNA分子量大小不同，易於在電泳膠片直接辨識，本實驗將置換片段再增加200 bp而成為約390 bp。故本實驗採用實驗室現有最接近390 bp DNA片段的禽流感N2 基因RT-PCR 產物(401 bp)以進行置換(方法如圖1)，該產物為野鳥排遺RNA以禽流感N2 基因引子對RT-PCR擴增而得(序列如後)。取2 uL AI-N2 基因RT-PCR產物為模版(401 bp)、10uM Neo4/6F-AI-F1 順向引子和Neo7R-AI-R486 反向引子各1 uL，加入含1X GoTaq® Green Master Mix (Promega)，總反應體積為25 uL，增幅條件為94°C 40秒、50°C 60秒和72°C 60秒進行35次循環，最後72°C 5分鐘。引子序列如下：Neo4/6F-AI-F1：

Cctccaatgccaacgaaactcattctcgtctcctcggggcac
tcgccagtaacctaactctctTCAAATGGCACAATACA
TGATAG；合成的引子長度90鹼基，無模版結合的游離區長度為67鹼基，與模版結合的鍵結區長度為23鹼基。Neo7R-AI-486R：

GGGTGAACCGAGGGAGTTCACTCCTCTATATGC
TGAGC，合成的引子長度38鹼基，游離區長度18鹼基，鍵結區長度20鹼基。PCR產物以TOPO® TA Cloning® Kits (Invitrogen) 套組選殖，操作方法參照使用手冊，挑選白色菌落，以M13引子進行PCR，再進行質體序列分析，確認序列無誤。陽性質體菌落大

量增殖後，利用QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) 純化質體，操作方法參照使用手冊。

為避免操作高濃度陽性對照質體污染實驗室，先確認可檢出的濃度極限，再稀釋成適當操作濃度做為對照使用。質體純化後，先連續10倍稀釋，取 10^6 至 10^{-14} 稀釋階，以NeoNP4/NP7引子對，進行PCR，實驗方法同上，確認檢測濃度極限。

為確認構築的Neo-AI可辨識陽性對照可應用於犬新孢子蟲PCR。取犬新孢子蟲DNA和Neo-AI純化質體，分別以NP4/NP7引子對和NP6/NP7引子對進行neospora PCR，實驗方法如上述。PCR產物分子量以電泳膠片分析。純化的Neo-AI可辨識陽性對照質體以AI-N2 基因引子對(順向5'TCAAATGGCACAATACATGATAG 和反向CACTCCTCTATATGCTGAGC)進行PCR，可用於污染陽性對照之偽陽性產物雙重辨識用。

Neo-AI可辨識陽性對照質體應用於臨床neospora PCR檢驗

取2管犬新孢子蟲陽性病例檢體(17H05-1腦、17H05-2心)、陰性病例檢體(NC)、犬新孢子蟲陽性對照、Neo-AI可辨識陽性對照質體(純化質體稀釋為 10^8 倍)，首先以NP4/NP7引子對進行PCR，其產物再以NP6/NP7引子對，進行半巢式PCR[12]，再以電泳膠片觀察其產物大小。引子序列如下：Neo4F：5'-CCTCCCAATGCGAACGAAA、Neo6F：5'-CAGTCAACCTACGTCTTCT、Neo7R 5'-GGGTGAACCGAGGGAGTT。

構築PI3可辨識陽性對照的RNA

本實驗室常規使用之PI3 RT-PCR以7829F/8276R引子對增幅該病毒的HN基因，再以7892F/8239R引子對進行巢式PCR[5]。PI3RT-PCR擴增產物大小為448 bp(順向引子區長度83 bp加上非引子區長度308 bp加上反向引子區長度57 bp)，扣除正向及反向RT-PCR和巢式PCR引子之序列，擬置換中間非引子區308 bp，本實驗則採用實驗室現有分子量最接近的293 bp山羊痘PCR產物進行置換(方法如圖2)。取2 uL山羊痘PCR產物DNA為模版(293 bp)，10uM PI3-pox-F1 順向引子和PI3-pox-R433

反向引子各1 uL，加入含1X GoTaq® Green Master Mix (Promega) 總反應體積為25 uL，增幅條件為94°C 40秒、50°C 60秒和72°C 60秒進行35次循環，最後72°C 5分鐘。引子序列如下：PI3-pox-F1：GGATATGGAGGCCTAGAGCATGAGGAAAACGGA GACGTAATATGTAACACAACCTGGTTGTCCTGGCA AAACACAGAGAGACTGCAACAGATCCGTTGTCTA C，合成的引子長度102鹼基，游離區83鹼基，鍵結區19鹼基。PI3-pox-R433：

TTAGTGGATATGCATCAGTGTAACCTCCTGTTAT GCATCCGTCTGGGCATGAATGACCGATGTAGTA AATGATGGTTCC，合成的引子長度79鹼基，游離區57鹼基，鍵結區22鹼基。DNA產物以TOPO® TA Cloning® Kits (Invitrogen) 套組選殖，操作方法參照使用手冊，挑選白色菌落，以M13引子進行PCR後，再進行質體序列分析，確認序列無誤。陽性質體菌落大量增殖後，利用QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) 套組並依其操作步驟，進行質體純化。

PI3屬於副黏液病毒 (paramyxovirus) 為單股負股的RNA病毒。質體轉錄成RNA之前，先需要定序確認質體中promoter T7和promoter SP6啟動子位點上下游位置以及需轉譯為 sense RNA (相同序列) 或 antisense RNA(互補序列)，才能轉錄正確序列方向。故本實驗選用MEGAscript™SP6 Transcription Kit轉錄套組之操作步驟進行實驗，取約0.1µg DNA PI3-pox質體加入 Transcription buffer、10 mM ATP/CTP/GTP/UTP solutions、TURBO DNase™ I (2U/µl)和dH₂O，37°C作用至隔日，轉錄完成即得PI3-goatpox RNA核酸，可供RT-PCR使用。

PI3-goatpox可辨識陽性對照RNA應用於RT-PCR及PCR試驗

取PI3-goatpox RNA以PI3 7829F/8276R引子對進行RT-PCR試驗[5]，試驗應用SuperScript® III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) 試劑配置與反應溫度條件參照其操作方法。RT-PCR產物再分別以PI3 7892F/8239R巢式引子對及goatpox 1F/293R引子對進行PCR，實驗方法用上，以電泳分析觀察產物大小。

引子序列如下：PI3 7829F 5'-GGATATGGAGGYCTAGAGCATG、PI3 7892F 5'-GGCAAAACACAGAGAGACTG、PI3 8239R 5'-TCCGTCTGGGCATGAATGAC、PI3 8276R 5'-TTAGYGGATATGCATCAGTG、goatpox 1F 5'-CAACAGATCCGTTGTCTAC、goatpox 293R 5'-CGATGTAGTAAATGATGGTTCC。

結果

構築neospora PCR試驗之可辨識陽性對照

以AI-N2基因DNA產物為模版(401 bp)，Neo4/6F-AI-F1和Neo7R-AI-R486引子對進行PCR，可得486 bp產物。PCR產物以TOPO® TA Cloning® Kits套組選殖，挑選白色菌落，以M13引子進行PCR後再分析其核酸序列。確認序列兩端為neospora 引子序列，中間為家禽流行性感冒病毒核酸序列，即構築完成Neo-AI陽性對照質體。

大量培養質體以套組純化，純化後質體連續10倍稀釋，取10⁻⁶至10⁻¹⁴稀釋階，以NeoNP4/NP7引子對，進行PCR，結果10⁻⁶至10⁻¹⁰為陽性(如圖3)，為減少PCR污染的風險，需使用檢測濃度極限的100倍質體濃度(10⁻⁸)為陽性對照。

Neo-AI可辨識陽性對照質體和犬新孢子蟲DNA以犬新孢子蟲 PCR和巢式PCR引子對進行PCR試驗結果

取犬新孢子蟲DNA和Neo-AI可辨識陽性對照質體，分別以Neo NP4/NP7引子對和Neo NP6/NP7引子對進行PCR，結果如圖4。犬新孢子蟲陽性對照以NP4/NP7為引子的PCR產物大小為275 bp；NP6/NP7為引子的PCR產物227 bp。Neo-AI質體陽性對照以NP4/NP7為引子的PCR產物大小為486 bp；NP6/NP7為引子的PCR產物為438 bp(結果如圖4)。因為可辨識陽性對照質體Neo-AI中間置換比原預期產物長211 bp，以電泳膠片結果可立即辨識。若懷疑污染Neo-AI對照質體時，除了產物大小不同外，也可以將疑似污染的DNA產物(486 bp或438 bp)利用AI-N2基因引子對進行PCR，可得產物大小為

401 bp，可用於污染陽性對照偽陽性產物雙重辨識用。

Neo-AI可辨識陽性對照質體應用於臨床常規犬新孢子蟲 PCR檢驗

取2管犬新孢子蟲陽性病例檢體DNA (17H05-1腦、17H05-2心)、陰性病例檢體DNA (NC)、犬新孢子蟲 DNA、Neo-AI可辨識陽性對照質體 (10^8)，首先以NP4/NP7進行First PCR，其產物再以NP6/NP7引子對，進行半巢式PCR，結果如圖5。First PCR陽性病例檢體DNA產物大小為275 bp；可辨識陽性對照質體為486 bp，產物大小相差211 bp，以電泳膠片結果可立即辨識。半巢式PCR檢測陽性病例檢體的DNA產物大小為227 bp；可辨識陽性對照質體為438 bp，產物大小也相差211 bp，以電泳膠片結果可立即辨識。

構築副流行性感冒病毒第三型RT-PCR試驗之可辨識陽性對照的RNA

以goatpox PCR產物DNA為模版 (293 bp)，PI3-pox-F1 順向引子和PI3-pox-R433引子對進行PCR，可得433 bp產物。PCR產物再以TOPO® TA Cloning® Kits套組選殖，挑選白色菌落，以M13引子進行PCR後再分析其核酸序列。確認序列兩端為PI3引子序列，中間為山羊痘病毒序列，即構築完成PI3-pox陽性對照質體。陽性菌落大量增殖後，利用QIAprep Spin Miniprep Kit純化質體。質體轉錄成RNA之前，經定序確認質體上游啟動子為SP6 promoter需轉譯為負股的RNA。故本實驗選用 MEGAscript™ SP6 Transcription Kit轉錄。取轉錄之PI3-goatpox RNA，以PI3 7829F/8276R引子對進行RT-PCR，產物大小為433 bp。取RT-PCR產物再分別以PI3 7892F/8239R巢式引子對及goatpox 1F/293R巢式引子對進行PCR，分別可得333 bp和293 bp產物。goatpox 1F/293R巢式引子可用於污染陽性對照 (433 bp和333 bp) 之偽陽性產物辨識用，結果如圖6。

討論

為避免陽性對照污染，設計可辨識PCR產物的陽

性對照為可行方法。本實驗辨識污染陽性對照之偽陽性產物方法如下：若置換非引子區DNA片段長度不同，可直接觀察電泳膠片分子量大小來區別。Neo-AI可辨識陽性對照質體First PCR產物為486 bp而非275 bp；巢式 PCR產物為438 bp而非227 bp。PCR產物 (486 bp和438 bp) 也可以AI-N2基因引子對進行PCR，產物大小為401 bp，即可確認為污染可辨識陽性對照。

若非引子區置換DNA片段長度一樣，可利用置換片段DNA引子對進行PCR區別，如PI3-goatpox可辨識陽性對照RNA PI3 RT-PCR試驗及巢式PCR之產物大小分別為433 bp和333 bp，以山羊痘引子對進行PCR，可得產物大小為293 bp，即可確認為污染陽性對照。PCR產物亦可直接定序，分析序列中間是否為被置換的病原序列。

如何選擇置換的DNA片段，優先考慮PCR擴增工作區中很少操作的病原核酸，或使用不同動物來源之基因，例如操作牛源檢體實驗室可以用禽源病毒取代，減少非特異反應並降低污染發生機率。置換的DNA選擇敏感性和特異性高的PCR產物，如此合成的引子的鍵結區與模板結合能力較強，PCR引子架接容易成功。本實驗所使用的PI3-goatpox F1引子游離區與鍵結區的比例為83:19 (=4.37)，鍵結區引子G+C的比例占47%。PI3-goatpox R433引子游離區與鍵結區的比例為57:22 (=2.59)，引子G+C的比例占41%。Neo4/6F-AI-F1則為67:23 (=2.91)和35%。

避免陽性對照污染而誤判，除了自製可辨識的DNA外，也可使用非引子區序列原本就有差異的核酸當做陽性對照使用。例如操作瘟疫病毒(pestiviruses)通用引子對 RT-PCR檢測牛病毒性下痢病毒時，以相同血清群(serogroup)的豬瘟病毒核酸作為陽性對照，利用定序序列差異來辨識。或者，選用序列有差異的毒株為對照，例如牛流行熱以疫苗株為對照，檢測野外毒，再利用序列差異來區別，是否污染陽性對照。

DNA污染的預防方法有機械性預防、化學清除或UV照射法，目前最廣泛的污染控制技术為應用尿嘧啶-DNA糖基化DNA修復酶(Uracil-N-glycosylase; UNG)，可識別和去除PCR產物中的去氧尿嘧啶核苷三磷酸

構築應用於 PCR 之可辨識陽性對照 DNA

(dUTP)。PCR使用dUTP取代dTTP)可產生相對於天然DNA模板具有區別特徵的擴增產物，因為目標DNA不含dUTP，反應同時加入UNG，在第一步驟PCR熱循環加熱至95°C時，UNG會將前次PCR時因殘留在環境中而污染到當次檢體內含dUTP的DNA的片段裂解，至第二步驟溫度降至約55°C時，UNG即失去作用，因此接著進行的annealing及extension步驟即可確保所增幅的產物是複製當次檢體內的DNA，因此可防止前次PCR時的污染造成的偽陽性結果[2]。

當傳染性病原診斷實驗室無法獲得病原核酸時，可自行設計合成陽性對照DNA，並選殖成質體，可長期保存備用。現今應用DNA合成儀直接合成寡鹼基價格較低廉，亦可直接合成含有雙向對接引子之DNA，

不需要用置換DNA片段的方法，為更便捷合成可辨識陽性對照的方法。

PCR為重要診斷工具，當檢測極限要求愈來愈高，巢式PCR試驗被陽性檢體或陽性對照污染的風險也更高，建議以即時螢光定量PCR，取代巢式PCR減少重覆操作DNA和PCR後產物的處理，可防止潛在的PCR產物污染的風險。

應用PCR進行診斷，需要建立標準作業流程、確效流程和適當的品質管制措施和系統措施來預防和檢測污染。當污染發生時，才能準確地找出哪個程序被污染。實驗人員工作習慣會直接影響實驗結果的質量，確實遵守標準作業流程和管控流程，才能降低污染風險並確保正確的PCR結果。

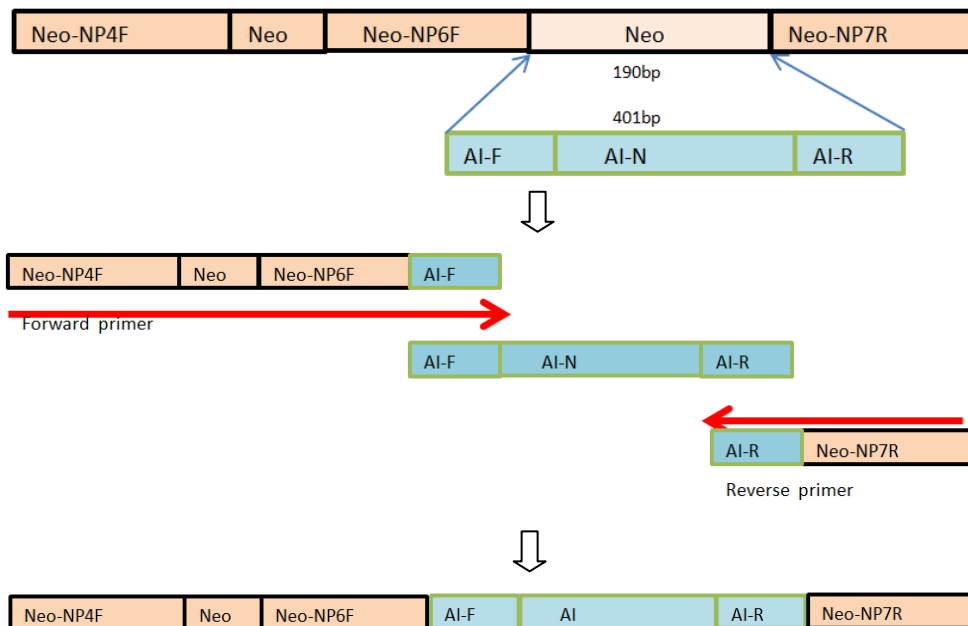


圖 1、構築 neospora PCR 試驗之可辨識陽性對照的 DNA 方法。

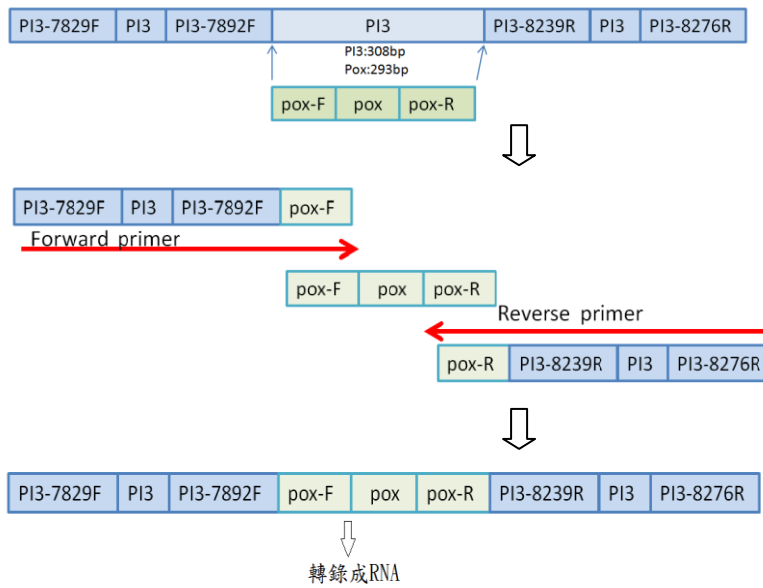


圖 2、構築副流行性感冒病毒第三型 (PI3) RT-PCR 試驗之可辨識陽性對照 RNA 的方法。

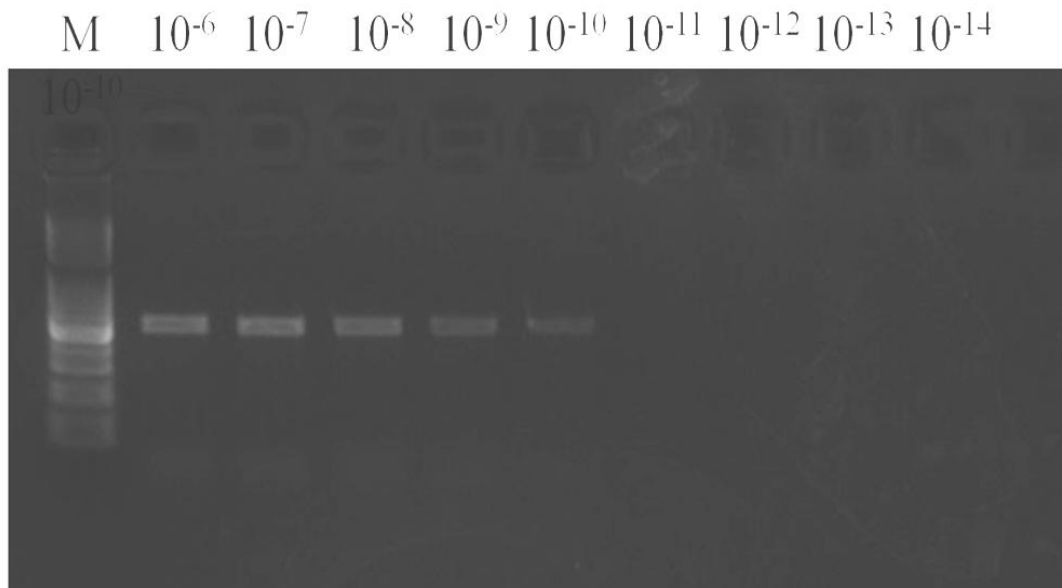


圖 3、Neo-AI 可辨識陽性對照質體取 10^{-6} 至 10^{-14} 稀釋階，以 Neo NP4/NP7 引子對，進行 PCR 之結果。 10^{-6} 至 10^{-10} 稀釋階可得 486 bp 產物。檢測濃度極限為 10^{-10} 倍稀釋。

構築應用於 PCR 之可辨識陽性對照 DNA

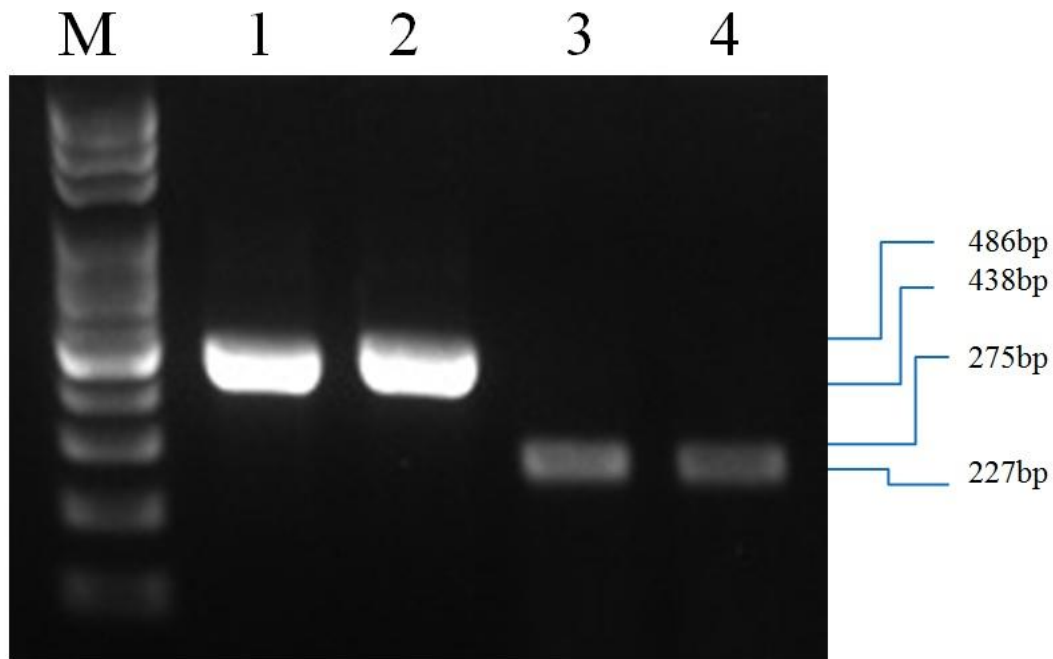


圖 4、Neo-AI 可辨識陽性對照質體和犬新孢子蟲 DNA 以 neospora PCR 和巢式 PCR 引子對進行 PCR 試驗之結果。

Lane 1：Neo-AI 質體陽性對照以 NeoNP4/NP7 為引子的 PCR 產物為 486 bp，
Lane 2：Neo-AI 質體陽性對照以 NeoNP6/NP7 為引子的 PCR 產物為 438 bp，
Lane 3：neospora DNA 陽性對照以 NeoNP4/NP7 為引子的 PCR 產物，Lane 4
為 275 bp：neospora DNA 陽性對照以 NeoNP6/NP7 為引子的為 PCR 產物 227
bp。M：DNA marker。可辨識陽性對照質體 Neo-AI 比 neospora DNA PCR 產物高
211 bp，以電泳膠片結果可立即辨識。

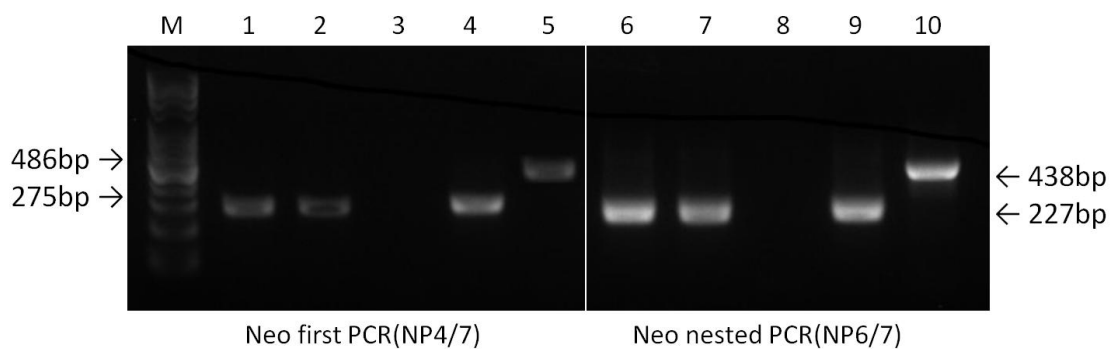


圖 5、Neo-AI 可辨識陽性對照質體應用於臨床 neospora PCR 和巢式 PCR 檢驗結果。

Lanes 1~5：以 Neo NP4/NP6 為引子的 PCR 產物。Lane 1：17HO5-1 腦，
Lane 2：17HO5-2 心，Lane 3：陰性對照，Lane 4：陽性對照 neospora DNA；
Lane 5：Neo-AI 質體陽性對照 (10^8)。M：DNA marker。Lanes 1、2、4 PCR
產物為 275 bp；Lane 5 Neo-AI 質體陽性對照產物為 486 bp。Lanes 6~10：
Lane1~5 PCR 產物以 NeoNP4/NP7 為引子的半巢式 PCR 產物。Lanes 6、7、
9 PCR 產物為 227 bp；Lane 10 Neo-AI 質體陽性對照產物為 438 bp。

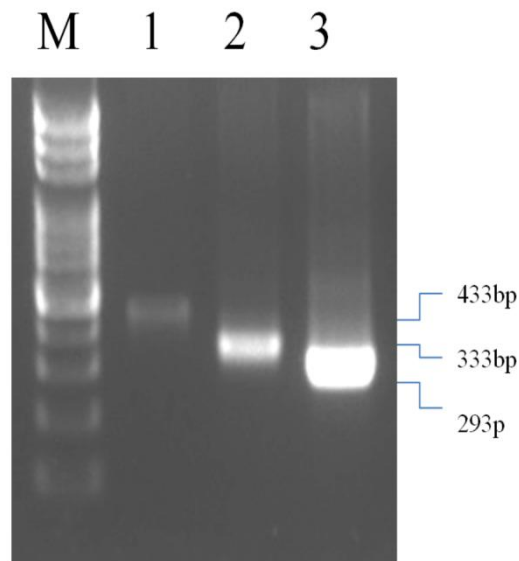


圖 6、PI3-goatpox 可辨識陽性對照 RNA 以 PI3 引子對進行 RT-PCR 試驗及 PI3 和 goatpox 巢式 PCR 之結果。

Lane 1 : PI3-goatpox RNA 以 PI3 7829F/8276R 引子對進行 RT-PCR 試驗，結果可得 433 bp 產物。Lane 2 : 取 Lane 1 產物以 PI3 7892F/8239R 巢式引子對進行 PCR 試驗可得 333 bp 產物。Lane 3 : 取 Lane 1 產物以 goatpox 1F/293R 巢式引子對進行 PCR 試驗可得 293 bp 產物。M : DNA marker。

1. Cimino GD, Metchette KC, Isaacs ST, Zhu YS. More false-positive problems. *Nature*, 347:340-341, 1990.
2. Aslanzadeh J. Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 34, no. 4, 2004.
3. Kitchin PA, Szotyori Z, Fromhoic C, Almond N. Avoidance of false positives. *Nature*, 344:201, 1990.
4. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339:237-238, 1989.
5. Lyon M, Leroux C, Greenland T, Chastang J, Patet J, Mornex JF. Presence of a unique parainfluenza virus 3 strain identified by RT-PCR in visna-maedi virus infected sheep. *Vet Microbiol*, 57, 95-104, 1997.
6. Nerenberg, MI, Minor T. Detection of plasmid contamination in PCR samples. *BioTechniques*, 11:332, 1991.
7. Persing DH. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol*, 29:1281-1285, 1990.
8. Persing DH. PCR protocols for emerging infectious diseases. ASM Press, Washington, DC, 1996.
9. Sarkar G, Sommer SS. Shedding light on PCR contamination. *Nature*, 343:27, 1990.
10. Sarkar G, Sommer SS. More light on PCR contamination. *Nature*, 347:340-341, 1990.
11. Tang Y, Persin DH. Molecular detection and identification of microorganisms, In: *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed, 215-244, 1999.
12. Yamage M, Flechtner O, Gottstein B. Neospora caninum: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR), *J Parasitol*, 82:272-279, 1996.

Using Plasmid to Construct a Differentiable Positive Control for Polymerase Chain Reactions

LJ Ting^{*}, YP Liu, LH Chen, WC Li, YP Chen, YJ Lin

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Polymerase chain reaction (PCR) has been a routine laboratory diagnostic method for the detection of the etiological agents of infectious diseases. When employing this method, one of the considerations is the potential of false-positive PCR results. To minimize the risk of producing false-positive results, amplified nucleic acid positive controls are a high risk factor for contamination, in addition to reagents, equipment, and working areas. The aim of this study was to construct plasmid as differentiable positive controls when using PCR to detect neospora and bovine parainfluenza virus 3, respectively. The positive control is a plasmid inserted with a fragment composed of an inner sequence of avian influenza virus and the primer annealing regions of neospora sequences at both ends. When the construct was employed in the neospora -AI PCR assay, the reaction generates a 211-base-pair-long product, longer than that of the normal neospora positive PCR product. In addition, the product can be identified by nested PCR which is used for the routine identification of avian influenza viruses. The same strategy was used to construct a parainfluenza 3-goatpox differentiable positive control, followed by transcribing plasmid DNA into RNA with the MEGAscript™ SP6 Kit.

Keywords : *differentiable positive control, polymerase chain reaction (PCR), contamination*

