



Nested PCR ve Kullanım Alanları

Emre SEVİNDİK¹

Z. Tuğba ABACI²

¹Ardahan Üniversitesi Göle Meslek Yüksek Okulu, Süt ve Ürünleri Teknolojisi, Ardahan

²Ardahan Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ardahan

*Sorumlu Yazar:

E-posta: ph.d-emre@hotmail.com

Geliş Tarihi : 15 Temmuz 2012

Kabul Tarihi : 31 Ağustos 2012

Özet

Nested PCR, PCR tekniğinin hassasiyetini artırmak için geliştirilen en popüler yöntemlerden biridir. İstenilen DNA dizisinin bulunup çoğaltılmasında hassasiyeti 10^4 kat artırdığı tahmin edilmektedir. Bu reaksiyon mekanizmasında birbirini takip eden iki polimeraz zincir reaksiyonunu içermektedir. İlk amplifikasyonda hedef DNA'nın dış bölgesine özgün iki dış primer kullanılır ve uzun bölge çoğaltılır. İkinci amplifikasyon basamağında, ilk amplifikasyondan gelen bölgenin iç bölgesine bağlanan iki iç primer kullanılarak küçük bölgenin çoğaltılması sağlanmaktadır. İkinci PCR işleminden sonra ortada istenilmeyen DNA dizisi kalmamaktadır. Bu sistem günümüzde, Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO), patojen teşhisinde, viral enfeksiyonlarda, genin ifadesinde, fungal tanıda ve birçok medikal alanda kullanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Nested PCR, GDO, Viral enfeksiyonlar, Uygulamalar

Nested PCR and Applications Area

Abstract

The Nested PCR is one of the most popular methods for improving the specificity of the PCR techniques. It is assumed that Nested PCR increase 10^4 fold for accuracy of the amplification of the target DNA sequence. This reaction mechanism contains two consecutive polymerase chain reactions. The two specific primer of outer region of DNA are used and the long area is replicated at the first amplification. The two primers of inner area that is come from first amplification are used for reproduction of small area at the second amplification step. There is no undesirable DNA sequence after the second PCR step. Nowadays this system have been using for GMO, pathogen diagnosis, viral infections, gene expression, fungal diagnosis and many medical fields.

Key Words: Nested PCR, GMO, Viral Infections, Applications

GİRİŞ

PCR, 1985 yılında Kary Mullis tarafından ilk kez bilim dünyasına sunulmuş olup, günümüzde modern bilime önemli katkılar sağlamıştır. Bu yöntem moleküler teknolojideki önemli gelişmelerden biridir [1]. PCR, ortamda polimeraz enzimi ve sentez için uygun moleküler bulunması durumunda, özel bir DNA veya RNA dizisinin seçilip tanınması ve sayısal olarak artırılması esasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem moleküler markırlar çalışmalarını için alternatif bir yol sağlamaktadır [2,3]. Teknik, özellikle nükleik asitlerin amplifikasyonu gibi moleküler teknolojiler, sistematik ekoloji, biyoteknoloji, toprak mikrobiyolojisi, tıp, patoloji, bakteri, virüs, mantar ve protozoa gibi canlılardan kaynaklanan enfeksiyon hastalıklarının teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [4,5,6].

PCR, basit ve hassas olup, temelde üç aşamadan oluşmaktadır. İlk basamak çift iplikli kalıp DNA molekülünün $90-95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de denature olmasıdır [7,8]. Bu aşamada DNA tek iplikçik halini alır. İkinci basamak, $37-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıklar arasında primerlerin tek iplikçikli DNA molekülüne bağlanma aşamasıdır [9]. Üçüncü basamakta ise DNA zincirleri üzerine yapışan primerler ve DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polimerase) vasıtasıyla istenilen DNA bölgesi çoğaltılır. DNA polimeraz enzimi $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta en iyi çalışma performansı gösterdiği için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır [10]. Üç basamaktan oluşan (denatürasyon, annealing, ekstension) işlem bir PCR devrini temsil etmektedir. Bu işlem genel olarak 25-40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılmaktadır [8,9].

Bazı durumlarda ortam şartlarının optimum olmaması veya reaksiyona giren ürünlerin az veya çok olması gibi sebeplerden ötürü yanlış primer bağlanmaları, istenilen bantların elde edilememesi veya istenmeyen bantların çoğaltımı söz konusu olabilir. PCR işlemlerinde yüksek hassasiyet için; Mg^{+2} gibi gerekli iyonlar, primerler, dNTP'ler ve DNA Polimeraz'ın optimum konsantrasyonlarda olması, etkili denaturasyon, yüksek yapışma sıcaklığı, döngü sayısı ve uzunluğu, PCR cihazı (Thermal cycler) etkinliği, Tek zincirin kalitesi, PCR bileşenlerinin kalite ve miktarı önemlidir [11].

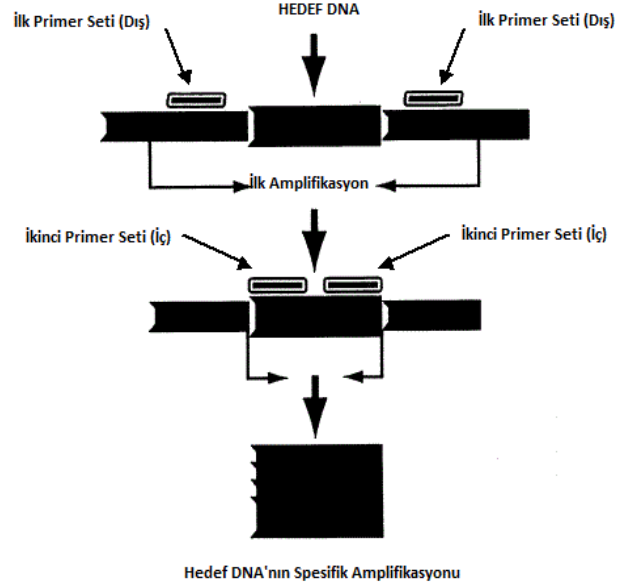
PCR tekniğinin bulunmasından bu yana pek çok metot geliştirilmiştir. Çoğaltılması istenilen DNA dizisinin bulunduğu durumlarda kullanılan metotlar; kantitatif PCR, revers transkriptaz PCR, kat fazlı PCR, touch down PCR, hot start PCR, multipleks PCR, asimetrik PCR ve nested PCR'dır.

PCR tekniğinin spesifikliğini artırmak için geliştirilen yöntemlerden biri Nested PCR'dır. Bu yöntem, birçok amplifikasyon ürünü içerisinde çoğaltılmak istenilen DNA dizisinin bulunup çıkarılmasını sağlayan oldukça spesifik bir yöntemdir. Nested PCR reaksiyonlarında birbirini takip eden iki polimeraz zincir reaksiyonu mevcuttur. Yöntemde istenilen amplifiye dizilerin iç bölgesinin çoğaltılması amacıyla dizayn edilen primerlerin kullanıldığı 2. PCR işlemi uygulanmaktadır. DNA segmentlerinin sekansı için iki primer çifti dizayn edilmiştir. Uygulanan ilk amplifikasyonda, hedef DNA dizisinin dış bölgesine özgü iki dış primer kullanılarak uzun bir bölgenin çoğaltılması gerçekleşmektedir. İkinci amplifikasyon mekanizmasında, ilk amplifikasyondan gelen bölgenin iç bölgesine bağlanan iki iç primer kullanarak küçük alanın çoğaltılması sağlanmaktadır (Şekil 1.) [12].

Nested PCR'ın istenilen DNA dizisinin bulunup çoğaltılmasında hassasiyeti 10^4 kat artırdığı tahmin edilmektedir ve ikinci PCR işleminden sonra ortamda istenilmeyen DNA dizisi kalmamaktadır. İkinci PCR işleminde kullanılan primerlerin 3' ucunda bulunan iki veya üç nükleotidlik dizi yöntemin hassasiyetini ortaya çıkarmaktadır. Eğer 3' nükleotid dizisi hedef DNA dizisinin komplementeri değilse amplifikasyon meydana gelmeyecektir. Bu durumda hedef olmayan dizilerin çoğaltımı engellenecektir.

Başlangıç ve ikinci PCR reaksiyonlarının her ikisi de herhangi bir kontaminasyon probleminden sakınmak ve manuplasyonları azaltmak için tek bir tüp içerisinde gerçekleştirilebilmektedir. Her iki primer de PCR reaksiyonu başlangıcında vardır ancak nested primerlerinin Tm (primer bağlanma sıcaklığı) değeri başlangıç primerlerine göre daha düşüktür. Başlangıç PCR programında yüksek sıcaklık uygulandığında, başlangıç dizisinin amplifikasyonuna izin verilirken, nested primerleri diziyeye bağlanamaz. Daha sonra ikinci PCR programında daha düşük sıcaklıkta, nested primerleri bağlanarak hedef dizilerin çoğaltılmasını sağlamaktadır. PCR reaksiyonları sonrası yapılan agaroz jel elektroforezi ile hem başlangıçtaki PCR ürünleri hem de daha küçük olan nested PCR ürünleri görülebilmektedir. Ancak başlangıç PCR ürünleri çoklu bantlar oluşturduysa veya nested PCR ürünleri kalitesizse jelde tanımlamak zor olabilmektedir.

Yöntemin en önemli dezavantajı birincil amplifikasyon tüpünden ikincisine örnekler aktarılırken çok az da olsa çevreye örnek saçılması ve daha sonraki çalışmalarda hava yolu ile kontaminasyona neden olmasıdır. Bu nedenle iki tüp yerine tek tüpte, iki farklı reaksiyon ısısı kullanılması önerilmektedir [11].



Şekil 1. Nested PCR çalışma akışı

Nested PCR'' Teknolojisinin En Önemli Uygulama Alanları

Hastalıkların teşhisinde

Günümüzde Nested PCR metodu kullanılarak protozoa, bakteri ve virüs gibi birçok hastalık etmeni teşhis edilebilmektedir. Bu hastalıkların başında tüberküloz gelmektedir. Tüberküloz, dünya çapında ölümcül sonuçlar oluşturabilen bulaşıcı bir hastalıktır. Dünya nüfusunun hemen hemen üçte biri tüberküloz basili ile enfektir. Tüberkülozun bulaşıcı bir hastalık olma sebebi halk için önemli bir sağlık sorunudur. Ülkemiz dâhil tüm dünyada ciddi bir şekilde mücadele edilmektedir [13,14]. Tüberküloz, klinik örneklerde aside dirençli basillerin (AFB) teşhisi ile belirlenebilmektedir [15]. Laboratuvar AFB kültür metodu hassas ve duyarlıdır fakat bu kültür metodu yaklaşık 6-8 hafta gibi uzun zaman almaktadır [16]. Son zamanlarda nükleik asit amplifikasyon teknolojisi gibi yöntemler kullanılarak, enfeksiyon yapan *Mycobacterium tuberculosis* gibi patojen mikroorganizmalar teşhis edilebilmektedir. Amplifikasyon teknolojisi kullanılarak birkaç saat içinde olası tüberkülozun varlığı ortaya çıkarılabilmektedir [17]. Nested PCR'm pek çok farklı klinik örnekten *Mycobacterium tuberculosis* kompleks türlerinin belirlenmesinde etkin olduğu gösterilmiştir [18].

Shukla ve ark. (2011), 140 tüberküloz şüpheli hastada, *Mycobacterium tuberculosis*'in akciğer ve diğer organlarda teşhisi için nested PCR değerlendirmesi yapmıştır ve Nested PCR amplifikasyonun özellikle akciğer haricindeki organlarda *Mycobacterium tuberculosis*'in hızlı ve hassas tespiti için kullanışlı olduğu kanısına varmışlardır [17].

Tüberkülozun yanı sıra Q humması, şark çibani gibi önemli hastalıkların teşhisinde de Nested PCR'dan yararlanılmaktadır. Ogawa ve ark.(2004), *Coxiella burnetii*'nin neden olduğu Q humması teşhisinde nested PCR yönteminin etkinliğini araştırdıkları bir çalışmada, yöntemin diğer PCR yöntemlerine göre 10 kat daha hassas

olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer yöntemlerde görülen spesifik olmayan bantların nested PCR yönteminde görülmediği ve net sonuç verdiği bildirilmiştir [19].

Bununla birlikte *Leptospira* cinsine ait bakterilerin neden olduğu dünya çapında yaygın hastalıklardan biri olan Spiroket hastalığı Nested PCR'in yüksek hassas ve özgül olma özelliği ile hayvanların yanı sıra insanlarda da teşhis edilebilmektedir [20,21].

Şark çıbanı, *Leishmania tropica* ve *Leishmania major* tarafından Orta Doğu, Brezilya ve Peru'da yaygın olarak görülen önemli bir hastalıktır [22]. Dünya genelinde yıllık 1.500.000 *Leishmania* vakası tespit edildiği bildirilmiştir [23]. *Leishmania* tanısında izoenzim analizleri, monoklonal antikolar, DNA hibridizasyon metodları, şizoderm analizleri ve diğer moleküler teknikler kullanılmaktadır [24]. *Leishmania* türleri moleküler metodlarla, hem kinetoplast DNA hem de kromozomal DNA kullanılarak teşhis edilebilmektedir [25]. Maraghi ve ark. (2007), klinik örneklerden *Leishmania* türlerinin tanısında Nested PCR'in güvenilir ve hassas bir yöntem olduğunu ve epidemiyolojik araştırmalarda kullanılabilirliğini önermektedir [26].

Mikoloji alanında ilk PCR uygulaması 1990 yılında fungusların taksonomik ve filogenetik akrabalıklarını göstermek için rRNA dizi analizi ve amplifikasyonu yapılmıştır [27]. Ancak örnekte az miktarda mikroorganizma olduğu zaman PCR'in hassas olmadığı ve hassasiyeti artırmak için Nested-PCR yöntemi kullanıldığı bildirilmiştir. Yöntemin birinci periyodunda tek primer çifti ile 15-30 kez çoğaltılan ürünler yeni bir reaksiyon tüpüne transfer edilerek transfer edilerek internal dizilere spesifik sekonder primer çiftleri kullanılarak ikinci bir çoğaltmaya tabi tutulmakta ve elektroforezle spesifik bantlar belirlenmektedir [28,29].

Serebral sıvılarda *Candida Neoformans*'ın saptanması için nested PCR yönteminin kullanıldığı bir çalışmada, kültür ile Cryptococcal menenjit teşhisi yapılmış olan 21 hastada fungusu ait DNA pozitif, 19 kontrol hastasında ise negatif bulunmuştur. Çalışma sonucunda Nested PCR yönteminin Cryptococcal menenjit tanısında etkin bir yöntem olduğu belirlenmiştir [30]. Benzer şekilde oküler sıvılarda *C. albicans* türünün rRNA dizilerine özgü primerler kullanılarak yapılan nested PCR uygulaması sonucunda fungusu ait DNA saptandığı bildirilmiştir [31].

Serolojik testler, PCR ve Nested PCR yöntemleri kullanılarak Pulmonar aspergillozis teşhisinin yapıldığı bir çalışmada *Aspergillus* DNA'sının serum örneklerinden saptanmasında, bu 3 yöntem arasında en hassas yöntemin Nested PCR yöntemi olduğu bildirilmiştir [32]. Nested PCR amplifikasyonu ile *Candida neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus* gibi fungal organizmaların teşhisi ile orkidelerde patojen olarak etken olan *phytophthora* tanımlanması da yapılabilmektedir [33].

Viral Tanıda etkili antiviral tedavinin geliştirilmesi ile uçuk virüslerin (HSV) enfeksiyonlarının hızlı ve duyarlı tanımlanması ihtiyacı artmıştır [34,35]. HSV'nin çeşitli klinik belirtileri, merkezi sinir sistemi ve diğer mukozalarda benzerlik göstermesi nedeniyle kesin tanı etkin klinik yöntemi için anahtar olmuştur. Beyin omurilik sıvısındaki (CSF) HSV DNA'sının algılanması, merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarını tanımlamak için kullanılmaktadır. CSF'deki HSV DNA'sını algılamaya yetecek kadar hassas ve net oldukları için, Nested PCR gibi nitelikli PCR denemeleri southern blot hibridizasyonu ile birlikte enfeksiyon tanısında kullanılmaktadır [36].

Benzer şekilde mavi dil hastalığı, rastık hastalığı gibi, bitki, hayvan ve insanlarda bakteri, virüs ve fungusların

neden olduğu birçok hastalığın tanısında nested PCR yönteminden yararlanılmaktadır [37,38].

Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların Teşhisinde

1996 yılından beri pek çok transgenik bitki yaygın olarak yetiştirilmekte ve marketlerde satılmaktadır. Marketlerde yer alan mısır, buğday, soya fasulyesi gibi gıda maddelerinin %60'ının genetiğinin değiştirilmiş olduğu tartışılmaktadır. Moleküler genetik yöntemler ile organizmalara istenilen çeşitli genlerin transferi yapılarak yiyeceklerin raf ömrü uzatılabilmekte ve görüntüsü cazip kılınabilmektedir. Nested PCR protokolleri, çeşitli gıdalarda genetiği değiştirilmiş organizmaların varlığını saptamada güvenilir bir yöntem sağlayacaktır. Nested PCR yöntemi genetiği değiştirilmiş gıdalarının tespitinde yanlış pozitif ve yanlış negatif etkileri ortadan kaldırmaktadır [39,40].

Gen ekspresyonu

Ökaryot ve prokaryotlar da genin faaliyeti transkripsiyon seviyesinde düzenlenmektedir. Genin transkripsiyon kontrolü, hücrenin fonksiyonu ve canlılığın devamı için büyük öneme sahiptir. Genin ifadesi DNA'dan oluşan genlerde bulunan kalıtsal bilginin ilgili gen ürünlerine aktarılmasıdır. Gen ifadesinin ilk aşaması olan transkripsiyon, yapısal olarak korunmuş olan DNA-bağımlı RNA polimerazlar tarafından gerçekleştirilmekte ve bir DNA kalıbından RNA molekülünün sentezlenmesi ile son bulmaktadır. Ökaryot ve prokaryot genomların organizasyonlarının çok farklı olması sebebi ile genin ekspresyonu hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda farklılık göstermektedir. Prokaryotlarda sadece tek bir RNA polimeraz bütün RNA'ların (tRNA, mRNA, rRNA) transkripsiyonundan sorumlu iken, ökaryotlarda farklı RNA türleri, farklı RNA polimerazlar tarafından sentezlenmektedir [41]. Lazer Mikrodiseksiyon ile başarılı bir şekilde mikrodiseksiyona uğratılan prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde Nested PCR yöntemi uygulanarak hem DNA hem de cDNA analizi yapılabilmektedir [42].

Sonuç olarak, bu derlemede genetiği değiştirilmiş organizmaların teşhisi, gen ifadesi, hastalıkların teşhisi gibi birçok alanda giderek önemi daha da artan PCR tekniklerinden bir tanesi olan Nested PCR yönteminin hassasiyeti ve önemi anlatılmıştır. Nested PCR, klasik kültür yöntemleri ve diğer PCR uygulamalarına oranla çok daha hassas bir yöntemdir ve bu hassasiyet iki aşamalı PCR uygulamasından kaynaklanmaktadır. Nested PCR uygulamalarının ilerleyen zamanlarda farklı hastalıkların teşhis ve tanısında da kullanılacağı ve güvenilir sonuçlar alınacağı tahmin edilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] McPherson MJ, Moller SG, 2000. The Basics. New York: Cromwell Press; 1-45.
- [2] Türkyılmaz S, Esendal MÖ, 2002. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Mikrobiyolojide Kullanım Alanları: Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 8(1): 71-76.
- [3] Nagaraja GM, Nagaraju J, 1995. Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primers. Electrophoresis, 16: 1633-1638.
- [4] Bridge PD, Arora DK, 1998. Interpretation of PCR methods for Species Definition, 63-84, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, p.357.
- [5] Edel V, 1998. Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview, 1-20, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, p. 357.

- [6] Louie RF, Tang Z, Albertson TE, Cohen S, Tran NK, Kost GJ, 2008. Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit. Care Med.*, 36(5): 1487-1492.
- [7] Hadidi AL, Levy Podleskis EV, 1995. Polymerase chain reaction technology in plant pathology. In: *Molecular Methods in Plant Pathology*, pp.167-187. Eds. R. P. Singh, U. S. Singh. Boca Raton: CRS Press.
- [8] Watson JD, Gilman J, Witkowski M and Zoller M, 1992. The polymerase chain reaction In: *Recombinant DNA*. Second Edition. New York. 79-98.
- [9] Innis MA, Gelfand DH, 1990. Optimization of PCRs In Innis, PCR protocols A guide to methods and applications. Academic Press. p.3-12.
- [10] Erlich HA, Gelfand DH, Sninsky JJ, 1991. Recent advances in polymerase chain reaction. *Science*, 252:1643-1650.
- [11] Mcpherson M, Moller S, 2006. PCR Second edition. p. 66,90,91
- [12] Karataş M, 2012. Moleküler Biyoloji Nobel Akademik Yayıncılık. p. 289.
- [13] World Health Organization: Treatment of Tuberculosis. Guidelines for National Programmes. Geneva, 1997.
- [14] Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H, 1999. Türkiye’de tüberkülozun kontrolü için kılavuz. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı Ankara.
- [15] Grange JM, 1984. The rapid diagnosis of paucibacillary tuberculosis. *Tubercle and Lung Disease*, 70: 1.
- [16] Prasad R, Lath SK, Mukerji PK, Agrawal SK, Srivastava R, 2001. Clinical utility of polymerase chain reaction in patients of pulmonary tuberculosis. *Indian Journal of Tuberculosis*. 48: 135.
- [17] Shukla I, Varshney S, Sarfraz, Malik A, Ahmad Z, 2011. Evaluation of nested PCR targeting IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* for the diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. *Biology and Medicine*, 3 (2) Special Issue: 171-175.
- [18] Tzoanopoulos D, Stakos D, Hatseras D, Ritis K, Kartalis G, 2001. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in pericardial fluid, bone marrow and peripheral blood in a patient with pericardial tuberculosis. A case report *Neth J Med*. 59:177-80.
- [19] Ogawa M, Setiyono A, Sato K, Cai Y, Shiga S, and Kishimoto T, 2004. Evaluation of PCR and nested PCR assays currently used for detection of *Coxiella burnetii* in Japan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 35:852-855.
- [20] Morshed MG, Konishi H, Terada Y, Aritutsu Y, Nakazawa T, 1994. Seroprevalence of leptospirosis in rural flood prone district of Bangladesh. *Epidemiol. Infect.*, 112:527-531.
- [21] Nassi F, Seixas KF, Jouglard DDS, Simionatto S, Silva FE, Seyffert N, Brod SC, Dellagostin AO, 2003. Leptospirosis diagnosis using nested-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34 (Suppl.1):90-92.
- [22] Ardehali S, Rezai H, Nadim A, *Leishmania* and leishmaniases, 2nd ed. Markaze Nashr Daneshgah Tehran; 1994. p. 2-10.
- [23] Available at:
http://www.WHO.int.tdr.diseases.Leishmani_a/default.html/. 09.12.2012
- [24] Mahboodi F, Abolhassani M, Tehrani SR, Azimi M, Asmar H, 2002. Differentiation of old and new world *Leishmania* species at complex and species levels by PCR. *Scand J Infect Dis*. 34:756-758.
- [25] Noyes HA, Reyburn H, Bailey WJ, Smith D. A, 1998. Nested-PCR based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application on the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pak J Clinic Microb. 36:2877-4881.
- [26] Maraghi S, Samarbaf Zadeh A, Sarlak AA, Ghasemian M, Vazirianzadeh B, 2007. Identification of Cutaneous Leishmaniasis Agents by Nested Polymerase Chain Reaction (Nested-PCR) in Shush City, Khuzestan Province, Iran Iranian J Parasitol: Vol.2, No.3, p.13-15.
- [27] Hugnes T, Rogers T, Haynes K, 1998. PCR diagnostics in medical mycology, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, p.357
- [28] Arda M, 1994, Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler), Kükem Derneği Bilimsel Yayınlar No:2, Armoni Ltd.Şti, Ankara,
- [29] Buffery C, 1993, The Polymerase Chain Reaction, The Royal Society of Chemistry, 51-61, Cambridge CB4 OWF,UK, 428.
- [30] Rappelli P, Are R, Casu G, Fiori PL, Cappuccinelli P, Aceti A, Nov.-1998, Development of a Nested PCR for Detection of *Cryptococcus neoformans* in Cerebrospinal Fluid, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.36, No.11, p.3438-3440.
- [31] Jaeger EE, Carroll NM, Choudhury S, Dunlop, AA, Towler HMA, Matheson MM, Adamson P, Okhravi N, 2000, Rapid Detection and Identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* Species in Ocular Samples Using Nested PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.38, No.8, p.2902-2908.
- [32] Kawamura S, Maesaki S, Noda T, Hirakata Y, Tomono K., Tashiro T, Kohno S, 1999, Comparison between PCR and Detection of Antigen in Sera for Diagnosis of Pulmonary Aspergillosis, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.37, No.1, p 218-220.
- [33] Tsai HL, Huang LC, Ann JP, Liou FR, 2006. Detection of orchid Phytophthora disease by nested PCR. *Botanical Studies* 47: 379-387.
- [34] Kimberling DW, 2001. Advances in the treatment of neonatal herpes simplex infections. *Rev. Med. Virol.* 11:157-163.
- [35] Kimberling DW, Lin CY, Jacops RF, Powell DA, Corey L, Gruber WC, Rathore M, Bradley JS, Diaz PS, Kumar M, Arvin AM, Gutierrez K, Shelton M, Weiner LB, Sleasman JW, de Sierra TM, Weller S, Soong SJ, Kiell J, Lakeman FD, Whitley RJ, 2001. Safety and efficacy of high-dose intravenous acyclovir in the management of neonatal herpes simplex virus infections. *Pediatrics* 180: 230-238.
- [36] Kawada JJ, Kimura H, Ito Y, Hoshino Y, Kitajima-Tanaka N, Ando Y, Futamura M, Morishima T. 2004. Comparison of real-time and nested PCR assays for detection of herpes simplex virus DNA. *Microbiol. Immunol.* 48(5), 411-415.
- [37] Chauhan HC, Kher HN, Chandel BS, Dadawala AI, Jain L, Agrawal SM and Bhadaniya A, 2009. Evaluation of Group specific Nested PCR for detection of Bluetongue virus *Veterinary World*, 2(5): 179-182.
- [38] Shen W, Xi P, Li M, Sun L, Zhang L and Jiang Z, 2012. Development of a sensitive nested-polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of *Ustilago scitaminea*. *African Journal of Biotechnology*. 11(46):10541-10547.
- [39] Günel T, Aydın K, 2009. Real time PCR ve Uygulama Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2(2): 43-45.

[40] Huang CC, Shih WT, Pan MT, 2004. Development and Application of a Nested Polymerase Chain Reaction Method for the Detection of Genetically Modified Soybean in Chinese Traditional Fermented Soy Food-sufu. *Journal of Food and Drug Analysis*. 12(3):266-272.

[41] Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B, 2007. *Moleküler Biyoloji Nobel Yayın No: 1170*. p. 213.

[42] Shi X, Kleeff J, Zhu WZ, Schmied B, Tang HW, Zimmermann A, Büchler WM, Friess H, 2003. Gene-expression analysis of single cells-nested polymerase chain reaction after laser microdissection. *World J Gastroenterol*. 9(6):1337-1341.