

استخدام تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR لكشف الأليل المتوسع لجين هشاشة الصبغي X (FMR1)

هبة المعدني⁽¹⁾ و عصام قاسم⁽¹⁾ و محمد علي عجلوني⁽²⁾

⁽¹⁾ قسم علم الحياة الحيوانية - كلية العلوم - جامعة دمشق - سورية

⁽²⁾ قسم الأطفال - كلية الطب البشري - جامعة دمشق - سورية

تاريخ الإيداع 2011/05/11

قبل للنشر في 2011/08/22

الملخص

تعد متلازمة هشاشة الصبغي X (Fragile X) من أكثر مسببات التخلف العقلي الموروث شيوعاً التي تنتج عن توسع الأليل CGG في المنطقة غير المرمزة (5'UTR) من الجين FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1)، المتموضعة على الذراع الطويلة للصبغي X في الموقع Xq27.3. وفي الغالب لا يتجاوز عدد التكرارات الثلاثية CGG عند الأشخاص الأسوياء 45 تكراراً. في حين يمكن أن يصل عدد التكرارات الثلاثية CGG عند الأشخاص المصابين بهذه المتلازمة إلى أكثر من 200 تكراراً. وقد هدفنا من هذه الدراسة إلى تطبيق تقنية سريعة، وغير مكلفة، وذات نوعية وحساسية عالية لتشخيص متلازمة هشاشة الصبغي X، في خطوة للكشف عن توسع الأليل CGG في جين FMR1 لدى المرضى، فضلاً عن إمكانية توفير التشخيص ما قبل الولادة، ولأسبماً لدى العائلات التي تملك سوابق عائلية لهذه المتلازمة. ويمهد استخدام هذه التقنية التي تطبق أول مرة في سورية إلى إجراء دراسات وراثية جزيئية أعمق في المستقبل. استخدمنا بادئات نوعية لتضخيم منطقة التكرارات الثلاثية CGG في الجين FMR1 بتقنية PCR، وذلك عند عشرة مرضى من الذكور والإناث الذين شخصوا سريريًا على أنهم مصابون بهشاشة الصبغي X.

بينت نتائجنا وجود مريضين يمتلكان نمطاً موزائيكياً بالنسبة إلى عدد التكرارات الثلاثية CGG حيث وجدنا عند المريض الأول نوعين من التكرارات الثلاثية CGG، النوع الأول كان للنمط السوي إذ بلغ عدد التكرارات فيه 42 تكراراً، أما النوع الثاني من التكرارات فكان للنمط ما قبل الطفرة إذ بلغ عدد التكرارات فيه 170 تكراراً، أما المريض الثاني فقد تبين أنه يحمل نوعين من التكرارات الثلاثية CGG أيضاً النوع الأول لطفرة تامة بالنسبة إلى عدد التكرارات الثلاثية CGG إذ بلغت عدد التكرارات CGG فيه 442 تكراراً، وكان النوع الثاني من التكرارات للنمط ما قبل الطفرة إذ بلغت عدد التكرارات CGG فيه 177 تكراراً. أما باقي الحالات التي درسناها فقد كان عدد التكرارات فيها ضمن الحدود السوية وقد راوحت بين 37 و29 تكراراً. وقفنا من خلال نتائج هذه الدراسة على أهمية تطبيق تقنية PCR في كشف متلازمة هشاشة الصبغي X وتشخيصها، وعلى حساسية هذه التقنية ودقتها بالأخص في الحالات الموزائيكية، وهذا ما لا يمكن الكشف عنه باستخدام تقنيات أخرى كالدراسة الوراثية الخلوية (karyotype). فضلاً عن كونها تقنية سريعة وغير مكلفة و تقلص الحاجة إلى استخدام تبصيم ساوثرن؛ مما يجعلها الخيار الأول عند إجراء مسوحات مخبرية واسعة.

الكلمات المفتاحية: التفاعل السلسلي للبوليميراز (PCR)، أليل، جين FMR1، هشاشة الصبغي X.

Using Polymerase Chain Reaction to Detect Expansion Allele Of Fragile X Gene FMR1

H. Al-Maadani⁽¹⁾; E. Kassem⁽¹⁾
and M. A. Ajloni⁽²⁾

⁽¹⁾ Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

⁽²⁾ Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Damascus University, Syria

Received 11/05/2011

Accepted 22/08/2011

ABSTRACT

Fragile X syndrome is the most common cause of inherited mental retardation, and that results from the expansion of CGG repeats in the 5' untranslated region of FMR1 gene, located on the long arm of X chromosome at Xq27.3. while, the number of CGG triple repeats for normal people do not exceed (45 repeats), but the number of CGG repeats can reach more than 200 repeats in fragile X affected people.

Our aim of this study is to apply a quick and inexpensive technique to diagnose fragile X syndrome, in order to detect the CGG allele expansion of FMR1 gene in patients. In addition of providing diagnosis, especially among families who have a family history of this syndrome, by using this technique which is applied for the first time in Syria and it is established for deeper molecular genetics studies in the future.

We used specific primers to amplify the CGG triple repeat region of FMR1 gene by using the PCR technique on ten patients (males and females), who are clinically diagnosed as affected fragile X patients.

Our results showed two patients having Mosaicism of CGG repeats, the first patient had two types of CGG repeats, the first type was normal repeat, it was about (42 repeats) and the second type was premutation and it was about (170 repeats). The second patient showed two types of triple CGG repeats, the first type was full mutation and the number of CGG repeats was (442 repeats), the second type was premutation (177 repeats). In the rest of cases which we studied, the number of repeats were within the normal level, ranging between 29 – 37 repeats.

Though these results we concluded, the PCR technique is important in detection and diagnosis the fragile X syndrome, also it is sensitive and accurate technique especially for the detection of the mosaic cases, which can not be detected by using other techniques as cytogenetic (karyotype), in addition it is a quick, inexpensive technique, so it reduces the use of Southern blot, making it the first choice for wide screening population.

Key words: Polymerase Chain Reaction PCR, Allele, FMR1 gene, Fragile X.

المقدمة

تعدُّ متلازمة هشاشة الصبغي X (Fragile X Syndrome) من أكثر مسببات التخلف العقلي الموروث شيوعاً. إذ تقدر نسب الإصابات لدى الإناث تبعاً للإحصائيات العالمية بـ 1/8000 إصابة في حين ترتفع هذه النسبة لتصل إلى 1/4000 إصابة لدى الذكور (Crawford *et al.*, 2001). ويعدُّ العامل الرئيسي المسؤول عن ظهور هذه المتلازمة هو زيادة عدد التكرارات الثلاثية CGG المتموضعة في المنطقة 5' غير المرمزة (5' Untranslated Region) من الجين FMR1 (Fragile X Mental Retardation) على الذراع الطويلة للصبغي X في الموقع (Kremer *et al.*, 1991) Xq27.3 (الشكل 1). ويشكل عام فإن عدد التكرارات الثلاثية CGG لدى الأشخاص الأسوياء لا يتجاوز 45 تكراراً، إلا أنه يمكن مشاهدة بعض الحالات السوية التي لا تتوافق مع أعراض سريرية لمتلازمة هشاشة الصبغي X يصل عدد التكرارات فيها إلى 54 تكراراً، بالمقابل فإن الأشخاص المصابين بطفرة تامة (Full mutation) يكون عدد التكرارات عندهم أكبر من 200 تكراراً، وتظهر لدى هؤلاء أعراض هشاشة الصبغي X النموذجية (Sherman, 2002; Maddalena *et al.*, 2001). وتوجد حالات لأشخاص حاملين لما يسمى بأليل ما قبل الطفرة Premutation Allele إذ يبلغ عدد التكرارات لديهم بين (55 - 200 تكراراً) ويؤدي هؤلاء الأشخاص بعض أعراض هشاشة الصبغي X مترافقة مع متلازمة الاضطراب الرعاشي Tremor Syndrome (Hagerman *et al.*, 2001).

تعود بدايات تشخيص متلازمة هشاشة الصبغي X إلى عام 1943 حيث شخص العالمان Bell و Martin لدى عائلة كبيرة 11 حالة تخلف عقلي لدى الذكور والإناث، تجلت المظاهر السريرية لدى المصابين: بأذنين بارزتين، وجه ضيق متطاول وكئييب، وكبر الخصيتين، و مفاصل أصابع مفرطة المرونة (Martin and Bell, 1943).

وتوالى بعد ذلك الدراسات حيث ظهرت أولى بوادر الاختبار التشخيصي لمتلازمة هشاشة الصبغي X من خلال الدراسة الوراثية الخلوية للموقع الهش من الصبغي X، وقد تمكن العالم Sutherland عام 1977 من إظهار الموقع الهش من الصبغي X لدى عينة من المرضى الذين يبدوون تأخراً عقلياً مرتبطاً بالصبغي X، وذلك من خلال استخدامه لوسط زرع خاص (Sutherland *et al.*, 1977).

وقد أسهم التطور التقني في طرائق التشخيص الحديثة، خصوصاً بعد معرفة التسلسل النكليوتيدي للجين FMR1 في إعطاء نتائج أكثر دقة لدى تشخيص متلازمة هشاشة الصبغي X، وخاصة في حالات وجود الأليلات ما قبل الطفرة (Regina *et al.*, 1997).

ومن أكثر التقنيات المستخدمة شيوعاً في تشخيص هذه المتلازمة تبصيم ساو ثرن Southern bolt (Rousseau *et al.*, 1991) إلا أنه يحتاج إلى كميات كبيرة من DNA وبضعة أيام لمعرفة النتيجة، مما يجعله غير ملائم لإجراء مسوحات مخبرية واسعة

مواد البحث وطرائقه

عينة الدراسة:

تألفت عينة الدراسة من (40) طفلاً يعانون من درجات متفاوتة من التخلف العقلي، فضلاً عن بعض أعراض الاضطرابات العصبية ذات العلاقة بمتلازمة هشاشة الصبغي X مثل التوحد Autism.

أجرينا أولاً دراسة وراثية خلوية لهؤلاء المرضى جميعهم لنفي أي شذوذ صبغي محتمل. حيث درسنا (20) انقساماً خلوياً في الطور الاستوائي metaphase من الانقسام المتساوي لكل مريض من المرضى فضلاً عن العينة الشاهدة.

انتقينا عشرة مرضى للدراسة الوراثية الجزيئية تجلت عندهم بعض مظاهر هشاشة الصبغي X أبرزها درجات متفاوتة من التخلف العقلي، ووجه متناول، ومفاصل أصابع مفرطة المرونة، وذلك من أجل تطبيق تقانة PCR.

سحبنا لكل مريض قرابة 5ml من الدم المحيطي فضلاً عن العينة الشاهدة، استخدمنا كيتاً خاصة لعزل DNA من شركة (Macherey-Nagel)، ثم جرت معايرة DNA ودراسة نقاوته باستخدام مقياس الطيف الضوئي.

أجرينا تفاعل PCR باستخدام بادئات نوعية لتضخيم منطقة التكرارات الثلاثية CGG حسب (Tassone et al., 2008; Chen et al., 2010) تضمن التفاعل المواد الآتية: دائرة تضخيم PCR buffer بتركيز 1X من شركة (Roche)، 200ng من DNA الجينومي، 0.2µM من البادئات، فضلاً عن استخدام أنزيم (Go Taq® DNA Polymerase) من شركة (Promega)، كذلك استخدمنا مادة البيتاين (2.2M) Betaine لتحسين تضخيم المناطق الغنية بالسيتوزين غوانين (CG-rich). أجرينا التفاعل وفق البرنامج الآتي: 10 دقائق بالدرجة 98 °C للفصل الأولي initial denaturation يليها (34) دورة، تتضمن دقيقة واحدة بالدرجة 95 °C ثم دقيقة واحدة بالدرجة 68 °C ودقيقة بالدرجة 78 °C، وانتهى التفاعل بمرحلة استطالة نهائية final extension بالدرجة 78 °C مدة 10 دقائق.

استخدمنا تقانة الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز لتحليل منتجات PCR للمرضى العشرة وللعينة الشاهدة، فضلاً عن ترحيل سلم جزيئي معياري (واسم معياري) Molecular weight marker (100 – 4000) على هلامة الأغاروز تركيز 2%، ثم صورنا الهلامة بالأشعة فوق البنفسجية UV.

تحليل البيانات (Data Analysis):

بعد ترحيل منتجات الـ PCR على هلامة الأغاروز، حددنا طول شدة منتج تفاعل PCR اعتماداً على واسم معياري، وباستخدام ورق ميليمتري، ثم حسبنا عدد التكرارات الثلاثية CGG وفق المعادلة الآتية:

طول المنتج = (عدد التكرارات ثلاثية النكليوتيد CGG × 3) + 161

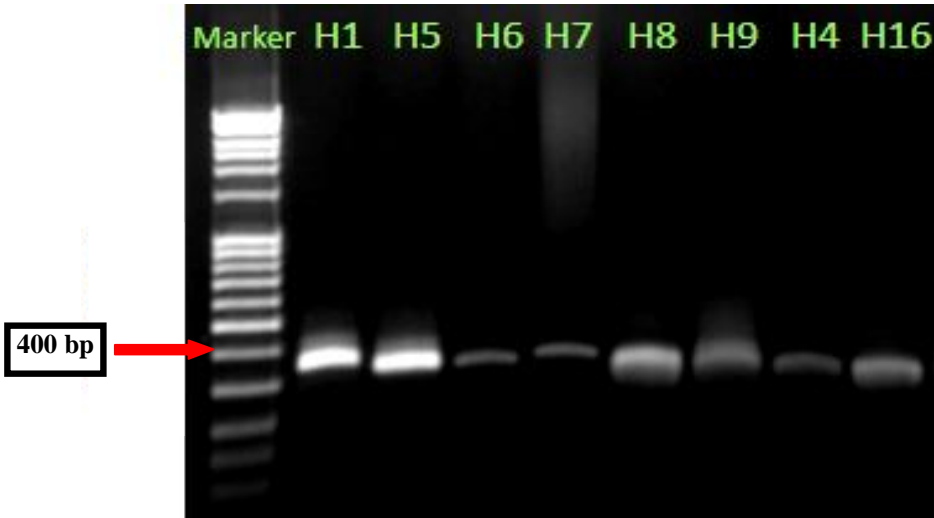
إذ 161 يشير إلى عدد النكليوتيدات خارج منطقة التكرارات الثلاثية، (Chen et al., 2010).

النتائج

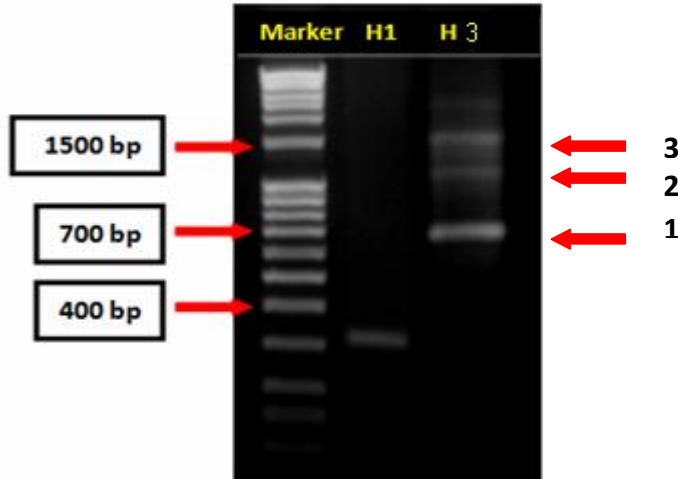
أظهرت نتائجنا أن عدد التكرارات الثلاثية CGG السوية قدراوح بين (28 - 42 تكراراً) لدى ثماني حالات من أصل عشر أي بنسبة 80%، وقد كان التكرار (29) هو التكرار الأكثر تواتراً، (الجدول 1 والشكل 2). كما أظهرت نتائجنا وجود حالتين موزائيك بالنسبة إلى عدد التكرارات الثلاثية CGG. الحالة الأولى كانت للمريض H3 حيث وجدنا نمطين من التكرارات الثلاثية CGG، النمط الأول ما قبل الطفرة، والنمط الثاني لطفرة تامة (177, 442 تكراراً) (الشكل 3)، أما الحالة الثانية H10 فقد أظهرت النمط الطبيعي لعدد التكرارات الثلاثية CGG فضلاً عن نمط ما قبل الطفرة (42, 170 تكراراً) (الشكل 4).

الجدول (1) نتائج تقانة PCR للمرضى الذين ظهرت عليهم أعراض هشاشة العظام X. حيث يظهر الجدول جنس كل مريض فضلاً عن المظاهر السريرية، كما سجلت أطوال شدة منتجات PCR مقدره بالزوج الأساسي أي bp، وعدد التكرارات الثلاثية CGG وقد لاحظنا حالتين تغير في عدد التكرارات الثلاثية CGG لدى المريضين H3 و H10. يملك المريض H3 عدد تكرارات CGG من نمط ما قبل الطفرة (177 تكراراً)، ونمط الطفرة التامة (341,442 تكراراً)، كما يملك المريض H10 نمطين من التكرارات الثلاثية CGG، الأول طبيعي (42 تكراراً)، والثاني ما قبل الطفرة (170 تكراراً).

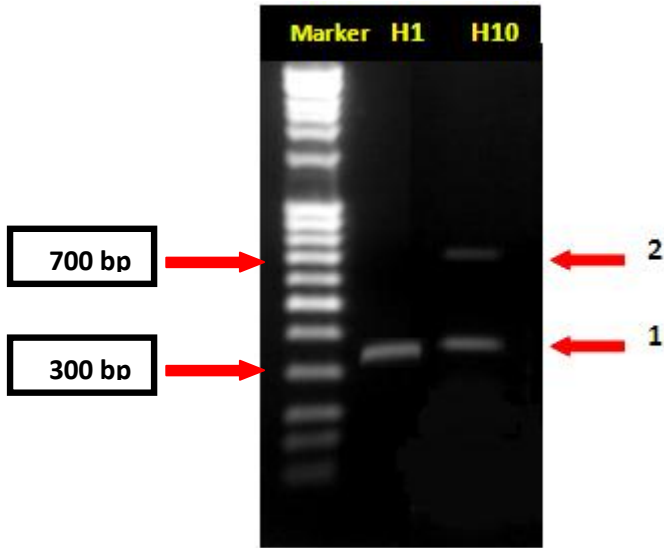
	Sample Info	Gender الجنس	Clinical Indication المظاهر السريرية	The size of DNA fragment bp طول شدة الـ DNA	CGG repeat number عدد التكرارات
1	H1	ذكر	شاهد	343	40
2	H3	ذكر	هشاشة العظام X	755,1185,1550	177,341, 442
3	H4	أنثى	هشاشة العظام X	311	29,29
4	H5	ذكر	هشاشة العظام X	311	29
5	H6	ذكر	هشاشة العظام X	308	28
6	H7	ذكر	هشاشة العظام X	335	37
7	H8	ذكر	هشاشة العظام X	311	29
8	H9	ذكر	هشاشة العظام X	314	30
9	H10	ذكر	هشاشة العظام X	350,734	42,170
10	H11	ذكر	هشاشة العظام X	311	29
11	H16	أنثى	هشاشة العظام X	308	28,28



الشكل (2) ترحيل منتجات PCR للحالات الطبيعية H5,H6,H6,H7,H8,H9,H4,H16 والعينة الشاهدة H1 فضلاً عن السلم الجزيئي المعياري على هلامة الآغاروز 2%، حيث تبدو عصابات بطول بين (308- 335) bp H5,H6,H7,H8,H9,H11. تبدي كل من H4,H16 (إناث) عصابة واحدة بسبب تقارب طول شدف منتج PCR لكلا أليلي الجين FMR1.



الشكل (3) ترحيل منتج PCR للمريض H3 وللشاهد H1 والسلم الجزيئي المعياري. تبدو عصابة بطول تقريباً 343 bp لدى الشاهد، بالمقابل يُظهر المريض H3 ثلاث عصابات، العصابة رقم (1) تقريباً بطول 755 bp، والعصابة (2) بطول 1185 bp، والعصابة (3) بطول 1550 bp.



الشكل (4) ترحيل منتج PCR للمريض H10 فضلاً عن الشاهد والسلم الجزيئي المعياري. تبدو عصابة تقريباً بطول 343 bp بالنسبة إلى الشاهد، بالمقابل يُظهر المريض H10 عصابتين. العصابة رقم (1) تقريباً بطول 350 bp، والعصابة (2) بطول 734 bp.

مناقشة النتائج

إنَّ تشخيص أنماط طفرة الجين FMR1 المؤدية إلى متلازمة هشاشة الصبغي X الناتجة عن زيادة عدد التكرارات الثلاثية CGG في المنطقة 5'UTR من الاكسون الأول، يتطلب إجراء اختبارات تعتمد على DNA الجينومي منها تصيم ساوثرن وسلسلة DNA (DNA sequencing)، فضلاً عن تقنية PCR، وذلك نظراً إلى عجز الاختبارات الوراثية الخلوية عن كشف أنماط طفرة الجين FMR1، إذ إنها تكشف بين 50-5% من الخلايا الطافرة لدى الذكور، في حين تكشف ما نسبته 0-30% لدى الإناث (Warren and Nelson, 1994). وهذا يوافق ما توصلنا إليه لأنَّ الدراسة الوراثية الخلوية للمرضى لم تكن قادرة على كشف الموقع الهش للصبغي X لدى الحالتين H10 و H3.

فيما بيّنت نتائجنا باستخدام تقنية PCR وجود حالتين موزائكية (وجود خطوط خلوية مختلفة)، الحالة الأولى H3 تبدي نمطين من عدد التكرارات الثلاثية CGG، الأول من نمط ما قبل الطفرة (177 تكراراً) والثاني نمط الطفرة تامة (442,341 تكراراً)، أمّا الحالة الثانية H10 فقد أبدت النمط السوي لعدد التكرارات (42 تكراراً)، ونمط ما قبل الطفرة (170 تكراراً). وإذا ما قارنا هذه النتيجة بدراسة كل من Petek وزملائه الذين وجدوا أن

نسبة انتشار الطفرة الموزائكية (أليل ما قبل الطفرة وأليل الطفرة التامة) لدى الذكور المصابين بهشاشة الصبغي X (15% – 20) (Petek et al., 1999).

كما وجد (Reddy et al., 2005) في دراسة أجراها على 316 مريض تخلف عقلي، أن (7) منهم يعانون من متلازمة هشاشة الصبغي X، ثلاثة لديهم طفرة موزائكية (أليل ما قبل الطفرة وأليل طفرة تامة). أي أن لدى 43% من مرضى متلازمة هشاشة X طفرة موزائكية.

أما الدراسة التي أجراها Filipovic حديثاً على 147 من مرضى متلازمة هشاشة الصبغي X فقد وجد طفرة موزائكية لدى عدد منهم. ومن ثم نجد أن تقنية PCR المستخدمة قادرة على كشف الطفرة التامة (FM) حتى ولو كانت نسبة الخلايا أقل من 5% (Filipovic et al., 2010). وهذا ناتج عن التطور التقني والتعديلات التي أدخلت على هذه التقنية. كما أن عدم الاستقرار في عدد التكرارات الثلاثية CGG في حال الطفرة التامة يسمح بظهور عدد مختلف من التكرارات الثلاثية ضمن مجال الطفرة التامة (أكبر من 200 تكراراً)، وذلك في أثناء الانقسامات المتتالية للخلايا السلفية في نقي العظم، ويعتمد كشف هذه الحالات على حساسية تفاعل PCR.

كما أن غياب اختبار غير مكلف و سريع، ولا يحتاج كمية كبيرة من DNA الجينومي يمثل إحدى العوائق الرئيسية لتشخيص الحالات المرضية لتوسع أليل الجين FMR1، وخاصة عند المواليد الجدد. لذا سعينا في تجربتنا إلى تطبيق تقنية PCR وتعديلها لتضخيم مناطق DNA الغنية بالستوزين غوانين (GC – rich DNA)، وهذه القدرة جاءت من خلال التركيز على ثلاثة أسس أساسية: (a) بوادئ قراءة (primers) نوعية للجين، (b) محلول الدائرة buffer لتضخيم العينات الغنية GC، (c) شروط دورات تفاعل PCR.

ومن ثم استطعنا تطبيق تقنية PCR وتعديلها ذات حساسية عالية وقادرة على كشف حالات أنماط طفرة الجين FMR1 ولاسيما حالة الطفرة التامة عندما تكون نسبة الخلايا أقل من 5% (حالة الموزائكية) (Filipovic et al., 2010). وهذا ما لا يمكن كشفه بالدراسة الوراثية الخلوية فضلاً عن كونه يطبق في الجمهورية العربية السورية أول مرة، مما يوفر على المرضى عناء السفر وتكاليفه إلى الدول العربية المجاورة لإجراء هذه التحاليل. كما أنها تقنية سريعة وغير مكلفة فهي تقلص الحاجة إلى تبصيم ساو ثرن، مما يسمح بتشخيص هذه المتلازمة لدى الأجنة قبل الولادة ولاسيما مع العائلات التي تملك قصة عائلية مع المرض. وهذا ما يجعلها الخيار الأول لدى إجراء مسوحات مخبرية واسعة.

ويعدُّ هذا العمل الذي قمنا به خطوة أولية ومهمة لمزيد من البحوث من أجل الكشف المبكر عن هشاشة الصبغي X لدى الأطفال والمواليد الجدد.

REFERENCES المراجع

- Chen, L., Hadd, A., Sah, S., Filipovic-Sadic, S., Krosting, J., Sekinger, E., Pan, R., Hagerman, P.J., Stenzel, T.T., Tassone, F., Latham, G.J. (2010). An Information-rich CGG Repeat Primed PCR that Detects the Full Range of Fragile X Expanded Alleles and Minimizes the Need for Southern Blot Analysis. *J Mol Diagn*,12(5):589-600.
- Crawford, DC., Acuna, JM., Sherman, SL. (2001). FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med*, 3:359-371.
- Filipovic-Sadic, S., Sah, S., Chen, L., Krosting, J., Sekinger, E., Zhang, W., Hagerman, P.J., Stenzel, T., Hadd, A., Latham, G.J., Tassone, F. (2010). A Novel FMR1 PCR Method for the Routine Detection of Low-Abundance Expanded Alleles and Full Mutations of Fragile X Syndrome. *Clin Chem*,56(3):399-408.
- Hagerman, R.J., Leehey, M., Heinrichs, W., Tassone, F., Wilson, R., Hills, J. (2001). Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* , 57: 127–30.
- Kremer, E. J., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CGG)n. *Science*, 252:1711–1714.
- Maddalena, A., Richards, CS., McGinniss, MJ., Brothman, A., Desnick, R.J., Grier, RE. (2001). Technical standards and guidelines for fragile X: the first of a series of disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. Quality Assurance Subcommittee of the Laboratory Practice Committee. *Genet Med*, 3:200–5.
- Martin, J.P., Bell, J. (1943). A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J Neurol Psychiatr*, 6:154-157.
- Petek, E., Kroisel, PM., Schuster, M., Zierler, H., Wagner, K. (1999). Mosaicism in a fragile X male including a de novo deletion in the FMR1 gene. *Am J Med Genet*, 84:229-32.
- Reddy, KS. (2005). Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC Med Genet*, 6:3.
- Regina, C., Mingroni-Netto, Rita C.M., Pavanello, Paulo, A., Otto and Angela, M. (1997). Experience with molecular and cytogenetic diagnosis of fragile X syndrome in Brazilian families . *Braz. J. Genet*,20:
- Rousseau, F., Heitz, D., Biancalana, V., Blumenfeld, S., Kretz, C., Boue, J., Tommerup, N., Van Der Hagen, C., DeLozier-Blanchet, C., Croquette, MF., Gilgenkrantz, S., Jalbert, P., Voelckel, MA., Oberle, I., Mandel, JL. (1991). Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 325:1673–1681.
- Saluto, A., Brussino, A., Tassone, F., Arduino, C., Cagnoli, C., Pappi, P., Hagerman, P., Migone, N., Brusco, A. (2005). An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene. *J Mol Diagn*,7:605-12.

- Sherman, S. (2002). "Epidemiology". Chapter 3 in *Fragile X Syndrome, Diagnosis Treatment and Research*. Ed. Hagerman, R. J. & Hagerman, P.J. (3rd Edition). Johns Hopkins University Press: Baltimore.
- Sutherland, GR. (1977). *Fragile Sites on Human Chromosomes: Demonstration of Their Dependence on the Type of Tissue Culture Medium*. *Science*, 197: 265-266.
- Tassone, F., Pan, R., Amiri, K., Taylor, AK., Hagerman, PJ. (2008). A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (FMR1) gene in newborn and high-risk populations. *J Mol Diagn*,10:43-9.
- Warren, ST., Nelson, DL. (1994). Advances in molecular analysis of fragile X syndrome . *JAMA* 271:536-542.