ABSTRACT

Background. Fragile X syndrome (FXS) is the most common genetic cause of hereditary intellectual disability. For diagnosing FXS, southern blot is considered as the gold standard technique. However, it is labor-intensive, costly, and challenging to do routinely in clinical laboratories. TP-PCR may be a reliable alternate technique for FXS diagnosis. Based on the reference protocol performed by Rajan-Babu, et al (2022), dTP-PCR can detect the expanded alleles of *FMR1* gene using two separate methods: one-step assay and two-step assay.

Objective: to identify *FMR1* gene allele using triplet primed PCR technique for genetic testing of FXS in the only FXS center in Indonesia.

Methods: This is a descriptive study using a diagnostic approach. For the optimization, there were 10 DNA samples with identified alleles of *FMR1* gene previously, a control DNA (53 CGG repeats), and non-template control (NTC). dTP-PCR amplification and melting curve analysis on High Resolution Melting Platform were performed for samples to identify the expanded allele in *FMR1* gene.

Results: The optimization of master mix preparation and adjustment were performed to the amplification profile, including denaturation, annealing, extension, final extension, and ramp temperature settings, to acquire the optimal profile for the amplification and melting curve analysis (MCA). MCA's findings indicate that the samples classified as expanded alleles (PM and FM) were found in the right side of the control DNA. The full mutation (FM) samples were found to have a greater melt temperature compared to the premutation (PM) samples. The left side of the control DNA represented the normal sample as non-expanded alleles.

Conclusion: Triplet primed PCR technique followed by the melting curve analysis can detect both expanded and non-expanded alleles of *FMR1* gene. Optimizing the TP-PCR amplification and MCA condition allowed an efficient and applicable method in FXS genetic testing.

Keyword: fragile X syndrome, TP-PCR, melting curve analysis, expanded allele, genetic testing.

ABSTRAK

Latar Belakang: Sindrom Fragile X (FXS) merupakan penyebab genetik paling umum dari disabilitas intelektual yang diturunkan. Dalam menegakkan diagnosis FXS, teknik *southern blot* masih dianggap sebagai standar emas. Namun demikian, metode ini memerlukan tenaga yang besar, biaya yang tinggi, serta sulit untuk diterapkan secara rutin di laboratorium klinis. Sebagai alternatif, triplet primed PCR (TP-PCR) dapat menjadi metode yang andal untuk diagnosis FXS. Berdasarkan protokol rujukan yang dikembangkan oleh Rajan-Babu dkk. (2022), dTP-PCR mampu mendeteksi alel yang mengalami ekspansi pada gen *FMR1* melalui dua pendekatan, yaitu metode satu tahap (*one-step assay*) dan dua tahap (*two-step assay*).
Tujuan: Untuk mengidentifikasi alel gen *FMR1* menggunakan TP-PCR sebagai metode pemeriksaan genetik FXS di satu-satunya pusat layanan FXS di Indonesia.
Metode: Penelitian ini merupakan studi deskriptif dengan pendekatan diagnostik. Sebanyak 10 sampel DNA yang sebelumnya telah diketahui alel gen *FMR1*-nya, DNA kontrol (53 CGG repeat) dan *non-template control* (NTC) digunakan dalam penelitian ini. Amplifikasi dTP-PCR serta *Melting Curve Analysis* (MCA) menggunakan *High Resolution Melting Platform* dilakukan untuk mengidentifikasi alel yang mengalami ekspansi pada gen *FMR1*.
Hasil: Optimasi dilakukan pada proses preparasi *mastermix* serta penyesuaian profil amplifikasi, yang meliputi tahap denaturasi, annealing, ekstensi, *final extension*, serta pengaturan suhu *ramp*, untuk memperoleh kondisi optimal dalam proses amplifikasi dan *melting curve analysis*. Hasil MCA menunjukkan bahwa sampel yang diklasifikasikan sebagai alel dengan ekspansi (FM dan PM) berada di sisi kanan kontrol DNA. Sampel yang diketahui dengan mutasi penuh (FM) memiliki suhu leleh yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel dengan premutasi (PM). Sementara itu, sisi kiri kontrol DNA merepresentasikan sampel normal yang tidak mengalami ekspansi alel.
Kesimpulan: Teknik *triplet-primed PCR* dilanjutkan dengan analisis kurva leleh mampu mendeteksi baik alel yang mengalami ekspansi maupun yang tidak mengalami ekspansi pada gen *FMR1*. Optimalisasi kondisi amplifikasi TP-PCR dan MCA memungkinkan metode ini menjadi lebih efisien dan aplikatif dalam pemeriksaan genetik FXS.
Kata Kunci: Sindrom Fragile X, TP-PCR, *melting curve analysis*, alel terekspansi, pemeriksaan genetik.