

# 单分子实时测序技术在1例21-羟化酶缺陷症患儿 基因检测中的临床应用

赵炜,王芳,李加山,梁思颖,苗艳,姜楠,李朔

(青岛大学附属青岛妇女儿童医院基因检测中心, 山东 青岛 266034)

**摘要:**目的 应用单分子实时测序(single molecular real-time sequencing, SMRT)技术明确1例21-羟化酶缺陷症患儿的分子病因,并探讨SMRT用于临床基因检测的可行性。方法 应用SMRT技术对先证者先天性肾上腺皮质增生症候选基因进行长读长测序,检测结果与多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)和Sanger测序检测的家系结果进行比较。结果 SMRT结果提示,先证者CYP21A2基因存在3个致病变异,先证者的一条染色体上串联排列两个重复的基因拷贝,分别为包含c.955C>T变异的CYP21A2基因和包含c.1069C>T变异的CYP21A2/CYP21A1P嵌合基因;另一染色体上的CYP21A2基因缺失。检测结果与家系MLPA+Sanger测序的结果相同,并明确了CYP21A2/CYP21A1P嵌合基因的排列方式。结论 SMRT技术能够明确基因拷贝数变异、结构变异及嵌合基因的排列方式,可为21-羟化酶缺陷症遗传学诊断和携带者筛查提供更有价值的信息,具有较大的临床应用前景。

**关键词:**单分子实时测序;长读长测序;CYP21A2基因;嵌合基因;基因重复

中图分类号:R586.2;R440

文献标志码:A

## Clinical application of single molecule real-time sequencing technology in gene detection for a child with 21-hydroxylase deficiency

ZHAO Wei, WANG Fang, LI Jiashan, LIANG Siying, MIAO Yan, JIANG Nan, LI Shuo

(Genetic Testing Center, Qingdao Women and Children's Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266034, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To determine the molecular etiology in a child with 21-hydroxylase deficiency using single molecule real-time sequencing (SMRT), and explore its clinical application for gene detection. **Methods** SMRT technology was applied to perform long-read sequencing on the candidate gene for congenital adrenal hyperplasia in the proband, and the results were compared to those obtained from multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and Sanger sequencing in the family. **Results** The SMRT results revealed three pathogenic variants in the proband's CYP21A2 gene, including two tandemly arranged gene copies on one chromosome (one CYP21A2 copy with c.955C>T mutation and the other CYP21A2/CYP21A1P chimeric copy with a c.1069C>T mutation), and a deletion of the CYP21A2 gene on the other chromosome. These variants were consistent with the results obtained by MLPA+Sanger sequencing in the family, and the arrangement of the CYP21A2/CYP21A1P chimeric gene was clarified. **Conclusion** SMRT technology can identify gene copy number variations, structure variations, and chimeric genes, providing more valuable information for genetic diagnosis and carrier screening of 21-hydroxylase deficiency.

**Key words:** Single molecule real-time sequencing; Long-read sequencing; CYP21A2 gene; Chimeric gene; Gene duplication

21-羟化酶缺陷症(21-hydroxylase deficiency, 21-OHD)是一种常染色体隐性遗传病,是先天性肾上腺皮质增生症(congenital adrenal hyperplasia, CAH)的主要类型,占全部CAH的90%~95%<sup>[1]</sup>,全球活产儿发病率在1/20 000~1/10 000,人群携带率为1/71~1/50<sup>[2]</sup>。21-OHD是由编码21羟化酶的*CYP21A2*基因的纯合或复合杂合变异所致<sup>[3]</sup>。明确的基因诊断是临床诊疗和遗传咨询的基础,也可作为有再生育要求夫妇的产前诊断提供依据。

*CYP21A2*基因与假基因*CYP21A1P*在外显子和内含子区域均达到高度同源性,且位置相近。基因诊断必须排除假基因的干扰,对于*CYP21A2*基因微小变异目前采用等位基因特异性扩增Sanger测序,基因大片段缺失,重复或转换多采用多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)来检测,这两种技术的联用已成为*CYP21A2*基因诊断的常用和推荐方法<sup>[4-6]</sup>。近年来出现的第三代测序技术,又称长读长测序,弥补了二代测序读长较短的技术瓶颈,能够实现一次对多种变异同时检测,准确提供基因组结构变异(structure variations, SV)的断点信息,构建单倍型等。三代测序技术包括PacBio的单分子实时测序(single molecular real-time sequencing, SMRT)和ONT的纳米孔测序技术。

本研究应用SMRT技术对1例经典型21-OHD患儿的CAH候选基因进行检测,明确先证者遗传学病因,探讨SMRT技术在基因检测中的应用价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

先证者,女,3个月,出生后皮肤颜色大致正常,乳晕及会阴部皮肤色素沉着,阴蒂2 cm,增粗,双侧阴囊空虚。新生儿疾病筛查发现17-羟基孕酮升高,约为89.58~245.94 nmol/L,伴低钠高钾,睾酮最高7.93 nmol/L,婴儿吸吮母乳情况一般,无反复呕吐。染色体核型为46,XX。生殖系统超声显示:子宫大小约9 mm×4 mm,右侧卵巢大小约11 mm×8 mm,左侧卵巢大小约17 mm×9 mm,阴囊及腹股沟未探及确切睾丸回声。依据临床表现和生化检查确诊为21-OHD失盐型<sup>[7]</sup>,父母无异常表现,无异常家族史。检测前家属均接受遗传咨询并签署知情同意书,该研究经青岛大学附属青岛妇女儿童医院伦

理委员会批准(批号:QFELL-YJ-2023-172)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因组DNA提取

先证者及父母抽取外周静脉血2 mL,柠檬酸钠抗凝。采用QIAamp DNA Blood Mini kit提取基因组DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA片段完整性,Thermo NanoDrop2000测定DNA浓度及纯度,并调整至合适实验浓度。

#### 1.2.2 单分子实时测序

针对常见CAH候选基因*CYP21A2*、*CYP21A1P*、*CYP11B1*、*CYP17A1*、*HSD3B2*和*StAR*基因进行全序列分析。对于*CYP21A2*和*CYP21A1P*基因,设计特异性引物对A1P-F/TNXA-R、A2-F/TNXB-R、A1P-F/TNXB-R、A2-F/TNXA-R分别扩增假基因*CYP21A1P*、功能基因*CYP21A2*、30 kb缺失型*CYP21A1P/CYP21A2*嵌合基因、转换型*CYP21A2/CYP21A1P*嵌合基因。基因组DNA进行多重长片段(7.0~10 kb)扩增。通过末端修复和连接反应,将独特的PacBio条形码适配器连接到PCR产物上,获得预文库。预文库纯化、定量,形成SMRT bell库,使用Sequel Binding Kit 2.0和Internal Control Kit 1.0(Pacific Biosciences)将测序引物与DNA聚合酶与库前混合物融合。DNA聚合酶复合物加载到SMRT细胞上,并在Sequel II平台上用Sequel II Sequencing Kit 2.0进行测序(太平洋生物科学公司)。

#### 1.2.3 MLPA分析*CYP21A2*基因缺失/重复或转换变异

应用Salsa MLPA Kit P050试剂盒(荷兰MRC-Holland公司)。试剂盒包含27对探针:*CYP21A2*基因5个外显子(1、3、4、6和7号外显子)上的8组探针,*CYP21A1P*基因上的4组探针,下游*TNXB*和*ATF6B*基因7组探针,以及8组对照探针。选用无相关疾病、且各外显子拷贝数均为2的正常人DNA样本作为对照。实验操作严格按照标准操作流程进行;产物在ABI 3130基因分析仪(美国Applied Biosystems公司)中行毛细管电泳,所得数据应用Cofalyser Net软件分析。根据扩增峰的峰值与正常样本对照的比率来判断靶序列是否有拷贝数异常或点突变的存在。

#### 1.2.4 *CYP21A2*基因特异性扩增和Sanger测序

根据*CYP21A2*与*CYP21A1P*序列的差异,参考文献合成引物进行巢氏PCR扩增<sup>[8]</sup>。使用2对外引物扩增出*CYP21A2*基因片段,以此为模板,再采用内引物分别对10个外显子进行扩增,ABI 3130

基因分析仪进行 Sanger 测序。

测序数据应用 Novosnp3.0.1 软件与美国生物技术信息中心网站的 *CYP21A2* 基因(NM\_000500.9) 标准序列进行比对分析,寻找突变位点。

### 1.2.5 生物信息学分析

原始 bam 文件使用 SMRT Link 分析软件 (PacBio)与人类 GRCh38/hg38 基因组序列进行比对。*CYP21A2* 基因变异基于 GRCh38/hg38 的 NM\_000500.9 转录本描述。

使用 FreeBayes1.3.4 进行单核苷酸变异 (single nucleotide variants, SNVs) 和小的插入/缺失 (small insertions and deletions, indels) 的鉴定。为确定嵌合基因断裂重接位点,使用两个参考版本, *CYP21A2-TNXB* (hg38 chr6:32037179-32046548) 和 *CYP21A1P-TNXA* (hg38 chr6:32004843-32013648)。根据 A2、A1P/A2 和 A2/A1P reads 与参考序列对比,确定 SNVs 和 indels 在 A1P/A2 和 A2/A1P 中的

分布,以及 A1P/A2 和 A2/A1P 嵌合基因的连接位点。单倍型分析使用 whatshap。最终结果用 bam 文件在 Integrative Genomics Viewer (IGV) 程序中显示并确认致病变异。参考常用国际公共数据库,如 UCSC、ISCA、PubMed 以及相关文献报道。根据美国医学遗传学与基因组学学会等发布的《遗传变异分类标准与指南》<sup>[9]</sup>判断致病性。

## 2 结果

### 2.1 先证者 SMRT 结果

先证者等位基因 1 的 *CYP21A2* 基因缺失,等位基因 2 的 *CYP21A2* 真基因包含 c.955C>T 杂合变异,*CYP21A2/CYP21A1P* 嵌合基因包含 c.1069C>T 杂合变异,见图 1。先证者两个等位基因排列模式见图 2。

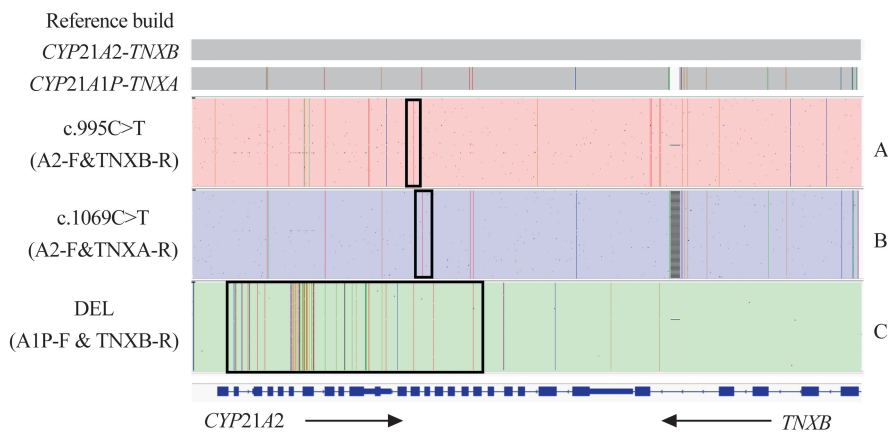


图 1 在 IGV 图中显示先证者 *CYP21A2* 基因变异

A: *CYP21A2* 真基因携带 c.955C>T 杂合突变 (黑框内); B: *CYP21A2/CYP21A1P* 嵌合基因携带 c.1069C>T 杂合突变 (黑框内); C: 左侧序列 (黑框内) 与 *CYP21A2* 基因对比大多为错配,右侧序列与 *TNXB* 基因相匹配,提示 *CYP21A2* 基因缺失。

Figure 1 IGV plots of the SMRT results showed *CYP21A2* gene variations of the prover

A: *CYP21A2* gene carried c.955C>T heterozygous mutation showed in black box; B: *CYP21A2/CYP21A1P* chimeric gene carried c.1069C>T heterozygous mutation showed in black box; C: The left half (in the black box) was mostly mismatched with *CYP21A2* gene, while the right half was matched with *TNXB* gene, indicating *CYP21A2* gene deletion.

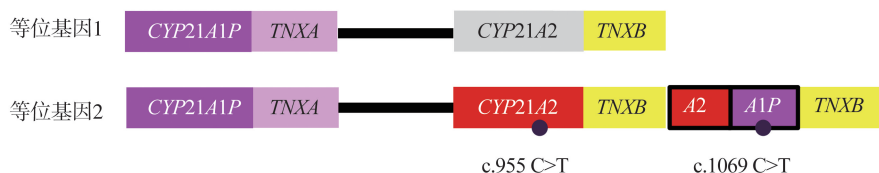


图 2 先证者两个等位基因排列的模式图

Figure 2 Pattern diagram of two alleles arrangement in the proband

### 2.2 先证者及父母 MLPA 结果

先证者 *CYP21A2* 基因拷贝数为 2; 母亲的基因拷贝数为 1, 提示其为 Exon 1~7 杂合缺失携带

者; 父亲的基因拷贝数为 3, 提示 *CYP21A2* 基因重复。MLPA 结果中各外显子拷贝数模式图见图 3。

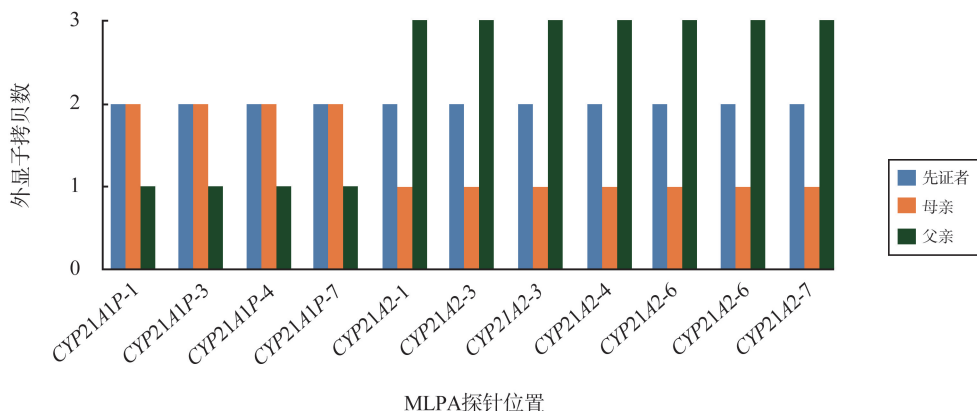


图3 先证者及父母 MLPA 结果

Figure 3 MLPA results of the proband and her parents

### 2.3 先证者及父母 Sanger 测序结果

先证者和父亲 *CYP21A2* 基因均携带 c.955 C>T 杂合变异,且野生峰高与变异峰高比值为 2:1 和 3:1,二者也同时携带 c.1069C>T 杂合变异,野生峰高与变异峰高比值为 1:1 和 2:1,提示位于 Exon8 上的这两个变异所在的拷贝不同。母亲在这两个位点

无变异。见图 4。

### 2.4 变异位点 SMRT 结果与 Sanger 测序结果对比

SMRT 结果与 Sanger 测序结果一致,均发现先证者的两个变异位点, c.955C>T 杂合变异和 c.1069C>T 杂合变异。见图 5。

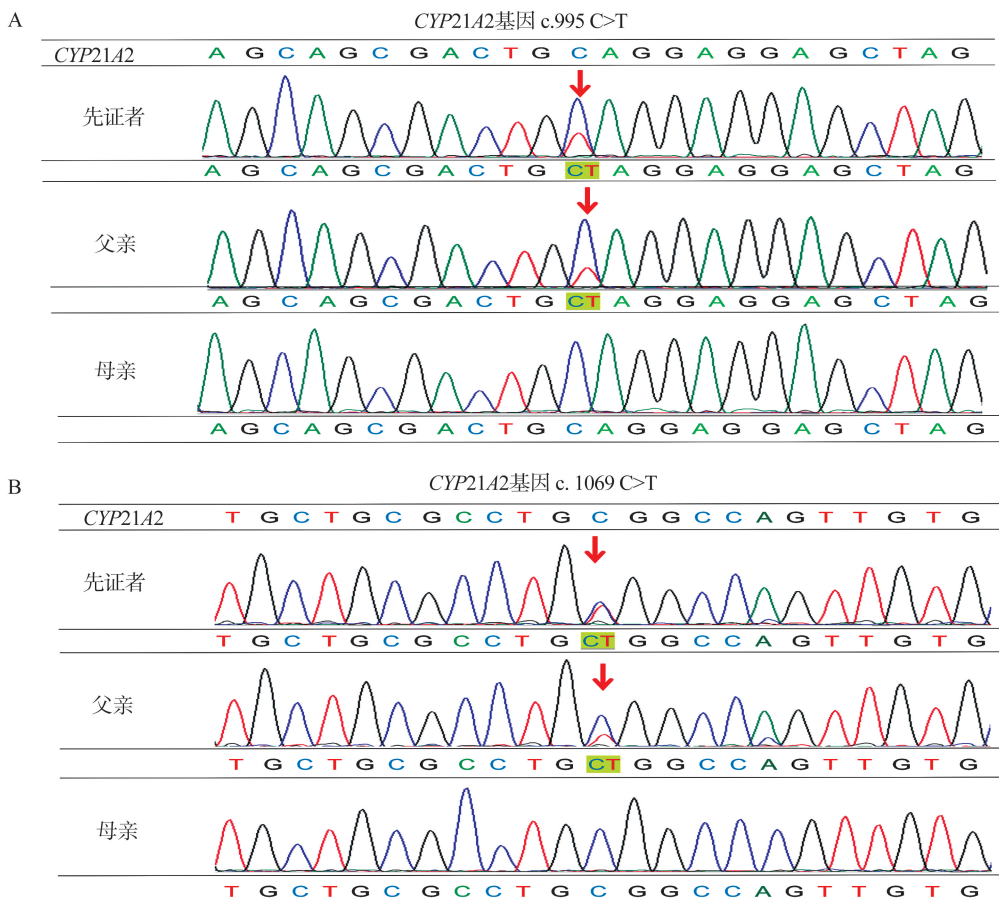


图4 家系 Sanger 测序结果

A: 箭头所指先证者和父亲均携带 c.955 C>T 杂合变异; B: 箭头所指先证者和父亲均携带 c.1069C>T 杂合变异,而母亲不携带。

Figure 4 The Sanger sequencing results of the family

A: Both the proband and his father carry the c.955 C>T heterozygous variation, as indicated by the arrow; B: Both the proband and his father carry the c.1069C>T heterozygous variation, as indicated by the arrow, while the mother does not carry them.

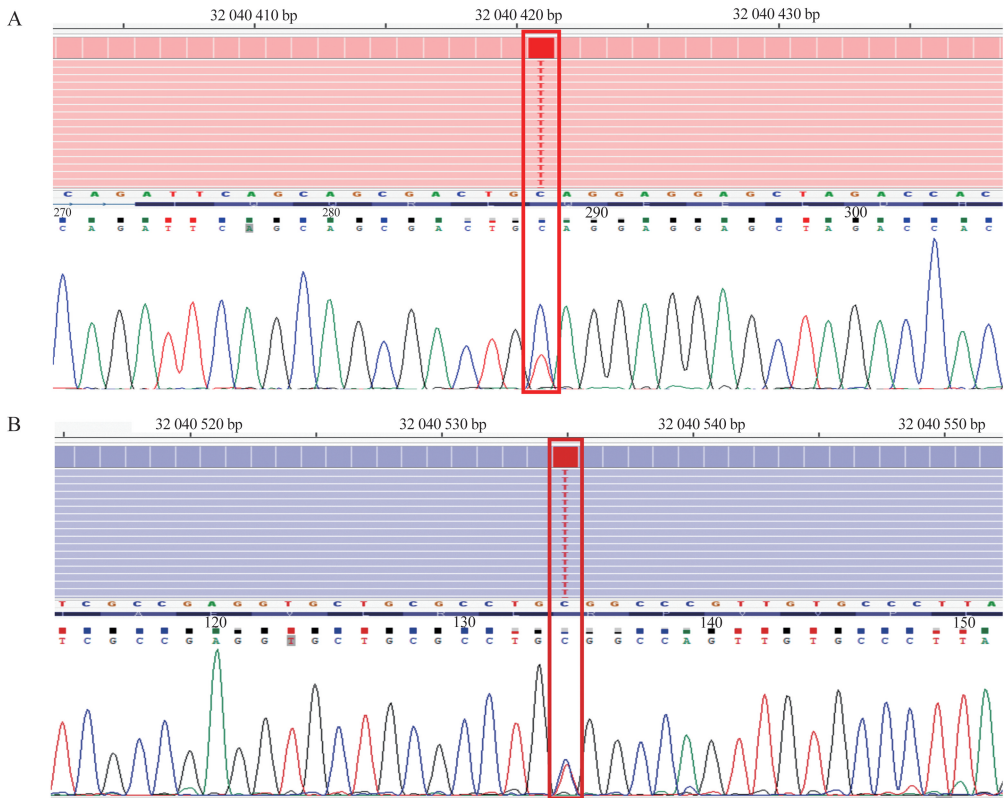


图5 变异位点 SMRT 结果与 Sanger 测序结果对比

A:c.955C>T 杂合变异;B:c.1069C>T 杂合变异。

Figure 5 Comparison of SMRT results and Sanger sequencing results at mutation sites

A: c.955C>T heterozygous variation; B: c.1069C>T heterozygous variation.

### 3 讨论

*CYP21A2* 基因定位于 6p21.3 (OMIM # 613815), 全长 3.35 kb, 包含 10 个外显子, 编码 494 个氨基酸。*CYP21A2* 基因与无编码功能的假基因 *CYP21A1P* 串联排列, 相距 30 kb, 两者在编码区和非编码区同源性分别为 98% 和 96%<sup>[10]</sup>。*CYP21A2* 和 *CYP21A1P* 及其邻近的编码色氨酸/苏氨酸激酶的 *RP* 基因 (*RP1* 和 *RP2*)、编码补体 C4 的基因 (*C4A* 和 *C4B*) 及编码细胞外基质蛋白-腱糖蛋白 X 的 *TNX* 基因 (*TNXA* 和 *TNXB*) 串联排列, 形成了 2 拷贝的 *RCCX* 单元 (*RP-C4-CYP21-TNX*)。功能基因 (*RP1*、*C4A*、*CYP21A2*、*TNXB*) 与相应假基因 (*RP2*、*C4B*、*CYP21A1P*、*TNXA*) 的高度同源性、近距离和串联重复增加了减数分裂过程中基因转换、缺失、重复和重组事件的发生率<sup>[11-12]</sup>。*CYP21A2* 基因变异的 90%~95% 由 *CYP21A2* 和假基因 *CYP21A1P* 之间重组所引起, 大约 70%~75% 的致病变异 (特别是 SNVs 和 indels) 在有丝分裂过程中, 通过基因的微转换从假基因转移到真基因上。20%~25% 的变异是由大片段的缺失/重复和不对称交叉重组导致

基因缺失或重复造成的<sup>[13]</sup>, 根据连接位点的位置, 嵌合基因分为 CH-1 至 CH-9 九种类型<sup>[14]</sup>。仅 5% 基因变异与假基因无关, 为新发突变。已发现的 *CYP21A2* 基因变异类型达 200 余种<sup>[3]</sup>。

目前 MLPA+Sanger 测序的联用成为 *CYP21A2* 基因诊断的推荐方法<sup>[4]</sup>。MLPA 能够检测拷贝数变异, 但仅覆盖 5 个外显子, 而且当基因重复与缺失同时存在时, 重复会掩盖缺失, 结果可能提示为正常; 位于探针结合区域的突变/多态性可能导致假阴性/假阳性结果。Sanger 测序能够检测 SNVs 和 indels, 引物必须精心设计, 以避免假基因干扰和等位基因缺失。当引物区域存在变异时会妨碍引物与模板 DNA 结合, 发生等位基因脱扣现象。MLPA 或 Sanger 测序所检出的变异都需要对先证者父母基因型溯源以判断顺反式状态。

本研究中, 先证者临床表现及实验室检查均符合 21-OHD 表型, 临床表型取决于两条染色体上等位基因的综合影响<sup>[4]</sup>, 说明其 *CYP21A2* 等位基因的功能皆受损。MLPA 结果中, 先证者 *CYP21A2* 基因外显子拷贝数为 2, 由于其母亲的外显子拷贝数为 1, 父亲外显子拷贝数为 3, 推断这 2 个拷贝都来源于父亲。MLPA 结果未见异常, 是因为父源等位基

因的重复掩盖了母源缺失,通过家系分析能够得出母源等位基因缺失的结论。Sanger 测序检测到先证者的 c.955 C>T 和 c.1069C>T 变异都来源于父亲,两个点突变存在等位基因不平衡的情况,都来自同一亲本,顺式排列于同一条染色体上。约 7% 的正常人携带 *CYP21A2* 基因重复,部分额外的拷贝会同时携带致病变异,以 c.955 C>T 变异多见,这通常不影响基因的功能。只有位于同一条染色体 *CYP21A2* 基因的两个拷贝同时都携带致病性变异时,才能认为是致病变异携带者<sup>[15-16]</sup>。Sanger 测序原始峰图中,c.955 C>T 和 c.1069C>T 两个变异位置相近,都位于 Exon8,而且其野生峰与变异峰的高度比例也提示这两个变异所在的拷贝并非同一个。先证者母源等位基因缺失,推测其父源重复的两个拷贝功能都受损。家系分析推断父亲 *CYP21A2* 基因的两个致病变异与 2 拷贝重复的单体型相关联。

这种 *CYP21A2* 基因重复型携带者的生殖细胞在减数分裂过程中,等位基因仍有可能发生同源重组<sup>[17]</sup>,生成另一种非携带状态配子(一条染色体携带 2 个 *CYP21A2* 拷贝,1 个拷贝正常,另 1 个拷贝携带致病性变异)。如果胎儿获得父亲的这种单体型和母亲等位基因缺失的单体型,在产前诊断时应用 MLPA+Sanger 测序方法,能够分别检出来自于父源和母源的变异,容易将两个等位基因均判断为致病性,从而将携带者误判为患者。MLPA+Sanger 测序方法更适合检测常见和已知的变异,在检测嵌合基因时存在一定的局限性。

本研究通过 SMRT 对先证者 CAH 候选基因进行了检测。测序片段长 8.45 kb~10.85 kb,测序深度 80×~100×。SMRT 技术实时记录被荧光标记的脱氧核苷酸三磷酸的荧光颜色和持续时间,实现碱基的判读和甲基化修饰的识别。所产生的错误是随机的,可以通过足够的测序次数来纠正,15 次测序准确率超过 99%<sup>[18]</sup>。超长读长和高准确率是三代测序的关键优势,可以实现在单个 reads 中获得基因的全长及其串联的其他基因,同时可以区分高度同源的真假基因,如 *CYP21A2* 和 *CYP21A1P*<sup>[19-21]</sup>。SMRT 结果提示,先证者的两个等位基因存在不平衡状态,一条染色体上串联排列两个 *CYP21A2* 基因拷贝,分别为包含 c.955C>T 变异的 *CYP21A2* 基因和包含 c.1069C>T 变异的 *CYP21A2/CYP21A1P* 嵌合基因。另一染色体上的 *CYP21A2* 基因缺失,只检测到相邻的 *TNXB* 基因。SMRT 更加直观地解释了先证者的遗传学病因,检出的变异在 MLPA+Sanger

中得到验证。

SMRT 结果表明,父源两拷贝之一为 *CYP21A2/CYP21A1P* 嵌合基因,含有 *CYP21A2* 的启动子、部分编码序列和 *CYP21A1P* 的部分编码序列。由于 *CYP21A1P* 不具有编码 21 羟化酶的功能,故嵌合基因最终导致 *CYP21A2* 基因出现拷贝数缺失,进而影响 21 羟化酶活性。先证者的嵌合基因断裂重排位点位于 c.955 和 c.1069 之间,根据目前国际上已报道的嵌合基因分型,属于 CH-3 型<sup>[22-23]</sup>,临床表型与 21-羟化酶缺陷症失盐型相关。SMRT 也检测到大量非致病性的 SNVs 和 SV,可以明确分析基因拷贝数目、碱基序列和结构变异,识别致病变异的顺反式状态,不需要依赖家系基因型分析,与标准方法 MLPA+Sanger 测序相比有明显优势。

本研究中检出 *CYP21A2* 基因的大片段缺失、点突变虽然都是比较常见的致病变异,但这种缺失与重复同时存在,重复拷贝又分别携带点突变的这种致病性变异的组合,尚未检索到类似报道。

*CYP21A2* 基因启动子和 3'UTR 区域变异可以通过影响 RNA 结构、降低 mRNA 稳定性和表达水平而导致 CAH,而且深度内含子区的变异也能导致 CAH 的发生<sup>[3, 24]</sup>。部分学者建议将 CAH-X 嵌合体也纳入 CAH 的分子遗传学检测<sup>[25-27]</sup>。

综上所述,基于 SMRT 的三代测序技术能够一次性对 *CYP21A2* 基因单核苷酸变异,小的插入/缺失,大片段缺失、重复及融合基因的结构变异进行准确描述,为基因检测提供了更加全面、准确、直观的新方法,为发现新的致病位点提供了可能,作为 CAH 携带者筛查和遗传学诊断方法在临床应用中具有很大的应用前景。

致谢:感谢韩青林(贝瑞基因)对本文中 SMRT 测序技术提供的帮助。

## 参考文献:

- [1] Merke D, Kabbani M. Congenital adrenal hyperplasia[J]. Paediatr Drugs, 2001, 3(8): 599-611.
- [2] Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an endocrine society clinical practice guideline[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2018, 103(11): 4043-4088.
- [3] Concolino P, Costella A. Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency: a comprehensive focus on 233 pathogenic variants of *CYP21A2* gene [J]. Mol Diagn Ther, 2018, 22(3): 261-280.

- [4] 孙昱, 邬玲仟, 叶蕾, 等. 21-羟化酶缺陷导致的先天性肾上腺皮质增生症的实验室诊断共识[J]. 中华医学遗传学杂志, 2023, 40(7): 769-780.  
SUN Yu, WU Lingqian, YE Lei, et al. Consensus on the laboratory diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency[J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2023, 40(7): 769-780.
- [5] 马定远, 孙云, 陈玉林, 等. 21-羟化酶缺陷症基因诊断方法的建立及应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(1): 49-54.  
MA Dingyuan, SUN Yun, CHEN Yulin, et al. Development and application of a method for molecular diagnosis of 21-hydroxylase deficiency[J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2013, 30(1): 49-54.
- [6] 高寅洁, 于冰青, 卢琳, 等. 多重连接探针扩增技术联合 Sanger 测序对 21-羟化酶缺陷症的诊断价值[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(6): 432-437.  
GAO Yinjie, YU Bingqing, LU Lin, et al. Diagnostic value of multiplex ligation dependent probe amplification combined with Sanger sequencing in 21-hydroxylase deficiency[J]. National Medical Journal of China, 2019, 99(6): 432-437.
- [7] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢病学组. 先天性肾上腺皮质增生症 21-羟化酶缺陷诊治共识[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(8): 569-576.
- [8] 夏艳洁, 梅世月, 胡爽, 等. 18 个 21-羟化酶缺陷症高危家系的基因筛查和产前诊断[J]. 中华医学遗传学杂志, 2019, 36(2): 103-107.  
XIA Yanjie, MEI Shiyue, HU Shuang, et al. Genetic screening and prenatal diagnosis in 18 high-risk families with 21-hydroxylase deficiency[J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2019, 36(2): 103-107.
- [9] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology[J]. Genet Med, 2015, 17(5): 405-424.
- [10] White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, 83(14): 5111-5115.
- [11] Blanchong CA, Zhou B, Rupert KL, et al. Deficiencies of human complement component C4A and C4B and heterozygosity in length variants of RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules in caucasians. The load of RCCX genetic diversity on major histocompatibility complex-associated disease[J]. J Exp Med, 2000, 191(12): 2183-2196.
- [12] Claahsen-van der Grinten HL, Speiser PW, Ahmed SF, et al. Congenital adrenal hyperplasia-current insights in pathophysiology, diagnostics, and management[J]. Endocr Rev, 2022, 43(1): 91-159.
- [13] Chen WY, Xu Z, Sullivan A, et al. Junction site analysis of chimeric CYP21A1P/CYP21A2 genes in 21-hydroxylase deficiency[J]. Clin Chem, 2012, 58(2): 421-430.
- [14] 常晨凯. 21-羟化酶缺陷症基因型与表型相关性研究[D]. 北京: 北京大学, 2021.
- [15] Fanis P, Skordis N, Toumba M, et al. The pathogenic p.Gln319Ter variant is not causing congenital adrenal hyperplasia when inherited in one of the duplicated CYP21A2 genes [J]. Front Endocrinol, 2023, 14: 1156616. doi:10.3389/fendo.2023.1156616.
- [16] Kleinle S, Lang R, Fischer GF, et al. Duplications of the functional CYP21A2 gene are primarily restricted to Q318X alleles; evidence for a founder effect[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(10): 3954-3958.
- [17] Carrozza C, Foca L, de Paolis E, et al. Genes and Pseudogenes; complexity of the RCCX locus and disease[J]. Front Endocrinol, 2021, 12: 709758. doi:10.3389/fendo.2021.709758.
- [18] Rhoads A, Au KF. PacBio sequencing and its applications[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2015, 13(5): 278-289.
- [19] Liu YD, Chen MM, Liu J, et al. Comprehensive analysis of congenital adrenal hyperplasia using long-read sequencing[J]. Clin Chem, 2022, 68(7): 927-939.
- [20] Adachi E, Nakagawa R, Tsuji-Hosokawa A, et al. A minION-based long-read sequencing application with one-step PCR for the genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2024, 109(3): 750-760.
- [21] Arriba M, Ezquieta B. Molecular diagnosis of steroid 21-hydroxylase deficiency: a practical approach[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 834549. doi: 10.3389/fendo.2022.834549.
- [22] Lee HH, Niu DM, Lin RW, et al. Structural analysis of the chimeric CYP21P/CYP21 gene in steroid 21-hydroxylase deficiency[J]. J Hum Genet, 2002, 47(10): 517-522.
- [23] Lao QZ, Burkardt DD, Kollender S, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to two rare CYP21A2 variant alleles, including a novel attenuated CYP21A1P/CYP21A2 chimera[J]. Mol Genet Genomic Med, 2023, 11(7): e2195. doi:10.1002/mgg3.2195.
- [24] Menabò S, Balsamo A, Baldazzi L, et al. A sequence variation in 3'UTR of CYP21A2 gene correlates with a mild form of congenital adrenal hyperplasia[J]. J Endocrinol Invest, 2012, 35(3): 298-305.