

基于 ACMG 指南进行遗传变异数致病性评估的策略研究



连文昌¹, 焦淑静¹, 吴松¹, 唐莉², 王华伟^{2,*}

¹ 苏州亿康医学检验有限公司医学遗传学部, 江苏苏州 215021

² 昆明医科大学第一附属医院生殖遗传科, 云南昆明 650032

摘要: 随着高通量测序 (Next-generation sequencing, NGS)、高分辨率染色体结构变异检测及三代测序等技术的发展, 针对特殊遗传疾病患者的致病性变异检测数量越来越多, 大量的新的变异被发现, 但如何确定患者表型直接相关的致病性变异是当前难题。上述变异需要经过特定的生物信息学分析, 再基于美国医学遗传学会与基因组学学会 (The American College of Medical Genetics Genomics and the Association for Molecular Pathology, ACMG-AMP) 制定的孟德尔遗传变异数解读和指南进行遗传变异数分类和解读是当前的热点和难点。针对上述问题, 团队根据研究经验和指南, 整理突变位点的评估原则、思路、数据库和网址等信息, 对基于 ACMG 规则指导下的遗传变异数分类流程进行介绍, 以期帮助临床医务人员进行遗传变异数分类评估和遗传报告解读, 最终使得更多基于基因组序列信息的特殊临床表型患者的个体化遗传评估。

关键词: ACMG; 遗传变异数分类; 策略; 流程

DOI: [10.57237/j.mrf.2023.01.002](https://doi.org/10.57237/j.mrf.2023.01.002)

Countermeasure on Evaluation for Pathogenicity of Variation with ACMG Guidelines

Lian Wenchang¹, Jiao Shujing¹, Wu Song¹, Tang Li², Wang Huawei^{2,*}

¹ Department of Medical Genetics, Yikon Genomics Company, Ltd, Suzhou 215021, China

² Department of Reproduction and Genetics, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China

Abstract: With the development of high-throughput sequencing (Next-generation sequencing, NGS), high-resolution chromosomal structure mutation detection, long-read sequencing and other technologies, a number of pathogenic variants were detected for patients with special genetic diseases rapidly, and new variants were discovered more and more from the patients and their family individuals. However, the evaluation and genetic consulting were main challenge for clinic staff on the uncertain relationship between the new detected variations and disease. And the evaluation of the relationships between the genetic variation and disease were challenged for the clinical doctors on how to explain the genetic reports to the patients correctly. Thus, performing evaluation for the function of the rare genetic variations in disease diagnose with the guideline of the American College of Medical Genetics Genomics and the Association for

基金项目: 上海市胚胎源性疾病重点实验室开放课题 (She2020006); 云南省卫生健康委员会高层次医学学科带头人 (D-2017007); 云南省高层次人才培养职称计划“名医专项” (RLMY20200017); 国家自然科学基金项目 (82160281)。

*通信作者: 王华伟, wanghuawei99@163.com

收稿日期: 2022-09-30; 接受日期: 2022-11-18; 在线出版日期: 2023-02-16

<http://www.medresfront.com>

Molecular Pathology (ACMG-AMP) were necessary. In this work, the principles, ideas, databases and URLs of the relevant variations were introduced according to the research experience and relevant guidelines, the experience of our team with the classification process of genetic variants basing on the guidance of ACMG rules would benefit for helping clinical staff to evaluate the genetic variants classification and genetic consulting, and finally performing the personalized patients diagnosis and treatment based on genome sequence information and special clinical phenotypes for the genetic disease.

Keywords: ACMG; Classification of Genetic Variants; Countermeasure; Process

1 前言

ACMG 为了规范和统一遗传变异分类，制定了遗传病变异的指南[1]，并在实际应用过程中不断修订和完善[2-7]。ClinGen 序列变异解释（Sequence Variant Interpretation, SVI）专家组也陆续发布了针对不同特定疾病，如听力损失[8]、RASopathy 表型[9]、遗传性心肌病[10]；特定基因，如 PAH [11]、CDH1 [12]、PTEN [13]等的变异解读指南。ACMG 指南中定义了 28 条证据，包括支持证据、中等证据、强、非常强、独立，并且建议通过经典的数据类型，包含文献支持数据、变异类型数据、人群发生频率数据、基因功能数据、共分离数据、表型数据等对遗传变异进行 5 级分类，

最后通过特定的标准术语进行相关基因变异分类，包括良性的（B）、可能良性的（LB）、临床意义不明（VUS）、可能致病的（LP）、致病的（P）突变 [14]。但对于刚接触遗传咨询的临床医务人员因需要具备文献证据寻找，数据库信息的获取，对表型数据的提取能力以及变异分类的评级把握，变异解读等方面的能力，这对临床遗传咨询人员提出了不小的挑战。因此，为提高临床工作人员的遗传咨询能力，本文从 ACMG 变异评级证据查找、经典致病突变案例的实际评估过程进行流程梳理和建议。



图 1 遗传变异评级流程图

2 基因变异评级流程概要和实践

2.1 基因变异评级流程

对于基因变异评级首先在于评级证据的寻找和解读, 需要通过一些数据库和文献查询平台进行证据收集和累积, 通过累积证据后根据 ACMG 评级标准与指南综合判定该基因变异评级。评级大致流程和 ACMG 评级标准见图 1。根据检索证据将变异进行分析, 可以分为非常强级别证据、强级别证据、中等级别证据及支持证据四个级别, 其中 PVS1 为非常强级别证据, 而 PS1-PS4 为强级别证据, 中等级别证据包括 PM1-PM6, 而支持证据可以分为 PP1-PP5, 良性变异分类标准可分为 BS1-BS4 的强证据, BPI-BP7 的支持证据, 在对

ACMG 致病性变异分级标准和 ACMG 良性变异分类标准对突变位点进行分级后, 再根据 ACMG 遗传变异分类联合标准规则进行基因突变分级评估, 最终将突变划分为致病性变异、可能致病性变异、良性变异、可能良性变异及意义不明确变异共 5 个级别, 具体参见 ACMG 评级标准与指南[1, 14]。

2.2 文献和数据库查询

常用的文献查询数据库可在以下网站上查询相关信息。美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)。通过 NCBI 下属的 PubMed 数据库进行文献报告查询, 如图 2。

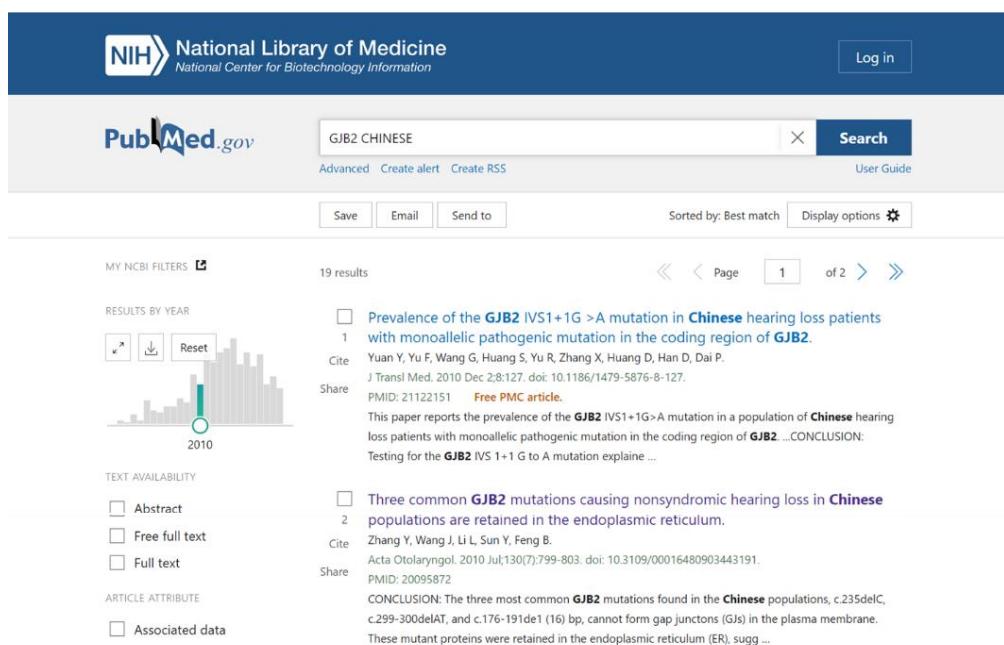


图 2 PubMed 数据库查询到 GJB2 基因文献报道

注: 文献表示查到在多名常染色体隐性耳聋患者中检出 c.235del (Leu79Cysfs*3) 纯合移码变异, 存在纯合或可能位于 GJB2 基因其他致病/可能致病变异的反式位置上, 评级为 PM3_very strong 证据。

另外也可以通过 google (www.google.com) 进行相关文献证据查询。

3 评级数据库查询

目前评级数据库或网站平台较多, 根据 ACMG 标准与指南推荐完整外显子序列数据库、疾病基因突变数据库、千人基因组数据库、dbSNP 及 dbVar 等数据

库; Clin Var、OMIM 及 Human Gene Mutation Database 等疾病数据库; Human Genome Variation Society、Leiden Open Variation Database、DECIPHER、NCBI Genome、RefSeqGene、Locus Reference Genomic 及 MitoMap 等数据库, 具体网址可参考 ACMG 评级标准与指南中推荐的网址, 以供分析人员进行文献和证据查找[1, 14]。并通过专业网站对错义预测、剪接位点预测、核酸保守性预测, 其中错义预测常用网站有 Consurf、

FATHMM、Mutation Asses、PANTHER、PhD-SNP、SIFT、SNP&GO、Align GVGD、MAPP、MutationTaster、MutPred、PolyPhen-2、PROVEAN、nsSNP Analyzer、Condel 及 CADD；剪接位点预测常用网站有 GeneSplicer、Human Splicing Finder、MaxEntScan、NetGene2、NNSplice 及 FSPLICE 等；核酸保守性预测常用网站为 GERP、PhastCons 及 PhyloP 等，具体参见 ACMG 评级标准与指南中推荐的网址[1, 14]。

但在寻找证据过程中需要谨慎的是，数据库包含一些分类错误的变异，如该变异被同行评审为错误判定。另外在使用这些数据库时，还需要考虑患者如何被确诊。另外针对这些评级数据库，不同的单位可能有自己开发的综合分析软件进行数据合并检索，以便提升致病评级评估效率。并根据自身分析软件结合

ACMG 标准与指南进行基因变异分类。如可利用公共综合分析网站（Inter Var-Genetic variants Interpretation by ACMG/AMP 2015 guideline (wglab.org)）进行初步错义、无义等基因变异评级和证据查找（图 3 和图 4）。再结合相关数据库查询的另外证据，如通过 Clin Var（图 5）、OMIM（图 6）等数据库，再进行综合分析和评估。

OMIM 数据库（<http://www.omim.org>）是关于人类基因和遗传紊乱的数据库，该数据库包含大量已知的致病性遗传疾病、并且有简略的各种疾病的临床特征、诊断、鉴别诊断、治疗与预防信息，还能提供已知致病基因的连锁关系、基因位置信息、结构功能、文献资料及动物模型等信息。OMIM 更新频率也较高，可以用来查询特定致病基因的临床表型[15]。

图 3 进行初步综合致病评估

Database version:hg19_update
You searched by chromosomal coordinates and Alleles
build:hg19_update Chr:11 Pos:88911236 Ref:T Alt:C

Chr	Position	Ref	Alt	Gene (refGene)	Interval
11	88911236	T	C	TYR	Uncertain significance (Details&Adjust)

Showing 1 to 1 of 1 entries
(Move mouse to popover or click the button of "Show/hide columns" for more information)

List of evidence in 28 criteria
(. means absent)

PM2:Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium. **Allele Frequencies in gnomAD:** . ;in 1000 Genome: ;in ESP: .

PP3:Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.). **MetaSVM_score:** 1.074 ; **GERP++_RS:** ; **dbscSNV_ADA:** . ; **dbscSNV_RF:** .

Search:

Criteria	MAF in gnomAD_ALL(genome)	Disease in OrphaNet	OMIM
1	352731	352737	606933
2	79434 (show in 7 POPs)	352731 79431 352740	606933

Previous 1 Next

图 4 针对 TYR 基因 (Chr:11 88911236(hg19) c.115T>C) 致病性初步评级并展示评级证据为 PM3 和 PP3

ClinVar TYR[gene] Search Help

Home About Access Help Submit Statistics FTP

Clinical significance
Conflicting interpretations (15)
Benign (0)
Likely benign (1)
Uncertain significance (87)
Likely pathogenic (46)
Pathogenic (49)

Types of conflicts
P/LP vs LB/B (3)
P/LP vs VUS (12)
VUS vs LB/B (6)

Molecular consequence
Frame-shift (0)
Missense (205) ✓
Nonsense (0)
Splice site (0)
ncRNA (0)
Near gene (0)
UTR (0)

Variation type
Exonic (1)

Search results
Display options - Sort by Location - Download - Items: 1 to 100 of 205
Filters activated: Missense. Clear all to show 399 items.

Variation Location	Gene(s)	Protein change	Condition(s)	Clinical significance (Last reviewed)	Review status
□ NM_000372.5(TYR).c.1A>G.(p.Met1Val) 1. GRCh37: Chr11:88911122 GRCh38: Chr11:89177954	TYR	M1V	Myopia, Nystagmus, Albinism, Slow decrease in visual acuity, Elevated hepatic transaminase, Albinism, Abnormality of metabolism/homeostasis, Choroidal neovascularization, Foveal hypoplasia, Skin/hair/eye pigmentation, variation in, 3, Ocular albinism with congenital	Pathogenic (Oct 1, 2021)	criteria provided, multiple submitters, no conflicts

图 5 通过 ClinVar 数据库查询到 TRY 基因错义变异 c.1A>G (Missense) ACMG 评级时可作为 PVS1 证据参考

About Statistics Downloads Contact Us MIMmatch Donate Help ?

Search OMIM... Options Display: Highlights

***606933**
Table of Contents

Title
Gene-Phenotype Relationships
Text
Description
Cloning and Expression
Gene Structure
Mapping
Gene Function
Molecular Genetics
Population Genetics
Animal Model
Allelic Variants
Table View
References
Contributors
Creation Date
Edit History

TYROSINASE; TYR

HGNC Approved Gene Symbol: TYR
Cytogenetic location: 11q14.3 Genomic coordinates (GRCh38): 11:89,177,875-89,295,759 (from NCBI)

Gene-Phenotype Relationships

Location	Phenotype	View Clinical Synopses	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
11q14.3	Albinism, oculocutaneous, type IA Albinism, oculocutaneous, type IB Waardenburg syndrome/albinism, digenic [Skin/hair/eye pigmentation 3, blue/green eyes] [Skin/hair/eye pigmentation 3, light/dark/freckling skin] [Melanoma, cutaneous malignant, susceptibility to, 8]	View Clinical Synopses	203100 606952 103470 601800 601800 601800	AR AR AR AD AD AD	3 3 3 3 3 3

External Links

- ▶ Genome
- ▶ DNA
- ▶ Protein
- ▶ Gene Info
- ▶ Clinical Resources
- ▼ Variation
- ▶ ClinVar
- ▶ DECIPHER
- ▶ gnomAD
- ▶ GWAS Catalog
- ▶ GWAS Central
- ▶ HGMD
- ▶ Locus Specific DBs
- ▶ NHLBI EVS
- ▶ PharmGKB
- ▶ Animal Models
- ▶ Cell Lines

图 6 OMIM 数据库对 TYR 基因的 DNA、蛋白、变异信息等数据检索

综合以上证据分级，根据 ACMG 致病性评级标准进行分级评估，可初步判断某些基因的变异评级。如具有 1 个非常强致病性评级 (PVS1) 加上 1 个以上具有强 (PS1-PS4) 级别证据，可初步判断该基因变异类型为致病性。

基因变异评级注意事项:不同解读人员在对基因变

异评级过程中采用的生物学软件、理解程度以及对于检测结果信息掌握情况等都有所不同，因此对于不同证据级别评估时有不同的细节需要证实，经过本人经验汇总在每个评级证据中常考虑 ACMG 指南的信息外，还补充了相关个人经验信息（表 1）。

表 1 不同致病评级注意事项（部分）

证据级别	Myogeno-Inter ACMG
PVS1	(1)零效变异 (2)如果不在 coding 最后 10%-PVS1。如果最后 10% 区 PVS1-PM4（如果文献 DM 有更靠后的位点，可以用 PVS1 证据）。如果起始密码子变异-PVS1_Modertate(init)。
PS1	特指和《文献数据库》同一氨基酸位置核苷酸变化不同氨基酸变化相同的错义突变。
PS2	自发-亲子关系确定-暂未采集该证据，需人工添加。
PS3	有功能验证文献-暂未采集该证据，需人工添加。
PS4	OR 值>5。《文献数据库》的显性变异用 PS4，AR 基因改成 PM3_strong。文献证据也用 ClinVar，需要核实文献可靠性[16]。
PM1	突变热点：左右 10 个核苷酸以内有 ≥ 3 个错义突变文献。
PM2	AD XL YL: MAF $\leq 1/100000$ 。AR: MAF $\leq 1/1000$ 。
PM3	反式位点为 pathogenic/likely-pathogenic 位点。见 PS4 说明。hom 且 MAF $\leq 1/1000$: PM3-Supporting(hom)。
PM4	Non frameshift, stop-loss。非重复区域。
PM5	和《文献数据库》同一氨基酸位置核苷酸变化不同氨基酸变化也不同的错义突变。
PM6	自发突变-不确定亲子关系。暂未采集该证据，需人工添加。
PP1	大家系，一般 AD 多的大家系，除先证者以外，还要有其他 3 个患者。暂未采集该证据，需人工添加。
PP2	GenomAD 数据库: PP2 mis_Z score 大于等于 3.09。
PP3	REVEL: 大于等于 0.7 为 PP3 证据。
PP4	与临床高度怀疑的疾病一致，且只有少数几个致病基因。暂未采集该证据，需人工添加。
BA	MAF>5% 或 mutinormal (不致病位点) 出现。
BS1	AD: MAF>0.001。AR: MAF>0.01。
BS2	Inter Var 的 BS2 数据库。
BS3	功能验证不致病，暂未采集该证据，需人工添加。
BS4	家系中有一个患者不分离就可以用 BS4。暂未采集该证据，需人工添加。
BP1	已报道的都是零效变异。
BP2	非复合杂合。
BP3	Inframe 插入缺失 (重复区域)。
BP4	REVEL 小于 0.4 为 BP4 证据。
BP 5	变异在已知不同分子基础疾病的患者中出现过。暂未采集该证据，需人工添加
BP 7	同义突变且软件预测不影响剪接。

近年来，随着 ACMG 遗传变异分类指南的推广和普及，越来越多的临床工作者开始加强遗传学知识的学习和应用，因此，对遗传变异解读能力也有了一定程度的提升。近年来，随着测序技术的发展，大量变异被发现，对遗传变异进行专业解读的需求也越来越多，特别是目前出生率越来越低的情况下，有些因遗传性疾病导致不能生育或已生育致病先证者的患者也在临床中较为常见。目前行业整体发展来看，遗传学除出现在常见的产前诊断、儿科、新生儿科、神经内科等科室外，生殖中心是目前开展遗传病筛查和诊断最多的科室之一。要求进行胚胎植入前遗传学诊断

(PGD) 技术的患者也随之增加，因此要求生殖中心临床医生在了解整体辅助生殖技术外还需要额外学习专业遗传学知识。因此，以上步骤流程可以为初步接触 ACMG 指南规则的生殖中心临床医生如何进行遗传变异分类提供参考依据。

4 讨论

本文就基于 ACMG 标准与指南进行基因变异评级的初步流程建议，不包含详细的基因变异评级的细节判读，旨在通过本文可让读者快速了解基于 ACMG 指

南, 并在指南的评估规则指导下快速寻找并了解基因变异评级证据, 进行基因变异的致病性评估。针对每个评级的证据都有相对应的标准, 根据标准需要查询或询问更加全面的信息, 包括但不限于临床信息、体征、家族病史等。这些信息在变异评级中与数据库查找到的相关证据具有同样重要的地位, 也是评级重要证据, 不可忽视。

另外, 在每个详细证据评级过程中虽可明确找到评级证据, 但还应考虑证据的其他方面, 如有些基因只有在杂合错义突变时才致病, 而当出现杂合无功能变异时则为良性; 又如当所预测的终止密码子出现在最后一个外显子时或出现在倒数第二个外显子的最后 50 个碱基对时, 虽为无义突变, 但并不会对蛋白的转录产生很大影响, 需要判断蛋白是否有转录降解的情况。根据预测蛋白截短长度也是评估 PVS1 的一个重要因素。对不同平台的生物信息数据分析结果大部分保持一致, 那么该基因变异类型可以作为支持证据, 如果绝大多数的分析结果不一致, 那么不能作为变异分类证据, 也不能作为 PP3 和 BP4 证据等。这些详细的评级细节在 PS1-PS4、PM1-PM6、PP1-PP5、BA1、BS1-BS4、BP1-BP7 证据评级中都有存在, 需要谨慎考虑。此文并没有将每个评级信息都进行详细的罗列, 具体可参考 2020 年最新 ACMG 标准与指南[17]。

因此, 在对基因变异评级结果解读过程中应该包含所有的评级证据, 包括蛋白功能预测、患者临床表型、临床医生的建议、患者家属成员变异情况以及其他附加信息。并且在对报告进行解读的过程中还需把先前找到的文献报道、疾病病例、人群数据频率等信息全部列出, 以便作为后续重新评估的依据。

以上仅作为作者对基因变异评级的观点, 不代表行业标准和单位实施方案, 仅供学习参考。

5 全文小结

随着测序技术的快速发展, 已有大量遗传学数据的产生并应用于临床疾病的辅助诊断, 但产生大量新的突变, 且上述变异多数为功能未知, 对临床医生开展遗传病的诊断造成较大的困惑。基于 ACMG-AMP 制定的孟德尔遗传变异数解读和指南进行遗传变异数分类, 在整体思路和现有原则指导下, 通过数据库对上述数据进行致病性证据的收集、分析及评估, 可以为临床医生对相关突变的致病性评估提供证据支持。但目前随着测序技术和相关基础研究的不断发展, 会有

新的算法和评估方式的出现, 相关工作人员在数据分析过程中需根据科学发展的新形势做出调整, 以便更好地让遗传学证据指导我们临床医生的临床遗传咨询工作。

参考文献

- [1] Richards S, Aziz N, Bale S. 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): 405-24.
- [2] Bai R, Balog A, Kiesler P, et al. Comment on the criteria for interpretation of mitochondrial tRNA variants [J]. *Genet Med.* 2020, 22 (8): 1418-1419.
- [3] Brnich SE, Abou Tayoun AN, Couch FJ, et al. Recommendations for application of the functional evidence PS3/BS3 criterion using the ACMG/AMP sequence variant interpretation framework [J]. *Genome Med.* 2019, 12 (1): 3.
- [4] Ghosh R, Harrison SM, Rehm HL, et al. Updated recommendation for the benign stand-alone ACMG/AMP criterion [J]. *Hum Mutat.* 2018, 39 (11): 1525-1530.
- [5] AbouTayoun AN, Pesaran T, DiStefano MT, et al. Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion [J]. *Hum Mutat.* 2018, 39 (11): 1517-1524.
- [6] Luo X, Feurstein S, Mohan S, et al. ClinGen Myeloid Malignancy Variant Curation Expert Panel recommendations for germline RUNX1 variants [J]. *Blood Adv.* 2019, 3 (20): 2962-2979.
- [7] Mester JL, Ghosh R, Pesaran T, et al. Gene-specific criteria for PTEN variant curation: Recommendations from the ClinGen PTEN Expert Panel [J]. *Hum Mutat.* 2018, 39 (11): 1581-1592.
- [8] Oza AM, DiStefano MT, Hemphill SE, et al. Expert specification of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for genetic hearing loss. [J] *Hum Mutat.* 2018, 39 (11): 1593-1613.
- [9] Gelb BD, Cave H, Dillon MW, et al. ClinGen's RASopathy Expert Panel consensus methods for variant interpretation [J]. *Genet Med.* 2018, 20 (11): 1334-1345
- [10] Kelly MA, Caleshu C, Morales A, et al. Adaptation and validation of the ACMG/AMP variant classification framework MYH7-associated inherited cardiomyopathies: recommendations by ClinGen's Inherited Cardiomyopathy Expert Panel [J]. *Genet Med.* 2018, 20 (3): 351-359.

- [11] ClinGen PAH Expert Panel Specification to the ACMG/AMP Variant Interpretation Guidelines Version 1. <https://clinicalgenome.org/affiliation/50015>.
- [12] Lee K, Krempley K, Roberts ME, et al. Specifications of the ACMG/AMP variant curation guidelines for the analysis of germline CDH1 sequence variants [J]. *Hum Mutat*. 2018, 39 (11): 1553-1568.
- [13] Erin S, Martino G, Leonardo S, et al. The Complex Landscape of PTEN mRNA Regulation [J] *Cold Spring Harb Perspect Med* 2020 Jun 1; 10 (6): a036236.
- [14] 王秋菊, 沈亦平. 等, 遗传变异分类标准与指南 [J]. *中国科学*. 2017, 00 (6): 1-21.
- [15] McKusick VA. Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM [J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 80 (4): 588-604.
- [16] Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting [J]. *Hum Genet*. 2020, 139 (10): 1197-1207.
- [17] Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (Clin Gen) [J]. *Genet Med*. 2020, 22 (2): 245G257.