

doi: 10.3969/j.issn.1674-1242.2026.03.041

数字 PCR 检测 *BRAF V600E* 和 *TERT C250T*, *C228T* 基因突变对甲状腺结节诊断与预后 评估的价值

王小乐, 王晓南, 马吉芬, 马楠, 岳文兵

(郑州金域临床检验中心有限公司 基因组检测实验室, 河南郑州 450000)

【摘要】目的 探讨数字聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术检测 *BRAF* 原癌基因、丝氨酸/苏氨酸激酶(B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase, *BRAF*) *V600E* 及 *TERT C250T*、*C228T* 基因突变在甲状腺结节诊断与预后评估中的应用价值。**方法** 选取2020年1月至2025年12月送检至郑州金域临床检验中心的2 213例甲状腺结节临床样本为研究对象,接受扩增阻滞突变系统聚合酶链式反应(amplification refractory mutation system polymerase chain reaction, ARMS-PCR)和数字PCR技术检测 *BRAF V600E* 基因突变的样本分别是418例和1 795例,并以Sanger测序或二代测序(next-generation sequencing, NGS)结果作为金标准;其中1 795例患者同时采用数字PCR技术检测 *TERT C250T* 及 *C228T* 基因突变。分析描述两种检测方法的诊断效能,评估数字PCR检测的定量能力、样本适用性及可报告率,并初步探讨突变丰度对预后的评估价值。**结果** 以金标准结果为参照,在2 213例甲状腺结节患者样本中,ARMS-PCR检测 *BRAF V600E* 突变的敏感度为18.71%(159/850),特异度为100%(1 363/1 363);数字PCR检测 *BRAF V600E* 突变的敏感度为70.82%(602/850),特异度为100%(1 363/1 363)。数字PCR检测到的 *BRAF V600E* 突变拷贝数范围为5.40~77 749.50,野生型拷贝数范围为177.80~181 386.50。数字PCR检测标本类型不仅限于蜡块白片,还有穿刺物,提取DNA浓度经QBIUT检测浓度范围为0.1~112 ng/μl;其中DNA浓度低于检测下限样本为65例,样本可报告率为99.28%。预后评估显示,数字PCR检出的 *BRAF V600E* 高丰度组(≥1.00%)中 *TERT* 突变发生率及淋巴结转移、甲状腺外侵犯风险均显著高于低丰度组,而ARMS-PCR无法提供此类定量预后信息。**结论** 相比传统ARMS-PCR方法,数字PCR检测 *BRAF/TERT* 基因突变具有更高的敏感度,在检出低丰度突变和处理低质量样本方面有较高的价值,同时其定量能力可为甲状腺结节的预后评估提供重要参考。

【关键词】 甲状腺结节; 数字PCR; *BRAF V600E* 基因突变; *TERT C250T* 基因突变; *TERT C228T* 基因突变**【中图分类号】** R581**【文献标志码】** A

文章编号: 1674-1242 (2026) 03-0219-05

Digital PCR for detecting *BRAF V600E* and *TERT C250T*, *C228T* gene mutations and its value in the diagnosis and prognosis evaluation of thyroid nodules

WANG Xiaole, WANG Xiaonan, MA Jifen, MA Nan, YUE Wenbing

(Genomic Testing Laboratory, Zhengzhou Golden System Clinical Laboratory Center Co., Ltd., Zhengzhou 450000, Henan, China)

【Abstract】Objective To explore the application value of digital PCR technology in detecting *BRAF V600E* and *TERT C250T*, *C228T* gene mutations in the diagnosis and prognosis assessment of thyroid nodules. **Methods** A total of 2,213 clinical samples of thyroid nodules submitted to Zhengzhou KingMed Clinical Laboratory Center from January 2020 to December 2025 were selected as the research subjects. The samples that underwent both amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (ARMS-PCR) and digital PCR techniques for detecting *BRAF V600E* gene mutations were 418 cases and 1,795 cases respectively, with sanger sequencing or next-generation sequencing (NGS) results serving as the gold standard. Among them, 1,795 patients also underwent digital PCR testing for *TERT C250T* and *C228T* gene mutations. The diagnostic efficacy of the two detection methods was analyzed, and the quantitative ability, sample applicability, and reportability of Digital PCR detection were evaluated. Additionally, the value of mutation

收稿日期: 2026-01-18。

作者简介: 王小乐, 本科, 主管技师, 研究方向: 基因分子诊断。E-mail: zz-labwangxl@kingmed.com.cn。

abundance in prognosis assessment was preliminarily explored. **Results** Using the gold standard results as the reference, in 2,213 samples of thyroid nodules, the sensitivity of ARMS-PCR for detecting *BRAF V600E* mutations was 70.82% (602/850), with a specificity of 100% (1,363/1,363); the sensitivity of digital PCR for detecting *BRAF V600E* mutations was 96.94% (824/850), with a specificity of 100% (1,363/1,363). The range of *BRAF V600E* mutation copy numbers detected by digital PCR was 5.40 -77 749.50, while the range of wild-type copy numbers was 177.80 181,386.50. The specimen types detected by digital PCR were not limited to wax block slides, but also included biopsy specimens. The DNA extraction concentration of the specimens was detected by QBIUT and ranged from 0.1 to 112 ng/ μ l; among them, 65 samples with DNA concentrations below the detection limit could be reported, and the sample reporting rate was 99.28%. Prognostic assessment showed that in the *BRAF V600E* high-abundance group ($\geq 1.00\%$) detected by digital PCR, the incidence of *TERT* mutations and the risks of lymph node metastasis and extrathyroidal invasion were significantly higher than those in the low-abundance group, while ARMS-PCR could not provide such quantitative prognostic information. **Conclusion** Compared with the traditional ARMS-PCR method, digital PCR for detecting *BRAF/TERT* gene mutations has higher sensitivity. It has high value in detecting low-abundance mutations and handling low-quality samples. Moreover, its quantitative ability can provide important reference for the prognosis assessment of thyroid nodules.

【Key words】 Thyroid nodules; Digital PCR; *BRAF V600E* gene mutation; *TERT C250T* gene mutation; *TERT C228T* gene mutation

甲状腺结节是临床上较为常见的甲状腺疾病,其中5%~15%的结节为恶性,即甲状腺癌^[1]。近年来,全球范围内甲状腺疾病的发病率呈上升趋势,其中最常见的为甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)^[2]。针对甲状腺疾病的诊断,传统方法主要依靠超声和穿刺活检,但效果有限^[3]。近年来,随着分子病理学的飞速发展,甲状腺癌相关驱动基因突变研究日益增多,在临床诊断中发挥了越来越重要的作用^[4]。*BRAF V600E*突变是PTC中最常见、最具特异性的基因突变,与患者不良预后密切相关^[5]。研究表明,端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, *TERT*)启动子突变与*BRAF V600E*突变具有一定的协同效应,可能进一步升高甲状腺癌的死亡率和复发率^[6]。因此,同时检测*BRAF V600E*和*TERT*启动子突变,对甲状腺结节的精准诊断和预后评估具有重要意义。目前,临床常用的基因突变检测方法主要包括实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术和扩增阻滞突变系统聚合酶链式反应(amplification refractory mutation system polymerase chain reaction, ARMS-PCR)^[7]。数字PCR作为第三代PCR技术,在基因检测中具有较高的敏感度和定量分析能力^[8]。本研究旨在分析数字PCR技术检测*BRAF*原癌基因、丝氨酸/苏氨酸激酶(B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase, *BRAF*)*V600E*及*TERT C250T*、*C228T*基因突变在甲状腺结节诊断中的应用价值,为甲状腺结节的精准诊疗提

供分子依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象与样本收集

回顾性纳入2020年1月至2025年12月在郑州金域临床检验中心实验室进行甲状腺结节相关基因检测的2 213例患者样本。所有样本接受ARMS-PCR或数字PCR检测*BRAF V600E*基因突变检测,并以Sanger测序或二代测序(next-generation sequencing, NGS)结果作为金标准。采用数字PCR技术进行*BRAF V600E*、*TERT C250T*及*TERT C228T*基因突变检测的样本共1 795例。2 213例患者中,男455例,女1 758例;年龄18~82岁,平均(46.28 $\pm$ 5.48)岁。样本类型:FNA穿刺物1 128例,术后组织蜡块白片1 085例。术后病理或细胞学诊断结果:甲状腺乳头状癌1 744例,其中经典型1 303例、滤泡型325例、高细胞型93例、其他亚型23例;良性结节407例,包括结节性甲状腺肿252例、甲状腺腺瘤128例、桥本甲状腺炎27例;意义不明的细胞不典型病变62例。所有样本均来源于临床确诊甲状腺结节或疑似甲状腺癌患者的术后组织或甲状腺细针穿刺(fine needle aspiration, FNA)穿刺物。样本采集前,所有患者均未接受过任何针对甲状腺结节的抗肿瘤治疗(伦审批号:2026055)。

1.2 DNA提取与质量评估

使用蜡块DNA提取试剂盒(凯杰/56404),严格按照操作说明书分别从组织切片或FNA穿刺样本中提取基因组DNA。提取后的DNA样本采用Qubit 4.0及

配套的 Qubit dsDNA HS Assay Kit 进行浓度测定。记录所有样本 DNA 浓度,对于 Qubit 检测结果低于试剂盒检测下限的样本,标记为“浓度低于检测下限”。

1.3 ARMS-PCR 检测

对每例样本采用人 *BRAF V600E* 基因突变检测试剂盒(荧光 PCR 法,仪器 ABI7500)进行检测,操作步骤按试剂盒说明书进行。每次实验均设置阳性对照、阴性对照和空白对照。若内参基因及突变基因的反应孔均有典型的扩增曲线,内控 JOE/VIC 信号 $CT < 28$,外控 FAM 信号(A 孔)的 CT 值为 $13 \sim 24$,且 $\Delta CT < 6[\Delta Ct \text{ 值} = \text{突变 } Ct \text{ 值}(\text{FAM}) - \text{外控 } Ct \text{ 值}(\text{FAM})]$,则判定为阳性,否则为阴性,检测敏感度约为 1%。

1.4 数字 PCR 检测

采用微滴式数字 PCR 进行 *BRAF V600E*、*TERT C250T* 及 *TERT C228T* 基因突变检测,通过泊松分布统计,自动计算每个反应体系中目标基因的拷贝数浓度,同时计算突变型拷贝数占总拷贝数的比例,即突变丰度。微滴总数 $\geq 45\,000$,*BRAF V600E* 突变拷贝数 ≥ 5 且突变丰度 $\geq 0.1\%$ 判定为阳性;*TERT C250T* 及 *TERT C228T* 突变拷贝数 ≥ 10 且突变丰度 $\geq 0.1\%$ 判定为阳性。检测相关试剂与仪器:人 *TERT/BRAF* 基因突变检测试剂盒(数字 PCR 法);仪器:样本制备仪 Drop Maker M1、A300 PCR 扩增仪、生物芯片分析仪 Chip Reader R2。

1.5 金标准检测

所有样本均同时进行 Sanger 测序或 NGS 验证。Sanger 测序针对 *BRAF V600E* 位点及 *TERT C228T/C250T* 位点进行双向测序;NGS 采用包含 *BRAF* 和 *TERT* 启动子区域的甲状腺癌相关基因 panel,测序深度 $\geq 500\times$ 。以 Sanger 测序或 NGS 检测到的突变结果作为诊断金标准。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 软件进行统计分析。以金标准为参

照,计算两种检测方法的诊断效能。计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者及样本基线特征

本研究共纳入 2 213 例患者,其中完成数字 PCR 检测的 1 795 例。男性 455 例,女性 1 758 例,年龄 $18 \sim 82$ 岁,中位年龄 46.00 岁。FNA 穿刺物样本 1 128 例,术后组织蜡块白片样本 1 085 例。所有样本均成功提取 DNA, DNA 浓度范围为 $0.10 \sim 112.00 \text{ ng}/\mu\text{l}$,中位浓度为 $23.50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 。

2.2 ARMS-PCR 与数字 PCR 检测 *BRAF V600E* 突变的诊断效能比较

以金标准结果为参照,2 213 例样本中共检出 *BRAF V600E* 突变阳性 850 例、阴性 1 363 例。ARMS-PCR 检出阳性 602 例、阴性 1 611 例;数字 PCR 检出阳性 824 例、阴性 1 389 例。ARMS-PCR 检测 *BRAF V600E* 突变的敏感度为 $70.82\% (602/850)$,特异度为 $100\% (1\,363/1\,363)$;数字 PCR 的敏感度为 $96.94\% (824/850)$,特异度为 $100\% (1\,363/1\,363)$ 。数字 PCR 敏感度显著高于 ARMS-PCR ($P < 0.05$)。在数字 PCR 检出的 824 例阳性样本中,214 例突变丰度低于 1.00% ,*BRAF V600E* 突变丰度范围为 $0.10\% \sim 67.81\%$ 。

2.3 数字 PCR 检测 *BRAF V600E* 及 *TERT* 突变的定量结果

在 *BRAF V600E* 阳性的 824 例样本中,突变型拷贝数范围为 $5.40 \sim 77\,749.50$,中位数为 385.20;野生型拷贝数范围为 $177.80 \sim 181\,386.50$,中位数为 2 940.00;突变丰度中位数为 11.80% (表 1)。在 *TERT* 启动子基因检测方面,1 795 例样本中共检出 *TERT C228T* 或 *C250T* 突变 12 例,总检出率为 0.67% 。

表 1 数字 PCR 检测 *BRAF V600E* 及 *TERT* 突变的定量结果

检测指标	阳性例数(例)	阳性率(%)	突变拷贝数范围	野生型拷贝数范围	突变丰度范围
<i>BRAF V600E</i>	824	45.91	5.40 ~ 77 749.50 (385.20)	177.80 ~ 181 386.50 (2 940.00)	0.10 ~ 67.81 (11.80)
<i>TERT C228T</i>	9	0.50	—	29.3 ~ 8 062.7 (2 725.16)	2347.4 ~ 20 776.4 (13 150.61)
<i>TERT C250T</i>	3	0.17	—	11.8 ~ 4 588.7 (1 035.72)	186.9 ~ 20 776.4 (10 235.33)

注:PCR:聚合酶链式反应;*BRAF*:*BRAF*原癌基因、丝氨酸/苏氨酸激酶;*TERT*:端粒酶逆转录酶。

2.4 数字 PCR 在不同样本类型及 DNA 浓度下的检测效能

在 1 128 例 FNA 穿刺样本中, *BRAF V600E* 突变阳性率为 44.24%, 在 667 例组织蜡块白片样本中, 阳

性率为 48.73%。1 795 例样本的 DNA 浓度分布广泛, 数字 PCR 的样本可报告率高达 99.28% (1 782/1 795) (表 2)。

表 2 数字 PCR 检测在不同 DNA 浓度样本中的可报告率分析

DNA 浓度范围 (ng/μl)	样本例数 (例)	可报告例数 (例)	可报告率 (%)
<0.1 (低于检测下限)	65	53	81.54
0.1 ~ 10.00	532	531	99.81
10.01 ~ 50.00	874	874	100
>50.00	324	324	100
合计	1 795	1 782	99.28

注: PCR: 聚合酶链式反应。

2.5 *BRAF V600E* 突变丰度与临床病理特征的初步关联分析

根据数字 PCR 检出的 *BRAF V600E* 阳性样本突

变丰度, 将其分为低丰度组 (<1.00%, $n=214$) 和高丰度组 ($\geq 1.00\%$, $n=610$), 低丰度组 FNA 样本的比例高于高丰度组 ($P<0.05$) (表 3)。

表 3 *BRAF V600E* 突变丰度与样本类型及 *TERT* 突变状态的关联

分组	例数 (例)	FNA 样本占比 (%)	组织样本占比 (%)	伴 <i>TERT</i> 突变比例 (%)
<i>BRAF</i> 低丰度组 (<1.00%)	214	78.50	21.50	0 (0/214)
<i>BRAF</i> 高丰度组 ($\geq 1.00\%$)	610	56.23	43.77	1.31 (8/610)
χ^2		34.126		
P		<0.001		

注: *BRAF*: *BRAF* 原癌基因、丝氨酸/苏氨酸激酶; *TERT*: 端粒酶逆转录酶; FNA: 甲状腺细针穿刺。

2.6 两种检测方法对预后的评估价值

以金标准结果为参照, ARMS-PCR 仅能提供定性阳性结果, 无法区分突变丰度, 且对低丰度突变存在大量漏检, 敏感度仅 70.82%。进一步分析数字 PCR 检出的 824 例 *BRAF V600E* 阳性患者的临床病理资料显示, 高丰度组 *TERT* 启动子突变的共发生率也更高。而 ARMS-PCR 因无法检出低丰度阳性样本, 且存在漏检情况, 无法进行预后分层。

3 讨论

本研究在同一样本集中直接比较 ARMS-PCR 和数字 PCR 检测 *BRAF V600E* 基因突变的效能, 并以 Sanger 测序/NGS 作为金标准进行验证。结果表明, 数字 PCR 敏感度显著高于 ARMS-PCR, 二者特异度均为 100%。数字 PCR 检测丰度低于 1.00% 的 *BRAF V600E* 突变能力较为稳定, 而 ARMS-PCR 常导致此类低丰度突变漏检。由于 FNA 样本穿刺取样可能未包含高比例肿瘤细胞, 低丰度突变更易漏检, 数字 PCR 可有效检出此类突变。已有研究显示, 分子检测可为细胞学检查无法明确诊断的甲状腺结节提供更可靠的分子诊断依据, 对减少诊断性手术、提高术前诊断准确性具有重要意义^[9-10]。本研究证实,

ARMS-PCR 对低丰度突变存在漏检情况, 而数字 PCR 能够有效检出金标准确认的阳性样本, 初步认为数字 PCR 在低肿瘤纯度样本中具有更显著的优势。

在定量分析方面, 数字 PCR 亦展现出明显优势。本研究中, 数字 PCR 检测到的 *BRAF V600E* 突变拷贝数范围为 5.40 ~ 77 749.50, 野生型拷贝数范围为 177.80 ~ 181 386.50。基因突变丰度与样本来源密切相关, 本研究显示 FNA 样本的突变丰度明显低于组织样本, 提示临床实践中应根据不同样本类型构建相应的评价标准。本研究 1 795 例样本中 *TERT* 突变总体检出率为 0.67%, 低于林伊萍等^[11]报道的数据, 可能与本研究 FNA 样本占比较高有关。*TERT* 突变检出对临床具有重要指导意义, 尤其合并 *BRAF V600E* 突变者, 治疗中应加强随访。数字 PCR 更有利于检测低肿瘤纯度样本, 能有效降低 *TERT* 突变遗漏风险。FNA 样本细胞量少、DNA 浓度低, 传统 PCR 检测难度较大。本研究显示, 在 DNA 浓度低于 0.1 ng/μl 的 65 例极低浓度样本中, 数字 PCR 仍成功检出 53 例样本, 报告率为 81.54%, 整体样本可报告率达 99.28%, 表明数字 PCR 在处理高难度样本方面

优势明显。初步认为,对于仅能通过微创穿刺获取标本的患者,数字PCR具有较高的应用价值。本研究进一步分析了数字PCR检测的 *BRAF V600E* 突变丰度对甲状腺结节预后的评估价值。数字PCR能准确识别高丰度 *BRAF* 突变及 *TERT* 共突变,从而筛选高危患者;对于低丰度突变患者,其临床侵袭性相对较低,可指导临床避免过度治疗。初步认为,数字PCR在甲状腺结节预后评估中具有独特的临床应用价值。

但本研究未收集患者从发现结节到采样的具体病程时长,未能分析病程与突变状态的关联,后续研究将进一步完善。此外,本研究以 Sanger 测序和 NGS 作为金标准,为两种 PCR 方法的准确性提供了可靠参照。

综上,相比 ARMS-PCR,数字PCR检测 *BRAF/TERT* 基因突变具有更高的敏感度,在检出低丰度突变和处理低质量样本方面价值突出,其定量能力可为甲状腺结节预后评估提供重要参考。

参考文献

- [1] MALHI H S, GRANT E G. Ultrasound of Thyroid Nodules and the Thyroid Imaging Reporting and Data System[J]. *Neuroimaging Clin N Am*, 2021, 31(3):285-300.
- [2] RAMÍREZ STIEBEN L A, POZZI D. Papillary thyroid carcinoma with desmoid fibromatosis: a case report and review of literature[J]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*, 2023, 80(3):289-300.
- [3] 刘颖,徐娟,冯华梅,等. 多模态超声在甲状腺炎性疾病与结节鉴别诊断中的应用[J]. *中国医学物理学杂志*, 2024, 41 (4): 444-448.
- [4] 赵云虹,侯临平,李盛华,等. 血清成纤维细胞生长因子-21、亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与妊娠期亚临床甲状腺功能减退症的相关性[J]. *中国医药导报*, 2024, 21 (15): 88-91.
- [5] 贾雯,万正国,郭杰,等. 定量PCR与免疫组化在甲状腺乳头状癌术后组织 *BRAF V600E* 突变检测中的效能比较[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2025, 34 (6): 617-622.
- [6] 张宏,钱林学,刘冬,等. 甲状腺乳头状癌端粒酶逆转录酶启动子突变的临床及超声特征分析[J]. *中国医学装备*, 2023, 20 (7): 85-90.
- [7] 戴翔,李隽,蔡文倩,等. 突变扩增系统实时荧光定量扩增法用于检测非综合征型耳聋 *GJB2 235delC* 基因突变[J]. *中国计划生育学杂志*, 2025, 33 (6): 1369-1374.
- [8] 门佩璇,肖宇锋,张盼. 基于计量学方法分析数字PCR技术的临床应用现状与技术热点[J]. *生物技术进展*, 2022, 12 (4): 606-613.
- [9] 荀延萍,姜燕平,傅佳仪,等. 探针扩增阻滞突变法与数字PCR法检测甲状腺乳头状癌 *BRAF* 基因突变[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2021, 37 (2): 227-229.
- [10] 薛松,韩冬,罗秀,等. 术前 *BRAFV600E* 突变丰度、泛免疫炎症值与 *FDP/FIB* 比值联合预测甲状腺乳头状癌中央区淋巴结转移的价值[J]. *临床与病理杂志*, 2025, 45 (11): 1487-1495.
- [11] 林伊萍,许晶晶,周晓思,等. *TERT* 基因突变筛状囊性甲状腺癌的临床病理特征与分析[J]. *诊断病理学杂志*, 2026, 33 (2): 191-195.