



УДК 577.217

НОВЫЕ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ МУТАЦИИ *LEIDEN* В ЭКЗОНЕ 10 ГЕНА ФАКТОРА V ПРИ ТРОМБОФИЛИЯХ

© 1997 г. Е. С. Зыкова, Л. И. Патрушев[#], А. Л. Каюшин, М. Д. Коростелева,
А. И. Мирошников, И. Н. Бокарев*, С. Г. Леонтьев**, В. М. Кошкин**, Е. С. Северин*

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

*Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова;

**Российский государственный медицинский университет, Москва

Поступила в редакцию 14.06.96 г.

Разработаны новые аллель-специфические праймеры, которые позволяют с помощью ПЦР просто и эффективно обнаруживать мутацию *Leiden* в геноме человека. Один из праймеров (неаллель-специфический), комплементарный последовательности нуклеотидов значащей цепи интрона 10 ((5')ГТСТТТГААГГАААТГССССАТТА), был описан Б. Дальбеком (1994). Два других (аллель-специфических) ((5')ТААГАГСАГАТСССТГГАСАСА или (5')ТААГАГСАГАТСССТГГАСАСА) содержат 3'-концевой нуклеотид, соответствующий нуклеотиду мутантного аллеля, а также нуклеотид, не комплементарный матричной ДНК, вблизи 3'-конца (выделены жирным шрифтом). Оба аллель-специфических праймера в сочетании с неаллель-специфическим оказались одинаково эффективными при обнаружении мутации *Leiden* в гене фактора V человека. С их использованием обнаружены две мутации *Leiden* в гетерозиготном состоянии у 20 больных с глубокими тромбозами вен и легочными тромбоэмболиями.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, аллель, мутация, фактор V, тромбофилия.

Мутации в геномной ДНК являются непосредственной причиной генетических заболеваний человека и во многих случаях определяют предрасположенность его организма к конкретным патологическим состояниям [1]. Кроме того, полиморфные последовательности нуклеотидов геномной ДНК, в основе образования которых лежат все те же мутации, могут быть хорошими генетическими маркерами и находят широкое применение в современном генетическом анализе [2]. В этой связи проблема обнаружения мутаций с помощью простых и эффективных методов представляет большой практический интерес с точки зрения оценки генетического здоровья населения и имеет немалое фундаментальное значение для популяционной генетики.

С появлением метода полимеразной цепной реакции процедура анализа последовательностей нуклеотидов ДНК в конкретных генетических локусах существенно упростилась [3]. Для обнаружения новых мутаций в геномной ДНК в настоящее время успешно используют прямое секвенирование одно- и двухцепочечных продуктов ПЦР [4], их электрофоретический анализ в денатурирующих градиентных гелях [4], химические модификации

ошибочно спаренных нуклеотидов в гетеродуплексах продуктов ПЦР [5, 6] или электрофоретический анализ конформационного полиморфизма однопочечных продуктов ПЦР [7].

Для идентификации известных мутаций в геномной ДНК при проведении ДНК-диагностики генетических заболеваний или генетического анализа в популяциях чаще всего используют гибридизацию геномной ДНК с аллель-специфическими олигонуклеотидами [8], определение полиморфизма длин рестриктазных фрагментов ДНК [9], лигазную цепную реакцию [10], а также ПЦР с аллель-специфическими праймерами [11].

В аллель-специфической ПЦР, как правило, применяют один обычный олигонуклеотидный праймер, полностью комплементарный исследуемой матричной ДНК, и встречный праймер, у которого 3'-концевой нуклеотид комплементарен соответствующему нуклеотиду ДНК мутантного аллеля, но не аллеля дикого типа. При таком сочетании праймеров в хорошо подобранных условиях продукт ПЦР образуется лишь при наличии в реакционной смеси в качестве матрицы мутантной ДНК, но не ДНК дикого типа. Следовательно, образование продукта аллель-специфической

[#] Автор для переписки.

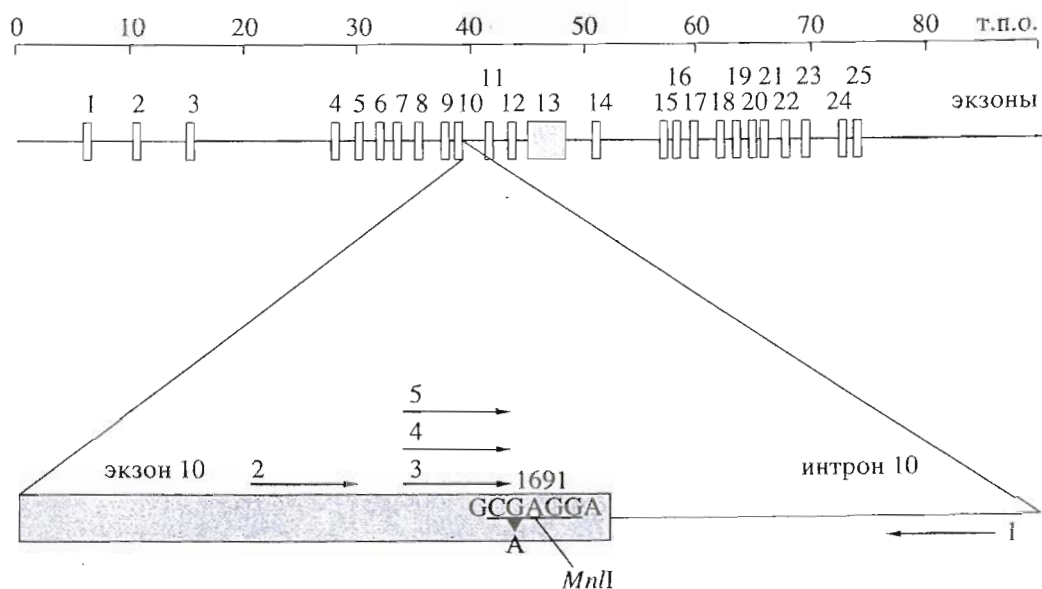


Рис. 1. Структура гена фактора V и положение праймеров, использованных в работе. Приведена интрон-экзонная структура гена фактора V. Вверху указаны размеры гена. Обозначены номера экзонов. Стрелками указано положение праймеров 1–5. Показана последовательность, включающая нуклеотид 1691, который изменяется под действием мутации *Leiden*, а также сайт для рестриктазы *MnlI*.

ПЦР указывает на наличие мутации в соответствующем локусе исследуемой ДНК.

Тромбофилии (группа патологических состояний организма человека, для которых характерна повышенная свертываемость крови, приводящая к развитию тромбозов и расстройству кровообращения в тканях) чаще всего являются следствием изменения определенных генов системы свертывания крови под действием мутаций. Эта группа заболеваний представляет серьезную медицинскую проблему, поскольку является причиной смерти 1 из 1000 людей во всем мире ежегодно [12]. Повышенной свертываемости крови в организме человека препятствует система антикоагуляции, основной компонент которой – активированный белок С (APC) [12]. Тромбин в комплексе с тромбомодулином, ассоциированный с клетками эндотелия, посредством протеолитического воздействия активирует белок С, который, в свою очередь, путем ограниченного протеолиза инактивирует связанные с мембранами белковые факторы V_a и $VIII_a$, необходимые для свертывания крови, что предотвращает процесс образования тромба. В качестве кофактора в этой реакции выступает белок S.

Фактор V человека кодируется большим геном, занимающим около 80 т. п. о. геномной ДНК, в котором имеется 25 экзонов длиной от 72 до 2820 п. о. (рис. 1) [13]. Ген кодирует полипептид-предшественник фактора V длиной 2224 а. о., содержащий лидерный пептид длиной 24 а. о. [14].

Недавно было установлено, что наследственная устойчивость факторов V_a и $VIII_a$ к APC – одна из

основных причин тромбофилий у человека. При этом у большого числа больных с синдромом устойчивости к APC была обнаружена единственная точечная мутация (замена G-1691 на A в экзоне 10 гена фактора V), приводящая к мутации $Arg^{506} \rightarrow Gln$ в полипептидной цепи фактора V_a [15, 16]. Эта мутация получила название *Leiden*, а мутантный фактор V – *FV Leiden*. В геномной ДНК больных, предварительно отобранных по признаку устойчивости к APC на основании данных биохимического анализа, эта мутация обнаруживалась в 50–90% случаев. Указанная мутация нарушает сайт для рестриктазы *MnlI*, которая теряет способность расщеплять мутантную ДНК в данном месте (рис. 1). В соответствии с этим до настоящего времени мутацию обнаруживали по устойчивости продукта ПЦР, образовавшегося в результате амплификации соответствующего участка экзона 10 гена фактора V, к рестриктазе *MnlI* [16, 17].

Для повышения эффективности диагностического метода при его клиническом применении нами была поставлена задача создания системы детекции данной мутации с использованием аллель-специфической ПЦР. Одновременно с помощью разрабатываемого метода проводилось исследование распространенности этой мутации среди больных тромбофилиями московской популяции. При этом имелось в виду, что разработка подобного метода в общем виде найдет применение и в фундаментальных исследованиях мутационного процесса. По основным результатам работы было сделано предварительное сообщение [18].

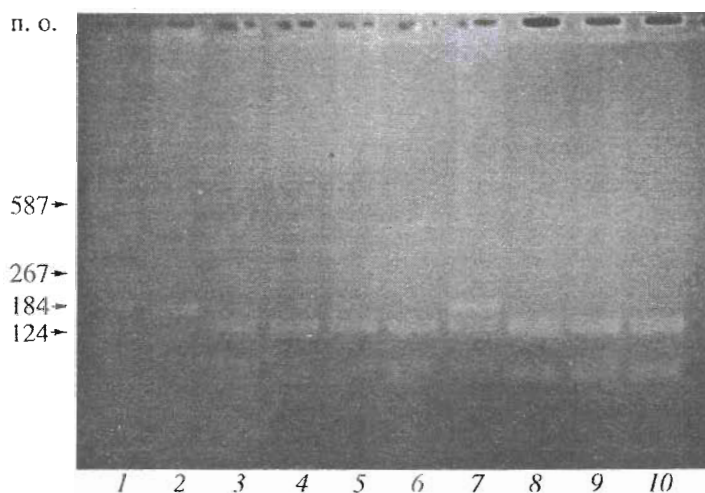


Рис. 2. Обнаружение мутации *Leiden* в геномной ДНК пациентов с использованием ПЦР и рестриктазы *MnlI*. Электрофорез продуктов ПЦР в 3% агарозном геле: 1 – молекулярные маркеры; 2 – продукт ПЦР без инкубации с рестриктазой *MnlI*; 3–10 – продукты ПЦР после инкубации с рестриктазой *MnlI*; 7 – ДНК содержит искомую мутацию в гетерозиготном состоянии. Обозначены длины олигонуклеотидов молекулярных маркеров.

На рис. 2 представлены результаты опытов по исследованию геномной ДНК больных с глубокими венозными тромбозами и легочными тромбоэмболиями на предмет наличия в них мутации *Leiden*. В этих опытах были использованы праймеры 1 и 2, разработанные Цоллером и Дальбеком [17] (см. рис. 1). Видно, что в присутствии праймеров 1 и 2 в результате ПЦР в соответствии с данными литературы происходит образование гомогенного продукта длиной приблизительно в 160 п. о. (рис. 2, 2). Обработка рестриктазой *MnlI* продуктов ПЦР, полученных после амплификации соответствующих участков ДНК ряда обследуемых больных с помощью тех же праймеров, в основном приводила к их расщеплению по сайту рестрикции, что сопровождалось увеличением электрофоретической подвижности образующихся в результате рестрикции более коротких олигонуклеотидов (рис. 2, 3–6, 8–10) и указывало на отсутствие у них искомой мутации. У одного больного в этом опыте было обнаружено изменение сайта рестрикции *MnlI* в экзоне 10 гена фактора V (рис. 2, 7), что с большой вероятностью свидетельствует о наличии в его геноме мутантного гена фактора V. Поскольку в этом случае происходит лишь частичное расщепление продукта ПЦР рестриктазой *MnlI* на фоне полного гидролиза продуктов ПЦР другого происхождения, можно сделать вывод о том, что исследуемый аллель присутствует в геноме этого больного в гетерозиготном состоянии.

При разработке аллель-специфической системы ПЦР, пригодной для обнаружения исследуемой мутации, в качестве одного из праймеров мы использовали так же, как и в предыдущем опыте, олигонуклеотид 1 ((5')ТСТСТГААГГААТГС-

СССАТТА), комплементарный последовательности значащей цепи интрона 10 гена фактора V, что можно видеть на рис. 1 [17]. В сочетании со встречным праймером 3 ((5')ТААГАГСАГАТСССТГ-САСАГГСА), у которого 3'-концевой нуклеотид соответствует измененному нуклеотиду мутантной ДНК, но не ДНК дикого типа, продукт ПЦР образовывался как в присутствии ДНК дикого типа, так и мутантной ДНК, исследованной в предыдущем опыте (рис. 3, 2 и 1 соответственно). Следовательно, простая одиночная замена нуклеотида на 3'-конце праймера, нарушающая его полную комплементарность с ДНК дикого типа, в этих условиях еще не обеспечивает достаточной специфичности системы. Аллель-специфический характер амплификации исследуемого участка генома с помощью этих праймеров удавалось усилить путем тщательного подбора температуры отжига праймеров, уменьшения концентрации матричной ДНК и использования минимального количества циклов амплификации. Однако на всех этапах оптимизации системы с этими праймерами различия в эффективности амплификации мутантного и нормального аллелей носили количественный характер (данные не представлены). Поэтому мы отказались от дальнейшего использования праймера 3 и продолжили разработку системы. При этом для усиления аллель-специфичности мы использовали известный подход с введением в аллель-специфические праймеры нескольких некомплементарных матрице нуклеотидов [19–21].

Были синтезированы два дополнительных аналога праймера 3 (праймеры 4 – (5')ТААГАГСАГАТСССТГГАСАГССА и 5 – (5')ТААГАГСАГАТСССТГГАСАГССА), у которых были заменены

Предполагаемый механизм действия аллель-специфических праймеров

Система праймер-матрица	Взаимодействие праймеров с ДНК	Образование продукта ПЦР*
I Мутантная ДНК Праймер 3	————— CGT^{1691} ————— GCA	+++
II ДНК дикого типа Праймер 3	$\text{————— CGT} \text{—————}$ ————— GC $\quad \quad \quad \diagdown$ $\quad \quad \quad \text{A}$	++
III Мутантная ДНК Праймер 4	$\text{————— CGC} \text{—————}$ ————— CA $\quad \quad \quad \diagdown$ $\quad \quad \quad \text{C}$	++
IV ДНК дикого типа Праймер 4	$\text{————— CGC} \text{—————}$ ————— CCA	—

* Крестами условно обозначено количество ПЦР-продукта, образующегося в одинаковых условиях в присутствии указанных праймеров.

Схема.

еще по одному нуклеотиду вблизи их 3'-концов (рис. 1, схема).

Производя такие модификации, мы надеялись, что введение дополнительного мутантного нуклеотида в большей степени ослабит взаимодействие 3'-конца праймеров с ДНК аллеля дикого типа, чем мутантного аллеля, и затруднит инициацию амплификации, поскольку в первом случае в гибриде будут присутствовать два ошибочно спаренных нуклеотидов, один из которых – 3'-концевой, тогда как во втором случае – только один, внутренний. При полной комплементарности в системе происходит максимальное образование продукта ПЦР (схема, система I). Несмотря на то что 3'-концевой нуклеотид праймера 3 некомпле-

ментарен соответствующему нуклеотиду ДНК дикого типа, в системе образуется значительное количество продукта ПЦР (схема, система II). Введение в праймер 4 второго некомплементарного ДНК дикого типа нуклеотида оказывает незначительное влияние на эффективность ПЦР на матрице мутантной ДНК, но полностью прекращает синтез продукта на матрице ДНК дикого типа (схема, системы III и IV). В соответствии с ожиданиями оба праймера (4 и 5) проявили высокую аллель-специфичность в опытах по детекции исследуемой мутации (рис. 3, 3, 4 и 5, 6). Подавление амплификации в присутствии ДНК дикого типа в этом случае не было артефактом, поскольку продукт ПЦР на матрице ДНК дикого типа эффективно

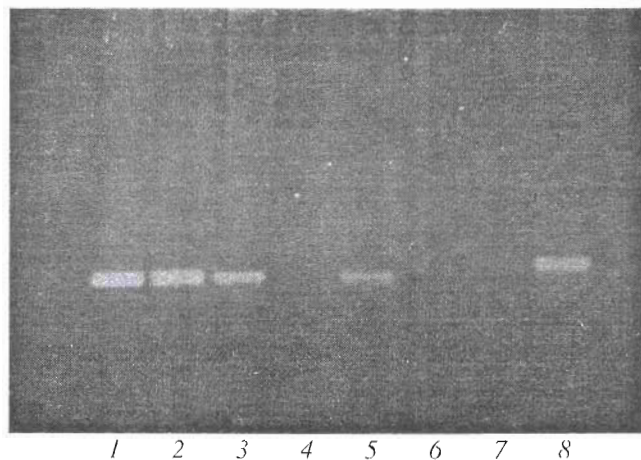


Рис. 3. Обнаружение мутации *Leiden* с использованием аллель-специфической ПЦР. Электрофорез продуктов ПЦР в 3% агарозном геле. В пробы 2, 4, 6 и 8 добавляли ДНК дикого типа, в пробы 1, 3 и 5 – ДНК, содержащую мутацию *Leiden* (см. рис. 2). Проба 7 не содержала ДНК. Во всех пробах присутствовал праймер 1 (рис. 1). В качестве встречного праймера использовали: праймер 3 (дорожки 1 и 2), 4 (3 и 4), 5 (5 и 6) или 2 (8).

образовывался в системе с праймерами 1 и 2 (рис. 3, 8), а также в присутствии праймеров 3 и 2 (рис. 3, 3). На основании этих данных был сделан вывод о пригодности данной аллель-специфической системы для обнаружения исследуемой мутации в геноме больных тромбофилиями.

Используя систему с рестриктазой *MnII*, а также описанные выше аллель-специфические праймеры, мы исследовали ДНК 20 больных с глубокими тромбозами вен и легочными тромбоземболиями на наличие у них мутации *Leiden*. При этом больные предварительно не отбирались по биохимическому признаку устойчивости фактора V_a к APC, а попадали в группу обследуемых только на основании внешних симптомов заболевания. В ходе этих исследований были обнаружены две искомые мутации, причем оба использованных метода оказались одинаково эффективными в скрининге мутаций (данные не представлены).

Хотя оба использованных при скрининге мутации *Leiden* метода одинаково эффективны, метод с аллель-специфическими праймерами обладает существенными преимуществами: он требует меньше времени и результаты опытов легче интерпретируются. Это связано прежде всего с тем, что при проведении рестриктазного расщепления продукта ПЦР часто наблюдаются артефакты в виде неполного гидролиза олигонуклеотидов, которые могут быть неправильно интерпретированы в пользу наличия мутации. Кроме того, метод, основанный на использовании аллель-специфических праймеров, более универсален и может быть применен к любому генетическому локусу, тогда как подходящих сайтов рестрикции может не оказаться в окрестностях исследуемых участков ДНК. Однако этот метод требует введения внутреннего контроля для исключения ложноотрицательных результатов, связанных с некачественными препаратами матричной ДНК или другими нарушениями функционирования системы ПЦР. В качестве такого внутреннего контроля мы предполагаем использовать и уже испытали праймеры, соответствующие локусам микросателлитной ДНК человека (данные не представлены).

Недавно в работе Киришбаум и Фостера [22] была описана другая система аллель-специфических праймеров, которую использовали для идентификации мутации *Leiden*. В этой работе авторы в отличие от нас в качестве аллель-специфических применили антисмысловые праймеры, комплементарные последовательностям нуклеотидов 5'-концевой части интрона 10 и 3'-концевой части экзона 10, включая мутантный нуклеотид. При этом аллель-специфичность достигалась только за счет 3'-концевых нуклеотидов праймеров, как это было в случае нашего праймера 3. Как уже упоминалось выше, применение таких праймеров требует очень тонкого подбора условий

ПЦР, и, как правило, различия в амплификации аллелей носят количественный характер. Все эти неудобства отсутствуют при использовании аллель-специфических праймеров с двойными заменами нуклеотидов, предложенных нами. Мы надеемся, что принцип множественных замен нуклеотидов окажется эффективным при конструировании других аллель-специфических праймеров, пригодных для поиска и идентификации новых мутаций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение клинического материала. Образцы периферической крови больных с диагнозом "тромбоз глубоких вен бедра" или "легочная тромбоземболия" помещали в пластиковые пробирки, содержащие цитрат Na. Образцы замораживали и хранили при -20°C .

ДНК из периферической крови выделяли по методу [23] с незначительными модификациями: 1.5 мл периферической крови смешивали для лизиса клеток с 3 мл холодного 1 М трис-HCl, pH 7.5, содержащего 320 мМ сахарозу, 1% Тритон X-100, 5 мМ MgCl₂. Интактные ядра осаждали на центрифуге J-21 (Beckman) в течение 7 мин при 6000 об/мин и 2°C. Ядра разрушали, суспендируя осадок в 210 мкл 240 мМ Na-фосфатного буфера, pH 6.8, содержащего 8 М мочевины, 1% SDS и 1 мМ EDTA, в течение 15 мин при комнатной температуре. ДНК экстрагировали стандартным фенольным методом, осаждали этанолом, растворяли в 10 мМ буфере трис-HCl, pH 8.0, содержащем 1 мМ EDTA, и диализовали против 10 объемов того же буфера при 4°C. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически при 260 нм.

Олигонуклеотиды синтезировали традиционным фосфоамидитным методом на синтезаторе ASM-102U (Новосибирск).

Полимеразная цепная реакция. Термостабильную *Taq*-полимеразу выделяли из рекомбинантного штамма *E. coli* PVG-A1 по описанной ранее методике с незначительными модификациями [24]. Реакционная смесь (25 мкл) содержала 67 мМ трис-HCl (pH 8.8), 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% Твин-20, 1.5 мМ MgCl₂, четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата (0.2 мМ каждый), 100 нг геномной ДНК человека, по 10 пмоль каждого из праймеров, 1–2 ед. акт. *Taq*-полимеразы. На пробы наслаивали по 25 мкл минерального масла (Sigma). ПЦР проводили в течение 35 циклов: при 94, 56, 72°C, по 30 с каждый.

Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 3% агарозном геле с использованием стандартного трис-ацетатного буфера [25]. Анализ продуктов ПЦР с помощью рестриктазы *MnII* ("Ферментас", Вильнюс) проводили с использованием реагентов фирмы в реакционной смеси 50 мкл,

содержащей 5 мкл 10-кратного G-буфера (0.33 М трис-ацетат (pH 7.9), 0.1 М Mg-ацетат, 0.66 М K-ацетат), 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, в которую вносили 10–20 мкл неочищенного продукта ПЦР из ПЦР-пробы. Пробы инкубировали 1.5 ч при 37°C и анализировали электрофорезом в 3% агарозном геле. В качестве молекулярного маркера использовали плазмиду pBR322, расщепленную рестриктазой HaeIII.

Авторы благодарны М.В. Громадскому за помощь при постановке первых экспериментов и обсуждение результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McKusick V.A. // *FASEB J.* 1991. V. 5. P. 12–20.
2. Prades C., Laurent A.M., Yurov Y., Puechberty J., Roizes G. // *Cytogenet. Cell Genet.* 1996. V. 72. P. 69–71.
3. Shikata H., Utsumi N., Kuivaniemi H., Tromp G. // *J. Lab. Clin. Med.* 1995. V. 125. P. 421–432.
4. Grompe M. // *Nature Genet.* 1993. V. 5. P. 111–117.
5. Cotton R.G., Rodrigues N.R., Campbell R.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. P. 4397–4401.
6. Ganguly A., Prockop D.J. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 3933–3939.
7. Oto M., Miyake S., Yuasa Y. // *Anal. Biochem.* 1993. V. 213. P. 19–22.
8. Studencki A.B., Wallace R.B. // *DNA.* 1984. V. 3. P. 7–15.
9. Hubner G., Battmer K., Link H. // *Leuk. Lymphoma.* 1995. V. 17. P. 27–33.
10. Barany F. // *PCR Methods Appl.* 1991. V. 1. P. 5–16.
11. Gibbs R.A., Nguyen P.N., Caskey C.T. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. P. 2437–2448.
12. Dahlback B. // *J. Clin. Invest.* 1994. V. 94. P. 923–927.
13. Cripe C.D., Moore K.D., Kane W.H. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 3777–3785.
14. Jenny R.J., Pittman D.D., Tool J.J., Kriz R.W., Aldape R.A., Hewick R.M., Kaufman R.J., Mann K.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. V. 84. P. 4846–4850.
15. Bertina R.M., Koeleman B.P.C., Koster T., Rosendaal F.R., Dirven R.J., de Ronde H., van der Velden P.A., Reijnsma P.H. // *Nature.* 1994. V. 369. P. 64–67.
16. Zoller B., Svensson P.J., He X., Dahlback B. // *J. Clin. Invest.* 1994. V. 94. P. 2521–2524.
17. Zoller B., Dahlback B. // *Lancet.* 1994. V. 343. P. 1536–1538.
18. Патрушев Л.И., Громадский М.В., Зыкова Е.С., Леонтьев С.Г., Бокарев И.Н., Миршников А.И., Кошкин В.М., Северин Е.С. // Патология гемокоагуляции. Ч. IV. М.: Изд. Всерос. ассоц. по изуч. тромбозов, 1995. С. 122–123.
19. Newton C.R., Graham A., Heptinstall S.J., Powell S.J., Summers C., Kalsheker N., Smith J.C., Markham A.F. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. P. 2503–2516.
20. Kwok S., Kellog D.E., McKinney N., Spasic D., Goda L., Levenson C., Sninsky J.J. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 999–1005.
21. Cha R.S., Zarbl H., Keohavong P., Thilly W.G. // *PCR Methods Appl.* 1992. V. 2. P. 14–20.
22. Kirschbaum N.E., Foster P.A. // *Thromb. Haemostasis.* 1995. V. 74. P. 874–878.
23. Lindblom B., Holmlund G. // *Gene Anal. Techn.* 1988. V. 5. P. 97–101.
24. Патрушев Л.И., Валяев А.Г., Головченко П.А., Виноградов С.В., Чикиндас М.Л., Киселев В.И. // Молекуляр. биология. 1993. Т. 27. С. 1100–1112.
25. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.

New Allele-Specific Primers for Detecting the *Leiden* Mutation in Exon 10 of the Factor V Gene in Thrombophilia

E. S. Zykova*, L. I. Patrushev*, A. L. Kayushin*, M. D. Korosteleva*, A. I. Miroshnikov*, I. N. Bokarev**, S. G. Leont'ev***, V. M. Koshkin***, and E. S. Severin**

* *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

** *Sechenov Medical Academy, Moscow, Russia*

*** *Russian State Medical University, Moscow, Russia*

Abstract—New allele-specific primers were developed which enable the facile and effective identification of the *Leiden* mutation in the human genome using PCR. One of the primers (allele-nonspecific), which is complementary to the nucleotide sequence of the intron 10 sense strand, [(5')TCTCTTGAAGGAAA TGCCCAAT-TA], was described by B. Dahlback in 1994. Two other primers (allele-specific), (5')TAAGAGCAGATC-CCTGGACAGCCA and (5')TAAGAGCAGATCCCTGGACA GCA), contained a 3'-terminal nucleotide corresponding to the nucleotide of the mutant allele, as well as a nucleotide noncomplementary to the template DNA near the 3'-end (shown by boldface type). When used in combination with allele-nonspecific primers, both allele-specific primers were equally effective in detecting the *Leiden* mutation in the human factor V gene. Using these primers, two *Leiden* mutations in the heterozygous state were found in 20 patients with deep vein thromboses and pulmonary thromboembolia.

Key words: polymerase chain reaction, allele, mutation, factor V, thrombophilia.