



УДК 577.217

## НОВАЯ СИСТЕМА ДНК-ДИАГНОСТИКИ, ПОЗВОЛЯЮЩАЯ ОБНАРУЖИВАТЬ И ИДЕНТИФИЦИРОВАТЬ ГОМОЗИГОТНЫЕ И ГЕТЕРОЗИГОТНЫЕ ТОЧКОВЫЕ МУТАЦИИ

© 1998 г. Л. И. Патрушев<sup>#</sup>, Е. С. Зыкова\*, А. Л. Каюшин,  
М. Д. Коростелева, А. И. Мирошников

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

Поступила в редакцию 19.08.97 г. Принята к печати 05.11.97 г.

Разработана простая и эффективная тест-система на основе ПЦР, позволяющая обнаруживать и идентифицировать гомозиготные и гетерозиготные точковые мутации. В системе применены два набора аллель-специфических праймеров. В одном из них 3'-концевые нуклеотиды праймеров комплементарны нуклеотидам исследуемых аллелей и праймеры эффективно функционируют лишь при наличии в исследуемой ДНК соответствующих аллелей. Для увеличения специфичности праймеров в них введены дополнительные некомплементарные матрицы нуклеотиды вблизи 3'-концов. В другом наборе праймеры постоянно содержат некомплементарный матрицу 3'-концевой нуклеотид, а мутантные нуклеотиды исследуемых аллелей образуют некомплементарные пары с нуклеотидами внутренних частей праймеров. В таком сочетании функциональная активность праймеров резко снижена при наличии в исследуемой ДНК мутации в гомозиготном состоянии. Разработанная тест-система использована для обнаружения мутации *Leiden* в гене фактора V системы свертывания крови человека у больных тромбофилиями.

*Ключевые слова:* полимеразная цепная реакция; ПЦР; ДНК-диагностика; гомозиготная мутация; гетерозиготная мутация; мутация *Leiden*; аллель; фактор V; тромбофилия.

Точковые мутации – это наследуемые изменения первичной структуры генома на уровне отдельных составляющих его нуклеотидов. Фенотипические проявления точковых мутаций могут быть весьма разнообразными. Наиболее значительны из них с практической точки зрения различные патологические состояния организма человека, животных и растений [1]. В том случае, если точковая мутация возникает в геноме клеток зародышевой линии, все клетки развившегося из них организма-потомка будут содержать эту мутацию, которая в данном случае может быть причиной наследственного заболевания. Даже гетерозиготное состояние доминантной мутации сопровождается формированием мутантного фенотипа. В отличие от этого рецессивные мутации проявляются фенотипически лишь в гомозиготном состоянии. В связи с наследственными заболеваниями человека гетерозиготное состояние рецессивных мутаций рассматривается как носительство, и их присутствие в геноме является серьезным фактором риска в отношении развития соответствующего заболевания. Для организмов-

носителей характерна высокая вероятность возникновения мутантного фенотипа вследствие независимого появления аналогичной мутации в гомологичных хромосомах соматических клеток в онтогенезе или в результате участия в акте размножения двух мутантных особей, геном которых содержит одинаковые рецессивные мутации.

С учетом сказанного особую важность приобретает разработка эффективных методов молекулярной диагностики точковых мутаций, ассоциированных с наследственными или приобретенными заболеваниями, которые бы позволяли дифференцировать гомозиготное и гетерозиготное состояние этих мутаций. Для обнаружения точковых мутаций в настоящее время чаще всего используют прямое секвенирование продуктов полимеразной цепной реакции или клонированных фрагментов ДНК, определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ДНК (часто с использованием ПЦР), гибридизацию с аллель-специфическими зондами, исследование конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК, образующихся в результате ПЦР, аллель-специфическую ПЦР, а также ряд других методов [2, 3].

<sup>#</sup> Автор для переписки.

Первичная структура праймеров (1)–(7), использованных в работе, и их соответствие нуклеотидам исследуемого локуса гена фактора V человека

Праймер	Структура 5' → 3'	Соответствующий участок гена
(1)	GGAACAACACCATGATCAGAGCA	1490–1512
(2)	TAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCA*	1668–1691
(3)	TCTCTTGAAGGAAATGCCCCATTA	Интрон 10
(4)	ACAAAATACCTGTATTCCTTGCCTG	1710–1686
(5)	GGGCTAATAGGACTACTTCTAATC	1641–1665
(6)	TAAGAGCAGATCCCTGGACAGCCA	1668–1691
(7)	TAAGAGCAGATCCCTGGACAGCCG	1668–1691

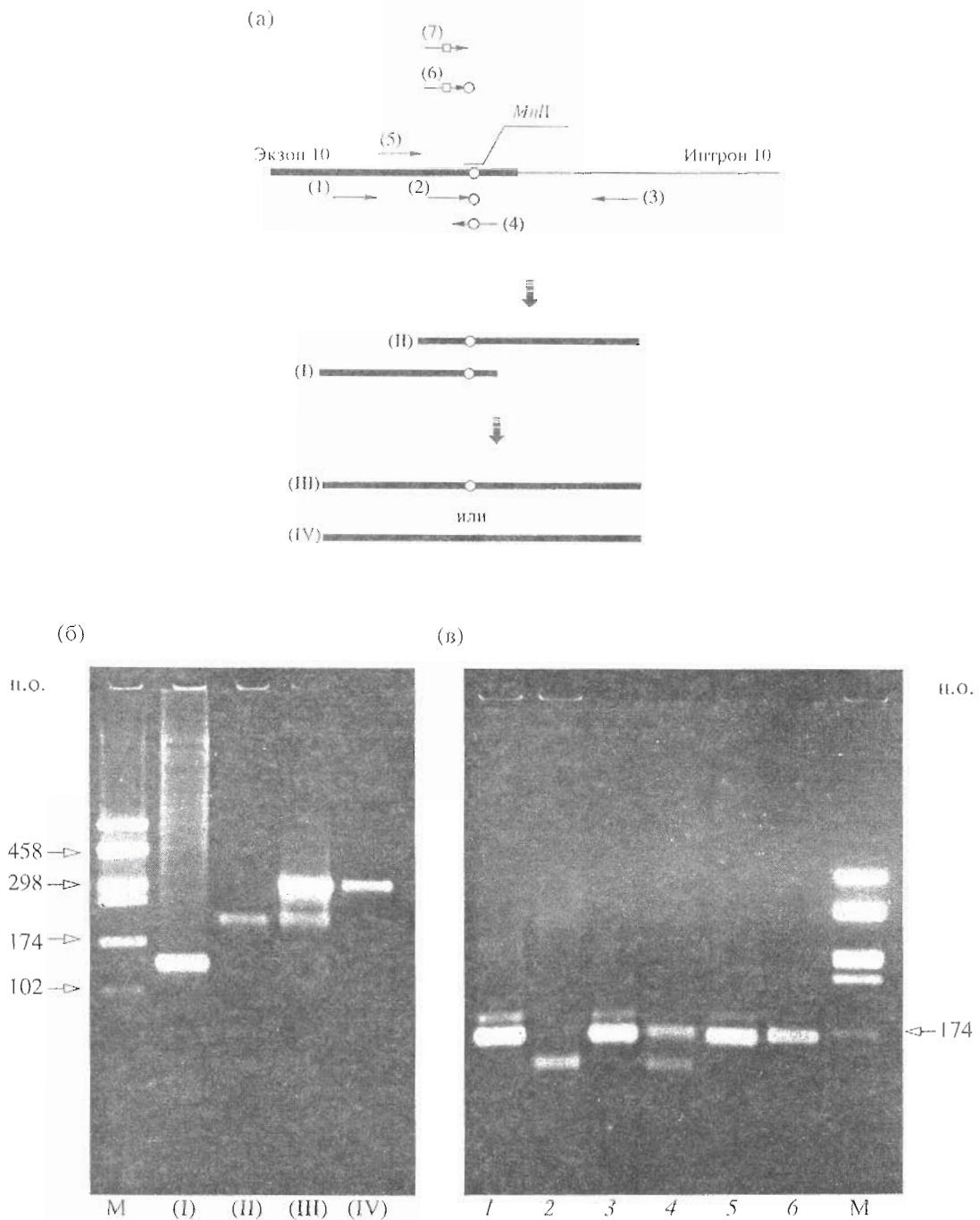
\* Жирным шрифтом обозначены нуклеотиды, критические для функционирования праймеров, среди которых нуклеотиды А и Т соответствуют мутации *Leiden*, С – нуклеотид, некомплементарный любой из использованных матричных ДНК.

Для определения точковых мутаций с помощью ПЦР ранее нами были разработаны модифицированные аллель-специфические праймеры, содержащие нуклеотиды, некомплементарные соответствующим нуклеотидам исследуемых ДНК [4, 5]. Такой подход позволил значительно повысить эффективность аллель-специфической ПЦР в обнаружении точковой мутации *Leiden* в экзоне 10 гена фактора V человека, ассоциированной с синдромом повышенной свертываемости крови (тромбофилиями) [6–8]. Поскольку тромбофилии представляют собой серьезную медицинскую проблему и являются причиной смерти одного из тысячи человек ежегодно [9], мы использовали этот подход для создания высокоэффективной диагностической тест-системы, позволяющей легко обнаруживать и дифференцировать гомозиготные и гетерозиготные мутации *Leiden*. Новые принципы, лежащие в основе функционирования этой системы, могут быть использованы для обнаружения любых известных гомозиготных и гетерозиготных точковых мутаций, а также неизвестных мутаций в гомозиготном состоянии.

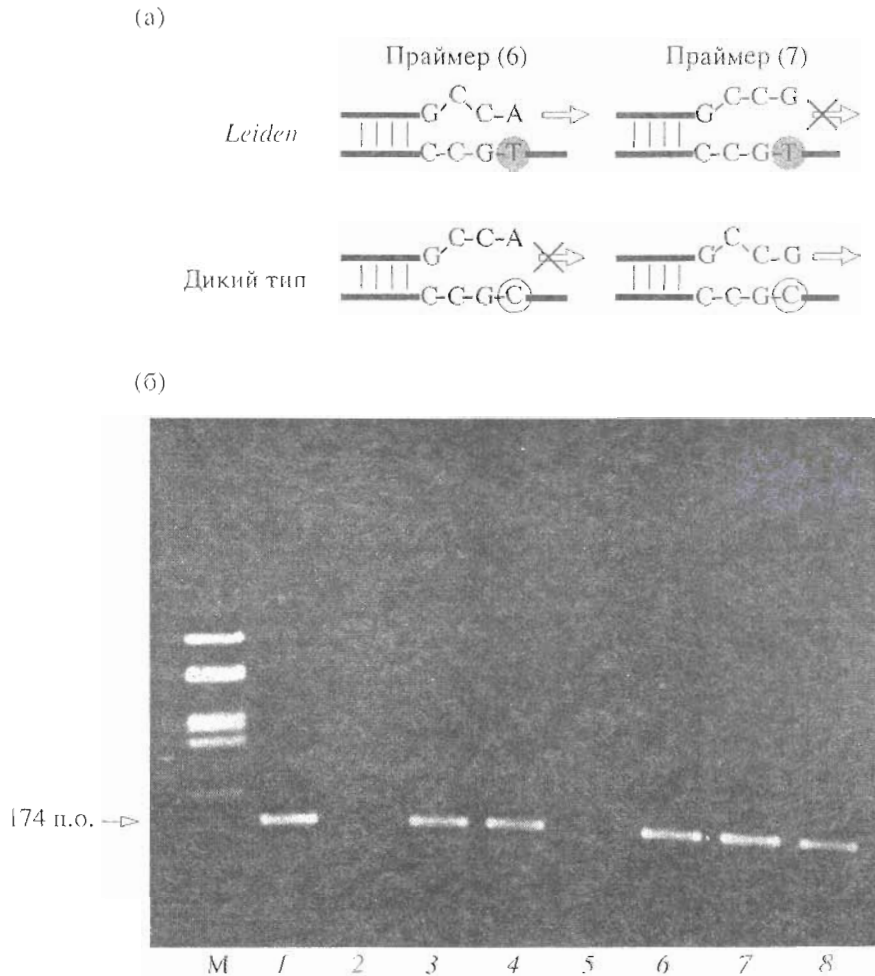
В исследованиях, проведенных ранее [4, 5], нам не удалось обнаружить мутацию *Leiden* в гомозиготном состоянии у больных тромбофилиями, хотя такие мутации описаны в литературе. Поэтому при разработке полноценной системы диагностики этой мутации мы использовали искусственную матричную ДНК, синтезированную с помощью ПЦР в присутствии перекрывающихся праймеров, которые содержали необходимую мутацию [10]. Синтез матричных ДНК проводили в две стадии (рис. 1). На первом этапе в ПЦР использовали найденную нами ранее ДНК больного, несущего мутацию *Leiden* в гетерозиготном состоянии. В принципе того же самого результата можно добиться и при использовании ДНК человека, не несущего данной мутации, поскольку мутантный нуклеотид вводится в продукт ПЦР в составе перекрывающихся частей праймеров (2) и

(4) (таблица) независимо от матрицы. На этой ДНК с помощью пар праймеров (1), (4) и (2), (3) синтезировали фрагменты (I) и (II) соответственно (таблица, рис. 1а). Далее фрагменты ДНК (I) и (II), которые содержали в своих перекрывающихся частях требуемую мутацию (рис. 1б, дорожки (I) и (II) соответственно), использовали в качестве матрицы для синтеза в присутствии праймеров (1) и (3) фрагмента (III), содержащего мутацию *Leiden* в своей внутренней части. По окончании ПЦР в пробе доминировал фрагмент (III) (рис. 1б, дорожка (III)), по размеру совпадающий с фрагментом (IV), полученным в присутствии праймеров (1) и (3) на матрице ДНК человека, не содержащей мутации *Leiden* (рис. 1б, дорожка (IV)). Эти идентичные по размерам фрагменты ДНК, содержащие или не содержащие мутацию, после электрофоретической очистки на DEAE-мембране были использованы в качестве матриц в дальнейшей работе. При этом гетерозиготное состояние мутации имитировалось путем смешивания полноразмерных фрагментов (III) и (IV) в эквимолярном отношении.

Наличие мутации в синтезированном фрагменте ДНК определяли, анализируя первичную структуру продукта амплификации, образующегося в присутствии праймеров (3) и (5) по методу Бертины с соавт. [6] (рис. 1в). Мутация *Leiden* нарушает участок расщепления рестриктазой *MnII*, поэтому фрагменты ДНК, содержащие мутацию, становятся устойчивыми к действию этого фермента. Действительно, при использовании в ПЦР в качестве матрицы синтезированного нами искусственного фрагмента ДНК, не содержащего мутации (фрагмент (IV)), образующийся продукт ПЦР полностью расщеплялся рестриктазой *MnII* (рис. 1в, дорожка 2); он расщеплялся лишь частично, если мутация *Leiden* присутствовала в искусственной матрице в “гетерозиготном” состоянии (рис. 1в, дорожка 4), и не расщеплялся вообще при наличии гомозиготной мутации *Leiden* (рис. 1в, дорожка 6). Подтвердив таким образом



**Рис. 1.** Синтез искусственной матричной ДНК, содержащей мутацию *Leiden*, и анализ образовавшихся продуктов. (а) – схема синтеза: вверху изображена часть гена фактора V человека, содержащего мутацию *Leiden* (обозначена светлой точкой во всех последовательностях); светлый квадрат в праймерах (6) и (7) обозначает некомплементарный матрице нуклеотид; горизонтальными стрелками показано положение праймеров, использованных для синтеза, сплошными линиями внизу – два промежуточных продукта ПЦР (I) и (II), образующихся в присутствии праймеров (1), (4) и (2), (3) (таблица) соответственно, на матрице которых синтезируется конечный фрагмент (III) в присутствии праймеров (1) и (3). Фрагмент (IV) синтезировали в присутствии праймеров (1) и (3) на ДНК человека, не содержащей мутации. (б) – электрофоретический анализ неочищенных промежуточных и конечного продуктов синтеза искусственной матрицы: М – молекулярные маркеры; цифры под дорожками соответствуют анализируемым фрагментам ДНК. (в) – доказательство наличия мутации *Leiden* в искусственных матрицах. Электрофоретический анализ в 3% агарозном геле продуктов ПЦР, полученных в присутствии праймеров (3) и (5) с использованием в качестве матриц фрагмента (IV) (дикий тип), смеси фрагментов (III) и (IV) (модель гетерозиготного состояния мутации) и фрагмента (III) (гомозиготное состояние) до (соответственно дорожки 1, 3 и 5) и после обработки рестриктазой *MnlI* (соответственно дорожки 2, 4 и 6). М – молекулярные маркеры.



**Рис. 2.** Предполагаемый механизм действия аллель-специфических праймеров и их функционирование в присутствии различных матричных ДНК. (а) – последовательности нуклеотидов 3'-концевых частей аллель-специфических праймеров, а также участка ДНК, непосредственно примыкающего к нуклеотиду (обведен кружком), изменяющемуся при мутации *Leiden*. Элонгация праймеров или ее ингибирование показаны стрелками, неперечеркнутыми или перечеркнутыми соответственно. (б) – электрофорез продуктов ПЦР, полученных в присутствии праймеров (6) (дорожки 1–4) или (7) (дорожки 5–8) и встречного праймера (3) на искусственных матричных ДНК, содержащих гомозиготную (дорожки 1, 5, 6) или “гетерозиготную” (дорожки 4, 8) мутацию, а также без мутации (дорожки 2, 3, 7). Условия проведения ПЦР: 19 циклов по 30 с, денатурация – 94°C, отжиг – 58°C, элонгация – 72°C. В контрольных пробах (дорожки 3 и 6) было проведено 30 циклов ПЦР. М – молекулярные маркеры.

полноценность искусственных матриц в отношении анализируемой мутации, мы перешли к разработке системы ДНК-диагностики мутации *Leiden* с использованием аллель-специфических праймеров.

Оба использованных для этой цели аллель-специфических праймера (6) и (7) (таблица, рис. 1а, 2а) содержали один и тот же третий от 3'-конца цитидин, некомплемментарный матричной ДНК, а также 3'-концевые аденозин или гуанозин, комплементарные соответствующим нуклеотидам мутантного аллеля или аллеля дикого типа. Высокая эффективность разработанного нами и описанного ранее [4, 5] аллель-специфического праймера (6) была подтверждена и при использовании искусственной ДНК в качестве матрицы

(рис. 2б, дорожки 1–4). Как и ожидалось, этот праймер функционировал эффективно на матрицах, содержащих гомозиготные и гетерозиготные мутации *Leiden* (рис. 2б, дорожки 1 и 4), и был мало эффективен в присутствии ДНК дикого типа (рис. 2б, дорожка 2). В последнем случае увеличение числа циклов ПЦР приводило к образованию продукта, видимого на электрофореграмме (рис. 2б, дорожка 3). Это указывает на то, что элонгация аллель-специфического праймера (6) в присутствии ДНК дикого типа ингибируется, но не подавляется полностью и образование продукта ПЦР при увеличении числа циклов может служить одним из контролей на эффективность функционирования всех компонентов системы ПЦР для исключения ложноотрицательных

результатов. Этот же эффект свидетельствует о необходимости оптимизации обсуждаемой тест-системы в отношении числа циклов ПЦР при ее использовании в новых условиях.

Праймер (7), 3'-концевой нуклеотид которого комплементарен соответствующему нуклеотиду аллеля дикого типа, функционирующий по тому же самому принципу (рис. 2а), эффективно элонгировался *Taq*-полимеразой в присутствии ДНК дикого типа и ДНК, содержащей "гетерозиготную" мутацию *Leiden* (рис. 2б, дорожки 7 и 8 соответственно). Эффективность элонгации этого праймера была резко снижена при наличии в матричной ДНК гомозиготной мутации *Leiden* (рис. 2б, дорожка 5). Так же как и в предыдущем случае, увеличение числа циклов ПЦР в этой пробе приводило к появлению видимого на электрофореграмме продукта ПЦР (рис. 2б, дорожка 6). Таким образом, аллель-специфический праймер (6) эффективно функционирует при наличии в матричной ДНК мутации *Leiden* в гомозиготном или гетерозиготном состоянии, тогда как праймер (7) мало эффективен в присутствии гомозиготной мутации. Это позволяет легко дифференцировать гомозиготное и гетерозиготное состояние точечной мутации в исследуемой ДНК.

Те же результаты были получены и с помощью разработанных нами универсальных праймеров, у которых 3'-концевые нуклеотиды всегда некомплементарны матричной ДНК, а нуклеотид мутантного аллеля образует некомплементарную пару с нуклеотидами внутренних частей праймеров (рис. 3а). Оказалось, что смещение положения универсальных праймеров на 2 (праймеры (8)–(10)), 3 (праймер (13)), 5 (праймер (11)), 8 (праймер (14)) и 10 (праймер (12)) нуклеотидов относительно мутантного нуклеотида матрицы существенно не сказывается на эффективности их работы (рис. 3б, в). Во всех этих случаях они эффективно элонгировались *Taq*-полимеразой на матричной ДНК "дикого типа" (рис. 3б, в, дорожки (8)–... (12)–, а также (13)–... (16)– соответственно) и значительно менее эффективно на "гомозиготной" мутантной ДНК (соответственно дорожки (8)+ ... (12)+ (рис. 3б) и (13)+, (14)+ (рис. 3в)). Различие уровня ингибирования элонгации некоторых праймеров (например, (8) или (12), рис. 3б) связано с неоптимальной температурой отжига. В данном опыте он проводился при одной и той же температуре (64°C), хотя GC-состав праймеров различен. Интересно, что сдвиг праймера (15) даже на 15 нуклеотидов относительно мутантного нуклеотида матрицы при его общей длине в 24 нт еще обеспечивает заметный функциональный эффект (рис. 3в, дорожки (15)–, (15)+).

Таким образом, универсальные праймеры перестают эффективно функционировать при об-

разовании любой некомплементарной пары внутри гибрида праймер · матрица и они пригодны для обнаружения неизвестных точечных мутаций в гомозиготном состоянии, а также у гаплоидных организмов (вирусы, бактерии, дрожжи и т.п.). Так же как и в опытах с аллель-специфическими праймерами, одним из контролей на эффективность работы системы в случае универсальных праймеров может служить увеличение количества циклов ПЦР сверх оптимального. Большинство описанных праймеров были испытаны нами на ДНК человека, содержащих мутацию *Leiden* в гетерозиготном состоянии, а также на немутантных ДНК и продемонстрировали те же самые свойства, что и в присутствии соответствующих искусственных матриц (данные не представлены).

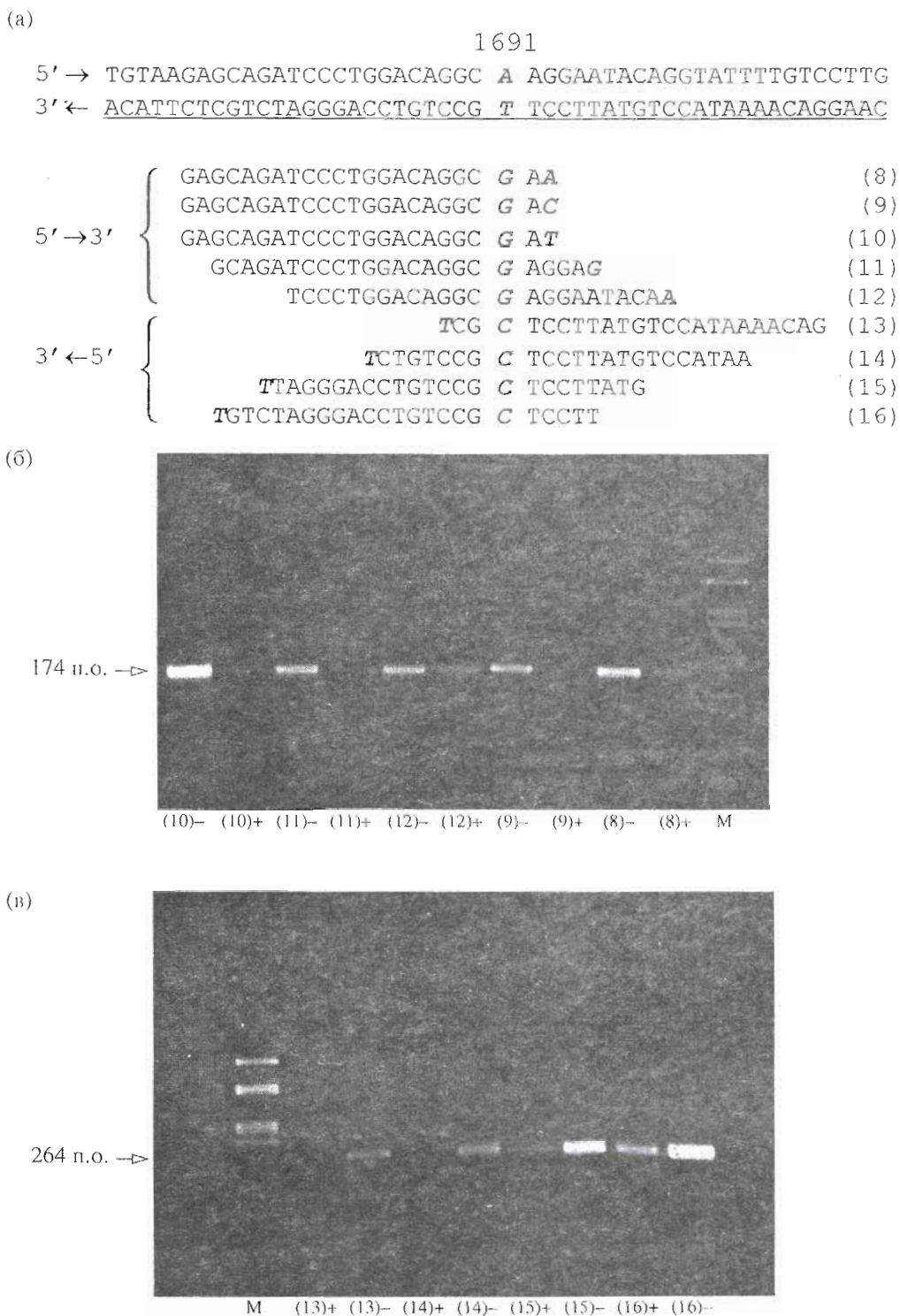
Киршбаум и Фостер впервые применили аллель-специфические праймеры для обнаружения мутации *Leiden* у больных тромбофилиями [11]. В своих опытах они использовали классический вариант праймеров, у которых 3'-концевой нуклеотид был комплементарен нуклеотидам соответствующих аллелей. Как мы уже показывали ранее, тест-система на этой основе работает нестабильно и требует очень тщательного подбора условий ПЦР. Предложенный нами подход с введением в аллель-специфические праймеры дополнительных некомплементарных матрице нуклеотидов для определения лейденской мутации резко повышает специфичность действия системы. Эти результаты недавно нашли подтверждение у Левандовского и др. [12], которые применили принцип множественных замен в аллель-специфических праймерах для обнаружения и дифференциации гомозиготных и гетерозиготных мутаций *Leiden*. Разработанные нами два набора аллель-специфических и универсальных праймеров расширяют возможности ДНК-диагностических тест-систем на их основе. Предложенный подход позволяет создавать новые универсальные тест-системы для обнаружения известных гомозиготных и гетерозиготных мутаций в сложных геномах, а также неизвестных мутаций в гомозиготном состоянии или у гаплоидных организмов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЧАСТЬ

**Получение клинического материала и выделение ДНК из периферической крови** осуществляли по описанным ранее методикам [5].

**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 небольшими модификациями [13]. Реакционная смесь (25 мкл) содержала 67 мМ



**Рис. 3.** Функционирование универсальных праймеров при идентификации мутации *Leiden* на различных матричных ДНК. (а) – структура универсальных праймеров. Вверху изображена первичная структура обеих цепей ДНК части экзона 10 гена фактора V человека, содержащей мутацию *Leiden* в положении 1691, ниже – последовательности нуклеотидов праймеров (8)–(16). Отражено их положение относительно нуклеотида 1691. В структуре праймеров жирным шрифтом выделены некомплементарные матрице нуклеотиды. (б, в) – электрофоретическое разделение продуктов ПЦР, образующихся на искусственных ДНК, не содержащих (–) или содержащих (+) гомозиготную мутацию, в присутствии праймеров (8)–(16); числа под дорожками соответствуют номерам праймеров. М – молекулярные маркеры. Условия ПЦР: по 30 с денатурация при 94°C, отжиг при 64 (б) или 60°C (в), элонгация при 72°C в ходе 21 (праймеры (8), (10) и (11) – (б)), 22 ((14)–(16) – (в)) или 24 циклов (праймеры (9)–(12) – (б), (13) – (в)). В качестве встречных использовали праймеры (3) (б) или (1) (в) (рис. 1а).

трис-НСI (рН 8.8), 16.6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% твин-20, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 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 на-слаивали по 25 мкл минерального масла (Sigma). Остальные условия проведения ПЦР указаны при описании соответствующих опытов. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 3% агарозном геле с применением стандартного трис-ацетатного буфера [14]. В качестве молекулярных маркеров использовали фрагменты ДНК, образующиеся при расщеплении плазмиды рGEM рестриктазой *Hae*III.

**Синтез фрагментов ДНК, содержащих мутацию *Leiden***, осуществляли в две стадии с использованием ПЦР в присутствии перекрывающихся праймеров [10]. Условия ПЦР при синтезе фрагментов (I) и (II) (рис. 1а): 35 циклов по 30 с при 94, 56, 72°C. Образовавшиеся фрагменты, которые содержали требуемую точковую мутацию, переносили с помощью электрофореза на мембранные фильтры NA-45 (Schleicher & Schuel) и элюировали 30 мин при 65°C раствором 1.5 М NaCl, содержащим 50 мМ EDTA. К фрагментам добавляли тРНК в качестве носителя до конечной концентрации 100 мкг/мл и их осаждали этанолом в течение ночи при -20°C. Осадки высушивали при комнатной температуре и растворяли в 100 мкл буфера трис-НСI (рН 7.5), содержащего 10 мМ EDTA. На втором этапе при проведении ПЦР для синтеза фрагмента (III) (33 цикла, 94 и 56°C по 30 с, 72°C - 40 с) в пробы к обычным ингредиентам добавляли в качестве матрицы по 10 мкл растворов фрагментов (I) и (II) и ПЦР проводили в присутствии праймеров (1) и (3) (рис. 1а). Для синтеза аналогичного фрагмента ДНК, не содержащего мутации *Leiden*, в качестве матрицы использовали геномную ДНК дикого типа человека и праймеры (1) и (3) в тех же условиях. Фрагменты очищали с помощью электрофореза, как опи-

сано выше. Эквимольная смесь мутантного фрагмента ДНК (III) и аналогичного фрагмента дикого типа была использована для имитации гетерозиготного состояния мутации *Leiden*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simpson A.J.G. // *Adv. Cancer Res.* 1997. V. 71. P. 209-240.
2. Shikata H., Utsumi N., Kuivaniemi H., Tromp G. // *J. Lab. Clin. Med.* 1995. V. 125. P. 421-432.
3. Birikh K.R., Plutalov O.V., Schwartz E.I., Devi S., Berlin Y.A. // *Hum. Mutation.* 1992. V. 1. P. 417-419.
4. Patrushev L.I., Zykova E.S., Kayushin A.L., Miroshnikov A.I., Bokarev I.N., Leontjev S.G., Koshkin V.M., Severin E.S. // 10th International Meeting of the Danubian League Against Thrombosis and Haemorrhagic Disorders / Eds K. Zawilska, H. Vinazzer. Poznan: Facultas, 1996. P. 57.
5. Зыкова Е.С., Патрушев Л.И., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мирошников А.И., Бокарев И.Н., Леонтьев С.Г., Кошкин В.М., Северин Е.С. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 205-210.
6. Bertina R.M., Koeleman B.P.C., Koster T., Rosendaal F.R., Dirven R.J., de Ronde H., van der Velden P.A. // *Nature.* 1994. V. 369. P. 64-67.
7. Zoller B., Svensson P.J., He H., Dahlback B. // *J. Clin. Invest.* 1994. V. 94. P. 2521-2524.
8. Zoller B., Dahlback B. // *Lancet.* 1994. V. 343. P. 1536-1538.
9. Dahlback B. // *J. Clin. Invest.* 1994. V. 94. P. 923-927.
10. Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R. // *Gene.* 1989. V. 77. P. 51-59.
11. Kirschbaum N.E., Foster P.A. // *Thromb. Haemostasis.* 1995. V. 74. P. 874-878.
12. Lewandowski K., Rozek M., Zawilska K., Markiewicz W.T. // *Thromb. Res.* 1997. V. 85. P. 105-113.
13. Патрушев Л.И., Валеев А.Г., Головченко П.А., Виноградов С.В., Чикиндас М.Л., Киселев В.И. // *Молекулярная биология.* 1993. Т. 27. С. 1100-1112.
14. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.

## A New DNA-diagnostic System for Revealing and Identifying Homozygous and Heterozygous Point Mutations

L. I. Patrushev\*, E. S. Zykova\*\*, A. L. Kayushin\*, M. D. Korosteleva\*, and A. I. Miroshnikov\*

\* Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, GSP-7 Moscow, 117871 Russia  
\*\* Sechenov Moscow Medical Academy

A straightforward and effective PCR-based assay system is devised that allows one to reveal and identify homozygous and heterozygous point mutations. The system uses two sets of allele-specific primers. In one set, the 3'-nucleotide matches the allele under study so that the primer functions effectively only if the DNA contains the corresponding allele. To increase primer specificity, template-noncomplementary nucleotides are introduced near its 3'-end. The primers from another set invariably bear a 3'-terminal mismatch, and, in addition, the mutant nucleotides of the alleles under study form mismatches with the internal nucleotides of the primers. In such combination, the primer activity is suppressed if the DNA contains a homozygous mutation. The assay system devised was utilized to reveal the *Leiden* mutation in the gene for factor V of the human blood clotting system in patients with thrombophilia.

*Key words:* polymerase chain reaction, DNA-diagnostics, homozygous mutation, heterozygous mutation, *Leiden* mutation, allele, factor V, thrombophilia