

NOS3-VNTR

Хромосомная локализация: 7q36.1 (позиции 150 997 100 – 150 997 600)



По данным *BLAT*: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat> (версия Dec. 2013, GRCh38/hg38).

Тандемные повторы: 27 нуклеотидов усреднённого мотива {gaagtctaga cctgctgc(g/a)g gggtag}.

Другие названия: *ecNOS 4a/4b (Endothelial Constitutive NOS)*, *eNOS 4a/4b*, *NOSIII*, *NOS3-intron-4-VNTR*, *EC-NOS*, *cNOS*, *c.582+353_379del*, *27 bp rep 4b/4a*, [rs61722009](#), [rs869109213](#).

Референтные генотипы

ДНК L-68	ДНК K562, 9947A, 9948, 007, 2800M, CO, CP
4 / 5 (4a / 4b)	5 / 5 (4b / 4b, WT)

Подчёркнуты аллели, визуально более интенсивные в гелях.

Общие сведения и диагностическая значимость

Минисателлит *NOS3-VNTR* расположен в четвёртом интроне гена эндотелиальной синтетазы окиси азота (*nitric oxide synthase 3*, NCBI Gene ID: [4846](#)). Функцией соответствующего фермента является выработка оксида азота (NO) – одного из наиболее важных биологических медиаторов, участвующего в иммунных реакциях, а также обладающего бактерицидным и виروцидным эффектами.

Первые работы, характеризующие этот полиморфный маркер, были опубликованы в 1994 г. (*Miyahara et al., 1994; Nadaud et al., 1994*). Два года спустя была опубликована, пожалуй, первая наиболее цитируемая статья об ассоциации генотипа 4a/4a с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний у курильщиков (*Wang et al., 1996*).

В 1998-2000 гг. появились первые работы российских авторов с результатами ассоциативных исследований этого локуса с сердечно-сосудистыми заболеваниями: *Воронько и др., 2000; Степанов и др., 1998; Чистяков и др., 2000*.

К настоящему времени накоплено огромное количество популяционных данных по аллельному полиморфизму этого маркера, в различных популяциях показано существование не менее пяти аллелей: с 2, 3, 4, 5 и 6 повторами (*ALFRED; Serrano et al., 2010; Thomas et al., 2013*). Однако в подавляющем большинстве работ полиморфизм этого минисателлита характеризуется именно как двух-аллельный: выявлялись только аллели с четырьмя и пятью повторами. Исторически, эти два аллеля были обозначены как 4a и 4b, соответственно. Характерно, что аллель **4b** является наиболее частым во всех исследованных популяциях («нормальный», аллель «дикого типа», wild type – **WT**). Остальные аллели (4c, 4d, 4y) являются весьма редкими и описаны в относительно небольшом количестве работ. Тем не менее, такие аллели были выявлены и в отдельных европейских популяциях (например, *Bolli et al., 2007*).

Во множестве работ «случай-контроль» была изучена предполагаемая ассоциация минисателлита *NOS3-VNTR* с риском развития ряда заболеваний, в первую очередь – сердечно-сосудистых. Было показано, что носительство мутантного (более редкого) аллеля **4a** (и генотипа 4a/4a) является фактором повышенного риска развития атеросклероза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда, а также сосудистых осложнений при сахарном диабете типа 1 и 2. То есть мутантный аллель является индикатором нарушения экспрессии гена *NOS3*, связанного с уменьшением выработки оксида азота. Например, в мета-анализе данных по гипертензии (анализ различных публикаций, суммарно более 6 800 человек в каждой из групп *случай* и *контроль*, *Niu & Qi, 2011*) повышенный риск для аллеля 4a в сравнении с аллелем 4b был оценен как **OR=1,29** (95% CI: 1,13-1,46; P<0,0005).

Относительно ВИЧ-инфекции следует отметить, что вирус существенно снижает уровень экспрессии гена *NOS3* в экспериментах *in vivo* (*Duffy et al., 2009; Jiang et al., 2010*). По генетике спортивной успешности данные относительно противоречивы: мутантный аллель **4a** может являться неблагоприятным для долгосрочной адаптации в высокогорных условиях (*Ahsan et al., 2005; Ахметов, 2009*).

Исходя из хромосомной локализации, минисателлит *NOS3-VNTR* может быть сцеплен с такими полиморфными локусами, используемыми в приложениях по идентификации личности, как *D7S8*, *D7S1517*, *D7S22*.

Дополнительные наиболее значимые полиморфные однонуклеотидные маркеры в гене *NOS3*: T-786C (промоторная область, [rs2070744](#)) и G894T (экзон 7, *Glu298Asp*, E298D, [rs1799983](#)).

Условия ПЦР

ПЦР настоятельно рекомендуется проводить только в формате «Смарт» (горячий старт) во избежание эффекта «ложной гомозиготности» и/или наработки неспецифических продуктов реакции.

Дополнительный компонент для приготовления реакционной смеси: «ПЦР-растворитель» (5X PCR-Diluent) – рекомендован, следует использовать в конечной концентрации 1X.

ПЦР-растворитель, Смарт 10X ПЦР-буфер и 12,5X смесь праймеров перед каждым использованием следует полностью разморозить при комнатной температуре и перемешать, встряхнув пробирки на Вортексе в течение нескольких секунд. Затем следует осадить все используемые компоненты на дно пробирок.

Для проведения анализа одного образца в каждую амплификационную пробирку вносят следующие компоненты в указанных количествах:

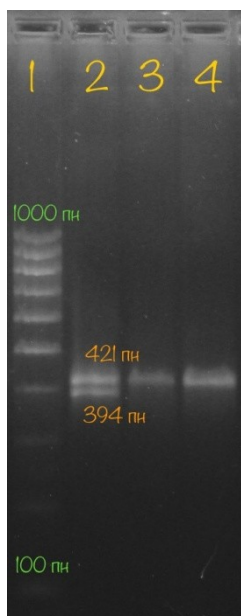
Деионизованная вода (<i>Deionized water</i>)	14,5 мкл
ПЦР-растворитель (5X PCR-Diluent)	5 мкл
Смарт 10X ПЦР-буфер (<i>Universal Smart 10X PCR Buffer</i>)	2,5 мкл
12,5X Смесь праймеров (12,5X Set of primers <i>NOS3-VNTR</i>)	2 мкл
Исследуемый образец ДНК в концентрации 5-100 нг/мкл (<i>Sample DNA</i>)	1 мкл
Суммарный объём ПЦР	25 мкл

Первая денатурация	35 циклов	Последний синтез цепи
95°C, 2 мин	94°C, 30 сек 58°C, 30 сек 72°C, 30 сек	72°C, 5 мин

Регистрация результатов

Аллельная «лестница» в состав наборов по этому локусу не входит.

Продукты ПЦР могут быть уверенно проанализированы как в агарозных, так и в неденатурирующих полиакриламидных гелях (ПАГ) с использованием различных нелокусных высокомолекулярных стандартов ДНК (например, *100 bp DNA Ladder*, «псевдоаллельная лестница» *DIS80*) и / или образцов положительных контролей с гетерозиготным генотипом 4/5.



Фрагмент окрашенного бромистым этидием агарозного геля (2%, буфер 1X TBE).

Дорожка 1 – нелокусный высокомолекулярный стандарт ДНК *100 bp DNA Ladder* («Сибэнзим», Россия), фрагменты размером от 1 000 до 100 п.н., с шагом 100 п.н. (сверху вниз).

Дорожка 2 – положительный контроль ДНК L-68. Вносили 10 нг матрицы ДНК в 25 мкл реакционной смеси, проводили 35 циклов ПЦР, наносили 5 мкл продукта реакции на дорожку в геле. **Генотип 4 / 5 (4a / 4b), с мутантным аллелем:** два ПЦР-фрагмента размером 394 и 421 п.н.

Дорожка 3 – положительный контроль ДНК 007. Вносили **1,6** нг матрицы ДНК в 25 мкл реакционной смеси, проводили 35 циклов ПЦР, наносили 8 мкл продукта реакции на дорожку в геле. **Генотип 5 / 5 (WT):** один ПЦР-фрагмент размером 421 п.н.

Дорожка 4 – исследуемый образец. Вносили 30 нг матрицы ДНК в 25 мкл реакционной смеси, проводили 35 циклов ПЦР, наносили 7 мкл продукта реакции на дорожку в геле. **Генотип 5 / 5 (WT).**

Референтные нуклеотидные последовательности

Доступ к GenBank	Дата публикации	Число тандемных повторов в референтной последовательности	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
AF519768	09-JUL-2002	5	421
NG_011992	10-APR-2017	5	421

AF519768: “Homo sapiens nitric oxide synthase 3 (endothelial cell) (NOS3) gene, complete cds”.

NG_011992: “Homo sapiens nitric oxide synthase 3 (NOS3), RefSeqGene on chromosome 7”.

GC-состав ПЦР-продукта: **62%** (для аллеля с пятью повторами).

Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе *NOS3-VNTR*

Аллели (*)	Размеры аллелей, п.н.	Частоты аллелей в выборке из русской популяции (**)	Частоты аллелей, которые рекомендуется использовать для расчётов индекса и вероятности родства (***)
1	313	0	0,006
2 (4y)	340	0	0,006
3 (4d)	367	0	0,006
4 (4a)	394	0,193	0,198
5 (4b)	421	0,807	0,808
6 (4c)	448	0	0,006

(*) Нумерация аллелей согласно числу содержащихся в них тандемных повторов. В скобках приводится альтернативное обозначение аллелей.

(**) по данным *Воронько и др., 2000*; популяционная выборка 83 неродственных человека (случайная выборка из популяции г. Москвы, контрольная группа здоровых лиц).

(***) «консервативная» оценка частот аллелей проведена для исследованной выборки (предыдущий столбец таблицы) согласно рекомендациям *Gjertson et al., 2007*.

Ссылки

- Ахметов И.И. (2009) Молекулярная генетика спорта. Монография. – М.; Советский спорт, 268 с.
- Воронько О.Е., Чистяков Д.А., Кобалава Ж.Д., Терещенко С.Н., Моисеев С.В., Носиков В.В. (2000) Полиморфный минисателлит eNOS4a/4b в гене эндотелиальной NO-синтазы и сердечно-сосудистые заболевания. – Молекулярная биология, 34 (5), 875-878, PMID: [11033815](#).
- Степанов В.А., Пузырев К.В., Спиридонова М.Г., Павлюкова Е.Н., Пузырев В.П., Карпов Р.С. (1998) Полиморфизм генов ангиотензин-превращающего фермента и эндотелиальной синтазы окиси азота у лиц с артериальной гипертензией, гипертрофией левого желудочка и гипертрофической кардиомиопатией. – Генетика, 34 (11), 1578-1581, PMID: [10096034](#).
- Чистяков Д.А., Воронько О.Е., Савостьянов К.В., Минушкина Л.О., Затейщиков Д.А., Носиков В.В. (2000) Полиморфные маркеры генов эндотелиальной NO-синтазы и сосудистого рецептора ангиотензина II и предрасположенность к ишемической болезни сердца. – Генетика, 36 (12), 1707-1711, PMID: [11190479](#).
- Ahsan A., Norboo T., Baig M.A., Qadar Pasha M.A. (2005) Simultaneous selection of the wild-type genotypes of the G894T and 4B/4A polymorphisms of NOS3 associate with high-altitude adaptation. – Ann. Hum. Genet., 69 (Pt 3), 260-267, PMID: [15845030](#).
- ALFRED: [SI6637481](#).
- Bolli P., Sticchi E., Abbate R., Fatini C. (2007) A novel allele of eNOS gene in the Italian population: the actual essence of intron 4 polymorphism. – Nitric Oxide, 16 (3), 392-394, PMID: [17291796](#).
- Duffy P., Wang X., Lin P.H., Yao Q., Chen C. (2009) HIV Nef protein causes endothelial dysfunction in porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. – J. Surg. Res., 156 (2), 257-264. PMID: [19540523](#).
- Gjertson D.W., Brenner C.H., Baur M.P., Carracedo A., Guidet F., Luque J.A., Lessig R., Mayr W.R., Pascali V.L., Prinz M., Schneider P.M., Morling N. (2007) ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing. – Forensic Science International Genet., 1 (3-4), 223-231, PMID: [19083766](#).
- Jiang J., Fu W., Wang X., Lin P.H., Yao Q., Chen C. (2010) HIV gp120 induces endothelial dysfunction in tumour necrosis factor-alpha-activated porcine and human endothelial cells. – Cardiovasc. Res., 87 (2), 366-374. PMID: [20083573](#).

- Miyahara K., Kawamoto T., Sase K., Yui Y., Toda K., Yang L.X., Hattori R., Aoyama T., Yamamoto Y., Doi Y., Ogoshi S., Hashimoto K., Kawai C., Sasayama S., Shizuta Y. (1994) Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. – Eur. J. Biochem., 223 (3), 719-726, PMID: [7519987](#).
- Nadaud S., Bonnardeaux A., Lathrop M., Soubrier F. (1994) Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. – Biochem. Biophys. Res. Commun., 198 (3), 1027-1033, PMID: [7509596](#).
- Niu W., Qi Y. (2011) An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension. – PLoS One, 6 (9), e24266, PMID: [21912683](#).
- OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man): <http://omim.org/entry/163729>.
- Serrano N.C., Díaz L.A., Casas J.P., Hingorani A.D., Moreno de Lucca D., Páez M.C. (2010) Frequency of eNOS polymorphisms in the Colombian general population. – BMC Genet., 11, 54, PMID: [20565909](#).
- Thomas B.N., Thakur T.J., Yi L., Guindo A., Diallo D.A., Ott J. (2013) Extensive ethnogenomic diversity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) polymorphisms. – Gene Regul. Syst. Bio., 7, 1-10, PMID: [23400313](#).
- Wang X.L., Sim A.S., Badenhop R.F., McCredie R.M., Wilcken D.E. (1996) A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. – Nat. Med., 2 (1), 41-45, PMID: [8564837](#).

Дополнительная информация

- Наборы ТАПОТИЛИ предназначены для исследовательских работ *in vitro* (то есть в пробирке, вне живого организма).
- Наборы не подлежат обязательной сертификации и декларированию соответствия в Системе сертификации ГОСТ Р.
- Коды продукции [ОКПД2](#) (ОК 034-2014, КПЕС 2008): **20.59.52.190** (Реагенты сложные диагностические или лабораторные, не включенные в другие группировки), **20.59.52.199** (Реагенты сложные диагностические или лабораторные прочие, не включенные в другие группировки).
- Наборы ТАПОТИЛИ не являются изделием медицинского назначения, не предназначены для использования в целях медицинской диагностики, для диагностических процедур, для профилактики и лечения заболеваний. По этим причинам наборы ТАПОТИЛИ не подлежат государственной регистрации на территории РФ (в том числе в Росздравнадзоре) в качестве медицинского изделия.
- Молекулярно-генетические исследования (МГИ) по установлению генотипов отдельных лиц, в том числе по идентификации личности и установлению спорного родства методом анализа полиморфных локусов генома человека не являются медицинской деятельностью: устанавливаются именно биологические факты (генотипы обследуемых лиц).
- Результаты МГИ мы рекомендуем оформлять в виде Заключения специалиста, отчёта о НИР и аналогичных документов, не являющихся медицинскими документами.
- Интерпретация медицинской значимости полученных данных и принятие клинического решения относится к компетенции врача.
- The *Tapotili* Kit is intended for molecular biology applications, including forensic or paternity usage. This product is not intended for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.