

АНАЛИЗ ДНК ВЫСШИХ ПРИМАТОВ С ПОМОЩЬЮ INTER-SINE-ПЦР

© 2008 г. Н. Л. Рябина¹, А. А. Банникова², В. А. Шереметьева²,
М. Г. Чикобава³, Б. А. Лапин³, Д. А. Крамеров¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва 119991
e-mail: kramerov@immb.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра зоологии позвоночных, Москва 119992

³ Научно-исследовательский институт медицинской приматологии, Сочи–Адлер 354376

Поступила в редакцию 20.04.2007 г.

Два вида (MIR и Alu) коротких рассеянных по геному повторяющихся последовательностей ДНК (SINE) использовали для изучения генетического родства между высшими приматами и выявления полиморфизма геномной ДНК человека. В полимеразной цепной реакции с праймерами, комплементарными консенсусным последовательностям повторов MIR и Alu, амплифицировали участки ДНК, расположенные между соседними копиями этих SINEs (интер-SINE-ПЦР). Сравнение набора амплифицированных фрагментов ДНК для разных видов или особей позволяет судить об их родстве. Интер-MIR-ПЦР подтвердил известные из литературы родственные связи между видами высших приматов инфраотряда Catarrhini, что доказывает применимость этого метода для изучения филогении. Полиморфизм ДНК человека не удалось обнаружить, используя интер-MIR-ПЦР. Такой полиморфизм был выявлен с помощью интер-Alu-ПЦР, что, возможно, связано с продолжающимся размножением Alu в геноме человека.

По геномам млекопитающих и многих других эукариот разбросано огромное число (10^5 – 10^6) копий повторяющихся последовательностей ДНК, именуемых короткими ретропозонами, или SINE (short interspersed elements) [1]. Они размножились в ходе эволюции благодаря процессу ретропозиции, который включает в себя транскрипцию этих элементов РНК-полимеразой III и обратную транскрипцию, сопряженную с интеграцией синтезирующейся ДНК в новый участок генома. Благодаря мутациям, накапливавшимся в течение миллионов лет, копии каждого SINE, в совокупности образующие семейство данного SINE, отличаются друг от друга обычно 10–30% оснований. В геноме имеется не более 3–4 семейств SINE, причем каждое из них характерно только для одного или нескольких семейств (иногда отрядов) организмов.

В геномах высших приматов имеется только два семейства SINEs – Alu и MIR [2]. Первый относится к уникальному типу SINEs, который вместе с B1-семейством SINE грызунов ведет свое происхождение от 7SL РНК – компонента цитоплазматических частиц (SRP), участвующих в секреции полипептидов из клеток. Alu, имеющий длину около 300 пн, в отличие от B1, состоит из двух сходных по структуре частей (мономеров), обладающих гомологией с 7SL РНК [3, 4].

MIR, как и подавляющее большинство SINE других известных семейств, ведет свое происхождение от молекул тРНК, о чем свидетельствует

структура нуклеотидной последовательности, расположенной в 5'-концевой (“головной”) части этих коротких ретропозонов [5, 6]. Одна из особенностей MIR – это широкое распространение. Данное семейство SINE имеется в геномах всех млекопитающих, а возможно, и других позвоночных [7]. Отсюда следует, что MIR возник как минимум 130 млн лет назад, что подтверждается чрезвычайно высокой дивергентностью копий SINEs данного семейства (средняя гомология между копиями составляет только 70%). По неясной пока причине наиболее консервативной частью MIR-элемента является его центральная часть (core), лежащая между тРНК-родственной и “хвостовой” частями [6, 8]. Поэтому в большинстве копий, в отличие от полноразмерного MIR длиной около 260 пн, обнаруживается только эта “core” последовательность длиной в среднем 65 пн [7].

В последние годы для изучения филогенетических связей между видами мы развивали метод интер-SINE-ПЦР [9]. Первоначально этот метод был применен для детекции и доказательства широкого распространения элемента MIR у млекопитающих [7]. В результате такой полимеразной цепной реакции происходит амплификация участков геномной ДНК длиной менее 3 тпн, которые ограничены с двух сторон копиями SINEs. После разделения амплифицированных фрагментов ДНК с помощью электрофореза в полиакриламидном геле можно оценить степень родства таксонов видового и подвидового уровня на основе

сходства получаемых наборов полос. Метод интер-MIR-ПЦР оказался достаточно успешным в оценке филогенетического родства видов и родов рукокрылых [10], насекомоядных [9, 11, 12] и некоторых грызунов [13].

Филогения приматов наиболее исследована с применением различных молекулярных методов, основанных на анализе митохондриальных и ядерных генов [14–17]. В настоящей работе мы использовали интер-MIR-ПЦР для анализа филогенетических отношений высших обезьян (Catarrhini) для того, чтобы проверить, в какой мере результаты этого простого и дешевого метода совпадают с результатами других методов. Кроме того, в этой работе мы предложили новый подход к дизайну праймеров, который позволил анализировать суммарную геномную ДНК приматов с помощью интер-Alu-ПЦР. Такая ПЦР дала возможность детектировать полиморфизм ДНК человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ДНК и интер-SINE-ПЦР. Геномную ДНК выделяли из крови [18] или из фиксированных этанолом тканей (мышцы, плацента) путем лизиса гомогената протеиназой К с последующей депротеинизацией смесью фенола и хлороформа (1 : 1). Список препаратов ДНК, использованных в работе, представлен в таблице.

Интер-MIR-ПЦР проводили с использованием двух затравок, комплементарных последовательности MIR [7]: 5'-AGTGACTTGCTCAAGGT-3' (MIR17) и 5'-GCCTCAGTTTCCTCATC-3' (MIL17). Обе затравки метили ($\gamma^{32}\text{P}$)-АТР (1 МБк/100 пмоль олигонуклеотида) с помощью полинуклеотидкиназы. Реакционная смесь (20 мкл) содержала буфер (70 мМ трис-НСl, рН 8.6, 16.6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5 мМ MgCl_2), 0.2 мМ dNTP, 4 пмоль каждой меченой затравки, 1 ед. *Taq*-полимеразы ("Силекс", Россия) и 25 нг геномной ДНК. Условия интер-MIR-ПЦР соответствовали описанным [7]: дена-

География и число образцов, использованных в анализе

География образцов	Число образцов	Источник получения образцов
<i>Homo sapiens</i>		
Русские, европейская часть России	13	ИМБ РАН
Афганцы, Афганистан	1	МГУ, каф. антропологии
Тувинцы, Тува, Тотженский р-н, с. Тоора-Хем	1	То же
Эвенки, Якутия, пгт Золотинка	1	»
Коряки, Корякский национальный округ, п-ов Камчатка	1	»
Индейцы, Северная Америка	4	»
Вьетнамцы, Вьетнам	1	ИМБ РАН
Малагасийцы (антадруи), о. Мадагаскар	1	МГУ, каф. антропологии
Ньямвези, Танзания	1	То же
Бамбара, Мали	1	»
Тубу, Чад	1	»
Народы Нигерии, Нигерия	1	»
Этническая принадлежность не известна, Россия		ИМБ РАН
<i>Обезьяны инфраотряда Catarrhini</i>		
<i>Pan troglodytes</i> – шимпанзе обыкновенная	1	Московский зоопарк
<i>Gorilla gorilla</i> – горилла	1	Немецкий центр приматологии
<i>Pongo pygmaeus</i> – орангутан обыкновенный	1	Московский зоопарк
<i>Hylobates lar</i> – гиббон белорукий	1	Немецкий центр приматологии
<i>Macaca silenus</i> – макак львинохвостый	1	Московский зоопарк
<i>Macaca arctoides</i> – макак бурый	1	ГУ НИИ медицинской приматологии РАНН
<i>Macaca mulatta</i> – макак резус	1	Московский зоопарк
<i>Papio anubis</i> – павиан анупис	1	ГУ НИИ медицинской приматологии РАНН
<i>Papio hamadryas</i> – павиан гамадрил	1	То же
<i>Chlorocebus aethiops</i> – мартышка зеленая	1	»

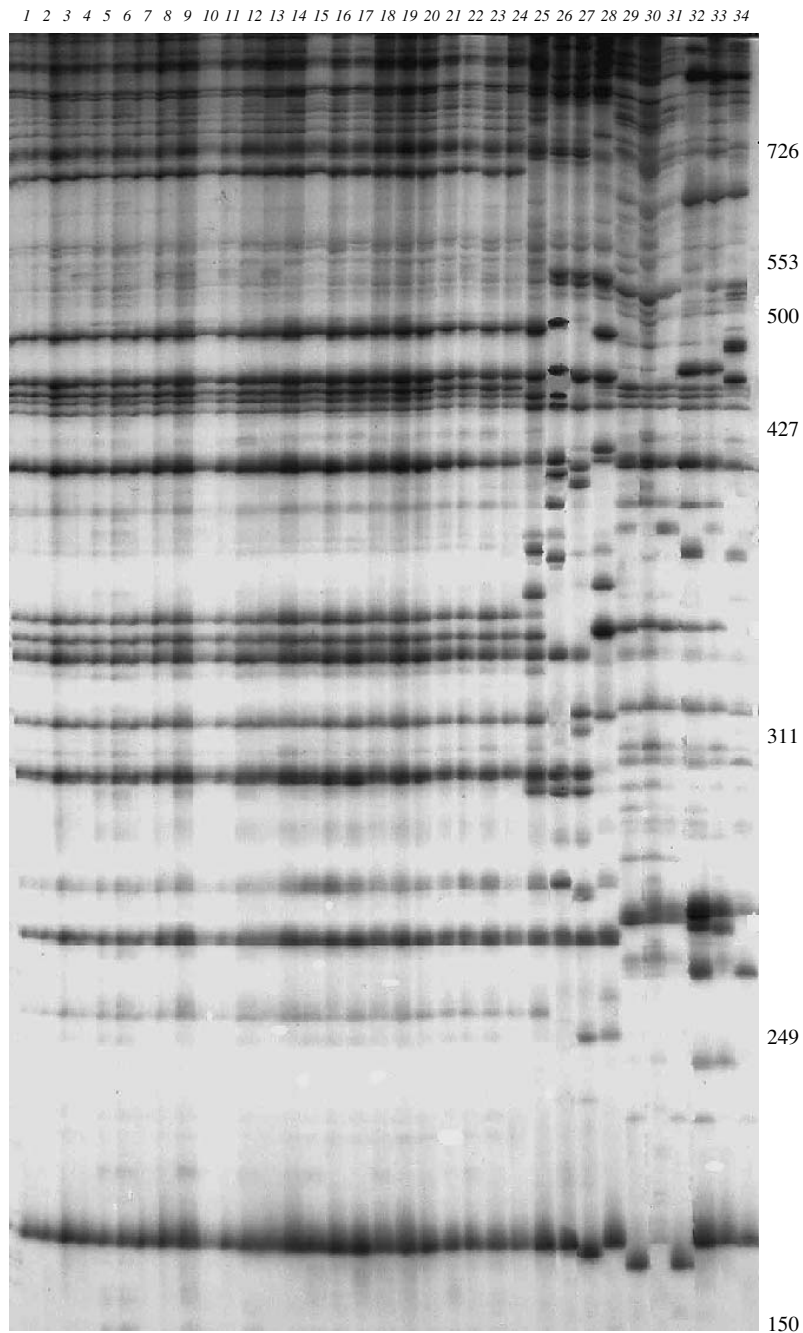


Рис. 1. Интер-MIR-ПЦР геномной ДНК людей и обезьян. *Homo sapiens* (1–24). Обезьяны: шимпанзе обыкновенная *Pan troglodytes* (25), горилла *Gorilla gorilla* (26), орангутан обыкновенный *Pongo pygmaeus* (27), гиббон белорукий *Hylobates lar* (28), макак львинохвостый *Macaca silenus* (29), макак бурый *M. arctoides* (30), макак резус *M. mulatta* (31), павиан анубис *Papio anubis* (32), павиан гамадрил *P. hamadryas* (33) и мартышка зеленая *Chlorocebus aethiops* (34). Разделение денатурированных ДНК-фрагментов проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с мочевиной. Справа от электрофореграммы указаны размеры маркерных фрагментов (ДНК ФХ147, гидролизованная *Hinf*I).

турация – 94°C, 30 с; отжиг – 56°C, 45 с; синтез – 72°C, 2 мин. Число циклов – 27. Предварительная денатурация продолжалась 3 мин при 94°C, конечный синтез – 5 мин при 72°C.

При проведении интер-Alu-ПЦР использовали единственную затравку: 5'-CCACCGCGCCCGGC-

СAG-3' (подчеркнуты нуклеотиды, комплементарные 5'-концу консенсусной последовательности Alu-элемента; ПЦР должна происходить только с участием тех копий Alu, 5'-фланкирующая последовательность которых начинается с динуклеотида 5'-СТ-3'). Олигонуклеотид метили,

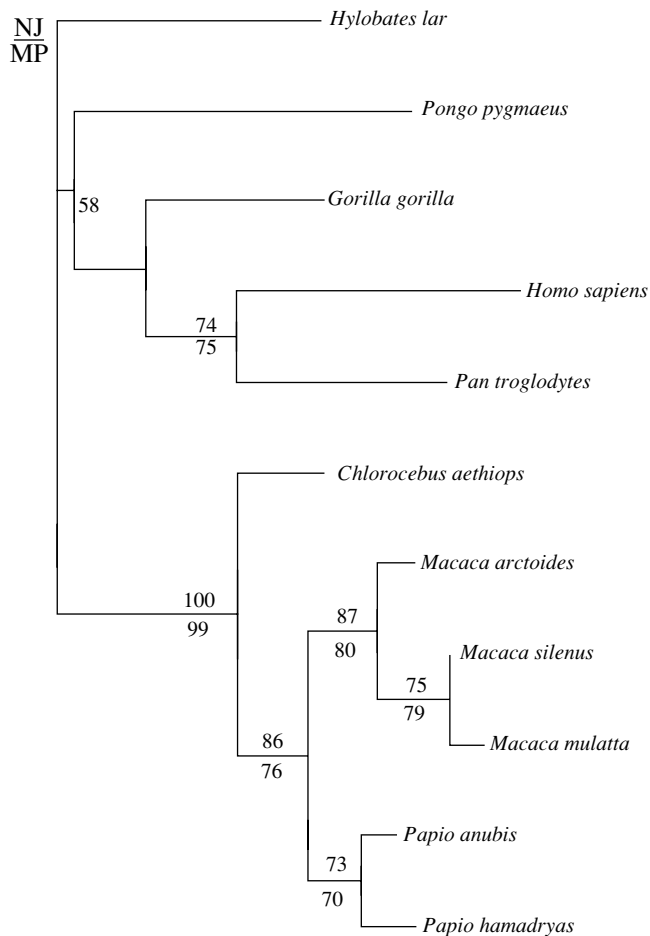


Рис. 2. Неукорененная дендрограмма филогенетических отношений исследованных приматов по результатам интер-MIR-ПЦР, построенная методом ближайшего связывания (NJ) на основе генетических дистанций Нея и Ли. Для кластеров, достоверность которых выше 50%, указаны индексы бутстрэпа (% от 1000 реплик): над ветвями – в анализе ближайшего связывания (NJ), под ветвями – в парсимониальном анализе (MP).

как описано выше. ПЦР осуществляли так же, как в случае интер-MIR-ПЦР, но отжиг затравки и синтез шли при одной и той же температуре (72°C) и продолжительность этой стадии составляла 3 мин.

Меченые продукты ПЦР денатурировали и разделяли электрофорезом в 6%-ном полиакриламидном геле, содержащем трис-боратный буфер и 8 М мочевины (длина геля 50 см, ширина – 28 см, толщина 0.4 мм). Разделение вели в течение 7 ч при постоянной мощности тока 75 Вт. Гель инкубировали 30 мин в растворе 5%-ной уксусной кислоты и 10%-ного этанола, после чего сушили и экспонировали с рентгеновской пленкой (18–24 ч).

Интер-Alu-ПЦР с немеченой затравкой проводили по аналогии с описанной выше процедурой, но количество олигонуклеотида в реакционной

смеси составляло 7.5 пмоль. Продукты амплификации разделяли в течение ночи электрофорезом в 2%-ном агарозном геле (длина 20 см), содержащем трис-боратный буфер. Полосы ДНК, окрашенные бромистым этидием, фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе.

Филогенетический анализ. Фингерпринты, полученные в интер-MIR- и Alu-PCR, были преобразованы в бинарную матрицу (1 – присутствие полосы, 0 – отсутствие), которую анализировали методами максимальной экономии (maximum parsimony – MP) и ближайшего связывания (neighbor-joining – NJ) с использованием пакета PAUP* version 4.0b10 [19]. Достоверность группировок на деревьях оценивали методом бутстрэп-анализа по 1000 репликам. Генетические дистанции (D_{NL}) рассчитаны по Нею и Ли [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Интер-MIR-ПЦР

В результате ПЦР одновременно с двумя праймерами (MIR17 и MIL17), специфичными для генетического элемента MIR [7], происходит амплификация участков ДНК, расположенных между соседними копиями MIR независимо от их взаимной ориентации. На рис. 1 представлены результаты интер-MIR-ПЦР геномной ДНК 24 человек, относящихся к евразийской, азиатско-американской и экваториальной расам, и 10 обезьян из семейств Cercopithecidae, Hylobatidae и Homiidae. Набор наблюдаемых полос был практически одинаковым у всех людей (дорожки 1–24), т.е. полиморфизм ДНК этот метод не выявлял. Набор полос у человекообразных обезьян (Homiidae) довольно сходен с человеческим, но отличия нарастают в ряду шимпанзе, горилла, орангутан и гиббон. Как и ожидалось, еще сильнее отличаются наборы полос у других обезьян (Cercopithecidae).

Посредством парсимониального (MP) и дистанционного (NJ) анализа данных интер-MIR-ПЦР были построены дендрограммы (рис. 2). Топология MP- и NJ-дендрограмм оказалась практически одинаковой. Семейства Cercopithecidae и Homiidae образовали две отдельные ветви. Роды *Chlorocebus*, *Macaca* и *Papio*, относящиеся к Cercopithecidae, хорошо дифференцируются. Зеленая мартышка (*Chlorocebus aethiops*) располагается на дендрограмме базально по отношению к другим анализированным представителям Cercopithecidae; *Macaca mulatta* ближе к *M. silenus*, чем *M. arctoides*. В семействе Homiidae гиббон (*Hylobates lar*) представляет собой базальную ветвь, затем следуют орангутан (*Pongo pygmaeus*), горилла (*Gorilla gorilla*), шимпанзе (*Pan troglodytes*) и человек (*Homo sapiens*). Хотя взаиморасположение *P. pygmaeus* и *G. gorilla* неустойчиво, что выражается в



Рис. 3. Схема предложенного варианта интер-Alu-ПЦР. Показаны две копии Alu-элемента (черные прямоугольники), расположенные в геноме "голова к голове". Выбранная затравка инициирует синтез ДНК только в том случае, если динуклеотид на ее 3'-конце спарен с нуклеотидами во фланкирующей последовательности.

низких величинах бутстрэпа в соответствующих узлах, в остальном полученная схема хорошо совпадает с филогенетическими деревьями Hominidae, основанными на анализе структуры митохондриальных и ядерных генов [15–17]. Можно заключить, что интер-MIR-ПЦР действительно дает возможность адекватно оценивать филогенетические связи. Будучи простым, нетрудоемким и дешевым методом, интер-MIR-ПЦР может найти достаточно широкое распространение при анализе филогенетических отношений млекопитающих на уровне видов, родов и семейств.

Почему у сравнительно близких видов некоторые полосы интер-MIR-ПЦР различаются и что это может отражать? MIR очень древний ретротрипозон, давно потерявший способность к размножению у плацентарных млекопитающих [5, 7, 8]. Поэтому отличия в спектрах полос интер-MIR-ПЦР между видами не могут быть объяснены интеграцией в геном новых копий MIR. Скорее всего, отличия полос интер-MIR-ПЦР у разных видов объясняются возникновением в ходе эволюции мутаций на участках MIR, комплементарных затравкам, и вставками/делециями в нуклеотидных последовательностях, расположенных между копиями MIR. (Надо отметить, что до сих пор не установлено, какой из этих двух факторов – нуклеотидные замены или вставки/делеции – дает больший вклад в изменение набора полос.)

Как было отмечено выше, наборы полос, получаемые в результате интер-MIR-ПЦР, у человека и человекообразных обезьян весьма схожи. Генетическая дистанция между человеком и шимпанзе такая же, как между мартышками и павианами: $D_{NL} = 0.28$. Эта величина значительно меньше генетической изменчивости, выявляемой с помощью интер-MIR-ПЦР на уровне родов у мелких млекопитающих ($D_{NL} = 0.65–0.84$, ежи и рукокрылые), и скорее соответствует генетическому расстоянию между географически удаленными популяциями этих животных ($D_{NL} = 0.20–0.30$) [9, 10]. Возможно, это объясняется более низкой скоростью мутирования у высших приматов, что обусловлено большей продолжительностью

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

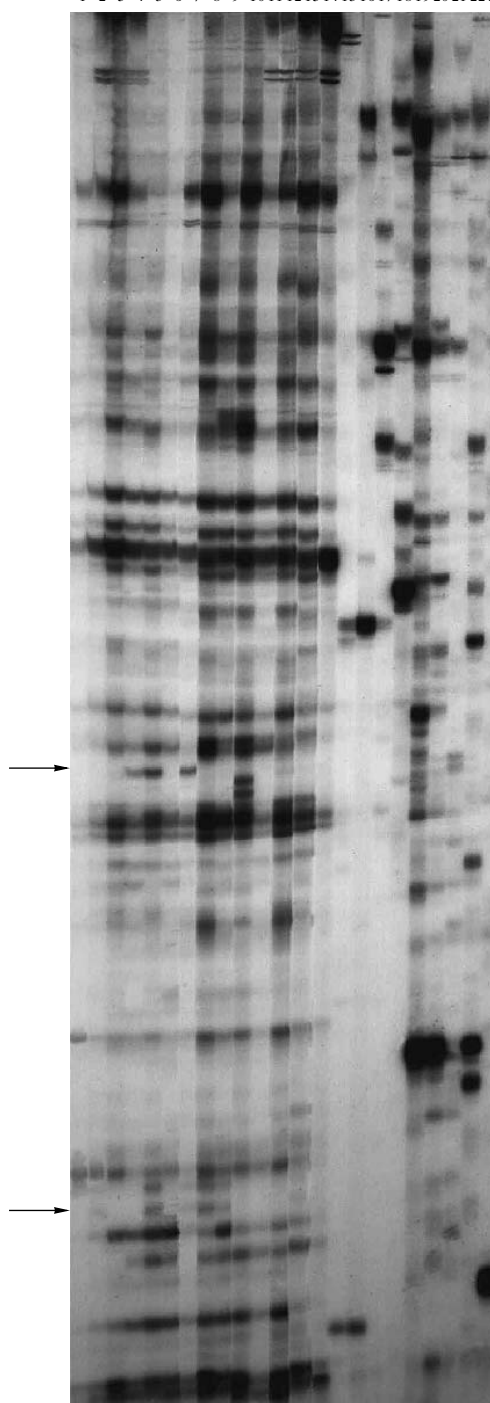


Рис. 4. Интер-Alu-ПЦР геномной ДНК людей и обезьян. Денатурированные фрагменты ДНК разделены с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с мочевиной. *Homo sapiens*: индейцы (1–4), эвенк (5), антадруи (6), тувинец (7), ньямвези (8), бамбара (9), тубу (10), нигериец (11), вьетнамец (12), европеоид (13), негроид неизвестной национальной принадлежности (14). Обезьяны: *Pan troglodytes* (15), *Gorilla gorilla* (16), *Pongo pygmaeus* (17), *Hylobates lar* (18), *Macaca silenus* (19), *M. mulatta* (20), *M. arctoides* (21), *Papio anubis* (22), *Chlorocebus aethiops* (23). Стрелками отмечены зоны переменных фрагментов.

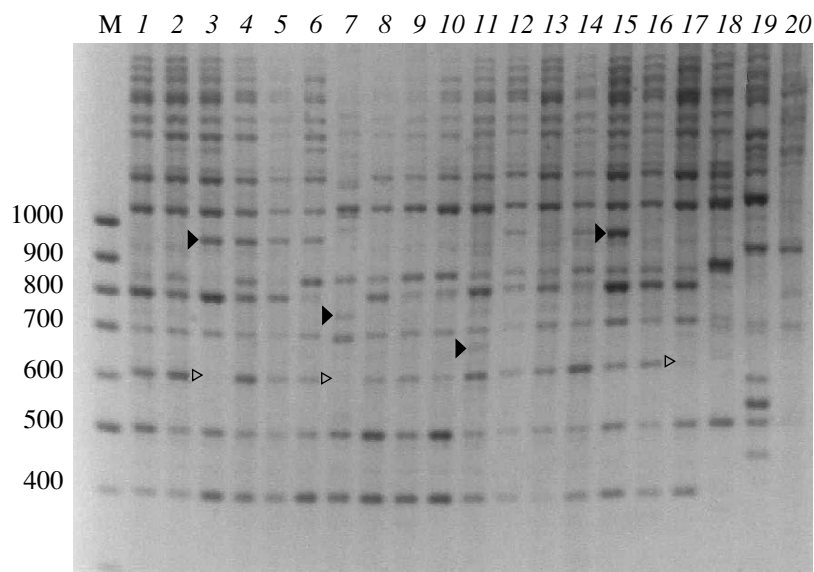


Рис. 5. Интер-Alu-ПЦР геномной ДНК людей и обезьян. Двухцепочечные фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 2%-ном агарозном геле и окрашивали бромистым этидием. *Homo sapiens*: русские (1, 2, 12–16), индейцы (3–5), коряк (6), эвенк (7), ньямвези (8), бамбара (9), тубу (10), нигериец (11), негроид неизвестной национальной принадлежности (17). Обезьяны: 18 – *Pan troglodytes*, 19 – *Pongo pygmaeus*, 20 – *Macaca silenus*. М – маркер длины фрагментов ДНК. Черными стрелками отмечены специфические полосы. Белые стрелки указывают на отсутствие полос, выявляемых с помощью интер-Alu-ПЦР у большинства людей.

стью генераций у высших приматов по сравнению с мелкими млекопитающими [21].

Интер-Alu-ПЦР

Alu-элемент возник в эволюции значительно позднее, чем MIR. В отличие от последнего он остается ретропозиционно активным до настоящего времени, хотя, по некоторым оценкам, активность Alu снизилась почти в 100 раз за последние 30 миллионов лет [22]. Способность Alu образовывать новые копии в геноме человека дает надежду на то, что с помощью интер-Alu-ПЦР можно выявлять полиморфизм ДНК человека. Первые наши опыты, в которых использовался праймер, комплементарный 5'-концу консенсусной последовательности Alu, давали при разделении в секвенирующем полиакриламидном геле слишком большое число полос, практически не поддающееся анализу. Очевидно, это связано с присутствием в геноме человека огромного числа (1.1×10^6) копий Alu и малой их дивергенцией по сравнению с копиями MIR [2]. Чтобы уменьшить число полос, образующихся при интер-Alu-ПЦР, была использована затравка, комплементарная 5'-концу консенсусной последовательности Alu, но имеющая на своем 3'-конце дополнительный динуклеотид, который должен спариваться с первыми двумя нуклеотидами в прилежащей к Alu последовательности ДНК (рис. 3). В такой реакции матрицей будет служить только часть всех

копий Alu, т.е. число ПЦР-продуктов должно уменьшиться.

На рис. 4 показаны результаты интер-Alu-ПЦР с использованием затравки с добавочным динуклеотидом AG на 3'-конце. ^{32}P -меченые ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в денатурирующем полиакриламидном геле. В этом опыте проводился анализ ДНК 14 человек – представителей разных рас, и 9 препаратов ДНК других высших приматов. Наблюдаемые ПЦР-продукты ДНК человека и обезьян очень сильно отличались. Наборы полос для препаратов ДНК разных людей были сходны, однако в отличие от интер-MIR-ПЦР некоторые полосы, обнаруживаемые в случае одних людей, отсутствовали у других (отмечены на рисунке). Таким образом, интер-Alu-ПЦР позволяет выявлять полиморфизм ДНК человека.

Мы также применили другой более дешевый и простой вариант интер-Alu-ПЦР. В этом варианте опыта использовали ту же, но не меченую затравку, а разделение двухцепочечных ПЦР-продуктов проводили в агарозном геле. Это, в частности, позволяло анализировать значительно более длинные фрагменты ДНК (400–3000 пн), чем в первом варианте, где хорошее разделение полос ограничивалось фрагментами до 500 нуклеотидов. На рис. 5 представлены результаты такого анализа препаратов ДНК 17 человек и трех видов обезьян. Для нескольких человек обнаружены специфические полосы: фрагмент длиной

950 пн у индейцев и коряка (дорожки 3–6) или не-много более длинный фрагмент у некоторых европеоидов (12, 14, 15), а также фрагменты длиной 650 и 750 пн у нигерийца и эвенка соответственно. Некоторые полосы, напротив, отсутствовали в паттернах того или иного человека. Например, фрагменты длиной 600 пн не наблюдались у одного из индейцев (3), эвенка (7) и негроида (17). Таким образом, и в этом варианте метод интер-Alu-ПЦР дает возможность выявлять полиморфизм человеческой ДНК.

Для каждой конкретной варибельной полосы неизвестно, какие различия в структуре ДНК обуславливают эту варибельность. Однако теоретически следующие причины могут обуславливать появление (исчезновение) тех или иных полос в опытах по интер-Alu-ПЦР: 1) интеграция в геном новых копий Alu, 2) мутации в том участке копий Alu, с которым спаривается используемый праймер, 3) протяженные делеции или вставки в участках ДНК, расположенных между копиями Alu, на которых происходит затравление при ПЦР. В будущем секвенирование фрагментов ДНК варибельных полос может позволить установить, какие из этих причин чаще вызывают наблюдаемый полиморфизм.

До сих пор метод интер-Alu-ПЦР применялся главным образом для картирования длинных клонированных фрагментов генома человека [23]. Предложенный нами вариант метода интер-Alu-ПЦР позволяет использовать в качестве матрицы суммарную геномную ДНК и может оказаться полезным для поиска полиморфизма ДНК человека, а также для изучения межпопуляционных родственных связей. Кроме того, примененный подход к выбору затравок для интер-Alu-ПЦР может быть использован и для других сравнительно “молодых” SINE с очень большим числом копий в геноме.

Авторы благодарны Московскому зоопарку и Немецкому центру приматологии за предоставленные образцы крови и ДНК.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (проекты № 05-04-49240 и 05-04-49553) и программы “Динамика генофондов”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kramerov D.A., Vassetzky N.S.* Short retroposons in eukaryotic genomes // *Int Rev. Cytol.* 2005. V. 247. P. 165–221.
2. *Lander E.S., Linton L.M., Birren B. et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome // *Nature.* 2001. V. 409. P. 860–921.
3. *Deininger P.L., Jolly D.J., Rubin C.M. et al.* Base sequence studies of 300 nucleotide renatured repeated human DNA clones // *J. Mol. Biol.* 1981. V. 151. P. 17–33.
4. *Ullu E., Tschudi C.* Alu sequences are processed 7SL RNA genes // *Nature.* 1984. V. 312. P. 171–172.
5. *Smit A.F., Riggs A.D.* MIRs are classic, tRNA-derived SINEs that amplified before the mammalian radiation // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. P. 98–102.
6. *Gilbert N., Labuda D.* CORE-SINEs: eukaryotic short interspersed retroposing elements with common sequence motifs // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 2869–2874.
7. *Jurka J., Zietkiewicz E., Labuda D.* Ubiquitous mammalian-wide interspersed repeats (MIRs) are molecular fossils from the mesozoic era // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. P. 170–175.
8. *Gilbert N., Labuda D.* Evolutionary inventions and continuity of CORE-SINEs in mammals // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 298. P. 365–377.
9. *Банникова А.А., Матвеев В.А., Крамеров Д.А.* Опыт использования интер-SINE-ПЦР в изучении филогенеза млекопитающих // *Генетика.* 2002. Т. 38. № 6. P. 853–864. (*Bannikova A.A., Matveev V.A., Kramerov D.A.* Using inter-SINE-PCR to study mammalian phylogeny // *Rus. J. Genetics.* 2002. V. 38. № 6. P. 714–724.)
10. *Матвеев В.А.* Систематика рукокрылых Старого Света по результатам исследования диспергированных повторов ДНК: Дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2003. 247 с.
11. *Банникова А.А., Крамеров Д.А., Василенко В.Н. и др.* Полиморфизм ДНК ежей рода *Erinaceus* и полиптичность таксона *E. concolor* (Insectivora, Erinaceidae) // *Зоол. журн.* 2003. Т. 82. С. 70–80.
12. *Bannikova A.A., Lavrenchenko L.A., Kramerov D.A.* Phylogenetic relationships between Afrotropical and Palaeartic *Crocidura* species inferred from inter-SINE-PCR // *Biochem. Systemat. and Ecol.* 2005. V. 33. P. 45–59.
13. *Брандлер О.В., Ляпунова Е.А., Крамеров Д.А. и др.* Сравнительный анализ применения разных молекулярно-генетических маркеров для изучения филогении и систематики сурков (Marmota, Sciuridae, Rodentia) // *Териофауна России и сопредельных территорий.* М.: КМК, 2007. 60 с.
14. *Goodman M., Porter C.A., Czelusniak J. et al.* Toward a phylogenetic classification of Primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1998. V. 9. P. 585–598.
15. *Purvis A.* A composite estimate of primate phylogeny // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* 1995. V. 348. P. 405–421.
16. *Arnason U., Gullberg A., Janke A. et al.* Pattern and timing of evolutionary divergences among hominoids based on analyses of complete mtDNAs // *J. Mol. Evol.* 1996. V. 43. P. 650–661.
17. <http://tolweb.org/Catarrhini/16293>
18. *Mathew C.C.* The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // *Methods in Molecular Biology / Ed. Walker J.M.* N.Y.: Humana Press, 1984. P. 31–34.
19. *Swofford D.L.* Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4. Sunderland MA: Sinauer Associates, 1998.
20. *Nei M., Li W.H.* Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. P. 5269–5273.

21. *Li W.H., Ellsworth D.L., Krushkal J. et al.* Rates of nucleotide substitution in primates and rodents and the generation-time effect hypothesis // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1996. V. 5. P. 182–187.
22. *Britten R.J.* Evidence that most human Alu sequences were inserted in a process that ceased about 30 million years ago // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 6148–6150.
23. *Kass D.H., Batzer M.A.* Inter-Alu polymerase chain reaction: advancements and applications // *Anal. Biochem.* 1995. V. 228. P. 185–193.

Analysis of DNA of Higher Primates Using Inter-SINE PCR

**N. L. Ryabinina¹, A. A. Bannikova², V. A. Sheremet'eva²,
M. G. Chikobava³, B. A. Lapin³, and D. A. Kramerov¹**

¹ *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia
e-mail: kramerov@imb.ru*

² *Lomonosov Moscow State University, Department of Vertebrate Zoology, Moscow, 119992 Russia*

³ *Research Institute of Medical Primatology, Russian Academy of Medical Sciences, Sochi–Adler, 35376 Russia*

Two types (MIR and Alu) of short interspersed repeated DNA sequences (SINEs) were used for analysis of genetic relationships among higher primates, and for detection of polymorphism in human genomic DNA. The DNA regions located between the neighboring copies of these SINEs were amplified in polymerase chain reaction with primers complementary to the MIR and Alu consensus sequences (inter-SINE PCR). Comparison of the sets of amplified DNA fragments for different species or individuals provides evaluation of the relationships among them. Using inter-MIR PCR technique, the relationships among the higher primates of the infraorder Catarrhini reported elsewhere were confirmed, pointing to the efficiency of the method for phylogenetic studies. No human DNA polymorphism was revealed with the help of inter-MIR PCR. This polymorphism was detected by means of inter-Alu PCR, which is probably associated with the continuing amplification of Alu elements in human genome.