

**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра зоологии**

**ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ
И ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТИ
ЦИТОХРОМОВ P450 И ЭСТЕРАЗ
У ТЛЕЙ И ДРУГИХ НАСЕКОМЫХ**

**Учебные материалы для студентов специальностей
1-31 01 01 «Биология (по направлениям)» направления
специальности 1-31 01 01-03 Биология (биотехнология)**

**МИНСК
2018**

УДК 575.8(075.8)
ББК 28.02я73
В92

А в т о р ы :
**Н. В. Воронова, А. В. Корбут, В. А. Астравович,
Р. С. Шулинский, Е. А. Абакумова**

Рекомендовано советом
биологического факультета
28 ноября 2018 г., протокол № 4

Р е ц е н з е н т
кандидат биологических наук
С. Н. Филиппова

Выделение белков и измерение активности цитохромов P450 и эсте-
В92 раз у тлей и других насекомых : учеб. материалы / Н. В. Воронова
[и др.]. – Минск : БГУ, 2018. – 15 с.

Содержится подробное описание методики выделения белков и оценки активности ферментов системы детоксикации насекомых, а также рекомендации по проведению необходимых расчетов для оценки полученных значений.

Предназначено для студентов биологических специальностей, магистрантов и аспирантов, а также специалистов в области энтомологии, защиты растений, биотехнологии.

**УДК 575.8(075.8)
ББК 28.02я73**

© БГУ, 2018

ВВЕДЕНИЕ

Проблема устойчивости насекомых к инсектицидам в последние годы вошла в число глобальных экологических угроз, что связано не только с собственно ростом устойчивости вредителей к препаратам различных классов, но и с вторично возникшей проблемой – гибелью пчел и других опылителей. Как считается, гибель опылителей во многом обусловлена повсеместным и не всегда контролируемым применением пестицидов. В связи с этим, сегодня, на фоне глобальной интенсификации сельскохозяйственного производства, во многих регионах мира отмечается две противоположно направленные, но одинаково опасные тенденции: сокращение численности летающих насекомых, в первую очередь относящихся к числу опылителей, и появление сверхустойчивых и мультиустойчивых популяций вредителей (фитофагов), что особенно опасно в случае насекомых с клональным размножением, как, например, тли, кокциды или трипсы, поскольку регистрация, так называемых, «суперклонов», устойчивость которых к применяемым инсектицидам превышает среднюю регистрируемую для этого вида устойчивость в сотни, а иногда и в тысячи раз, сегодня уже не является чем-то необычным. Опасность появления клона, устойчивого ко всем существующим на сегодняшний день классам инсектицидов, в связи с этим представляется вполне реальной.

Во всех случаях, когда применение инсектицидов осуществляется на открытых пространствах, особенно если речь идет об инсектицидах системного и контактного действия, своеобразным «побочным эффектом» является неизбежный контакт с пестицидом полезных насекомых, в первую очередь, пчел. Нахождение баланса между эффективностью инсектицидного агента в отношении борьбы с вредителями и, одновременно, щадящим действием препарата на других членистоногих невозможно без оценки устойчивости насекомых из целевых групп. Один из способов оценить потенциальную устойчивость к токсинам различной природы является измерение активности основных белков системы детоксикации, в частности, цитохромов р450 4-го и 6-го семейств и эстераз, отвечающих за нейтрализацию ксенобиотиков в организме насекомых. Подробному описанию методов, применяемых для оценки активности этих белков у насекомых, посвящено настоящее пособие.

ТЛИ ФАУНЫ БЕЛАРУСИ, СПОСОБНЫЕ К ФОРМИРОВАНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ К ИНСЕКТИЦИДАМ (СВОДНЫЕ ЛИТЕРАТУРНЫЕ ДАННЫЕ)

Устойчивость к инсектицидам – проблема, свойственная многим вредящим насекомым: переносчикам заболеваний человека и животных, синантропным насекомым (например, тараканам и термитам), паразитам (таким как вши, клопы, блохи), но в наибольшей степени это характерно для фитофагов, в частности, тлей, жуков-листоедов, разнообразных чешуекрылых, трипсов, кокцид, белокрылок и т.д. Как считается, легкость, с которой фитофаги формируют устойчивость к современным инсектицидам, непосредственно связана с тем, что препараты, которые в конце XX и начале XXI вв. использовались наиболее широко – пиретроиды и неоникотиноиды, являются аналогами вторичных метаболитов растений. Существование у фитофагов адаптаций, позволяющих им успешно метаболизировать пищевые субстраты, содержащие природные аналоги инсектицидов, которыми, по сути, являются вторичные метаболиты растений защитного действия, стало необходимой молекулярной базой для быстрого формирования у этих насекомых устойчивости к синтетическим инсектицидам.

Несмотря на то, что регистрация устойчивых линий тлей в самых разных регионах мира происходит все более часто, в Беларуси исследований, связанных с выявлением устойчивых микропопуляций в естественной фауне фитофагов, до сих пор не проводилось. В рамках этого пособия мы представляем список видов тлей, как являющихся обычными (фоновыми), так и инвазивными на территории Беларуси, для которых ранее в каких-либо регионах мира отмечалось появление устойчивых линий. Эти виды в афидофауне Беларуси должны представлять наибольший интерес и требуют особого внимания с точки зрения возможности появления устойчивых и сверхустойчивых линий.

К числу таких видов должны быть отнесены:

***Aphis craccivora* Koch, 1854.** Полифаг, преимущественно встречается на бобовцветных. В Европе часто отмечаются линии, устойчивые к пиретроидам, неоникотиноидам, органофосфатам, карбаматам (Swaran et al. 2004, El-Saed et al. 2009, Tang et al. 2004, Abdallah et al. 2016, Hirata 2017 и др.).

***Aphis pomi* de Geer, 1773.** Наиболее часто встречается на яблонях, грушах и других яблонных. Отмечались линии, устойчивые к органофосфатам, карбаматам, неоникотиноидам, пиретроидам (Tamas et al. 2015, Muthusamy et al. 2014, Lowery et al. 2006, Smirle et al. 2010).

***Aphis spiraecola* Patch, 1914.** Наиболее часто встречается на спирее, боярышнике, яблонях, грушах и других яблонных. Отмечались линии, устойчивые к органофосфатам, карбаматам, неоникотиноидам, пиретроидам (Tamas et al. 2015, Muthusamy et al. 2014, Lowery et al. 2006).

***Aphis gossypii* Glover, 1877.** Полифаг, встречается на множестве возделываемых растений. Всесветно отмечаются линии, устойчивые к органофосфатам, неоникотиноидам, пиретроидам, циклодиенам (Saito et al. 2000, Sun et al. 2004, Herron et al. 2011, Matsuura et al. 2014, Langfield et al. 2017, Brown et al. 2003)

***Rhopalosiphum maidis* Fitch, 1856.** Встречается на пшенице, кукурузе и других злаковых, картофеле, горохе. Отмечаются линии, устойчивые к неоникотиноидам, карбаматам, органофосфатам, пиретроидам (Sun et al. 2004, Abdallah et al. 2016, Tang et al. 2013).

***Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758).** Обычен на черемухе и разнообразных злаковых. Отмечаются линии, устойчивые к неоникотиноидам, органофосфатам, карбаматам (Chen et al. 2007).

***Acyrtosiphon pisum* Harris, 1776.** Питается на бобовых. Известны линии, устойчивые к неоникотиноидам (Tailebois et al. 2014).

***Chromaphis juglandicola* Kaltenbach, 1843.** Питаются на грецком орехе. Отмечались линии, устойчивые к органофосфатам (Brown et al. 1967).

***Drepanosiphum platanoidis* (Schrank, 1801).** Питается на клене ложноплатановом. Отмечались линии, устойчивые к органофосфатам (Addicott et al. 1979).

***Myzus cerasi* Fabricius, 1775.** Встречается на вишне, черешне, реже сливе и персике. Известны случаи устойчивости к органофосфатам (Brown et al. 1967).

***Myzus persicae* (Sulzer, 1776).** Полифаг на многих возделываемых растениях, в т.ч. в закрытом грунте. Всесветно отмечаются устойчивые линии к инсектицидам всех классов (Foster et al. 2003, Bass et al. 2015, Charaabi et al. 2016, MacKenzie et al. 2018, Margaritopoulos et al. 2007, Charaabi et al. 2018).

***Phorodon humuli* (Schrank, 1801).** Обычен на сливе, терне, черемухе. Часто обнаруживают линии, устойчивые к органофосфатам, неоникотиноидам, пиретроидам, карбаматам (Weichel et al. 2003, Nauen et al. 2005, Cranham et al. 1982, Büchi et al. 1981, Furk et al. 1988).

***Aphis fabae* s.l. Scopoli, 1763.** Обычен на калине, жасмине, бобовых, свекле, подсолнечнике. Отмечались линии, устойчивые к органофосфатам и карбаматам (Beranek et al. 1974, Foster et al. 2007).

***Aphis frangulae* Kaltenbach, 1845.** Питается на облепихе и крушине. Были отмечены линии, устойчивые к пиретроидам (Melia, 1990).

***Aphis grossulariae* Kaltenbach, 1843.** Вредит крыжовнику и смородине. Отмечаются линии, устойчивые к неоникотиноидам (Foster et al. 2007).

***Aphis idaei* van der Goot, 1912.** Питается на малине, ежевике и розах. Может быть устойчив к неоникотиноидам (Foster et al. 2007).

***Aphis nasturtii* Kaltenbach, 1843.** Питается на подсолнухах, свекле, салате. Отмечалась устойчивость к неоникотиноидам и карбаматам (Foster et al. 2007).

***Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758).** Обычен на разных видах капусты. Отмечались линии, устойчивые к органофосфатам, пиретроидам, неоникотиноидам (Ahmad et al. 2013).

***Lipaphis pseudobrassicae* Davis, 1914.** Встречаются на тыквах, капусте, редьке, пасленовых. Отмечались линии, устойчивые к органофосфатам и пиретроидам (Tang et al. 1988, Foster et al. 2007).

***Macrosiphoniella sanborni* (Gillette, 1908).** Питаются на астрах. Отмечались линии, устойчивые к органофосфатам (Gould et al. 1966).

***Macrosiphum euphorbiae* Thomas, 1878.** Может быть обнаружен на картофеле, томатах, капусте. Отмечалась устойчивость к органофосфатам, пиретроидам, карбаматам (Foster et al. 2007).

***Metopolophium dirhodum* (Walker, 1849).** Питаются на розах и шиповниках, а также разнообразных злаках. Отмечалась устойчивость к неоникотиноидам, пиретроидам (Stribley et al. 1983).

***Myzocallis coryli* (Goeze, 1778).** Встречается на лещинах. Отмечались линии, устойчивые к органофосфатам и пиретроидам (Katunda et al. 1990, Kerns et al. 1992).

***Nasonovia ribisnigri* (Mosley, 1841).** Питается на смородине и крыжовнике, цикории. Отмечалась устойчивость к карбаматам и органофосфатам (Rufingier et al. 1997, Foster et al. 2007).

***Schizaphis graminum* Rondani, 1852.** Питается на разнообразных злаках. Отмечалась устойчивость к неоникотиноидам и органофосфатам (Peters et al. 1975, Foster et al. 2007).

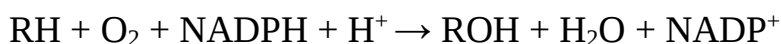
***Sitobion avenae* Fabricius, 1775.** Вредит различным злакам. Выявляются линии, устойчивые к пиретроидам и неоникотиноидам (Stribley et al. 1983).

***Therioaphis trifolii* (Monell, 1882).** Питается на клевере и люпине. Отмечается устойчивость к карбаматам и органофосфатам (Foster et al. 2007).

ОСНОВНЫЕ БЕЛКИ СИСТЕМЫ ДЕТОКСИКАЦИИ НАСЕКОМЫХ

Основными ферментами системы детоксикации насекомых являются белки, относящиеся к суперсемейству цитохромов P450 (CYP450) и эстеразы (карбоксил-эстеразы). Отличительной особенностью этих белков является их способность к реактивному возрастанию экспрессии при попадании в организм насекомого токсичных веществ и, кроме того, увеличение числа копий генов, кодирующих CYP450 и эстеразы, в процессе эволюции, происходящей под действием естественного отбора в условиях инсектицидного пресса.

Цитохромы P450 относятся к классу гемопротеинов и обычно выполняют роль терминальных оксидаз в монооксигеназных системах. В клетках CYP450 связаны с внутриклеточными мембранными структурами, что во многом определяет их активность. CYP450 катализируют перенос одного атома молекулярного кислорода на субстрат с образованием молекулы воды, что происходит в присутствии NADPH. Данный процесс описывается уравнением:



Перенос атома кислорода, однако, не является единственной каталитической функцией ферментов суперсемейства CYP450. Они также проявляют активность как оксидазы, редуктазы, десатуразы, изомеразы и т.д. Большинство CYP450 обладают широкой субстратной специфичностью. У насекомых CYP450, относящиеся к семействам 4 и 6, нейтрализуют множество токсичных веществ различной природы, в т.ч. инсектициды из группы неоникотиноидов, органофосфатов, пиретроидов и др. При этом число активных генов CYP450 у насекомых сильно варьируется (от 36 у *Pediculus humanus*, до 170 у *Culex quinquefasciatus*).

Эстеразы и карбоксил-эстеразы, это ферменты класса гидролаз, катализирующих в клетках гидролитическое расщепление сложных эфиров на спирты и кислоты при участии молекул воды.

Неспецифические эстеразы выполняют важные функции в организме насекомых, такие как осуществление катаболизма эфиров высших жирных кислот, активно происходящий в летательных мышцах и

обеспечивающий полет насекомого; мобилизация липидов, в том числе жиров в жировом теле; деградация метаболически инертных эфиров, в том числе и разнообразных ксенобиотиков. Широкая субстратная специфичность эстераз позволяет им играть значительную роль в трансформации токсинов различного происхождения, в том числе, инсектицидов, содержащих в молекуле действующего вещества сложноэфирные связи. Эстеразы участвуют в формировании устойчивости насекомых к органофосфатным соединениям, карбаматам и пиретроидам, обычно сопровождаемую усилением экспрессии генов эстераз, амплификацией генов и увеличением числа их копий в геноме.

CYP450, эстеразы и карбоксил-эстеразы, действуя совместно, способны обеспечивать мультирезистентность насекомых к инсектицидам, под которой обычно понимают способность клона (линии) насекомых успешно выживать при действии инсектицидов, принадлежащих к самым разным классам химических веществ, что, как считается, обусловлено общей широкой субстратной специфичностью ферментов и значительным усилением их экспрессии при попадании в организм насекомого различных ксенобиотиков. Поскольку существует зависимость между количеством фермента, находящегося в клетке, и эффективностью биodeградации ксенобиотиков, в частности, инсектицидов, измерение количества активных ферментов в тканях насекомого может служить косвенным указанием на «готовность» тканей насекомого к эффективной деградации инсектицидов. В соответствии с общепринятыми представлениями, устойчивость к инсектицидам у насекомых находится в прямой зависимости с активностью CYP450 и эстераз в тканях насекомых.

ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ ТЛЕЙ И ДРУГИХ НАСЕКОМЫХ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУР450 И ЭСТЕРАЗ

Приготовление реактивов и рабочих растворов

Для измерения активности СУР450 в тканевых гомогенатах насекомых:

1. 50 мМ Нерес pH 7,0 (11,9 г Нерес на 1 л дистиллированной воды).
2. 50 мМ фосфатный буфер pH 7,2 (68,4 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 31,6 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ на 886,6 мл H_2O).
3. Субстратный раствор – 0,4 мМ 7-этоксикумарина в фосфатном буфере (50 мМ pH 7,2) (0,076 г 7-этоксикумарина на 1 л фосфатного буфера).
4. Глицин-этаноловый буфер, pH 10,4 (375 мг глицина на 25 мл H_2O , 154,4 мг NaOH на 19,3 мл H_2O , 55,7 мл H_2O , 100 мл 96% этанола).

Для выделения общего белка и измерения активности эстераз в смеси общего белка насекомых:

1. 50 мМ натрий-фосфатный буфер pH 7,2 (см. выше).
2. 1% раствор Тритон-Х в натрий-фосфатном буфере.
3. Субстратный раствор флуоресцеина диацетата (2 мг флуоресцеина диацетата на 1 мл ацетона).
4. Краситель Кумасси (10 мг Coomassie Brilliant Blue G-250 (C.I. 42655), 5 мл 95% этанола, 10 мл 95% H_3PO_4 на 85 мл дистиллированной воды).

Измерение активности СУР450 в тканях насекомых

1. Навеску биологического материала массой 1–3 мг залить 150 мкл Нерес-буфера. Тщательно гомогенизировать с помощью пестика.
2. Гомогенизированный образец внести в лунку 96-луночного непрозрачного плоскодонного планшета.
3. В каждую лунку с гомогенатом добавить 150 мкл субстратного раствора 7-этоксикумарина.
4. В контрольные лунки, не содержащие тканевой гомогенат, внести 150 мкл Нерес-буфера и 150 мкл субстратного раствора.
5. Планшет поместить в термостат для инкубации при 37 °C в течение 4 ч.

6. Остановить реакцию добавлением в каждую лунку 100 мкл глицин-этанолового буфера.

7. Измерить активность флуоресценции образовавшихся продуктов реакции на спектрофлуориметре с использованием следующих параметров: длина волны испускания – 498 нм, длина волны поглощения – 517 нм.

Выделение общего белка из тканей насекомых и измерение активности эстераз

В отличие от цитохромов р450, которые являются мембранными белками и потому оценка их активности возможна только в составе микросом, эстеразы могут быть выделены в пуле общего белка, после чего проводится их измерение. Выделение белка и дальнейшую работу с ним проводят по следующему протоколу:

1. Навеску биологического материала массой 1–3 мг залить 200 мкл свежеприготовленного раствора тритона X и тщательно гомогенизировать при помощи пестика. Объем раствора тритона X довести до 1 мл.

2. Центрифугировать тканевой гомогенат в течение 10 мин при 10 000 оборотов в мин.

3. Отобрать 200 мкл супернатанта в чистые пробирки. Супернатант представляет собой раствор общего белка неизвестной концентрации.

4. Внести в лунки 96-луночного непрозрачного плоскодонного планшета следующие реактивы: 149 мкл натрий-фосфатного буфера, 50 мкл раствора общего белка и 1 мкл субстратного раствора.

5. В контрольные лунки внести 199 мкл натрий-фосфатного буфера и 1 мкл субстратного раствора (флуоресцеин диацетат);

6. Инкубировать в термостате при 37 °С в течение 30 мин. По истечении времени инкубации немедленно приступить к измерению активности флуоресценции.

6. Измерить активность флуоресценции продукта реакции при следующих условиях: длина волны испускания – 390 нм, длина волны поглощения – 460 нм.

7. Для проведения дальнейших расчетов необходимо определить количество общего белка в растворе после выделения, что осуществляют по методу Брэдфорда (см. ниже).

Измерение количества общего (выделившегося) белка в растворе

Для построения калибровочной прямой и расчета содержания белка в растворе приготовить серию стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина (БСА):

1. Приготовить стоковый раствор БСА растворением 2 мг в 1 мл дистиллированной воды.
2. Приготовить рабочие растворы БСА с заданной концентрацией (табл. 1):

Таблица 1

Концентрации рабочих растворов БСА

Концентрация раствора, мкг/мл	Стоковый раствор БСА, мкл	Вода, мкл
1	0,5	49,5
2	1	49
4	2	48
6	3	47
8	4	46
10	5	45
20	10	40

3. В ряд пробирок внести по 1,5 мл раствора Кумасси и 50 мкл рабочего раствора БСА с заданной концентрацией, производя, таким образом, серию разведений.

4. В контрольные пробирки вместо раствора белка внести 50 мкл дистиллированной воды.

5. В пробирки для измерений аналогично внести 1,5 мл раствора Кумасси и 50 мкл раствора общего (выделенного, концентрацию которого нужно установить).

6. Измерить оптическую плотность во всех пробах при длине волны 595 нм.

7. По результатам измерения оптической плотности растворов с заданной концентрацией белка (БСА) построить калибровочную прямую.

ПРОВЕДЕНИЕ РАСЧЕТОВ

Активность цитохромов р450 в тканях насекомых

Подсчет результатов, полученных при измерении активности флуоресценции в пробах (тканевых гомогенатов) насекомых осуществляется по формуле:

$$\frac{\text{Акт. флуор. опыт. обр.} - \text{Акт. флуор. контроля}}{\text{Вес, мг}}$$

Активность флуоресценции измеряется в относительных единицах флуоресценции (о.е.ф.)

Количество общего белка и активность эстераз

Исходя из графика калибровочной прямой получить уравнение калибровочной прямой, по которому будет производиться расчет активности эстераз.

1. Рассчитать концентрацию белка в 1 мл раствора, используя уравнение калибровочной кривой, где y – значение оптической плотности анализируемого раствора, x – концентрация белка в 1 мл.

3. Используя полученное значение концентрации белка в 1 мл раствора, рассчитать концентрацию белка в 200 мкл раствора, затем в 50 мкл раствора (значения используются в последующих формулах).

4. От значения активности флуоресценции белка в опытной пробе отнять значение активности флуоресценции в контрольной пробе.

5. Рассчитать концентрацию белка в 1 г насекомого по формуле:

$$\frac{\text{Концентрация белка в 200 мкл раствора}}{\text{Вес, г}}$$

6. Рассчитать активность флуоресценции на 1 г белка по формуле:

$$\frac{x \times y}{z},$$

где x – значение активности флуоресценции белка в опытной пробе минус значение флуоресценции в контрольной пробе, y – концентрация белка в 1 г насекомого, z – концентрация белка в 50 мкл раствора.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. A Microfluorometric Method for Measuring Ethoxycoumarin-O-deethylase Activity on Individual *Drosophila melanogaster* Abdomens: Interest for Screening Resistance in Insect Populations / G. Desousa [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 1995. – Vol. 229, n. 1. – P. 86–91.
2. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72, n. 1-2. – P. 248–254.
3. Després, L. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals / L. Després, J.-P. David, C. Gallet // *Trends in Ecology & Evolution*. – 2007. – Vol. 22, n. 6. – P. 298-307.
4. Energetic costs of detoxification systems in herbivores feeding on chemically defended host plants: a correlational study in the grain aphid, *Sitobion avenae* / L.E. Castaneda [et al.] // *Journal of Experimental Biology*. – 2009. – Vol. 212, n. 8. – P. 1185–1190.
5. He, X. A continuous spectrophotometric assay for the determination of diamondback moth esterase activity / X. He // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 2003. – Vol. 54, n. 2. – P. 68–76.
6. Microplate Adaptation of Gomori's Assay for Quantitative Determination of General Esterase Activity in Single Insects / O. Dary [et al.] // *Journal of Economic Entomology*. – 1990. – Vol. 83, n. 6. – P. 2187–2192.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ТЛИ ФАУНЫ БЕЛАРУСИ, СПОСОБНЫЕ К ФОРМИРОВАНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ К ИНСЕКТИЦИДАМ (СВОДНЫЕ ЛИТЕРАТУРНЫЕ ДАННЫЕ).....	4
ОСНОВНЫЕ БЕЛКИ СИСТЕМЫ ДЕТОКСИКАЦИИ НАСЕКОМЫХ.....	8
ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ ТЛЕЙ И ДРУГИХ НАСЕКОМЫХ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СYP450 И ЭСТЕРАЗ.....	10
Приготовление реактивов и рабочих растворов.....	10
Измерение активности СYP450 в тканях насекомых.....	10
Выделение общего белка из тканей насекомых и измерение активности эстераз	11
Измерение количества общего (выделившегося) белка в растворе ...	12
ПРОВЕДЕНИЕ РАСЧЕТОВ.....	13
Активность цитохромов р450 в тканях насекомых	13
Количество общего белка и активность эстераз	13
СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	14

Учебное издание

Воронова Нина Владимировна
Корбут Алина Витальевна
Астрамович Вероника Анатольевна и др.

**ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ И ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТИ
ЦИТОХРОМОВ P450 И ЭСТЕРАЗ У ТЛЕЙ
И ДРУГИХ НАСЕКОМЫХ**

Учебные материалы для студентов специальностей
1-31 01 01 «Биология (по направлениям)» направления специальности
1-31 01 01-03 Биология (биотехнология)

В авторской редакции

Ответственный за выпуск *Н. В. Воронова*

Подписано в печать 03.12.2018. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,53. Тираж 50 экз. Заказ

Белорусский государственный университет.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Отпечатано с оригинал-макета заказчика
на копировально-множительной технике
биологического факультета
Белорусского государственного университета.
Ул. Курчатова, 10, 220064, Минск.