

УДК 577.151.3

© 1991 г.

А.А. В. КОНАРЕВ, Ю. В. ФОМИЧЕВА

**ПЕРЕКРЕСТНЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ
 α -АМИЛАЗ И ПРОТЕИНАЗ НАСЕКОМЫХ С БЕЛКОВЫМИ
ИНГИБИТОРАМИ ИЗ ЭНДОСПЕРМА ПШЕНИЦЫ**

Ключевые слова: насекомые, α -амилазы, протеиназы; пшеница, эндосперм, ингибиторы α -амилаз, ингибиторы трипсина, химотрипсина и тиоловых протеиназ.

У восьми видов насекомых, повреждающих зерно злаков или зернопродукты, изофокусированием в ПААГ изучен компонентный состав пищеварительных протеиназ, гидролизующих желатину, N α -бензоил-DL-аргинин-D-нитроанилид (БАПНА), ацетил-DL-фенилаланин-2-нафтиловый эфир (АФНЭ), а также α -амилаз. С помощью новых, «перекрестных» методов проведен анализ взаимодействия компонентов α -амилаз и протеиназ с белковыми ингибиторами из эндосперма пшеницы. Показано, что компонентный состав комплексов протеиназ насекомых характеризуется четко выраженной видовой специфичностью. Компоненты спектров различаются по способности гидролизовать белковые и синтетические субстраты и по отношению к ингибиторам трипсина, химотрипсина и тиоловых протеиназ. Сведения, полученные предложенными методами, могут использоваться для предварительной «классификации» индивидуальных фракций ферментов перед их более детальными исследованиями, а также при оценке возможной защитной роли ингибиторов в связи с особенностями комплексов пищеварительных гидролаз у разных видов насекомых.

Белковые ингибиторы α -амилаз и протеиназ считаются одним из факторов, обеспечивающих защиту растений от насекомых и микроорганизмов [1—4]. Определение роли ингибиторов в защите пшеницы и других злаков от вредителей затрудняется слабой изученностью пищеварительных ферментов у многочисленных видов насекомых, питающихся зерном или вегетативными органами, а также отсутствием простых методов анализа.

В эндосперме пшеницы выявлены ингибиторы α -амилаз насекомых и млекопитающих [1, 5, 6], ингибиторы трипсина (ИТ), α -химотрипсина (ИХт), химотрипсина-субтилизина (ИХт-Ст), эндогенной α -амилазы-субтилизина (ИА-Ст) и тиоловых протеиназ [4—9]. При изоэлектрофокусировании (ИЭФ) белков эндосперма в ПААГ и последующем выявлении ингибиторов по активности с помощью соответствующих методов [6, 8] указанные типы ингибиторов дают характерные спектры [10]. Это позволяет, в частности, сопоставляя спектры ингибиторов гидролаз-стандартов и гидролаз различного происхождения, «классифицировать» анализируемые ферменты по отношению к ингибиторам. Таким образом были охарактеризованы некоторые протеиназы насекомых и растений [8, 9]. Однако данный подход требует выделения индивидуальных фракций ферментов, что весьма трудоемко и не всегда оправдано. Известно, что множественность компонентов спектра ферментов

кубировали в течение 1 ч при 38° [8, 9]. При использовании синтетических субстратов (а иногда и фото пленки) снимали реплику с геля на нитроцеллюлозную мембрану Millipore 0,45 в течение 15 мин.

Для работы с *n*-нитроанилидом α -бензоил-DL-аргинина (БАПНА, «Serva») применяли модифицированный нами метод Олссона и др. [12]. Нитроцеллюлозную реплику инкубировали в растворе, содержащем 0,4 мл 1%-ного раствора БАПНА в диметилсульфоксиде (ДМСО) и 8 мл 0,1 М Na_2HPO_4 с 0,001 М ЭДТА и 0,002 М цистеином (рН 8,0), в течение 1 ч при 38°. Реплику переносили в раствор 0,1%-ного NaNO_2 в 1 н. HCl на 10 мин, ополаскивали в воде и погружали в 0,05%-ный раствор орцинола («Calbiochem», Англия) в 0,1 М Na_2HPO_4 , рН 9,0. Компоненты протеиназ проявлялись в виде желто-оранжевых полос. Влажную реплику фотографировали с синим светофильтром. Нитроцеллюлоза необходима для фиксации легко растворимого *n*-нитроанилина. Орцинол мы применили вместо N(1-нафтил)этилендиамина [12] ввиду его большей доступности, а также потому, что это облегчает длительное хранение высушенных препаратов.

Для анализа протеиназ с ацетил-DL-фенилаланин-2-нафтиловым эфиром (АФНЭ, «Sigma», США) применяли описанный ранее модифицированный нами метод [13]. Нитроцеллюлозную реплику инкубировали 30 мин при 38° в растворе, содержащем 0,2 мл 1%-ного АФНЭ в ДМСО, 2 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера, рН 7,0, и 0,1 мл 1%-ного красителя Fast B («Serva»). Ингибиторы протеиназ выявляли методом желатиновых реплик [7, 8].

Для анализа взаимодействия компонентов α -амилаз и ингибиторов на разные гели наносили широкими полосами с помощью бумажных полосок препараты α -амилаз и фракций белков, содержащих ингибиторы, и проводили ИЭФ. На гель с разделенными ингибиторами помещали ПААГ-реплику (такую же, как и при выявлении α -амилаз), а затем ее «перекрестно» накладывали на гель с α -амилазами, инкубировали 20 мин при 38°, рН 5,5 и помещали в раствор иода.

Протеиназы и ингибиторы также наносили на гели широкими полосами. С геля, в котором разделялись белки зерна, снимали реплику на фото пленку в течение 20 мин, после чего ее накладывали на гель с протеиназами так, чтобы компоненты белков зерна и протеиназ пересекались под прямым углом, и инкубировали 1 ч при 38° (метод использовался преимущественно для «кислых» протеиназ). В другом варианте, дававшем более стабильные результаты при работе с трипсино- и химотрипсиноподобными протеиназами, желатиновую реплику-фото пленку с геля с ингибиторами «перекрестно» накладывали на нитроцеллюлозную реплику с геля с протеиназами, смоченную буфером с рН, оптимальным для протеиназ, и инкубировали 1 ч при 38°. В упрощенном варианте на фото пленку накладывали бумажные полоски шириной 1–2 мм и длиной, достаточной для перекрытия всех компонентов спектра протеиназ, смоченные растворами обогащенных белковых ингибиторов (1 мг/мл). Через 15 мин фото пленку накладывали на гель с протеиназами так, чтобы следы от бумажных полосок пересекались с компонентами спектров, и инкубировали 1 ч при 38°.

Ингибиторы трипсина и химотрипсина из эндосперма мягкой пшеницы обогащали аффинной хроматографией [7, 8]. Активность препаратов ингибиторов трипсина из эндосперма сорта «Саратовская 33» составляла 2,1 мг трипсина на 1 мг белка. Активность соевого ингибитора трипсина (СИТ) («Serva») в тех же условиях составила 1,8 мг трипсина на 1 мг белка.

Активность протеиназ и ингибиторов определяли по гидролизу БАПНА в 0,05 М трис-HCl-буфере, рН 7,8, и азоказеина в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, рН 5,0 и 8,0, с 0,001 М ЭДТА и 0,002 М цистеином микрометодами в 96-луночных планшетах [4]. Активность по БАПНА выражали в мкмоль *n*-нитроанилина на 1 мл за 1 мин при 38° (ед.).

Препаративное фракционирование протеиназ насекомых проводили в геле Ultrodex («LKB») [8]. Протеиназы гомогената имаго зернового точильщика выделяли также аффинной хроматографией на СИТ-агарозе («Sigma»). На колонку с гелем объемом 0,5 мл наносили 5 мл экстракта из гомогената (0,5 ед. БАПНА в 1 мл). Через колонку пропускали по 2,5 мл экстрагента, 0,05 М трис-HCl-буфера, рН 7,8, с 0,2 М NaCl и вновь экстрагента. Протеиназы элюировали 0,01 н. NaOH, рН 11, нейтрализовали добавлением HCl и разделяли методом ИЭФ в геле Ultrodex («LKB»).

Концентрацию белка определяли по связыванию красителя кумасси G-250 [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 в качестве примера показаны результаты перекрестного анализа взаимодействия компонентов α -амилаз зернового точильщика с компонентами белковых ингибиторов. Очевидно, что основные компо-

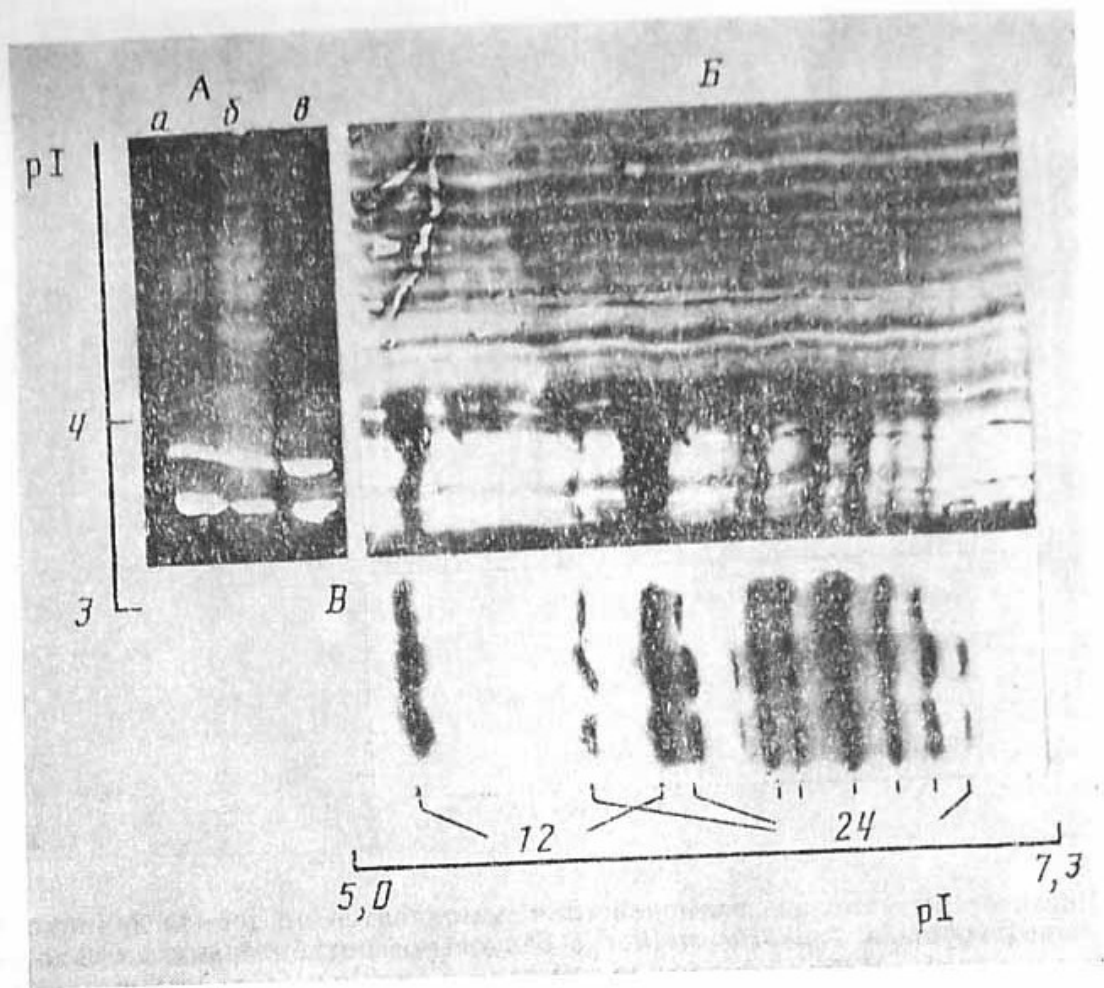


Рис. 1. Перекрестный анализ взаимодействия компонентов α -амилаз зернового точильщика *Rhyssopertha dominica* с белковыми ингибиторами из эндосперма мягкой пшеницы сорта «Безостая 1»: А – ИЭФ α -амилаз рН 3–7; В – спектр α -амилаз гомогената имаго и кишечника личинки (а) в интервале рН 3–7; В – спектр α -амилаз гомогената имаго после перекрестного взаимодействия с компонентами белков 5-кратного водного экстракта из эндосперма (4 мкг белка на 1 мм полосы нанесения); В – спектры ингибиторов, выявленные после ИЭФ белков эндосперма (рН 5–8) α -амилазой личинки *T. molitor* (контроль). Нанесено по 5–10 мкг белков эндосперма на трек, 12 и 24 – молекулярные массы компонентов ингибиторов в кДа [6, 10]

ненты α -амилаз с рI в области от 3,0 до 4,0, выявляемые как в экстрактах из кишечника, так и в гомогенатах, ингибируются одними и теми же компонентами альбуминов зерна с молекулярными массами 12 и 24 кДа [5, 6]. Здесь в качестве контроля использовали реплику с геля с белками зерна, проявленную суммарным препаратом α -амилазы личинки большого мучного хрущака – наиболее типичной и изученной α -амилазой насекомого [5, 15]. Компоненты с рI > 4,5, также гидролизующие крахмал, в этих условиях с ингибиторами не реагировали. Данные амилазы присутствуют в основном в экстрактах из гомогената и относительно менее интенсивны в экстрактах из кишечника.

Кишечные α -амилазы амбарного долгоносика и ряда других видов насекомых ингибируются теми же компонентами белков зерна, что и α -амилазы точильщика и хрущака. В свою очередь все компоненты спектра α -амилаз слюны человека реагировали лишь с компонентами альбуминов с молекулярными массами 24 и 60 кДа (на рис. 1 не показано). Таким образом, предложенный подход позволяет оценивать компоненты сложных спектров α -амилаз насекомых и других организмов по отношению к ингибиторам. Конечно, это в первую очередь качественный

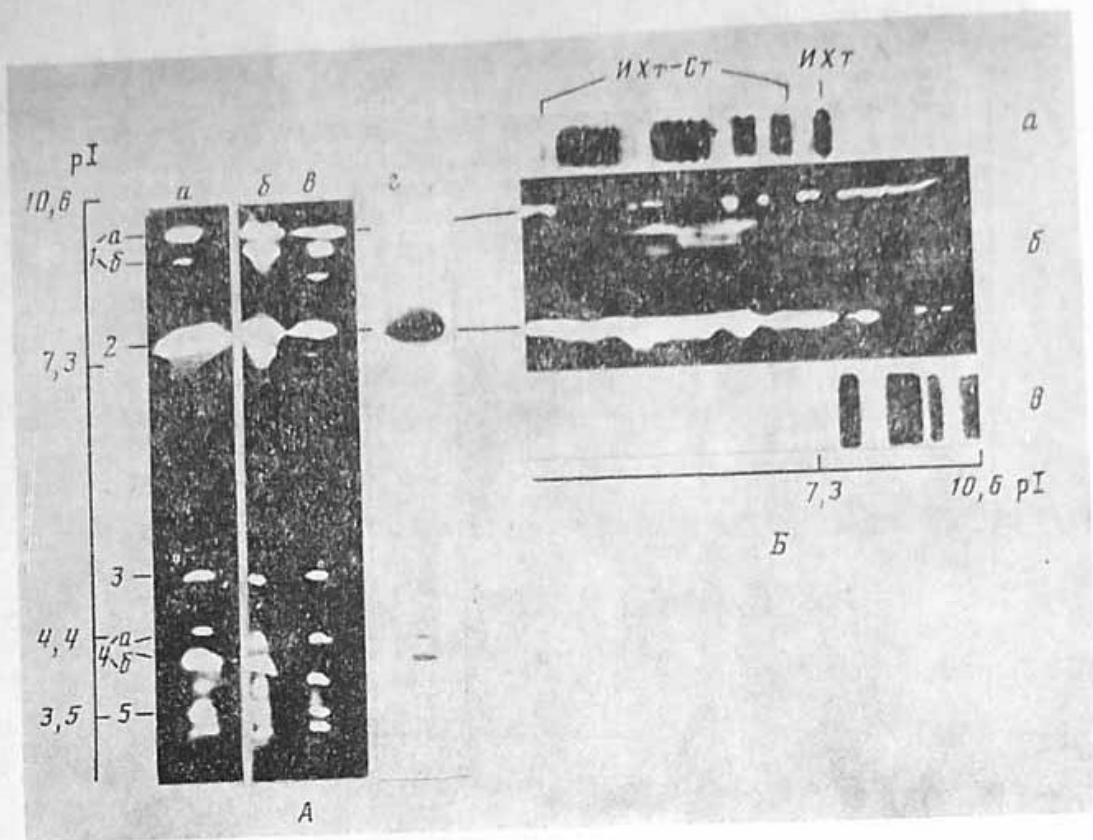


Рис. 2. Перекрестный анализ взаимодействия компонентов протеиназ личинки большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* с белковыми ингибиторами из эндосперма мягкой пшеницы: А – ИЭФ протеиназ из гомогената личинок (а, в) и кишечника имаго (б) и личинок (в) в интервале рН 3–10. Нанесено по 10 мкл экстрактов компонентов протеиназ; а, б, в – протеиназы выявлены по гидролизу желатины фото пленки, г – по БАПНА. Б – Спектр протеиназ после взаимодействия с компонентами белков эндосперма (б) (вертикальное направление – ИЭФ протеиназ, горизонтальное – ИЭФ белков эндосперма (20 мкг на 1 мм полосы)), а – желатиновая реплика, проявленная химотрипсином, в – трипсином быка (контроль)

метод, но в известных пределах он может использоваться для ориентировочной оценки специфичности взаимодействия различных α -амилаз с ингибиторами. Для этого препараты разных α -амилаз наносят на гель в количествах, обеспечивающих примерно одинаковую интенсивность компонентов, проявленных в сходных условиях (оценивается визуально). Для получения одинаковых картин «перекрестного» взаимодействия разных α -амилаз с ингибиторами необходимы различные количества ингибиторов. Так, если для чувствительной α -амилазы *T. molitor* достаточно ингибиторов, содержащихся в пятикратном водном экстракте из эндосперма мягкой пшеницы (2 мкг белка на 1 мкл) при нанесении 0,5 мкл на 1 мм полосы, то для α -амилаз зернового точильщика необходимо использование в 2–4 раза большего количества препарата ингибиторов, а для α -амилаз кишечника вредной черепашки — больше чем в 10–20 раз. Это соответствует чувствительности указанных α -амилаз к ингибиторам, определенной обычными методами [5, 16].

На рис. 2 показаны спектры пищеварительных протеиназ большого мучного хрущака *T. molitor* и результаты взаимодействия их отдельных компонентов с компонентами ингибиторов, содержащимися в водном экстракте белков эндосперма (2 мкг/мкл, 20 мкг белка на 1 мм полосы нанесения). Здесь использовали смесь (1:1) экстрактов из эндосперма сортов «Безостая 1» и «Диамант», поскольку первый характеризуется

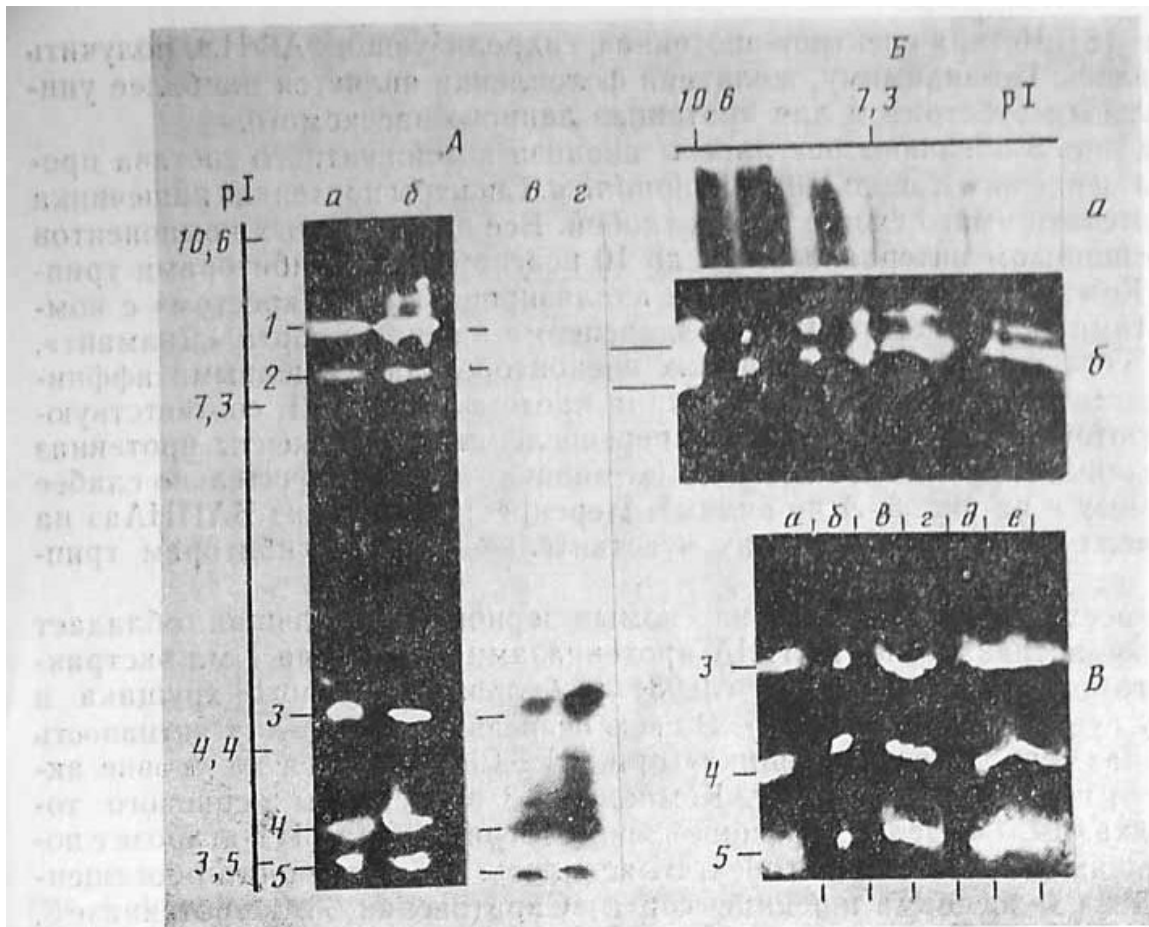


Рис. 3. Перекрестный анализ взаимодействия компонентов протеиназ зернового точильщика *R. dominica* с белковыми ингибиторами из эндосперма мягкой пшеницы. А — ИЭФ протеиназ гомогената (*a, в, з*) и кишечника имаго (*б*, 1 орган на 40 мкл) в интервале рН 3–10. Нанесено по 10 мкл. *a, б* — протеиназы выявлены по гидролизу желатины фотопленки, *в, з* — по БАПНА. Б — Компоненты 1 и 2 протеиназ после взаимодействия с белками эндосперма мягкой пшеницы сорта «Диамант», разделенными методом ИЭФ (*б*), *a* — контроль ИЭФ белков эндосперма, реплика проявлена трипсином. В — Компоненты протеиназ 3–5, выявленные фотопленкой, предварительно обработанной растворами ингибиторов по полосам *a–e*: *a, б* — обогащенные ИТ эндосперма, *в* — ингибиторы химотрипсина эндосперма, *з* — СИТ (все по 1 мг на 1 мл), *д* — 0,002 М *n*-ХМБ, *e* — вода

более высокой активностью ингибиторов химотрипсина, а второй — трипсина. (Активность ингибиторов на 1 мл смеси ~80 мкг химотрипсина и 40 мкг трипсина.) Компонентный состав протеиназ, выделенных из кишечника личинок и имаго и гомогената личинок, качественно сходен (рис. 2, А). Это позволило использовать в перекрестном анализе протеиназы гомогената. Очевидно, что компонент протеиназы 1а реагирует с компонентами спектра ингибиторов химотрипсина — ИХт-Ст и ИХт, а компонент 2 — с ингибиторами трипсина. Последний, кроме того, гидролизует БАПНА (рис. 2, А, Г), широко применяемый субстрат для трипсина. По-видимому, компонент 1а — химотрипсиноподобная протеиназа, а 2 — трипсиноподобная. Можно отметить, что трипсиноподобные ферменты у *T. molitor* описаны и другими авторами [16]. Компоненты с относительно слабой БАПНАзной активностью выявляются и в зоне спектра с рН ~4,0. Возможно, это также трипсиноподобные протеиназы. Ранее среди «кислых» компонентов протеиназ *T. molitor*, гидролизующих желатину, были выявлены ферменты, чувствительные к ингибиторам тиоловых про-

тенназ [8]. Четких спектров протеиназ, гидролизующих АФНЭ, получить не удалось. По-видимому, желатина фотопленки является наиболее универсальным субстратом для протеиназ данного насекомого.

На рис. 3 показаны результаты анализа компонентного состава протеиназ зернового точильщика *R. dominica*. Спектры протеиназ кишечника и гомогената имаго сходны между собой. Все пять главных компонентов с рI в широком интервале от 3,5 до 10 реагируют с ингибиторами трипсина. Компоненты протеиназ 1 и 2 анализировали «перекрестом» с компонентами ИЭФ спектра белков эндосперма пшеницы сорта «Диамант», а 3 и 5 — с фракциями пшеничных ингибиторов, обогащенными аффинной хроматографией, и СИТ. Реакция протекала при рН, соответствующих изоточкам компонентов. Все перечисленные компоненты протеиназ точильщика гидролизуют БАПНА (компоненты 1 и 2 значительно слабее остальных и на рис. 3, А не видны). Перекрестный анализ БАПНАаз на нитроцеллюлозе подтвердил их чувствительность к ингибиторам трипсина.

Из всех изученных видов насекомых зерновой точильщик обладает наиболее активными по БАПНА протеиназами (0,5 ед. на 1 мл экстракта из гомогената имаго против 0,034 у большого мучного хрущака и 0,028 у суринамского мукоеда). В свою очередь по азоказеину активность протеиназ зернового точильщика (при рН 8,0) находится на уровне активности протеиназ *T. molitor*. Компонент 3 протеиназы зернового точильщика был выделен аффинной хроматографией на СИТ-агарозе с последующим ИЭФ в геле Ultrodex. Выяснилось, что активность обогащенных ИТ из эндосперма пшеницы сорта «Саратовская 33» к протеиназе 3, выраженная через активность фермента по БАПНА, составила 24 ед/мг, а активность СИТ — 21 ед/мг против 2,7 и 2,3 ед/мг в отношении трипсина. Возможно, такое большое различие в величинах активности ингибиторов объясняется повышенной (по сравнению с трипсином) специфичностью протеиназы точильщика к БАПНА. Все компоненты протеиназ зернового точильщика имели рН-оптимум 8,0 и выше (по БАПНА, азоказеину, а также при визуальной оценке по желатине фотопленки).

Для комплекса протеиназ малого и булавоусого хрущака *Tr. confusum* и *Tr. castaneum* рН-оптимум по азоказеину (и по желатине) был в области 5,0. Основная активность по желатине (визуально) приходилась на компоненты с рI от 3,0 до 5,0 (рис. 4, А). Ранее было показано [9], что «кислые» компоненты протеиназ *Tr. confusum*, гидролизующие желатину и выделенные препаративным ИЭФ, ингибируются теми же компонентами белков эндосперма, что и папани, а также тиоловая протеиназа прорастающего зерна пшеницы. (Эти белки, обозначенные как ингибиторы тиоловых протеиназ, имеют молекулярную массу ~11—12 кДа [11].) На этом основании препарат «кислых» протеиназ *Tr. confusum* был использован для контроля при работе перекрестным методом (рис. 4, Б). Для характеристики препарата укажем, что при использовании в качестве субстрата азоказеина при рН 5,0 ни ИТ пшеницы, ни СИТ в концентрации в реакционной смеси до 200 мкг/мл не оказывали влияния на активность протеиназ. По-видимому, подобные протеиназы были выделены из кишечника *Tr. confusum* и другими авторами [17—19].

На рис. 4 показаны картины перекрестного взаимодействия «кислых» компонентов протеиназ *Tr. confusum* и *Tr. castaneum* с компонентами белков эндосперма мягкой пшеницы, выделенными 2 М мочевиной разделенными методом ИЭФ в ПААГ. Очевидно, что компоненты ?

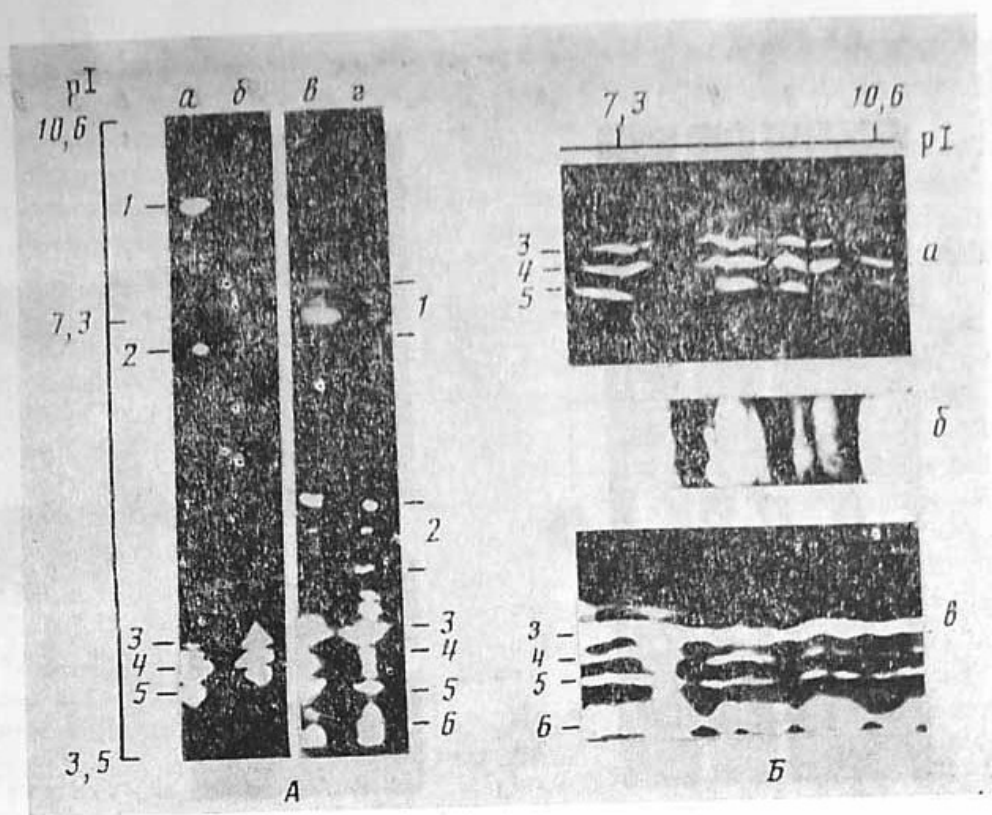


Рис. 4. Анализ компонентов протеиназ малого мучного (*Tribolium confusum*) и булавоусого (*Tr. castaneum*) хрущаков по отношению к белковым ингибиторам: А — ИЭФ протеиназ личинок малого мучного хрущака (а, б) и булавоусого хрущака (в, г); а, в — кишечники (10 органов на 100 мкл), б, г — гомогенаты (нанесено по 10 мкл на трек, протеиназы выявлены по гидролизу желатины фотопленки); Б — перекрестное взаимодействие компонентов протеиназ 3–5 малого мучного (а) и 3–6 булавоусого (в) хрущаков с компонентами белков эндосперма мягкой пшеницы сорта «Диамант», разделенными методом ИЭФ; б — желатиновая реплика с геля после ИЭФ белков эндосперма, проявленная препаратом «кислых» протеиназ малого мучного хрущака

Tr. confusum и компоненты 4–6 *Tr. castaneum* ингибируются одинаковыми компонентами белков пшеницы. Четкого ингибирования компонента 3 протеиназы *Tr. castaneum* не наблюдается, возможно, вследствие его высокой активности (количества ингибитора недостаточно). Не исключено также, что это протеиназа иной природы. «Кислые» протеиназы данных видов, гидролизующие желатину, в этих же условиях не реагировали с ингибиторами трипсина и химотрипсина (реакция проходила при рН, соответствующих изоточкам компонентов). В спектрах протеиназ обоих видов хрущаков в области рН от 3,5 до 5,0 выявлялись также относительно слабые компоненты, гидролизующие БАПНА и АФНЭ, которые реагировали с препаратами ИТ пшеницы и СИТ (на рис. 4 не показаны).

Слабые «щелочные» компоненты протеиназ данных видов насекомых гидролизуют только желатину. Результаты перекрестного анализа указывают на их возможную химотрипсиноподобную природу.

Ранее было показано, что «щелочные» компоненты протеиназ амбарного и рисового долгоносиков являются химотрипсиноподобными [8]. Это подтвердил и перекрестный анализ.

Перекрестный метод показал, что главные компоненты кишечных протеиназ суринамского мукоеда *O. surinamensis* с рН ~ 5,5–6,0, гидро-

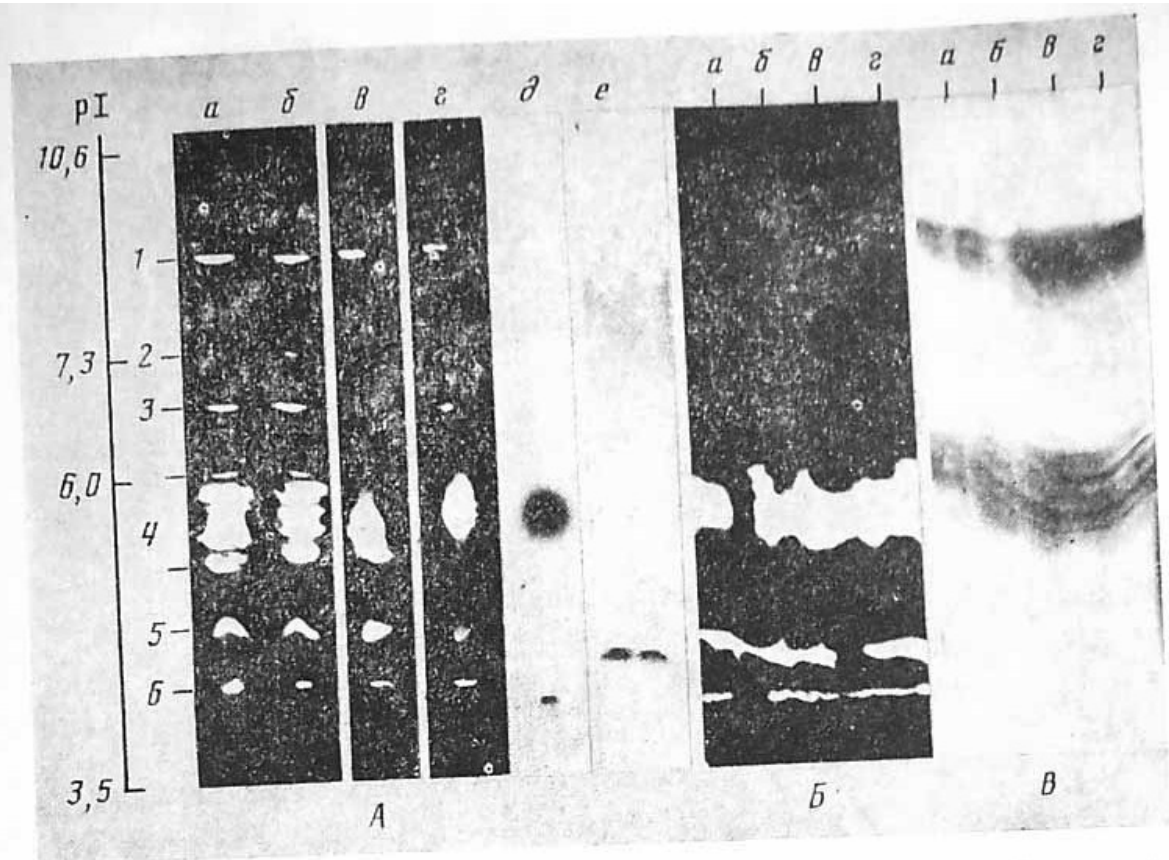


Рис. 5. Анализ протеиназ суринамского мукоеда *O. surinamensis* (А, Б) и вредной черепашки *E. integriceps* (В) по субстратной специфичности и отношению к ингибиторам: А – ИЭФ протеиназ гомогената личинок (а) и имаго (б, д, е) кишечника имаго (е) и личинок (з) (по 10 органов на 50 мкл) в интервале рН 3–10 (а–г – протеиназы выявлены по гидролизу желатины фотопленки, д – БАПНА, е – АФНЭ); Б – перекрестный анализ взаимодействия компонентов протеиназ 4–6 с фракциями ингибиторов: а – обогащенные ИТ эндосперма, б – вода, в – ингибиторы химотрипсин-ингибиторов; В – ИЭФ протеиназ кишечника вредной черепашки (протейна эндосперма, з – n-XMB; 20 органов на 100 мкл, нанесено 20 мкл экстракта на 1 мм полосы): а–г – полоски бумаги, смоченные растворами ингибиторов и наложенные на нитроцеллюлозную реплику перед проявлением; а – ИТ эндосперма, б – СИТ, в – ингибиторы химотрипсина эндосперма, з – вода

лизующие желатину, ингибируются эндоспермальными ИТ и СИТ и способны также гидролизовать БАПНА. Активность по АФНЭ приходится на другой компонент с более низкими рI (рис. 5, А).

Протеиназы кишечника вредной черепашки *E. integriceps* очень слабо гидролизовали желатину и БАПНА, но проявляли заметную активность по АФНЭ (рис. 5, В). Перекрестный анализ (полоски с ингибиторами накладывали на нитроцеллюлозную реплику перед проявлением) показал, что эти протеиназы чувствительны к ИТ пшеницы и СИТ.

Таким образом, компонентный состав комплексов пищеварительных протеиназ насекомых, питающихся зерном или зернопродуктами, характеризуется четко выраженной видовой специфичностью. В свою очередь компоненты спектров протеиназ различаются по способности гидролизовать белковые или синтетические субстраты и по отношению к белковым ингибиторам из эндосперма пшеницы.

Наиболее универсальным из изученных субстратов для протеиназ насекомых является желатина фотопленки, которую гидролизуют протеиназы различной природы. Отдельные компоненты, гидролизующие же-

латину, проявляют активность также к БАПНА, АФНЭ или к ним обоим. Спектр протеиназ, проявленный синтетическим субстратом, как правило, беднее, чем при использовании желатины. Это связано, видимо, со значительными качественными и количественными различиями протеиназ по специфичности к определенным типам гидролизуемых связей. Желатина фотопленки обеспечивает во многих случаях большую чувствительность анализа при ИЭФ (на порядок и выше). Исключения составляют протеиназы зернового точильщика, специфичные к БАПНА, и вредной черепашки, специфичные к АФНЭ.

Предложенная модификация метода анализа с БАПНА пригодна для выявления трипсиноподобных протеиназ различных видов насекомых. Широкий выбор возможных вариантов метода перекрестного анализа позволяет осуществлять качественную оценку взаимодействия компонентов сложных смесей гидролаз насекомых (α -амилаз, трипсино-, химо-трипсиноподобных и тиоловых протеиназ) с белковыми ингибиторами. Подобные сведения могут служить ориентирами для проведения более детальных исследований индивидуальных компонентов протеиназ или α -амилаз классическими методами. Они также ценны на ранних этапах выяснения особенностей комплекса пищеварительных гидролаз разных видов насекомых и соответственно возможной защитной роли отдельных типов ингибиторов у растений по отношению к конкретным вредителям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Buonocore V., Petrucci T., Silano V. // *Phytochemistry*. 1977. V. 16. P. 11–16.
2. Richardson M. // *Phytochemistry*. 1977. V. 16. P. 159–169.
3. Мосолов В. В. Белковые ингибиторы как регуляторы процессов протеолиза. М.: Наука, 1983. 40 с.
4. Конарев Ал. В. // *Сельскохозяйственная биология*. 1987. № 5. С. 17–24.
5. Конарев Ал. В. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л.: ЛГУ, 1982. 22 с.
6. Конарев Ал. В. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1985. Т. 21. № 1. С. 92–100.
7. Конарев Ал. В. // *Сельскохозяйственная биология*. 1986. № 3. С. 46–52.
8. Конарев Ал. В. // *Биохимия*. 1986. Т. 51. № 2. С. 195–201.
9. Конарев Ал. В. // *Докл. ВАСХНИЛ*. 1984. № 10. С. 13–15.
10. Конарев Ал. В. // *Сб. науч. тр. по прикл. бот., ген. и сел.* 1987. Т. 114. С. 34–47.
11. Конарев Ал. В. // *Докл. ВАСХНИЛ*. 1990. № 1. С. 10–13.
12. Ohlsson B. G., Westrom B. R., Karlsson B. W. // *Anal. Biochem.* 1986. V. 152. P. 239–244.
13. Hejgaard J. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 116. P. 444–449.
14. Sedmac Y. Y., Grossborg S. E. // *Anal. Biochem.* 1977. V. 79. P. 544–552.
15. Buonocore V., Poerio E., Silano V., Tomasi M. // *Biochem. J.* 1976. V. 153. P. 621–625.
16. Silano V., Furia L., Gianfreda L., Macri A., Palescandolo R., Rab A., Scardi V., Stella E., Valfre F. // *Biochim. et biophys. acta*. 1975. V. 391. P. 170–178.
17. Applebaum S. W., Birk Y., Harpaz J., Bondi A. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1964. V. 11. P. 85–103.
18. Applebaum S. W., Konijn A. M. // *J. Insect. Physiol.* 1966. V. 12. P. 665–669.
19. Балаян В. М., Левицкий А. П. // *Укр. биохим. журн.* 1982. № 4. С. 405–408.

Всесоюзный НИИ защиты растений,
Ленинград

Поступила в редакцию
08.05.90

После доработки
04.10.90

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.