



Структура и функция биополимеров

УДК 547.963.3

ФОСФОНАТНЫЕ АНАЛОГИ P¹,P⁴-БИС(5'-АДЕНОЗИЛ)ТЕТРАФОСФАТА (Ar₄A) КАК ИНГИБИТОРЫ БЫЧЬЕЙ ТРИПТОФАНИЛ-тРНК-СИНТЕАЗЫ*

Т. И. Меркулова, М. К. Нурбеков, Н. Б. Тарусова, Г. К. Ковалева

Введение. Триптофанил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.2) из поджелудочной железы крупного рогатого скота (M_r 60 000×2) катализирует активацию L-триптофана с последующим его переносом на тРНК^{Trp}. Фермент, в отличие от ряда других аминокцил-тРНК-синтетаз, не катализирует с заметной скоростью синтеза динуклеотидного производного, Ar₄A — важного регуляторного фактора многих метаболических процессов в клетке [1—3]. Показано, что фермент не может эффективно использовать Ar₄A вместо АТР при активации триптофана [4]. Ar₄A обратимо ингибирует ферментативную активность конкурентно по отношению и к АТР, и к пирофосфату (PP_i). На основании этого предложено [4] использовать диаденозилолигофосфаты типа Ar₄A для ингибиторного анализа активного центра фермента. В настоящей работе изучены АТР- и PP_i-связывающие участки триптофанил-тРНК-синтетазы с помощью фосфонатных аналогов Ar₄A и показано, что последние могут необратимо ингибировать фермент за счет удаления из активного центра иона цинка, существенного для активности.

Материалы и методы. В работе использовали L-метилен-[¹⁴C]триптофан, 2146 ГБк/моль; [³²P]пирофосфат, 1221 ГБк/моль («Amersham», Англия); L-триптофан («Sigma», США); динатриевую соль АТР («Reanal», ВНР); активированный уголь Norit A («Serga», ФРГ); бромид цетилтриметиламмония (цетавлон), нитроцеллюлозные фильтры «Супрог» № 2 и 3 («Chemarol», ЧССР); нитроцеллюлозные фильтры («Millipore», США).

Фосфонатные аналоги Ar₄A синтезировали, как описано в [5, 6].

Чистоту нуклеотидов проверяли методом тонкослойной хроматографии на РЕИ-целлюлозных пластинках (20×20 см) UV-254 («Merck», ФРГ): промывка водой и после высушивания на воздухе хроматография в 0,75 М LiCl, а также методом жидкостной хроматографии с высоким разрешением (ВЖХ).

Суммарная тРНК и 2 %-ная тРНК^{Trp} из дрожжей и печени быка получены, как описано в работах [7, 8].

Препараты фермента получали по методике, описанной ранее в [9], и перед использованием подвергали кислотному переосаждению [9]. Препараты гомогенны при электрофорезе в денатурирующих условиях. Активность фермента в реакциях АТР-[³²P]пирофосфатного обмена и аминокцилирования тРНК^{Trp} определяли согласно [9]. Радиоактивность измеряли в толуоловом сцинтилляторе на счетчике «Intertechnique» (Франция). Тип ингибирования определяли по методу Лайнуивера—Берка и методу Диксона [10].

Величины констант обратимого ингибирования K_i определяли графически как средние абсолютные значения абсциссы точки пересечения прямых линий, описывающих зависимость величины обратной скорости от концентрации ингибитора при различных концентрациях субстрата.

* Представлена членом редколлегии д. б. н. Л. Л. Киселевым.

Сокращения: Ar₄A—P¹,P⁴-бис(5'-аденозил)тетрафосфат; АрсрррА, АррсрррА, АрсрррррА — фосфонатные аналоги Ar₄A, содержащие метиленовые группировки между P¹- и P²-, P²- и P³-атомами, а также между P¹- и P²-, P³- и P⁴-атомами соответственно.

Спектры КД снимали на дихрографе Mark III («Jobin-Ivon», Франция). В ближней УФ-области (250—340 нм) измерения проводили при концентрации белка 0,7 мг/мл в кюветках с длиной оптического пути 1 см (чувствительность прибора $1 \cdot 10^{-6}$ А/мм) при постоянной времени 10 с и скорости сканирования 0,1 нм/с. Определение ионов цинка проводили на атомно-адсорбционном спектрофотометре «Hitachi-207» [11].

Результаты и обсуждение. В испытанных фосфонатных аналогах Ar_4A , I—III (табл. 1), содержащих остатки метилendifосфоновой кислоты, метиленовые группы расположены: I — между P^1 - и P^2 -, II — между P^2 - и P^3 -атомами, III — между P^1 - и P^2 -, а также между P^3 - и P^4 -атомами. Фосфонатные аналоги Ar_4A синтезированы недавно [5, 6], и их физико-химические свойства еще недостаточно изучены, хотя ясно, что они определяются фосфонатной природой этих соединений и степенью взаимодействия адениновых оснований [5, 6]. Эти нуклеотидные производные могут образовывать прочные комплексы с ионами двухвалентных металлов [12]. Для III определены [12] константы ассоциации с Mg^{2+} и Zn^{2+} (стехиометрия III — $Me^{2+} \sim 1$), которые составляют 2,4 и 0,26 мкМ соответственно (для Ar_4A эти константы — 28 и 15 мкМ [12]). I и II, как показывают наши предварительные опыты, также достаточно прочно связывают ион Zn^{2+} .

Таблица 1

Константы ингибирования триптофанзависимого АТР- $[^{32}P]PP_i$ обмена, катализируемого бычьей триптофанил-тРНК-синтетазой, фосфонатными аналогами Ar_4A
Inhibition constants of tryptophan dependent АТР- $[^{32}P]PP_i$ exchange, catalysed by bovine tryptophanyl-tRNA synthetase, with phosphonate analogs of Ar_4A

Аналог Ar_4A	K_i (АТР), мМ	K_i (PP_i), мМ
I (АрсрррА)	$0,9 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$
II (АрсрррА)	$7,7 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,4$
III (АрсрррА)	$9,0 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$

Примечание. Все аналоги проявляют конкурентный по отношению к АТР и PP_i тип ингибирования. K_i (АТР) и K_i (PP_i) — величины констант обратимого ингибирования, конкурентного в отношении АТР и PP_i соответственно. Для Ar_4A K_i (АТР) найдена равной $3,8 \pm 0,1$ мМ, K_i (PP_i) — $10,2 \pm 0,5$ мМ [4]; K_m для АТР — $2,2 \pm 0,1$ мМ; для PP_i — $0,2 \pm 0,1$ мМ. Каждое из приведенных значений K_i есть среднее из не менее чем трех определений.

АТР- Mg^{2+} — субстрат частичной и полной ферментативной реакций [см. 14]. Ингибирующее действие I—III на фермент могло быть следствием связывания необходимого для активности иона Mg^{2+} . Однако это не так: степень ингибирования сохраняется практически постоянной при варьировании концентраций Mg^{2+} от 5 до 15 мМ.

На рис. 1 в двойных обратных координатах приведены зависимости скорости реакции АТР- $[^{32}P]PP_i$ обмена от концентраций АТР и PP_i в отсутствие ингибиторов и в их присутствии. Видно, что ингибирование во всех случаях носит конкурентный характер по отношению и к АТР, и к PP_i . Ранее аналогичный характер ингибирования был обнаружен для Ar_4A и Ar_3A [4]. Он может отражать связывание динуклеотидного производного как на одной субъединице фермента одновременно по участкам для АТР и PP_i , так и на двух субъединицах: на одной — по участку связывания АТР и на другой — по участку связывания PP_i .

Триптофанил-тРНК-синтетаза — цинксодержащий фермент [13]. Ион цинка связан с белковой молекулой довольно лабильно; его удаление с фермента длительным диализом приводит к потере ферментативной активности в частичной и полной реакциях [13]. Можно было ожидать, что исследуемые фосфонатные аналоги Ar_4A , связываясь в активном центре, будут удалять существенный для активности ион цинка. Чтобы проверить это, изучали взаимодействие I—III с ферментом в условиях реакции триптофанзависимого АТР- $[^{32}P] \times \times PP_i$ обмена и условиях длительной преинкубации их с ферментом в отсутствие АТР и PP_i .

I—III в концентрации $1 \times \times 10^{-3}$ М частично ингибируют реакцию АТР- $[^{32}P]PP_i$ обмена, катализируемую ферментом. Для фермента необходим ион Mg^{2+} , который активирует его и является косубстратом АТР; только

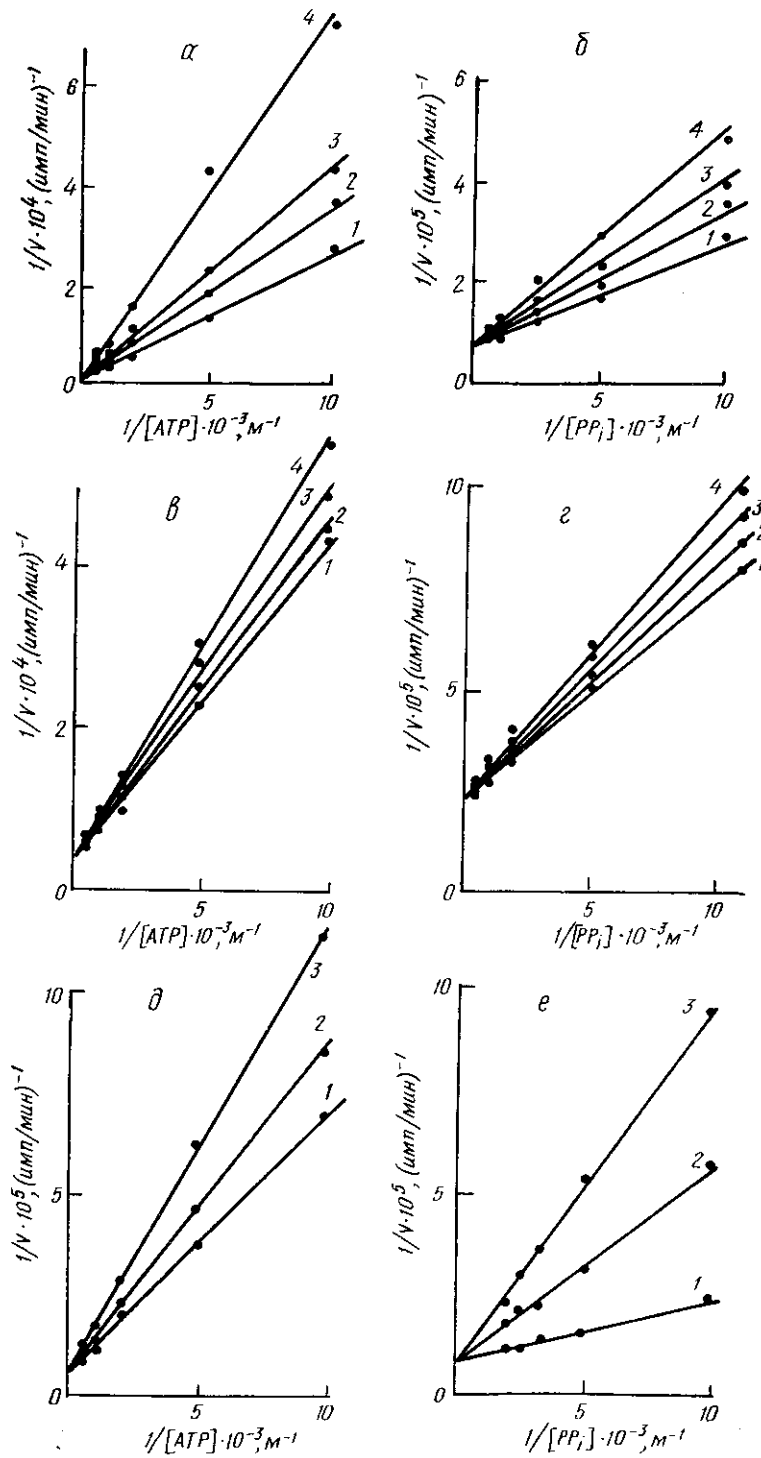


Рис. 1. Зависимость в двойных обратных координатах скорости триптофанзависимого АТФ- ^{32}P PP_i обмена, катализируемого триптофанил-тРНК-синтетазой, в присутствии I (а, б), II (в, г), III (д, е) от концентрации АТФ·Mg²⁺ (а, в, д) и PP_i (б, г, е). Концентрации I—III (мМ): I—0(1); 0,4(2); 0,8(3); 2,0(4); II—0(1); 0,56(2); 1,12(3); 2,80(4); III—0(1); 3,9(2); 7,8(3).

Fig. 1. The double reciprocal plots of the rate of tryptophan dependent ATP- ^{32}P PP_i exchange catalyzed by tryptophanyl-tRNA-synthetase in the presence of Ap₄A analogs I (а, б), II (в, г), III (д, е) versus ATP·Mg²⁺ (а, в, д) and PP_i (б, г, е).

В табл. 1 приведены значения K_i для I—III, определенные по методу Диксона [10]. Наибольшее сродство к АТР-связывающему участку проявляет I, значение K_i для которого близко к величине K_m для АТР, определенной в той же реакции. Значения K_i для II и III превышают K_m для АТР в ~ 4 раза. Сродство к PP_i -связывающему участку всех трех ингибиторов в условиях реакции снижено по сравнению с PP_i : K_i — для I и III примерно на порядок, а для II — в 14 раз выше K_m для PP_i .

Наиболее слабым ингибирующим действием обладает II. В его молекуле, как и в молекуле I, сохранен P^1-O-P^2 фрагмент, необходимый для образования интермедиата ферментативной реакции — триптофаниладенилата. Наблюдаемое для II слабое ингибирование могло быть вызвано участием его как плохого субстрата в ферментативной реакции. Однако мы показали, что II не заменяет АТР ни в одной из реакций, катализируемых ферментом, и не образует триптофаниладенилата на ферменте.

В табл. 2 приведены данные по взаимодействию фермента с I, II и III в условиях его длительной преинкубации (рН 7,5, 37 °С, 5 ч) с каждым из аналогов. Видно, что такая преинкубация приводит к ингибированию фермента на $\sim 80\%$ для I и III и на $\sim 40\%$ для II. Наблюдаемое развитие ингибирования во времени указывает на его необратимый характер. Фосфонатные аналоги Ar_4A не содержат в своих молекулах высокорекреационноспособных группировок и не могут поэтому модифицировать существенные для активности аминокислотные остатки фермента. В то же время они могут, как указывалось выше, хелатировать необходимый для активности ион цинка, достаточно лабильно связанный с ферментом [13].

Таблица 2

Изменение активности фермента (7 мкМ) в реакции триптофанзависимого АТР- $[^{32}P]PP_i$ обмена в ходе инкубации (рН 7,5; 37 °С) с фосфонатными аналогами Ar_4A , I—III (5 мМ) в отсутствие и в присутствии АТР- Mg^{2+} (5 мМ) или PP_i (2 мМ)
Time-course dependence of the enzyme inactivation in tryptophan dependent АТР- $[^{32}P]PP_i$ exchange under the action of Ar_4A analogs I—III (5 мМ) in the presence and absence of АТР- Mg^{2+} (5 мМ) or PP_i (2 мМ)

Время инкубаций, ч	Остаточная активность фермента в присутствии ингибиторов, %						
	I	I+ +АТР- Mg^{2+}	I+ + PP_i	III	III+ +АТР- Mg^{2+}	III+ + PP_i	II
0,2	100	—	—	100	—	—	100
1	68	85	98	102	105	100	105
2	42	63	78	75	80	100	96
3	28	42	54	55	60	98	70
4	23	35	39	35	32	99	65
5	18	28	32	18	20	97	62

Примечание. Все пробы содержали 10 мМ $MgCl_2$ и $5 \cdot 10^{-5}$ М L-триптофан, добавленные для стабилизации фермента. Для определения активности аликвоты разводили в 200 раз.

Для триптофанил-тРНК-синтетазы показано [13], что удаление ионов Zn^{2+} приводит к существенным конформационным перестройкам в молекуле фермента. Это находит отражение в спектрах КД в области 260—340 нм: удаление цинка сопровождается полным исчезновением пика при 290—300 нм [13]. На рис. 2 приведены спектры КД в ближней УФ-области исходного фермента (спектр 4) и препарата, преинкубированного с III в течение 3 ч при 37 °С и затем подвергнутого гель-фильтрации для удаления избытка ингибитора (спектр 3). Видно, что пик в области 290—300 нм для фермента, наполовину утратившего активность в присутствии III, снижается в два раза по сравнению с исходным ферментом. Прямое определение содержания цинка в этих препаратах методом атомно-адсорбционной спектроскопии [11] пока-

зало, что исходный и подвергнутый обработке III препараты фермента содержат 1,1 и 0,5 атомов цинка (соответственно) на белковую молекулу. Аналогичные соотношения между уменьшением пика при 290—300 нм в спектрах КД и снижением ферментативной активности получены также для I (рис. 2, спектр 2). Таким образом, необратимое

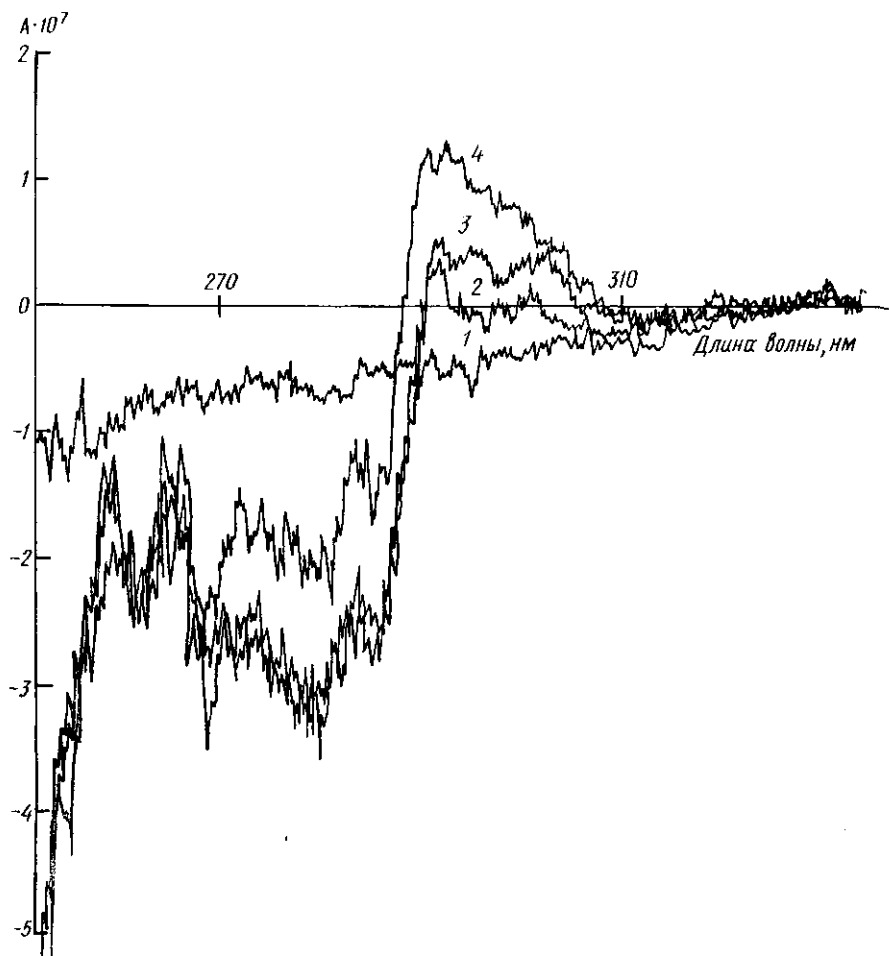


Рис. 2. Спектры КД в ближней ультрафиолетовой области исходной триптофанил-тРНК-синтетазы и препаратов фермента, обработанных фосфонатными аналогами Ar_4A и подвергнутых гель-фильтрации: 1 — нулевая линия; 2, 3 — фермент, обработанный I и III соответственно (инкубация 3 ч, 37°C, pH 7,5); 4 — исходный фермент.

Fig. 2. CD spectra in the near UV of the native tryptophanyl-tRNA-synthetase and of the enzyme preparations treated with Ar_4A analogs and liberated from them by gel filtration.

ингибирование триптофанил-тРНК-синтетазы фосфонатными аналогами Ar_4A вызвано удалением с фермента существенного для активности иона цинка.

В отличие от орто-фенантролина фосфонатные аналоги Ar_4A можно рассматривать для триптофанил-тРНК-синтетазы как аффинные цинкхелатирующие реагенты, так как они обладают значительным сродством к АТР- и (или) пиродифосфатсвязывающим участкам активного центра фермента.

В табл. 2 приведены также данные по защите фермента АТР и PP_i от ингибирования I и III. АТР и PP_i примерно в равной степени защищают фермент от ингибирования I. Их совместное добавление приводит к значительному усилению защитного эффекта. В случае III PP_i полностью защищает фермент от потери активности, а АТР на степень ингибирования не влияет. Из сопоставления этих данных с

приведенными в табл. 1 величинами K_i можно заключить, что как в условиях реакции АТР-[^{32}P]PP $_i$ обмена, так и в отсутствие субстратов I взаимодействует с ферментом как аналог АТР и PP $_i$, а III — только как аналог PP $_i$.

Ранее на основании опытов с удалением Zn $^{2+}$ с помощью ортофенантролина предполагали возможное участие АТР в связывании Zn $^{2+}$ на ферменте [13]. Наблюдаемая нами полная защита PP $_i$ от ингибирования фермента III (за счет удаления существенного для активности Zn $^{2+}$) указывает на то, что ион цинка локализован вблизи от PP $_i$ -связывающего участка или непосредственно в нем.

Авторы глубоко признательны Л. Л. Киселеву за интерес к работе и ценные советы; О. О. Фаворовой — за полезные замечания по рукописи статьи; А. В. Ажаеву — за проверку чистоты фосфонатных аналогов Ар $_4$ А методом ВЖХ; Н. Т. Гурвич — за снятие спектров КД; С. Г. Дмитриенко — за определение содержания цинка в образце фермента.

PHOSPHONATE ANALOGS
OF P 1 , P 4 -BIS(5'-ADENOSYL)TETRAPHOSPHATE
(Ar $_4$ A) AS INHIBITORS OF BOVINE
TRYPTOPHANYL-tRNA-SYNTHEASE

T. I. Merkulova, M. K. Nurbekov, N. B. Tarusova, G. K. Kovaleva

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

Phosphonate analogs of Ar $_4$ A—ArpppA(I), ArpppA(II) and ArppppA(III) — inhibit the enzymic activity of bovine tryptophanyl-tRNA-synthetase (EC 6.1.1.2); I effectively interacts with АТР and PP $_i$ binding sites, III — mainly with PP $_i$ binding site, and II interacts weakly with both of them. After prolonged incubation (5 h, 37°C) with I or III an irreversible 80 % inhibition of the enzyme is observed, whereas with II it is only 40 %. The inhibiting action of the Ar $_4$ A analogs is shown to be due to the removal of essential Zn $^{2+}$ ion from the enzyme. Based on these observations, an assumption is made that Zn $^{2+}$ in the active site of the enzyme is located in or near the PP $_i$ binding site.

1. Zamecnik P. Diadenosine 5',5'''-P 1 , P 4 -tetraphosphate (Ar $_4$ A) : its role in cellular metabolism // *Anal. Biochem.*— 1983.—134, N 1.— P. 1—10.
2. Blanquet S., Plateau P., Brevet A. The role of zinc in 5',5'-diadenosine tetraphosphate production by aminoacyl-transfer RNA synthetases // *Mol. and Cell. Biochem.*— 1983.—52, N 1.— P. 3—11.
3. Goerlich O., Foeckler R., Holler E. Mechanism of synthesis of adenosine(5')tetraphosphate(5')adenosine (ArpppA) by aminoacyl-tRNA synthetases // *Eur. J. Biochem.* — 1982.—126, N 1.— P. 135—142.
4. Ковалева Г. К., Меркулова Т. И., Нурбеков М. К. Взаимодействие бычьей триптофанил-тРНК-синтетазы с P 1 ,P 4 -бис(5'-аденозил)тетрафосфатом и P 1 ,P 3 -бис(5'-аденозил)трифосфатом (Ar $_4$ A и Ar $_3$ A) // *Молекуляр. биология.*— 1986.—20, № 2.— С. 558—562.
5. Тарусова Н. Б., Завгородний С. Г., Осипова Т. И. Фосфорорганические аналоги биологически активных соединений. XIV. Синтез фосфонатных аналогов P 1 ,P 4 -бис(5'-аденозил)тетрафосфата и 5'-нуклеозидтрифосфатов // *Биоорганич. химия.*— 1985.—11, № 6.— С. 802—807.
6. Phosphonate analogs of nucleotide-5'-triphosphates and P 1 ,P 4 -diadenosine tetraphosphate / N. B. Tarusova, T. I. Osipova, A. I. Biriukov et al. // *Nucl. Acids Res.*— 1984.— N 14.— P. 287—288.
7. Maxwell H., Wimmer E., Tener G. M. The isolation of yeast typosine and tryptophan transfer ribonucleic acids // *Biochemistry.*— 1968.—7, N 7.— P. 2629—2634.
8. Roy K. L., Söll D. Fractionation of *Escherichia coli* transfer RNA on benzoylated DEAE-cellulose // *Biochim. et biophys. acta.*— 1968.—161, N 2.— P. 572—574.
9. Kisselev L. L., Favorova O. O., Kovaleva G. K. Tryptophanyl-tRNA synthetase from beef pancreas // *Meth. Enzymol.*— 1979.—59, pt G.— P. 234—257.
10. Диксон М., Узбб Э. Ферменты.— М.: Мир, 1982.— Т. 1.— 392 с.
11. Fuma K., Vallee B. L. The physical basis of analytical atomic absorption spectrometry. The pertinence of the Beer — Lambert law // *Anal. Chem.*— 1963.—35, N 8.— P. 942—946.

12. Circular dichroism and ordered structure of bisnucleoside oligophosphates and their Zn^{2+} and Mg^{2+} complexes / E. Holler, B. Holmquist, B. L. Vallee et al. // *Biochemistry*.— 1983.—22, N 21— P. 4924—4933.
13. Bovine tryptophanyl-tRNA synthetase. A zinc metalloenzyme / L. L. Kisselev, O. O. Favorova, M. K. Nurbekov et al. // *Eur. J. Biochem.*— 1981.—120, N 3.— P. 511—517.
14. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК.— М.: Наука, 1984.—408 с.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва

Получено 29.10.85

УДК 576:547.963.3

РИБОСОМНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ ИЗ АМИНОАЦИЛ-тРНК В ОТСУТСТВИЕ МАТРИЧНОГО ПОЛИНУКЛЕОТИДА: СИНТЕЗ ПОЛИФЕНИЛАЛАНИНА ИЗ ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК^{Лиз}

Г. Ж. Юсупова (Тналина), Н. В. Белицина, А. С. Спирин

Введение. Ранее было показано, что рибосомы *Escherichia coli* в отсутствие матричного полинуклеотида способны использовать лизил-тРНК и некоторые другие аминоацил-тРНК в качестве субстратов для синтеза полипептидов [1—3]. Среди изученных 16 аминоацил-тРНК лучшими субстратами для рибосомного безматричного синтеза полипептидов оказались лизил-, серил-, треонил- и аспартил-тРНК. Пролил-, фенилаланил- и аспарагинил-тРНК оказались практически неактивными субстратами для элонгации в отсутствие матрицы [2, 3]. Однако было неясно, что определяет эффективность аминоацил-тРНК как субстрата для безматричного синтеза: структура тРНК или природа аминокислотного остатка. Удобной моделью для решения этой проблемы оказались ложноацилированные тРНК.

В этой работе показано, что фенилаланил-тРНК^{Лиз}, так же как и лизил-тРНК^{Лиз}, способна служить субстратом для синтеза гомопептидов на рибосомах в отсутствие поли(А). Из этих результатов следует, что именно структура тРНК определяет способность аминоацилированной тРНК^{Лиз} участвовать в элонгации пептида в отсутствие кодон-антикодонного спаривания. Фенилаланил-тРНК^{Фен} является неактивным субстратом для рибосомного синтеза в отсутствие поли(У).

Материалы и методы. В работе использованы рибосомы из *E. coli* MRE-600, 4-кратно отмывые 1 М NH_4Cl [4, 5]. Очищенные рибосомы хранили в замороженном состоянии при $-70^\circ C$ в буферном растворе (20 мМ трис-НСl, рН₃₇ °с 7,6, 100 мМ NH_4Cl , 10 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ ЭДТА и 10 %-ный глицерин). Очищенные факторы элонгации EF-Tu и EF-G были получены из *E. coli* MRE-600, в основном согласно методике, описанной Казиро и др. [6, 7].

Препарат [¹⁴С]лизил-тРНК^{Лиз} из *E. coli* получен с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном факторе EF-Tu из *Thermus thermophilus* HB8 [8]. Фактор элонгации EF-Tu из *T. thermophilus* был предоставлен М. Б. Гарбер (Ин-т белка АН СССР) и иммобилизован на ВгCN-активированной сефарозе 4В («Pharmacia», Швеция). Исходный препарат тРНК из *E. coli* («Boehringer-Mannheim», ФРГ), энзиматически ацилированный [¹⁴С]лизином («Amersham», Англия, 12,9 ГБк/ммоль), получали, как описано в [9]; конечный препарат тРНК содержал 52—59 пмоль лизина на 1 ед. A_{260} тРНК. Препарат, обогащенный [¹⁴С]лизил-тРНК^{Лиз}, содержал 1000—1100 пмоль [¹⁴С]лизина на 1 ед. A_{260} тРНК (1 ед. A_{260} соответствует 1500 пмолям тРНК).

Перед процедурой ложного аминоацелирования [¹⁴С]лизил-тРНК^{Лиз} деацелировали в течение 1 ч при $37^\circ C$ в буфере, содержащем 100 мМ трис-НСl, рН₃₇ °с 8,9. Ложное ацилирование тРНК^{Лиз} из *E. coli* [³H]фенилаланином («Amersham», 1850 ГБк/ммоль) проводили с помощью фенилаланил-тРНК-синтетазы из дрожжей, как описано в методике [10]. Препарат индивидуальной фенилаланил-тРНК-синтетазы из дрожжей с удельной активностью 3000—3500 ед./мг белка предоставлен доктором П. Реми (Страсбург, Франция). Степень аминоацелирования составляла 750 пмоль фенилаланина на 1 ед. A_{260} тРНК^{Лиз}. Возможную примесь тРНК^{Фен} в препаратах тРНК^{Лиз} оценивали по степени ацилирования [³H]фенилаланином препаратов тРНК^{Лиз} при использовании ферментной фракции из *E. coli* в стандартных условиях [9]; примесь тРНК^{Фен} в препаратах тРНК составляла 20—25 пмоль на 1 ед. A_{260} тРНК^{Лиз}, т. е. не более 2—2,5 %.