



УДК 547.467 + 547.963.3

ПРИМЕНЕНИЕ ДИФУНКЦИОНАЛЬНОГО АЦИЛИРУЮЩЕГО
РЕАГЕНТА — ДИАЗИДА ДИТИОДИГЛИКОЛЕВОЙ
КИСЛОТЫ — ДЛЯ ОБРАТИМОЙ КОВАЛЕНТНОЙ ФИКСАЦИИ
НУКЛЕОПРОТЕИДОВ

Буторин А. С., Василенко С. К.

Новосибирский государственный университет

Описан метод синтеза и некоторые химические свойства диазида дитиодигликолевой кислоты — бифункционального ацилирующего реагента, содержащего дисульфидную связь внутри молекулы. Показано, что предлагаемый реагент ацилирует аминогруппы белка и практически не реагирует с нуклеиновыми кислотами. Диазид дитиодигликолевой кислоты, взаимодействуя обеими своими функциональными группами, образует ковалентные сшивки между нуклеофильными группами белков. Количественный разрыв этих сшивок возможен в мягких условиях путем восстановления дисульфидных связей тиолсодержащими соединениями. Изучен характер воздействия диазида дитиодигликолевой кислоты на рибосомы *E. coli*. Обработка 70S-рибосом этим реагентом приводит к потере значительной частью рибосом (50—70%) способности диссоциировать на субчастицы при понижении концентрации ионов магния. Ковалентные сшивки жестко фиксируют пространственную структуру рибосомальных субчастиц, которые становятся устойчивыми к деструктурирующему воздействию высокой концентрации солей. Это позволяет анализировать субчастицы в градиенте плотности хлористого цезия. Обработка фиксированных рибосом 0,02 М дитиотреитом количественно восстанавливает способность рибосом к диссоциации на субчастицы в растворах с низкой концентрацией ионов магния и свойство субчастиц диссоциировать на белки и нуклеиновые кислоты в градиенте плотности хлористого цезия. Показано, что диазид дитиодигликолевой кислоты необратимо инактивирует способность рибосом к poly(U)-зависимому бесклеточному биосинтезу полифенилаланина. Компоненты белоксинтезирующей системы (матрица, аминоацил-tРНК, пептидил-tРНК) не защищают рибосомы от необратимой инактивации.

Ковалентная фиксация белков в нуклеопротеидах с помощью бифункциональных химических реагентов, образующих ковалентные сшивки между белковыми молекулами, широко используется для структурных и функциональных исследований нуклеопротеидов [1]. В литературе описано использование бифункциональных электрофильных реагентов, образующих поперечные сшивки в белках, таких, как глутаровый альдегид [2], диметиладипинимидат [3], *n*-фенилендималеимид [4], диметилсуберимидат [5—7].

Возможность расщеплять образованные ковалентные сшивки в мягких условиях позволяет выделять белковые компоненты нуклеопротеидов в индивидуальном виде и облегчает их идентификацию.

Принятые сокращения: ДАТГ — диазид дитиодигликолевой кислоты; poly(U) — полиуридиловая кислота; ДТТ — дитиотреит; ТХУ — трихлоруксусная кислота; ТЭА — триэтаноламин.

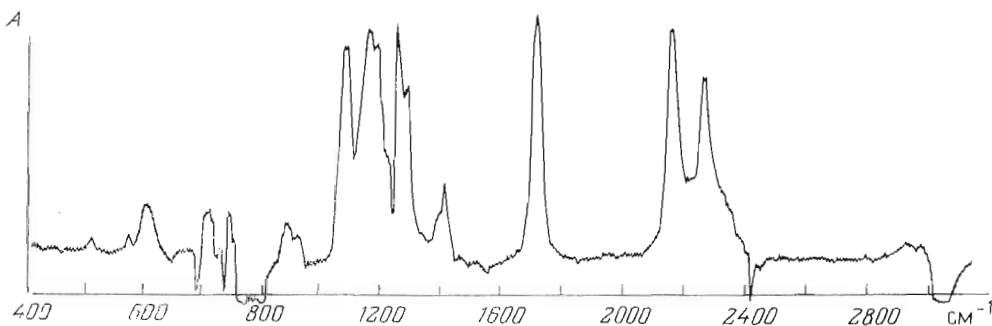
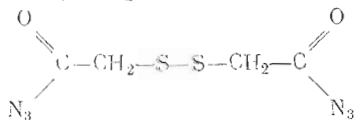


Рис. 1. Инфракрасный спектр диазида дитиодигликолевой кислоты в хлороформе при комнатной температуре, толщина кюветы из КВг 0,1 мм

Наиболее часто используются для обратимой ковалентной фиксации бифункциональные имидоэфиры, содержащие в своем составе легко восстанавливаемую дисульфидную связь [8—13]. Был использован также бифункциональный ацилазид, содержащий азидные группы, обладающие высокой реакционной способностью, в качестве функциональных, и vicinalные гидроксильные группы, которые количественно окисляются периодатом натрия с расщеплением поперечных сшивок [14].

В настоящей работе описан синтез и некоторые химические свойства диазида дитиодигликолевой кислоты (ДАТГ) — бифункционального ацилирующего агента. Как известно из литературы [15], ацилазиды являются ацилирующими агентами, взаимодействующими с сульфгидрильными и аминокруппами белка. Химия ацилазидов хорошо изучена, накоплен большой опыт их использования, проста и доступна процедура синтеза. ДАТГ сочетает в себе ряд преимуществ обратимо фиксирующих реагентов, описанных ранее: высокую реакционную способность ацилазидных групп, способность к образованию ковалентных сшивок между белками и возможность разрывать эти ковалентные сшивки в мягких условиях путем восстановления дисульфидной связи внутри молекулы реагента.

Диазид дитиодигликолевой кислоты был синтезирован из дигидразида дитиодигликолевой кислоты обработкой его азотистой кислотой (см. «Экспериментальную часть»). ДАТГ представляет собой тяжелую маслянистую жидкость желтоватого цвета со слабым чесночным запахом, плохо растворим в воде и хорошо растворим в органических растворителях (эфир, диоксан, этанол). Строение молекулы диазида



подтверждает инфракрасный спектр вещества (рис. 1). В спектре ДАТГ обнаруживаются линии, соответствующие карбонильной связи C=O (1710 см⁻¹) и азидной группировке —N₃ (2140 см⁻¹). Полоса поглощения в области 2260 см⁻¹, по-видимому, соответствует изоцианату, который образуется во время записи спектра по механизму перегрушировки Курциуса [15]. Размер этого пика у разных препаратов варьировал.

ДАТГ удовлетворительно хранится в течение двух недель в спиртовом растворе при —20°, но с заметной скоростью разлагается при повышении температуры и довольно быстро гидролизуется в водной среде в буферном растворе следующего состава: 0,01 М триэтанолламин (pH 8,0), 0,1 М KCl, 0,02 М MgCl₂ (рис. 2).

Для изучения химических свойств ДАТГ по отношению к разным компонентам нуклеопротеидов были использованы в качестве моделей полилизин, транспортная и рибосомальная РНК и рибосомы из *E. coli*.

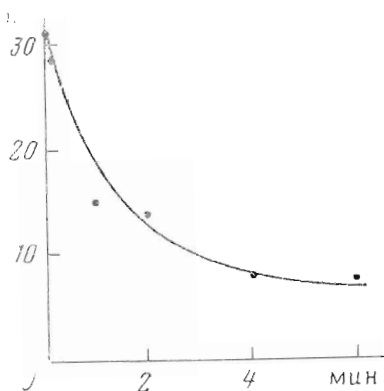


Рис. 2. Кинетика гидролиза диазида дитиодигликолевой кислоты в буфере 1 (0,06 М триэтанол-амин, 0,02 М $MgCl_2$, 0,1 М KCl , рН 8,0)

Обработка полилизина избытком ДАТГ приводила к осаждению полипептида. Осадок удавалось растворить только восстановлением в 0,01 М растворе ДТТ. При удалении SH-содержащих соединений диализом модифицированный полилизин вновь выпадал в осадок из-за повторного образования ковалентных сшивок за счет окисления гецеперированных сульфгидрильных групп кислородом воздуха. Быстрое окисление сульфгидрильных групп до дисульфидных не позволяет количественно оттитровать известными методами восстановленные SH-группы, поэтому мы были вынуждены обратиться к элементному анализу. Оказалось, что на 2 лизиловых остатка в модифицированном полилизине приходится один диацильный остаток дитиодигликолевой кислоты. При изменении рН среды от 7,5 до 10,0 скорость модификации заметно возрастала, но конечный уровень модификации был постоянным.

Степень модификации тРНК из *E. coli* была следовой: 1 остаток на 400—800 нуклеотидов. Модификации рибосомальной РНК вообще обнаружить не удалось. Следовую модификацию тРНК можно объяснить повышенным содержанием в ней нуклеофильных минорных оснований.

В результате обработки 70S-рибосом ДАТГ от 50 до 70% препарата теряло способность к диссоциации на субчастицы при снижении концентрации ионов магния до 1 мМ (рис. 3а). Зависимость степени фиксации 70S-рибосом от концентрации ДАТГ изображена на рис. 4 (концентрация рибосом была везде постоянной — 1,6 мг/мл). Как видно из этого рисунка, достаточная для предельной фиксации рибосом концентрация ДАТГ равна 3 мМ, что соответствует примерно $5 \cdot 10^3$ молекулам ДАТГ на 1 рибосому. Значительная часть рибосом (30—50%) после фиксации сохраняет способность к диссоциации, но теряет способность к ассоциации. Большой процент таких рибосом, вероятно, обусловлен монофункциональными модификациями соответствующих нуклеофильных групп. Мы не проводили количественной оценки соотношения би- и монофункциональных модификаций, но из литературы известно, что бифункциональные агенты, особенно гидролизующие средой, нередко реагируют с нуклеопротеидами лишь одной своей функциональной группой. Так, Перетц и соавт. [11] показали, что большинство молекул использованного ими бифункционального агента диметил-3,3'-дитиобиспропионилимидаата не давало поперечных сшивок.

В использованных условиях (ТЭА-буфер, рН 8,0) скорость модификации рибосом была настолько высока, что процесс фиксации 70S-рибосом, выражавшийся в потере ими способности к диссоциации, завершался уже в первую минуту после добавления диазида и степень фиксации не повышалась при дальнейшей инкубации рибосом с ДАТГ.

Способность модифицированных рибосом к диссоциации на субчастицы полностью восстанавливалась после обработки рибосом 0,02 М ДТТ (рис. 3б).

Введение новых ковалентных связей с помощью ДАТГ вызывало жесткую фиксацию пространственной структуры нуклеопротеидных комплексов и повышение их стабильности в денатурирующих условиях. Фиксация рибосомальных субчастиц диазидом препятствовала их разворачиванию при центрифугировании в градиенте хлористого цезия. Обработка 30S-субчастиц ДАТГ приводила к сохранению в условиях высокой ионной си-

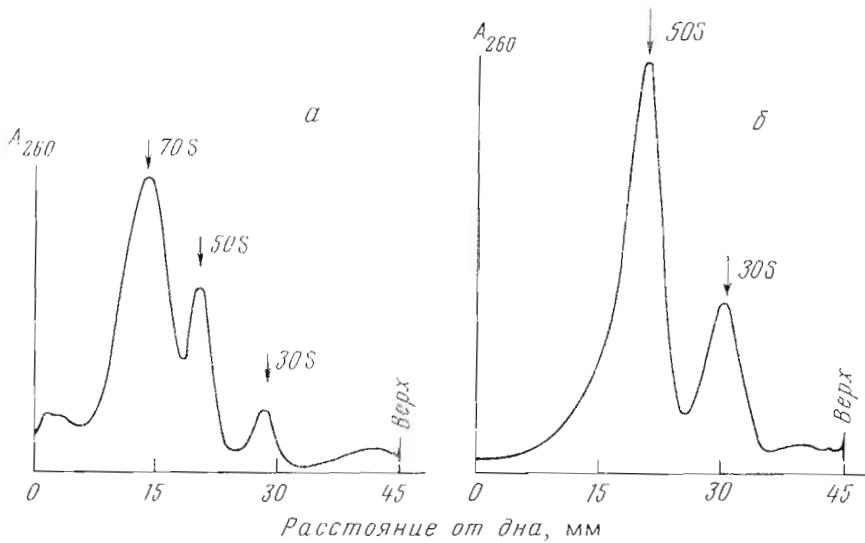


Рис. 3. Центрифугирование рибосом в градиенте сахарозы 5—20%, ротор SW-65, 30 000 об/мин, 5 ч, 4°, буфер 2 (0,01 М Трис-НСl-буфер, 0,001 MgCl₂, 0,1 М KCl, pH 7,5); а — рибосомы, модифицированные диазидом дитиодиглицероловой кислоты; б — модифицированные рибосомы, восстановленные 0,02 М дитиотрептоном



Рис. 4. Зависимость степени фиксации 70S-рибосом от концентрации диазида дитиодиглицероловой кислоты. 1 — процент недиссоциирующих рибосом; 2 — активность в poly(U)-зависимом бесклеточном биосинтезе полифенилаланина, % от начальной

лы рибосомальных субчастиц с плавучей плотностью 1,56 г/см³ (рис. 5а, б). Фиксация становится количественной, если в момент добавления диазида к рибосомальным субъединицам смесь облучать светом с длиной волны $\lambda > 300$ нм (рис. 5г). Это происходит благодаря известному процессу фотоактивации азидной группировки и понижению специфичности действия ацилазида [15]. Уровень модификации нуклеиновой кислоты при облучении и без облучения был одинаков.

При обработке фиксированных субчастиц 0,02 М ДТГ субчастицы диссоциируют на белки и нуклеиновые кислоты (рис. 5е). В отличие от формальдегидной обработки [16] фиксация ДАТГ позволяет при разрыве поперечных сшивок восстанавливать компоненты нуклеопротеидов в индивидуальном виде.

Функциональные свойства ковалентно фиксированных диметилсуберимидатом рибосом были изучены Слабином [7], который обнаружил заметное сохранение функциональной активности фиксированных рибосом в poly(U)-зависимом бесклеточном биосинтезе полифенилаланина. Возможность разрыва образованных ковалентных сшивок позволила бы изу-

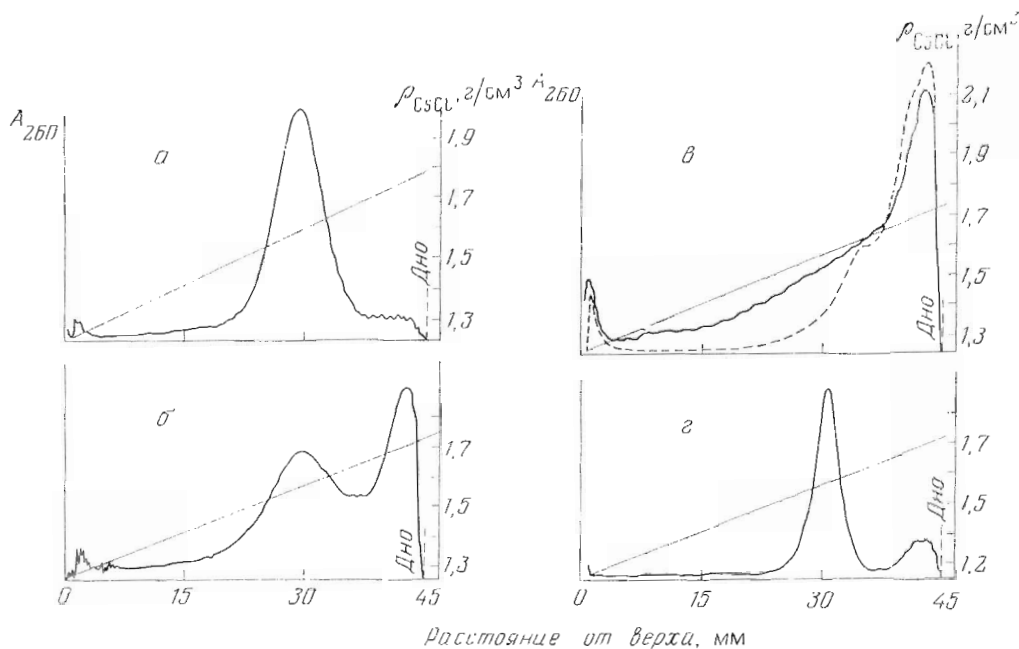


Рис. 5. Центрифугирование модифицированных 30S-субчастиц в градиенте плотности хлористого цезия 1,2—1,8 г/см³, 36 000 об/мин, 20 ч, 4°, центрифуга Spinco L5-75 В, ротор SW-65. 30S-субчастицы, фиксированные: а — формалином; б — диазидом дитиодигликолевой кислоты; в — диазидом дитиодигликолевой кислоты и восстановленные дитиотрептом (пунктиром обозначена кривая центрифугирования нативных 30S-субчастиц); г — диазидом дитиодигликолевой кислоты при облучении светом с длиной волны $\lambda > 300$ нм

читать влияние фиксации на функцию рибосом и получить полезную информацию о связи между пространственной структурой и функциями белоксинтезирующей системы. В этом отношении ковалентная фиксация с использованием реагентов, содержащих внутри молекулы дисульфидную связь, представляется оптимальной, так как ее восстановление SH-содержащими агентами протекает в мягких условиях, а сами SH-реагенты не нарушают функциональной активности нативных рибосом [17].

В нашей работе было изучено влияние ДАТГ на функциональные свойства рибосом. Оказалось, что в результате модификации 70S-рибосомы резко теряют способность к матричному связыванию [¹⁴С]фенилаланил-тРНК. При разрыве образованных поперечных сшивок эта способность восстанавливалась незначительно (табл. 1). После фиксации ДАТГ фракция рибосом, потерявших способность к диссоциации, была выделена

Таблица 1

Ролу(U)-зависимое связывание [¹⁴С]фенилаланил-тРНК с фиксированными и восстановленными ДТТ рибосомами
На 400 мкг рибосом

Рибосомы	Количество связанной [¹⁴ С]фенилаланил-тРНК, пмоль
Нативные	4,64
Фиксированные	0,46
Фиксированные и восстановленные 0,02 М ДТТ	0,82

и использована в системе $poly(U)$ -зависимого бесклеточного биосинтеза полифенилаланина как в присутствии ДТТ, так и без него. Заметного включения $[^{14}C]$ фенилаланина в нерастворимый в горячей ТХУ полимерный продукт ни в том, ни в другом случае не наблюдалось (табл. 2). Рибосомы в результате модификации инактивировались необратимо.

С целью защиты от ацилирования функциональных участков рибосом была проведена фиксация в составе тройного комплекса рибосома — $poly(U)$ -аминоацил-тРНК и в составе транслирующего комплекса рибосома — $poly(U)$ — аминоацил-тРНК — пептидил-тРНК. В обоих случаях от 60 до 80% рибосом теряли способность к диссоциации на субчастицы. Против ожидаемого фиксация рибосом ДАТГ не приводила к укреплению тройного комплекса. При уменьшении концентрации ионов магния количество аминоацил-тРНК, связанной с фиксированными 70S-рибосомами, снижалось на 65%. В высоких концентрациях Mg^{2+} уровень радиоактивности по $[^{14}C]$ фенилаланину и в тройном, и в транслирующем комплексе после

Таблица 2

Включение $[^{14}C]$ фенилаланина в ТХУ-нерастворимый продукт в процессе $poly(U)$ -зависимого бесклеточного биосинтеза
На 20 мкг рибосом

Рибосомы	Контрольные	Фиксированные в свободном состоянии	Фиксированные в составе тройного комплекса	Фиксированные в составе транслирующего комплекса
Количество $[^{14}C]$ фенилаланина, включенного в полимерный продукт, пмоль	25,8	В отсутствие ДТТ 1,8 / 2,3		1,5
	19,0	1,8	2,6	1,9

фиксации оставался тем же, что и до фиксации. Данные о функциональной активности 70S-рибосом, фиксированных в составе комплексов (табл. 2), показывают, что компоненты белоксинтезирующей системы не защищают рибосомы от необратимой инактивации.

Отдельные рибосомальные субчастицы после фиксации ДАТГ теряли как способность к образованию 70S-рибосом, так и функциональную активность. 30S-субчастицы при этом частично димеризовались. 50S-субчастицы оказались более чувствительными к инактивирующему влиянию ДАТГ, чем 30S-субчастицы (табл. 3). Разрыв образованных сшивок реактивацию субчастиц не вызывал.

Из приведенных данных следует, что инактивация рибосом ДАТГ осуществляется не за счет образования поперечных сшивок, а вследствие обычной модификации ацилирующим агентом нуклеофильных функцио-

Таблица 3

Включение $[^{14}C]$ фенилаланина в нерастворимый в ТХУ продукт в процессе биосинтеза на рибосомах с фиксированными субчастицами
пмоль $[^{14}C]Phe$ на 20 мкг 70S-рибосом

30S-субчастицы	50S-субчастицы			
	Нативные		Фиксированные	
	-ДТТ	+ДТТ	-ДТТ	+ДТТ
Нативные	32,3	27,5	2,1	2,6
Фиксированные	6,5	3,6	1,1	0,8

нальных групп белков. Такой вывод согласуется с данными литературы. Необратимая инактивация рибосом и субчастиц при модификации сульфгидрильных и аминогрупп монофункциональными агентами отмечалась в работах ряда авторов [18—20]. Необратимая инактивация не связана только с модификацией центров связывания компонентов белоксинтезирующей системы, так как эти компоненты не обладают защитными свойствами.

Предлагаемый бифункциональный ацилирующий агент может быть использован для изучения топографии нуклеопротеидов и сложных белковых комплексов и для фиксации нуклеопротеидных частиц с целью их фракционирования в градиенте плотности хлористого цезия. Однако применение его для функциональных исследований рибосом ограничено из-за необратимой инактивации их биологических функций.

Экспериментальная часть

В работе использовали *D,L*-полилизин (Nutritional Biochemicals, США) с *M* 15 000—20 000, ДТТ (ICN, США), [¹⁴C]иодуксусную кислоту с уд. акт. 70 Ки/моль (Amersham, Англия), ГТФ (Fluka, Швейцария) и полиуридиловую кислоту производства СКТВ биологически активных веществ (Новосибирск).

Рибосомы *E. coli*, штамм MRE-600, РНК, [¹⁴C]фенилаланил-тРНК с удельной активностью по фенилаланину 500 Ки/моль и белковые трансферные факторы любезно предоставлены Н. В. Белициной (Институт белка АН СССР).

Седиментационный анализ рибосомальных субчастиц выполняли на ультрацентрифуге УЦА-10 (СКБ биофизической аппаратуры, Москва), а препаративное их разделение — в градиенте сахарозы 5—20% в буфере 2 (0,01 М Трис-НСl, 0,001 М MgCl₂, 0,1 М KCl, pH 7,5) на центрифуге Spinco L-5-75B (Beckman, США), ротор SW-25 или SW-65.

Бесклеточный биосинтез полифенилаланина проводили в условиях, описанных в работе [21]. Для отделения транскрибирующего комплекса от менее высокомолекулярных соединений использовали метод гель-фильтрации на сефарозе 4В (Pharmacia, Швеция).

Анализ рибосомальных субчастиц в градиенте плотности хлористого цезия выполняли в условиях, разработанных Спириным и сотр. [16].

Количественный анализ азидных групп проводили газометрически, как описано в работе [22]. Кинетику гидролиза диазида в водной среде изучали по освобождению анионов N₃⁻, количественный анализ которых описан в работе [23].

Степень модификации полилизина рассчитывали, исходя из определенного элементным анализом содержания серы в модифицированном препарате. Степень модификации РНК определяли восстановлением остатков фиксирующего реагента боргидридом натрия и, после удаления восстановителя диализом, титрованием генерированных сульфгидрильных групп радиоактивной [¹⁴C]иодуксусной кислотой. Результаты сравнивали с контролем — не обработанной ДАТГ РНК.

Синтез диазида дитиодигликолевой кислоты. В качестве исходного вещества для синтеза диазида дитиодигликолевой кислоты использовали дигидразид дитиодигликолевой кислоты, синтезированный из диметилового эфира дитиодигликолевой кислоты гидразиолизом [24]. 50 мг (0,24 ммоль) дигидразида растворяли в 10 мл 0,5 н. HCl и добавляли раствор 120 мг (1,4 ммоль) KNO₂ в 1 мл воды при перемешивании. После 3—5-минутной инкубации смесь центрифугировали 2 мин при 6000 об/мин, слой маслянистой жидкости собирали, промывали водой до нейтральной реакции водного слоя и растворяли в 1 мл этанола. Выход продукта 22 мг (0,096 ммоль), 40%. Найдено, %: С 20,29; Н 1,85; N 35,13; S 27,04. С₁₁H₁₀O₂N₆S₂. Рассчитано, %: С 20,69; Н 1,72; N 36,21; S 27,59. Инфракрас-

ный спектр вещества в хлороформе снимали на приборе UR-20 (Carl Zeiss, ГДР) в кювете из КВг толщиной 0,4 мм при комнатной температуре.

Обработка биополимеров диазидом дитиодигликолевой кислоты. К 1 мл раствора препарата (полилизин, РНК, рибосомы) с концентрацией 0,5—2,0 мг/мл в буфере 1 (0,06 М триэтаноламин (рН 8,0), 0,02 М MgCl₂, 0,1 М KCl) добавляли при интенсивном перемешивании 20—100 мкл 0,2—0,3 М раствора диазида дитиодигликолевой кислоты в этаноле и выкубировали 5 мин. Избыток диазида удаляли диализом после добавления в раствор 30—50 мкл 1 М Трис-HCl-буфера, рН 8,0, для нейтрализации агента. Разрыв образованных ковалентных сшивок проводили добавленным дитиотрейта до концентрации 0,02 М. В опытах использовали только свеже-синтезированный диазид.

Для облучения образцов при модификации была использована ртутная лампа СВД-120А и фильтр, пропускающий свет с длиной волны выше 300 нм. Интенсивность лампы составляла $1,9 \cdot 10^{17}$ кв/с.

Авторы выражают благодарность Л. П. Овчинникову и Т. Н. Власик за полезные советы и практическую помощь в проведении центрифугирования в градиентах плотности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wold F. (1972) *Methods Enzymol.*, vol. 25, part B, 624—651.
2. Нехорешев С. А., Прессман Е. К., Сандахчиев Л. С., Севастьянов А. П. (1971) *Биохимия*, 36, 586—587.
3. Chang F. N., Flaks J. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, 68, 177—180.
4. Lutter L. C., Kurland C. G. (1973) *Nature New Biol.*, 243, 15—17.
5. Bickle T. A., Hershey J. M. B., Traut R. R. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 1327—1331.
6. Clegg C., Hayes D. (1972) *C. r. Acad. Sci.*, D275, 1819—1822.
7. Slobin L. I. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 3769—3773.
8. Traut R. R., Bollen A., Sun T.-T., Hershey J. M. B., Sundler J., Pierce L. R. (1973) *Biochemistry*, 12, 3266—3273.
9. Sun T.-T., Bollen A., Kahan L., Traut R. R. (1974) *Biochemistry*, 13, 2334—2340.
10. Peretz H., Elson D. (1976) *Eur. J. Biochem.*, 63, 77—82.
11. Peretz H., Towbin H., Elson D. (1976) *Eur. J. Biochem.*, 63, 83—92.
12. Ruoho A., Bartlett P. A., Dutton A., Singer S. J. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 63, 417—423.
13. Lomant A. J., Fairbanks G. (1976) *J. Mol. Biol.*, 104, 243—261.
14. Lutter L. C., Ortanderl F., Fasold H. (1974) *FEBS Lett.*, 48, 288—292.
15. Lwowski W. (1971) in *The chemistry of azido group* (Patai S., ed.), part 9, p. 534, London — New York — Sidney — Toronto.
16. Белицкая Н. В., Овчинников Л. П., Спирин А. С., Геадон Ю. З., Червос В. П. (1968) *Молекуляр. биология*, 2, 727—735.
17. Belitsina N. V., Elizarov S. M., Clukhova M. A., Spirin A. S., Butorin A. S., Vasilenko S. K. (1975) *FEBS Lett.*, 57, 262—266.
18. Betsema J. A., Conway T. W. (1971) *J. Mol. Biol.*, 55, 457—465.
19. Suzuka I. (1971) *Eur. J. Biochem.*, 23, 61—68.
20. Kumura K., Watanabe A., Machida M., Kanaoka Y. (1971) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 43, 882—887.
21. Белицкая Н. В., Гривович А. С., Спирин А. С. (1973) *Докл. АН СССР*, 210, 224—227.
22. Carpenter W. R. (1964) *Anal. Chem.*, 36, 2352—2355.
23. Звягильская Р. А. (1975) В сб. *Методы современной биохимии* (Кретович В. Л., Шольц К. Ф., ред.), с. 144—146, «Наука», М.
24. Rose F. L., Walpole A. L. (1964) *Progr. Biochem., Pharmacol.*, 1, 432—441.

Поступила в редакцию
10.VI.1977

APPLICATION OF BIFUNCTIONAL ACYLATING
REAGENT—DITHIODIGLYCOLIC ACID DIAZIDE—
FOR REVERSIBLE COVALENT FIXATION OF NUCLEOPROTEINS

BUTORIN A. S., VASILENKO S. K.

State University, Novosibirsk

A method for the synthesis as well as some chemical properties of dithioglycolic acid diazide, a bifunctional acylating agent containing intramolecular disulphide linkage, are described. This reagent acylates the protein amino groups and practically does not react with nucleic acids. Dithioglycolic acid diazide forms covalent crosslinks between nucleophilic groups of proteins, whereby both its functional groups are involved in the interaction. Quantitative cleavage of crosslinks is possible in mild conditions by reducing the disulphide linkages with the thiol compounds. The mode of action of dithioglycolic acid diazide on *E. coli* MRE-600 ribosomes was studied. The treatment of 70S-ribosomes abolishes their dissociability in solutions with low concentration of magnesium ions. The covalent crosslinks firmly fix a spatial structure of ribosomal subparticles conferring them the stability against destructive conditions of a high ionic strength. This makes possible the analysis of subparticles in density gradients of cesium chloride. The treatment the fixed ribosomes by 0.02 M dithiotreitol quantitatively cleaves the formed crosslinks, thereby restoring the ribosome capability in solutions of low concentration of magnesium ions to dissociate into subunits which, in turn, may further degrade into proteins and nucleic acids in the cesium chloride density gradient. It was shown that dithiodiglycolic acid diazide completely and irreversibly inactivated ribosomes in poly(U)-dependent cell-free polyphenylalanine biosynthesis. The components of the protein synthesis system (messenger, aminoacyl-t-RNA, peptidyl-t-RNA) failed to protect the ribosomes from the irreversible inactivation by this reagent.
