

**Mariusz JASZCZOŁT, Grzegorz BOCZKAJ,  
Khrystyna GRYGORYSHYN, Marian KAMIŃSKI\***

Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny,  
Instytut Chemii, Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej,  
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk  
e-mail: [mknkj@chem.pg.gda.pl](mailto:mknkj@chem.pg.gda.pl)\*, [mariusz.jaszczolt@gmail.com](mailto:mariusz.jaszczolt@gmail.com)

## **Immuno chromatografia: przegląd i charakterystyka immunosorbentów oraz metod immobilizacji**

**Immuno chromatography: a review and characterization  
of immunosorbents and methods of immobilization**

**Streszczenie:** Chromatografia immunopowinowactwa (ang. *ImmunoAffinity Chromatography, IAC*) jest techniką rozdzielania stosowaną do różnorodnych klas związków chemicznych, a także jako dodatkowe narzędzie w badaniach z zakresu biochemii. Kluczowym elementem odpowiedzialnym za wysoce selektywne oddziaływania w IAC jest przeciwciało (ang. antibody, Ab) produkowane przez organizmy żywe w wyniku odpowiedzi immunologicznej i wykazujące specyficzność oraz powinowactwo wobec substancji rozpoznawanych, jako obce, określanych jako antygeny. W celu przeprowadzenia procesu immuno chromatograficznego przeciwciała immobilizuje się na nośnikach, które wcześniej muszą zostać zaktywowane. Jako matryce stosuje się naturalne oraz syntetyczne polimery: agarozę, celulozę, dekstran, poliakrylamidy, polimetakrylady, a także żel krzemionkowy oraz szkło porowate. Aktywacja ziół ma za zadanie przygotować matrycę do immobilizacji poprzez wprowadzenie grup funkcyjnych oddziałujących z elementami przeciwciała. W tym celu stosuje się różnorodne aktywatory rozpuszczalne oraz sieciujące czynniki bifunkcyjne. Istnieje także szeroki wachlarz dostępnych metod unieruchamiania przeciwciała na powierzchni nośnika, które ze względu na rodzaj oddziaływań przeciwciało-nośnik dzielimy na fizyczne oraz chemiczne, a w zależności od orientacji związanych immunoglobulin: ukierunkowane i nieukierunkowane (losowe). W trakcie przygotowania immunosorbentu należy uwzględnić właściwości matrycy, a także warunki prowadzenia procesu aktywacji oraz immobilizacji, co bezpośrednio wpływa na sprawność kolumny wypełnionej tego typu ziołem, a w konsekwencji na efektywność procesu chromatograficznego.

**Słowa kluczowe:** chromatografia immunopowinowactwa, przeciwciała monoklonalne, przeciwciała poliklonalne, immobilizacja

**Abstract:** Immunoaffinity Chromatography (IAC) is a technique used for separation of different classes of chemical compounds, as well as an additional tool in biochemistry. The key element in the IAC is an antibody (Ab) produced by living organisms as a result of activation of the immune response, which shows the specificity and affinity with the substances recognized as foreign, known as antigens. In order to carry out the immuno chromatographic process, antibodies are immobilized on the carrier, which must be firstly activated. There are carriers made of natural and synthetic polymers: agarose, cellulose, dextran, polyacrylamides, polymethacrylates, as well as silica gel and porous glass. The main task of activation is to prepare the carrier for the immobilization by the introduction of functional groups interacting with the elements of the antibody. For this purpose, the various activators like soluble and bifunctional crosslinking agents are used. There are many methods of immobilization, which, depending on the antibody-matrix

*interactions, are divided into physical and chemical immobilization, and depending on the orientation - random and site-directed. During the preparation of immunosorbent one should take into account the characteristics of the matrix, as well as the conditions of the activation and immobilization, which directly affect the efficiency of the bed, and consequently the performance of the chromatographic process.*

**Key words:** *Immunoaffinity chromatography, IAC, monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, immobilization*

## **1. Wstęp (Introduction)**

Chromatografia immunopowinowactwa (IAC - *Immunoaffinity Chromatography*) jest techniką rozdzielania, w której podstawę procesu separacji składników rozdzielanej mieszaniny stanowi specyficzność oddziaływań przeciwciała – antygen. Możliwość wytwarzania przeciwciał wykazujących powinowactwo wobec różnorodnych klas związków chemicznych, a także selektywność wiązań spowodowała, że chromatografia immunopowinowactwa została uznana za jedną z najbardziej efektywnych technik stosowanych w celach analitycznych oraz preparatywnych. Obecnie metoda ta jest powszechnie wykorzystywana w dziedzinach z zakresu biologii, ochrony środowiska, analityki żywności, jak również w badaniach klinicznych do rozdzielania oraz oczyszczania peptydów, enzymów, hormonów, receptorów, wirusów, leków, mykotoksyn, pestycydów, innych związków organicznych, a także metali [1, 2]. Ponadto, IAC może służyć, jako dodatkowe narzędzie do badań biochemicznych, pozwalając na ilościową ocenę parametrów dotyczących specyficznych oddziaływań różnorodnych elementów w systemach biologicznych [3].

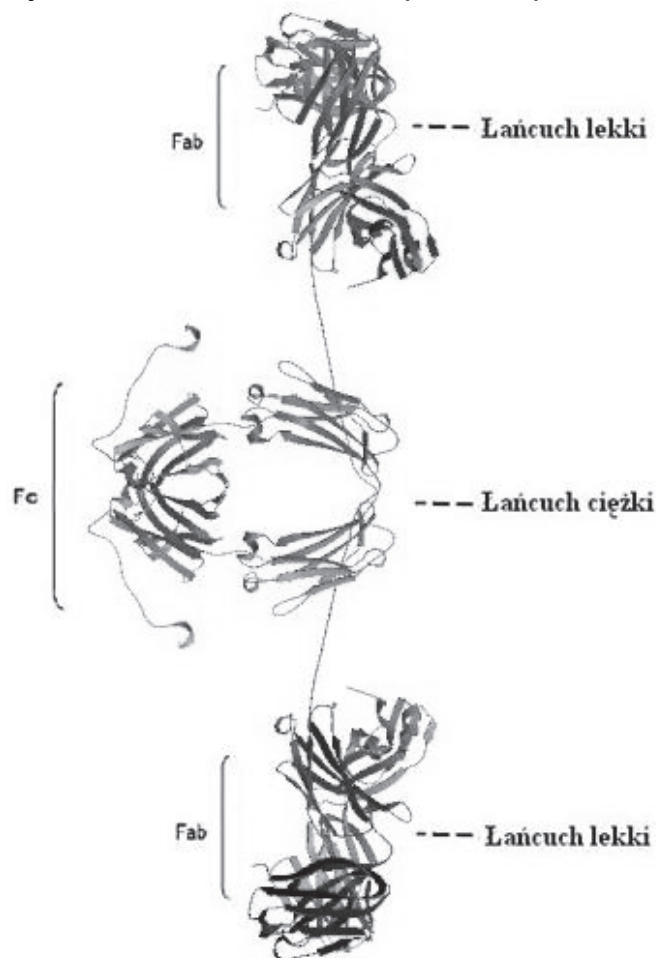
Pierwsze doniesienia o immobilizacji przeciwciał na podłożu stałym pochodzą z roku 1967 [2]. Od tego momentu nastąpił ogromny postęp w kierunku rozwoju rozmaitych technik unieruchamiania, umożliwiających wydajne przeprowadzenie procesu chromatograficznego. Pomimo tego, że ich ilość oraz różnorodność obecnie wydaje się być bardzo duża, wielu naukowców nadal pracuje nad doskonaleniem metod unieruchamiania centrów aktywnych na nośniku, uzyskując wyższe wydajności oraz polepszając efektywność procesów immobilizacji. Jednym z głównych problemów napotykanym przez badaczy w trakcie prowadzenia procesu immobilizacji jest zachowanie pierwotnej aktywności przeciwciał, która często ulega zmianie w wyniku wytwarzanych ze złożem wiązań chemicznych, a także odpowiedniej orientacji zapewniającej efektywne rozdzielanie.

## **2. Przeciwciała (Antibodies)**

### **Charakterystyka przeciwciał (Characterization of antibody)**

Przeciwciała, inaczej immunoglobuliny (Ig), są glikoproteinami należącymi do grupy białek cytoplazmatycznych wytwarzanych przez komórki

w wyniku aktywacji odpowiedzi immunologicznej. Szacuje się, że układ odpornościowy ssaków (w tym człowieka) produkuje od  $10^6$  do  $10^8$  różnorodnych przeciwciał, które swoiście wiążą się z ciałami obcymi lub ich częściami zwanymi antygenami [4]. Typowe przeciwciało (rys.1) o masie cząsteczkowej około 150 kDa złożone jest z czterech łańcuchów polipeptydowych: dwóch lekkich – L, od ang. *light* (o ciężarze ok. 25 kDa każdy) oraz dwóch ciężkich – H, od ang. *heavy* (o ciężarze ok. 50 kDa każdy). Dwa identyczne łańcuchy H są dłuższe i powiązane między sobą wiązaniami disiarczkowymi. Łańcuchy lekkie również są identyczne i wiążą się wiązaniami disiarczkowymi z łańcuchami ciężkimi. Często występują w dwóch formach –  $\lambda$  i  $\kappa$ . W wyniku trawienia enzymatycznego papainą przeciwciała otrzymuje się trzy fragmenty o masie 50 kDa każdy. Dwa z nich to fragment  $F_{ab}$  (z ang. *antigen binding fragment*) znajdujący się na N-końcu i zawierający region o zmiennej zawartości aminokwasów zwany paratopem, który odpowiada za wiązanie antygeny, a także element  $F_c$  (z ang. *crystallization fragment*) na C-końcu, który nie wiąże antygeny, natomiast wykazuje funkcje efektorowe. W nienaruszonej cząsteczce immunoglobuliny fragment  $F_c$  jest połączony w sposób ruchomy z dwoma jednostkami  $F_{ab}$ , co umożliwia zmianę kąta  $F_c - F_{ab}$ , tym samym ułatwia tworzenie kompleksów przeciwciało-antygen [5].



Rys. 1. Schemat budowy przeciwciała  
Fig. 1. Scheme of antibody structure

Istnieje 5 klas immunoglobulin: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, które zawierają taki sam łańcuch lekki, ale różnią się sekwencją aminokwasową łańcucha ciężkiego, ładunkiem, zawartością węglowodanów, ilością jednostek Y, miejscem występowania, a także stężeniem w organizmie, co w konsekwencji daje inne funkcje biologiczne. W chromatografii immunopowinowactwa najczęściej wykorzystywaną klasą jest immunoglobulina G (IgG), występująca w surowicy w największej ilości. W jej obrębie wyróżnia się cztery podklasy: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Występują one w różnych proporcjach: 66%, 23%, 7% oraz 4%. Cechą wspólną jest posiadanie łańcucha ciężkiego  $\gamma$ , który w zależności od podklasy nieco różni się sekwencją aminokwasową, a także regionem zwiastowym, szczególnie lokalizacją mostków disiarczkowych. Zaletą tej klasy przeciwciał jest stabilność w trakcie oczyszczania, a także najmniejsza masa cząsteczkowa spośród wszystkich klas immunoglobulin [5, 6].

### **Otrzymywanie przeciwciał (Receiving of antibodies)**

Dwa typy przeciwciał – poliklonalne oraz monoklonalne - są wykorzystywane jako elementy aktywne fazy stacjonarnej w chromatografii immunopowinowactwa. Przeciwciała poliklonalne są produkowane przez różnorodne linie komórkowe, mogą wiązać różne epitopy z różniącym się powinowactwem. Z kolei przeciwciała monoklonalne są wytwarzane z jednego klonu limfocytów B, są swoiste wobec tego samego epitopu oraz wiążą się z nim w przybliżeniu z taką samą siłą [6].

W początkowym okresie rozwoju technik chromatografii immunopowinowactwa głównym źródłem przeciwciał poliklonalnych była surowica immunizowanych (choć nie zawsze) zwierząt laboratoryjnych. Po wprowadzeniu antygeny do organizmu zwierzęcia (zazwyczaj myszy lub królika) zostaje zaktywowany cały szereg limfocytów B, które zaczynają produkować przeciwciała przeciw antygenom zawierającym różne epitopy. W ten sposób powstaje mieszanina przeciwciał o zróżnicowanym powinowactwie i swoistości. Gdy stężenie immunoglobulin osiągnie pożądaną wartość, przeprowadza się procedurę izolacji. W celu immobilizacji, wcześniej wykorzystywano albo nieoczyszczoną frakcję Ig lub też oczyszczoną metodami powinowactwa na specyficznych złożach [2].

Dzięki rozwojowi technik hybrydyzacji komórek w połowie lat 70. pojawiła się też możliwość wykorzystania przeciwciał monoklonalnych. Procedura ich otrzymywania jest analogiczna do procedury otrzymywania przeciwciał poliklonalnych. Limfocyty B są izolowane ze śledziony zwierząt immunizowanych antygenami, specyficznymi do interesujących nas przeciwciał, a następnie poddawane fuzji z komórkami szpiczaka wykazującymi zdolność do nieograniczonej liczby podziałów. Tak otrzymana hybryda o swoistości limfocytu B jest w stanie produkować specyficzne przeciwciała przez długi okres czasu. Kolejnym etapem jest dokonanie selekcji (skringingu) i izolacji hybrydy produkującej charakterystyczne przeciwciała. Po dokonaniu wyboru, odpowiednie komórki izoluje się, a następnie reklonuje. Na tym etapie ocenia się też właściwości wiążące przeciwciał. Jeśli wybrana linia prze-

ciwciał monoklonalnych spełnia wszystkie stawiane wymagania, można rozpocząć produkcję na większą skalę [2].

Dokonanie wyboru pomiędzy przeciwciałami poli- czy monoklonalnymi, które mają służyć jako elementy złoża do oczyszczania interesujących składników mieszaniny, czasami następuje trudności, ponieważ każdy typ posiada swoje zalety i wady. Z praktycznego punktu widzenia produkcja przeciwciał poliklonalnych jest łatwiejsza i szybsza. Jednak źródło, z którego izolowane są tego typu immunoglobuliny, jakim są zwierzęta hodowlane (konia), jest ograniczone. Dodatkowo potrzeba pobierania krwi wcześniej zaszczepionych zwierząt, a także przeprowadzenie procesu immunizacji za każdym razem od nowa, często powoduje problemy z uzyskaniem odpowiedniej ilości oraz jakości pożądaných przeciwciał. W tym przypadku dobrym rozwiązaniem może być wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych. Komórki hybrydowe można przechowywać w ciekłym azocie i teoretycznie zachowują one zdolność do wytwarzania przeciwciał monoklonalnych nawet przez kilka lat. Pomimo że ich produkcja jest nieco bardziej skomplikowana i kosztowna, stosowanie przeciwciał monoklonalnych na większą skalę oraz przez dłuższy okres czasu jest bardziej opłacalne [3].

Nie ma uniwersalnych zasad wyboru typów przeciwciał. W badaniach naukowych szerokie zastosowanie posiadają oba typy immunoglobulin. Z kolei w przemyśle, zwłaszcza farmaceutycznym, do oczyszczania stosuje się głównie przeciwciała monoklonalne. Oprócz aspektów ekonomicznych, związane to też jest z koniecznością standaryzacji metod oraz technik, która wymaga zapewnienia stałego oraz bezpiecznego źródła surowca [2].

### **3. Nośniki: ogólna charakterystyka (Carriers: general characterization)**

Ważnym elementem planowania procesu chromatograficznego rozdzielania jest dokonanie wyboru odpowiedniego nośnika. Dla efektywnego wykorzystania w chromatografii immunopowinowactwa, idealna matryca powinna posiadać następujące właściwości [7]:

- nierozpuszczalność;
- odpowiednia przepuszczalność i duża powierzchnia właściwa;
- sztywność oraz odpowiedni rozmiar ziaren;
- zerowa pojemność adsorpcyjna (w przypadku chemicznych metod immobilizacji);
- odpowiednia reaktywność chemiczna, pozwalająca na wprowadzenie przeciwciał;
- stabilność chemiczna w warunkach prowadzenia procesu immobilizacji, adsorpcji, desorpcji oraz regeneracji;
- odporność na działanie mikroorganizmów i enzymów;
- charakter hydrofilowy.

Całkowita nierozpuszczalność jest ważna nie tylko z powodu możliwych strat części nośnika, ale też dla zapobiegania zanieczyszczenia substancji przeznaczonych do rozdzielania.

Odpowiednia przepuszczalność matrycy jest konieczna, w celu umożliwienia tworzenia się kompleksów pomiędzy przeciwciałem, a substancją rozdzielaną [7].

Sorbent musi też wykazywać minimalną niespecyficzną sorpcję. Jest to istotny warunek w przypadku chemicznych metod immobilizacji. W trakcie przygotowania złoża ważne jest, aby ligand przyłączał się głównie wiązaniami kowalencyjnymi, a przeciwciała niezwiązane mogły być usunięte z kolumny. Natomiast w przypadku fizycznej adsorpcji warunek ten nie jest konieczny [7].

Matryca powinna zawierać odpowiednią ilość grup funkcyjnych, które po aktywacji lub modyfikacji mają nabyć zdolność do wiązania przeciwciała.

Aktywacja oraz modyfikacja muszą zachodzić w warunkach niepowodujących zmian struktury nośnika. Szczególnie ważną jest wytrzymałość mechaniczna w trakcie dołączania liganda (przeciwciała) oraz stabilność chemiczna w szerokim zakresie pH, temperatury, siły jonowej, jak również w obecności czynników denaturujących. Fizyczna oraz chemiczna stabilność wiąże się z możliwością wielokrotnego wykorzystania złoża [7].

Sorbenty nie mogą być też atakowane przez drobnoustroje lub enzymy. Takie wymagania lepiej spełniają nośniki nieorganiczne, takie jak szkło, czy też syntetyczne polimery.

Hydrofilowe właściwości są pożądane nie tylko w celu zniesienia niespecyficznego oddziaływań, ale także w celu niedopuszczenia do obniżenia stabilności liganda w wyniku oddziaływań hydrofobowych, które mogą mieć podobny efekt, co rozpuszczalniki organiczne i powodować denaturację białka, jakim jest przeciwciało [7].

Stosowane w chromatografii immunopowinowactwa złoża to głównie pochodne węglowodanowe (np. agaroz, celuloza), czy też syntetyczne, organiczne nośniki (akrylamidy, ich pochodne oraz kopolimery, polimetakrylany, matryce polieterosulfonowe). Istnieje też wiele złoża komercyjnych: Affinica Agarose/Polymeric Supports (Schleicher i Schuell), AvidGel (BioProbe), Bio-Gel/Affi-Gel (BioRad), Fractogel (EM Separations), HEMA-AFC (Alltech), Reacti-Gel (Pierce), Sepharose/Superose/Sephacryl (Pharmacia), Trisacryl / Ultrogel (IBF) oraz TSK Gel Toyopearl (TosoHaas) [4]. Niskie opory przepływu tych złoża powodują, iż proces może być przeprowadzony w warunkach przepływu pod wpływem siły grawitacji czy też podciśnienia. To powoduje, że żele te są stosunkowo proste i tanie. Główną wadą tego typu materiału jest niekorzystna dynamika wymiany masy, ograniczona stabilność przy wysokich natężeniach przepływu oraz zwiększonym ciśnieniu. W tabeli 1 przedstawiono informację dotyczące niektórych złoża komercyjnych stosowanych w procesach rozdzielania składników mieszanin z zastosowaniem IAC.

Chromatografia immunopowinowactwa może być stosowana, w wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), pod warunkiem, że zostaną wykorzystane materiały o większej wytrzymałości mechanicznej. Złoża, które

zostały wytworzone do tych celów obejmują modyfikowany żel krzemionkowy, szkło, organiczne polimery syntetyczne, takie jak złoża azalaktone i polistyrenowe [4].

#### **4. Przegląd najpopularniejszych nośników (Review of the most common carriers)**

##### **Celuloza (Cellulose)**

Celuloza jest liniowym polimerem należącym do polisacharydów. Składa się z cząsteczek zawierających od kilkunastu do kilkuset tysięcy jednostek D-glukozy, które są połączone wiązaniami  $\beta$ -1,4-glikozydowymi, rzadko też  $\beta$ -1,6-glikozydowymi.

Preparaty komercyjne, produkowane na bazie celulozy są zazwyczaj sieciowane czynnikami bifunkcyjnymi takimi jak epichlorohydryną (1-chloro-2,3-epoksypropan) i wykazują wysoką stabilność chemiczną. Wiązania glikozydowe celulozy są podatne na hydrolizę kwaśną, a w warunkach ekstremalnych obserwuje się prawie ilościowe rozczepienie do wolnej krystalicznej D-glukozy. Z kolei oddziaływanie z czynnikami utleniającymi jak na przykład nadjodan sodu (jodan (VII) sodu) powoduje tworzenie się grup aldehydowych bądź też karboksylowych. Celuloza ulega działaniu celulaz obecnych między innymi w mikroorganizmach.

##### **Agaroza (Agarose)**

Agaroza jest liniowym polisacharydem zbudowanym z naprzemian ułożonych jednostek D-galaktozy oraz 3,6-anhydro-L-galaktozy.

Obecnie jest najbardziej rozpowszechnionym nośnikiem w chromatografii powinowactwa. Jak wykazały badania, odpowiada ona prawie wszystkim wymaganiom idealnej matrycy.

Sepharose jest żelem agarozy o sferycznych ziarnach. W handlowej postaci występuje jako biała zawiesina w wodzie, która zawiera 0,02% azydek sodu jako czynnik bakteriostatyczny. Pierwsze w sprzedaży pojawiły się trzy typy sefarozy: Sepharose 6B, 4B oraz 2B.

Najczęściej stosowaną jest Sepharose 4B. Wraz ze wzrostem stężenia agarozy zmniejsza się jej porowatość, co z kolei powoduje zwiększenie sztywności. Sepharose rozpuszcza się po podgrzewaniu do 40°C, a także może zostać zniszczona pod wpływem zamrażania. Sepharose jest stabilna w wodnych (w tym o wysokim stężeniu soli) roztworach w zakresie pH od 4 do 9. Nie zaleca się też stosowania jako medium odszczepiającego chlorowodoru guanidyny, mocznika, soli chaotropowych, rodanku potasu czy też czynników utleniających. Substancje te mogą powodować niszczenie wiązań wodorowych, które stabilizują nośnik. Dzięki obecności 3,6-anhydro-L-galaktozy matryca jest odporna na biodegradację. Sepharose można również poddawać sterylizacji chemicznej (np. dietylopirowęglańcem - DEPC) [7].

W roku 1975 w celach praktycznych zaczęto wykorzystywać Sepharose CL (2B, 4B, 6B), wytwarzaną w wyniku reakcji z 2,3-dibromopropanolem w silnie zasadowym środowisku. Po przeprowadzeniu procesu sieciowania, żel jest poddawany hydrolizie zasadowej w warunkach redukujących. Związane łańcuchy polisacharydowe zawierają mało grup ulegających jonizacji, a także lepszą chemiczną i fizyczną wytrzymałość w porównaniu z Sepharose. Z kolei porowatość obu rodzajów nośników jest podobna. Sepharose CL jest stabilna w środowisku wodnym w pH 3-14 oraz w rozpuszczalnikach organicznych. Można stosować sole chaotropowe, natomiast należy unikać warunków utleniających w celu zachowania identyczności wchodzących w skład reszt cukrowych. Sepharose CL może być wielokrotnie autoklawowana w temperaturze 120°C oraz przy pH 7. Matryca jest również odporna na biologiczną degradację [8].

Firma BioRad produkuje kilka typów nośników znanych, jako Biogel A o zróżnicowanej zawartości agarozy. W chromatografii immunopowinowactwa najczęściej są wykorzystywane formy zaktywowane tych matryc występujących w sprzedaży pod nazwą handlową Affi-Gel 10. Złoże to stanowi sieciowaną agarozę z aktywną grupą karboksylową w postaci estru z N-hydroksysukcynimidem [7, 9].

Affi-Gel 10 zawiera obojętne 10-atomowe ramie łącznikowe, w związku z czym jest często wykorzystywany w różnych technikach chromatografii powinowactwa. Białko, w tym przeciwciała, wiążą się wiązaniem amidowym poprzez terminalną grupę karboksylową. Wielkość ziaren wynosi 75-300 µm. Pojemność chemiczna – 15 µmol/ml żelu, pojemność białkowa 35 mg/ml. Złoże jest stabilne do temperatury -70°C, a także w obecności rozpuszczalników organicznych: alkoholi, dimetylosulfotlenku, formamidu oraz dioksanu. Wśród zalet można wymienić łatwość w wykorzystaniu, szybkie wiązanie liganda (w ciągu 4 godzin) w stosunku do innych sorbentów, wysoka stabilność w szerokim zakresie pH (2÷11) oraz w obecności czynników chaotropowych [9].

### **Żele poliakrylamidowe (*Poliacrylamides gels*)**

Żele poliakrylamidowe są zbudowane z łańcucha węglowego, do którego przyłączone są grupy amidowe. Te zupełnie syntetyczne matryce otrzymuje się poprzez kopolimeryzację akrylamidu  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$  oraz N,N'-metylenobisakrylamidu  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ , który jest czynnikiem sieciującym [10].

Żele poliakrylamidowe do celów chromatograficznych otrzymuje się metodą polimeryzacji emulsyjnej. Są produkowane przez firmę Bio-Rad, która oferuje je w postaci suchych proszków o nazwie handlowej – Bio-Gel. Biożel, to kserożel (ciało stałe), które powstaje poprzez powolne suszenie żelu (bez zmiany mikrostruktury), który po dodaniu wody pęcznieje formując ziarna przydatne do celów chromatograficznych [10]. Żele poliakrylamidowe są stabilne w zakresie pH 1÷10 i odporne na większość rozpuszczalników. Nie posiadają naładowanych grup, dlatego wymiana jonami z substancjami



poddany rozdzieleniu chromatograficznemu odgrywa marginalne znaczenie. Żele poliakrylamidowe są biologicznie obojętne i nie są atakowane przez drobnoustroje. W związku z tym, że ich cząsteczki silnie przylegają do szklanych powierzchni, zaleca się stosowanie naczyń ze szkła silanizowanego lub polietylenu [7, 11].

### **Żele krzemionkowe (Silica gels)**

Żel krzemionkowy (*silica gel, silica*) - jest amorficznym ciałem stałym o ogólnym wzorze chemicznym  $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Zakwaszając roztwór krzemianu sodu otrzymuje się zol kwasu ortokrzemowego ( $\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), a następnie przeprowadza się proces „dojrzewania”, przemywanie oraz suszenie. W trakcie „dojrzewania” zolu zachodzi jego polikondensacja w mikrocząstki, które następnie tworzą konglomeraty wypełnione kapilarami (porami) o średnich wymiarach liniowych w zakresie 3-30 nm. Powierzchnia właściwa żelu krzemionkowego może osiągać nawet  $600 \text{ m}^2/\text{g}$ . W zależności od techniki przygotowania można otrzymać cząstki o zróżnicowanych wymiarach oraz wielkościach porów. Od techniki wytwarzania zależą także właściwości powierzchniowe materiału, co jest bardzo istotnie wpływa na charakterystykę nośników chromatograficznych.

Struktura ta wyróżnia się wysoką stabilnością wynikającą z dość mocnych wiązań krzemu za pośrednictwem mostków tlenowych. Ponadto, na powierzchni mikrocząstek, a w konsekwencji wewnątrz porów oraz na powierzchni ziaren znajdują się grupy hydroksylowe, co powoduje, iż żel krzemionkowy wykazuje silne właściwości hydrofilowe. Nieco wilgotny żel krzemionkowy regenerują oraz aktywują w temperaturze  $200\text{-}400^\circ\text{C}$ . Wynik procesu zależy od wybranej temperatury. Dla otrzymania standardowych właściwości adsorpcyjnych po całkowitym wysuszeniu żel częściowo dezaktywuje się poprzez dozowanie kontrolowanej ilości wody (20-30 ml na  $100 \text{ m}^2$  ogólnej powierzchni). Tak otrzymany żel zachowuje właściwości hydrofilowe oraz duże zdolności adsorpcyjne.

W zależności od stosowanej techniki chromatograficznej żele krzemionkowe poddaje się różnym modyfikacjom chemicznym. Jednak w przypadku IAC wprowadza się głównie grupy hydroksylowe -OH oraz typu DIOL. Tak otrzymane nośniki są następnie aktywowane grupami aldehydowymi (metoda Schiffa), imidazolowymi (metoda CDI), a także hydrazydowymi (metoda hydrazydowa) [11].

## **5. Metody immobilizacji (Methods of immobilization)**

Ze względu na rodzaj oddziaływań przeciwciało–antygen metody immobilizacji dzieli się na fizyczne oraz chemiczne, a w zależności od orientacji immunoglobulin – ukierunkowane i nieukierunkowane (losowe).



### Fizyczne metody immobilizacji (Physical methods of immobilization)

Metody fizyczne immobilizacji przeciwciał opierają się na różnego typu niespecyficznych oddziaływaniach pomiędzy przeciwciałem a nośnikiem. Takie oddziaływania obejmują zróżnicowane wiązania niekowalencyjne: jonowe, wodorowe, siły van der Waalsa oraz oddziaływania hydrofobowe, których liczba oraz zasięg zależy od właściwości chemicznych fazy stałej oraz charakterystyki powierzchniowej przeciwciała. Ten sposób immobilizacji nie zapewnia odpowiedniej orientacji fragmentów przeciwciała wiążących antygen względem fazy ruchomej. Zatem w praktyce nie da się z góry określić frakcji przeciwciał, która będzie wykazywać funkcjonalność po tego typu immobilizacji. Dodatkowo, poważnym ograniczeniem immobilizacji fizycznej jest fakt, że w trakcie procesu elucji związane z fazą stałą przeciwciała mogą ulegać wymywaniu. Niemniej jednak, immobilizacja poprzez fizyczną adsorpcję jest nadal, choć rzadko, wykorzystywana w chromatografii immunopowinowactwa. Adsorpcja jest często spotykana w zastosowaniach, gdzie elucja związanych przeciwciał jest albo pożądana albo nie jest wykonywana [3].

### Chemiczne metody immobilizacji (Chemical methods of immobilization)

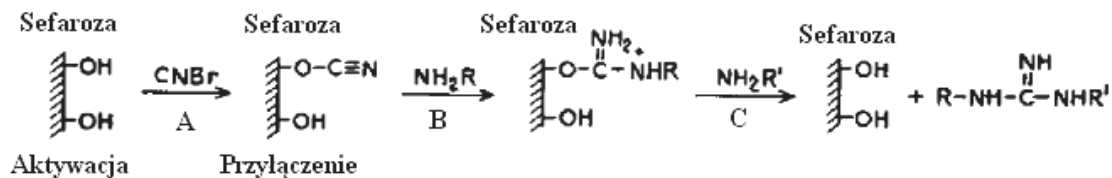
#### Wiązanie kowalencyjne nieukierunkowane (Indirect covalent binding)

W celu związania przeciwciała do nośnika stałego używane są różne odczynniki, reagujące z grupami funkcyjnymi złoza i przeciwciał – tzw. aktywatory. Te reagenty zostały podzielone na kilka grup: aktywatory rozpuszczalne, rozpuszczalne bifunkcyjne czynniki sieciujące oraz aktywatory związane z fazą stałą. W tabeli 1 została wymieniona część z nich, która znalazła swoje zastosowanie w chromatografii immunopowinowactwa.

**Tabela 1.** Aktywatory stosowane do immobilizacji [3]  
**Table 1.** Activators used for immobilization [3]

Rodzaj odczynnika (Type of the reagent)	Nazwa odczynnika (Reagent name)
Aktywatory rozpuszczalne	<ul style="list-style-type: none"> <li>• chlorowodorek N'-(3-dimetyloaminopropylo) karbodiimidu</li> <li>• chlorowodorek N-etylo-N'-(dimetyloaminopropylo) karbodiimidu</li> <li>• N-hydroksysukcynoimid</li> <li>• sulfo-N-hydroksysukcynoimid</li> <li>• bromocyjan</li> </ul>
Rozpuszczalne bifunkcyjne czynniki	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dialdehyd glutarowy</li> <li>• bezwodnik maleinowy</li> </ul>
Aktywatory związane z fazą stałą	<ul style="list-style-type: none"> <li>• związki oksiranu (pochodne epoksydowe)</li> <li>• grupy estrowe n-hydroksysukcynoimidu</li> <li>• bezwodnik maleinowy</li> </ul>

W praktyce jednym z najczęściej stosowanych aktywatorów rozpuszczalnych jest bromocyjan, który oddziałuje z grupami funkcyjnymi złoża przygotowując go do przyłączenia przeciwciała.



Rys. 2. Schemat aktywacji złoża bromocyjanem [7]

Fig. 2. Scheme of activation by bromo-cyanide [7]

Na rys. 2 przedstawiono schemat aktywacji bromocyjanem sefarozy. Nie protonowane grupy aminowe przeciwciała reagują z zaktywowanym nośnikiem wytwarzając N-podstawiony izomocznik. Pomimo swojej popularności, metoda ta ma posiada pewne wady. Powstałe w trakcie immobilizacji struktury nie są całkowicie stabilne. W wyniku reakcji w środowisku obojętnym bądź zasadowym powstają grupy, które mogą zostać sprotonowane i w konsekwencji działać jako jonowymieniacze. Kolejne dodanie cząsteczek zawierających grupy aminowe prowadzi do powstania N-monopodstawione i N,N-dipodstawione pochodne guanidyny. W połączeniu z hydrofobowymi łańcuchami alkilamin wytwarzają się ładunki dodatnie, wykazujące właściwości powierzchniowe czynne. To powoduje wzrost niespecyficznego sorpcji, co może być rozpatrywane, jako odwrotna denaturacja białek - jakimi są przeciwciała [7]. W przeciwieństwie do tego reakcja grup aminowych ze złożem zaktywowanym N-hydroksysukcynoimidem czy też 1,1'-karbonyldiimidazolem (CDI) umożliwia uzyskanie stabilnych N-alkilokarbaminianów (uretany) pozbawione dodatkowych naładowanych grup w szerokim zakresie pH.

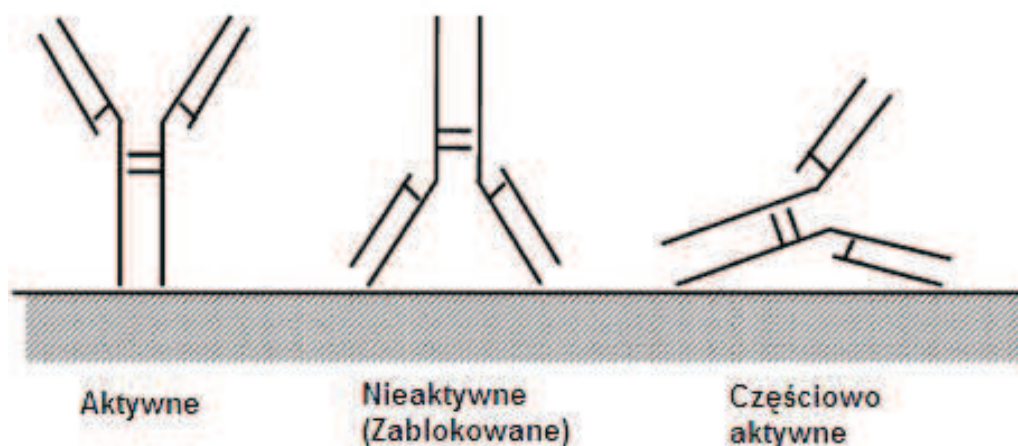
Rozpuszczalnie bifunkcyjne czynniki wiążące działają, jako mostki pomiędzy grupami funkcyjnymi. Część z nich, do których należy na przykład dialdehyd glutarowy czy bezwodnik maleinowy, tworzą mostki pomiędzy identycznymi grupami funkcyjnymi, np. między dwoma grupami aminowymi. Z kolei heterogenne bifunkcyjne czynniki takie jak ester N-hydroksysukcynoimidolowy kwasu 4-maleimidomasłowego wiążą grupy tiolowe nośnika z aminowymi grupami przeciwciała. Inną grupą związków należących do tej rodziny są fotoaktywne agenty, takiej jak benzofenony czy diazyryny. Po związaniu z fazą stałą przeprowadza się fotoaktywację umożliwiającą tworzenie wiązań kowalencyjnych z przeciwciałem [2].

Pomimo tego, że opisane metody są bardzo często wykorzystywane do unieruchamiania, istnieje też kilka nieuniknionych problemów związanych z budową samych przeciwciała. Jak już zostało wcześniej zaznaczone, chemiczne nieukierunkowane metody immobilizacji dla związania przeciwciała wykorzystują głównie aminowe reszty lizyny występujące w obrębie całej cząsteczki (60-80 z 1350 reszt w cząsteczce). Skutkiem tego jest wielokrotne wiązanie oraz wielokierunkowa orientacja, co w konsekwencji powoduje spadek aktywności przeciwciała. Ponadto przeciwciała zawierają cztery ter-

minalne grupy aminowe, które z powodu niższego  $pK_a$  są nawet bardziej reaktywne w porównaniu z  $\epsilon$ -aminowymi grupami lizyn. Negatywny efekt polegający na przyłączaniu poprzez te grupy, które znajdują się w miejscu wiązania antygeny, będzie o wiele większy nawet w porównaniu ze znacznym nadmiarem reszt lizynowych [12].

Podsumowując, niespecyficzna natura tworzących się wiązań uniemożliwia przewidywanie orientacji immobilizowanych przeciwciał, ani też stopnia ich funkcjonalności.

Potencjalnie możliwe sposoby orientacji związanych przeciwciał są przedstawione na rys. 3.



Rys. 3. Orientacja losowo związanych przeciwciał [3]  
Fig. 3. Orientation of random bonded antibodies [3]

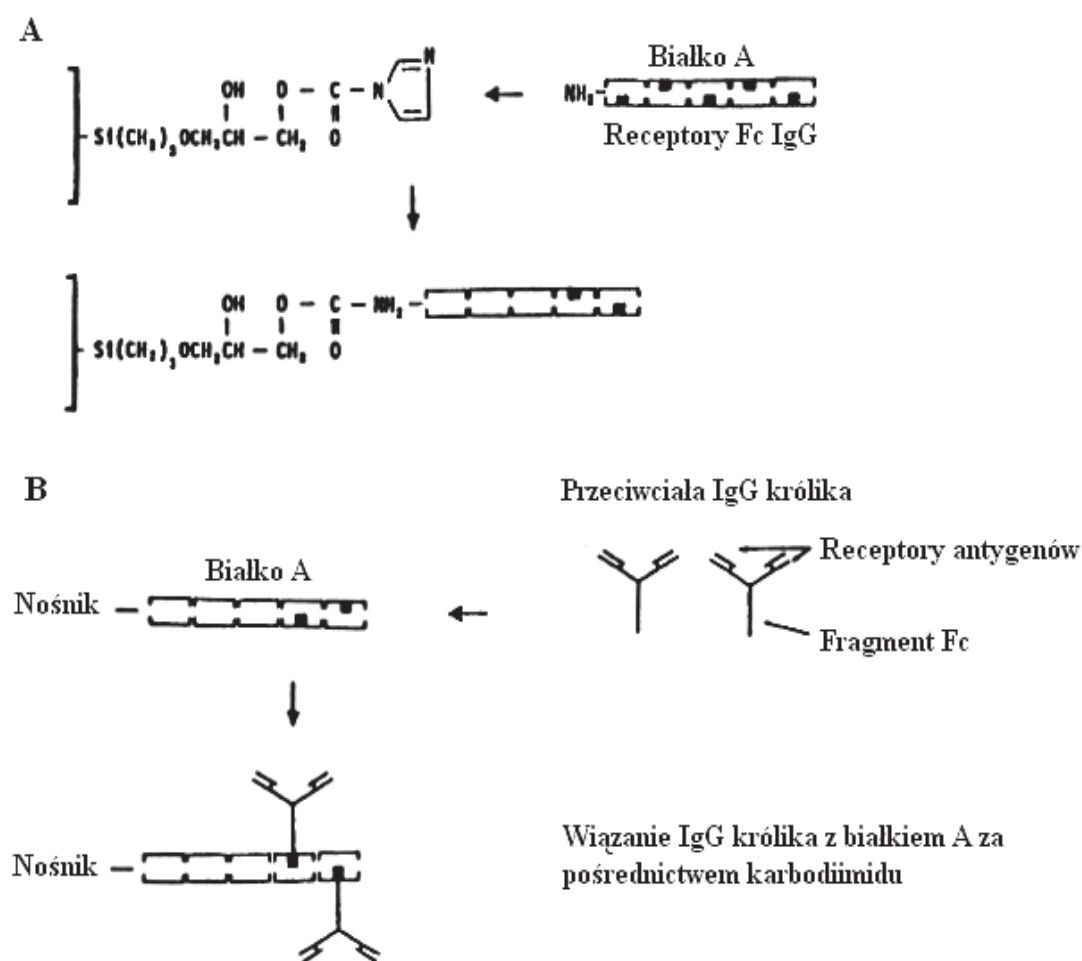
### Wiązanie ukierunkowane (Direct binding)

Metoda wiązania ukierunkowanego ma na celu unieruchomić przeciwciało tak, aby jak największa liczba regionów odpowiedzialnych za łączenie się z antygenem została wyeksponowana w kierunku fazy ruchomej [3].

Jedną z technik, należącą do tej grupy, opiera się na tworzeniu mostków białkowych pomiędzy fazą stacjonarną a przeciwciałem. Najczęściej w tym celu wykorzystuje się dwa typy białek: białko A (PrA) oraz G (PrG).

Białko A wyizolowane z bakterii *Staphylococcus aureus* należy do białek powierzchniowych i posiada wyjątkową zdolność do wiązania immunoglobulin ssaków, szczególnie immunoglobulin G. To białko, związane ze złożem typu Sepharose, jako pierwsze zostało wykorzystane do konstrukcji biospecyficznych kompleksów, mających na celu ukierunkowaną immobilizację przeciwciał. Unieruchamianie poprzez mostek białkowy okazało się szczególnie przydatne w wysokosprawnych procesach rozdzielczych (HPIAC lub HPIC), pozwalających na efektywną jednoetapową izolację odpowiednich antygenów nawet z tak złożonych próbek jak ekstrakty błony komórkowej (*plasma membrane extracts*) [13].

Uniwersalnym nośnikiem w technice HPIAC jest szkło porowate. Schemat przygotowania złoża jest przedstawiony na rys. 4.



Rys. 4. (A) Chemizm procesu wiązania białka A ze złożem szklanym modyfikowanym 1,1'-karbonyldiimidazolem. (B) Schemat wiązania Immunoglobuliny G z unieruchomionym białkiem A

Fig. 4. (A) Chemistry of binding protein A to glass sorbent modified with 1,1'-carbonyldiimidazole. (B) Scheme of binding immunoglobulin G to immobilized protein A

Białko A posiadające właściwość wiązania fragmentów  $F_c$  immunoglobulin jest złożone z pięciu podjednostek, z których każda posiada własny receptor dla  $F_c$ . Jednak w trakcie immobilizacji trzy z nich są dezaktywowane, natomiast dwie pozostałe stanowią punkt uchwytu dla przeciwciał, które następnie tworzą wiązania kowalencyjne z białkiem A potraktowanym uprzednio karbodiimidem. Takie z kolei przyłączenie ułatwia odpowiednią orientację receptorów antygenowych przeciwciała względem fazy ruchomej. Na dodatek białko A stanowi „ruchome ramię” dla unieruchomionych przeciwciał, zmniejszając wpływ zawady sterycznej [13].

W celu zwiększenia specyficzności wiązania IgG przez białko A została skonstruowana technika wykorzystująca aktywne fragmenty PrA (FB). Uzyskuje się je poprzez trawienie trypsyną białka A. Otrzymane fragmenty FB immobilizuje się następnie poprzez aldehyd glutarowy na złożu Eupergit CB6200 zmodyfikowanym dihydrazidem kwasu adypinowego. Tak powstałe

złoże wykazuje lepszą zdolność wiązania przeciwciała, niż złoże z nietrawionym białkiem A w takich samych warunkach.

Do tworzenia złożeń z immobilizowanymi przeciwciałami są również stosowane techniki IMAC (ang. *Immobilized Metal Affinity Chromatography*), czyli chromatografii metalopowinowactwa. Oryginalne podejście zaproponowane przez Hale'a polegało na przygotowaniu wypełnienia zawierającego, jako grupy aktywne reszty kwasu iminodiocetowego, kompleksujące jony kobaltu, na którym zostały unieruchomione w sposób odwracalny przeciwciała. Pierwszym etapem tego procesu była chelatacja jonów kobaltu, którego źródłem jest  $\text{CoCl}_2$ . Następnie do kolumny dozuje się bufor z przeciwciałami, które wiążą się ze złożem IDA- $\text{Co}^{2+}$  w sposób odwracalny. Po związaniu kobalt jest utleniany do  $\text{Co}^{3+}$  rozcieńczonym roztworem  $\text{H}_2\text{O}_2$  w PBS. W ten sposób tworzy się nieodwracalny kompleks z przeciwciałami. Ostatnim etapem jest przemywanie złoża roztworem EDTA i imidazolu w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał. Związane immunoglobuliny nie mogą być wymyte przez reagenty chelatujące, wysokie stężenie soli, detergenty ani czynniki chaotropowe. Jedynie odczynniki o właściwościach redukcyjnych są zdolne do usuwania przeciwciał. Ponieważ histydyny wiążące metale koncentrują się na C-końcu łańcucha ciężkiego, przeciwciała łączą się ze złożem w sposób ukierunkowany, a ich receptory rozpoznające antygen są skierowane do fazy ruchomej. Ważną zaletą tego typu złożeń jest fakt, że umożliwiają one immobilizację przeciwciał różnych typów oraz podklas. Ilustruje to doświadczenie przeprowadzone przez Hale'a. Cztery podtypy przeciwciał (oczyszczone mysie  $\text{IgG}_1$ , mysie  $\text{IgG}_{2a}$  (z płynu puchlinowego), mysie  $\text{IgG}_3$  (z płynu puchlinowego), oczyszczone ludzkie  $\text{IgG}_4$ ) zostały unieruchomione wcześniej opisaną metodą w identycznych warunkach (kolumna IDA 7,5 x 75 mm zrównoważona  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ). Przeciwciała były wymywane poprzez elucję gradientową imidazolem w stężeniu od 0 do 250 mM w ciągu 20 min [8].

Wszystkie przeciwciała w tym przypadku były związane przy takiej samej wartości pH 7,5 oraz zostały wymyte z kolumny przy niskim stężeniu imidazolu (50 mM). Na chromatogramie testowym, piki pochodzące od różnych przeciwciał wykazywały prawie ten sam czas retencji, co oznacza, że wiązanie przeciwciał nie jest specyficzne względem różnych typów oraz podklas [8].

Technika wykorzystująca jony metali przejściowych, w tym przypadku kobalt, jest prostym i szybkim sposobem umożliwiającym immobilizację różnorodnych przeciwciał. Czas przygotowania kolumny wynosi 2-3 godziny. Przeciwciała poddaje się działaniu czynników utleniających w niskich stężeniach, co nie powoduje ich denaturacji, ani utraty aktywności. Tworzenie nieodwracalnych wiązań z jonami  $\text{Co}^{3+}$  nie wymaga przeprowadzenia procesu blokowania grup funkcyjnych, jak ma to miejsce w innych technikach. Kolejną zaletą tych złożeń jest odwracalność immobilizacji. Po traktowaniu kolumny czynnikami redukującymi oraz chelatującymi jony metali, złoże może być następnie wykorzystane do konstrukcji innych kolumn w chromatografii powinowactwa [8].

Najnowsze publikacje z dziedziny immobilizacji donoszą o opracowaniu nowej metody za udziałem metali. Wykorzystując akrylamid (AM) jako monomer, dimetakrylan glikolu etylenowego (EGDMA) jako czynnik sieciujący, 2,2-azobizonitryl kwasu masłowego (AIBN) (inicjator) oraz metodę syntetyczną polegającą na skonstruowaniu polimeru z wbudowanymi jonami miedzi (II) tzw. *bulk polymerization*. Kolumna jest następnie przygotowywana przez unieruchomienie przeciwciał poliklonalnych specyficznych do klenbuterolu - leku z grupy leków  $\beta$ -adrenergicznych, odpowiedzialnego za rozszerzanie oskrzela. Testując kolumnę okazało się, że nawet po 30 powtórzeniach procesu rozdzielania, nie stwierdzono znaczących zmian w specyficznym rozpoznawaniu antygenów.

Najbardziej efektywnymi metodami immobilizacji są takie, które wiążą przeciwciało poprzez ich unikalne fragmenty [3]. Jedno z takich podejść polega na wykorzystaniu węglowodanowych reszt regionu  $F_c$  przeciwciała. Reszty cukrowe znajdują się w domenie przeciwciała przestrzennie oddzielonej od miejsc wiązania antygeny. W związku z powyższym metoda ta pozwala na otrzymanie immunosorbentu o wysokiej specyficznej aktywności.

Immobilizację przeprowadza się poprzez utlenienie nadjodanem łańcuchów węglowodanowych znajdujących się na  $F_c$  przeciwciała do grup aldehydowych, które następnie mogą kondensować z nośnikiem zawierającym grupę aminową tworząc zasadę Schiffa. Zasada Schiffa jest następnie stabilizowana borowodorkiem sodu. Metodą alternatywną jest wykorzystanie zaktywowanych hydrazidem nośników, takich jak: agaroz, celuloza, żel krzemionkowy oraz kopolimery akrylowe, które po reakcji z aldehydami tworzą hydrazony. Biorąc pod uwagę fakt, że przeciwciała posiadają grupy cukrowe tylko w obrębie domeny  $CH_2$  łańcuchów ciężkich, fragmenty  $F_{ab}$  rozpoznające i wiążące antygen będą całkowicie wolne i mogą oddziaływać z fazą ruchomą. Różne badania nad warunkami utleniania przeciwciał poliklonalnych udowodniły, że immobilizacja tą techniką zależy od stężenia nadjodanu, odczynu pH, czasu oraz temperatury. Efektywną kombinację tych czynników można przewidzieć matematycznie [3, 12].

## 6. Podsumowanie

Dzięki wysokiej specyficzności, przeciwciała immobilizowane na podłożach stałych są dzisiaj powszechnie stosowane do oczyszczania różnorodnych klas związków chemicznych. Przed rozpoczęciem procesu unieruchamiania należy dokonać wyboru odpowiednich przeciwciał. Przeciwciała poliklonalne są tańsze, a ich produkcja łatwiejsza w porównaniu z monoklonalnymi. Natomiast wadą jest niepewne źródło pozyskiwania (zwierzęta hodowlane) oraz problem ze standaryzacją. Zaletą przeciwciał monoklonalnych jest natomiast możliwość długotrwałego przechowywania oraz jednorodność właściwości (specyficzności i powinowactwa). Obecnie wciąż stosowane są obie grupy.

Wybierając odpowiedni nośnik należy brać pod uwagę cel rozdzielania, a w konsekwencji koszty. Nośniki do HPLC są droższe, cechują się jednak lepszą wytrzymałością mechaniczną, kinetyką.

Najistotniejsze znaczenie w całym procesie immobilizacji ma metoda aktywacji złoża oraz koncepcja unieruchamiania. Złoża można przygotować stosując cały szereg związków chemicznych, należących do aktywatorów rozpuszczalnych, oraz bifunkcyjnych czynników sieciujących. Często wykorzystuje się także komercyjne, uprzednio zaktywowane złoża.

Większość technik immobilizacji opiera się na nieukierunkowanym (losowym) wiązaniu przeciwciał, wykorzystując przy tym wolne aminowe reszty lizyn rozproszone w obrębie całego przeciwciała. Jest to często przyczyną spadku zdolności wiążących przeciwciał i niską efektywnością immobilizacji – niekiedy jedynie na poziomie 1-30% teoretycznej wydajności. Stąd obecne trendy zmierzają do wykorzystywania jedynie metody ukierunkowanej immobilizacji.

Unieruchamianie poprzez białko A lub G daje odpowiedni efekt orientacji oraz aktywności przeciwciał, ale wadą jest wysoki koszt oraz fakt, że nie wszystkie immunoglobuliny wykazują zdolność do łączenia się z tymi ligandami.

Jednym z ciekawych kierunków rozwoju metod unieruchamiania jest wykorzystanie jonów metali. Techniki te są powszechnie stosowane do immobilizacji białek i być może wkrótce będą też wykorzystywane w przypadku przeciwciał. Przygotowując immunosorbent uwzględnić należy właściwości złoża, warunki procesu aktywacji oraz unieruchamiania. Odpowiedni dobór przeciwciał oraz ukierunkowana immobilizacja chemiczna stanowią o sukcesie uzyskania unikatowej fazy stacjonarnej pozwalającej na selektywne rozdzielanie wielu skomplikowanych mieszanin.

### **Conclusions**

*Because of high specificity immobilized antibodies are widely applied in purification of various chemical compounds. First step in immobilization process is selection of the most suitable antibodies. In comparison to polyclonal antibodies are less expensive and their production process is less complicated than monoclonal antibodies. However an uncertain source (breeding animals) and problem with standardization are main disadvantages of monoclonal antibodies. The advantages of that kind of antibodies are possibility of long-term storage and homogeneity properties: specificity and affinity. Currently both kinds of antibodies are used.*

*A method of bed activation and method of immobilization are the most important factors in separation process by immunochromatography.*

*To preparation of beds many chemical compound are applied, e.g. soluble activators and bifunctional cross linkers. Most of the immobilization techniques are based on indirect binding to antibodies, using free lysine residues distributed through antibody but low efficiency implicates that monoclonal antibodies are more frequently used. Immobilization of antibodies by protein A and protein G is well oriented, but method is high cost and unspecificity to some ligands.*



*Suitable selection of antibodies and direct chemical immobilization are main cause of success of application of antibodies.*

## Literatura (Literature)

1. S. Zhang, J. Wang, D. Li, J. Huang, H. Yang, A. Deng, *A novel antibody immobilization and its application in immunoaffinity chromatography*, *Talanta*, **82**(2010)704.
2. M. Nisnevitch, M.A. Firer, *The solid phase in affinity chromatography: strategies for antibody attachment*, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **49**(2001)467.
3. E. Heftmann, *Journal of Chromatography Library, Chromatography: Fundamentals, and applications of chromatography and related differential migration methods*, Elsevier Amsterdam, 2004.
4. S.D. Hage, *Survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography*, *J. Chromatogr. B*, **715**(1998)3.
5. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, *Biochemia*, 2007, 922.
6. P.A. Millner, *High resolution chromatography. A practical approach*, Oxford University Press 2002, 145.
7. J. Turkova, *Journal of Chromatography Library, Bioaffinity chromatography*, Elsevier Amsterdam, 1978, 174-175.
8. J. Turkova, *Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function*, *J. Chromatogr. B*, **722**(1999)11.
9. Katalog Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>.
10. Katalog BioRad, [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com).
11. O. Mikes, Mir, *Laboratory handbook of chromatographic and allied methods*, 1982, 351-352.
12. L. Osterman, „Chromatografia białek i kwasów nukleinowych”, *Chromatography of proteins and nucleic acids*, Nauka 1985, 58.
13. R.L. Wimalasena. G.S. Wilson, *Factors affecting the specific activity of immobilized antibodies and their biologically active fragments*, *J. Chromatogr. B*, **572**(1991)85.
14. J.E. Hale, *Irreversible, Oriented immobilization of antibodies to cobalt-iminodiacetate resin for use as immunoaffinity*, *Media Anal. Biochem.*, **231**(1995)46.