

La inmunolectroforesis

CAPITULO II

Identificación de las líneas de precipitación

La interpretación de los resultados en la inmunolectroforesis es uno de los capítulos que aún presentan dificultades. No existe todavía un sistema único para denominar las líneas de precipitación del suero humano.

La identificación y la caracterización de los arcos de precipitación no está aún determinada y sigue engrosándose de acuerdo con el descubrimiento de nuevas fracciones.

Un gran mérito tiene en este campo los estudios de Grabar y Burtin,³ en Francia, los Schultze y sus colaboradores en Alemania,^{6, 7, 8} y los de Heremans⁴ en Bélgica, así como los de Hirschfeld⁵ en Suecia.

En esta parte de nuestro trabajo sobre inmunolectroforesis, queremos ofrecer una visión panorámica de las técnicas usadas por dichos autores, que completaremos con nuestras experiencias.

Para la identificación de las líneas de precipitación se utilizan los siguientes métodos:

- 1º Coloración específica.
- 2º Identificación de acuerdo con la posición.
- 3º Identificación con antisueros específicos.
- 4º Identificación según Osserman.
Veamos ahora en detalle cada uno de estos métodos.

1º. Coloración específica.

- a) *Coloración de las lipoproteínas:*
Esta técnica de coloración fue descrita en la parte general, Capítulo I. Con ese procedimiento se puede obtener la coloración de tres o cuatro fracciones: la Alfa₂ Lipoproteína, la Alfa₁ Lipoproteína y algunas veces la Beta₁ Lipoproteína y la Ro-Lipoproteína. La situación de cada una de estas fracciones está esquemáticamente representada en la figura No. 1.
- b) *Coloración de la glucoproteínas:*
Se pueden reconocer estas fracciones por la coloración de PAS (Acido Periódico - Reactivo de Schiff) o por la técnica de NADI. Nosotros recomendamos esta última por ser de más fácil ejecución y ha sido descrita en la parte general. Se reconocen las siguientes fracciones: Alfa₁ Orosomucoproteína, la Haptoglobina y la Ceruloplasmina, y la Beta₁ Glicoproteína. En estos casos hay que tener en cuenta que algunas fracciones como la Albúmina, la Gammaglobulina y otras, pueden colorearse debido a la presencia de grupos glucídicos en la molécula de anticuerpos. Sin embargo esta coloración es mucho más

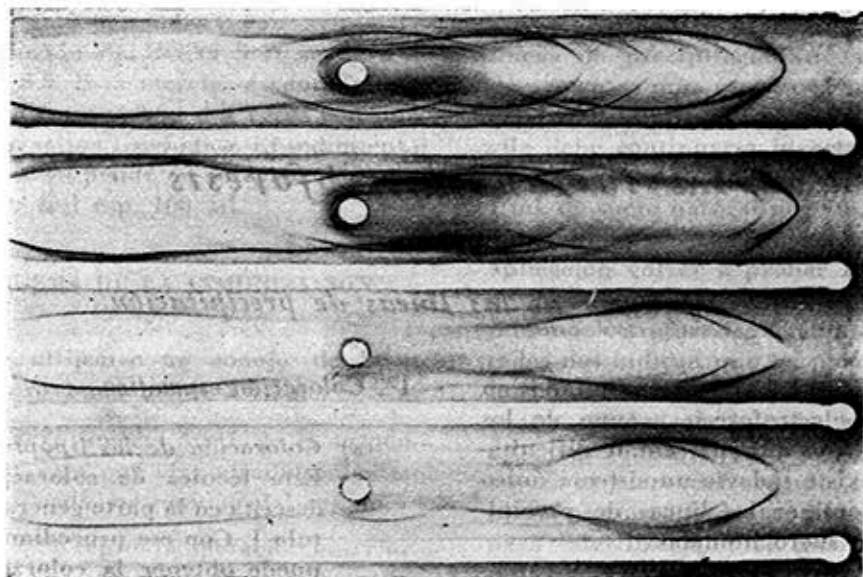


Fig. 1. Coloración de lipoproteínas. Descripción en el texto.

débil que en el caso de las glucoproteínas propiamente dichas.

- c) **Coloración de la ceruloplasmina:** Esta reacción posee la propiedad de la polifenol oxidasa, y por tanto cataliza la reacción de la p-fenilendiamina.

Reactivos:

- I) Solución al 0.5% de p-fenilendiamina.
2 HCl disuelto en Buffer acético de pH 5.5.
- II) Buffer acetato de pH 5.5.
Acido Acético 04 M., 24 ml.
Acetato de Sodio 04 M., 176 ml.
- III) Acido Acético 04 M.
Acido Acético glacial, 22.6 ml.
H₂O Dest. csp, 1000 ml.
Acetato de Sodio 0.4 M.
Acetato de Sodio 3 H₂O, 54.4 gr.
H₂O Dest. csp, 1000 ml.
- IV) Buffer Acetato pH 4.5.

Procedimiento:

Después de la inmunoprecipitación, la placa de agar lavada, pero sin secar, se sumerge en la solución de p-fenilendiamina en Buffer pH 5.5 a temperatura de 37°C durante 2 horas, después se lava. Con el Buffer Acético de pH 4.5 dos veces durante 30 minutos c/u. Luego se envuelve en papel de filtro humedecido y se deja secar a temperatura ambiente. La ceruloplasmina, toma una coloración marrón-violeta. Coloración específica que solamente la da esta fracción. (Fig 2)

- d) **Coloración de las Haptoglobinas:** Las haptoglobinas son fracciones proteicas que se pueden unir a la hemoglobina formando complejos que poseen actividad de peroxidasa, y por esta propiedad se

colorean en presencia del H_2O_2 y la Bencidina u otras sustancias.

Reactivos:

- I) Solución de Bencidina 0.5% en Solución de Acido Acético al 10%.
- II) Acido Acético al 10%.
- III) Solución de Hemoglobina 5 gr%.

rar ésta y luego se diluye hasta la concentración de 5 gr%. Esta solución se guarda en bulbos cerrados al vacío y se pueden conservar.

- IV) H_2O_2 al 30%.

Procedimiento:

Se mezcla una parte de Solución de Hb con parte del suero para

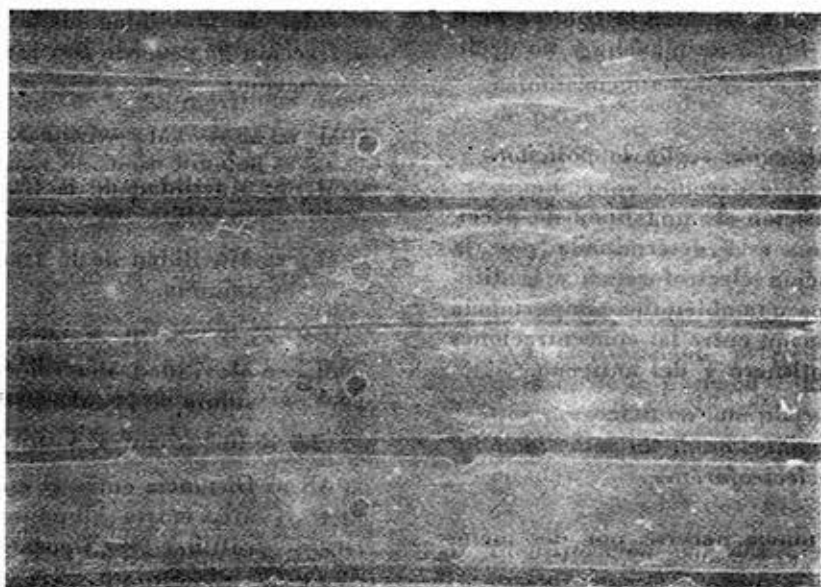


Fig. 2. Coloración específica de la ceruloplasmina (marrón violeta).

Preparación de la solución de Hemoglobina:

Una muestra de sangre oxalata-da, se separa del plasma, por centrifugación, y los glóbulos rojos se lavan cuatro veces con 2 veces su volumen en solución salina fisiológica. Después del último lavado, se hemolizan los hematíes, con 2 veces su volumen en agua destilada con la ayuda del frío. Se centrifuga para sepa-

satuar el suero con la Hemoglobina. Se hace migrar el suero por electroferesis y se precipita por la acción del antisuero. Se lava con solución salina al 9% y se procede a la coloración. La placa sin secar se sumerge en Solución de Bencidina que contiene 0.5 ml. de H_2O_2 por cada 100 ml. del reactivo, se mantiene la placa por 15 minutos. Luego se lava en tres baños decolorantes de ácido acético al 10% du-

rante 10 minutos en cada una. Se envuelve luego en el papel de filtro humedecido y se deja secar espontáneamente a temperatura ambiente. Las Hemoglobinas se colorean específicamente, pero si la solución de Hgb. contiene también metahemoglobina, la B₁ glicoproteína se colorea y también la albúmina formando meta-hem-albúmina, la hemoglobina libre no fijada en la heptoglobina, también se colorea pero en forma de mancha y no de línea.

2º *Identificación según la posición.*

La posición de una línea de precipitación está determinada por la migración electroforética y la difusión, pero también tiene importancia la relación entre las concentraciones del antisuero y del antígeno.

Determinación de la movilidad inmunolectroforética.

Esta puede hacerse por dos métodos:

1º *Medida de la distancia del punto de partida hasta el máximo de arco,*

que indica también la mayor concentración del antígeno. Esta medida puede hacerse directamente sobre la placa o con la ayuda de un proyector que nos de una imagen más ampliada.

2º *Calculando la movilidad absoluta, según Heremans.¹ El principio de este método se basa en que conocida la movilidad absoluta de dos fracciones por ejemplo de la albúmina y de la siderofilina podemos calcular la movilidad de cualquiera fracción de acuerdo con la siguiente ecuación:*

$$M_x = M_A - (M_A - M_S) \times \frac{AX}{AS}$$

M_x = Movilidad de la fracción conocida.

M_A = Movilidad de la fracción Albúmina.

$(-67 \times 10^{-5} \times \text{cm}^2 \times \text{Volt}^{-1} \times \text{Seg}^{-1})$

M_S = Movilidad electroforética absoluta de la siderofilina.

$(3.3 \times 10^{-5} \times \text{cm}^2 \times \text{Volt}^{-1} \times \text{Seg}^{-1})$

AS = Distancia entre el máximo de arco entre Albúmina y Siderofilina (ver figura No. 3).

AX = Distancia entre el máximo de arco entre Albúmina y la fracción desconocida.

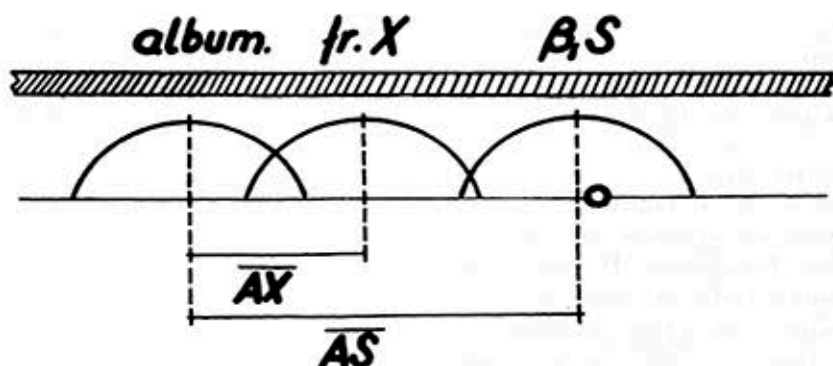


Fig. 3. *Determinación de la movilidad inmunolectroforética.*

Por ejemplo: la distancia entre la albúmina y siderofilina (AS) = 22 mm; la distancia entre la albúmina y la fracción desconocida (AX) = 16.5 mm. De acuerdo con la ecuación anterior calculamos:

$$M_X = 6,7 - (6,7 - 3,3) \times \frac{16,5}{22}$$

$$M_X = 6,7 - \frac{3,4 \times 16,5}{22} = 4,22$$

En la tabla siguiente presentaremos algunos valores.

Tabla No. 1: La movilidad inmuno-electroforética de las fracciones proteicas de suero humano.

Fracción: Movilidad absoluta

$\times 10^{-5} \times \text{cm}^2 \times \text{Volt}^{-1} \times \text{Seg}^{-1}$

Albúmina	6,7
Siderofilina	3,3
Orosomacoproteína	6,85
Alfa-1-Lipoproteína	6,23
Alfa-1	3,5s
Glicoproteína	5,93
Ceruloplasmina	4,43
Alfa 2 Gc ₁ -Globulina	5,0
Alfa 2 Gc ₂ -Globulina	4,46
Haptoglobina 1-1	4,58
Haptoglobina 2-2	4,15
Alfa 2 Lipoproteína	4,7-4,0
Alfa 2 Macroglobulina	4,22
B ₁ A Globulina	3,86
Beta-globulina	0,22

Los componentes más fácilmente identificables por la posición son los siguientes: Albúmina, A-Globulina, Alfa-2-Lipoproteína, la B-2-Macroglobulina y Siderofilina. La albúmina es la línea situada más anódicamente formando un arco y más difuso en el resto, esto es debido a la disolución del ppdo. por exceso

de antígeno. La globulina forma una línea que empieza cerca del punto de partida y avanza hacia el cátodo mucho más que las restantes.

La Alfa 2-Lipoproteína, es una línea difusa que anódicamente va desde el punto de partida hasta la zona de la Alfa 1. Se encuentra muy cerca del eje central de la lámina, debido a que por su gran peso molecular difunde muy poco.

La Beta-2-Macroglobulina, muestra el mismo efecto en la difusión que la anterior, pero está localizada catódicamente con respecto al punto de partida.

La Siderofilina, forma un arco grande muy cóncavo y bien visible alrededor del punto de partida. La localización es más cercana a la fuente de anticuerpos debido a su buena difusión.

A continuación presentamos esquemas de la posición y del tamaño que presentan en una placa inmuno-electroforética las fracciones antes citadas.

3º Identificación por antisueros específicos.

Se denomina antisuero específico a aquél que contiene sólo anticuerpos capaces de reaccionar frente a un solo antígeno. Estos antisueros se obtienen inmunizando animales por medio de un antígeno puro desde el punto de vista inmunológico; pero como esto es muy difícil en la práctica, se les inyecta a los animales antígenos químicamente puros. Como estos tipos de antígenos contienen también impurezas de otras fracciones proteicas, se produce un antisuero que posee además del antisuero deseado, otros, los cuales se deben precipitar sobresaturándolos

con antígenos que actúen sobre los anticuerpos no deseados. Por ejemplo al producir antisueros específicos Anticeruloplasmina se procede de la siguiente forma:

1º Inmunizamos al conejo por medio de un preparado de Ceruloplasmina, aislada por medio de la Dietil-Aminoetil Cerulosa. Este preparado contiene además de la Ceruloplasmina trazas de Alfa-2-Macroglobulina y Beta-globulina. Para eliminar estas impurezas indeseables saturamos el antisuero obtenido, con el suero de un enfermo que posea la enfermedad de Wilson y como este suero tiene una deficiencia casi total de Ceruloplasmina, precipita las otras dos globulinas y queda el antisuero específico Anticeruloplasmina inmunológicamente puro.

Existen numerosos antisueros específicos como los que produce la Casa Behringwerke A. G. de Alemania, entre éstos los más importantes son:

- Suero Antiprecalbúmina
- Suero Antialbúmina
- Suero Anti-Alfa-2-Lipoproteína
- Suero Anti-Alfa-2-Macroglobulina
- Suero Anti-transferrina
- Suero Anti-Beta-2-Macroglobulina
- Suero Anti-Beta-2A-Globulina
- Suero Anti-Gamma-Globulina
- Suero Antifibrinógeno

Debemos hacer la salvedad que en caso de poseer sólo antisueros polivalentes o antisueros no específicos se puede usar otro método que consiste en la saturación del antisuero polivalente por una fracción proteica conocida. Luego se hace

una comparación entre la imagen del antisuero polivalente solo y la del antisuero polivalente más la proteína. La línea de precipitación, que falta en el lado del antisuero saturado es idéntica a la proteína conocida.

4º *Identificación según Osserman.*

Ponemos en un canal de la placa de agar un antisuero polivalente, en otro la proteína conocida. Esta proteína conocida forma una línea de precipitación a lo largo de toda la placa, si esta línea de precipitación se fusiona con el arco de precipitación formado por el antígeno y el antisuero, este arco es idéntico al de la proteína conocida y por lo tanto la proteína a identificar es la misma.

CLASIFICACION DE LAS FRACCIONES PROTEICAS EN EL SUERO HUMANO

Por medio de las técnicas inmunoelectroforéticas, se pueden distinguir en el suero humano, hasta 35 componentes proteicos.

De estos componentes, no todos han podido ser identificados hasta ahora. De acuerdo con los datos obtenidos de la literatura mundial describiremos las más conocidas entre todos ellos. Para su mejor conocimiento dividimos la imagen en seis zonas de acuerdo con su posición electroforética. Estas zonas son:

- 1º Zona de las pre-albúminas.
- 2º Zona de la albúmina.
- 3º Zona de las Alfa-1-globulinas.
- 4º Zona de las Alfa-2-globulinas.
- 5º Zona de las Beta-1-globulinas.
- 6º Zona de las inmunoglobulinas.

A continuación pasaremos a describir cada una de ellas.

1º Zona de las pre-albúminas.

Esta zona contiene una o dos líneas de precipitación, estas líneas no son constantes, variando con la edad del individuo y con el tiempo que tiene el suero, de extraído.

La primera de estas fracciones se denomina Ró-1-Lipoproteína y es la que está situada más anódicamente. También se llama pre albúmina rica en triptófano, por poseer una gran cantidad de este aminoácido. El peso molecular de esta prealbúmina es

3º Zona de las Alfa-1-Globulinas.

Se compone de cuatro o cinco líneas. La primera está formada por la Orosomacoproteína o Alfa-1-glicoproteína ácida, o Alfa-1-Seromucoïd. Es una proteína soluble en ácido sulfosalicílico y en ácido perclórico. Su P.M. es 44,000 y contiene gran cantidad de ácido siálico en su molécula (hasta 10%) la concentración de Orosomacoproteína en suero es de 75 mg%. La segunda línea está constituida por la Alfa-1-lipopro-

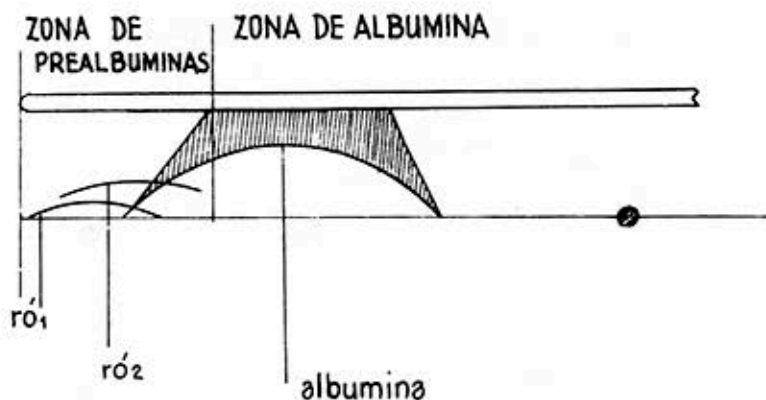


Fig. 4. Zona de pre-albúminas y albúmina.

de 61,000 y su concentración en el suero humano oscila alrededor de 30 mgr%. La segunda fracción se denomina Ró-2-Lipoproteína, es una fracción que no siempre se puede descubrir y sólo aparece en sueros recientes, su peso molecular es de 200,000.

2º Zona de la Albúmina.

Está formada por una fracción única, la mayor de todas, el P.M. es de 69,000 y se encuentra en el suero alrededor de 4.2 gms%. A continuación la figura de prealbúmina y albúmina. (Ver figura 4).

teína. Forma junto con la Ró-2-Lipoproteína y con la Lipoalbúmina, las denominadas Lipoproteínas de alta densidad (HD. Lipoproteins). La concentración en el suero es de alrededor de 180 mlgs% y su P.M. La tercera línea de esta zona está formada por a 3,5-S-glicoproteína o Alfa-1-Antitripsina.

Esta fracción forma un arco bastante largo en la inmunoelectroforesis, y según Laurell esta fracción es la única que se colorea por el azul de Bromofenol en la electroforesis en papel. Su concentración en el suero es de 160 mlg% y su P.M.

54,000. Los otros componentes que son la Alfa-1-Bilirrubina globulina y la Alfa-1-X-globulina no están aún bien estudiadas. (Ver figura 5)

4º Zona de las Alfa-2-Globulinas.

En esta zona se encuentra en mayor número de componentes proteicos, según Hirschfeld hasta 12 de ellas. Las más estudiadas son las siguientes:

La Alfa-2-Lipoproteína: Es la fundamental de las fracciones lipopro-

vista genético podemos distinguir 3 tipos fundamentales: la haptoglobina 1-1, la haptoglobina 2-2, las cuales presentan un estado homocigótico y la haptoglobina 2-1 que es un tipo heterocigótico.

Estos tipos se distinguen entre sí por la distinta movilidad electroforética, el tipo haptoglobina 1-1 migra más rápidamente hacia el ánodo y el tipo haptoglobina 2-2 lo hace más lentamente y el tipo haptoglobina 2-1, tiene una velocidad de

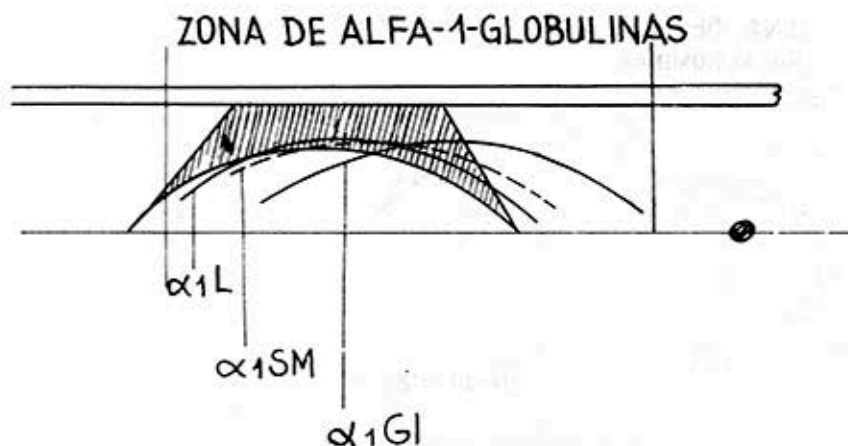


Fig. 5. Zona de las alfa-uno globulinas.

teicas en la inmunoelectroforesis y forma las lipoproteínas de baja densidad (L.D. Lipoproteins). Su P.M. es de 3.400,000.

La Alfa-2-Macroglobulina: Es una glicoproteína con gran peso molecular, cerca de un millón. Su concentración en el suero es de alrededor 360 mg%.

Las Haptoglobinas: Representa el grupo de las proteínas que poseen la capacidad de combinarse con la hemoglobina formando un complejo bastante estable. Desde el punto de

migración intermedia entre ambos. También sus pesos moleculares son diferentes, el tipo haptoglobina 1-1 tiene un peso molecular de 85,000 y el tipo haptoglobina 2-2 tiene un P.M. de 169,000. La concentración de haptoglobina es de 105 mg%. No se encuentra en el suero obtenido del cordón umbilical.

Creemos útil aclarar que cada individuo posee uno solo de estos dos grupos de haptoglobinas citados y este grupo es transmitido genéticamente.

Los Gc. Componentes: Forman también distintos tipos genéticos denominados Gc. 1-1, Gc. 2-2 y Gc. 2-1. Sin embargo la herencia con respecto a las haptoglobinas es independiente de ellas.

Ceruloplasmina: Es una proteína que contiene Cobre en su molécula. Su P.M. es de 156,000, y la concentración en plasma varía alrededor de 30 mlgs%. En el suero del cordón umbilical su nivel está disminuido. Todas estas fracciones antes descritas son bien conocidas y estudiadas y son fácilmente identificables. Veamos ahora otros componentes de esta zona tan bien conocidos.

Neuroamino-glicoproteína: Esta proteína fue descubierta por Schultze y colaboradores, y es una de las glicoproteínas que contiene mayor cantidad de ácido siálico o neuro-mínico.

La Zinc-Alfa-2-glicoproteína y la Bario Alfa-2-glicoproteína: Son denominadas también 3S glicoproteína

de la fracción VI según Cohn. Se diferencian entre sí por solubilidad en sales de Zinc o de Bario respectivamente. En el suero se encuentran cantidades mínimas. (Ver esquema No. 6 donde se presentan la situación de las Alfa-2-globulina).

5º Zona de las Beta-1-Globulinas.

Los componentes de esta zona se encuentran alrededor del punto de partida.

- Siderofilina o transferrina:** Representa la mayor porción de la Beta-1-globulinas y el 3 al 5% de las proteínas séricas totales. Es una metaloproteína que puede fijar hierro en su molécula. Su P.M. es de 85,000.
- La Beta-1-C-globulina:** Se encuentra sólo en los sueros recientes, durante el tiempo de conservación cambia su movilidad, pues escinde el dímero en dos monómeros. El dímero tiene 96 unidades Sb y al despolimeri-

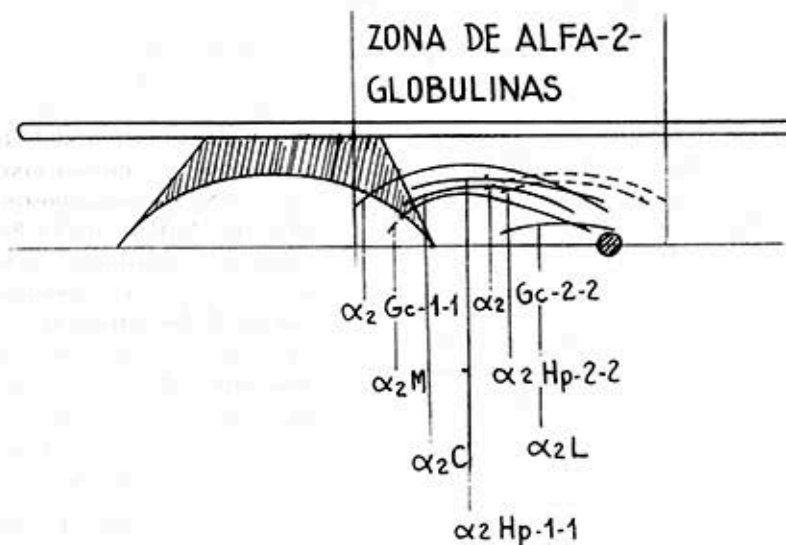


Fig. 6. Zona de las alfa-dos globulinas.

zarse el monómero tiene una constante desedimentación de 7Sv, ésta es la causa de su modificación en la movilidad electroforética, en los sueros viejos encontramos sólo la Beta-1-A-globulina que es el manómero del anterior. Esta fracción tiene relaciones con un elemento del complemento que se llama C' 3b.

- c) *La Beta 1-B-globulina o hemopexina*: Es una glicoproteína que se puede combinar con la hemina.

algunos sueros patológicos. La inmunoglobulina como su nombre lo indica son portadores de anticuerpos y a continuación veremos detalladamente cada una de estas fracciones.

Beta 2A-globulina o Gamma 1A-globulina: Es una fracción bien soluble en presencia de iones de zinc. El P.M. es de 156,000. Es el que posee mayor cantidad de glúcidos (10.6%) Su concentración promedio en el suero según Heremans es de 112 mlgs%. No se encuentra en el suero del cordón umbilical.

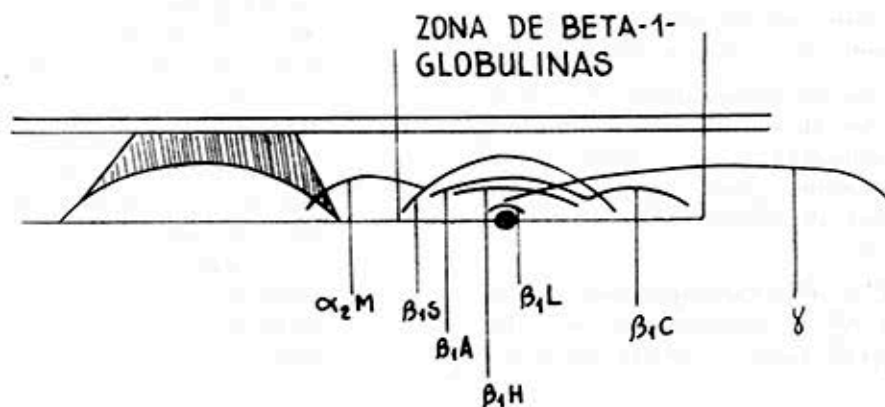


Fig. 7. Zona de las beta-uno globulinas.

- d) *La Beta -1-Lipoproteína*: Forma una línea fina y constante en la cercanía del punto de partida. (Ver figura 7).

6º Zona de las inmunoglobulinas.

El sistema Gammaglobulina se compone de tres fracciones fundamentales: Gamma-2-globulina, Beta 2A-globulina y Beta-2M-globulina, y de otros componentes no constantes denominados Beta 2B-globulina y Beta 2X-globulina. A este grupo pertenece también la fracción Gamma-X-globulina que se encuentra en

Beta 2M-globulina o Beta-2-macroglóbunina o Gamma-1-macroglóbunina o 19 S Gamma-globulina: Es una proteína de P.M. de 1.000,000 y que posee una constante sedimentación de 19 Sv de ahí su nombre. Es portadora de los anticuerpos macromoleculares por ejemplo las ishemaglutininas. Tiene una concentración en el suero sanguíneo de 75 mlgs%. En el suero del cordón umbilical está muy disminuida.

Beta 2X-globulinas: Es una fracción inconstante muy fina con gran difusibilidad, representa probablemente

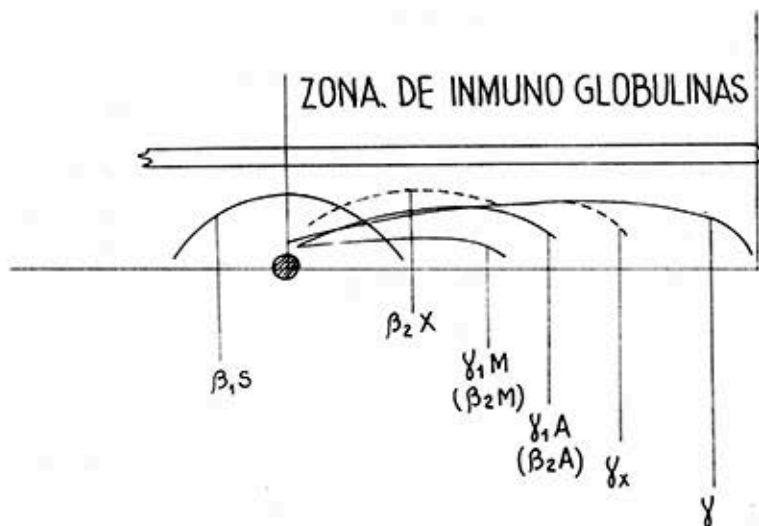


Fig. 8. Zona de las inmunoglobulinas.

un fragmento de la Gamma-globulina con constante segmentación de 3S. Está aumentada patológicamente en las paraproteínas del tipo Bence-Jones.

Gamma 2-globulinas, o 7S Gamma-globulina: Es de mayor fracción de la inmunoglobulina, y se presenta como una línea prolongada que va desde el punto de partida hacia el cátodo y el P.M. es de 156,000 y su concentración en el suero es aproximadamente de 900 mg% en adultos.

Beta 2B-globulina: Es idéntica a la Beta 1C-globulina (que ya hemos estudiado).

Gamma X-globulina: Es una fracción que se encuentra sólo en sueros patológicos es idéntica a la proteína C reactiva que se encuentra en el suero de enfermos con fiebre reumática. (Ver figura 8)

A continuación presentamos una tabla donde se encuentran todas las fracciones antes descritas y su abreviaturas más usuales:

ZONA	COMPONENTE	SINONIMO	ABREVIACION
ALFA ₁ GLOBULINAS ALBUMINA PREALBUMINAS	Ró ₁ -glicoproteína	Prealbúmina rica en triptófano	Ró ₁ -G1
	Ró ₂ -Lipoproteína		Ró ₂ -L
	Albúmina	Serina	Al G
	Alfa ₁ -Seromucoproteína	Alfa ₁ -glicoproteína ácida	Alfa ₁ -SM
	Alfa ₁ -Lipoproteína		Alfa ₁ -L
	Alfa ₁ -3,5 S-glicoproteína	Alfa ₁ -antripsina	
	<i>Gc-Componentes</i>	<i>Alfa₂-Gc-globulinas</i>	
	1 - 1		Alfa ₁ -Gc-1-1
	2 - 2		Alfa ₂ -Gc-2-2
	2 - 1		Alfa ₂ -Gc-2-1
ALFA ₂ GLOBULINAS	<i>Haptoglobinas</i>		
	1 - 1		Alfa ₂ -Hp-1-1
	2 - 2		Alfa ₂ -Hp-2-2
	2 - 1		Alfa ₂ -Hp-2-1
	<i>Ceruloplasmina</i>		Alfa ₂ -C
	Alfa ₂ -Lipoproteína		Alfa ₂ -L
	Alfa ₂ -Macroglobulina		Alfa ₂ -M

ZONA	COMPONENTE	SINONIMO	ABREVIACION
BETA-GLOBULINAS	Beta ₁ -Lipoproteína	Transferrina	Beta ₁ -L
	Siderofilina	Transferrina	Beta ₁ -S
	Beta ₁ A-globulina		Beta ₁ -A
	Beta ₁ C-globulina	Beta ₂ B-globulina	Beta ₁ -C
	Beta ₁ B-globulina	Hemopoxina	Beta ₁ -B o Beta ₁ -H
	Beta ₂ M-globulina	Gamma ₁ M-globulina Beta ₂ -Macroglobulina 19S-Gamma-globulina	Beta ₂ M Gamma ₁ M
INMUNOGLOBULINAS	Beta ₂ A-globulina	Gamma ₁ A-globulina	Beta ₂ A (Gamma ₁ A)
	Beta ₂ X-globulina	Gamma-microglobulina	Gamma ₁₁
	Gamma-globulina	7S-Gamma-globulina Gamma ₂ -globulina	Gamma ₂
	Gamma X-globulina	C.R.P. (Proteína C-reactiva)	Gamma X

RESUMEN

1. Se presentan los diversos métodos que pueden utilizarse para la identificación de las líneas inmunoelectroforéticas: a) Coloración específica; b) de acuerdo con la posición; c) por el método de antisuero específico; d) identificación según Osserman.
2. Diferentes clasificaciones de las fracciones proteicas en el suero humano.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—*Ericksson, S. and Laurel, C. B.*: The electrophoretic Alpha₁ globulin pattern of serum in Alpha₁ antitrypsin deficiency. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 15: 132, 1963.
- 2.—*Crowle, A. J.*: Immunodifusion. Academic Press, New York and London, 1961.
- 3.—*Grabar, P. and Burtin, P.*: Analyse immuno-electrophorétique. Masson (Paris) 1960.
- 4.—*Heremans, J. F.*: Les globulines sérique du système Gamma. Leur nature et leur pathologie. Masson (Paris). Arselia (Bruselles) 1960.
- 5.—*Hirschfeld, J.*: Characterization of precipitating components in normal human sera obtained by an immunoelectrophoretic technique. *Acta pathol. Microbiol. Scand.* 49: 255, 1960.
- 6.—*Heide, K., Haupt, H. and Schultze, H. E.*: Ueber ein noch nicht beschriebenes Alpha₁ Glycoprotein des menschlichen Serums. *Naturwissenschaften* 49: 133, 1962.
- 7.—*Schultze, H. E., Göllner, I., and Heide, K.*: Zur Kenntnis des Alpha-Globulins des menschlichen Normalserums.
- 8.—*Schönenberger, M., Schwick, G.*: *Z. Naturforschung* 10, 463, 1955.