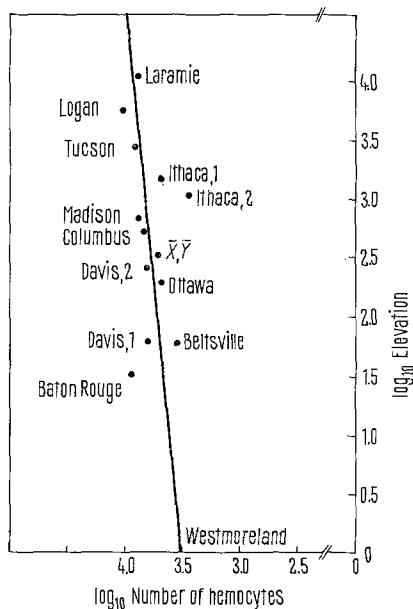


Table II. Statistical data from regression correlation study of elevation versus total hemocyte counts (THC)

Formula:  $\log_{10} Y = \log_{10} a + b \log X$  where  $X$  = elevation and  $Y$  = average THC (let  $-159 = 1.00000$ )  
 No. of observations = 43  
 Correlation coefficient between  $\log Y$  and  $\log X$  = 0.58820  
 Regression coefficient = 0.10851  
 Standard error of regression coefficient = 0.02330  
 Coefficient of determination = 0.34598  
 Mean of  $\log_{10} X$  = 2.54946  
 Mean of  $\log_{10} Y$  = 3.77982



The effect of altitude on total hemocyte counts of 5-day-old honey bee larvae.

Since the regression coefficient was significant at the 1% level, increased elevation was related to a rise in the number of free hemocytes present in larval blood. The reason for this rise is not known. Perhaps factors such as pressure, blood volume, or a respiratory pigment play a role. When these studies were repeated with pooled hemolymph from adult worker bees, similar results were obtained<sup>2,3</sup>.

**Zusammenfassung.** Ausgewertet wurde die Gesamtzahl der Hemocyten (GZH) von Proben von Honigbienenlarven, die aus verschiedenen Höhenregionen in Bereichen von 48 bis 2160 m über dem Meeresspiegel stammten. Die Untersuchung des Zusammenhangs der beiden Größen mittels Regressionsanalyse mit logarithmischer Auftragung von  $\log_{10}$  GZH gegen  $\log_{10}$  Meereshöhe ergaben eine deutliche Beziehung zwischen der Zahl der Hemocyten pro  $\text{mm}^3$  und der Meereshöhe, aus der die Insekten entnommen wurden.

MARTHA GILLIAM<sup>4</sup> and HACHIRO SHIMANUKI<sup>5</sup>

Bee Disease Laboratory, Entomology Research Division,  
 Agricultural Research Service,  
 US Department of Agriculture,  
 Laramie (Wyoming, USA), 6 March 1970.

<sup>2</sup> Acknowledgments. Our sincere appreciation goes to Dr. G. ROEHRKASSE and Dr. J. McGuire for their statistical assistance.

<sup>3</sup> Published with approval of the Director, Wyoming Agricultural Experiment Station, as Journal Article 396.

<sup>4</sup> Present address: U.S.D.A. Bee Research Laboratory, Tucson (Arizona 85719, USA).

<sup>5</sup> Present address: U.S.D.A. Bee Disease Investigations, Beltsville (Maryland 20705, USA).

### Electroimmunoprecipitation de protéines anodiques et cathodiques à pH 8,2

Il est un fait bien connu que les méthodes de précipitation en milieu gélié sont aujourd'hui appliquées couramment dans les recherches sur de nombreuses substances antigéniques.

La réalisation même des réactions spécifiques antigène/anticorps, et notamment celles qui sont exécutées sur des plaques de gélose, avait été soumise à des modifications telles que: microméthode et macrométhode, diffusion simple et double, détermination qualitative et quantitative, augmentation de la sensibilité de la réaction de précipitation spécifique par l'utilisation de dextrans ou des immunosérums «anti-espèce fournitrice des anticorps», lecture de résultats obtenus rendue plus sensible par la mise en jeu de l'isothiocyanate de fluorescéine ou des substances radioactives<sup>1-12</sup>.

Les résultats positifs de la précipitation de diffusion double ne se lisent pas avant 4-6 h et plus à partir du début des réactions. Ceci nécessite dans certains cas l'abrévement du temps qui s'écoule entre le début des réactions et l'apparition de résultats positifs.

En vue de surmonter cet obstacle, certains auteurs ont lié la précipitation de double diffusion sur plaques de gélose à l'électrophorèse<sup>13-16</sup>. Selon les principes de la méthode, dans la gélose coulée sur des plaques de

verre on découpe 2 rangées de réservoirs perpendiculairement au grand axe des plaques.

Dans les réservoirs situés du côté cathodique, on introduit des antigènes analysés, dans les réservoirs situés du côté anodique l'immunsérum, puis on laisse passer le courant électrique.

Sérum de cheval	Résultats positifs après (min)	
	Protéines anodiques	Protéines cathodiques
1:10	25	60
1:100	25	60
1:1000	25	60
1:2000	25	80
1:4000	60	80
1:6000	60	150
1:10,000	60	-

L'immunsérum de lapins «anti-sérum de cheval» a été préparé par nous-même.

Par ce procédé, les résultats positifs de précipitation ont été observés après 20–25 min. La méthode est réellement plus rapide que les autres, mais elle ne peut rendre service qu'en cas d'analyses de protéines caractérisées par la migration électrophorétique vers l'anode, ce qui les mène à la rencontre des immunoglobulines spécifiques qui se déplacent à contre courant. Sous cette forme la méthode n'est pas utilisable pour les protéines cathodiques.

Compte tenu du problème, nous proposons une modification qui pourra être praticable en cas d'analyses accélérées des protéines cathodiques, séparément ou en mélange avec des protéines anodiques. Dans ce but nous avons utilisé le gel d'agar à 1,5% dans un tampon véronal sodique à pH 8,2<sup>17,18</sup>. L'analyse est réalisée en deux temps:

1. Sur des plaques de gel solidifié, on découpe deux rangées de réservoirs, perpendiculairement au grand axe des plaques (réservoirs de 2 mm de diamètre et distance de 5 mm entre les rangées). Les réservoirs cathodiques sont remplis par les protéines recherchées; dans des réservoirs du côté anodique on introduit l'immunsérum précipitant, soumettant les plaques à l'électrophorèse à 20 V/cm, 2,5 mA/cm (Figure 1). La précipitation peut se faire au cours de l'électrophorèse pour les protéines concentrées, ou peu après pour les protéines diluées.

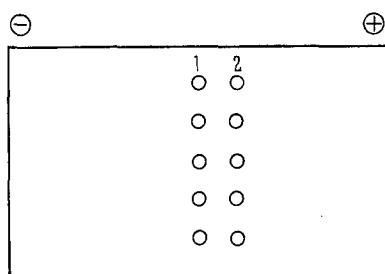


Fig. 1. Plaque avant électrophorèse. 1. Antigènes. 2. Immunsérum.

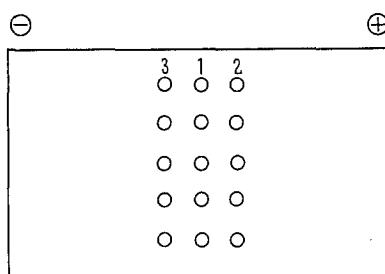


Fig. 2. Plaque après électrophorèse. 1. Antigènes. 2. Immunsérum. 3. Immunsérum.

2. Après 25 min, on coupe le courant électrique et on forme une troisième rangée de réservoirs (du côté cathodique qui contenait les antigènes étudiés) dans lesquels on introduit l'immunsérum précipitant (Figure 2). La précipitation se fait par double diffusion. Le temps d'apparition des résultats positifs est présenté au Tableau.

La modification proposée peut se révéler très utile en ce qui concerne l'analyse accélérée aussi bien des antigènes que des anticorps et notamment dans les cas suivants: a) Titrage des anticorps dans des échantillons du sang des animaux immunisés (vivants) avec la distinction simultanée du niveau des anticorps anti-protéines anodiques et anti-cathodiques. Dans une seule journée de travail cette modification permet de prélever des échantillons du sang, de titrer les anticorps et même de saigner les animaux. b) Titrage de protéines anodiques et cathodiques dans un mélange donné. c) Détermination de la pureté de préparations d'antigènes et d'immunoglobulines. d) Modification présentée en dehors du titrage, met en évidence l'homogénéité ou hétérogénéité des substances examinées, bien qu'elle soit moins utile dans l'étude de fractions protéiques, mais dans ce cas l'immunoélectrophorèse peut être d'un grand recours.

**Summary.** A new modification of agar immunoprecipitation is described. The modification allows one to shorten the time of precipitation of proteins which at pH 8.2 migrate towards anode or cathode. It can also be used for the titration of antibodies.

E. GAJOS

*Institut d'Immunologie et de Thérapie Expérimentale,  
Service d'Immunochimie, Wroclaw (Pologne),  
16 mars 1970.*

- 1 E. GRASSET, Ann. Inst. Pasteur 91, 162 (1956).
- 2 A. CROWLE, J. Lab. clin. Med. 55, 593 (1960).
- 3 O. OUCHTERLONY, Acta path. microbiol. scand. 25, 186 (1948).
- 4 J. OUDIN, Ann. Inst. Pasteur 89, 531 (1955).
- 5 C. OAKLEY, J. Path. Bact. 65, 49 (1953).
- 6 S. ELEK, Br. J. exp. Path. 31, 358 (1950).
- 7 G. MANCINI, Immunochimistry 2, 235 (1965).
- 8 J. FEINBERG, Nature 177, 530 (1956).
- 9 M. CESKA, Immunology 15, 837 (1968).
- 10 Ph. RÜMKE et J. C. BREEKVELDT-KIELICH, Vox sang. 16, 486 (1969).
- 11 V. GHETIE, Immunochimistry 4, 467 (1967).
- 12 E. V. CHERNOKHVOSTOVA, Biokhimia 33, 1183 (1968).
- 13 B. J. CULLIFORD, Nature 201, 1092 (1964).
- 14 J. FEINBERG, Int. Arch. Allergy 33, 120 (1968).
- 15 Z. MAREK, K. JAEGERMAN et B. TUROWSKA, Folia med. cracov. 1, 83 (1964).
- 16 O. PROKOP, D. SCHLESINGER et H. FALK, Dt. Gesundh Wes. 18, 760 (1963).
- 17 P. GRABAR, *Analyse immunoélectrophorétique* (Masson, Paris 1960).
- 18 J. SCHEIDEGGER, Allergy appl. Immun. 7, 103 (1955).

#### Circulating Hemagglutinins of New Zealand Black Strain Mice Immunized with Sheep Erythrocytes

Experiments employing the JERNE<sup>1</sup> plaque assay have demonstrated young adult New Zealand Black (NZB) strain mice to be hyperresponsive to primary immunization with sheep erythrocytes whereas old Coombs positive animals manifested marked immunodepression<sup>2</sup>. In the case of overtly autoimmune NZB mice, production of 7S

and 19S antibody-forming cells during the secondary response was unimpaired<sup>3</sup>. The present report is an attempt to determine analogous aspects between these observed antibody-forming cell patterns and features of the circulating antibody response following a similar immunization regimen. This appeared of added interest