

IMMUNOMARCATURA SU SEZIONE APPLICATA ALLA VIROLOGIA VEGETALE

ANNA APPIANO E GIOVANNI D'AGOSTINO

Istituto di Fitovirologia Applicata del C.N.R.
Strada delle Cacce 73, 10135 Torino.

RIASSUNTO

Nell'ultimo decennio l'immunomarcatura con oro colloidale su sezioni in resina si è sviluppata notevolmente ed è stata applicata con successo alla virologia vegetale, permettendo di identificare e/o localizzare a livello intracellulare proteine virali strutturali e non strutturali, nonché proteine dell'ospite legate all'infezione. Questa nota riporta alcune esperienze di immunomarcatura effettuate su diversi sistemi virus-pianta ospite, usando sia sezioni in resina sia criosezioni. Vengono descritti i problemi affrontati, mettendo in evidenza le difficoltà incontrate e le eventuali soluzioni.

SUMMARY

Post-embedding immunogold labeling applied in plant virology. In the last ten years immunogold labeling (IGL) on resin sections has undergone considerable development and has been successfully applied in plant virology, allowing intracellular identification and/or localization of structural and non-structural virus proteins, as well as host plant proteins associated with infection. We report here some IGL experiments made with different virus-host combinations, using both resin and cryosections. For each experience we describe the problems we dealt with, outlining the difficulties encountered and possible solutions.

INTRODUZIONE

L'immunomarcatura su sezione consiste, com'è noto, nella localizzazione di antigeni intracellulari attraverso la loro reazione con anticorpi specifici, coniugati a loro volta con un marcante visibile al microscopio elettronico, ad esempio oro colloidale. Le prime applicazioni dell'immunomarcatura con oro colloidale (immunogold labeling = IGL) nel campo della virologia vegetale sono relativamente recenti (cf. Appiano et al., 1986), ma il suo uso si è andato progressivamente diffondendo. IGL si è rivelata un utile strumento per dare risposta ad alcuni quesiti non risolvibili con altre tecniche, quali ad esempio identificazione nel tessuto infetto di proteine strutturali del virus, assemblate o meno in particelle, e/o di proteine costituenti i corpi d'inclusione (Appiano et al., 1986; Langenberg e Van Der Wal, 1986; Appiano et al., 1987; D'Agostino, 1987; Lin et al., 1987; Appiano et al., 1988; D'Agostino e Redolfi, 1988; D'Agostino et al., 1988; Langenberg 1988; Pesic et al., 1988; Appiano et al., 1989; D'Agostino e Redolfi, 1989), localizzazione di proteine virali non strutturali codificate dal virus (Hills et al., 1987; Saito et al., 1987; Stussi-Garaud et al., 1987; Toménus et al., 1987; Linstead et al., 1988; Mackenzie e Tremaine, 1988), identificazione e/o localizzazione di proteine dell'ospite la cui produzione o variazione quantitativa siano legate all'infezione virale (Appiano et al., in stampa).

Questo lavoro riporta alcune esperienze di IGL da noi effettuate su differenti combinazioni virus-pianta ospite, come esemplificazione dei problemi risolvibili con questa tecnica, degli inconvenienti riscontrati e delle possibili soluzioni, ottenute sperimentando sui campioni diversi metodi di fissazione e inclusione, nonché la tecnica di criosezionamento.

MATERIALI E METODI

Le combinazioni virus-pianta ospite usate sono le seguenti: tomato bushy stunt virus (TBSV) in Gomphrena globosa, potato virus Y° (PVY°) in Nicotiana tabacum o N. glutinosa, tabacco necrosis virus (TNV) in N. tabacum o Phaseolus vulgaris.

Per i campioni inclusi in resina, Araldite (Ar), Epon-Araldite (Ep/Ar) o London Resin White (LR White), sono stati sperimentati i seguenti fissativi, seguiti o meno da postfissazione in osmio: glutaraldeide (GA) 3%, GA 2,5% + acroleina (Ac) 1%, paraformaldeide (PFA) 2% + Ac 0,2%. I campioni per la criomicrotomia sono stati fissati brevemente in GA 2,5% + Ac 1% o in PFA 2%, infiltrati in saccarosio 2,3 M, congelati in azoto liquido e sezionati con un ultramicrotomo Reichert Ultracut E fornito di apparato per criosezionamento FC4.

Per l'IGL delle sezioni in resina si è seguito essenzialmente il metodo di Viale et al. (1985), per le criosezioni il metodo di Griffiths et al. (1983) e Tokuyasu (1986). I sieri primari usati vengono specificati per ogni antigene nel corso dei risultati. I sieri secondari (Janssen, Belgium) sono i seguenti: GAR-G5 o GAR-G20 (goat anti-rabbit coniugato con oro colloidale da 5 o 20 nm), GAM-G20 (goat anti-mouse con oro da 20 nm), RAS-G15 (rabbit anti-sheep con oro da 15 nm). Come controllo, IGL è stata effettuata sia su tessuto infetto omettendo il siero primario sia su tessuto in cui l'antigene era sicuramente assente.

RISULTATI E DISCUSSIONE

TBSV-G.globosa. Questo sistema è stato ampiamente studiato da un punto di vista citologico e citochimico (cf. Bassi et al., 1986), nell'intento di comprendere origine e funzione del due tipi di

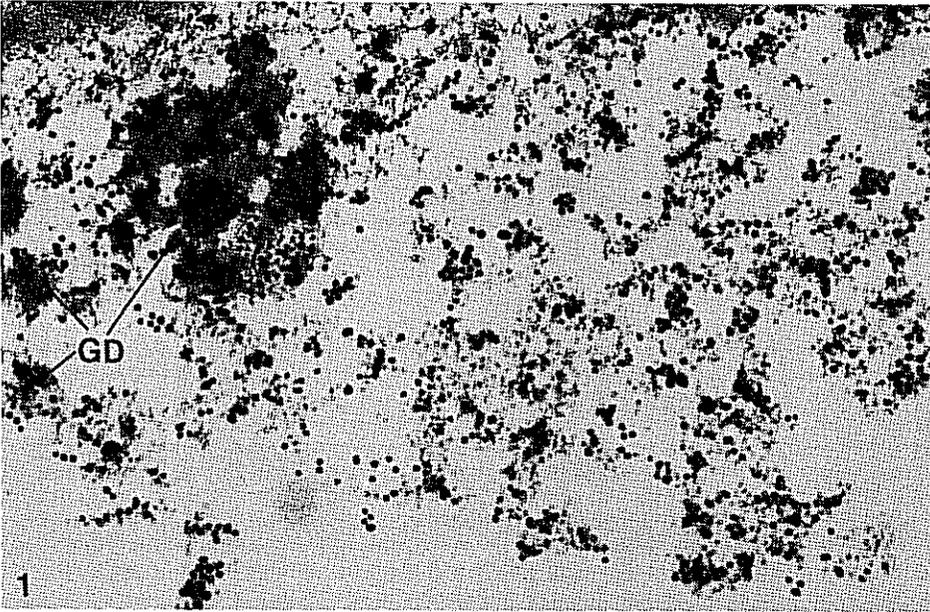
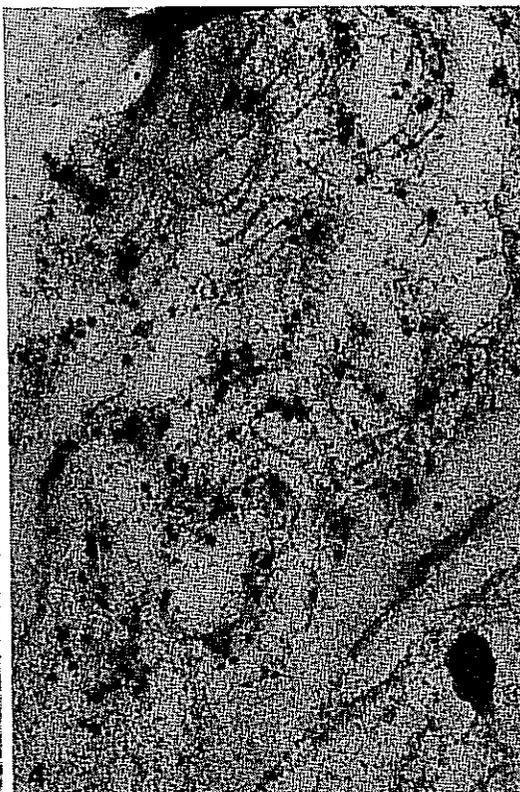
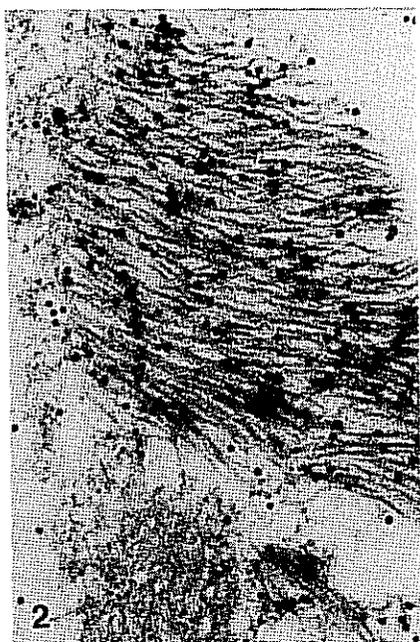


Fig. 1. TBSV-G. globosa. Tessuto fissato in GA e incluso in Ar. IGL con siero anti TBSV 1/100 per 1 h + GAR-G20. La marcatura è localizzata sui GD e sulle particelle virali, che vengono così notevolmente evidenziate (x 70.000).

corpi d'inclusione indotti da TBSV nelle cellule infette, corpi multivescicolari (MV) e granuli densi (GD). Prove di autoradiografia, positive per i corpi MV e negative per i GD, hanno dimostrato che i primi, contrariamente ai secondi, sono coinvolti nella replicazione virale. Nessuna indicazione si aveva tuttavia sulla natura dei GD e sull'eventuale coinvolgimento dei corpi MV nella produzione e/o accumulo di proteina virale. E' stata quindi effettuata una prova di IGL con siero anti-TBSV, utilizzando campioni di G.globosa fissati in GA, osmicati o meno e inclusi in Ar. I campioni osmicati non si sono rivelati utili, data la scarsa preservazione dell'antigenicità. Nei campioni fissati in sola GA la minor preservazione ultrastrutturale era compensata da un'intensa e specifica marcatura sia sul virus che sui GD, dimostrando che questi ultimi sono costituiti prevalentemente di proteina del coat virale. L'assenza di marcatura sui corpi MV indica che in essi non si verifica accumulo di proteina virale. L'IGL si è rivelata inoltre più efficace dei normali coloranti a base di metalli pesanti nella localizzazione dell'antigene virale nelle cellule, specialmente nell'osservazione a bassi ingrandimenti.

PVY°-N.tabacum o N.glutinosa. Per questo virus erano disponibili sia un antisiero policlonale (PA) sia una miscela di quattro anticorpi monoclonali (Mab). Quest'ultima era in grado di distinguere in ELISA due diversi isolati di PVY°, indistinguibili con PA. Poiché l'uso di Mab per IGL di virus dei vegetali in sezione sembra essere finora molto limitato (Mackenzie e Tremaine, 1988), ci è parso interessante confrontare le possibilità d'uso di PA e Mab nel nostro sistema, come eventuale premessa allo studio in vivo di infezioni miste con isolati diversi. Per avere indicazioni



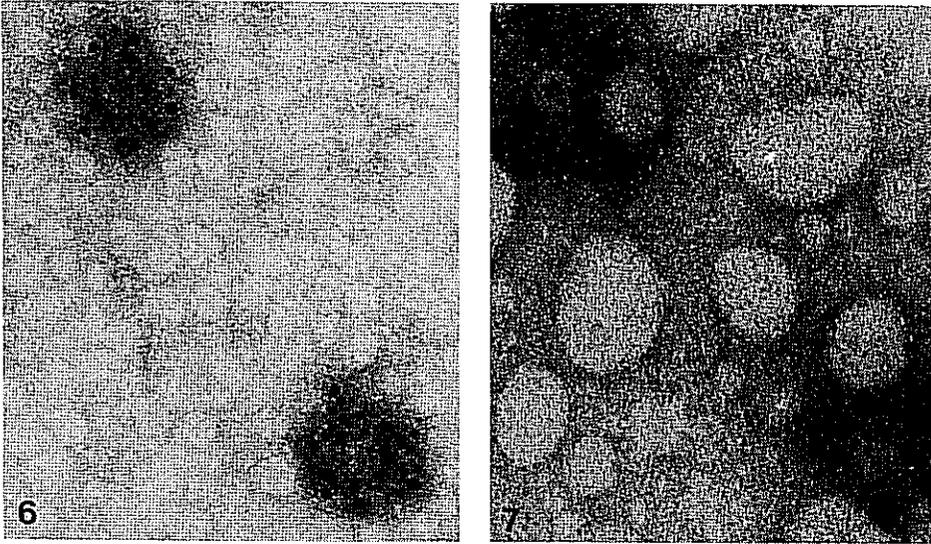


Fig. 2-4. PVY^o-N. tabacum. Fig. 2, tessuto fissato in GA-AC e incluso in Ep/Ar. IGL con PA anti-PVY^o 1/50 per 1 h + GAR-G20. Le particelle sono intensamente marcate, ma si nota anche una certa marcatura aspecifica, dovuta all'alta concentrazione di siero primario (x 65.000). Fig. 3, tessuto fissato in PFA-Ac e incluso in Ep/Ar. IGL con PA anti-PVY^o 1/500 per 1 h + GAR-G20. La marcatura, molto specifica, è concentrata sulle particelle situate fra i bracci delle girandole (x 100.000). Fig. 4, tessuto fissato in PFA-Ac e incluso in LR White. IGL con PA anti-PVY^o 1/1000 per 1 h + GAR-G20. Il tessuto non è ben preservato come quello osservato nelle figure precedenti, ma virus e girandole sono ben distinguibili e mostrano un'intensa marcatura (x 75.000).

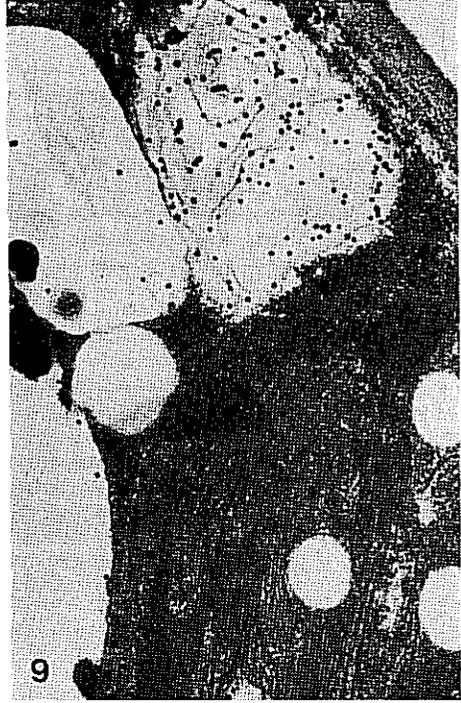
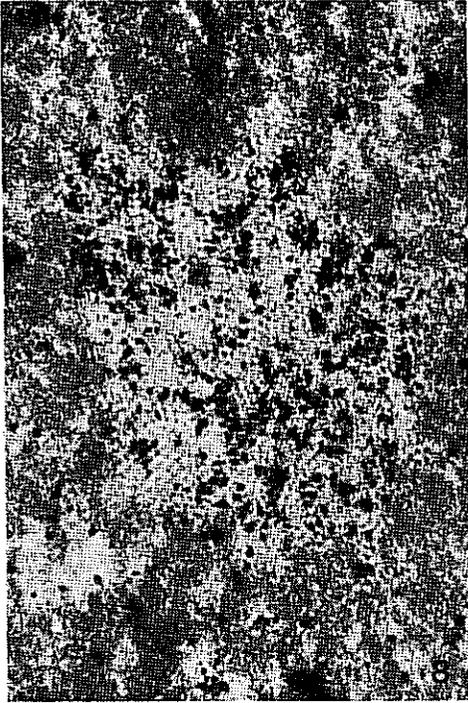
Fig. 5. PVY^o-N. glutinosa. Tessuto fissato in PFA e criosezionato. IGL con Mab anti-PVY^o indiluito per 60 h + GAM-G20. La preservazione strutturale è discreta. La marcatura sulle girandole, qui viste in sezione longitudinale, è specifica, seppure non molto intensa. Il cloroplasto (C) non appare marcato (x 45.000).

Fig. 6-7. Particelle di TNV da succo grezzo di N. tabacum adsorbite su retino, 'decorate' con anticorpi anti-TNV 7,6 µg/ml + GAR-G5 (Fig. 6) o + GAR-G20 (Fig. 7). Il numero dei granuli d'oro su ogni particella è inversamente proporzionale al diametro dell'oro (x 300.000).

Fig. 8. TNV-N. tabacum. LN fissata in GA-Ac, postfissata in osmio e inclusa in Ep/Ar. IGL con anticorpi anti-TNV 7,6 µg/ml per 1 h + GAR-G20. Zona necrotica con aggregato paracristallino di TNV specificamente marcato. I granuli d'oro dispersi nella matrice opaca indicano la presenza di TNV non aggregato (x 60.000).

Fig. 9-10. TNV-P. vulgaris. LN fissata in GA-Ac, postfissata in acetato di uranile e inclusa in LR White. IGL con anticorpi anti-TNV 7,6 µg/ml per 30 min + GAR-G20. Fig. 9, intensa marcatura sulle zone di vescicolazione e proliferazione del plasmalemma (x 50.000). Fig. 10, intensa marcatura sui depositi granulari situati negli spazi intercellulari (SI) (x 25.000).

Fig. 11. TNV-P. vulgaris. Tessuto fissato in GA-Ac e incluso in LR White. IGL con siero anti-Rubisco 1/2000 per 1 h + RAS-G15. La marcatura sui cristalli è estremamente specifica, mentre i tilacoidi (T) non sono marcati; R, ribosomi (x 37.500).



sulle concentrazioni ottimali di PA e Mab, è stata effettuata un'esperienza preliminare di IGL su virus in estratto grezzo: mentre con PA è stata ottenuta una buona decorazione delle particelle con diluizioni fino a 1/50, con Mab la decorazione, più leggera, è stata ottenuta solo con siero indiluito.

Fin dal primo tentativo (fissazione in GA + Ac e inclusione in Ep/Ar) IGL con PA ha dato esito positivo: la preservazione del tessuto è risultata ottima e la marcatura molto specifica, localizzata sulle particelle virali sparse nel citoplasma o situate fra i bracci delle girandole, i tipici corpi d'inclusione indotti dai potyvirus. Su questi campioni non è stata ottenuta invece alcuna marcatura con Mab. Ulteriori tentativi sono stati compiuti adottando un diverso fissativo, PFA + Ac, e successivamente una diversa resina, LR White. La preservazione strutturale del tessuto è risultata sempre meno buona, tuttavia particelle virali e girandole sono rimaste perfettamente distinguibili nel citoplasma. La marcatura con PA è divenuta via via più intensa e specifica, tanto che si è potuto alzare la diluizione ottimale del siero da 1/50 fino a 1/1000. Sulle sezioni in LR White è stato possibile ottenere una specifica ma assai debole marcatura con Mab, pur usando anticorpi indiluiti e un tempo d'incubazione di ben 60 h. Per ottenere risultati più attendibili, IGL sia con PA che con Mab è stata effettuata anche su criosezioni. La marcatura con PA non ha mostrato miglioramenti rispetto alle sezioni in LR White, ma il tessuto è apparso meglio conservato. La marcatura con Mab è invece risultata più intensa e specifica. L'insieme di queste osservazioni suggerisce che si tratti di anticorpi la cui specificità è legata ad epitopi conformazionali, che possono subire alterazioni critiche se sottoposti a fissazione drastica o ad inclusione in resina, indipendentemente dalla resina usata.

TNV-N. tabacum o P. vulgaris. Le indagini citologiche e citochimiche sulla reazione ipersensibile indotta da TNV in N. tabacum hanno permesso di rilevare le principali alterazioni ultrastrutturali e la distribuzione del virus nella lesione necrotica (LN). In particolare sono state osservate grosse inclusioni cristalline nel citoplasma e nei cloroplasti, estese proliferazioni e vescicolazioni delle membrane, in particolare del plasmalemma, accumuli di particelle virali in prossimità delle parete cellulare e depositi più o meno estesi di materiale a struttura granulare, localizzati negli spazi intercellulari (D'Agostino e Pennazio, 1985).

Utilizzando anticorpi anti-TNV sono state ottenute marcature specifiche di TNV in estratto sia grezzo (fig. 6-7) sia purificato. Queste prove hanno fornito utili indicazioni sulla specificità degli anticorpi e sulle concentrazioni più idonee del siero primario e secondario, e infine sul diametro più adatto dei granuli d'oro.

IGL su sezioni di tessuto fissato in GA+Ac, osmicato e incluso in Ep/Ar, hanno permesso di rilevare un'efficace e specifica marcatura di TNV (fig. 8). Si è tentato di migliorare questi risultati applicando IGL su tessuto criosezionato, ottenendo tuttavia una marcatura confrontabile ma non superiore a quella ottenuta in sezioni di Ep/Ar, anche se per le criosezioni questi risultati potevano essere ottenuti con sieri più diluiti e tempi d'incubazione più brevi. Questo indica che, per TNV, la procedura di fissazione utilizzata per l'inclusione in Ep/Ar preserva sia l'antigenicità del virus sia l'accessibilità degli anticorpi ai siti antigenici.

Per ovviare alla necessità di mordenzare le sezioni in Ep/Ar prima di poter effettuare IGL, cosa che provoca inevitabilmente una perdita di contrasto nel tessuto, è stata effettuata una prova di

IGL su tessuto fissato in GA-Ac, postfissato in acetato di uranile ed incluso in LR White.

IGL su LR White ha fornito i risultati migliori sia per il contrasto ottenibile sulle sezioni sia perché, a parità di marcatura, il virus e i granuli d'oro apparivano meglio evidenziati. Questa tecnica ha permesso inoltre di rilevare una intensa e specifica marcatura sulle zone di vescicolazione e proliferazione del plasmalemma (fig. 9) e sui depositi granulari osservati negli spazi intercellulari (fig. 10) indicando, in queste zone, una massiccia presenza di proteina virale. La concentrazione di proteina virale lungo il plasmalemma è in accordo con il successivo accumulo di TNV osservato in questa stessa zona, indicando in essa un possibile sito di assemblaggio del virus. L'accumulo osservato negli spazi intercellulari è tutt'ora oggetto di studio.

Le inclusioni cristalline osservate nei cloroplasti sono simili a quelle descritte da altri Autori in piante infette da virus o sottoposte a moderati stress fisiologici (cf. D'Agostino e Pennazio, 1985; Rascio *et al.*, 1985). L'ipotesi corrente è che i cristalli siano costituiti di ribuloso-1,5-bisfosfato carbossilasi (Rubisco), ma nessuna prova diretta in vivo di questa ipotesi è mai stata data (cf. Appiano *et al.*, in stampa). Noi abbiamo effettuato prove di IGL su campioni fissati in GA-Ac e inclusi in Ep/Ar o in LR White, usando un siero policlonale anti-Rubisco. Su entrambi i tipi di sezioni è stata ottenuta un'intensa e specifica marcatura localizzata sui cristalli e sullo stroma dei cloroplasti, mentre grana e tilacoidi non mostravano alcuna marcatura. Anche in questo caso le sezioni in LR White si sono dimostrate più adatte per IGL, permettendo una maggior diluizione del siero primario e tempi d'incubazione più brevi, e mostrando una quasi totale assenza di marcatura aspecifica. Queste osservazioni, oltre a confermare che lo stroma contiene Rubisco, com'era logico aspettarsi, indicano che nei cloroplasti di fagiolo i cristalli sono effettivamente costituiti di questa proteina, offrendo per la prima volta una conferma sperimentale diretta delle ipotesi espresse in letteratura.

Per quanto la nostra esperienza dimostri che si possono ottenere buoni risultati anche con tessuto fissato e incluso in modo convenzionale (vedi TNV e TBSV), occorre tener presente che i processi di fissazione, disidratazione e inclusione possono avere un'influenza determinante al fine di ottenere sia un'adeguata preservazione ultrastrutturale sia una buona accessibilità degli anticorpi ai siti antigenici. E' poi condizione indispensabile disporre di un buon antisiero, che abbia un titolo alto contro l'antigene prescelto e non reagisca con altri antigeni presenti nel tessuto in studio. Nel caso che l'antigene sia un virus, si dovrebbe far precedere l'IGL in vivo da prove di IGL su particelle virali in estratto grezzo o purificato, per avere indicazioni sia sulle concentrazioni di siero primario e secondario da usare, sia sul diametro più adatto dei granuli di oro colloidale. Questa tecnica ha inoltre una sua propria utilità come aiuto nella identificazione in succo grezzo di particelle piccole, poco numerose o frammiste a molte impurità.

Le esperienze sopra riportate confermano, con l'unica eccezione di TNV, che la postfissazione in osmio danneggia notevolmente l'antigenicità, in accordo con quanto riportato in letteratura (Polak e Varndell, 1984). GA, se usata a bassa concentrazione e per tempi brevi, è risultata generalmente un buon fissativo per IGL, tranne nel caso della reazione PVY^o-Mab, per la quale un'aldeide monovalente come PFA si è rivelata meno dannosa per l'antigenicità.

Benché buoni risultati siano stati ottenuti anche con le resine epossidiche, è consigliabile usare resine idrofiliche tipo LR White, che permettono una più agevole penetrazione degli anticorpi, consentendo quindi di usare sieri più diluiti e tempi d'incubazione più brevi, il che abbassa molto la marcatura aspecifica.

IGL su criosezioni ha sempre dato risultati positivi, spesso migliori di quelli su sezioni in resina, grazie alla possibilità di usare fissativi blandi e di eliminare del tutto disidratanti, includenti e sali di metalli pesanti. In caso di siti antigenici particolarmente delicati, come per PVY^o-Mab, si è rivelata l'unica soluzione possibile. Questi vantaggi, cui si aggiunge l'estrema rapidità di esecuzione dell'intero processo, sono però controbilanciati dall'alto costo della strumentazione e dal lungo e laborioso apprendistato necessario per acquisire la tecnica.

BIBLIOGRAFIA

- APPIANO A., D'AGOSTINO G., BASSI M., BARBIERI N., VIALE G., DELL'ORTO P. (1986). Origin and function of tomato bushy stunt virus-induced inclusion bodies. II. Quantitative electron microscope autoradiography and immunogold cytochemistry. *J. Ultrastruct. Molec. Struct. Res.*, 97, 31-38.
- APPIANO A., DELL'ORTO P., VIALE G., BRAIDOTTI P. (1988). Immunogold cytochemistry of a plant potyvirus in sections of host tissue: effect of different fixation and embedding methods on labeling with polyclonal and monoclonal antibodies. *Proc. EUREM 88, York, G.B. Inst. Phys. Conf. Ser. No. 93, 3, 295-296.*
- APPIANO A., REDOLFI P., DOI P., VIALE G. Cytochemical identification of Rubisco in the crystals of bean chloroplasts. *Giorn. Bot. Ital.*, in stampa.
- APPIANO A., VIALE G., DELL'ORTO P. (1989). Immunogold labeling of a plant potyvirus in cryosections of host tissue. *Atti XVII Congr. S.I.M.E.*, 37-38.
- APPIANO A., VIALE G., DELL'ORTO P., ROGGERO P. (1987). Immunocytochemical localization of two isolates of potato virus Y^o in tissue sections of Nicotiana tabacum. *Atti XVI Congr. S.I.M.E.*, 77-78.
- BASSI M., BARBIERI N., APPIANO A., D'AGOSTINO G. (1986). Origin and function of tomato bushy stunt virus-induced inclusion bodies. I. Differential staining, cytochemistry and serial sectioning. *J. Ultrastruct. Molec. Struct. Res.*, 96, 194-203.
- D'AGOSTINO G. (1987). Immuno-cryoultramicrotomy of tobacco necrosis virus in Phaseolus vulgaris. *Atti XVI Congr. S.I.M.E.*, 79-80.
- D'AGOSTINO G., DELL'ORTO P., VIALE G. (1988). Immunoelectron microscopy on tobacco necrosis virus in Phaseolus vulgaris: cryo-ultramicrotomy versus plastic embedding. *Proc. EUREM 88, York, G.B., Inst. Phys. Conf. Ser. No. 93, 3, 297-298.*
- D'AGOSTINO G., PENNAZIO S. (1985). Fine structure of necrotic lesions induced by tobacco necrosis virus in tobacco. *J. Submicrosc. Cytol.*, 17, 229-237.
- D'AGOSTINO G., REDOLFI P. (1989). Preliminary investigations on tobacco necrosis virus coat protein in bean leaves. *Atti XVII Congr. S.I.M.E.*, 303-304.
- D'AGOSTINO G., REDOLFI P. Immunocytochemical investigations on granular bodies present in the intercellular spaces of tobacco necrosis virus-infected plants. *Atti XI Conv. Gruppo di Citologia S.B.I., Palermo 1988, Giorn. Bot. Ital.*, in stampa.
- GRIFFITHS G., MCDOWALL A., BACK R., DUBOCHET J. (1984). On the preparation of cryosections for immunocytochemistry. *J. Ultrastruct. Res.*, 89, 65-78.

- HILLS G.J., PLASKITT K.A., YOUNG N.D., DUNIGAN D.D., WATTS J.W., WILSON T.M.A., ZAITLIN M. (1987). Immunogold localization of the intracellular sites of structural and nonstructural tobacco mosaic virus proteins. *Virology*, 161, 488-496.
- LANGENBERG W.G. (1988). Barley stripe mosaic virus but not brome mosaic virus binds to wheat streak mosaic virus cylindrical inclusions in vivo. *Phytopathology*, 78, 589-594.
- LANGENBERG W.G., VAN DER WAL D. (1986). Identification of barley yellow mosaic virus by immunoelectron microscopy in barley but not in Polymyxa graminis or Lagena radiculicola. *Neth. J. Pl. Path.*, 92, 133-136.
- LIN N.S., HSU Y.H., CHIU R.J. (1987). Identification of viral structural proteins in the nucleoplasm of potato yellow dwarf virus-infected cells. *J. Gen. Virol.*, 68, 2723-2728.
- LINSTEAD P.J., HILLS G.J., PLASKITT K.A., WILSON I.G., HARKER C.L., MAULE A.J. (1988). The subcellular location of the gene 1 product of cauliflower mosaic virus is consistent with a function associated with virus spread. *J. Gen. Virol.*, 69, 1809-1818.
- MACKENZIE D.J., TREMAINE J.H. (1988). Ultrastructural location of non-structural protein 3A of cucumber mosaic virus in infected tissue using monoclonal antibodies to a cloned chimeric fusion protein. *J. Gen. Virol.*, 69, 2387-2395.
- PESIC Z., HIRUKI C., CHEN M.H. (1988). Detection of viral antigen by immunogold cytochemistry in ovules, pollen, and anthers of alfalfa infected with alfalfa mosaic virus. *Phytopathology*, 78, 1027-1032.
- POLAK J.M., VARDELL I.M. (1984). Immunolabeling for electron microscopy. Elsevier. Amsterdam, New York, Oxford.
- RASCIO N., MARIANI COLOMBO P., DALLA VECCHIA F., CHITANO P. (1985). Intrathylakoidal crystal appearance during the vital cycle of spinach chloroplasts. *Protoplasma*, 126, 153-157.
- SAITO T., HOSOKAWA D., MESHI T., OKADA Y. (1987). Immunocytochemical localization of the 130K and 180K proteins (putative replicase components) of tobacco mosaic virus. *Virology*, 160, 477-481.
- STUSSI-GARAUD C., GARAUD J.C., BERNA A., GODEFROY-COLBURN T. (1987). *In situ* location of an alfalfa mosaic virus non-structural protein in plant cell walls: correlation with virus transport. *J. Gen. Virol.*, 68, 1779-1784.
- TOKUYASU K.T. (1986). Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. *J. Microscopy*, 143, 139-149.
- TOMENIUS K., CLAPHAM D., MESHI T. (1987). Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology*, 160, 363-371.
- Viale G., Dell'Orto P., Braidotti P., Coggi G. (1985). Ultrastructural localization of intracellular immunoglobulins in Epon-embedded human lymph nodes. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 400-406.