

用单因子血清识别急性致瘤性 ALV 诱发肿瘤组织中的 fps 肿瘤抗原

王一新¹, 陈浩², 赵鹏¹, 李建亮¹, 崔治中^{1*}

¹ 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018

² 北京家禽育种有限公司, 北京 101301

摘要: 【目的】制备鼠抗 fps 单因子血清, 检测急性致瘤性 ALV 诱发肉瘤组织中的 fps 肿瘤抗原。【方法】以 J 亚群相关禽白血病/肉瘤病毒 Fu-J 株 RNA 为模板, 分两段扩增 *v-fps* 肿瘤基因, 利用大肠杆菌表达系统表达这两段蛋白, 纯化后将两种蛋白同时免疫小鼠, 获得抗血清, 间接免疫荧光试验检测肉瘤组织滤过液感染的 CEF 和肿瘤细胞中的 fps 抗原, 免疫组织化学方法检测肿瘤组织中的 fps 抗原。【结果】该单因子血清具有较好特异性, 不与经典 ALV-J 发生交叉反应。被感染的 CEF 细胞、肿瘤细胞及纤维肉瘤组织切片均显示阳性。【结论】该实验制备了鼠抗 fps 单因子血清, 建立了 fps 肿瘤抗原的检测方法, 为进一步研究该病毒的生物学特性及其致瘤机制奠定了基础。

关键词: J 亚群相关禽白血病/肉瘤病毒, *v-fps* 基因, 单因子血清, 间接免疫荧光试验, 免疫组织化学试验

中图分类号: S852 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2013)03-0299-07

禽白血病病毒 (Avian Leukosis Virus, ALV) 属反转录病毒科禽 C 型反转录病毒属成员, 可引起禽类多种肿瘤性疾病^[1]。该病毒可分为 A 到 J 10 个亚群, 临床上常见的为 A、B 和 J 亚型, 而 C、D 亚型在临床上相对少见, E 亚群主要以前病毒的形式存在于宿主基因组而广泛存在^[2]。ALV-J 最早是由 Payne 等在肉种鸡中分离得到^[3], 在国内, 杜岩等从市场白羽肉鸡中首次发现并证实 ALV-J 的存在^[4], 此后分别在商品肉鸡、蛋鸡、麻鸡中相继分离到 ALV-J^[5-8]。研究表明, ALV-J 可在禽类中引起髓细胞瘤、血管瘤、肾瘤、组织肉瘤、纤维肉瘤等多种肿瘤^[9-14]。但这些病毒的致病性都不是很强, 肿瘤的形成时间较长。

近年来, 我国鸡群中出现了急性肿瘤病毒所引起的纤维肉瘤病例。本实验室在“817”肉杂鸡群中发现了急性纤维肉瘤^[15], 病毒分离及系统的人工致病动物实验证明该急性纤维肉瘤主要与 ALV-J 相关^[16-17]。以病毒 RNA 为模板, 使用多对扩增不同肿瘤基因嵌合体分子的引物, 我们扩增到了完整的含有 *v-fps* 肿瘤基因的缺陷型病毒基因组 Fu-J 1-5^[18]。

为建立针对携带有 *v-fps* 肿瘤基因急性致瘤性病毒的检测方法, 明确 fps 肿瘤抗原的分布部位, 我们利用 Fu-J 病毒 RNA 为模板, 制备鼠抗 fps 单因子血清, 使用间接免疫荧光试验检测感染肉瘤组织滤过液的 CEF 以及肿瘤组织悬液细胞; 使用免疫组织

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31172330)

* 通信作者。Tel: +86-538-8241560; Fax: +86-538-8241419; E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

作者简介: 王一新 (1989-), 男, 山东济南人, 硕士研究生, 主要从事动物分子病毒学研究。E-mail: 07sdauwyx@163.com

收稿日期: 2012-10-29; 修回日期: 2012-12-04

化学方法检测纤维肉瘤组织切片中的 fps 肿瘤抗原。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒来源: ALV-J 相关急性致癌性病毒毒株 Fu-J^[18]、ALV-J 中国分离株 NX0101 均由本实验室保存^[19];

1.1.2 主要试剂和仪器: 病毒 RNA 提取试剂购自 OMEGA 公司; RT-PCR 反应试剂购自大连宝生物公司; Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit 购自 IDEXX 公司; FITC 标记羊抗鼠 IgG、HRP 标记羊抗

鼠 IgG 购自 Sigma 公司; 完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂购自 Sigma 公司。

1.1.3 实验动物: 昆明白小鼠购自山东泰邦生物制品公司。

1.2 v-fps 蛋白分析及引物设计

由于 *v-fps* 基因较长, 且含有大肠杆菌稀有密码子, 使用 DNASTAR 软件下分析其抗原性、亲水性等特性, 将其分为两部分分段表达。第一段源自 *v-fps* 基因的第 1-543 位, 称之为 *v-fpsq*; 第二段源自 *v-fps* 基因的第 772-2055 位, 称为 *v-fpsh*。设计两对引物分别扩增 *v-fpsq* 和 *v-fpsh* 片段, 引物两端分别加入 *Sal* I 与 *Eco*R I 酶切位点。扩增引物见表 1, 两段表达蛋白示意图如图 1。

表 1 用于扩增 *v-fpsq*、*v-fpsh* 片段的引物

Table 1 Primers used for the amplification of *v-fpsq* and *v-fpsh*

Primer	Sequence (5'→3')	Size/bp	Restriction site
<i>fpsq</i> -F	TAGAATTCATGGGCTTTGGGCCGAGCT		<i>Sal</i> I
<i>fpsq</i> -R	GTCGACCTACAGGCTGCGCACGTACTT	543	<i>Eco</i> R I
<i>fpsh</i> -F	ATGAATTCATGATCGACCCGCCACTGA		<i>Sal</i> I
<i>fpsh</i> -R	GTCGACCTACCTGTGGATGCAGTGCTTG	1283	<i>Eco</i> R I

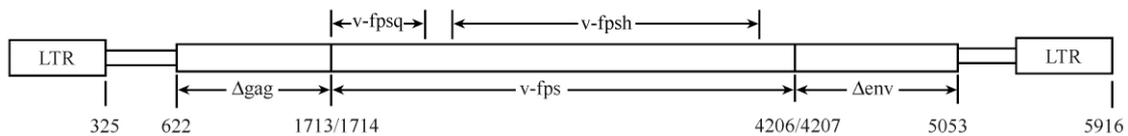


图 1 两段 *v-fps* 表达蛋白示意图

Fig. 1 A sketch map of two parts of *v-fps* proteins.

1.3 重组蛋白的获得及单因子血清的制备

将肉瘤组织研磨滤过液接种 CEF 细胞, 5d 后使用禽白血病抗原检测试剂盒检测细胞上清, 抗原 p27 阳性者 (S/P > 0.2), 提取病毒 RNA, 进行 RT-PCR 反应扩增 *v-fpsq*、*v-fpsh* 两段目的基因, 酶切并连入表达性载体 pET-32a(+). 将重组质粒转化表达性大肠杆菌 BL21 (DE3) 宿主菌, 挑取单克隆, 摇菌, 酶切、测序正确后诱导表达。SDS-PAGE 电泳分析两段蛋白的可溶性。对于非可溶性蛋白, 裂解菌体后离心收集包涵体沉淀, Buffer B (GenScript Corporation) 溶解包涵体后使用针对 His 标签的镍柱纯化, 洗脱液转移至半透膜 4℃ 透析复性 48 h。对于可溶性蛋白, 裂解菌体后离心收集上清, 使用针对 His 标签的镍柱纯化。fpsq、fpsh 目的蛋白纯化后定量, 将两种蛋白同时按常规程序免疫 6-8 周龄 Balb/c 小鼠, ELISA 方法测定抗体效价。析出的血

清置 -20℃ 保存。

1.4 间接免疫荧光试验检测 Fu-J 感染 CEF 细胞中 fps 肿瘤抗原

将肉瘤组织研磨滤过液接种 CEF 细胞, 培养 5d 后, 用 0.25% 胰酶消化, 转移至加有飞片的平皿中, 继续维持 7 d。使用禽白血病抗原检测试剂盒检测细胞上清, p27 抗原阳性者取出飞片, 固定。晾干后加入鼠抗 fps 单因子血清 (1:100 稀释), 37℃ 温箱中作用 45 min。弃一抗, PBS 洗 3 次, 晾干后每孔加入 100 μL FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (1:150 稀释), 37℃ 温箱中作用 45 min。弃去二抗, PBS 洗 3 次后在荧光显微镜下观察。阴性对照为 NX0101 感染的 CEF 以及空白 CEF。

1.5 间接免疫荧光试验检测肿瘤悬液细胞中 fps 肿瘤抗原

取 1 g 鸡肉瘤组织加 5 mL PBS 研磨, 将肉瘤

组织研磨滤过液颈部皮下接种 5 只 SPF 鸡, 接种后第 10d 在接种部位全部出现同样的纤维肉瘤。常规方法制备^[20] 单个肿瘤细胞, 计数后分装于培养瓶中 (300 - 400 万/瓶), 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。待大部分细胞铺满后, 0.25% 胰酶消化, 转移至加有飞片的平皿中, 间接免疫荧光试验检测肿瘤悬液细胞中 fps 肿瘤抗原, 方法同前。

1.6 免疫组化试验检测肉瘤组织中 fps 肿瘤抗原

取 0.5 cm³ 左右新鲜肉瘤组织, 常规方法^[21] 进行免疫组化试验。将组织切片依次经过两道二甲苯及梯度乙醇, 3% H₂O₂ 室温消化 20 min, 柠檬酸盐缓冲液中 92 - 98℃ 加热修复抗原。鼠抗 fps 单因子血清 1:100 倍稀释, HRP 标记羊抗鼠二抗 1:200 倍稀释。中性树胶封片, 显微镜下观察。

2 结果

2.1 目的基因 v-fpsq, v-fpsh 的扩增

RT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 在成像系统下观察, 分别可见 543 bp 和 1283 bp 处的清晰条带, 与预计的目的片段大小相符。

2.2 原核表达重组质粒 pET-32a (+)-fpsq, pET-32a (+)-fpsh 的双酶切鉴定

将构建好的表达重组质粒 pET-32a (+)-fpsq, pET-32a (+)-fpsh 用 Sal I 与 EcoR I 进行双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳分析, pET-32a (+)-fpsq 酶切产物可见在 543 bp 和 5900 bp 处有两条目的条带; pET-32a (+)-fpsh 酶切产物在 1283 bp 和 5900 bp 处两条目的条带。

2.3 v-fpsq 及 v-fpsh 蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 检测

重组质粒 PET-32a-fpsq, PET-32a-fpsh 转化入 DE3 感受态, 诱导表达, 进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果发现诱导表达的重组菌分别在约 37.1 kDa 和 65.8 kDa 出现特异表达带, 与预期结果相符合。经超声波处理后分别收集上清和沉淀物进行 SDS-PAGE 电泳, 发现 fpsq 蛋白目的条带出现在沉淀物中, fpsh 蛋白目的条带出现在上清中。分别超声波破碎, 离心收集包涵体及上清, Ni-NTA-Resin 纯化。IPTG 诱导后, 不同时段 fpsq 及 fpsh 蛋白表达 SDS-PAGE 如图 2 所示。

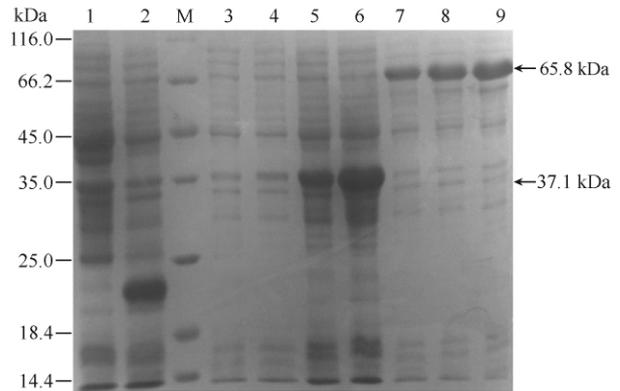


图 2 SDS-PAGE 检测 fpsh 重组蛋白的表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressive products in different induction time. 1: Whole cell protein from IPTG-induced *E. coli*. BL21 (DE3) cells; 2: Whole cell protein from IPTG-induced *E. coli*. BL21 (DE3) cells containing PET-32a (+); M: Protein Molecular Weight Marker (Low); 3 - 6: Whole cell protein from IPTG-induced *E. coli*. BL21 (DE3) cells containing recombinant plasmid pET-32a-fpsq after 0, 1, 3, 5h (37.1 kDa); 7 - 9: Whole cell protein from IPTG-induced *E. coli*. BL21 (DE3) cells containing recombinant plasmid pET-32a-fpsh after 1, 3, 5h (65.8 kDa).

2.5 抗 fps 血清对急性致瘤病毒感染的 CEF 细胞的鉴定

使用间接免疫荧光试验检测血清效价, 以该血清为一抗 100 倍稀释时, 阳性细胞染色明显, 且非特异背景较小。图 3 为不同种类细胞的间接免疫荧光检测结果, 其中视野 A 为肉瘤滤过液感染的 CEF, 细胞均匀分布, 部分为阳性; 视野 B 为疑似被转化细胞的团块, 团块细胞全部为阳性; 视野 C 为肿瘤块悬液培养的原代细胞, 全部为阳性; 为更清晰呈现阳性细胞, 视野 D 中加入等量的 CEF, 约一半的细胞为阳性; 感染了 NX0101 的 CEF 及空白 CEF 均为阴性。

2.6 免疫组化法检测纤维肉瘤组织中病毒抗原

以鼠抗 fps 单因子血清为一抗, 对颈部皮下肿瘤切片进行免疫组化染色, 图 4 视野 A 显示, 纤维细胞有的呈束状排列, 有的呈漩涡状排列, 胞核形状不一, 还有核分裂现象, 免疫组化检测阳性细胞数量比较多, 在纤维细胞的胞浆和胞膜出现了深浅不一的褐色, 判定为阳性。视野 B 进一步显示, 阳性染色主要出现在组织细胞的胞浆。使用阴性血清检测该肿瘤切片则不能看到呈阳性特征的褐色区存在。

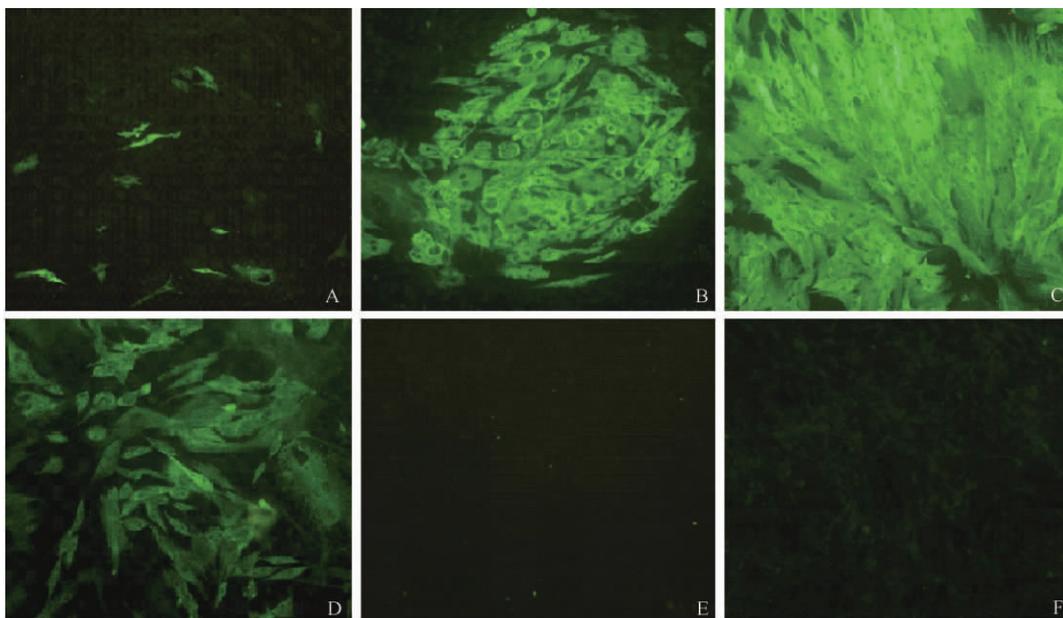


图3 抗fps单因子血清对不同细胞的间接免疫荧光检测结果

Fig. 3 IFA test for different kinds of cells by mono-specific anti-fps serum. A/B: CEF infected by sarcoma supernatant (100 ×); C: primary cells of tumor tissue suspension (100 ×); D: culture cells of tumor tissue suspension added CEF (100 ×); E: CEF infected by NX0101 (100 ×); F: uninfected CEF (100 ×).

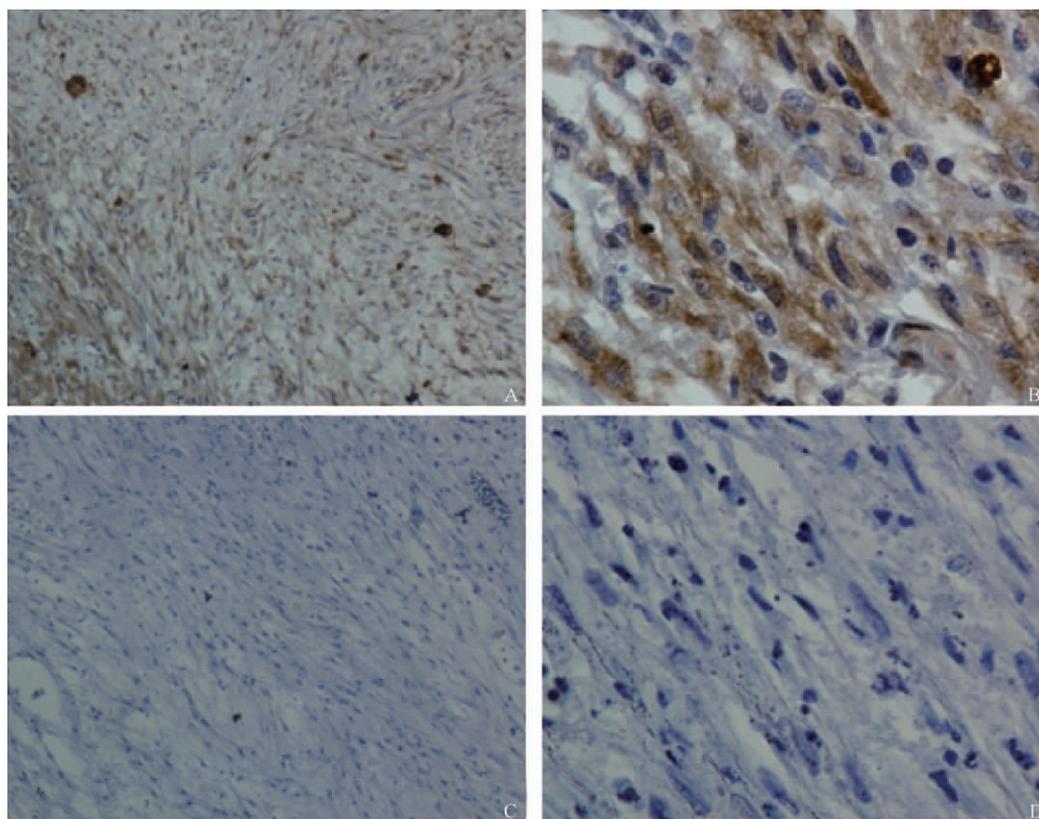


图4 鸡纤维肉瘤使用抗fps单因子血清进行免疫组化检测结果

Fig. 4 IHC of fibrosarcoma from chickens by mono-specific anti-fps serum. A: IHC of fibrosarcoma from chickens by anti-fps serum (200 ×); B: IHC of fibrosarcoma from chickens by anti-fps serum (1000 ×); C: IHC of fibrosarcoma from chickens by negative serum (200 ×); D: IHC of fibrosarcoma from chickens by negative serum (1000 ×).

3 讨论

根据诱导产生肿瘤速度的快慢, 禽白血病/肉瘤病毒可分为慢性致瘤性和急性致瘤性病毒两类^[22]。急性致瘤性病毒基因组含有肿瘤基因, 如携带 *v-src* 的罗斯肉瘤病毒 (Rous Sarcoma Virus, RSV)^[23], 携带 *v-fps* 的 Fujinami 肉瘤病毒 (Fujinami Sarcoma Virus, FSV)^[24]、携带 *v-myc* 的成髓细胞性白血病病毒 (Avian Myeloblastosis Virus, AMV)^[25]。由于缺失病毒复制的基因, 急性致瘤性病毒多为“复制缺失型 (rd) 突变株”, 因此它们需要具有完整复制能力的慢性致瘤性病毒作为“辅助病毒”以完成整个生活史^[26]。近期, 我们从 30 多日龄 817 肉杂鸡颈部纤维肉瘤中分离到一株 ALV-J 相关急性肿瘤病毒, 初步确定该病毒携带有 *v-fps* 肿瘤基因, 病毒基因组结构特征为 5'-R-U5- Δ gag-fps- Δ env-U3-R-3' 或 5'-R-U5- Δ gag-fps- Δ pol- Δ env-U3-R-3'^[18]。

为建立急性转化型禽白血病/肉瘤病毒的检测方法, 进一步证实该 ALV-J 相关急性肿瘤病毒含有 *v-fps* 肿瘤基因, 本实验利用大肠杆菌表达系统人工表达了两段抗原性较好的 fps 蛋白, 获得了高效价的鼠抗 fps 单因子血清, 并建立了用于检测的间接免疫荧光试验和免疫组织化学方法。肉瘤滤过液感染的 CEF 和肿瘤块悬液原代培养细胞的 IFA 及纤维肉瘤组织切片的免疫组化实验均为阳性, 这证实了该病毒确实携带 *v-fps* 肿瘤基因。结果同时显示, 部分感染该急性转化型病毒的 CEF 发生了“细胞转化”现象, 被转化的细胞不再局限于单层生长, 逐渐形成“细胞转化灶”, 提示被转化的细胞存在无限传代的可能性。

历史上, 禽白血病/肉瘤病病毒的研究曾在分子生物学和分子肿瘤学的发展中起了非常重要的动物模型作用^[27-29]。近年来, ALV-J 相关急性肿瘤病毒的出现和流行, 一方面给我国养禽业带来了挑战, 另一方面也为我们进一步研究禽白血病/肉瘤病的致瘤机制、肿瘤发生发展的分子机制提供了资源和机遇。本试验制备了鼠抗 fps 单因子血清, 建立了携带 *v-fps* 肿瘤基因的急性转化型禽白血病/肉瘤病病毒检测方法, 证实了携带 *v-fps* 肿瘤基因的 ALV-J 相关急性肿瘤病毒具备体外转化细胞的能力, 这为我们下一步开展 ALV-J 相关急性肿瘤病毒分子生物

学特性及其致瘤分子机制的研究奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] Calnek BW. 禽病学. 高福, 苏敬良等译. 第十版. 北京市: 中国农业出版社, 1999: 529-296.
- [2] Payne LN. HPRS-103: a retrovirus strikes back. The emergence of subgroup J avian leukosis virus. *Avian Pathology*, 1998, 27: S36-S45.
- [3] Payne LN, Brown R, Bunste AD. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. *Journal of General Virology*, 1991, 72: 801-807.
- [4] Du Y, Cui Z, Qin A. Subgroup J of leukosis viruses in China. *China Poultry Science*, 1999, 3 (1): 1-4. (in Chinese)
杜岩, 崔治中, 秦爱建. 从市场商品肉鸡中检出 J 亚群禽白血病病毒. 中国家禽学报, 1999, 3 (1): 1-4.
- [5] Zhang Z, Cui Z, Zhao H, Wang H, Xu Y. Pathological study on subgroup J of avian leukosis and isolation of virus from commercial broiler flocks. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2002, 38 (6): 6-8. (in Chinese)
张志, 崔治中, 赵宏坤, 王海蓉, 许益明. 商品代肉鸡 J 亚群禽白血病的病理及病毒分离鉴定. 中国兽医杂志, 2002, 38 (6): 6-8.
- [6] Xu B, Dong W, He Z, Feng X, Yu C, Zhang L, Ren Y, Lee LF, Mao XL. Rapid diagnosis of avian leukosis subgroup J of egg-type chicken by indirect fluorescent assay. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2002, 38 (9): 7-9. (in Chinese)
徐银蕊, 董卫星, 何召庆, 冯小宇, 余春明, 张丽, 任艳丽, Lee LF, Mao XL. 间接荧光抗体法快速诊断海兰褐蛋鸡 J 亚群禽白血病的研究. 中国兽医杂志, 2002, 38 (9): 7-9.
- [7] Du Y, Cui Z, Qin A, Silva RF, Lee LF. Isolation of subgroup J avian leukosis viruses and their partial sequence comparison. *Chinese Journal of Virology*, 2000, 16 (4): 341-346. (in Chinese)
杜岩, 崔治中, 秦爱建, Silva RF, Lee LF. 鸡的 J 亚群白血病毒分离及部分序列比较. 病毒学报, 2000, 16 (4): 341-346.
- [8] Cheng Z, Zhang L, Liu S, Zhang L, Cui Z. Emerging of avian leusis virus subgroup J in a flock of Chinese local breed. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45 (4): 584-587. (in Chinese)
成子强, 张利, 刘思当, 张玲娟, 崔治中. 中国麻鸡中发现禽 J 亚群白血病. 微生物学报, 2005, 45 (4): 584-

- 587.
- [9] Venugopal K, Smith LM, Howes K, Payne LN. Antigenic variants of J subgroup avian leukosis virus: sequence analysis reveals multiple changes in the env gene. *Journal of General Virology*, 1998, 79: 757-766.
- [10] Benson SJ, Ruis BL, Garbers AL, Fadly AM, Conklin KF. Independent isolates of the emerging subgroup J avian leukosis virus derive from a common ancestor. *Journal of Virology*, 1998, 72: 1121-1298.
- [11] Hatai H, Ochiai K, Nagakura K, Imanishi S, Ochi A, Kozakura R, Ono M, Goryo M, Ohashi K, Umemura T. A recombinant avian leukosis virus associated with fowl glioma in layer chickens in Japan. *Avian Pathology*, 2008, 37 (2) : 127-137.
- [12] Cheng ZQ, Liu JZ, Cui ZZ, Zhang L. Tumors associated with avian leukosis virus subgroup J in layer hens during 2007 to 2009 in China. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2010, 72 (8) : 1027-1033.
- [13] Zhang X, Shi W, Liu H, Zhang H, Liao M, Xin C, Cao W. Isolation and the full-length genome sequencing of subgroup J avian leukosis virus ZH-08 isolate associated with hemangioma. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41 (2) : 193-199. (in Chinese)
张小桃, 史伟伟, 刘红波, 张贺楠, 廖明, 辛朝安, 曹伟胜. 血管瘤相关J亚群禽白血病病毒ZH-08株的分离与全基因组序列测定. *畜牧兽医学报*, 2010, 41 (2) : 193-199.
- [14] Lai H, Zhang H, Ning Z, Chen R, Zhang W, Qing A, Xin C, Yu K, Cao W, Liao M. Isolation and characterization of emerging subgroup J avian leukosis virus associated with hemangioma in egg-type chickens. *Vet Microbiol*, 2011, 151 (3-4) : 1549-1684.
- [15] Liu S, Wang B, Zhang Z, Wang J, Sun S, Cui Z. The separation of subgroup A and J ALV in soft tissue sarcomas of "817" broiler hybrids. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42 (3) : 396-401. (in Chinese)
刘绍琼, 王波, 张振杰, 王健, 孙淑红, 崔治中. 817肉杂鸡肉瘤组织分离出A、J亚型禽白血病病毒. *畜牧兽医学报*, 2011, 42 (3) : 396-401.
- [16] Li C, Zhang H, Zhao P, Cui Z. Establishment of a bird experiment model for chicken acute fibrosarcomas induced by ALV-J associated virus. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45 (3) : 548-555. (in Chinese)
李传龙, 张恒, 赵鹏, 崔治中. ALV-J相关的鸡急性纤维肉瘤发病模型的建立. *中国农业科学*, 2012, 45 (3) : 548-555.
- [17] Wang X, Li D, Bian X, He Y, Zhao P, Cui Z. Differential diagnosis and bird experiments of fibrosarcoma induced by subgroup J avian leukosis virus in Hy-Line brown layers. *Veterinary Science in China*, 2012, 42 (06) : 582-586. (in Chinese)
王鑫, 李德庆, 边小明, 何羽婷, 赵鹏, 崔治中. 海兰褐产蛋鸡ALV-J亚型相关纤维肉瘤的鉴别诊断及人工造病试验. *中国兽医科学*, 2012, 42 (06) : 582-586.
- [18] Chen H, Wang Y, Zhao Y, Li J, Cui Z. Acute fibrosarcomas caused by avian leukosis virus subgroup J associated with *v-fps* oncogene. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. In press.
- [19] Zhang J, Cui Z, Ding J, Jiang S. Construction of infectious clone of subgroup J avian leukosis virus strain NX0101 and its pathogenicity. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 03: 437-440.
张纪元, 崔治中, 丁家波, 姜世金. J亚群白血病病毒NX0101株感染性克隆化病毒的构建及其致病性. *微生物学报*, 2005, 03: 437-440.
- [20] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版西安公司, 2007: 159-160.
- [21] 倪灿荣, 马大烈, 戴益民. 免疫组织化学实验技术及应用. 北京: 化学工业出版社-现代生物技术与医药科技出版中心, 2006: 65-78.
- [22] Chen H, Wang Y, Zhao P, Li J, Li D, Cui Z. The relationship between oncogene and oncogenesis mechanism of avian leukosis/sarcoma virus. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43 (3) : 336-342. (in Chinese)
陈浩, 王一新, 赵鹏, 李建亮, 李德庆, 崔治中. 禽白血病/肉瘤病毒肿瘤基因及其与致肿瘤机制的关系. *畜牧兽医学报*, 2012, 43 (3) : 336-342.
- [23] Stephen Goff. *Retroviruses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997: 27-53.
- [24] Ludford RJ. The occasional neutralisation of the active agent of filterable fowl tumours by fluid media from tissue cultures. *Cancer Research*, 1939. 35 (1) : 63-71.
- [25] Fritz RB, Langlois AJ, Beard D, Beard JW. Strain MC29 avian leukosis virus: immunologic relationships to other avian tumor viruses. *Journal Of Immunology*, 1968, 101 (6) : 1199.
- [26] Weiss RA, Vogt PK. 100 years of Rous sarcoma virus. *Journal of Experimental Medicine*. 2011, 208 (12) : 2351-2355.
- [27] Cui Z. The past, present and future in the studies of avian

- leukosis viruses. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2012, 24 (4) : 305-310. (in Chinese)
- 崔治中. 禽白血病病毒研究的过去、现在和将来. *生命科学*, 2012, 24 (4) : 305-310.
- [28] Maeda N, Fan H, Yoshikai Y. Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. *Reviews in Medical Virology*. 2008 (18) : 387-405.
- [29] Valeria Bergonzini, Cristiano Salata, Arianna Calistri, Cristina Parolin, Giorgio Palu. View and review on viral oncology research. *Infectious Agents and Cancer*. 2010, 5:11.

Detection of fps tumor antigen with mono-specific anti-fps serum in tumors induced by acute transforming ALV

Yixin Wang¹, Hao Chen², Peng Zhao¹, Jianliang Li¹, Zhizhong Cui^{1*}

¹Animal Science and Technology College, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

²Beijing Poultry Breeding co., LTD, Beijing 101301, China

Abstract: [Objective] To prepare anti-fps mono-specific serum, and detect the fps antigen in tumors induced by acute transforming avian leukosis/sarcoma virus containing *v-fps* oncogene. [Methods] Two part of *v-fps* gene was amplified by RT-PCR using the Fu-J viral RNA as the template. Mono-specific serum was prepared by immunizing Kunming white mouse with both two recombinant infusion proteins expressed by the prokaryotic expression system. Indirect immunofluorescent assay was used to detect fps antigen in tumor tissue suspension cells and CEF infected by sarcoma supernatant. Immunohistochemical method was used to detect fps antigen in tumor tissue. [Results] The mouse mono-specific serum was specific as it had no cross reaction with classical ALV-J strains. The result reveals that the tumor tissue suspension cells, the CEF infected by sarcoma supernatant, and the slice immunohistochemistry of the sarcoma showed positive results. [Conclusion] The anti-fps mono-specific serum was prepared, and the detection method was established, which laid the foundation for the study of viral biological characteristics and mechanism of tumourgenesis of acute transforming avian leukosis/sarcoma virus containing *v-fps* oncogene.

Keywords: The acute transforming subgroup J associated avian leukosis/sarcoma virus, *v-fps*, mono-specific serum, indirect immunofluorescent assay, immunohistochemical method

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (31172330)

* Corresponding author. Tel: +86-538-8241560; Fax: +86-538-8241419; E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

Received: 29 October 2012/Revised: 4 December 2012