

# PCR과 RFLP분석을 이용한 transmissible gastroenteritis virus의 spike glycoprotein gene과 nonstructural protein gene의 분석

권혁무

강원대학교 수의학과  
(1996년 2월 6일 접수)

## Analysis of the spike glycoprotein gene and nonstructural protein gene of transmissible gastroenteritis virus using PCR and RFLP analysis

Hyuk-moo Kwon

*Department of Veterinary Medicine Kangwon National University*  
(Received Feb 6, 1996)

**Abstract** : To analyze the genomic diversity of transmissible gastroenteritis virus (TGEV), the N-terminal half of the spike (S) glycoprotein gene and nonstructural protein gene (open reading frames 3 and 3-1) were amplified by reverse transcriptase reaction and polymerase chain reaction (RT-PCR), and analyzed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of the amplified DNA. In this study, TGEV Miller (M6) and Purdue (P115) strains were used as reference strains, and two vaccine strains (MSV and STC3) and four Korea isolates (P44, VRI-WP, VRI-41, and VRI-48) were analyzed. All TGEV strains were amplified with three TGEV primer pairs. Although there was some exception in RFLP analysis, this method differentiated TGEV strains into following groups : Miller group (M6 and MSV), Purdue group (P115, STC3, P44, VRI-WP, VRI-41, and VRI-48). Using *Sau3AI* and *SspI*, VRI-48 was differentiated from the Miller and Purdue type viruses. The RT/PCR in conjunction with RFLP analysis was a rapid and valuable tool for differentiating several strains of TGEV. This study revealed the occurrences of distinct difference in genome of TGEV strains.

**Key words** : TGEV, RT-PCR, RFLP, Spike glycoprotein gene, Nonstructural protein gene.

## 서 론

돼지전염성위장염 바이러스(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)는 구토, 심한 설사 그리고 2주령미만의 신생 자돈에서 높은 폐사율을 특징으로 하는 돼지전염성위장염 (Transmissible gastroenteritis, TGE)의 원인체이다<sup>1</sup>.

Coronaviridae에 속하는 TGEV는 다형태성으로 envelope 를 가지고 있으며, genome은 single-stranded RNA로 구성되어 있다<sup>2,3</sup>. TGEV 증식과정에서 최소한 8개의 바이러스 특이 mRNA가 합성된다<sup>4-6</sup>. TGEV는 3가지 주요 구조단백질, 즉, spike(S) glycoprotein, integral membrane(M) glycoprotein 그리고 nucleocapsid(N) protein을 함유하고 있는데 이들은 mRNAs 2, 6 그리고 7로부터 각각 합성된다. mRNA 4로부터 바이러스의 membrane에 관련된 작은 structural polypeptide가 합성되고, 다른 mRNAs인 3,5, 그리고 8로부터는 nonstructural protein이 합성되는 것으로 알려져 있다. 그중에서 S glycoprotein은 envelope에 곤봉모양의 표면돌기(peplomers)를 형성하여 TGEV의 주요 면역원 단백질로 작용해 바이러스 중화항체를 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>7-9</sup>. 그러므로 S glycoprotein gene의 분석은 TGEV에서 인정되고 있는 항원의 다양성을 이해하는데 가장 중요한 부분이다. S glycoprotein gene과 M glycoprotein gene사이 존재하는 open reading frames (ORFs) 3, 3-1 그리고 4는 병원성이나 조직친화성과 깊은 관련이 있는 것으로 알려졌다. ORF 3과 3-1을 encoding하는 RNAs 3과 4에 462-nucleotides가 결여된 TGEV의 small plaque 변이주는 작은 plaque, 낮은 병원성 그리고 돼지백혈구내에서의 지속성 등을 나타냈다<sup>10</sup>. 따라서 ORFs 3, 3-1, 그리고 4의 분석은 TGEV의 병원성과 조직친화성을 정확히 이해하는데 꼭 필요한 일이다.

현재 TGE를 예방하기 위해서 TGEV 백신을 이용하고 있는데 이러한 백신들은 불활화 또는 병원성을 약화시킨 바이러스를 사용하고 있다. 이들 백신은 다양한 방어효과를 보여주고 있는데 병원성 TGEV가 가장 우수한 면역효과를 나타내는 것으로 보인다. 현재 사용되고 있는 백신이 TGE에 의한 피해를 줄이는데 성공하지 못한 돈군에서는 자가백신 (autogenous vaccine)이 효과적인 것으로 나타났다<sup>11</sup>. 현재 사용하고 있는 백신의 방어효과 결여는 부분적으로 백신에 대한 개체의 면역정도와 면역형태때문으로 보인다<sup>12,13</sup>. 또한 시판되고 있는 백신에 의해 방어효과가

없는 돈군에서 자가백신의 성공은 TGEV 분리주들 사이에 다양한 항원성이 존재하고 있음을 암시하고 있다<sup>11</sup>. 바이러스 중화시험에 의하면 TGEV는 오직 한 종류의 혈청형만이 존재하는 것으로 보이지만 단클론항체나 다양한 분자생물학적 방법을 이용한 분석결과에 의하면 항원성, genome 그리고 병원성에 있어서 다양성을 나타내고 있다<sup>14-20</sup>. 그러므로 성공적인 TGEV백신을 위해서는 이러한 차이점들을 인식하는 것이 중요하다.

현재 우리나라에서는 국내 TGEV 분리주에 대해서 이러한 분석이 이루어지지 않고 있다. 그러므로 국내에서 분리되는 TGEV의 정확한 분석이 이루어진다면 올바른 백신선택을 할 수 있고, 국내분리주를 백신주로 이용할 경우 좀더 효과적으로 백신주를 선택할 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 목적을 위하여 본 연구는 polymerase chain reaction과 restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)분석을 이용하여 국내에서 분리된 TGEV strain과 백신으로 사용하고 있는 TGEV strain의 유전적 다양성을 결정하기 위하여 수행되었다.

## 재료 및 방법

TGEV : TGEV의 Miller주(virulent M6)와 Purdue주 (attenuated P115)를 표준바이러스로 사용하였고, 농촌진흥청 수의과학연구소에서 분양받은 국내분리주 (VRI-WP, P 44, VRI-41 그리고 VRI-48)와 국내에서 사용하고 있는 백신주 (STC3와 MSV)를 실험에 사용하였다. 이들은 PCR을 이용하여 TGEV로 확인하였다. MSV(killed vaccine)를 제외한 바이러스는 swine testicular cell(STC)에서 증식시킨 다음 실험에 사용하였다. 세포배양액은 Dulbecco's modified Eagle medium을 실험목적에 따라 우혈청을 3-10% 되게 가하고 항생제를 첨가하여 사용하였다.

TGEV RNA 추출과 정제 : 바이러스를 감염시킨 STC가 세포변성을 보였을 때 세포를 얼렸다 녹인후 원심분리하여 깨끗하게 분리된 세포배양 상층액을 바이러스 RNA 추출을 위한 재료로 사용하였다. RNA는 Kwon 등의<sup>21</sup> 방법에 따라 추출하였다. 간단히 설명하면 sodium dodecyl sulfate(최종농도 2%)와 proteinase K (최종농도 250µg/ml)를 세포배양 상층액에 더하고 55℃에서 5분간 유지시킨 후 acid phenol (pH4.0)과 chloroform/isoamyl alcohol (49:1)로 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 RNaid kit (Bio 101)를 사용하여 정제하였다. 마지막으로 RNA는

diethyl-pyrocabonate(DEPC)로 처리한 멸균증류수에 부유한 후 -70℃에 보관하면서 reverse transcriptase(RT)반응에 이용하였다.

Oligonucleotide primers : Oligonucleotide primer의 염기서열은 이미 발표된 TGEV 염기서열을 참고로 선택하였다<sup>22-24</sup>. 이 primer들은 S glycoprotein gene의 N-terminal쪽 반과 ORFs 3와 3-1를 증폭시키기 위하여 사용하였다(Fig 1).

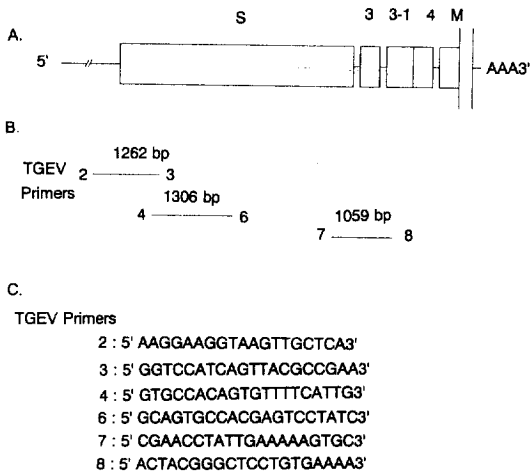


Fig 1. Schematic representation of A) the RNA genome of TGEV Miller strain, showing the location spike (S) glycoprotein gene, open reading frames 3, 3-1 and 4, and the N-terminal M glycoprotein gene; B) the location of primers used in PCR and the sizes of the PCR-amplified fragments expected from the TGEV; and C) the sequence of the primers.

Reverse transcriptase(RT) reaction과 polymerase chain reaction(PCR) : RT반응은 위에서 준비된 TGEV RNA 3~5µl에 2µl의 10×PCR완충액(500mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 9.0, 1.0% Triton ×-100), 2µl의 10mM dNTPs, 250ng antisense primer, 40units RNasin 그리고 1.5µl의 60mM MgCl<sub>2</sub>를 더한 다음 최종 20µl 반응액은 DEPC로 처리한 멸균된 증류수를 더하여 얻었다. 이렇게 준비된 RT반응을 위한 혼합액을 65℃에서 10분간 반응시킨 후 200units의 Molony murine leukemia virus RT(GIBCOBRL)를 더한 다음 45℃에서 1.5시간 반응시켰다. PCR을 위해 RT반응액에 8µl의 10×PCR 완충액, 250ng의 sense primer, 3.5µl의 60mM MgCl<sub>2</sub> 그리고 2.5units의 Tag DNA polymerase(Promega)를 더하고 최종반응액 100µl는 멸균증류수를 더하여 얻었다. PCR은

94℃에서 1분동안의 denaturation, 45℃에서 2분동안의 annealing 그리고 74℃에서 5분동안의 polymeration을 한 cycle로 35 cycles 실행하였다. 증폭된 PCR 생성물은 ethidium bromide 를 함유한 1% agarose gel에서 분석하였다.

Restriction fragment length polymorphism 분석 : 증폭된 S glycoprotein gene과 ORFs 3, 그리고 3-1 gene의 PCR 생성물을, 표준주로 사용한 Miller주와 Purdue주의 염기서열을 참고로하여 선택한 제한효소들로 처리하였다<sup>22-25</sup>. 소화된 PCR 생성물의 RELP pattern은 2% agarose gel에서 전기영동후 분석하였다.

## 결 과

TGEV S gene과 ORF 3와 3-1 gene의 PCR 증폭 : TGEV 표준주, 국내분리주, 그리고 백신주 S glycoprotein gene의 N-terminal region을 TGEV 2/3과 4/6 primer pairs를 이용하여 증폭한 후 PCR 생성물을 1% agarose gel에서 전기영동한 결과 각각 약1262bp와 1306bp의 band를 확인할 수 있었다(Fig 2와 3). 이들 각 PCR product들의 크기는 1% agarose gel에서 동일한 것으로 나타나 증폭된 region에 큰 deletion은 없는 것으로 나타났다. TGEV 7/8 primer pair로 증폭하였을 때 표준주인 M6 (1059 bp)를 제외한 다른 TGEV strain들은 1% agarose gel에서 동일한 크기(1102 bp)의 PCR product를 생성하였다(Fig 4). 이들 PCR 생성물의 identity는 conserved region을 인지하는 제한효소로 확인하였다.

Restriction fragment length polymorphism : TGEV 국내분리주와 백신주의 유전적 다양성을 분석하기 위하여 증폭된 PCR product를 표준주의 염기서열을 참고로하여 선택한 제한효소들로 처리하였다. TGEV 2/3 primer pair로 증폭시킨 PCR product를 *MnI*으로 소화시켰을 때 TGEV를 두 type으로 분류할 수 있었다. 첫째 type은 M6와 MSV가 속하고 두번째 type은 P115, STC3, VRI-WP, P44, VRI-41, VRI-48이 속하였다(Fig 2). TGEV 4/6 primer pair로 증폭시킨 PCR product를 *Sau3AI*와 *SplI*으로 처리하였을 때 TGEV를 세 type으로 분류할 수 있었다. 첫째 type은 M6와 MSV, 둘째 type은 P115, STC3, P44, VRI-WP, 그리고 VRI-41, 셋째 type은 VRI-48이 속하였다(Fig 3). ORF 3와 3-1을 TGEV 7/8 primer pair로 증폭시킨 PCR product를 *AccI*으로 처리한 결과는 TGEV 2/3 primer pair로 증폭시킨 PCR product를 *MnI*으로 처리한 것과 동일하였다(Fig 4).

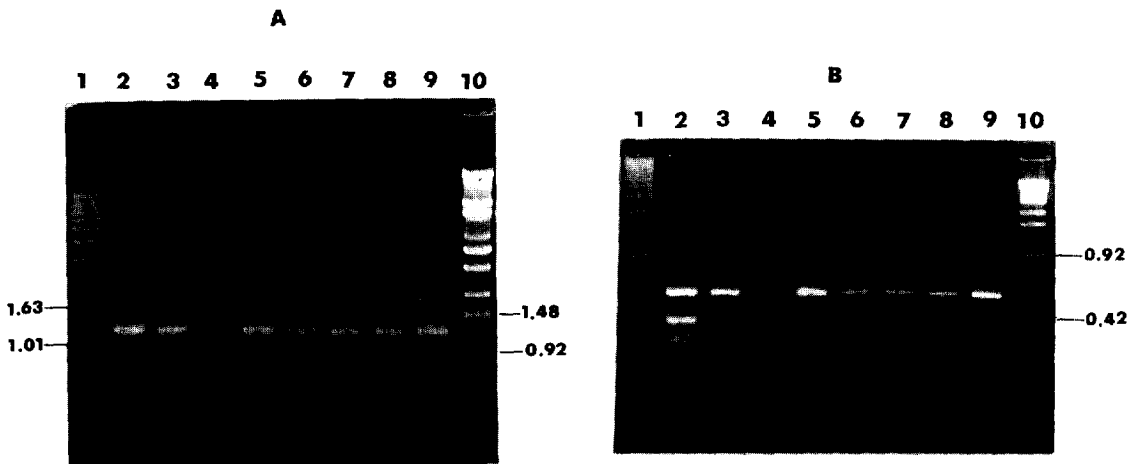


Fig 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products of single-stranded cDNA made from RNA extracted several TGEV strains by the TGEV 2/3 primer pairs(A) and RFLP patterns of the PCR products digested with *MnlI*(B). Lane 1 = molecular-weight marker 1kb ladder (GIBCOBRL); lane 10 = molecular-weight marker made from bacteriophage lambda DNA digested with *StyI*; lane 2 = M6; lane 3 = P115; lane 4 = MSV; lane 5 = STC3; lane 6 = P44; lane 7 = VRI-WP; lane 8 = VRI-41; lane 9 = VRI-48. Numbers at left and right are molecular-weight markers in kilobase pairs.

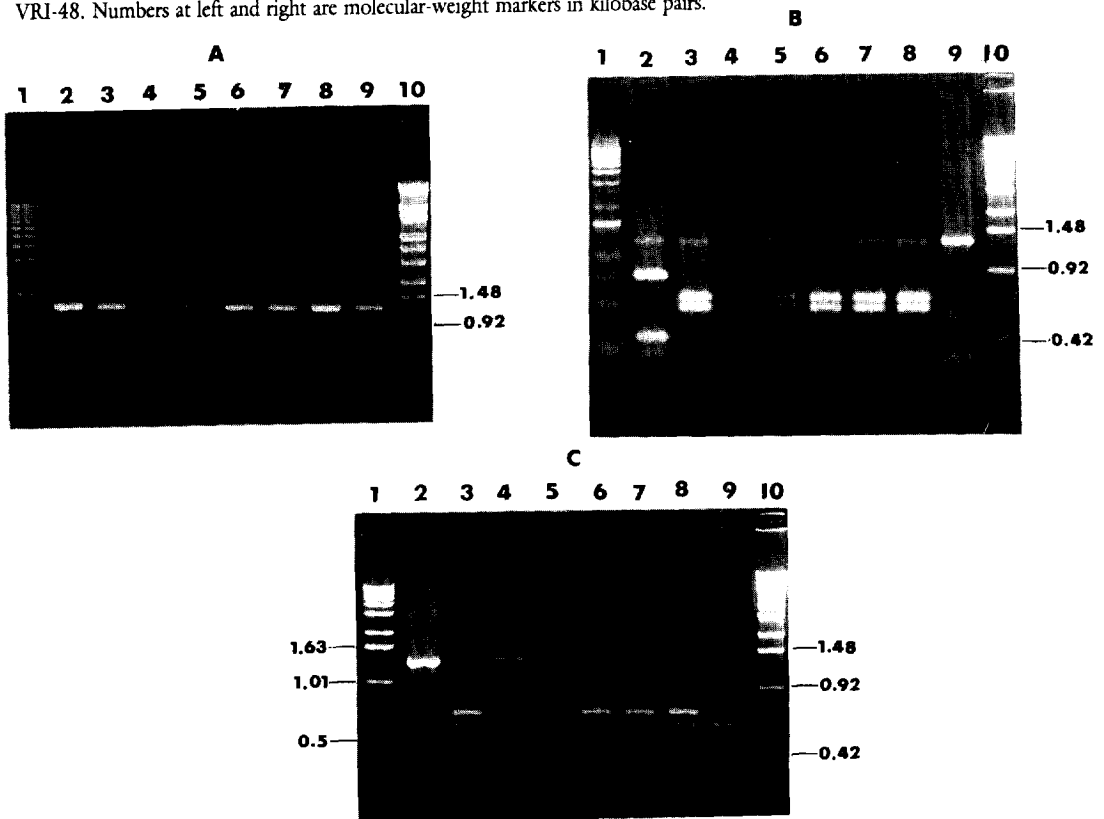


Fig 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products of single-stranded cDNA made from RNA extracted several TGEV strains by the TGEV 4/6 primer pairs(A) and RFLP patterns of the PCR products digested with *Sau3AI*(B) and *SspI*(C). Lane 1 = molecular-weight marker 1kb ladder; lane 10 = molecular-weight marker made from bacteriophage lambda DNA digested with *StyI*; lane 2 = M6; lane 3 = P115; lane 4 = MSV; lane 5 = STC3; lane 6 = P44; lane 7 = VRI-WP; lane 8 = VRI-41; lane 9 = VRI-48. Numbers at left and right are molecular-weight markers in kilobase pairs.

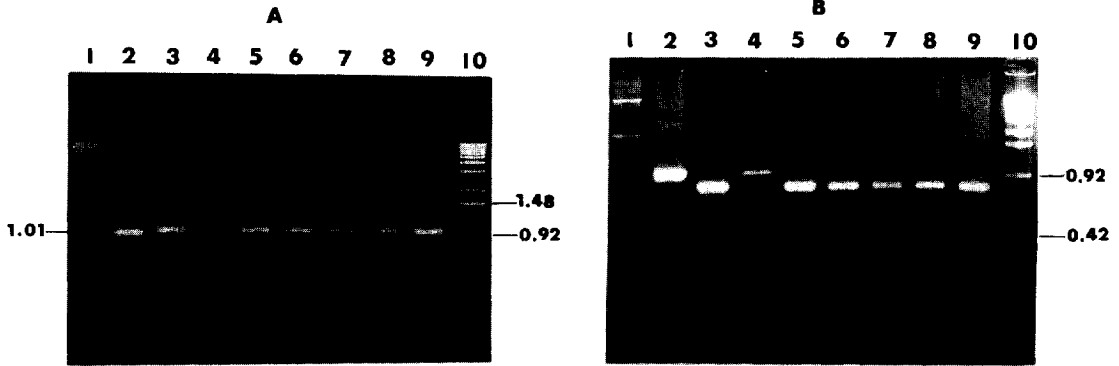


Fig 4. Agarose gel electrophoresis of PCR products of single-stranded cDNA made from RNA extracted several TGEV strains by the TGEV 7/8 primer pairs(A) and RFLP patterns of the PCR products digested with *AccI*(B). Lane 1 = molecular-weight marker 1kb ladder; lane 10 = molecular-weight marker made from bacteriophage lambda DNA digested with *StyI*; lane 2 = M6; lane 3 = P115; lane 4 = MSV; lane 5 = STC3; lane 6 = P44; lane 7 = VRI-WP; lane 8 = VRI-41; lane 9 = VRI-48. Numbers at left and right are molecular-weight markers in kilobase pairs.

## 고 찰

PCR과 RFLP분석법을 이용한 genome mapping을 이용하여 TGEV의 S glycoprotein gene과 nonstructural protein gene의 유전적 다양성을 분석하였다. 이 연구는 TGEV strain 사이에 다양한 유전적 상관관계가 있음을 보여주었다. 이러한 genome mapping은 TGEV의 특성을 규명하기 위한 빠르고 신뢰할 수 있는 방법으로 여겨졌다.

특정염기서열에 특이적으로 결합할 수 있는 primer를 이용한 PCR법은 PCR생성물의 크기에 의해 증폭된 DNA내에 존재하는 insertion과 deletion을 효과적으로 검출할 수 있다<sup>25</sup>. 이 실험에서 여러 TGEV strain의 S glycoprotein gene의 N-terminal region은 거의 동일한 크기의 PCR product를 나타내었다. 이것은 이 실험에 사용한 TGEV strain의 증폭된 지역에는 1% agarose gel에서 검출할 수 있을 정도의 deletion 또는 insertion이 없음을 나타냈다. 표준주로 사용한 Miller와 P115 strain의 염기서열 분석에 의하면 Miller strain은 S glycoprotein gene과 nonstructural protein gene의 ORF 3-1사이에 두 곳의 커다란 deletion이 있어 P115에 존재하는 45 nucleotides가 결여되어 있다<sup>23,24</sup>. 그러므로 Miller와 P115 strain은 PCR product의 크기에 의해 쉽게 구별할 수 있다. 이와같은 기준으로 이 실험에 사용한

TGEV 아의분리주와 백신주들을 분류하였을 때 모두 Purdue type으로 나타났다.

PCR과 함께 RFLP분석법을 이용하여 TGEV strain을 여러 type으로 분류할 수 있었다. TGEV 2/3 primer pair로 증폭된 region은 TGEV strain 간에 염기서열이 잘 보존되어온 것으로 보였다. 그러나 TGEV 7/8 primer pair에 의한 PCR product를 기준으로 했을 때 Purdue type으로 분류되었던 MSV는 *MnlI*에 의하여 Miller type으로 분류되었다. TGEV 4/6 primer pair를 이용하여 생성된 PCR product의 분석은 TGEV strain간에 유전적 다양성이 있음을 보여주었다. 이 지역은 antigenic site A와 D를 포함하고 있다<sup>16</sup>. A site에 존재하는 중화 epitope는 TGEV strain에서 잘 보존되어 온 것으로 알려져 있지만<sup>26</sup> 제한효소 *Sau3AI*과 *SspI*을 이용하였을 때 TGEV strain을 세 type으로 분류할 수 있었다. *Sau3AI*과 *SspI*에 의하여 MSV는 Miller type으로 분류되었고 아의분리주인 VRI-48을 제외한 나머지 TGEV는 Purdue type으로 분류되었다. VRI-48은 독립된 type을 형성하였는데 *Sau3AI*에 의한 recognition site를 가지고 있지 않았고 *SspI*에 의한 recognition site는 Purdue type에 속하는 다른 TGEV strain보다 많았다. 앞으로 좀더 다양한 종류의 제한효소를 사용한 RFLP분석이나 염기서열의 분석이 이루어지면 이 바이러스의 유래나 다른 strain과의 상관관계 등을 알 수 있을 것으로 사료된다. 또

한 면역원성시험은 TGEV의 항원적 다양성에 관한 정보를 제공할 것으로 보인다. TGEV strain의 항원적 변이에 관계하는 epitope는 주요 neutralization domain외에 존재하였고 이들은 중화능력이 없는 항체를 유도하였다<sup>17,27</sup>. 그러므로 *Sau3AI*과 *SspI*의 recognition site는 중화 epitope를 형성하는데 중요하지 않거나 중화epitope를 형성하는 염기외에 위치하는 것으로 보였다. 그러나 이러한 결과들은 TGEV strain도 다양한 혈청형을 나타내는 같은 coronavirus인 avian infectious bronchitis virus 정도의 변화는 아니지만 지속적으로 RNA genome의 nucleotide에 변화가 일어나고 있는 것으로 여겨졌다<sup>21</sup>. TGEV 7/8 primer pair로 증폭된 PCR product의 RFLP 분석에 의하면 이 실험에 사용한 TGEV strain의 nonstructural protein region은 잘 보존되어 온 것으로 보였다. 백신주인 MSV는 PCR product의 size에 의해서 Purdue type으로 분류되었지만 제한효소 *AccI*에 의해서 Miller type으로 분류되었다. 그러나 MSV RFLP 분석에서 Purdue type에서 볼수 있는 회미한 band가 관찰되었다. 이것은 실험에 사용한 MSV내에 *AccI*의 recognition site를 갖는 virus가 소수 존재하고 있는 것이 하나의 이유가 될 수 있을 것이다.

본 실험결과 PCR과 RFLP법을 이용한 genome mapping에 의하여 TGEV에 다양한 유전적 변이가 일어나고 있음이 밝혀졌다. 앞으로 이 방법을 이용하여 좀더 많은 수의 TGEV 국내분리주를 분석한다면 항원변이와 유전적인 배경을 좀더 자세히 밝힐수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

TGEV 국내분리주와 백신주의 S glycoprotein gene과 nonstructural protein gene의 유전적 다양성을 PCR과 RFLP법을 이용하여 분석하였다. 실험에 공시한 TGEV 국내분리주와 백신주는 세종류의 primer pair로 모두 증폭되었다. 증폭된 PCR product를 제한효소로 처리했을 때 TGEV strain은 기본적으로 Miller(Miller와 MSV)와 Purdue type(P115, STC3, P44, VRI-WP, VRI-41, 그리고 VRI-48)으로 분류할 수 있었으나, TGEV 6/4 primer pair로 증폭한 PCR product를 *Sau3AI*과 *SspI*으로 처리하였을 때 국내분리주인 VRI-48은 독립된 type을 형성하였다. 이것은 국내에서 분리되는 TGEV strain에 다양한 유전적변이가 일어나고 있음을 보여주었다. 이 실험에서 사용한 TGEV strain의 nonstructural protein gene은 잘 보존

되어 온 것으로 나타났다.

## 참 고 문 헌

1. Saif LJ, Wesley RD. Transmissible gastroenteritis. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, ed. *Diseases of swine*. Ames: Iowa State University Press, 362-386, 1982.
2. Siddle SG, Anderson R, Cavanagh R, et al. Coronaviridae. *Intervirology*, 20:181-189, 1983.
3. Spaan, W, Cavanagh D, Horzinek MC. Coronaviruses: structure and genome expression. *J Gen Virol*, 69:2939-2952, 1988.
4. Jacobs L, van der Zeijst BAM, Horzinek MC. Characterization and translation of transmissible gastroenteritis virus mRNAs. *J Virol*, 57:1010-1015, 1986.
5. Sethna PB, Hung S-L, Brian DA. Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 5626-5630, 1989.
6. Wesley, RD, Cheung AK, Michael RD, et al. Nucleotide sequence of coronavirus TGEV genomic RNA: evidence for 3 mRNA species between the peplomer and matrix protein genes. *Virus Res*, 13: 87-100, 1989.
7. Garwes DJ, Pocock DH. The polypeptide structure of transmissible gastroenteritis virus. *J Gen Virol*, 29: 25-34, 1975.
8. Garwes DJ, Lauca MH, Higgins DA, et al. Antigenicity of structural components from porcine transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol*, 3: 179-190, 1978/1978.
9. Godet M, L'haridon R, Vautherot JF, et al. TGEV coronavirus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology*. 1992;188: 666-675.
10. Wesley RD, Woods RD, Cheung AK. Genetic basis for the pathogenesis of transmissible gastroenteritis virus. *J Virol*, 64:4761-4766, 1990.
11. Paul PS, Zhu XL, Vaughn EM. Current strategies

- for the development of efficacious vaccines for transmissible gastroenteritis in swine. *Proc U.S. Anim Hlth Assoc*, 92:429-443, 1988.
12. Bohl EH. Transmissible gastroenteritis virus (classical enteric variant). In: Pensaert MB, ed. *Virus infections of porcine*. New York: Elsevier Science Publishing Company Inc., 139-153, 1989.
  13. Laude H, Gelfi JD, Aynaud JM. *In vitro* properties of low-and high-passaged strains of transmissible gastroenteritis coronavirus of swine. *Am J Vet Res*, 42:447-449, 1981.
  14. Hohdatsu T, Eiguchi Y, Tsuchimoto M, et al. Antigenic variation of porcine transmissible gastroenteritis virus detected by monoclonal antibodies. *Vet Microbiol*, 14:115-124, 1987;
  15. Register KB, Wesley RD. Molecular characterization of attenuated vaccine strains of transmissible gastroenteritis virus. *J Vet Diagn Invest*, 6:16-22, 1994
  16. Sanchez CM, Gebauer F, Sune C, et al. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology*, 190:92-105, 1992.
  17. Simkins RA, Weilnau PA, Bias J, et al. Antigenic variation among transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus strains detected with monoclonal antibodies to the S protein of TGEV. *Am J Vet Res*, 53:1253-1258, 1992.
  18. Vaughn EM, Paul PS. Antigenic and biological diversity among transmissible gastroenteritis virus isolates of swine. *Vet Microbiol*, 36:333-347, 1993.
  19. Wesley RD, Woods RD, Cheung AK. Genetic basis for the pathogenesis of transmissible gastroenteritis virus. *J Virol*, 64:4761-4766, 1990.
  20. Woods RD. Small plaque variant transmissible gastroenteritis virus. *J Am Vet Med Assoc*, 173:643-647, 1978.
  21. Kwon HM, Jackwood MW, Gelb J Jr. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis*, 37:194-202, 1993.
  22. Rasschaert D, Laude H. The predicted primary structure of the peplomer protein E2 of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Gen Virol*, 68:1883-1890, 1987.
  23. Wesley RD. Nucleotide sequence of the E2-peplomer protein gene and partial nucleotide sequence of the upstream polymerase gene of transmissible gastroenteritis virus (Miller strain). In: Cavanagh D, Brown TDK, ed. *Coronaviruses and Their Diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York:Plenum, 301-306, 1990.
  24. Rasschaert D, Gelfi J, Laude H. Enteric coronavirus TGEV: partial sequence of the genomic RNA its organization and expression. *Biochimie*, 69:591-600, 1987.
  25. Britton P, Kottier S, Chen C-M, et al. The use of PCR genome mapping for the characterisation of TGEV strains. In: Laude H, Vautherot JF, ed. *Coronaviruses*. New York: Plenum Press, 29-34, 1994.
  26. Delmas B, Gelfi J, Laude H. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II Domains in the peplomer glycoprotein. *J Gen Virol*, 67:1405-1418, 1986.
  27. Laude H, Chapsal JM, Labiau J. et al. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. I. Properties of monoclonal antibodies directed against virion proteins. *J Gen Virol*, 67:119-130, 1986.