

국내분리 돼지 전염성 위장염 바이러스의 antigenic site A와 D를 포함하는 spike gene의 염기서열 분석

권혁무 · 피재호 · 성환우*

강원대학교 수의학과
수의과학연구소*
(1998년 2월 18일 접수)

Sequence of the spike gene containing antigenic sites A and D of transmissible gastroenteritis virus isolated in Korea

Hyuk-moo Kwon, Jae-ho Pi, Hwan-woo Seong*

*Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University
National Veterinary Research Institute**

(Received Feb 18, 1998)

Abstract : The nucleotide sequences of spike (S) glycoprotein containing antigenic sites A and D of TGEV isolated in Korea were determined and compared with published sequences for TGEVs. The TGEV 133 and DAE5 strains had 97.40% nucleotide sequence similarity. The overall nucleotide sequence similarity of the 133 and DAE5 strains compared with other TGEV strains was between 96.86% and 99.15%. The similarity of the predicted amino acid sequence of the 133 and DAE5 strains was 94.93%. The TGEV 133 and DAE5 strains had 94.93-98.61% amino acid similarity with published sequences of other TGEV strains. The sequences of amino acid codons in the antigenic sites A and D were identical among all the viruses although there were several nucleotide changes in region containing antigenic sites A and D of Korean TGEV isolates. By phylogenetic analysis of the sequences, two Korean isolates 133 and DAE5 seemed to be derived from different lineages. These studies showed that a distinct difference in genome exists among TGEV field strains isolated in Korea.

Key words : TGEV, coronavirus, spike glycoprotein gene, sequencing.

본 연구는 한국과학재단 핵심전문 연구비(961-0606-053-1)지원으로 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Hyuk-moo Kwon, Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea.

서 론

돼지 전염성 위장염 바이러스(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)는 envelope를 가지며 단일 strand의 RNA genome으로 구성된 coronavirus로²⁵, 돼지에서 구토, 심한 설사 그리고 2주령 미만의 신생자돈에서 높은 폐사율을 특징으로 하는 돼지 전염성 위장염(TGE)의 원인체이다²⁰.

TGEV는 세가지 구조 단백질인 spike protein (S), nucleoprotein, membrane protein을 가지고 있다²⁵. S protein은 바이러스의 peplomer를 형성하며 바이러스의 strain에 따라 1, 447 또는 1,449개의 아미노산으로 구성되어 있다^{2,15,18,28}. S protein은 중화항체를 유도하여 방어와 관련있고, receptor 결합부위를 포함하며 바이러스의 조직친화성을 결정한다^{4,9,11,14,16,26}. TGEV의 S protein은 4개의 주요 antigenic site (A, B, C, D)를 가지고 있다. 이 중에서 site A와 D는 중화항체를 유도하는 주요 부위로 알려져 있다^{6,12}. 현재 우리나라에서는 백신을 하고 있지만 TGEV에 의한 피해는 계속 증가하고 있다. 바이러스 중화시험에 의하면 TGEV는 오직 한 종류의 혈청형만이 존재하는 것으로 알려져 있지만 단클론항체나 다양한 분자생물학적 방법을 이용한 분석결과에 의하면 항원성, genome 그리고 병원성에 있어서 다양성을 나타내고 있다^{3,13,19,20,22,24}.²⁷ 그러므로 성공적인 TGEV 백신을 위해서는 이러한 차이점들을 인식하는 것이 무엇보다도 중요하다.

본 실험실에서는 한국에서 분리된 TGEV의 RNA를 분리하여 reverse transcriptase reaction (RT)과 polymerase chain reaction (PCR)으로 증폭시킨 다음 특징적인 restriction fragment length polymorphism (RFLP) pattern을 보이는 분리주들을 확인하여 왔다^{31,32}. 이 연구에서는 RFLP 분석에서 외국분리주와는 다른 것으로 나타난 TGEV (133, DAЕ5)의 antigenic site A와 D를 포함하는 S gene의 염기서열을 결정하여 그 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

바이러스의 배양 : 바이러스 배양을 위하여 swine testicular(ST) cell을 수의과학연구소에서 분양받아 Dulbecco's modified Eagle medium(GIBCO/BRL)에 sodium bicarbonate (Sigma), fetal bovine serum(GIBCO/BRL)과 항생제를 첨가하여 5% CO₂ 상태에서 세포를 증식시켰다. 야외분리주

인 TGEV 133과 DAЕ5를 ST cell에 접종하여 1시간동안 흡착시킨 후 2% fetal bovine serum이 함유된 배지를 첨가한 후 5% CO₂ 상태에서 배양하며 세포의 변화유무를 매일 관찰하였다. 세포변성(cytopathic effect)이 70~90% 보일 때 -70℃ 냉동고에 보관한 후 얼렸다 녹이는 과정을 3회 반복 실시한 다음 원심분리 후, 상층액을 바이러스 재료로 하여 ST cell에서 2회 plaque purification후 증식시켜 실험에 사용하였다. 증식된 바이러스는 간접형광항체법과 TGEV 특이 primer를 이용한 RT-PCR로 TGEV임을 확인하였다³¹.

Viral RNA의 추출과 정제 : 세포배양 상층액에 2% sodium dodecyl sulfate와 proteinase K(250µg/ml)를 첨가하고 55℃ 항온수조에서 5분간 유지시킨 다음 acid phenol(pH 4.0)과 chloroform : isoamyl alcohol(49 : 1)로 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 RNaid kit (Bio101)를 이용하여 정제하였으며, RNA는 diethyl-pyrocabonate(DEPC)로 처리한 멸균증류수에 부유시켜 -70℃ 냉동고에 보관하면서 cDNA 합성에 이용하였다.

Oligonucleotide primers : Antigenic site A와 D를 포함하는 S protein gene을 증폭시키기 위하여 이미 발표된 TGEV 염기서열을 참고로 하여 sense primer (5'GTGCC-ACAGTGTITTCATTG3')와 antisense primer (5'GCAGTG-CCACGAGTCTATC3')를 합성하여 사용하였다^{18,28}.

Reverse transcriptase 반응과 polymerase chain reaction : cDNA 합성을 위하여 준비된 TGEV RNA에 5µl 10× PCR buffer(500mM KCl, 100mM Tris-HCl<pH 9.0>, 1% Triton X-100), 1µl 10mM dNTPs, 250ng antisense primer, 40 units RNasin(Promega), 5µl 25mM MgCl₂를 더한 다음 최종 49µl가 되게 DEPC 처리된 멸균증류수를 더한 후, DNA thermal cycler (Perkins Elmer Cetus)를 이용하여 65℃에서 10분간 반응시켰다. 반응액에 200 units의 Molony murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBCO/BRL)를 더한 다음 51℃에서 60분, 95℃에서 5분간 반응시킨후 -70℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

PCR을 위하여 cDNA 10µl에 10µl 10× PCR buffer, 1µl 10mM dNTPs, 250ng sense와 antisense primers, 10µl 25mM MgCl₂와 2.5 units Taq DNA polymerase(Promega)를 더한 후 최종반응액이 100µl가 되게 멸균증류수를 첨가하였다. PCR 전반응으로 94℃에서 5분, 51℃에서 2분, 74℃에서 6분간 반응시켰으며, PCR 본 반응은 94℃에서 1분의 denaturation, 51℃에서 1.5분의 annealing, 74℃에서 1.5분

의 extension을 35회 실시하였고, 마지막으로 94℃에서 1분, 51℃에서 2분, 74℃에서 10분간 반응시켰다. 증폭된 PCR product는 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에서 전기영동한 후 UV-transilluminator에서 확인하였다.

Cloning과 염기서열의 분석 : PCR로 증폭된 cDNA를 Original TA cloning® kit(Invitrogen)를 사용하여 cloning하였다. Recombinant plasmid로 competent cell (*E. coli* INVα F' cell)을 transformation 시킨 후 kanamycin과 X-gal이 첨가된 LB agar에서 무색투명한 집락을 선발하였다. Mini-prep 방법으로 분리한 plasmid DNA를 Eco RI으로 처리하여 PCR product의 삽입여부를 확인하였다. Mini-prep에서 insertion을 확인한 후 염기서열 분석을 위한 다량의 plasmid DNA를 얻기 위하여 maxi-prep을 실시하였다²¹.

DNA 염기서열은 Dye terminator cycle sequencing® kit (Perkin Elmer)를 사용하여 automatic DNA sequencer(ABI PRISM 373, Perkin Elmer)로 결정하였다. PCR product의 internal sequence를 결정하기 위하여 추가로 primer를 합성하여 사용하였다. 얻어진 TGEV 국내분리주 133과 DAE5의 염기서열과 기존의 발표된 TGEV의 염기서열을 DNASIS version 2.1 software (Hitachi software engineering Co. Ltd., Japan)를 이용하여 분석하였고, phylogenetic tree를 작성하였다^{3,18,22,28}.

결 과

국내에서 분리한 TGEV 133과 DAE5의 S protein gene 중에서 antigenic site A와 D를 포함하는 부위의 염기와 아미노산 서열을 결정하였다(Fig 1, 2). 염기서열을 분석한 결과 133은 이 부위가 1,306 base인 반면 DAE5는 1,300 base로 구성되었다. DAE5는 60-65 위치에 6 base가 deletion 되어 있었다(Fig 1). 두 분리주는 6 base 차이가 있었지만 PCR product를 1% agarose gel에 전기영동하였을 때 구별이 불가능하였다. TGEV의 antigenic site D를 결정하는 base인 GGT(96-98)와 site A를 결정하는 AAG(555-557), GGT(570-572), GAC(699-701), CGA(714-716)는 국내분리주인 133, DAE5와 외국분리주 모두 동일하였다. 아미노산 서열분석에서 국내분리주인 DAE5는 6 base의 결여로 두 개의 아미노산이 133보다 적었다(Fig 2).

국내분리주인 133과 DAE5는 염기와 아미노산 서열 비교에서 각각 97.40%, 94.93%의 상동성을 나타내었다. 염

기서열의 비교에서 133과 DAE5 야외분리주는 외국분리주와 각각 97.86~98.62%, 96.86~99.15%의 상동성을 나타내었고, 아미노산 서열비교에서는 각각 95.62~96.54%, 94.93~98.61%의 상동성을 나타내었다(Fig 1, 2)^{18,22,28}.

염기와 아미노산 서열을 바탕으로 하여 DNASIS program을 사용하여 phylogenetic tree 구조를 작성한 후 외국 TGEV와 비교하였을 때 DAE5 분리주는 Purdue strain과 유사한 것으로 나타났으며, 133 국내분리주는 염기서열을 기초로 한 phylogenetic tree 구조 비교에서 Miller strain, BRI70-FS strain과 유사한 것으로 나타났으나 아미노산을 기초로 한 phylogenetic tree 구조분석에서는 외국의 TGEV와 구별되어 국내 특유의 TGEV로 추정되었다(Fig 3, 4)^{18,22,28}.

고 찰

RFLP pattern 분석에서 나타난 유전적 다양성을 확인하기 위하여 antigenic site A와 D를 포함하는 spike gene을 증폭시키는 primer pairs를 사용하여 증폭한 TGEV 133과 DAE5 야외분리주의 cDNA를 cloning하여 염기서열을 결정하였다. 얻어진 염기서열과 아미노산 서열을 이미 발표된 외국의 TGEV strain과 비교하였다^{2,18,22,28}.

국내 야외분리주 DAE5는 6 base의 염기와 2개의 아미노산이 deletion 되어 있는 반면, 133 야외분리주는 이 부위에 deletion이 없었다. Wesley²⁸는 Purdue strain은 S glycoprotein gene의 N-terminal half region인 2053~2058 부위에 6 base의 염기가 deletion 되어 Miller strain과 2개의 아미노산 차이가 발생한다고 보고하였다. 한국분리주인 133과 DAE5는 모두 TGE 증상을 보이는 자돈에서 분리된 것으로 6 base의 deletion 여부가 직접 병원성과 관련되지는 않는 것으로 보인다. 그러나 이 부위는 잠재적인 N-glycosylation site로 두 분리주 사이에 glycosylation의 차이를 나타낼 것으로 보인다.

단클론항체에 의한 연구에 의하면 S glycoprotein은 4개의 antigenic site(A, B, C, D)로 구성되어 있으며, antigenic site A와 D는 중화항체의 주요 유도인자로 알려져 있다. 특히 antigenic site A는 3개의 antigenic subsite(Aa, Ab, Ac)로 구별되고, 그 중 subsite Ac는 TGEV간에 높게 보존되어 있으며 면역과 진단에 관련되어 있다^{1,5-8,12}. 본 실험의 염기서열 분석에서도 국내 야외 분리주인 133과 DAE5의 antigenic site A와 D가 잘 보존되어 있었다. 그러

```

                                                    *
                                                    Site D
                                                    100
133  GTGCCACAGTGTTCATTGAACACAACGGGTGGTGTCACTCCCTGAAATCTCATGTTATAATGATACAGTGAGTGACTCGAGCTTTTCAGTTACGGTGA
DAE                                     T       T       -----
MIL                                     T
PUR115                                 T       T       -----
PUR46                                  T       T       -----
BRI70                                  T
NEB72                                  T       T       -----
TOY56                                  T       G       T

                                                    *
                                                    *
                                                    *
                                                    200
133  AATCCGTTTCGGCGTAACTGATGGACCACGGTACTGTCACGTACTCTACAATGGCACAGCTCTTAAGTATATAGGAATATTACCACCTAGTGTCAAGGAG
DAE                                     T       A       T       T       C
MIL      G                             T       T       C       C
PUR115                                 T       A       T       T       C
PUR46                                  T       A       T       T       C
NBRI70                                 T       T       C       C
EB72                                   T       A       T       T       C
TOY56                                  TT      T       T       C       C

                                                    *
                                                    *
                                                    *
                                                    300
133  ATTGCTATTAGTAAGTGGGCCATTTTATATTAATGGTTACAATTTCTTTAGCACACTTCCTATTGATTGTATATCTTTTAATTGACCACCTGGTGATA
DAE                                     T
MIL                                     T
PUR115                                 T
PUR46                                  T
BRI70                                  T
NEB72                                  T
Toy56                                  T

                                                    *
                                                    *
                                                    *
                                                    400
133  GTGACGTTTTCTGGACAATAGCTTACACATCGTACACTGAAGCATTAGTACAAGTTGAAAACACAGCTATTACAAAAGGTGACGTATAGTAATAGTTACGT
DAE                                     T       C
MIL                                     T
PUR115                                 T       C
PUR46                                  T       C
BRI70                                  T
NEB72                                  T       C
TOY56                                  T

                                                    *
                                                    *
                                                    *
                                                    500
133  TAATAACATTAATGCTCTCAACTTACTGCTAATTTGAATAATGGATTTTATCCTGTTTCTTCAAGTGAAGTTGGTCTTGTCAAATAAGAGTGTGTGTGA
DAE                                     A
MIL
PUR115                                 A
PUR46                                  A
BRI70                                     T
NEB72                                 A
TOY56                                 A

                                                    SiteA
                                                    SiteA
                                                    *
                                                    600
133  CTACCTAGCTTTTACACACATACCATTGTTAACATAACTATTGGTCTTGGTATGAAGCGTAGTGGTTATGGTCAACCCATAGCCTCAACATTAAGTAACA
DAE                                     G
MIL
PUR115
PUR46
BRI70      C
NEB72      G  C
TOY56                                     A

                                                    *
                                                    *
                                                    *
                                                    700
                                                    SiteA
133  TCACACTACCAATGCAGGATAACAAAACCGATGTGTACTGTATTCTGTTCTGACCAATTTTCAGTTTATGTTCAITTCCTACTTGCAAAAGTGCTTTATGGGA
DAE      TC      C       C
MIL      T      C       C
PUR115      C       C
PUR46      C       C
BRI70      T      C  T
NEB72      C       C
TOY56      T      C  G  C

                                                    SiteA
                                                    *
                                                    *
                                                    *
                                                    800
133  CAATATTTTTAAGCGAAACTGCACGGACGTTTTACATGCCACAGCTGTTATAAAAACTGGTACTTGTCTCTCAITTTGATAAATTGAACAAATTACTTA
DAE                                     C       G
MIL      G       G
PUR115      G
PUR46      G
BRI70      G
NEB72      G
TOY56      G

```

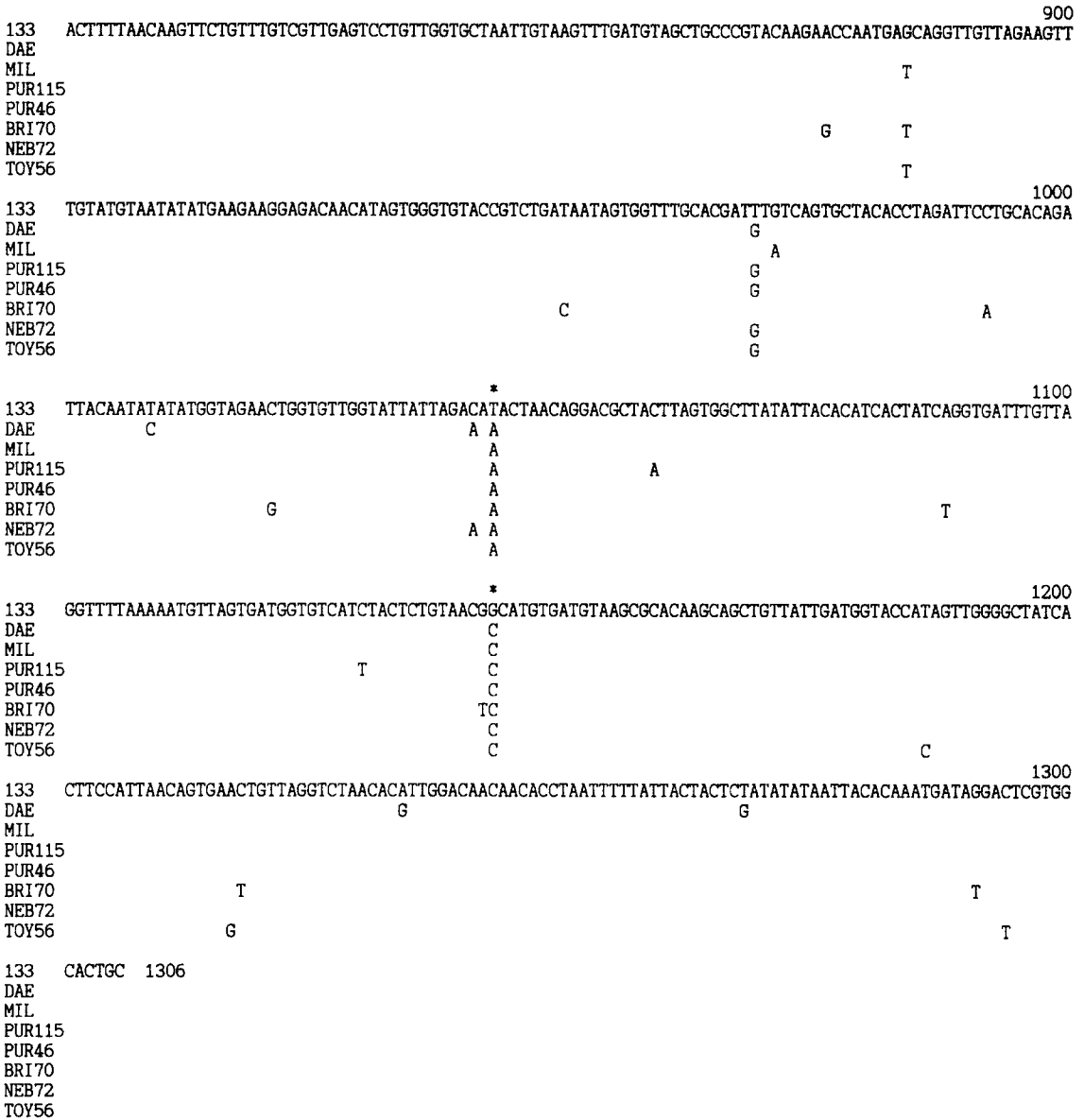


Fig 1. Sequence comparison of TGEV Korea field isolates 133 and DAES(DAE) strains with virulent Miller(MIL), PUR115, PUR46-MAD(PUR46), BRI70-FS(BRI70), and NEB72, TOY56 strains^{3,18,22,28}. Antigenic sites A and D were based on data by Correa *et al*⁶. The shadowed nucleotide sequences are shown antigenic sites A and D of TGEV strain and the asterisks are shown unique nucleotide sequence for TGEV Korea field isolate 133 strain.

므로 이 부위는 TGEV 증식이나 생물학적 특성을 나타내는데 매우 중요한 것으로 추측된다²³.

133 야의 분리주는 T→C(43, 138, 149, 258), C→T(177), T→A (387), C→A(626), G→C(735), A→T(1043), C→G

(1143)로 substitution 되는 point mutation이 발생되어 10개 부위가 기존의 외국 TGEV와는 다른 염기서열을 나타내었다^{2,18,22,28}. 이러한 결과는 Enjuanes *et al*¹⁰이 TGEV의 진화가 recombination과 point mutation과 연관이 있다고

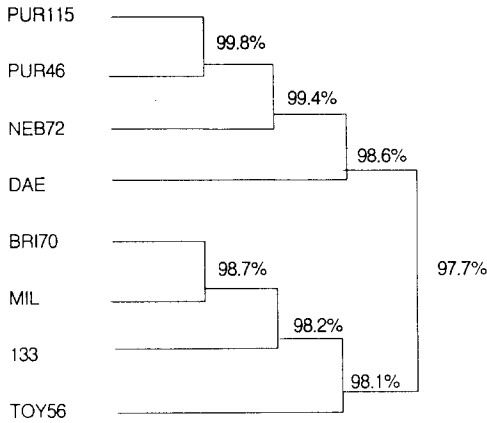


Fig 3. Phylogenetic tree based on the nucleotide sequence of spike protein gene containing antigenic sites A and D for 133 and DAE5 strains of TGEV, compared with published sequenced for other strains of TGEV^{3,18,22,28}.

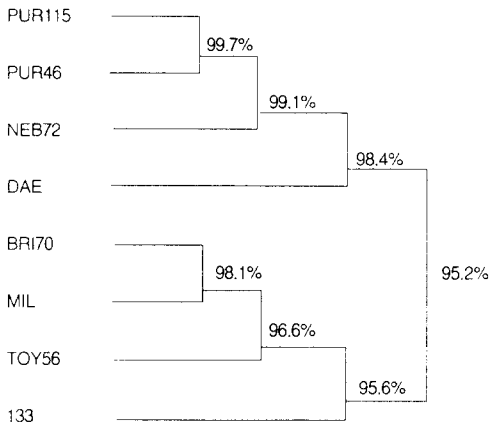


Fig 4. Phylogenetic tree based on the amino acid sequence of spike protein containing antigenic sites A and D for 133 and DAE5 strains of TGEV, compared with published sequences for other strains of TGEV^{3,18,22,28}.

DAE5는 Purdue계열로 133과는 다른 것으로 나타나 이 두 바이러스는 서로 다른 계통으로부터 유래한 것으로 보여, 국내에는 다양한 유전적 특성을 갖는 TGEV가 존재하는 것으로 보인다²². 앞으로 보다 많은 수의 국내 TGEV 분리주의 염기서열을 분석하면 좀더 자세한 이 바이러스의 유래와 특성을 파악할 수 있을 것으로 사료된다.

결론

TGEV 한국분리주인 133과 DAE5의 antigenic site A와 D를 포함하는 S gene을 RT-PCR로 증폭시키고, cDNA를 cloning 후 염기서열을 결정하였다. 염기와 아미노산 서열비교에서 133은 외국분리주와 각각 97.86~98.62%, 95.62~96.54%의 상동성을 나타내었고, DAE5는 96.86~99.15%, 94.93~98.61%의 상동성을 나타내었다. DAE5는 133에 있는 6 base의 결여로 두 개의 아미노산이 적었다. Antigenic site A와 D를 결정하는 모든 염기서열은 한국 분리주인 133, DAE5와 외국분리주 모두 동일하였다. 염기와 아미노산 서열을 바탕으로 phylogenetic tree를 작성하였을 때 133과 DAE5는 서로 다른 계열로 분류되었으며, 모두 외국분리주와는 다른 독립적인 양상을 나타내었다.

참고문헌

1. Bernard S, Laude H. Site-specific alteration of transmissible gastroenteritis virus spike protein results in markedly reduced pathogenicity. *J Gen Virol*, 76:2235-2241, 1995.
2. Britton P, Page KW. Sequence of the S-gene from a virulent British field isolate of transmissible gastroenteritis virus. *Virus Res*, 18:71-80, 1990.
3. Britton P, Kottier S, Chen CM, et al. The use of PCR genome mapping for the characterisation of TGEV strains. In "Coronaviruses" (H. Laude, and J.F. Vautherot eds.). Plenum Press, New York, 1994.
4. Collins AR, Knobler RL, Powell H, et al. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology*, 119:358-371, 1982.
5. Correa I, Gebauer F, Bullido MJ, et al. Localization of antigenic sites of the E2 glycoprotein of transmissible coronavirus. *J Gen Virol*, 71:271-279, 1990.
6. Correa I, Jimenez, G, Sune C, et al. Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Res*, 10:77-94, 1988.
7. De Diego M, Laviada MD, Enjuannes L, et al. Ep-

- itope specificity of protective lactogenic immunity against swine transmissible gastroenteritis virus. *J Virol*, 66:6502-6508, 1992.
8. Delmas B, Rasschaert D, Godet M. Four antigenic sites of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus are located on the amino-terminal half of spike glycoprotein S. *J Gen Virol*, 71:1313-1323, 1990.
 9. 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.
 10. Enjuanes L, Sune C, Gebauer F, *et al.* Antigen selection and presentation to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus. *Vet Micro*. 33:249-262, 1992.
 11. Garwes DJ, Lauca MH, Higging DA, *et al.* Antigenicity of structural components from porcine transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol*, 3:179-190, 1978/1979.
 12. Gebauer F, Posthumus, WPA, Correa I, *et al.* Residues involved in the antigenic sites of transmissible gastroenteritis coronavirus S glycoprotein. *Virology*, 183:225-238, 1991.
 13. 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.
 14. Holmes KV, Doller EW, Behnke, JN. Analysis of the functions of coronavirus glycoproteins by differential inhibition of synthesis with tunicamycin. *Adv Exp Med Biol*, 142:133-142, 1981.
 15. Jacobs L, De Groot R, van der Zeijst BAM, *et al.* The nucleotide sequence of the peplomer gene of porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV): Comparison with the sequence of the peplomer protein of feline infectious peritonitis (FIPV). *Virus Res*, 8:363-371, 1987.
 16. Jimenez G, Correa I, Melgosa MP, *et al.* Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J Virol*, 60:131-139, 1986.
 17. Kemeny LJ. Antibody response in pigs inoculated with transmissible gastroenteritis virus and cross reaction among ten isolates. *Can J Comp Med*, 40:209-214, 1976.
 18. Rasschaert D, Laude H. The predicated primary structure of the peplomer protein E2 of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Gen Virol*, 68:1883-1890, 1987.
 19. Register KB, Wesley RD. Molecular characterization of attenuated vaccine strains of transmissible gastroenteritis virus. *J Vet Diagn Invest*, 6:16-22., 1994.
 20. Saif LJ, Wesley, RD. Transmissible gastroenteritis. In "Diseases of swine" (AD Leman, BE Straw, WL Mengeling eds.), pp.362-386. Iowa State University Press, Ames, IA., 1992.
 21. Sambrook, J Fritsch EF, Maniatis T. "*Molecular cloning: A Laboratory Manual*". 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 1989.
 22. Sanchez CM, Gebauer F, Sune C, *et al.* Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology*, 190:92-105, 1992.
 23. Sanchez CM, Jimenez G, Laviada MD, *et al.* Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology*, 174:410-417, 1990.
 24. Simkins RA, Weillau 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.
 25. Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC. Coronaviruses: Structure and genome expression. *J Gen Virol*, 69: 2939-2952, 1988.
 26. Sune C, Jimenez G, Correa I, *et al.* Mechanisms of transmissible gastroenteritis coronavirus neutralization. *Virology*, 177:559-569, 1990.
 27. Vaughn EM, Paul PS. Antigenic and biological diversity among transmissible gastroenteritis virus isolates of swine. *Vet Microbiol*, 36:333-347, 1993.
 28. Wesley RD. Nucleotide sequence of the E2-peplomer protein gene and partial nucleotide sequence of the upstream polymerase gene of transmissible gastroenter-

- itis virus (Miller strain). In: Cavanagh D, Brown TDK, ed. *Coronaviruses and Their Diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York: Plenum, 1990:301-306, 1990.
29. Wesley RD, Woods RD, Cheung AK. Genetic basis for the pathogenesis of transmissible gastroenteritis virus. *J Virol*, 64:4761-4766, 1991.
30. Wesley RD, Woods RD, Cheung AK. Genetic analysis of porcine respiratory coronavirus, an attenuated variant of transmissible gastroenteritis virus. *J Virol*, 65: 3369-3373, 1991.
31. 권혁무. PCR과 RFLP분석을 이용한 transmissible gastroenteritis virus의 spike glycoprotein gene과 nonstructural protein gene의 분석. *대한수의학회지*, 36:627-633, 1996.
32. 피재호. 국내에서 분리한 돼지 전염성 위장염 바이러스의 spike gene과 ORFs 3, 3-1 gene의 분석. *강원대학교 대학원 수의학석사학위논문*, 1998.
-