

TRIZol을 이용한 노로바이러스 RNA 추출의 pH 의존성

전덕영*

전남대학교 식품영양과학부

pH-Dependence of RNA Extraction for Norovirus by TRIZol Method

Deok-Young Jhon*

Division of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju, Korea

(Received December 2, 2017/Revised December 20, 2017/Accepted January 16, 2018)

ABSTRACT - Norovirus is a leading cause of sporadic pathogenic non-bacterial gastroenteritis worldwide. For the detection of norovirus, reverse transcription real-time PCR (RT qPCR) has quickly become a major tool due to its sensitivity and specificity. However, accurate viral RNA extraction methods are essential for RT qPCR analysis. TRIzol reagents are used to extract RNA from biological materials and are therefore widely used for norovirus RNA extraction. In this study, the yield of viral RNA extraction using TRIzol from genogroup II (GII) among the human norovirus genogroup I (GI) and GII, and murine norovirus (GV) depended on the pH of the virus sample solution. The yield of RNA extraction was higher at the alkaline pH than in the acidic region compared with the Ct (threshold cycle) value of the real-time PCR. From the results of this study, it was found that the pH condition is very important for the quantitative analysis of norovirus by extracting GII RNA using TRIzol.

Key words : Norovirus, TRIzol extraction

노로바이러스는 단일 가닥(+)의 RNA로서, 전세계적으로 급성 장염을 주증상으로 하는 식중독 발생에 있어서 가장 중요한 원인물질중 하나이다¹⁾. 노로바이러스의 종류는 현재 7개의 유전자군(G, genogroup)으로 나뉘며 이 중에서 사람에게 발병하는 인체 노로바이러스(HuNov)는 GI, GII, GIV형이다²⁾. 특히 노로바이러스 GII는 이 유전자군에 속한 유전자형(genotype)이 22개로 알려져 다른 군에 비하여 가장 많고 노로바이러스 중 전세계적으로 가장 많은 식중독 발병률을 나타내고 있다²⁾. 이들 HuNov는 다양한 세포배양시스템에도 불구하고 배양방법이 확립되어 있지 않으며³⁾ 최근들어 enterocyte나 B cell을 이용한 방법이 제시되고 있는 실정이다^{4,5)}. 따라서 HuNov에 대하여는 정량적인 계수는 물론 정성적인 검사 또한 역전사 실시간 PCR (reverse transcription real-time PCR, RT qPCR)을 이용한 바이러스 RNA 핵산의 검출방법에 의존하고 있는 것이다^{6,7)}. HuNov는 감염성이 아주 높아 바이러스 입자 18개로도 식중독 발생이 가능하다고 하였으며⁸⁾ 그 범위는 대개 10~100

개의 바이러스 입자로 알려져 있다⁹⁾. 따라서 이 바이러스에 의한 식중독을 예방하기 위하여는 소량의 바이러스 입자도 신속하고 정확하게 정량할 수 있는 PCR 방법이 필수적이다. 그런데 RT qPCR을 위하여는 바이러스 입자로부터 RNA를 추출하는 과정이 선행되어야 한다. 노로바이러스의 외관은 캡시드(capsid) 단백질로 이루어진 다면체의 형태이며 그 내부에 핵산이 들어 있으므로¹⁰⁾ 핵산의 추출을 위해서는 캡시드 단백질을 제거하는 과정이 필요하다. 그런데 GI, GII, GV의 캡시드의 입체 구조는 서로 간에 상당히 다른 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 바이러스 입자는 고압에 의하여 불활성화되는데¹²⁾ GI이 GII보다 훨씬 더 높은 압력에서 불활성화가 발생하며, 이 불활성화는 pH 4보다 생리적인 pH에서 더 잘 일어난다는 것이다. 또한, 질량분석기를 이용하여 pH 변화에 대한 바이러스 입자크기의 연구에서는 노로바이러스의 캡시드의 조립이나 분해가 pH에 대단히 민감하다고도 보고되었다¹³⁾. 노로바이러스 핵산의 추출에는 전통적으로 많이 사용되는 구아니디늄티오시아네이트-페놀-클로로포름 방법이 있으며, 시판되는 시약인 TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이 사용된다¹⁴⁻¹⁷⁾. QIAamp® (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) Viral RNA Mini kit을 이용한 RNA 추출 방법도 있지만¹⁸⁻²⁰⁾ TRIzol방법을 사용했을 때와는 달리 블루 치즈 등 식품중

*Correspondence to: Deok-Young Jhon, Division of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea
Tel: 82-10-3130-4953, Fax: 82-62-530-1339
E-mail: dyjhon@gmail.com

에 함유된 노로바이러스가 검출되지 않았다고 보고된 바 있다²¹⁾.

본 연구에서는 TRIzol을 사용하여 노로바이러스 RNA를 추출할 때 유전자군의 종류에 따라 RNA추출물이 바이러스 용액의 pH에 대하여 영향을 받는 것을 확인하였다. 즉, 노로바이러스 GI, GII, GV중에서 GII군만 그 RNA추출물이 pH에 크게 의존함을 알수 있었기에 이를 보고하고자 한다.

Materials and Methods

노로바이러스

HuNoV로서 Norwalk 프로토 타입 유전자군 I, 유전자형 1 (GI.1) 균주와 스노우 마운틴 바이러스, 프로토 타입 유전자군 II, 유전자형 2 (GII.2)가 대변 시료의 형태로 사용되었다(Lee-Ann Jaykus 제공, 식품, 생물공학 및 영양 과학과, 노스 캐롤라이나 주립 대학, Raleigh, NC, USA). 대변 샘플은 인산염 완충 생리 식염수(PBS, 10 mM, pH 7.2)에 20%가 되게 현탁된 것이었다. 생쥐 노로바이러스 GV는 생쥐의 대식 세포주 RAW 264.7에서 바이러스의 감염에 의해 얻어진 것을 사용하였다²²⁾. 모든 바이러스 현탁액은 사용하기 전까지 -80°C에서 보관하였다.

바이러스 RNA의 추출

바이러스 RNA 추출을 위해서 시료를 물 또는 서로 다른 pH의 50 mM 완충액(50 mM 시트르산(pH 3, 4, 5, 6), 인산염(pH 7, 8) 및 글리신-NaOH (pH 9, 10))으로 20배 희석 하였다. 희석된 샘플 0.2 mL를 TRIzol® 0.8 mL에 현탁시켰다. 현탁액에 클로로포름(Fischer Biotech, Fair Lawn, NJ, USA) (0.16 mL)을 첨가하고 30 초 동안 볼텍싱하고 실온에서 5 분 더 방치 하였다. 그런 다음 현탁액을 4°C에서 12,000 rpm으로 15 분간 원심 분리 하였다. 바이러스 RNA가 포함 된 상층액을 회수하고 DNase와 RNase가 없는 이소프로판올(Acros, NJ, USA) 0.5 mL와 혼합하고

-20°C에서 20 분간 정치한 후 15,000 × g, 4°C, 10 분간 원심 분리하였다. 펠릿을 0.8 mL의 75% 에탄올로 세척하고, 10 분 동안 공기 건조시키고, 25 µL의 RNase와 DNase가 없는 증류수에 현탁시켰다. 바이러스 RNA는 사용하기 전까지 -80°C에서 보관했다.

실시간 정량적 RT-PCR

RT qPCR은 시료 바이러스 RNA 추출물, 유전자 특이적 프라이머(Table 1)^{23,24)}, 그리고 OneStep RT-PCR 키트(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 혼합하여 SmartCycler® 시스템(Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 총 반응액의 부피는 25 µL로써 2.5 µL의 RNA 주형, 1.0 µL의 효소, 5.0 µL의 5x Tris 완충액, 0.25 µL의 RNasin RNase 억제제(N211A; Promega, Madison, WI, USA), 400 nM dNTP 믹스, 200 nM 각 프라이머 세트, 150 nM 프로브 JJV1P (GI 용) 및 150 nM 프로브 RING2P (GII 용) 및 200 nM 프로브 G54808 (GV 용)를 함유하였다. 역전사 반응을 위하여 먼저 55°C에서 30 분간 처리하였다. PCR 운전 조건은 95°C에서 15 분간의 열처리를 통하여 DNA를 변성시킨 후에 각각의 조건을 45주기 반복하여서 DNA를 증폭하였다. 즉, HuNov GI의 경우, 55°C에서 20 초 동안의 어닐링, 72°C에서 15 초 신장반응, 그리고 94°C에서 10 초간의 DNA변성 조건이었다. HuNov GII의 경우에는 54°C에서 20 초 동안 어닐링, 72°C에서 15 초간의 합성, 그리고 94°C에서 10 초 동안의 변성조건이었으며, 쥐 노로바이러스 GV에 대해서는 55°C에서 15 초 동안의 어닐링, 72°C에서 30 초간의 신장 조건, 95°C에서 10 초간의 변성 조건이 사용되었다.

단백질 서열 분석

인간 노로바이러스 GI, GII 및 생쥐 노로바이러스 GV에 대한 서열은 Genbank에서 입수하였다. accession 번호는 GI의 경우 CAK22261, GII의 경우 ABD73936, GV의 경우 ABI95835였다. 캡시드 단백질의 1차구조는 EXPASY

Table 1. Primer and probe identities, sequences, genome location, and source for RT-qPCR assays used in this study

Virus	Name	Sequence (5'-3')	Location	Reference
Norovirus GI.1 (HuNoV GI.1)	JJV1F	GCCATGTTCCGTTGGATG	5282	Jothikumar et al. -2005 ²³⁾
	JJV1R	TCCTTAGACGCCATCATCAT	5377	
	JJV1P	6-FAM-TGTGGACAGGCGCAATCTC -BHQ1	5319	
Norovirus GII.4 (HuNoV GII.4)	JJV2F	CAAGAGTCAATGTTTAGTGGATGAG	5003	Jothikumar et al. -2005 ²³⁾
	COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	5080	
	RING2P	6-FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-BHQ1	5048	
Murine norovirus-1 (GV)	G54763F	TGATCGTGCCAGCATCGA	4763	Tung et al. -2013 ²⁴⁾
	G54863R	GTTGGGAGGGTCTCTGAGCAT	4884	
	G54808P	6-FAM-CTACCCACCAGAACCCCTTGAGACTC-BHQ1	4808	

PROTPARAM을 이용하여 분석되었고 계통 발생 나무 (phylogenetic tree)는 프로그램 Mega4 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>, <http://www.megasoftware.net/>)를 사용하여 얻었다.

Results and Discussion

TRIzol 방법을 사용하여 노로바이러스-GI, GII, 및 GV의 RNA를 추출한 후 그 양을 qPCR로 측정하였으며 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. RNA 추출용 노로바이러스 시료로부터 그 pH만을 서로 달리한 후에 RNA를 추출하였으므로 이 결과는 pH가 RNA의 추출에 미치는 영향을 나타낸다. RNA의 양은 cycle threshold (Ct)값으로 나타냈다. GI와 GV의 경우에 시료 희석 완충액의 모든 pH 범위에서 Ct 값이 30 부근을 나타냈으며 따라서 서로간에 유사한 RNA 추출 수율을 보였다. 그러나 GII의 경우에는 pH가 높아질수록 RNA의 추출 양이 점점 증가하는 경향을 나타냈다. pH 3에서는 Ct값이 30이었으나 pH 8~10의 범위에서는 27까지 단축되어 RNA양이 최대량이 되었다.

이 실험에서 사용된 RNA는 인간노로바이러스(HuNov)인 GI.1과 GII.2, 그리고 생쥐 노로바이러스인 GV였으며, 물 또는 서로 다른 pH의 50 mM 완충액으로 희석된 상태였다. 바이러스 RNA는 일반적으로 PBS나 글리신-NaOH 완충액과 같은 알칼리 완충액을 사용하여 조직 또는 식품 샘플에서 분리된다. 알칼리성 완충액은 바이러스의 추출을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이 실험에서는 GI 또는 GII 추출을 위해 대변 샘플이 사용되었고 GV 추출을 위해서는 배양된 세포가 사용되었다. Fig. 1은 이 실험 조건에서의 pH 변화가 GI 또는 GV의 바이러스의 RNA 추출에 대하여는 아무런 영향을 미치지 않았지만 오직 GII의 경우에만 영향을 준다고 할 수 있다. TRIzol은 강력한 단백질 변성제인 구아니디늄 티오시아네이트를 주요 성분으로 가지고 있다. 그러나 이렇게 노로바이러스 RNA의 추출이 시료액의 pH에 영향을 받는 이유는 바이러스의 캡시드 단백질의 구조적 특성에서 찾아 볼 수 있다. 바이러스 RNA 추출 중에 TRIzol은 탈 단백질, 정제, RNA의 RNase 억제 역할을 한다¹⁴⁾. 노로바이러스는 외피(envelope)가 없기 때문에 바이러스로부터 캡시드 단백질을 제거하는 과정이 RNA 추출물의 향상에 있어서 가장 중요한 과정 중 하나이다. 그런데 캡시드 단백질은 그 구성 및 안정성이 주위 환경의 pH에 영향을 받는다. 노로바이러스 유전자군 GI의 캡시드 단백질의 virus-like protein (VLP) 연구 결과²⁵⁾에 의하면 노로바이러스 RNA를 둘러 싸고 있는 단백질 껍질이 pH 3~7 범위에서는 대단히 안정하지만, pH 8의 알칼리 영역에서는 불안정하다고 알려졌다. 한편, GII를 이용한 연구는 캡시드 단백질 껍질의 주성분인 VP1 외에도 적은 수의 VP2라는 단백질이 껍질의 내부에 자리잡

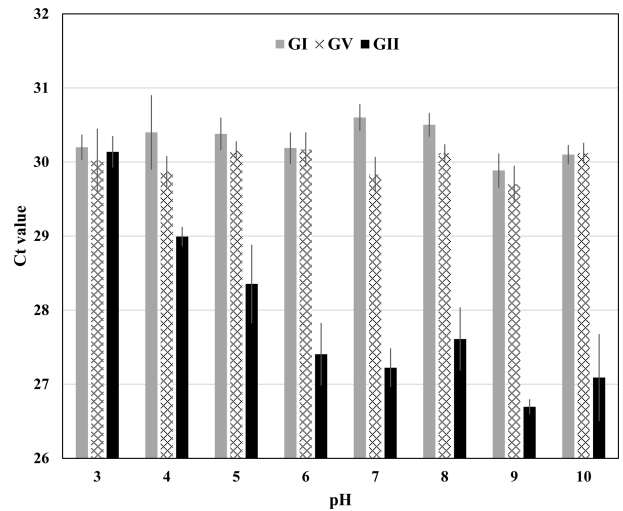


Fig. 1. Reverse transcription real-time PCR of norovirus RNA extracted by TRIzol method using sample dilution buffer with different pH. Data were derived from four independent experiments. GI.1 and GII.2 were obtained from fecal samples and GVs were derived from cultured cells. Reverse transcription real-time PCR was performed using specific primers, sequence-specific probes and norovirus RNA templates.

고 있는데 이 VP2가 알칼리 pH조건에서의 캡시드 안정성에 기여한다는 것을 보여 주었다²⁶⁾. 이는 노로바이러스의 캡시드 단량체로부터 만들어진 90개의 이량체가 20면체의 껍질을 형성하고 유지하는데 있어서 pH의 영향을 받는다는 것을 의미한다.

노로바이러스의 유전자군인 GI, GII, 그리고 GV중에서 GII만이 pH증가에 따라 RNA의 추출이 크게 증가하는 것을 이들의 캡시드 단백질의 물리화학적 특성으로부터 찾고자 하였다. 이들 세 바이러스 스트레인의 캡시드 단백질의 아미노산 서열을 분석하여 그 특성을 Table 2에 나타냈다. 캡시드 단백질은 노로바이러스 유전자의 ORF2 정보를 바탕으로 만들어진 VP1 단백질로서 3개, 즉 S-, P1-, P2-도메인으로 구성되어 있다¹⁰⁾. S-도메인은 핵산에 가까운 단백질 부위이고 P2-도메인은 단백질의 표면에 노출된 돌출 부위이다. 캡시드 단백질의 3개 도메인중 물리화학적 특성에 있어서 GI와 GV에 비하여 특히 GII가 다른 것은 P2-도메인과 S-도메인이었다. 즉, pI (Theoretical pI), Instability index, GRAVY (Grand average of hydropathicity) 값에서 차이가 두드러졌다. P2-도메인의 경우 pI는 5.3으로서 GI나 GV의 4.4, 4.2에 비하여 훨씬 높은 수치를 나타냈다. Instability index는 다른 두 단백질과 달리 40 이하의 낮은 값이었으며, 열안정성을 나타내는 aliphatic 지표도 낮은 수치를 나타냈다. GRAVY 값은 GII의 P2-도메인이 GI와 GV에 비하여 상대적으로 친수성을 알 수 있다. S-도메인의 경우에는 이와 반대로 pI는 낮은 값을, Instability index는 다른 두 종류와 달리 40 이상의 높은

Table 2. Physicochemical characteristics of capsid proteins of noroviruses - GI, GII, and GV

Subdomain of capsid protein ¹⁾	S			P1			P2		
	GI	GII	GV	GI	GII	GV	GI	GII	GV
Genogroup of Noroviruses ²⁾	GI	GII	GV	GI	GII	GV	GI	GII	GV
Number of amino acids	225	220	223	192	187	188	127	134	131
Molecular weight	24,006	23,770	24,007	20,968	20,786	20,978	13,469	14,545	13,892
Theoretical pI	4.85	4.7	4.89	7.9	7.87	5.66	4.42	5.32	4.19
Total number of negatively charged residues (Asp + Glu)	17	19	19	12	14	16	11	12	17
Total number of positively charged residues (Arg + Lys)	10	11	12	13	15	14	5	7	7
The instability index (II) ³⁾	36.78	47.42	39.11	45.12	46.75	40.35	42.57	30.55	36.48
Aliphatic index ⁴⁾	91.47	91.73	94.04	83.7	74.49	101.2	82.05	54.48	74.5
Grand average of hydropathicity (GRAVY)	0.172	0.075	0.169	-0.13	-0.18	0.104	-0.1	-0.71	-0.09

Physicochemical properties of capsid domains were analyzed by PROTRAM (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>).

¹⁾S, P1, and P2-domain of capsid proteins are segments of peptide 1~224, 225~278 and 406~520, and 279~405, respectively. The numbering is based on norovirus GI.

²⁾Noroviruses were GI.1, GII.2, and GV(murine norovirus-1).

³⁾A protein whose instability index is lower than 40 is predicted as stable, a value above 40 predicts that the protein may be unstable.

⁴⁾The aliphatic index of a protein is defined as the relative volume occupied by aliphatic side chains (alanine, valine, isoleucine, and leucine). It may be regarded as a positive factor for the increase of thermostability of globular proteins.

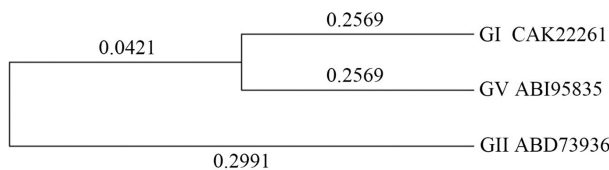


Fig. 2. Phylogenetic tree of S-domain of capsid proteins of norovirus GI, GII, and GV. Amino acid sequences for capsid protein were obtained from Genbank. Phylogenetic tree was produced using Mega4 program (<http://www.megasoftware.net/>).

값을 나타냈다. GRAVY 값 또한 GII가 GI와 GV와는 다른 특성을 갖고 있었다. 따라서 이러한 캡시드 단백질이 노로바이러스의 껍질을 구성할 때 그 내부와 외부로 차지하는 S-도메인과 P2-도메인의 물리화학적 성질에 있어서 GI와 GV가 서로 유사하며 이는 GII와 차이가 있음을 보여주었다. 이러한 특성의 차이가 pH에 따른 RNA의 추출률의 차이에 관련될 수 있을 것이다. 이러한 노로바이러스 캡시드의 안정성이 GII의 VLP에 대한 연구 결과 pH에 의존한다는 것이 보고된 바 있다.²⁷⁾ 이들의 연구에 따르면, 염기성 pH에서는 캡시드의 크기가 커지면서 더 부드러워진다는 것이다. 그리고 캡시드 껍데기의 기계적인 변화는 캡시드단량체의 입체구조적 변화와 관련되어 있는 캡시드 단량체간의 약해진 인력이 원인이라고 하였다. P-도메인을 제거한 재조합 노로바이러스 VLP는 중성 및 산성 pH에서만 안정하므로 P-도메인이 pH 안정성에 중요하다.^{13,28)} 또한 염기성 pH에서는 캡시드 단백질이 풀어진다는 연구가²⁵⁾ 있으므로 이들 연구 내용들은 pH 8 이상의

높은 pH에서 RNA의 추출률이 최대값에 이른 본 연구의 결과와 일치한다.

계통 발생 수계는 보통 생물학적 물질의 유사성을 나타낸다. Fig. 2는 캡시드 단백질의 N-말단 S-도메인의 아미노산 서열에 기초한 노로바이러스의 계통 발생 수계이다. S-도메인은 핵산이 인접하고 있는 캡시드 내부 구조이다. 즉, RNA와 가장 가까운 단백질 1차구조에 있어서 GI와 GV는 상대적으로 유사하며 GII는 계통 발생학적으로 먼 거리에 있음을 알 수 있었다. Table 2 및 Fig. 2에 기초하여 GII가 GI나 GV와는 다른 물리 화학적 성질의 캡시드 단백질을 갖는다는 것을 알 수 있으며 따라서 이것이 GII RNA 추출의 pH 의존성의 하나의 원인이라고 할 수 있을 것이다.

노로바이러스에 의한 인체 감염은 소수의 바이러스 입자에 의한다고 알려져 있다. 이것이 이 분야에서 고 감도의 추출 방법이 필요한 주된 이유이다. TRIzol은 노로바이러스의 추출 방법으로 널리 사용되지만 식품에 정확한 바이러스 양을 얻기 위해 적절하게 사용되어야 한다. 노로바이러스는 신선한 채소나 물, 해산물에 오염되어 있는 경우가 많다. 이러한 여러 식품들이 낮은 pH를 나타내기 때문에, TRIzol을 이용하여 GII RNA를 추출할 때는 GI와 GV와는 달리 시료희석용 완충액이 pH 8 이상으로 조정되어야 높은 RNA 추출률을 달성할 수 있을 것이다.

Acknowledgement

이 연구에 사용된 노로바이러스는 미국 노쓰캐롤라이나

대학 Department of Food, Bioprocessing, & Nutrition Sciences의 Lee-Ann Jaykus 교수가 제공하였기에 이에 감사드립니다. 이 연구의 수행에는 전남대학교의 연구비 지원이 도움이 되었습니다.

국문요약

노로바이러스는 전 세계적으로 산발적인 발병 관련 비세균성 위장염의 주요 원인 물질이다. 노로바이러스 검출을 위해 역전사 실시간 PCR (RT qPCR)이 그 민감도와 특이성으로 인해 주요 수단으로 빠르게 자리 잡았다. 그러나 RT qPCR 분석을 위해서는 정확한 바이러스 RNA 추출 방법이 필수적이다. TRIzol 시약은 생물학적 물질로부터 RNA의 추출에 이용되고 따라서 노로바이러스 RNA 추출에도 널리 사용된다. 이 연구에서는 인체 노로바이러스 유전체 그룹 I (GI) 및 유전자 그룹 II (GII)와 생쥐 노로바이러스(GV) 중에서 GII로부터의 TRIzol 을 이용한 바이러스 RNA의 추출률이 바이러스 시료 용액의 pH에 의존했다는 내용이 다루어졌다. 실시간 PCR의 Ct값으로 비교한 RNA 추출 수율은 산성 영역보다 알칼리성 pH에서 높았다. 이 연구 결과로 부터 TRIzol을 이용하여 GII RNA를 추출하여 노로바이러스를 정량적으로 분석할 때 pH조건이 대단히 중요하다는 것을 알 수 있었다.

References

- van Beek J., de Graaf M., Xia M., Jiang X., Vinjé J., Beersma M., de Bruin E., van de Vijver D., Holwerda M., van Houten M., Buisman A.M., van Binnendijk R., Osterhaus A.D.M.E., van der Klis F., Vennema H., Koopmans M.P.G.: Comparison of norovirus genogroup i, ii and iv seroprevalence among children in the Netherlands, 1963, 1983 and 2006. *J. Gen. Virol.* **97**, 2255-2264 (2016).
- Vinje J.: Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 373-381 (2015).
- DiCaprio E.: Recent advances in human norovirus detection and cultivation methods. *Curr. Opin. Food Sci.* **14**, 93-97 (2017).
- Ettayebi K., Crawford S.E., Murakami K., Broughman J.R., Karandikar U., Tenge V.R., Neill F.H., Blutt S.E., Zeng X.-L., Qu L., Kou B., Opekun A.R., Burrin D., Graham D.Y., Ramani S., Atmar R.L., Estes M.K.: Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science (New York, N.Y.)* **353**, 1387 (2016).
- Jones M.K., Watanabe M., Zhu S., Graves C.L., Keyes L.R., Grau K.R., Gonzalez-Hernandez M.B., Iovine N.M., Wobus C.E., Vinjé J., Tibbetts S.A., Wallet S.M., Karst S.M.: Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science (New York, N.Y.)* **346**, 755 (2014).
- Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino F.B., Takeda N., Katayama K.: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1548 (2003).
- Vinje J., Hamidjaja R.A., Sobsey M.D.: Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J. Virol. Methods.* **116**, 109-117 (2004).
- Teunis P.F.M., Moe C.L., Liu P., Miller S.E., Lindesmith L., Baric R.S., Pendu J.L., Calderon R.L.: Norwalk virus: How infectious is it? *J. Med. Virol.* **80**, 1468-1476 (2008).
- Patel P.K., Araujo-Castillo R.: Norovirus and infection control. *Hosp. Med. Clin.* **6**, 28-37 (2017).
- Prasad B.V.V., Hardy M.E., Dokland T., Bella J., Rossmann M.G., Estes M.K.: X-ray crystallographic structure of the norwalk virus capsid. *Science.* **286**, 287-290 (1999).
- Karst S.M.: Pathogenesis of noroviruses, emerging rna viruses. *Viruses.* **2**, 748 (2010).
- Li X., Chen H., Kingsley D.H.: The influence of temperature, pH, and water immersion on the high hydrostatic pressure inactivation of GI.1 and GII.4 human noroviruses. *Int. J. Food Microbiol.* **167**, 138-143 (2013).
- Shoemaker G.K., van Duijn E., Crawford S.E., Utrecht C., Baclayon M., Roos W.H., Wuite G.J.L., Estes M.K., Prasad B.V.V., Heck A.J.R.: Norwalk virus assembly and stability monitored by mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics.* **9**, 1742-1751 (2010).
- Chomczynski P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987).
- Xu Q., Liu H., Yuan P., Zhang X., Chen Q., Jiang X., Zhou Y.: Development of a simplified RT-PCR without RNA isolation for rapid detection of RNA viruses in a single small brown planthopper (*Laodelphax striatellus* Falln). *Virol. J.* **14**, 90 (2017).
- O'Donnell T.B., Hyde J.L., Mintern J.D., Mackenzie J.M.: Mouse norovirus infection promotes autophagy induction to facilitate replication but prevents final autophagosome maturation. *Virology.* **492**, 130-139 (2016).
- Cuevas J.M., Combe M., Torres-Puente M., Garijo R., Guix S., Buesa J., Rodríguez-Díaz J., Sanjuán R.: Human norovirus hyper-mutation revealed by ultra-deep sequencing. *Infect. Genet. Evol.* **41**, 233-239 (2016).
- Kim H.-Y., Kwak I.-S., Hwang I.-G., Ko G.: Optimization of methods for detecting norovirus on various fruit. *J. Virol. Methods.* **153**, 104-110 (2008).
- Somura Y., Kimoto K., Oda M., Nagano M., Okutsu Y., Mori K., Akiba T., Sadamasu K.: Detection of norovirus in swab specimens of restrooms and kitchens collected for investigation of suspected food poisoning outbreaks in tokyo. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* **58**, 201-204 (2017).
- Tian P., Yang D., Shan L., Wang D., Li Q., Gorski L., Lee B.G., Quinones B., Cooley M.B.: Concurrent detection of human norovirus and bacterial pathogens in water samples from an agricultural region in central California coast. *Front. Microbiol.* **8**, 1560 (2017).

21. Morillo S.G., Luchs A., Cilli A., do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky M.: Rapid detection of norovirus in naturally contaminated food: Foodborne gastroenteritis outbreak on a cruise ship in Brazil, 2010. *Food Environ. Virol.* **4**, 124-129 (2012).
22. Gentry-Shields J., Jaykus L.-A.: Comparison of process control viruses for use in extraction and detection of human norovirus from food matrices. *Food Res. Int.* **77**, 320-325 (2015).
23. Jothikumar N., Lowther J.A., Henshilwood K., Lees D.N., Hill V.R., Vinjé J.: Rapid and sensitive detection of noroviruses by using taqman-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1870-1875 (2005).
24. Tung G., Macinga D., Arbogast J., Jaykus L.A.: Efficacy of commonly used disinfectants for inactivation of human noroviruses and their surrogates. *J. Food Prot.* **76**, 1210-1217 (2013).
25. Ausar S.F., Foubert T.R., Hudson M.H., Vedvick T.S., Midaugh C.R.: Conformational stability and disassembly of norwalk virus-like particles: Effect of pH and temperature. *J. Biol. Chem.* **281**, 19478-19488 (2006).
26. Lin Y., Fengling L., Lianzhu W., Yuxiu Z., Yanhua J.: Function of VP2 protein in the stability of the secondary structure of virus-like particles of genogroup II norovirus at different pH levels: Function of VP2 protein in the stability of Nov VLPs. *J. Microbiol.* **52**, 970-975 (2014).
27. Cuellar J.L., Meinhoefel F., Hoehne M., Donath E.: Size and mechanical stability of norovirus capsids depend on pH: A nanoindentation study. *J. Gen. Virol.* **91**, 2449-2456 (2010).
28. Baclayon M., Shoemaker G.K., Uetrecht C., Crawford S.E., Estes M.K., Prasad B.V.V., Heck A.J.R., Wuite G.J.L., Roos W.H.: Prestress strengthens the shell of norwalk virus nanoparticles. *Nano Lett.* **11**, 4865-4869 (2011).