

Investigation of Murine Norovirus Replication in RAW264.7 Cells by Strand-specific RT-PCR

Ga Young Ji¹, So Young Jang¹, Soon Young Paik², Gwang Pyo Ko³,
Weon Hwa Jeong⁴ and Chan Hee Lee^{1*}

¹Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju; ²Department of Microbiology, Catholic University Medical School, Seoul; ³School of Public Health, Seoul National University, Seoul;

⁴National Institute of Environmental Research, Incheon, Korea

Murine norovirus (MNV) is a non-enveloped virus with a positive-sense RNA genome and causes lethal infection in mice. MNV has been used as a model virus for human norovirus (NV) whose *in vitro* cell culture system has not been available to date since MNV and NV are genetically related. In this study, the genome replication of MNV was investigated using strand-specific RT-PCR in RAW264.7 cells. Reverse transcription (RT) using a sense primer followed by PCR showed that negative-sense RNAs were first detected in RAW264.7 cells between 6 and 9 [3 and 6] hours post infection (h.p.i.). However, these negative-sense RNAs were not detected when cells were treated with a translation inhibitor cycloheximide. Then, RT with an antisense primer followed by PCR was performed to detect positive-sense RNAs. RT-PCR results revealed that the amount of positive-sense RNAs began to increase from 9 [6] h.p.i., indicating the accumulation of the newly synthesized (+)RNA genome. Furthermore, cycloheximide abrogated the increase of newly made RNAs during MNV infection. In conclusion, strand-specific RT-PCR using a sense or antisense primer, in combination with cycloheximide treatment, enabled us to detect positive-sense and negative-sense RNAs selectively and provided a useful tool to understand the replication cycle of MNV.

Key Words: Murine norovirus, Strand-specific RT-PCR, RNA synthesis

서 론

장염(gastroenteritis)은 공중보건학적으로 매우 중요한 질병이며, 노로바이러스는 비세균성 급성 장염의 가장 많은 요인이다. 미국, 유럽, 일본 등 선진국에서는 모든 장염 집단 발병의 60~85%가 노로바이러스에 의해 일어난다고 보고된 바 있다 (1~3). 노로바이러스는 매우 전염

성이 강하고 오염된 물, 음식을 섭취하거나 감염된 사람과 가까이 접촉한 사람들에게 나이를 불문하고 감염될 수 있다 (4, 5).

노로바이러스는 1968년 미국 오하이오주 노워크 (Norwalk)에서 처음으로 집단 발병이 보고되었고 (6), 이후 이 지역 이름을 따서 노워크바이러스로 불리우기도 한다. 노로바이러스는 1972년에 분리되었고 (7), 1990년 계놈 구조가 밝혀진 후 (8) 분자생물학적 연구 및 검출이 가능하게 되었다. 그러나 아직까지 노로바이러스를 증식 할 수 있는 세포 배양 시스템이 개발되어 있지 않기 때문에 보다 의미 있는 생물학적 연구가 불가능한 실정이다 (9, 10). 따라서 노로바이러스 연구를 위한 실험 모델 바이러스 시스템이 필요하다.

현재 사람 이외에도 소, 돼지, 생쥐 등에서 노로바이러스가 발견되었으나, 뮤린 노로바이러스(murine norovirus:

Received: March 30, 2011 / Revised: May 24, 2011

Accepted: May 30, 2011

*Corresponding author: Chan Hee Lee, Department of Microbiology, Chungbuk National University, 52 Naesudong-Ro, Heungdeok-Gu, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea.

Phone: +82-43-261-2304, Fax: +82-43-273-2451

e-mail: chlee@cbu.ac.kr

**이 논문은 2009년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

MNV)만이 세포 배양과 작은 실험 동물에서 증식이 가능하다 (11, 12). 뮤린 노로바이러스는 2003년 처음 보고되었으며 (13), 약 7.4 kb의 단일 양성 가닥 RNA [(+)RNA]를 게놈으로 가진다. 게놈의 5' 쪽은 ORF1을 암호화하며, 여기에서 하나의 폴리프로테인이 만들어지고, 이는 나중에 p48, NTPase, p22, Vpg, protease 그리고 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)로 절단된다. 게놈의 3' 쪽은 두 개의 구조단백질인 VP1과 VP2를 만드는 ORF2와 ORF3가 위치한다 (12). 뮤린 노로바이러스의 대표적 참고주인 MNV-1 clone CW1 (GenBank accession number DQ28562.9)은 7,382 염기로 구성되어 있으며, ORF1은 6-5,069, ORF2는 5,056-6,681, 그리고 ORF3은 6,681-7,307에 위치한다.

세포 배양에서 뮤린 노로바이러스의 증식은 현재까지 많은 연구가 되어 있지 않다. 특히 뮤린 노로바이러스의 RNA 합성에 대해서는 다른 Calicivirus처럼 subgenomic RNA도 만들어진다는 보고 (11) 이외에는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 strand-specific RT-PCR 실험기법을 이용하여 세포 배양에서의 뮤린 노로바이러스 RNA 합성에 대해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

세포 및 바이러스 배양

뮤린 노로바이러스의 증식을 알아보기 위해 murine monocytic 세포주인 RAW264.7을 사용하였다. RAW264.7 세포는 Herbert W. Virgin 박사(Washington University School of Medicine, MO, USA)로부터 얻은 것으로 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 실험에 사용할 바이러스 stock을 얻기 위해 완전히 자라 단층을 형성한 RAW264.7 세포에 바이러스를 MOI (multiplicity of infection)가 0.1 plaque forming unit (pfu/ml)이 되게 감염시켰다. 감염 후 2% FBS가 포함된 DMEM을 첨가하여 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 바이러스 stock은 감염된 세포를 -70°C에서의 얼림과 37°C에서의 녹임을 세 번 반복한 것을 초음파 처리하여 얻었다. 바이러스 titer는 plaque assay에 의해 pfu/ml로 결정하였다. 실험에 사용할 세포는 12 well plate에 5 × 10⁵ cells/well이 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 하루 정도

배양하였다.

Strand-specific RT-PCR

RAW264.7 세포에 뮤린 노로바이러스를 감염시키고, 일정한 시간이 경과한 후 감염된 세포에서 QIAamp RNeasy [Viral RNA Mini] kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 RNA를 추출하였다. 시료 140 μl을 lysis solution 560 μl과 섞어주고 에탄올 560 μl을 넣어 침전시켰다. QIAamp spin column과 buffer AW1, AW2를 이용하여 RNA를 정제하고 농축하였다. 마지막으로 buffer AVE 60 μl로 RNA를 elution 하여 -70°C 이하에서 보관하였다. Strand-specific RT-PCR을 위해 RT 과정에서 음성 가닥 RNA [(-)RNA]는 sense primer인 MNV-1pol5F (5'-TCTTCGCAAGACACGCCAATTTCAG-3')을, (+)RNA는 antisense primer인 MNV-1pol5R (5'-GCATCACAAATGTCAGGGTCAACTC-3')을 각각 따로 넣어 cDNA를 신장시켰다.

RT 반응을 위해 추출된 주형 RNA 3 μl, 5 mM dNTP, 0.1 M primer, 40 U RNase inhibitor, 4 U Sensiscript RTase (Qiagen)를 넣은 후 RNase-free water로 최종 부피를 20 μl로 맞추었다. 이 혼합용액을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 94°C에서 3분간 반응하여 RTase의 활성을 제거한 후 4°C에서 10분간 식힌 뒤 PCR을 수행하였다.

PCR을 위해 앞서 생성시킨 cDNA 5 μl를 넣고 primer pair 10 pmol짜리 각 5 μl씩, 0.2 mM의 각각의 dNTP, 5 U/μl Taq polymerase (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 넣은 후에 최종 부피를 증류수로 50 μl로 맞춘 후 T-Gradient Thermocycler (Biometra, Gottingen, Germany)를 사용하여 다음의 조건으로 PCR을 수행하였다. 94°C에서 3분간 denaturation시킨 후 94°C 1분, 63°C 1분, 72°C 1분의 조건으로 40 cycle을 반복 수행한 후 72°C에서 7분간 최종 반응시켰다. 증폭된 시료는 1.5% agarose gel에서 전기영동을 한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator로 확인하였다. 확인된 결과는 디지털 카메라로 찍어 보관하였다. 전기영동 상의 랜드 두께는 Scion Image program (version Beta 4.02, <http://www.scioncorp.com>, Released 5/05/2000)으로 정량화하여 비교하였다.

결과

뮤린 노로바이러스 RNA 검출을 위한 조건 확립

RAW264.7 세포에 뮤린 노로바이러스를 M.O.I = 1로

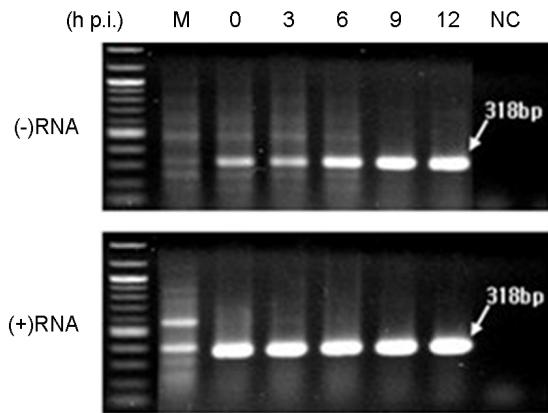


Figure 1. Detection of murine norovirus RNA in RAW264.7 cells by strand-specific RT-PCR. RAW264.7 cells were infected with murine norovirus at MOI of 1. RNAs were extracted at 3 hrs time interval and cDNAs were synthesized using either sense primer or antisense primer. Resulting cDNAs were subjected to PCR using both sense and antisense primers. M, Mock-infected. NC: negative control without primer.

감염시켜 배양한 후 시간대별로 RNA를 추출하여 strand-specific RT-PCR을 수행한 결과를 보면, (-)RNA는 시간이 지날수록 검출량이 증가하는 것을 볼 수 있으나, 감염 직후인 0시간부터 검출되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1). 여러 번 실험을 반복하였어도 동일한 결과를 얻었고, 그 이유는 사용한 바이러스 원액 속에 바이러스 입자 뿐 아니라 RNA도 존재하고, 그 중 (-)RNA가 검출되는 것으로 밝혀졌다. 따라서 보다 명확한 결과를 얻기 위해서는 뮤린 노로바이러스 원액에 존재하는 RNA를 제거하거나 또는 영향을 최소화하는 방안이 필요했다.

따라서 원액의 (-)RNA를 제거시키기 위한 방법으로 RNase 처리와 PEG 처리를 실시하였다. 먼저, (-)RNA를 제거하기 위한 방법으로 RNase를 사용하여 소량으로 불완전하게 존재하는 (-)RNA를 제거하고자 하였다. 그러나 RNase의 농도에 따라 바이러스의 genomic RNA [(+)RNA]도 제거될 수 있으므로 (-)RNA가 효과적으로 제거되면서 (+)RNA가 보존되는 처리 농도를 찾는 실험을 선행하였다. 선행 실험 결과 RNase 처리 농도로 500 μ g/ml의 농도가 적합하다고 판단하여 이 농도를 사용하였고 원액 속의 (-)RNA를 효율적으로 제거하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 2). 두 번째 방법으로 PEG 처리를 통해 (-)RNA가 제거되도록 하였다. 7% PEG를 바이러스 원액과 섞어 15,000 rpm에서 바이러스를 회수하였다. PEG를 처리하였을 때에는 RNase 처리에 비해 (-)RNA를 더 효과적으로

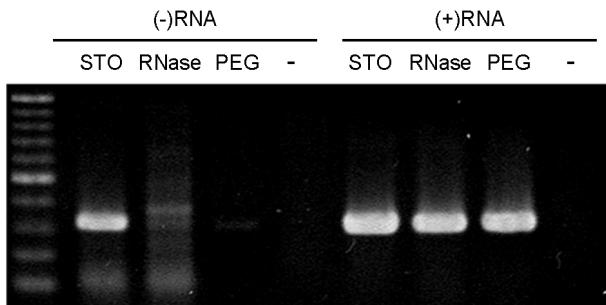


Figure 2. Removal of free (-)RNA from murine norovirus stock. Virus stock was pre-treated with RNase at a concentration of 500 μ g/ml or 7% polyethylene glycol (PEG) overnight. Virus stock treated with RNase or PEG was used for strand-specific RT-PCR. STO, virus stock. -, negative control.

제거하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2). RNase나 PEG 처리 결과 모두 (+)RNA 양은 조금 감소하였지만 (-)RNA 감소 효과가 더욱 크기 때문에 앞으로의 실험에서는 PEG를 처리하여 (-)RNA를 제거시킨 바이러스 원액을 사용하기로 하였다.

뮤린 노로바이러스에 감염된 RAW264.7 세포에서의 (-)RNA와 (+)RNA 검출

바이러스 원액에 PEG를 처리하여 얻은 바이러스 원액을 RAW264.7 세포에 감염시켜 시간대별로 추출한 RNA를 가지고 실험을 진행하였다. 감염된 세포에서 추출한 RNA를 가지고 (-)RNA를 검출한 결과 감염 후 6시간부터 gel 상에 밴드가 확인됨에 따라 뮤린 노로바이러스 (-)RNA는 감염 후 3시간과 6시간 사이부터 생성된다고 생각된다. 또한 (-)RNA는 감염 후 6시간 이후에 점차 증가되는 양상을 보였다. 더불어 antisense primer로 검출한 (+)RNA는 감염 후 0시간부터 검출되었으며, 감염 후 시간이 경과함에 따라 점차 증가되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3A). 검출된 (-)RNA와 (+)RNA가 뮤린 노로바이러스의 증식에 의한 결과인지 확인하기 위해 cycloheximide (CHX)를 처리하였다. CHX는 단백질 합성 저해제로 (+)RNA를 genome으로 가지는 뮤린 노로바이러스는 RdRp를 이용하여 증식할 것이므로 RdRp의 합성을 저해하여 RNA 증식을 억제시킬 것으로 예상되었다. CHX 처리 결과 (-)RNA는 바이러스 감염 후 0시간부터 12시간까지 검출되지 않았으며, (+)RNA는 감염 후 0시간부터 검출되었으나, 이후에도 일정한 양으로 검출되었다 (Fig. 3B). 전기영동 상의 PCR 산물에 해당하는 밴드의

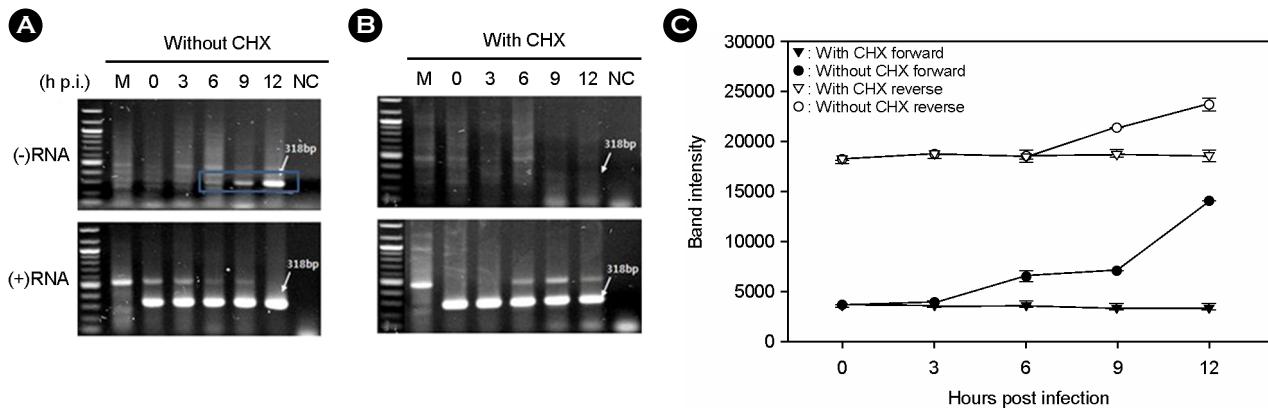


Figure 3. Synthesis of murine norovirus (-)RNA and (+)RNA in RAW264.7 cells. Cells were infected with murine norovirus in the presence of CHX (10 μ M). Cycloheximide was present in the culture medium prior [before], during and after virus infection. At the indicated times after virus infection, RNAs were extracted and RT reactions were performed using only sense primer for detection of (-)RNAs or antisense primer for detection of (+)RNAs. (A) In the absence of CHX. (B) In the presence of CHX. (C) The intensities of the gel bands of the PCR products were converted to numerical forms using Scion Image program and plotted against time after virus infection. ●, (-)RNA in the absence of CHX; ○, (+)RNA in the absence of CHX; ▼, (-)RNA in the presence of CHX; ▽, (+)RNA in the presence of CHX.

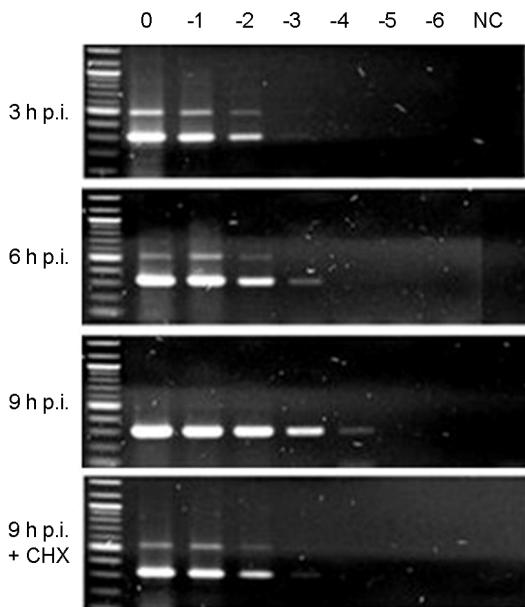


Figure 4. Semi-quantitative RT-PCR of murine norovirus. RAW264.7 cells were infected with murine norovirus. RNA was extracted at 3, 6, 9 h.p.i. and RT reaction was performed using antisense primer only. The resulting cDNAs were serially diluted 1:10 and subjected to PCR using both sense and antisense primers. Cycloheximide treated sample was included at 9 h.p.i.

두께를 측정하여 대략적으로 상대적인 양을 그래프로 나타내 보았다(Fig. 3C). 여기에서 (-)RNA는 감염 초기에는 거의 검출되지 않다가 감염 3시간과 6시간 사이에 검출되는 것을 볼 수 있다. 반면 (+)RNA는 감염 초기부터

검출되고, 감염 6시간부터 증가하는 것으로 나타났다. CHX를 처리하였을 때에는 (-)RNA는 거의 검출되지 않았으며, (+)RNA는 검출되지만 양적 증가는 보이지 않았다(Fig. 3C).

앞의 실험에서 RAW264.7 세포에서 뮤린 노로바이러스의 (-)RNA는 감염 3시간과 6시간 사이에 합성되기 시작한다는 것을 알 수 있었다. 합성된 (-)RNA는 다시 (+)RNA 합성의 주형으로 사용되므로 바이러스 감염 이후에 (+)RNA의 양적 증가가 수반된다. 따라서 바이러스가 증식하면서 증가되는 (+)RNA 양을 정량적으로 분석하기 위하여 semi-quantitative RT-PCR을 시행하였다. 바이러스 감염 3, 6, 9시간째에 RNA를 추출하고, antisense primer로 cDNA를 합성한 뒤 이를 10진 희석한 뒤 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 감염 3시간에는 10^{-3} 에서 희미한 밴드가 관찰되었고, 6시간째에는 10^{-3} 에서 비교적 뚜렷하게 밴드가 관찰되어 감염 6시간 전에 (+)RNA 합성이 시작되는 것을 알 수 있다. 이 후 RNA 합성은 계속 증가하여 감염 9시간째에는 10^{-4} 까지 검출되었다(Fig. 4). 반면 CHX를 처리하였을 때에는 감염 후 9시간까지 (+)RNA 양이 증가하지 않는 것을 알 수 있었다. 따라서 (-)RNA로부터 (+)RNA로의 전사는 바이러스 감염 후 6시간 이전에 시작한다고 생각된다.

뮤린 노로바이러스의 세포외 방출

세포 증식 과정에 의해 세포 내에서 증식한 바이러스

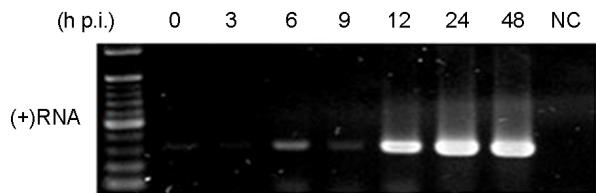


Figure 5. Detection of murine norovirus in the extracellular media. Cells were infected with murine norovirus and the extracellular media were harvested at the indicated times after virus infection. RNAs were extracted from the extracellular media and subjected to semi-quantitative RT-PCR by 10-fold serial dilution.

는 세포 밖으로 방출될 것이기 때문에 언제 세포 밖으로 방출되는지 알아보기 하였다. 바이러스 감염 후 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48시간에 세포 배양액을 수확하여 이 속의 바이러스를 (+)RNA로서 검출하였다. 그 결과 세포 배양액 속의 뮤린 노로바이러스는 감염 후 9시간까지 소량 검출되었으나 감염 12시간부터 많은 양이 검출되었고, 이후 24, 48시간까지 점차 증가되는 양상으로 나타났다(Fig. 5). 따라서 RAW264.7 세포에서 증식한 뮤린 노로바이러스는 감염 후 9시간과 12시간 사이에 세포 밖으로 방출된다고 생각된다.

고 찰

본 연구결과, 뮤린 노로바이러스는 RAW264.7 세포에 감염하였을 때 감염 6시간 경에 (−)RNA와 (+)RNA가 만들어지고, 완성된 바이러스 입자의 세포 밖 방출은 감염 후 9시간과 12시간 사이에 이루어진다고 생각된다.

뮤린 노로바이러스와 같이 (+)RNA를 계놈으로 가지는 바이러스에서 (−)RNA 합성은 증식에서 매우 중요한 단계이다. 그러나 전통적으로 (−)RNA를 (+)RNA와 구분되게 검출하는 것은 (+) 또는 (−) 극성을 가지는 단일 가닥 DNA 또는 RNA 탐침을 필요로 하기 때문에 기술적으로 매우 까다롭고 어렵다고 생각되어 왔다. 이를 극복하기 위해 역전사(RT) 과정에서 cDNA를 합성할 때 sense 또는 antisense primer만 사용하는 strand-specific RT-PCR 방법이 개발되었다. 이 기술을 이용하여 뎅기 바이러스나 C형 간염바이러스 같은 (+)RNA 바이러스의 replicative intermediate 또는 (−)RNA를 검출하였으며 (14~17), 본 연구실에서도 최근 아스트로바이러스의 RNA 합성을 연구하는데 이용한 바 있다 (18).

본 연구에서는 3시간 단위로 RNA 합성을 살펴보았

는데, (−)RNA와 (+)RNA 모두 감염 3시간과 6시간 사이에 생성되는 것이 관찰되었다. 일반적으로 (+)RNA는 (−)RNA가 생성되고, 이를 주형으로 만들어지게 되는데 본 연구에서는 시간적인 차이를 볼 수 없었다. 그 이유는 두 가지로 생각된다. 첫째는 3시간 보다 짧은 시간 단위로 분석하였으면 차이를 볼 수 있었을 것으로 생각된다. 두 번째 이유는 피코르나바이러스, 플라비바이러스 그리고 구제역바이러스와 같은 (+)RNA 바이러스처럼 뮤린 노로바이러스의 경우에도 (+)RNA 합성이 (−)RNA 합성 직후에 이루어져 사실상 시간 차이가 거의 나지 않는 것이다 (19~23). 최근 본 연구실에서 수행한 아스트로바이러스의 RNA 합성 연구에서도 (+)RNA와 (−)RNA가 거의 동시간 대에 검출되는 것을 보고한 바 있다 (18). 또한 Northern blot 기술을 이용한 Wobus 등(2004)의 뮤린 노로바이러스 연구에서도 (+)RNA가 감염 6시간째에 검출되는 것이 보고되었다. 따라서 본 연구-결과는 (+)RNA 바이러스의 (+)RNA 합성이 (−)RNA 합성과 거의 동시에 일어난다는 일반적인 견해와 다르지 않다.

참 고 문 헌

- 1) Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, et al. Epidemiologic and molecular trends of Norwalk-like viruses associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 2002;186:1-7.
- 2) Inouye S, Yamashita K, Yamadera S, Yoshikawa M, Kato N, Okabe N. Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. *J Infect Dis* 2000;181:S270-4.
- 3) Lopman BA, Reacher MH, Van Duijnoven Y, Hanon FX, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis* 2003;9:90-6.
- 4) Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinjé J, De Bruin E, van Duynhoven Y, et al. Natural history of Human Calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2002;35: 246-53.
- 5) Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346:312-23.
- 6) Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis* 1969; 119:668-73.
- 7) Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of

- a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972;10:1075-81.
- 8) Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 1990;250:1580-3.
- 9) Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol* 2004;85:79-87.
- 10) Straub TM, Höner zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA, et al. *In vitro* cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis* 2007;13:396-403.
- 11) Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* 2004;2:e432.
- 12) Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW 4th. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol* 2006;80:5104-12.
- 13) Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW 4th. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 2003;299:1575-8.
- 14) Craggs JK, Ball JK, Thomson BJ, Irving WL, Grabowska AM. Development of a strand-specific RT-PCR based assay to detect the replicative form of hepatitis C virus RNA. *J Virol Methods* 2001;94:111-20.
- 15) Lin L, Fevery J, Hiem Yap S. A novel strand-specific RT-PCR for detection of hepatitis C virus negative-strand RNA (replicative intermediate): evidence of absence or very low level of HCV replication in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol Methods* 2002;100:97-105.
- 16) Liu HS, Lin YL, Chen CC. Comparison of various methods of detection of different forms of dengue virus type 2 RNA in cultured cells. *Acta Virol* 1997;41:317-24.
- 17) Vaughan G, Olivera H, Santos-Argumedo L, Landa A, Briseño B, Escobar-Gutiérrez A. Dengue virus replicative intermediate RNA detection by reverse transcription-PCR. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:198-200.
- 18) Jang SY, Jeong WH, Kim MS, Lee YM, Lee JI, Lee GC, et al. Detection of replicating negative-sense RNAs in CaCo-2 cells infected with human astrovirus. *Arch Virol* 2010;155:1383-9.
- 19) Ali N, Tardif KD, Siddiqui A. Cell-free replication of the hepatitis C virus subgenomic replicon. *J Virol* 2002;76:12001-7.
- 20) Bartholomeusz AI, Wright PJ. Synthesis of dengue virus RNA *in vitro*: initiation and the involvement of proteins NS3 and NS5. *Arch Virol* 1993;128:111-21.
- 21) Barton DJ, Black EP, Flanegan JB. Complete replication of poliovirus *in vitro*: preinitiation RNA replication complexes require soluble cellular factors for the synthesis of VPg-linked RNA. *J Virol* 1995;69:5516-27.
- 22) Chu PW, Westaway EG. Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology* 1985;140:68-79.
- 23) Gu C, Zheng C, Shi L, Zhang Q, Li Y, Lu B, et al. Plus- and minus-stranded foot-and-mouth disease virus RNA quantified simultaneously using a novel real-time RT-PCR. *Virus Genes* 2007;34:289-98.