

## 출아효모에서 재조합 neoagarobiose hydrolyase의 생산을 위한 최적 발현시스템

정혜원, 김연희\*

동의대학교 바이오응용공학부 의생명공학전공

Received: June 17, 2019 / Revised: July 2, 2019 / Accepted: July 4, 2019

### Optimal Expression System for Production of Recombinant Neoagarobiose Hydrolyase in *Saccharomyces cerevisiae*

Hye-Won Jung and Yeon-Hee Kim\*

Biomedical Engineering and Biotechnology Major, Division of Applied Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 47340, Republic of Korea

In this study, the *NABH558* gene expression system was constructed to efficiently produce neoagarobiose hydrolase (NABH) in *Saccharomyces cerevisiae* strain. The *ADH1* and *GAL10* promoters of the pAMF $\alpha$ -NABH and pGMF $\alpha$ -NABH plasmids were examined to determine the suitable promoter for the *NABH558* gene expression, respectively. The effect of promoter and carbon sources on *NABH558* gene expression was investigated by transforming each plasmid into the *S. cerevisiae* 2805 strain. The NABH activity in the 2805/pAMF $\alpha$ -NABH strain was 0.069 unit/ml/DCW in YPD medium, whereas that in the 2805/pGMF $\alpha$ -NABH strain was similar (0.02–0.027 unit/ml/DCW) irrespective of the medium composition. The higher NABH activity in the YPD medium was due to the increased *NABH558* gene transcription. NABH produced in the recombinant strains could degrade agarose to galactose and AHG. This indicated that *ADH1* promoter was a more optimal promoter for the expression of *NABH558* gene than the *GAL10* promoter. The NABH activity induced by the *ADH1* promoter was about 3-fold higher than that induced by the *GAL10* promoter.

**Keywords:** Carbon source, neoagarobiose hydrolase, promoter strength, *Saccharomyces cerevisiae*, signal sequence

화석연료의 고갈 및 지구온난화에 따른 친환경 바이오연료(바이오에탄올)의 공급이 시급해짐에 따라 바이오연료의 생산에 관한 연구개발 및 생산량이 급증하고 있다[1]. 따라서 단위면적당 높은 생산성과 고농도의 탄수화물, 난분해성 리그닌의 함량이 적은 해조류 바이오매스를 이용한 바이오에탄올의 생산이 대안으로 부각되고 있다[2, 3]. 해조류는 상대적으로 glucan의 함량이 낮아 해조류 바이오에탄올을 생산하기 위해서는 glucan 외의 다른 탄수화물(다당)의 선택이 필요하게 되는데, Yanagisawa 등은 glucan 대신에 galactan을 사용하여 한천(agar weed)으로부터 55 g/l의 에탄올 생산을 보고하였다[4]. 한천을 구성하고 있는 galactan은 agarose와 agaropectin으로 이루어져 있으며, 3,6-anhydro-L-

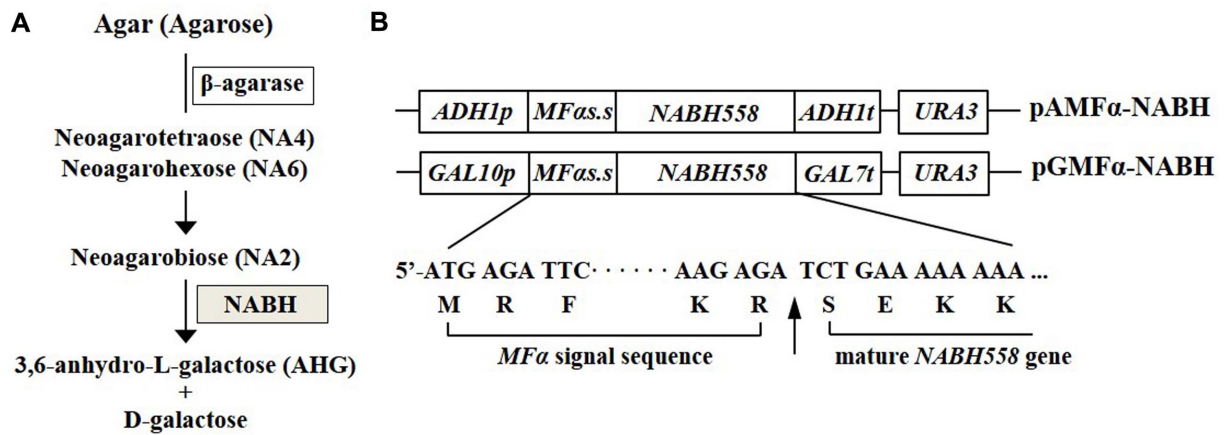
galactose (AHG)와 D-galactose의  $\alpha$ -1,3 결합과  $\beta$ -1,4 글라이코시드 결합으로 연결되어 있는 중합체(polymer)이다[5]. 한천을 이용한 바이오에탄올의 생산을 위해서는 agarose를 발효당(galactose)으로 당화(saccharification)하는 공정이 필수적이며, 이를 위해서는 agarose의 선택적 당화 및 발효부산물인 환경에 미치는 영향이 적은 효소학적 공정[6]이 바람직하다고 할 수 있다. 한천 바이오매스의 효소학적 당화를 위해서는 agarose의  $\alpha$ -1,3 결합을 절단하여 agarooligosaccharide를 생산하는  $\alpha$ -agarase [7]와  $\beta$ -1,4 결합을 절단하여 neoagarooligosaccharide를 생산하는  $\beta$ -agarase가 필요하다[8]. 또한  $\beta$ -agarase에 의한 생성물 중 neoagarobiose (L-3,6-anhydrogalactosyl- $\alpha$ -1,3-D-galactose)는 neoagarobiose hydrolase (NABH)에 의해 더 가수분해되어 최종적으로 D-galactose와 AHG로 분해된다(Fig. 1A) [9, 10]. 하지만 NABH를 포함한  $\alpha$ -agarase의 경우는  $\beta$ -agarase와 달리 낮은 효소활성 및 생산성으로 산업적 이용에 한계

#### \*Corresponding author

Tel: +82-51-890-2281, Fax: +82-504-033-6356

E-mail: yeonheekim@deu.ac.kr

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology



**Fig. 1. Scheme of agarose degradation by acting  $\beta$ -agarase and neoagarobiose hydrolyase (NABH) (A) and expression plasmid for NABH, pAMF $\alpha$ -NABH and pGMF $\alpha$ -NABH. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence indicate the MF $\alpha$ .s-NABH558 gene junction region. The arrow indicates a cleavage site by the KEX2 protease.**

가 있어,  $\alpha$ -agarase의 생산을 위한 최적 공정이 추가적으로 요구되는 실정이다[11]. 따라서 한천 바이오매스로부터 효율적으로 바이오에탄올을 생산하기 위해서는 agarose를 최종 발효당인 galactose로 변환하는 NABH 효소의 최적 생산조건이 요구되며, NABH의 활성증가를 위한 발현을 증가가 필요하게 된다. 따라서 본 연구에서는  $\beta$ -agarase와는 달리 유전자의 발현율과 생산성이 낮은 NABH 효소의 발현을 증가를 위한 최적의 발현 시스템 및 배양조건을 확립하여 해조류 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산에 적합한 생산조건을 최적화하고자 하였다.

본 연구에는 *Saccharomyces cerevisiae* 2805 (*MAT $\alpha$  pep4::HIS4 prb1-1.6R can1 GAL2 his3-200 ura3-52*) 균주 [12]를 효모속주세포로 이용하였고, NABH 효소의 생산을 위해 *Gayadomonas joobiniege* G7 균주 유래의 *NABH558* (*AHG558*) 유전자[13]를 이용하였다. *NABH558* 유전자의 발현을 위해 galactose 유도성 promoter인 *GAL10* promoter와 구성적 promoter인 *ADHI1* promoter를 이용하였으며, *GAL10* promoter와 mating factor alpha (MF $\alpha$ ) 분비서열 (MF $\alpha$  s.s) [11, 14, 15] 및 *NABH558* 유전자를 가지는 pGMF $\alpha$ -NABH plasmid [6]를 사용하였다. 또한 *ADHI1* promoter를 가지는 pAMF $\alpha$ -NABH plasmid를 구축하기 위해, pGMF $\alpha$ -NABH plasmid를 주형으로 pAMFa-F와 tNABH-R primer (Table 1)를 사용하여 MF $\alpha$ .s-NABH558 유전자 cassette를 증폭하여 *ADHI1* promoter 하류에 연결시켰다. 각 유전자의 coding region (*NABH558* 유전자의 SEKK로 시작되는 아미노산서열로 시작되는 영역)은 MF $\alpha$  분비서열의 염기성 아미노산 잔기 Lys-Arg (KR) 뒤에 연결되도록 design되었고, 번역 후 분비과정 중 효모세포내의 KEX2 protease (yeast endopeptidase) [16]에 의해 절단되

**Table 1. Oligonucleotides list used in this study.**

Oligonucleotides	Sequences (5'-3')
pAMFa-F	GCT GGA TCC TCT AGA ATG AGA TTC CCA TCC
tNABH-R	TGC TGC AGG AAG CTT TTA GTT GGA GTT CTG
NABH-F	CCGCTAGATAAGAGATCTGAAAAA AAATT
NABH-R	CGCGTCGACTTAGTTGGAGTTCT
ACT1-F	ATCCAAGAGAGGTATCT
ACT1-R	CACACTTCATGATGGAG

어 성숙형(mature form)의 NABH 단백질이 세포 밖으로 분비될 수 있도록 하였다(Fig. 1B).

효모의 성장배지로는 YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) 배지를 사용하였으며, 형질전환체(URA<sup>+</sup>)의 선별을 위한 선별배지로는 YNBCAD (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% casamino acids, 2% dextrose) 배지를 사용하였다. *NABH558* 유전자의 발현 유도를 위해 YPDG (YP + 1% glucose, 1% galactose) 배지, YPG (YP + 2% galactose) 배지와 YNBCADG (YNBCA + 1% glucose, 1% galactose) 배지를 사용하였다. 재조합 효모 균주는 5 ml YNBCAD 배지에서 16-24시간 동안 전배양 한 후, 50 ml YPD, YPDG, YPG, YNBCADG 배지에 각각 접종(initial OD<sub>600</sub> 0.1)하여 30°C, 190 rpm에서 48시간 동안 배양하였다. 균체 농도(optical density (OD))는 분광광도계 (Shimadzu)를 사용하여 600 nm (OD<sub>600</sub>)에서 흡광도를 측정하였고, dry cell weight (DCW)는 미리 측정된 conversion factor (0.3 DCW (g/l)/OD)를 적용하여 산출하였다[17]. Plasmid stability는 배양액을 적당히 희석하여 YPD 평판배지에 도말한 후 자란 약 100개의 colony를 YNBCAD 선별배지로 toothpicking한 다음 형성된 colony 수의 비 (백분율)로

측정하였다. NABH 효소활성의 차이를 정량적으로 비교하기 위해 DNS assay법[6]을 통해 NABH 효소의 활성을 측정하였고, 효소의 활성은 0.2% agarose를 이용하여 40°C에서 1분당 1  $\mu$ mole의 galactose를 생산하는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였다. 세포 내에 잔존하는 NABH 효소활성을 조사하기 위한 세포 파쇄는 Y-PER (Yeast Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific)를 사용하여 효소액을 회수하였으며[18], 모든 실험값은 3회 독립적으로 수행된 실험에서 평균값을 제시하였다. 각각의 형질전환체에서 *NABH558* 유전자의 발현율을 비교하기 위한 RT-PCR 분석을 위해 각 형질전환체의 total RNA로부터 cDNA를 합성하였고, NABH-F/NABH-R primer와 ACT1-F/ACT1-R primer (Table 1)를 사용하여 *NABH558* 유전자와 *ACT1* 유전자(internal control)를 각각 증폭하였다[6, 19]. 각각의 band intensity는 scion image program을 이용하여 측정 분석하였다. 또한 NABH 효소에 의한 agarose 분해산물들은 thin layer chromatography (TLC)를 이용하여 분석하였다[6].

Neogagarobiose hydrolase 유전자의 과발현 및 분비생산을 위해 pAMF $\alpha$ -NABH plasmid와 pGMF $\alpha$ -NABH plasmid는 *S. cerevisiae* 2805 균주에 도입되었고, YNBCAD 배지에서 형질전환체를 1차 선별하였다. 2805/pAMF $\alpha$ -NABH와 2805/pGMF $\alpha$ -NABH 형질전환체 중 무작위적으로 5개의 형질전환체를 선별하여 10 ml YPDG 배지에서 48시간동안 배양하여 NABH 활성을 측정해 본 결과, 2805/pAMF $\alpha$ -NABH 균주는 0.15–0.23 unit/ml의 NABH 활성을 보였고, 2805/pGMF $\alpha$ -NABH 균주는 0.09–0.12 unit/ml의 활성을 보임을 확인할 수 있었다(data not shown). 각 균주의 세포내에 잔존하는 NABH 활성을 조사해본 결과, 매우 낮은 수준의 NABH 활성이 검출되었고, 분비효율(secretion efficiency)을 조사해보니 대부분 95% 이상이 세포밖으로 분비되었음을 확인하였다. 이는 MF $\alpha$  분비서열을 이용한 다양한 재조합 agarase와 xylose reductase 생산에서 90% 이상의 분비효율을 보이는 것보다도 일치한다[6, 18]. 1차 선별한

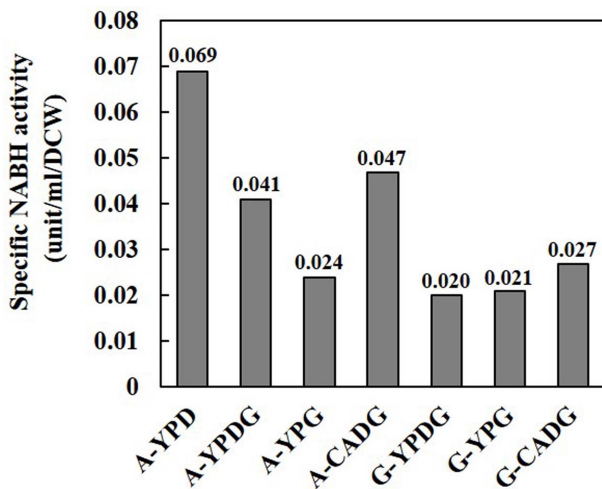
형질전환체 중 가장 높은 활성을 가지는 형질전환 균주를 각각 선별하여 탄소원과 배지조성에 따른 NABH 효소활성을 비교 분석해 보았다(Table 2). 그 결과, 2805/pAMF $\alpha$ -NABH 균주의 경우, YPD 배지에서  $0.408 \pm 0.005$  unit/ml로 가장 높은 NABH 활성을 보였고, 효소활성을 효모 건조균체량(DCW) 대비 specific activity로 환산하여 비교해 보니, YPD 배지가 YPG 배지에서 배양한 경우보다 2.9배 증가되어 있음을 확인하였고, plasmid를 안정하게 유지하고 있는 YNBCADG 배지에서보다도 1.5배 NABH 효소활성이 증가되었음을 확인할 수 있었다. 2805/pGMF $\alpha$ -NABH 균주의 경우는 모든 배지에서 약 0.02 unit/ml/DCW 정도의 NABH 활성을 보임을 알 수 있었다. 따라서 2805/pAMF $\alpha$ -NABH 균주를 YPD 배지에서 배양하여 NABH 효소를 생산하는 것이 가장 높은 NABH 효소활성을 보인다는 것을 알 수 있었으며, *GAL10* promoter 보다 *ADH1* promoter가 *NABH558* 유전자의 발현에는 더 적합함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한 *S. cerevisiae*를 이용한 *EXGA* 유전자( $\beta$ -1,3-glucanase를 코드)의 발현에서 55–66% 정도의 안정성을 보이는 plasmid를 다른 효모 숙주세포에 도입함으로써 76%까지 plasmid stability를 증가시킨 보고[15]에 따라 pAMF $\alpha$ -NABH plasmid를 이용한 최적의 숙주세포의 선정에 의해 plasmid stability를 좀 더 안정하게 유지시킬 수 있을 것이라 생각된다. 그리고 효모염색체내로 *NABH558* 유전자의 직접적인 도입(integration)을 통해서 도입한 plasmid를 안정하게 유지시킨다면 좀 더 높은 효소 활성을 얻을 수 있을 것이라 기대한다[14].

*NABH558* 유전자의 과발현이 유도배지의 조성 및 탄소원에 의해 차이가 난다는 것을 확인하였고, 이러한 활성의 증가가 *NABH558* 유전자의 transcription level의 증가에 의한 것인지 단백질의 번역 후 변형(translational modification)으로 인한 활성 증가의 영향인지 확인해보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 YPDG 배지에서 유도한 경우, 2805/pGMF $\alpha$ -NABH 균주에 비해 2805/pAMF $\alpha$ -NABH 균주에서

**Table 2. Comparisons of cell growth, NABH activity and plasmid stability in *S. cerevisiae* 2805/pAMF $\alpha$ -NABH and 2805/pGMF $\alpha$ -NABH strains.**

Strains	Media	DCW (g/l)	NABH activity (unit/ml)	Plasmid stability (%)
2805/pAMF $\alpha$ -NABH	YPD	5.92	$0.408 \pm 0.005$	48.7
	YPDG	6.16	$0.253 \pm 0.008$	45.9
	YPG	5.58	$0.136 \pm 0.003$	50.1
	YNBCADG	4.11	$0.195 \pm 0.005$	80
2805/pGMF $\alpha$ -NABH	YPDG	6.81	$0.138 \pm 0.006$	68.8
	YPG	5.76	$0.123 \pm 0.004$	65.2
	YNBCADG	2.81	$0.076 \pm 0.008$	84

Each strain was cultivated in various media for 48 h at 30°C and NABH activity was independently determined three times.



**Fig. 2. Comparison of the specific NABH activity in yeast transformants.** Transformants were cultivated in various media for 48 h in a baffled shake-flask to facilitate the expression of NABH, and the activity units were divided by the dry cell weight (DCW). A-YPD, A-YPDG, A-YPG and A-CADG: 2805/pAMF $\alpha$ -NABH strains cultivated in YPD, YPDG, YPG and YNBCADG medium, respectively; G-YPDG, G-YPG and G-CADG: 2805/pGMF $\alpha$ -NABH strains cultivated in YPDG, YPG and YNBCADG medium, respectively.

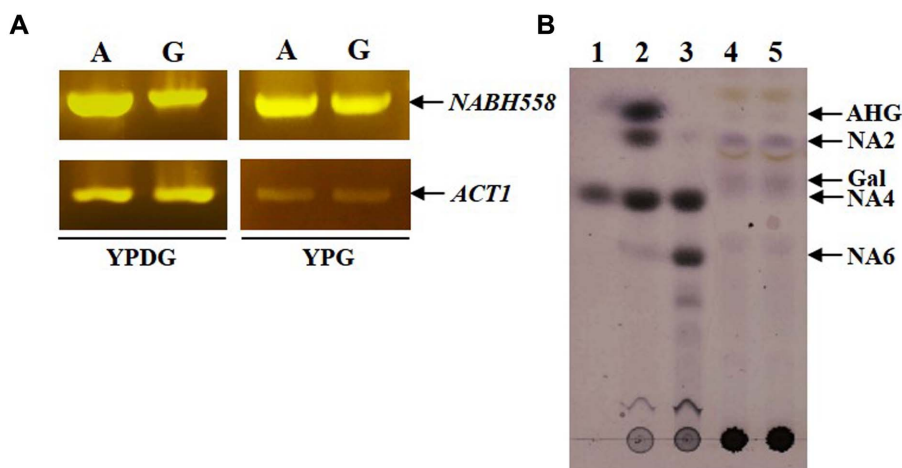
발현된 *NABH558* 유전자의 transcription level이 약 2.5배 증가되었음을 확인할 수 있었고, YPG 배지에서는 두 균주에서 발현된 *NABH558* 유전자의 transcription level의 유의적인 차이는 보이지 않았다(Fig. 3A). 이것은 Fig. 2의 배지 조성에 따른 NABH 활성 증가와도 일치하며, 이는 *ADH1*

promoter에 의해 조절된 *NABH558* 유전자의 transcription level 증가가 NABH 효소 활성의 증가로 나타났음을 시사한다. 또한 재조합 NABH 효소를 이용한 agarose 분해능을 조사해 본 결과(Fig. 3B), 2805/pAMF $\alpha$ -NABH 균주(Fig. 3B, lane 4)와 2805/pGMF $\alpha$ -NABH 균주(Fig. 3B, lane 5)에서 생산된 NABH는 agarose를 neoagarobiose (NA2)를 포함한 한천올리고당(NAO)과 galactose 및 AHG로 분해할 수 있었으며, 이는  $\beta$ -agarase와의 상호작용을 통해 더 많은 galactose를 생산할 수 있음을 시사한다[6].

이상의 결과로부터 한천바이오매스를 발효당(galactose)으로 최종 당화하기 위한 NABH 효소의 활성증가 및 분비생산을 위해 *ADH1* promoter와 MF $\alpha$  분비서열이 적합함을 확인하였으며, 배지조성 및 탄소원의 최적화에 따라 NABH 효소활성을 조절할 수 있었다.

## 요약

본 연구에서는 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용해서 neoagarobiose hydrolase (NABH)를 효율적으로 생산하기 위한 *NABH558* 유전자 발현시스템을 구축하였다. *ADH1* promoter와 *GAL10* promoter 하류에 *NABH558* 유전자를 가진 pAMF $\alpha$ -NABH plasmid와 pGMF $\alpha$ -NABH plasmid는 *S. cerevisiae* 2805 균주에 형질전환되었다. 2805/pAMF $\alpha$ -NABH 균주는 YPD (2% dextrose) 배지에서 가장 높은 NABH 효소 활성(0.069 unit/ml/DCW)을 보였고, 2805/pGMF $\alpha$ -NABH 균주의 경우는 배지의 조성상관없이 비슷한 수준의 NABH 활성(0.02–0.027 unit/ml/DCW)을



**Fig. 3. Analysis of the transcription levels of *NABH558* gene using RT-PCR (A) and TLC chromatogram of hydrolysis products of recombinant NABH on agarose (B).** The *NABH558* and *ACT1* (internal control) genes were amplified by PCR using each cDNA as template, and the products were visualized by agarose gel electrophoresis. Lane A; 2805/pAMF $\alpha$ -NABH strain, lane G; 2805/pGMF $\alpha$ -NABH strain. The hydrolyzed products of agarose by NABH were detected by TLC using silica gel plate. Lane 1; AHG, NA2, NA4, lane 3; NAO, lane 4; agarose+NABH produced by 2805/pAMF $\alpha$ -NABH, lane 5; agarose+NABH produced by 2805/pGMF $\alpha$ -NABH.



보였다. RT-PCR을 통한 *NABH558* 유전자의 transcription level은 NABH 활성 증가에 따라 비슷한 수준으로 증가되었음을 확인할 수 있었다. 또한 재조합균주에서 생산된 NABH는 agarose를 galactose와 AHG로 분해하였다. 따라서 *NABH558* 유전자의 발현에는 *ADH1* promoter를 사용하는 것이 더 효율적이며 *GAL10* promoter와 비교해서 최대 3배 정도 높은 활성의 재조합 NABH를 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

## Acknowledgments

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (2018R1D1A1B07047291).

## Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

## References

- Naik SN, Goud VV, Rout PK, Dalai AK. 2010. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renew Sustainable Energy Rev.* **14**: 578-597.
- John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey M. 2011. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.* **102**: 186-193.
- Lee SM, Kim JH, Cho HY, Joo H, Lee JH. 2009. Production of bio-ethanol from brown algae by physicochemical hydrolysis. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **20**: 517-521.
- Yanagisawa M, Kawai S, Murata K. 2013. Strategies for the production of high concentrations of bioethanol from seaweeds: production of high concentrations of bioethanol from seaweeds. *Bioengineered* **4**: 224-235.
- Duckworth M, Yaphe W. 1971. The structure of agar. I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **16**: 189-197.
- Lee JS, Hong SK, Lee CR, Nam SW, Jeon SJ, Kim YH. 2019. Production of ethanol (agaro-bioethanol) from agarose by unified enzymatic saccharification and fermentation in recombinant yeast. *J. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 625-632.
- Potin P, Richard C, Rochas C, Kloareg B. 1993. Purification and characterization of the  $\alpha$ -agarase from *Alteromonas agarlyticus* (Cataldi) comb. nov., strain GJ1B. *Eur. J. Biochem.* **214**: 599-607.
- Kirimura K, Masuda N, Iwasaki Y, Nakagawa H, Kobayashi R, Usami S. 1999. Purification and characterization of a novel  $\beta$ -agarase from an alkalophilic bacterium, *Alteromonas* sp. E-1. *J. Biosci. Bioeng.* **87**: 436-441.
- Ha SC, Lee S, Lee J, Kim HT, Ko HJ, Kim KH, et al. 2011. Crystal structure of a key enzyme in the agarolytic pathway,  $\alpha$ -neoagarobiose hydrolase from *Saccharophagus degradans* 2-40. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **412**: 238-244.
- Lee S, Lee JY, Ha SC, Jung J, Shin DH, Kim KH, et al. 2009. Crystallization and preliminary X-ray analysis of neoagarobiose hydrolase from *Saccharophagus degradans* 2-40. *Acta. Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **65**: 1299-1301.
- Seok JH, Kim HS, Hatada Y, Nam SW, Kim YH. 2012. Construction of an expression system for the secretory production of recombinant  $\alpha$ -agarase in yeast. *Biotechnol. Lett.* **34**: 1041-1049.
- Park HS, Kim HC, Shin DH, Kim JK, Nam SW. 2005. Expression of *Thermomonoeopora fusca* exoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae* and its application to cellulose hydrolysis. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 267-273.
- Asghar S, Lee CR, Chi WJ, Kang DK, Hong SK. 2019. Molecular cloning and characterization of a novel cold-adapted alkaline 1,3- $\alpha$ -3,6-anhydro-L-galactosidase, *Ahg558*, from *Gayadomonas joobiniege* G7. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **188**: 1077-1095.
- Choi HJ, Kim YH. 2018. Simultaneous and sequential integration by cre/loxP site-specific recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 826-830.
- Kim MJ, Nam SW, Tamono K, Machida M, Kim SK, Kim YH. 2011. Optimization for production of exo- $\beta$ -1,3-glucanase (laminarinase) from *Aspergillus oryzae* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Korean Soc. Biotech. Bioeng. J.* **26**: 427-432.
- Latchinian-Sadek L, Thomas DY. 1993. Expression, purification, and characterization of the yeast *KEX1* gene product, a polypeptide precursor processing carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **268**: 534-540.
- Jo JH, Oh SY, Lee HS, Park YC, Seo JH. 2015. Dual utilization of NADPH and NADH cofactors enhances xylitol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. J.* **10**: 1935-1943.
- Jung HM, Kim JW, Kim YH. 2016. Secretory expression system of xylose reductase (*GRE3*) for optimal production of xylitol. *J. Life Sci.* **26**: 1376-1382.
- Hummon AB, Lim SR, Difilippantonio MJ, Ried T. 2007. Isolation and solubilization of proteins after TRIZOL extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *Biotechniques* **42**: 467-472.