آنزیم لوسیفراز و موارد مختلف کاربرد آن

چکیده

آنزیم لوسیفراز و سوبسترای آن، لوسیفرین، از عوامل اصلی پدیده بیولومینسانس یا نشر نور توسط موجودات زنده می باشند. تمام واکنش‌های بیولومینسانس شناخته شده نیازمند به اکسیژن و میانجی گری پراکسیداز بوده که در نتیجه اکسیداسیون در آنها نور تولید می‌گردد. طبقه بندی لوسیفراز به صورت لوسیفراز باکتریایی، لوسیفراز کرم شب تاب، لوسیفراز دینوفلاژله‌ها و لوسیفراز مرجانی صورت می‌گیرد. مکانیسم‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی موثر در پدیده بیولومینسانس در بین ارگانیسم-های نورانی و همچنین عملکرد آن در یک ارگانیسم نسبت به ارگانیسم دیگر متفاوت بوده و برای دفاع در برابر شکارچیان، شکار و یا برای ارتباط با جفت خود مورد استفاده قرار می گیرد. لوسیفراز یکی از مهمترین آنزیم‌های صنعتی بوده و این آنزیم، در گستره وسیعی از تکنیک‌های تشخیصی کاربرد دارد. تولید نور توسط آنزیم لوسیفراز یکی از حساس ترین ابزارهای تشخیص مقدار ATP از طریق لومینومتری می باشد که از آن جهت تشخیص آلودگی های میکروبی، ارزیابی فسفاتازها، توالی یابی DNA به روش پیروسکونسینگ، اندازه گیری میزان زنده مانی، تهیه کیت های تشخیص سرطان و زیست حسگرها، غربال گری داروها، بررسی روابط برهمکنشی و تاخوردگی پروتئین ها، سنجش های آنزیمی و همچنین به عنوان گزارشگر و ... استفاده می شود.

کلمات کلیدی

آنزیم لوسیفراز ، بیولومینسانس ، ژن گزارشگر، لومینومتری

مقدمه

نشر نور توسط موجودات زنده یا همان بیولومینسانس[3] از جالب ترین پدیده های زیستی در طبیعت بوده که در موجودات مختلفی از قبیل حشرات، کیسه تنان، قارچ‌ها، ماهی‌ها و باکتری‌ها مشاهده می‌شود. این مجموعه موجودات شامل گونه‌های خشکی زی، آب شیرین و آب شور بوده و حدود 50 درصد از شاخه های گیاهی و جانوری را شامل می شوند. عملکرد بیولومینسانس ممکن است در یک ارگانیسم نسبت به ارگانیسم دیگر متفاوت باشد از جمله برای دفاع در برابر شکارچیان، شکار و یا برای ارتباط با جفت خود

[1] دانشجوی دکترای تخصصی زیست شناسی - میکروبیولوژی - دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال- دانشکده علوم زیستی

[2] دانشیار و عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال- دانشکده علوم زیستی- گروه میکروبیولوژی

[3] **Bioluminescence**

[1]. بیولومینسانس به فرایند تبدیل انرژی شیمیایی به نور در سیستم‌های زیستی گفته می شود و به دو جزء اصلی یعنی آنزیم لوسیفراز و سوبسترای لوسیفرین بستگی دارد. آنزیم های در گیر در این فرایند با نام کلی لوسیفراز نام‌گذاری شده اند و واکنش آنزیم ها عموما منجر به تولید نورسبز- زرد می گردد [2]. مکانیسم های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی موثر در پدیده بیولومینسانس در بین ارگانیسم های نورانی متفاوت است، در واقع اجزای واکنش در ساختار متفاوت بوده ولی نقش مشابه دارند [3]. تمام واکنش های بیولومینسانس شناخته شده نیازمند به اکسیژن [4] و میانجی گری پراکسیداز هستند. لوسیفراز می تواند در دو مسیر مختلف عمل کند. مسیر بیولومینسانس و مسیرکوانزیم آ لیگاز. در هر دو مسیر لوسیفراز در ابتدا یک واکنش آدنیلاسیون با Mg^{2+} و **ATP** را کاتالیز می کند. مطالعات ساختاری نشان داده اند که این پروتئین از تا خوردگی دو دمین متراکم تشکیل شده است: یک دمین انتهای **N** بزرگ و یک دمین انتهای **C** کوچک که توسط یک لولای انعطاف پذیر به هم مرتبط شده اند که موجب شکل گیری یک شکاف بزرگ بین این دو ناحیه شده است [5]. اسیدهای آمینه موثر در پدیده بیولومینسانس عمدتا به دمین انتهای **N** تعلق دارند [۶،۷و8]. دو نوع تابش نور رنگی برای واکنش لوسیفرین/ لوسیفراز توصیف شده است. تابش نور معمول زرد- سبز با انرژی بالا و با طول موج 562 نانومتر در **pH** 7.5 و تابش نور قرمز با طول موج 620 نانومتر وقتی که **pH** آن به 5 کاهش می یابد [10و9]. تحقیق در زمینه آنزیم لوسیفراز در پنج برهه‌ی زمانی در قرن بیستم آغاز شد. اولین لوسیفراز کلون شده و همچنین اولین لوسیفرازی که ساختار آن شناسایی شد آنزیم لوسیفراز باکتریایی بود (جدول 1).

جدول 1- مطالعات انجام شده بر روی آنزیم لوسیفراز

پژوهش انجام شده	سال انجام پژوهش	منبع
استخراج و تخلیص آنزیم لوسیفراز باکتریایی از ویبریو هاروئی[4]	1954	**[11]**
استخراج آنزیم لوسیفراز با روش تبلور	1956	**[12]**
شناسایی ساختار لوسیفراز حشره شب تاب برای نخستین بار	1970	**[13]**
تجریه و تحلیل ساختار و مکانیسم لوسیفراز باکتریایی ویبریو فیشری[5] و معرفی حضور دو زیر واحد غیر یکسان با بکار گیری الکتروفورز ژل اکریلامید	1976	**[14]**

با توجه به این که مطالعات مختلفی بر روی آنزیم لوسیفراز در موجودات نورانی گوناگون صورت گرفته و کاربردهای وسیعی از آن در زیست فناوری و زیست شناسی سلولی و مولکولی وجود دارد، لذا در این مطالعه به بررسی آنزیم لوسیفراز و کاربردهای مختلف آن خواهیم پرداخت.

1. طبقه بندی آنزیم لوسیفراز:

طبقه بندی لوسیفرازها بر اساس نوع موجودی که در آن یافت شده اند به صورت لوسیفراز باکتریایی[6]، لوسیفراز کرم شب تاب[7]، لوسیفراز دینوفلاژله ها[8] و لوسیفراز مرجانی[9] صورت می گیرد [15].

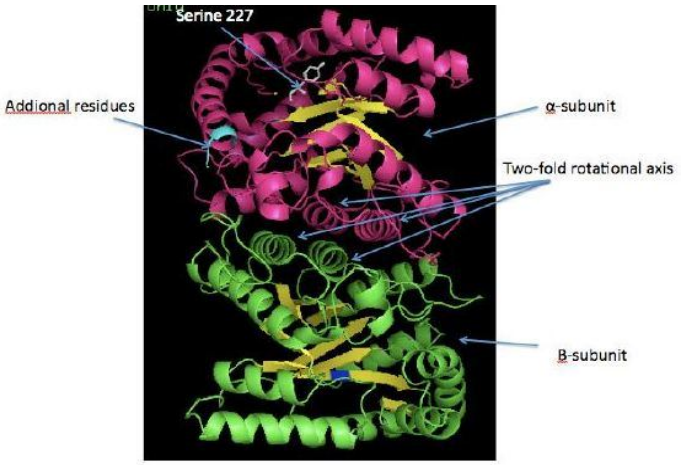
---

[4] **Vibrio harveyi**
[5] **Vibrio fischeri**

[6] **Bacterial luciferase**
[7] **Firefly luciferase**

أ. لوسیفراز باکتریایی

باکتری‌های لومینسانس نسبت به سایر موجودات لومینسانس از گستردگی بیشتری برخوردارند، بطوری‌که در 11 گونه از چهار جنس: فتوباکتریوم[10]، ویبریو[11]، شوانلا (آلتروموناس)[12] و زنورابدوس[13] قرارگرفته و در دو خانواده ویبریوناسه[14] و انتروباکتریاسه[15] نشر نور گزارش شده است [5و4]. تاکنون لوسیفراز باکتریایی از اشرشیاکلی[16]، فتوباکتریوم فسفورئوم[17]، ویبریو فیشری و ویبریو هاروئی استخراج شده است [14و11]. مکانیسم بیولومینسانس در باکتری های مختلف، مشابه است. سوبستراهای واکنش بیولومینسانس در باکتری‌های لومینسانس؛ فلاوین مونو نوکلئوتید احیا شده[18]، آلدئید و اکسیژن است. باکتری‌های بیولومینسانس نور سبز- آبی با طول موجی بین450 تا490 نانومتر را از خود نشر می دهند [16]. تمام لوسیفرازهای باکتریایی یک هترودایمر از دو پلی پپتید آلفا (**α**) و بتا (**β**) هستند (شکل 1). زیر واحد های **α** (40کیلودالتون) و **β** (37 کیلودالتون) به ترتیب توسط ژن‌های **luxA** و **luxB** که در اپرون **lux** قرار گرفته اند رمز می شوند [17].



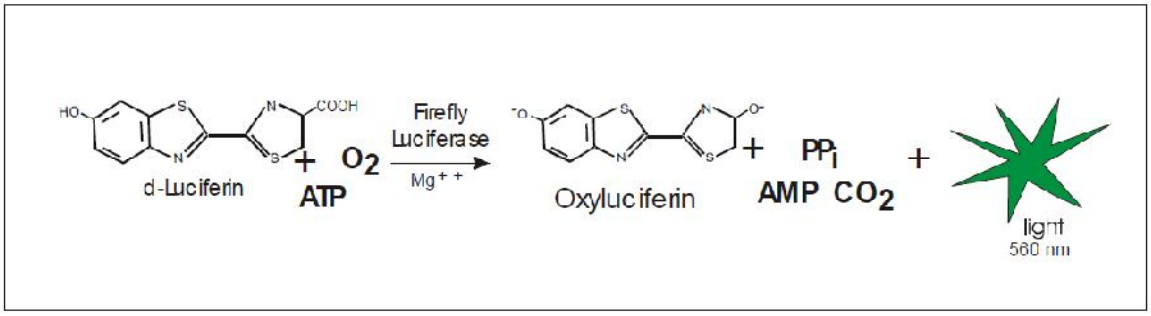
شکل 1: لوسیفراز باکتریایی [18]

ب. لوسیفراز حشره شب تاب

به دلیل کاربرد فراوان لوسیفراز حشره شب تاب، بیشتر مطالعات بر روی این آنزیم صورت گرفته است. این آنزیم (EC 1.13.12.7) از حشره شب تاب فوتینوس پیرالیس[19] بدست آمده و به عنوان یک معرف آزمایشگاهی اغلب به این نام اشاره شده است، اگر چه لوسیفرازهای نوترکیب از چندین گونه کرم شب تاب دیگر نیز به صورت تجاری در دسترس هستند. در حشره شب تاب، واکنش لوسیفراز در پراکسی زوم های اندام نوری مشخصی صورت می گیرد. این آنزیم با استفاده از Mg^{2+} O_2 و ATP با انجام عمل دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو بر روی سوبسترای D- لوسیفرین، نور سبز-زرد و نیز آدنوزین مونوفسفات، دی اکسید کربن، اکسی لوسیفرین و پیروفسفات تولید می‌کند (شکل 2) [20و19و2].

---

[8] **Dinoflagellate luciferase**
[9] **Coelentrate luciferase**
[10] **Photobacterium**
[11] **Vibrio**
[12] **Shewanella(Alteromonas)**
[13] **Xenorhabdus**
[14] **Vibrionaceae**
[15] **Entrobacterieceae**
[16] **Escherichia coli**
[17] **Photobacterium phosphoreum**
[18] **$FMNH_2$**
[19] **Photinus pyralis**

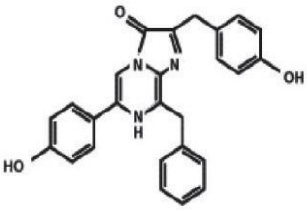


شکل 2: واکنش های بیولومینسانت کاتالیز شده توسط لوسیفراز حشره شب تاب [21].

رنگ بیولومینسانس لوسیفراز کرم شب تاب می تواند بین سبز- زرد (λ_{max} = 550 nm) و قرمز (λ_{max} = 620) متغیر باشد.

ج. لوسیفراز مرجانی

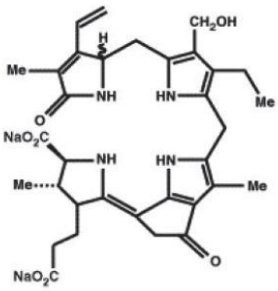
لوسیفراز و لوسیفرین (کوالنترازین)[20] در مرجان‌ها در حضور اکسیژن به یکدیگر متصل شده و واحدی به نام اکواورین[21] را تشکیل می دهد. فوتو پروتئین کوالنترات[22] به منظور رهایی لومینسانس خود به یون کلسیم نیاز دارد. سپس سوبسترا به منظور اکسید شدن توسط لوسیفراز در دسترس قرار گرفته و با آزاد سازی انرژی به کوالنترامید تجزیه می گردد (شکل 3) [22].



شکل 3: لوسیفراز مرجانی [15].

د. لوسیفراز دینوفلاژله ها

لوسیفراز دینوفلاژله‌ها یک پروتئین چند دمینه متشکل از یک دمین انتهای N و سه دمین کاتالیتیکی می باشد. لوسیفراز و دمین-هایش در **pH**=8 فعالیتی نداشته اما به شدت در **pH**=6.5 فعال می گردند. لوسیفرین دینوفلاژله ها شبیه به کلروفیل بوده و دارای یک حلقه تتراپیرول می باشد (شکل 4) [23].



شکل 4: لوسیفرین دینوفلاژله ها [15].

[20] **Coelenterazine**
[21] **Aequorin**
[22] **coelenterate**

2. استخراج لوسیفراز:

استخراج لوسیفراز می تواند از طریق لیز مکانیکی و یا به روش لیز شیمیایی صورت پذیرد:

لیز مکانیکی: روش سونیکاسیون متداول‌ترین روش لیز مکانیکی جهت تخریب سلول است فقط در نتیجه وارد کردن انرژی زیاد به نمونه حرارت بالایی تولید می‌گردد در نتیجه در هنگام استفاده از این روش باید به این نکته توجه داشت که آنزیم لوسیفراز نسبت به دما ناپایدار بوده و خنک کردن نمونه می‌تواند برای استخراج لوسیفراز مفید بوده و غیر فعال شدن آن را تا حد امکان کاهش دهد.

3. کاربرد آنزیم لوسیفراز

آنزیم لوسیفراز به طور وسیعی در زیست فناوری و زیست شناسی سلولی و مولکولی مورد استفاده قرار می گیرد .لوسیفراز یکی از مهمترین آنزیم های صنعتی می باشد که در تکنیک های تشخیصی گسترده ای کاربرد دارد .تولید نور توسط آنزیم لوسیفراز یکی از حساس ترین ابزارهای تشخیص مقدار ATP در لومینومتری می باشد که از آن، جهت تشخیص آلودگی های میکروبی، توالی یابی DNA به روش پیروسکونسینگ[23]، اندازه گیری میزان زیست پذیری[24]، ارزیابی فسفاتازها، تهیه کیت های تشخیص سرطان و زیست حسگرها، بررسی روابط برهمکنشی و تاخوردگی پروتئین ها، غربال گری داروها، سنجش های آنزیمی و به عنوان ژن گزارشگر فراوان کاربرد دارند[26و25و24].

أ. سیستم ژن گزارشگر و نمایان ساختن آن

سیستم ژن گزارشگر به عنوان شاخصی جهت مطالعه بیان ژن و وقایع سلولی مرتبط با آن مانند فعالیت رسپتور، انتقال از طریق سیگنال‌های داخل سلولی، پردازش mRNA و برهم‌کنش‌های پروتئین- پروتئین و پیچ خوردگی آنها مورد استفاده قرار می‌گیرند. به طور معمول یک ژن گزارشگر با توالی DNA مورد نظر در وکتور بیانی که سپس به سلول منتقل می شود کلون شده است. به دنبال انتقال، سلول‌ها به منظور ارزیابی وجود گزارشگر، یا اندازه‌گیری مستقیم میزان پروتئین و یا فعالیت آنزیمی آن مورد سنجش قرار می‌گیرند. پروتئین‌های گزارشگر می‌توانند از طریق تشخیص خصوصیات ذاتی از قبیل فعالیت آنزیمی، خصوصیات اسپکتروسکوپیک و یا به طور غیرمستقیم با سنجش بر پایه آنتی بادی مورد ارزیابی قرارگیرند. گزارشگران بیولومینسانس ایده‌های خوبی هستند زیرا دربردارنده ویژگی‌هایی چون:

- اندازه گیری فوری
- حساسیت فوق العاده
- پویایی گسترده
- عدم فعالیت درون زاد در سلول های میزبان و در نتیجه عدم تداخل با کمیت سنجی

می باشند[27].

تحقیقات پایه در بیولومینسانس منجر به کاربردهای زیادی در این زمینه مخصوصاً دربیولوژی مولکولی شده است. برخی کاربردهای آن عبارت است از: مشخص کردن عملکرد عوامل ژنتیکی عمل کننده به صورت سیس[25] مانند پروموتورها و افزایش دهنده‌ها، بررسی مسیرهای انتقال درون سلولی پیام و کاربرد به عنوان زیست حسگر، بررسی اثر RNA های مداخله گر، انتقال انرژی رزونانس بیولومینسانسی[26] و تصویربرداری ازسلول زنده [28].

---

[23] **Pyrosequencing**
[24] **Viability**
[25] **Cis-acting**
[26] **Bioluminescenceresonance energy transfer (BRET)**

ب. تحقیقات مرتبط با سیستم RNAi

تداخل RNA (RNAi) مکانیسمی است که بیان ژن در مرحله ترجمه را مهار کرده و یا از رونویسی ژن‌های خاص ممانعت می کند. RNA های مداخله‌گر کوچک (siRNA)، ابزاری جهت انجام فرایند تداخل RNA بوده و توالی نوکلئوتیدی مکمل رشته RNA هدف را دارا می باشند. زو [27] و همکاران نشان دادند که DNA های آنتی سنس[28] و siRNA توانایی مهار فعالیت لوسیفراز گزارشگر در سلول های پستانداران را دارا می باشند [29] .

4. بررسی برهم‌کنش بین پروتئین‌ها

لوسیفراز می‌تواند به منظور بررسی برهم‌کنش بین پروتئین‌ها و فسفریلاسیون آنها مورد استفاده قرار گیرد. در سال 2001، کوزاوا[29] و همکاران فسفریلاسیون هر نوع پروتئین و برهم کنش بین پروتئین‌های سراسری غشا (کلاسی از مولکول‌ها که مطالعه آنها با روش‌های ژنتیک و بیوشیمیایی موجود دشوار است) را با قطعات طراحی شده لوسیفراز حشره شب تاب و بر اساس پیرایش پروتئین مورد مطالعه قرار دادند[30].

5. آنالیز سلول

به همان اندازه که سطح ATP در سلولهای پستانداران به طور دقیقی کنترل می شود، سطح آن به طور چشمگیری زمانی که سلول مرده است و سنتز ATP متوقف شده، افت می کند. لوسیفراز همچنین می تواند جهت تشخیص سطح ATP سلولی برای ارزیابی حیات سلول و یا جهت سنجش فعالیت کیناز به کار رود[31].

6. شناسایی میکروارگانیسم

در شرایط نرمال، باکتری های بیولومینسانت نور آبی را در طول موج 450-490 نانومتر منتشر می کنند. پس از تماس با نمونه (به عنوان مثال فاضلاب) که دربردارنده غلظت معینی از ماده مهاری بوده، شدت نور باکتری بیولومینسانت تغییر خواهد کرد که این خود به سمیت ماده مهاری وابسته است. الیسون هورسبرگ[30] و همکاران، لوسیفراز بر پایه بیوسنسور را جهت تست سمیت به منظور بررسی کیفیت آب بکار بردند [32].

أ. کاربرد در صنایع غذایی

به منظور توجه به تقاضای صنایع غذایی، روش های حساس و سریع به منظور ارزیابی کیفیت میکروبیولوژیکی مواد غذایی مختلف و آب گسترش پیدا کرده است. به تازگی روش سنجش ATP بیولومینسانس، امکان بررسی سریع و همچنین شناسایی باکتری (مقدار جزیی از هر منبع آلودگی در هنگام حمل مواد غذایی، ذخیره سازی و فرآوری آنها) را بر این اساس که تمام سلول های زنده دربردارنده آدنوزین تری فسفات(ATP) می‌باشند، فراهم کرده است. در واقع ATP بیولومینسانس روش شمارش میکروبی نبوده، اما به اندازه کافی جهت شناسایی محتوای ATP در سلول‌های منفرد و به تعداد کم حساس می باشد. شدت ATP، مستقیما با سلولهای باکتری موجود درنمونه در ارتباط بوده و لوسیفراز با ATP به منظور ایجاد نور واکنش می دهد. برخی از باکتری‌های رایج که محققین در حال بررسی و از بین بردن آن‌ها با این روش می باشند شامل استافیلوکوکوس[31]، سالمونلا [32] اشرشیاکلی و استرپتوکوکوس[33] و ... بوده، که این باکتری‌ها باعث مسمومیت غذایی می گردند [33].

---

[27] **Xu**
[28] **Antisence**
[29] **Qzawa**
[30] **Alison M. Horsburgh**
[31] **Staphylococcus**
[32] **Salmonella**
[33] **Streptococcus**

ب. شیر و محصولات وابسته به آن

روش های ATP بیولومینسانس می‌توانند جهت بررسی کیفیت شیر خام از نقطه نظر شمارش سلول های سوماتیک پستان و میکروبی مورد استفاده قرار گیرند. نشانه ای از شدت سلول سوماتیک در شیر را می توان با استفاده از شدت ATP موجود در شیر به دنبال تیمار با دترجنت های غیر یونی بدست آورد که در واقع می تواند به عنوان شاخصی برای عفونت پستان مورد استفاده قرار گیرد [34]. حضور باکتریوفاژ و آنتی بیوتیک‌ها می‌تواند در فرآیندهای تولید ماست و پنیر موجب ایجاد مشکل شود. استرپتوکوک-های لاکتیک اسید بیولومینسانت به منظور استفاده به عنوان شاخصی جهت تشخیص وجود فاژهای لیتیک و یا آنتی بیوتیک‌ها مفید می باشند [33].

ج. ارگانیسم‌های تشکیل دهنده اسپور و بیولومینسانس

لوسیفراز باکتریایی می‌تواند در ارگانیسم‌های گرم مثبت دارای عملکرد باشد، اگر چه در انواع گرم منفی نیز عملکرد آن نشان داده شده است. اسپورهای بدست آمده از سلول های رویشی دارای فنوتیپ بیولومینسانت، تیره هستند. در زمان جوانه زنی اسپورها، انتقال الکترون و شروع متابولیسم از همان ابتدا صورت می گیرد. جوانه زنی در اسپورهای حاوی ژن lux ، با ظهور نور همراه بوده که این به نوبه خود بررسی حساس و دقیق زمانی جوانه زدن و فرایندهای رشد را فراهم می‌کند. اسپورهایی که از بین رفته و یا آسیب دیده اند و قادر به جوانه زدن نمی باشند، نوری تولید نمی کنند[36و35] .

7. مزایا و معایب سنجش ATP بیولومینسانس و سیستم لومینسانس باکتریایی در میکروبیولوژی غذایی

سنجش ATP بیولومینسانس روشی بسیار سریع و حساس بوده اما اختصاصی نیست. با این روش می‌توان حتی کمترین تعداد سلول را با لومینومتر اندازه گیری کرد. اما همانند هر تکنولوژی جدید، این روش معایبی نیز دارد. بدین معنی که ترکیبات خاص و یا ترکیبات غیر میکروبی بیولومینسانت در نمونه‌های بیولوژیکی می‌توانند به شدت میزان نور اندازه گیری شده را کاهش و یا افزایش دهند. از دیگر معایب در صنعت میکروبیولوژی غذایی این است که سنجش‌های بیولومینسانس باکتریایی در مقایسه با سنجش ATP بیولومینسانس هنوز در مراحل اولیه و آزمایشی خود بوده است [33].

نتیجه گیری

مطالعات بسیاری بر روی آنزیم لوسیفراز در موجودات لومینسانس مختلف انجام شده و در دهه های اخیر گرایش زیادی برای تولید تجاری آنزیم لوسیفراز به منظور توسعه تکنولوژی‌های مبتنی بر این آنزیم و جایگزینی آن‌ها به جای روش‌های قدیمی غربالگری به وجود آمده است. کاربردهای بسیاری از این آنزیم و مولکول های مرتبط با آن وجود دارد. تولید نور توسط لوسیفراز یکی از حساسترین ابزارهای تشخیصی در بسیاری از مطالعات سلولی و مولکولی بوده و بررسی ها درباره این آنزیم و پدیده بیولومینسانس در حال پیشرفت می باشد.

منابع

[1] Hastings J, W., Potrikas, C. J., Gupta, S. C., Kurfurst, M., and Makemson, J. C: Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria. Ado. Microbiot Physiol.1985, 26: 235-291.

[2] Gomi, K, Hirokawa, K, and Kajiyama, N: Molecular cloning and expression of the cDNA encoding luciferin regenerating enzyme from Luciola cruciata and Luciola lateralis. Gene.2002, 294:157-166.

[3] Campbell A. K: Living light: biochemistry, function and biomedical applications. Essays Biochem. 1989,24:41-76.

[4] Harvey E. N: Bioluminescence Academic Press, New York, 1952.

[5] Conti E, Franks N. P. & Brick, P: Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. Structure.1996,4: 287–298.

[6] Branchini, B. R, Murtiashaw, M. H, Magyar, R. A. & Anderson, S. M: (2000). The role of lysine 529, a conserved residue of the acyl-adenylate-forming enzyme superfamily, in firefly luciferase. Biochemistry.2000, 39: 5433–5440.

[7] Thompson, J. F, Geoghegan, K. F, Lloyd, D. B, Lanzetti, A. J, Magyar, R. A, Anderson, S. M., & Branchini, B. R: Mutation of a protease-sensitive region in firefly luciferase alters light emission properties. Journal of Biological Chemistry.1997, 272: 18766–18771.

[8] Zako T, Ayabe K, Aburatani T, Kamiya N, Kitayama A, Ueda H. & Nagamune, T: Luminescent and substrate binding activities of firefly luciferase N-terminal domain. Biochimica et Biophysica Acta - Proteins & Proteomics.2003, 1649: 183–189.

[9] Seliger, H. H, Buck, J. B, Fastie, W. G. & McElroy, W. D: (1964). The spectral distribution of firefly light. Journal of General Physiology.1964 48: 95–104.

[10] Seliger, H. H. & McElroy, W. D: (1964). The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity. Proceedings of the National Academy of Sciences.1964, 52: 75–81.

[11] Mcelory WD,Green AA: Enzymatic Properties of Bacterial Luciferase [J] . Arch Biochem.1955,56(1) : 240-255 .

[12] Green AA , Mcelory WD: Crystalline Firefly Lucif erase [J] . Biochim Biophys Act a .1956, 20 (1) : 170-176.

[13] Denburg JL. , Mcel roy WD: Catalytic Subunit of Firefly Luciferase [J] . Biochrmistry.1970 ,9(24) : 4619-4624 .

[14] Friedland J, Hastings J W: Nonidentical Subunit s of Bacterial Luciferase : Their Isolation and Recombination to for m Active Enzyme[J] . Proc Natl Acad Sci USA. 1967 , 58 (6) : 2336- 2342.

[15] Day John C, Tisi Laurence C.& Bailey Mark J: Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin. Luminescence 2004, 19: 8–20.

[16] Vet rova EV , Kudryasheva NS , Visser AJ , et al :Characteristics of endogenous flavin fluorescence of Photobacterium leiognathi luciferase and Vibrio fischeri NAD(P)H:FMN-oxidoreductase. [J] . Luminescence .2005 ,20(3) :205-209.

[17] Baldwin TO, Christopher JA, Raushel FM, Sinclair JF, Ziegler MM, Fisher AJ, Rayment I: Structure of bacterial luciferase. current Opinion in Strucrural Biology. 1995, 5: 798-809.

[18] Fisher, A.J., Thompson, T.B., Thoden, J.B., Baldwin, T.O., Rayment, I: The 1.5-A resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions. J.Biol.Chem. 1996, 271: 21956-21968.

[19] Gould SJ & Subramani S: "Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology". Analytical Biochemistry. 1988,175 (1): 5–13.

[20] Baldwin TO:"Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains". Structure.1996, 4 (3): 223–8.

[21] Luciferase Measurements using the Clarity™ Luminescence Microplate Reader Luminescence made easy. [http://www.biotek.com].

[22] Shimomura O: "Bioluminescence in the sea: photoprotein systems". Symposia of the Society for Experimental Biology. 39: 351–72.

[23] Schultz LW, Liu L, Cegielski M& Hastings JW: (Feb 2005). "Crystal structure of a pH-regulated luciferase catalyzing the bioluminescent oxidation of an open tetrapyrrole" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.2005, 102 (5): 1378–83.

[24] Thore, A., Lundin, A. and Ansehn, S: Firefly luciferase ATP assay as a screening method for Bacteriuria. Clinical Microbiology,1983, 2: 218-224.

[25] Leeuwen, W.V., Hagendoorn, M.J.M., Ruttink, T., Poecke, R.V., Vanderplas, L.H.W. and Vanderklor, A.R. (2000).The use of the luciferase reporter system for in Planta gene expression studies. Plant Molecular Biology Reporter, 18: 143a-143t.

[26] Hauke, H. and Mona, C.W. (2006). Whole-cell living biosensors - Are they ready for environmental application? Applied Microbiology and Biotechnology, 70: 273-280.

[27] Simon T.M., Allard and Kevin Kopish: Luciferase reporter assay: powerful adaptable tools for cell biology research. Promega corporation.2008.

[28] Brasier AR, Ron D: Luciferase reporter gene assay in mammalian cells. Methods in enzymology. 1992, 216: 386-397.

[29] Xu Y, Zhang HY, Thormeyer D, Larsson O, Du Q, Elmén J, Wahlestedt C, Liang Z: Effective small interfering RNAs and phosphorothioate antisense DNAs have different preferences for target sites in the luciferase mRNAs [J luciferase mRNAs [J] . Biochem Biophys Res Commun. 2003, 4;306(3):712-7.

[30] Ozawa T, Kaihara A, Sato M, Tachihara K, Umezawa Y: Split luciferase as an optical probe for detecting protein-protein interactions in mammalian cells based on protein splicing. [J] Anal Chem. 2001, 73(11):2516-21.

[31] Fan F, Wood KV: Bioluminescent assays for high-throughput screening. Assay Drug Dev Technol.2006, 5 (1): 127–36.

[32] Horsburgh AM, Mardlin DP, Turner NL, Henkler R, Strachan N, Glover LA, Paton GI, Killham K:Online microbial biosensing and fingerprinting of water pollutants. [J]. Biosens Bioelectron. 2002, 17(6-7):495-501.

[33] Dostalek P., BranikI T: Prospects for rapid bioluminescent detection methods in the food industry – a review. Czech J. Food Sci.2005, 23: 85–92.

[34] Webster J.A.J., Hall M.S., Rich C.N., Gilliland and S.E., Ford S.R., Leach F.R: Improved sensitivity of the bioluminescent determination of numbers of bacteria in milk samples. *Journal of Food Protection*.1988, 51: 949–954.

[35] Baker J.M., Griffithes M.W., Collins-thompson D.L: Bacterial bioluminescence: Applications in food microbiology. *Journal of Food Protection*.1992, 55: 62–70.

[36] Hill P.J., Hall L., Vinicombe D.A., Soper C.J., Setlow P., Waites W.M., Hill P.J., Rees C.E.D., Winston M.K., Stewart G.S.A.B: Theapplicationoflux genes. *Biotechnology and Applied Biochemistry*.1993, 17: 3–14.