Physiology and Pharmacology, 12 (2), 109 - 114
Summer 2008 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Expression and purification of the luciferase enzyme and *in vivo* ATP Assay

Mojtaba Mortazavi, Saman Hosseinkhani*, Abdorrahman Emamzadeh

Dept. Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received: 30 Dec 2007 **Revised: 4 June 2008** **Accepted: 9 June 2008**

Abstract

Introduction: In this study, gene expression and purification of luciferases from the firefly, *Lampyris turkestanicus*, and optimization of cellular ATP measurements were performed.

Methods: cDNA encoding luciferases from *Lampyris turkestanicus* was transferred from pQE30 vector into pET28a expression vector and pLtu28 was built. Newly constructed vector was expressed in *E. coli* XL1 Blue and the recombinant luciferase was purified using Ni-NTA Sepharose column. Enzymatic properties (Km and Vmax) for ATP were measured using luminescence assay. Standard curve of ATP was obtained by Promega ATP detection kit and the designed method based on the *L. turkestanicus* luciferase and ATP serial dilution. Moreover, bacterial ATP was measured by Promega kit and the designed method using *L. turkestanicus* luciferase.

Results: Results showed that ligation of *L. turkestanicus* luciferase encoding cDNA into pET28a and transformation of competent cells induced by the recombinant vector was performed efficiently. Using luciferin, positive colonies were screened and cultured. SDS-PAGE showed that recombinant luciferase was efficiently purified by Ni-NTA Sepharose column. ATP standard curve and measurement of bacteria, using Promega and the designed method by *L. turkestanicus* luciferases showed high similarities.

Conclusion: A method based on *L. turkestanicus* luciferases was designed. Comparison of the developed assay with promega kits in identification of bacterial concentration show its high quality and potent ability in ATP detection.

Keywords: Bioluminescence, *Lampyris turkestanicus*, Luciferase, ATP.

* Corresponding author e- mail: saman_h@modares.ac.ir
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۲ (۲)، ۱۰۹ – ۱۱۴
تابستان ۱۳۸۷

فیزیولوژی و فارماکولوژی

بیان ژن و تخلیص آنزیم لوسیفراز و سنجش ATP سلولی

مجتبی مرتضوی، سامان حسینخانی*، رحمان امامزاده
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

دریافت: بهمن ۸۶ بازبینی: خرداد ۸۷ پذیرش: خرداد ۸۷

چکیده

مقدمه: لوسیفراز آنزیم کلیدی نشر نور در موجودات نورافشان می باشد. این آنزیم واکنش نشر نور را با استفاده از سوبستراهای لوسیفرین و ATP انجام می دهد. در این مطالعه، بیان ژن و تخلیص آنزیم لوسیفراز از حشره شبتاب گونه ایرانی *Lampyris turkestanicus* و راه اندازی سنجش ATP سلولی انجام شد.

روش‌ها: cDNA کدکننده لوسیفراز گونه *L. turkestanicus* از ناقل pQE30 به ناقل بیانی pET28a منتقل و ناقل نوترکیب بیانی pLtu28a ساخته شد. این ناقل در باکتری E. coli سویه XL1Blue بیان و تخلیص لوسیفراز نوترکیب با استفاده از ستون نیکل سفارُز و در یک مرحله انجام شد. فعالیت آنزیم با استفاده از دستگاه لومینومتر بررسی و مقدار Km و Vmax آنزیم نسبت به ATP اندازه گیری گردید. با استفاده از کیت شرکت پرومگا و روش طراحی شده به کمک آنزیم لوسیفراز و سریال رقت از ATP، یک منحنی استاندارد رسم شد. سپس به کمک محیط کشت حاوی باکتری، منحنی سنجش غلظت باکتری‌ها برای کیت شرکت پرومگا و روش طراحی شده رسم گردید.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش نشان میدهد که انتقال cDNA کدکننده لوسیفراز *L. turkestanicus* به داخل وکتور pET28 و ترانسفورم کردن آن به درون باکتری‌های مستعد به طور کامل انجام شده است. پس از رشد باکتری‌های نوترکیب، کلونی‌های مثبت به سهولت و به کمک لوسیفرین انتخاب و کشت داده شد. تصویر ژل SDS-PAGE نشان می‌دهد که تخلیص آنزیم لوسیفراز به کمک رزین نیکل سفاروز با خلوص بالائی انجام شده است. منحنی‌های استاندارد سنجش ATP و سنجش غلظت باکتری‌ها با استفاده از کیت شرکت پرومگا و کیت طراحی شده به کمک آنزیم لوسیفراز نشان‌دهنده همسانی بالای این دو روش در تشخیص میزان ATP می باشند.

نتیجه‌گیری: مطالعه منحنی‌های حاصل از سنجش ATP و سنجش غلظت باکتری‌ها در مورد کیت پرومگا با کیت طراحی شده نشان‌دهنده کیفیت بالای کیت طراحی شده و قابلیت آن در سنجش ATP و استفاده‌های دیگر از این کیت را تایید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: بیولومینسانس، لوسیفراز، *Lampyris turkestanicus*، ATP

مقدمه

بیولومینسانس (BL) یا نشر نور توسط موجودات زنده از پدیده‌های جالب توجه در علوم زیستی می‌باشد. این فرایند در دسته وسیعی از موجودات خشکی‌زی و آبزی مشاهده و گزارش شده است. آنزیم‌های کلیدی کاتالیز کننده این دسته از واکنشها، با نام عمومی لوسیفراز شناخته می‌شوند. لوسیفراز حشره‌ای شبتاب (Firefly) و لوسیفراز باکتریایی شناخته شده‌ترین لوسیفرازها می باشند و از لحاظ نوع سوبسترا و مکانیسم عمل با یکدیگر متفاوت هستند.

لوسیفراز حشره‌ی شبتاب (Firefly) دو مرحله آنزیمی اساسی را برای بیولومینسانس کاتالیز می‌کند. در مرحله اول لوسیفراز فعال شدن D–لوسیفرین طی آدنیلاسیون گروه کربوکسیل توسط $Mg^{2+}ATP$ را کاتالیز می‌کند و در مرحله دوم، لوسیفراز به عنوان یک اکسیژناز عمل می‌کند و با اکسیداسیون آدنیل – لوسیفرین تشکیل یک حد واسط دی‌اکسی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: saman_h@modares.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

اتانون پر انرژی می‌دهد. در ادامه با شکسته شدن این حد واسط و خروج CO_2 حالت برانگیخته اکسی‌لوسیفرین به وجود می آید که با بازگشت به حالت پایه یک فوتون در ناحیه قرمز- سبز ایجاد می‌شود. به طور کلی عمل آنزیم لوسیفراز در حشرات بصورت زیر می‌باشد.

(1) E + ATP + D - Luciferin ⟶ E (luciferyl-adenylate) + PPi

(2) E(luciferyl-adenylate) + O_2 ⟶ E(oxyluciferin*; AMP) + CO_2

(3) E(oxyluciferin*; AMP) ⟶ E(oxyluciferin; AMP) + photon

(4) E(oxyluciferin; AMP) ⟶ E + oxyluciferin + AMP

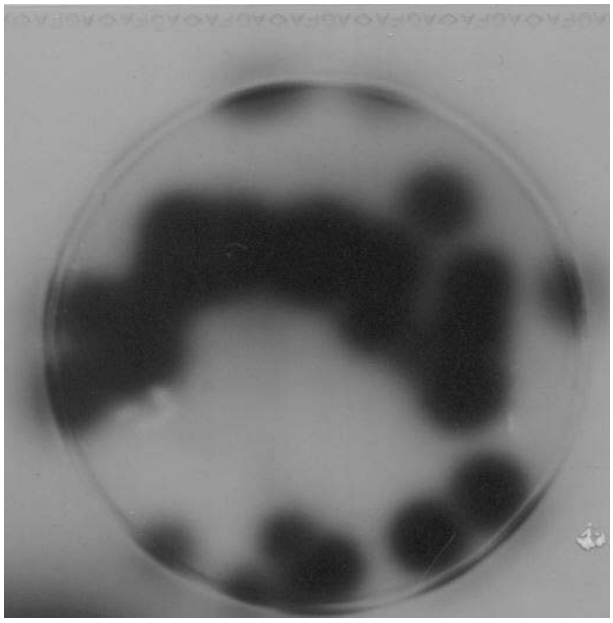
از میان لوسیفراز گونه های مختلف حشرات شبتاب، مطالعات زیادی بر روی لوسیفراز گونه *Photinus pyralis* انجام گرفته [۱۲] و کاربردهای زیست فناوری آن به خوبی نشان داده شده است. بعلاوه تاکنون دو گونه حشره شبتاب با نام‌های *Lampyroide maculata* و *Lampyris turkestanicus* در شمال ایران شناسایی و گزارش شده است [۶]. در این میان، گونه *L. turkestanicus* به لحاظ فراوانی شناخته شده‌تر و cDNA کد کننده لوسیفراز آن کلون و بیان شده است [۱]. با توسعه تحقیقات مشخص گردیده که بعضی از واکنش‌های لوسیفرازی با توجه به سرعت، دقت زیاد و غیر مخرب بودن دارای کاربردهای متنوع زیست فناوری هستند. امروزه از لوسیفراز در تشخیص مقادیر اندک ATP از طریق لومینومتری، به عنوان حساس‌ترین روش سنجش ATP، استفاده می‌شود [۷]. همچنین این آنزیم در آزمون‌های اندازه‌گیری بقای سلول، رشد و تمایز سلولها و تشخیص آلودگی‌های میکروبی به عنوان یک روش حساس به کار رفته است. بعلاوه cDNA کد کننده لوسیفراز دارای کاربردهای متنوع در سیستم‌های ژن گزارشگر است [۴] و کارآمدی این سیستم‌ها در بسیاری از موجودات نظیر قارچها، باکتریها، گیاهان و موش نشان داده شده است [۵]. در این تحقیق، با توجه به اهمیت آنزیم لوسیفراز، برای اولین بار بیان قابل توجه(over expression) ژن لوسیفراز *L. turkestanicus*، تخلیص آنزیم و استفاده از آن در طراحی و تولید کیت سنجش ATP انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

cDNA کدکننده لوسیفراز گونه *L. turkestanicus* از ناقل pQE30 به ناقل بیانی pET28a منتقل شد. واکنش PCR با پرایمرهای پیشرو و معکوس شامل 5′-TTC GATGGATCCATGGAAGATGCAAAAAAAT-3′ و 5′-CTAAGC AAGCTTTTACAATTTGGATTTTTT-3 انجام گرفت. قطعه ۱/۷ کیلو بازی تکثیر شده پس از استخراج از ژل (کیت کیاژن) توسط آنزیم‌های محدود کننده *BamH*I و *Hin*d III هضم و در حضور آنزیم T4 لیگاز در داخل ناقل بیانی pET28a بریده و دفسفریله، الحاق (ligate) گردید. ناقل نوترکیب بیانی حاصل (pLtu28) به روش الکتروپوریشن به داخل *E. Coli* سویه BL21 ترانسفورم شد. بیان پروتئین نوترکیب، با افزودن محلول ۱ mM لوسیفرین و مشاهده نور افشانی کلونی‌های فعال در اتاق تاریک تأیید و برای ثبت آنها از فیلم رادیولوژی استفاده گردید.

برای بیان پروتئین یک کلونی از باکتریهای غربال شده به ۵ میلی لیتر محیط 2XYT(Bacto-Trypton۱۶g/lit، ۱۰g/lit Bacto-Yeast extract و NaCl ۵ g/lit) حاوی ۵۰ µg/ml آمپی‌سیلین، تلقیح و در دمای ۳۷ ^oC با هوادهی مطلوب به مدت ۶ ساعت انکوبه گردید. سپس ۱ میلی لیتر باکتری رشد کرده به ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط 2XYT حاوی ۵۰ µg/ml آمپی‌سیلین منتقل و تا افزایش OD_{600} به حدود ۰/۷ در ۳۷ ^oC و هوادهی مطلوب انکوبه شد. در مرحله بعد با افزودن IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) با غلظت نهایی ۱ mM به محیط کشت به مدت یک شب در دمای۲۲ ^oC با هوا دهی مطلوب، انکوبه گردید.

برای تخلیص لوسیفراز نوترکیب، باکتری‌های کشت و القاء شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰g و دمای ۴ ^oC سانتریفوژ شد. رسوب باکتری حاصله پس از افزودن ۵ میلی لیتر بافر لیز کننده (۳۰۰mM,NaH_2PO_4 ۵۰mM NaCl و ایمیدازول ۵ mM با pH=۷/۸) به روش تخریب صوتی لیز گردید. سوپ حاصل در ۱۲۰۰۰g و دمای ۴ ^oC به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول شفاف رویی به ستون حاوی رزین نیکل سفارز منتقل شد و سپس ستون با بافر شستشو دهنده (۳۰۰ mM،NaH_2PO_4 ۵۰mM NaCl، ایمیدازول ۲۰ mM و PMSF با غلظت نهایی ۱ mM در pH=۷/۸)، شستشو داده شد. در آخرین مرحله تخلیص، از بافر elution (۳۰۰ mM ،$NaH_2PO_4$۵۰mM NaCl و ایمیدازول ۲۵۰ mM در pH=۷/۸) استفاده



شکل۱- مشاهده تأثیر درخشش کلونی‌های ترانسفورم شده بر فیلم رادیولوژی

گردید و محصول ستون در میکروتیوب‌های جداگانه جمع آوری شد. میزان خلوص نمونه‌های مختلف با استفاده از SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) بررسی و غلظت آنها به روش برادفورد تعیین گردید [۸].

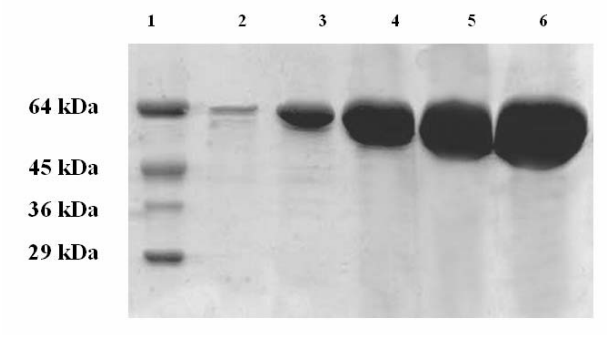
فعالیت آنزیم با استفاده از دستگاه لومینومتر (Berthold) و با غلظتهای مختلف لوسیفرین و ATP مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله از غلظت ۵۰ µM آنزیم استفاده شد. برای اندازه گیری مقدار Km و Vmax آنزیم لوسیفراز گونه *L. turkestanicus* نسبت به ATP، بافر سنجش (۱ mM luciferin , ۵۰ mM $Mgso_4$, ۵۰ mM Tricine و pH = 8/7) و غلظت های مختلف ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۶، ۲/۵، ۳/۵ و ۴/۵ میلی مولار از ATP تهیه گردید [۱۳]. حداکثر نور نشر شده به عنوان سرعت آغازی و بر حسب واحد نسبی نور RLU/S (Rate Light Units/Second) اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از منحنی لینوربرگ مقدار Km و Vmax بدست آمد [۱۳].

برای مقایسه روش جدید با کیت سنجش ATP شرکت Promega به ترتیب زیر عمل شد. کیت شرکت پرومگا از سوبسترای لوسیفرین لوسیفرین و بافر BacTiter-Glo™ در ظروف جداگانه تشکیل شده است. بافر BacTiter-Glo™ و سوبسترای آنزیم در دمای ۷۰ °C- نگهداری می‌شوند. ۱۰ میلی لیتر از بافر پس از تعادل با دمای محیط، به ظرف تیره حاوی سوبسترا منتقل و تا یکنواخت شدن و تشکیل معرف A (بافر BacTiter-Glo™ و سوبسترا) به آرامی تکان داده شد. به طور مشابه ۵ml از آنزیم خالص شده با فعالیت ویژه RLU/S.mg $۱۰^{-۱۲}$ با بافر سنجش (۱۰mM $MgSO_4$ ، ۵۰mM Tricine و pH =۷/۸) و لوسیفرین ۱ mM مخلوط گردیده و معرف A^+ بدست آمد. برای رسم منحنی استاندارد کیت، ۱۰ml از محیط کشت استریل LB تهیه گردید. به ۱ ml از محیط کشت، یک میلی لیتر ATP با غلظت ۱۲µM اضافه و سپس ۸ سریال رقت (Serial Dilutions) از نمونه اولیه ATP تهیه شد. در مرحله بعدی 50 µl از هر یک از رقت‌های حاصل با ۵۰ µl معرف A اضافه و فعالیت آن به کمک دستگاه لومینومتر تعیین شد. به طور مشابه برای رسم منحنی استاندارد از کیت طراحی شده، ۵۰ µl از هر یک از رقت‌های ATP با ۵۰ µl از معرف A^+ اضافه و فعالیت آنزیم با استفاده از دستگاه لومینومتر تعیین شد [۱۱].

برای اندازه‌گیری میزان ATP از باکتریها، ابتدا با تلقیح باکتریهای *E. coli* سویه XL1Blue به ۱۰ میلی لیتر محیط کشت TB و کشت شبانه آن در دمای ۳۷°C یک پیش کشت با OD_{600} برابر ۰/۷ بدست آمد. سپس به هشت میکروتیوب استریل میزان ۵/. میلی لیتر محیط کشت TB استریل منتقل و از پیش کشت حاصل، یک سریال رقت از باکتری تهیه گردید. در مرحله بعد، از هر یک از رقت‌های حاصل، ۵۰µl به یک میکرتیوب استریل منتقل و ۵۰µl معرف A به آن اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و در نهایت میزان فعالیت آنزیم لوسیفراز با افزودن سوبسترای کیت به نمونه‌ها، در دستگاه لومینومتر تعیین گردید. به طور مشابه و برای رسم منحنی اندازه‌گیری ATP با استفاده از کیت طراحی شده، پس از تخریب صوتی (sonication) باکترهای پیش کشت، سریال رقتی از آنها در ۸ میکروتیوب استریل حاوی ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت TB تهیه شد. سپس ۵۰µl از هر یک از نمونه های آماده شده با ۵۰µl از معرف A^+ مخلوط و فعالیت آنزیم لوسیفراز توسط لومینومتر تعیین گردید [۳].

یافته‌ها

به منظور بیان مطلوب لوسیفراز، انتقال توالی کد کننده آن از

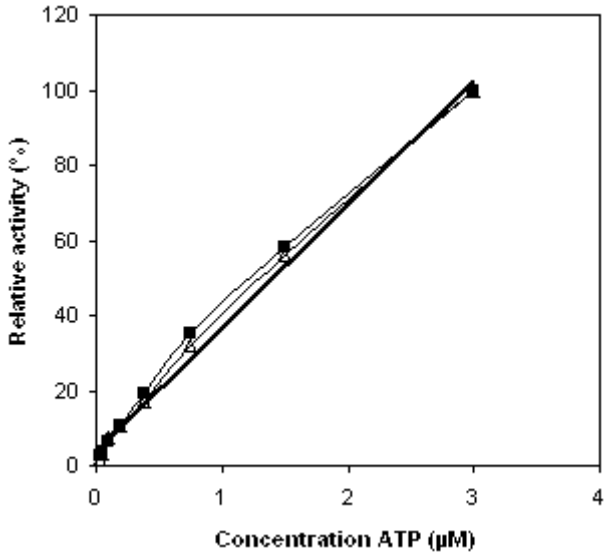


شکل۲- نمونه‌های آنزیم خالص شده بر حسب زمان خروج از ستون Ni-NTA l (Nickel Nitrilotriacetic acid) بر روی ژل (۱۲٪) SDS-PEGE. (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

pQE30 به ناقل بیانی pET28a انجام گرفت. در این مرحله با انجام واکنش PCR توسط پرایمرهای اختصاصی، قطعات ۱/۷ کیلو بازی بدست آمد. آمپلیکون حاصل پس از هضم توسط آنزیم‌های محدودکننده، در حضور آنزیم T4 لیگاز به درون ناقل بیانی pET28a بریده و دفسفریله شده، الحاق و ناقل بیانی pltu28 ساخته شد. pltu28 حاصل به درون باکتری‌های مستعد شده به روش الکتروپوریشن ترانسفورم گردید و پس از رشد باکتری‌های نوترکیب، بیان مطلوب لوسیفراز در آنها با افزودن محلول ۱ mM لوسیفرین و مشاهده کلونی‌های نورافشان در اتاق تاریک تأیید شد (شکل ۱).

تخلیص مؤثر آنزیم لوسیفراز با استفاده از رزین نیکل سفاروز انجام گرفت. در این مرحله با عبور محلول، لوسیفرازهای نوترکیب از طریق ۶ باقیمانده هیستیدینی طراحی شده در انتهای C– ترمینال، به ستون متصل و از سایر پروتئین‌های خارج شده از ستون جدا شد. در مرحله بعد با افزودن بافری با غلظت بالای ایمیدازول، لوسیفراز نوترکیب از رزین جدا و در انتهای ستون جمع آوری شد. نمونه آنزیم لوسیفراز نوترکیب خالص شده بر روی ژل SDS-PAGE بررسی (شکل ۲) و درجه خلوص آن بیش از ۹۵ درصد تعیین شد [۳].

میزان Km و Vmax آنزیم لوسیفراز گونه *L. turkestanicus* با تعیین فعالیت آنزیمی در غلظت اشباع از لوسیفرین و غلظت‌های متفاوت از ATP تعیین شد [۱۳]. میزان Km آنزیم لوسیفراز گونه *L. turkestanicus* کمتر از آنزیم لوسیفراز گونه *P. pyralis* بوده و مقادیر آنها به ترتیب در حدود ۱۸۲ µM و در حدود ۲۶۱ µM می باشد (شکل ۴). این موضوع نشان دهنده حساسیت بالاتر لوسیفراز گونه *L. turkestanicus*

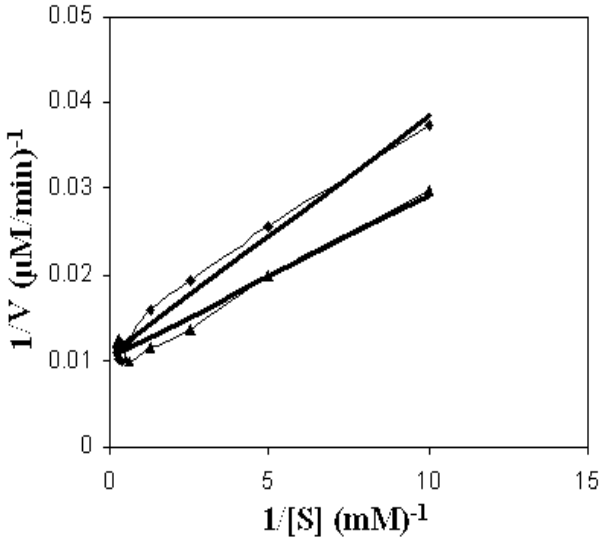


شکل۳- نمودار استاندارد برای کیت شرکت پرومگا (Δ) و روش سنجش با آنزیم *L. turkestanicus* (■) در حضور غلظت‌های استاندارد از ATP.

در مقایسه با لوسیفراز گونه *P. pyralis* نسبت به ATP می باشد و این ویژگی در دستیابی به تشخیص مقدار پایین‌تر ATP محیط بسیار مفید می باشد. به منظور تسهیل در اندازه‌گیری ATP آنزیم خالص شده، در مخلوطی از لوسیفرین و $MgSO_4$ و نیز سایر ترکیبات به صورت پایدار قرار گرفت. با افزودن ATP یا محلول حاوی ATP به آن به صورت تک مرحله‌ای واکنش متناسب با غلظت ATP انجام می‌گیرد.

سنجش سلول‌های میکروبی زنده به کمک لوسیفراز یک روش مناسب برای تعیین سلول‌های باکتری قابل زیست یا میزان آلودگی میکروبی محیط بر اساس اندازه‌گیری ATP است. ATP شاخصی از باکتری‌ها و سلول‌های فعال از نظر متابولیکی می‌باشد. [۹] و به کمک آنزیم لوسیفراز می‌توان مقدار آن را تا حد 10^{-8} M شناسائی کرد [۱۴]. در حقیقت شدت لومینسانس تولید شده توسط لوسیفراز متناسب با مقدار ATP موجود است و مقدار ATP متناسب با تعداد باکتریهای محیط می‌باشد. شکل ۳ منحنی استاندارد سنجش ATP با استفاده از کیت شرکت پرومگا و با استفاده از کیت طراحی شده با آنزیم لوسیفراز *L. turkestanicus* را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل نشان داده شده است منحنی حاصل از سنجش ATP در مورد کیت BacTiter-Glo™ با کیت طراحی شده همسانی بالائی دارد و این موضوع دقت و حساسیت کیت طراحی شده را تایید می‌کند.

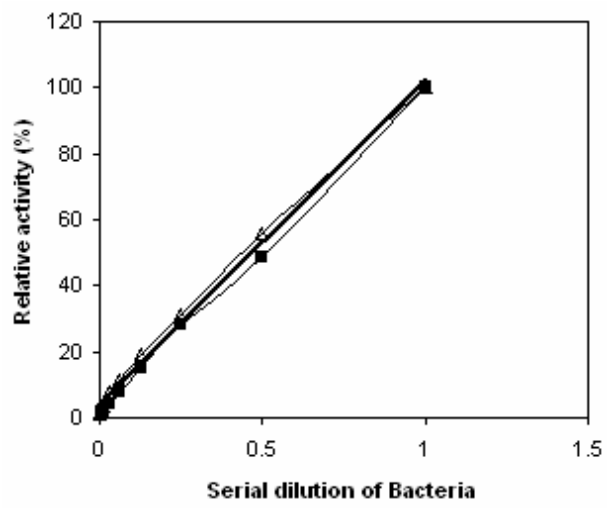
برای مقایسه میزان ATP سنجش شده از باکتری‌ها به کمک کیت BacTiter-Glo™ و کیت طراحی شده با آنزیم



شکل۴- نمودار لینوور-برگ فعالیت آنزیم‌های لوسیفراز (▲) L. tu و(♦) P. py در حضور غلظت‌های مختلف ATP.

لوسیفراز، پس از تهیه محیط کشت، میزان ATP موجود در محیط به عنوان شاخص آلودگی تعیین گردید. منحنی‌های سنجش ATP بر حسب غلظت باکتری موجود با استفاده از کیت شرکت پرومگا و کیت طراحی شده در شکل ۵ نشان داده شده است. بطور مشخص با افزایش غلظت باکتری های موجود، میزان نشر نور نیز افزایش می‌یابد. بعلاوه منحنی حاصل از سنجش غلظت باکتری‌ها در مورد کیت BacTiter-Glo™ با کیت طراحی شده همسانی بالائی دارد و این موضوع، دقت و صحت مطلوب کیت طراحی شده را نشان می‌دهد.

سنجش ATP محیط با استفاده از لوسیفراز دقیق‌ترین روش تعیین میزان و همچنین تعداد سلول‌های زنده یوکاریوتی و اندازه‌گیری آلودگی‌های محیطی است. نتایج این تحقیق نشان می دهند که مراحل انتقال، ترانسفورم کردن، بیان و تخلیص آنزیم لوسیفراز گونه *L. turkestanicus* با موفقیت کامل انجام شده است. میزان بالای آنزیم بدست آمده و درصد بالای خلوص آن، قابلیت استفاده از این آنزیم در طراحی و تولید کیت سنجش ATP را نشان می‌دهد. آنزیم لوسیفراز گونه *L. turkestanicus* با Km کمتر نسبت به لوسیفراز گونه *P. pyralis*، قابلیت بالاتری در تشخیص مقادیر اندک ATP محیط و در نتیجه حساسیت بالاتر برای آشکار نمودن آلودگی‌های محیطی و سنجش تعداد سلول‌های زنده دارد. بعلاوه، مقایسه صحت و دقت کیت طراحی شده با کیت پرومگا، همسانی بالای این دو کیت را نشان می‌دهد.



شکل۵- نمودار رسم شده برای کیت شرکت پرومگا (Δ) و روش سنجش با آنزیم *L. turkestanicus* (■) در حضور سریال رقت از باکتری.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و هم چنین سازمان گسترش صنایع ایران که حمایت مالی این طرح را بر عهده داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

[1] Alipor BS, Hosseinkhani S, Nikkhah M, Naderi-manesh H, Chaichi MJ, Kazempour Osaloo S, Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, *Lampyris turkestanicus*. ***Biochem Biophys Res Commun*** 325 (2004) 215-222.

[2] Bradford MM, A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Anal Biochem*** 72 (1976) 248-254.

[3] Campbell AK, Chemilumenescence: principle & application in biology & medicine. ***Ellis Horwood Chichester*** (1988).

[4] De Wet JR, Wood KV, Helinski DR, DeLuca M, Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 82 (1985) 7870-7873.

[5] Dilella AG, Hope DA, Chen H, Trumbauer M, Schwartz

RJ, smith RG, Utility of firefly luciferase as a reporter gene for promoter activity in transgenic mice. ***Nucleic Acids Res*** 16 (1988) 4159.

[6] Gesthardt M, Day JC, *Lampyroidea maculata*, coleopteran: *Lampyrida*: a new species of lampyrid from Iran. ***Zootaxa*** 427 (2002) 1-6.

[7] Gould SJ, Subramani S, Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. ***Anal Biochem*** 175 (1988) 5-13.

[8] Hastings IW, Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. ***J Mol Evol*** 19(5) (1983) 309-321.

[9] hnical Bulletin BacTiter-Glo™ Microbial cell viability assay instructions for use of products G8230, G8231, G8232 AND G8233.

[10] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall PJ, Protein measurement with folin phenol reagent. ***J Biol Chem*** 193 (1981) 262-275.

[11] Lundin A, Use of Firefly Luciferase in ATP-Related Assay of Biomass, Enzymes and Metabolites. ***Method Enzymol*** 305 (2000) 346-370.

[12] McElory WD, Crystalline firefly luciferase. ***Method Enzymol*** (1960) 445-448.

[13] Wang CY, Hitz S, Andrade JD, Stewart RJ, Specific Immobilization of Firefly Luciferase through a Biotin Carboxyl Carrier Protein. ***Analytical Biochemistry*** 240 (1997) 133-139.

[14] www.turnerbiosystems.com/doc/appnotes/997_9304.php