ธวัลยา คำทอง : การตรวจจับไนโตรรีดักเตสโดยโพรบฟลูออเรสเซนต์ (INVESTIGATION OF NITROREDUCTASE DETECTION BY A FLUORESCENCE PROBE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รุง-ยี ไลย์, 37 หน้า

คำสำคัญ: ไนโตรรีดักเตส; ตัวตรวจวัดเรืองแสง; การตรวจหาจุลชีพกลุ่ม ESKAPE; การเรืองแสงตามแอคติวิตี้

ไนโตรรีดักเตส (NTR) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในแบคทีเรียหลากหลายชนิด โดยมีบทบาทสำคัญในการกำจัดความเป็นพิษของสารประกอบที่มีหมู่ไนโตร ด้วยคุณสมบัตินี้จึงทำให้เอนไซม์ไนโตรรีดักเตสเป็นเป้าหมายสำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย ในงานนี้ได้ทำการพัฒนาโพรบเรืองแสงที่ตอบสนองต่อ NTR (IND-NO_2) เพื่อใช้ในการตรวจจับกิจกรรมของ NTR ในจุลชีพโดยเฉพาะ โดยใช้เอนไซม์ NTR จาก *Escherichia coli* (*Ec*NfsB) เป็นเอนไซม์ต้นแบบในการทดลองเบื้องต้น เมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับโพรบ IND-NO_2 ในสภาวะที่มี NADH หมู่ไนโตรของโพรบนี้จะถูกรีดิวซ์โดย *Ec*NfsB เกิดเป็นหมู่อะมิโน ส่งผลให้เกิดความเข้มของการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 564 นาโนเมตรที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดการเรืองแสงของสาร (fluorescence spectroscopy) และเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อยืนยันว่าสารผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ IND-OH นอกจากนี้ยังมีการศึกษาค่าพารามิเตอร์จลนศาสตร์สำหรับการรีดิวซ์ของโพรบด้วย เมื่อทำการศึกษาความจำเพาะของโพรบต่อ NTR และสารรีดิวซ์ทางชีวภาพต่าง ๆ พบว่าโพรบนี้แสดงความจำเพาะสูงต่อ NTR และไม่มีถูกรีดิวซ์โดยสารรีดิวซ์ทางชีวภาพต่าง ๆ นอกจากนี้ โพรบยังสามารถตรวจจับกิจกรรมของ NTR ในแบคทีเรีย ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR780, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR781 และ *Staphylococcus aureus* TISTR1466 ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อก่อโรคในกลุ่ม ESKAPE โดยตรวจวัดการเรืองแสงด้วยเครื่องวัดการเรืองแสงของสาร และสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแบบเรียลไทม์ของโพรบนี้

สาขาวิชาเคมี
ปีการศึกษา 2567

ลายมือชื่อนักศึกษา ธวัลยา คำทอง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Rung-Yi Lai

TAWANYA KAMTHONG : INVESTIGATION OF NITROREDUCTASE DETECTION BY A FLUORESCENCE PROBE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. RUNG-YI LAI, Ph.D. 37 PP.

Keywords: Nitroreductase; Fluorescent probe; ESKAPE pathogens detection; Activity-based fluoresecence

Nitroreductase (NTR), found in a variety of bacteria, plays a crucial role in the detoxification of nitro-containing compounds, making it a valuable target for bacterial detection. In this study, we developed an NTR-responsive fluorescent probe (IND-NO_2) for the selective detection of NTR activity in microorganisms. *E. coli* NTR (*Ec*NfsB) was used as a model enzyme in preliminary experiments. The probe's nitro group was reduced to an amino group by *Ec*NfsB in the presence of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), resulting in a marked fluorescence increase at 564 nm. The reaction was characterized by fluorescence spectroscopy and high-performance liquid chromatography (HPLC) to confirm the product identity, IND-OH. *Ec*NfsB kinetic parameters for the probe's reduction were also determined. Furthermore, the probe was demonstrated to show high NTR specificity, while the control experiments showed no reduction by various biological reductants. Furthermore, the probe successfully detected NTR activities in the bacteria of *Escherichia coli* TISTR780, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR781, and *Staphylococcus aureus* TISTR1466, which represent ESKAPE pathogens, by fluorescence spectroscopy and observation with naked eyes demonstrating its potential for real-time bacterial detection.

School of Chemistry
Academic Year 2024

Student's Signature ธัญญา กำทอง
Advisor's Signature Rung Yi Lai