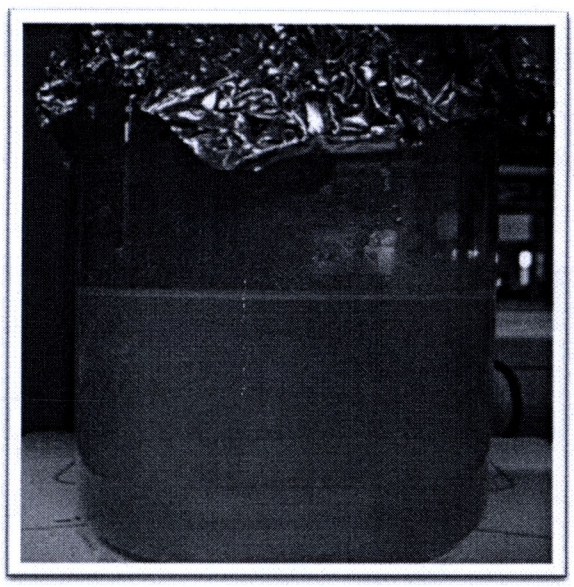
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

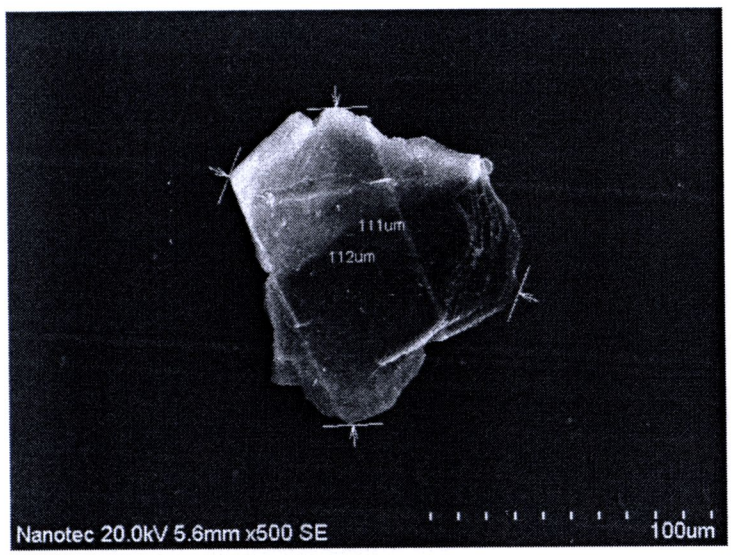
4.1 การเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซาน และขนาดอนุภาคที่ได้

หลังจากการเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซานด้วยกระบวนการทางเคมี (Chemical process) ด้วยวิธี ionic gelation ดังสภาวะที่กล่าวไว้ที่วิธีดำเนินการทดลองข้างต้น จะได้คอลลอยด์ที่มีลักษณะสีขาวขุ่น ดังภาพที่ 4.1

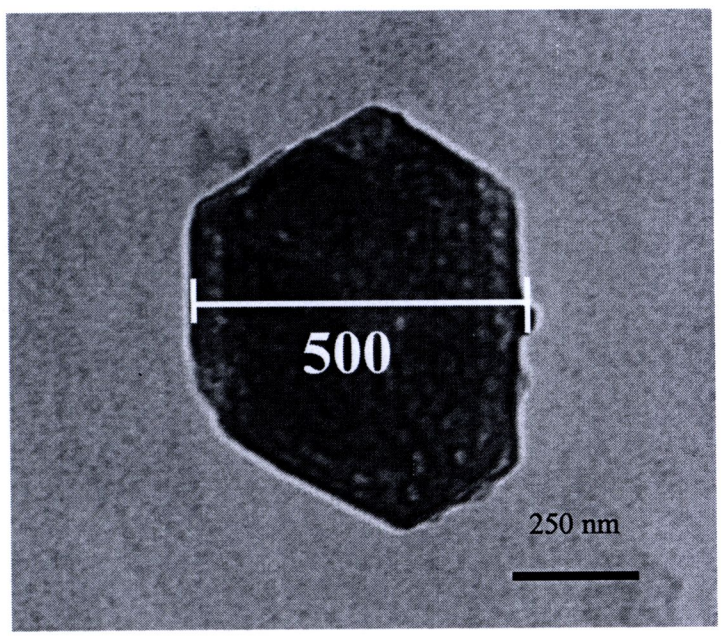


ภาพที่ 4.1 สารประกอบคอลลอยด์อนุภาคนาโนไคโตซาน

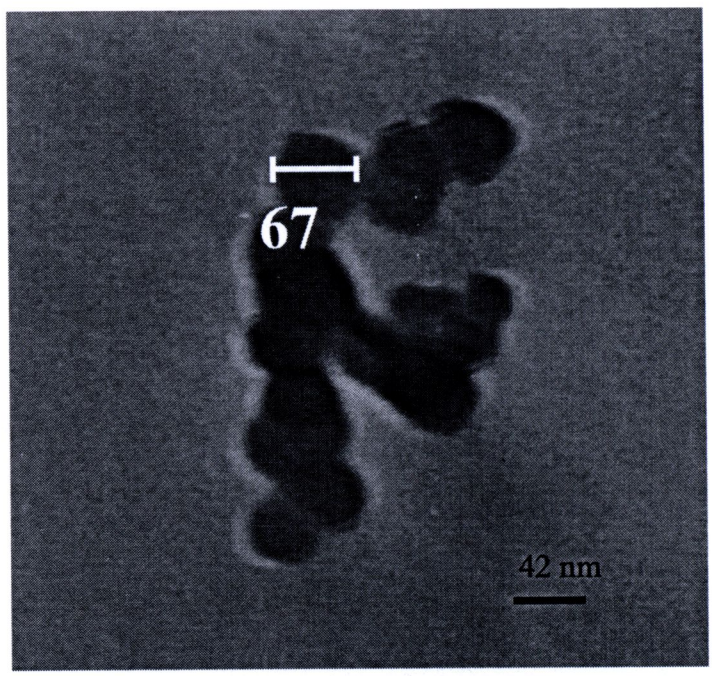
จากการศึกษาขนาดอนุภาคไคโตซานด้วยการตรวจวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) และส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) ก่อน และหลังการเติมสารละลาย Tripolyphosphate (TPP) จะได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.2, 4.3 และ 4.4



ภาพที่ 4.2 ขนาดเกล็ดอนุภาคไคโตซานก่อนเริ่มต้นการทดลอง (SEM)



ภาพที่ 4.3 ขนาดอนุภาคไคโตซานในสารละลายก่อนเติมสารละลาย Tripolyphosphate (TPP) วัดด้วยวิธี TEM



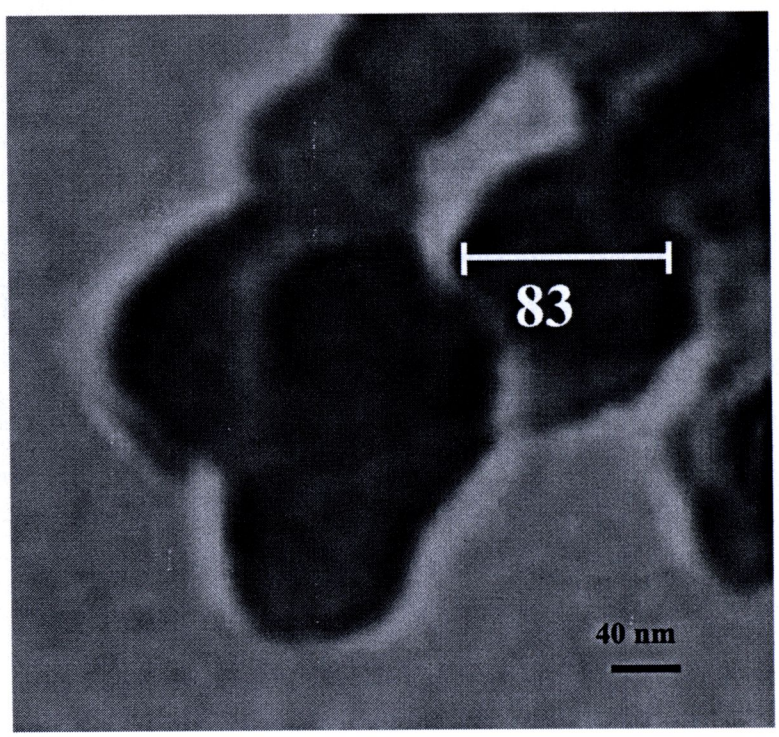
ภาพที่ 4.4 ขนาดอนุภาคไคโตซานหลังเติมสารละลาย Tripolyphosphate (TPP) วัดด้วยวิธี TEM

ในการศึกษาขนาดของอนุภาคไคโตซานด้วยการตรวจวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) ก่อน และหลังการเติมสารละลาย Tripolyphosphate (TPP) พบว่าขนาดของอนุภาคไคโตซานก่อนเติมสารละลาย Tripolyphosphate (TPP) จะมีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ คือ มีขนาด 500 นาโนเมตร แต่เมื่อนำอนุภาคไคโตซานมาเติมสารละลาย Tripolyphosphate (TPP) จะพบว่ามีขนาดอนุภาคที่เล็กลงอยู่ในระดับอนุภาคนาโน คือ มีขนาด 67 นาโนเมตร โดยสารละลาย Tripolyphosphate (TPP) ที่มีประจุตรงข้ามกับไคโตซาน จะก่อให้เกิดการครอส-ลิงค์ภายใน (intramolecular crosslinkages) และระหว่างโมเลกุล (intermolecular crosslinkages) ของไคโตซาน จึงเกิดเป็นอนุภาคนาโนไคโตซานขึ้น ซึ่งขนาดที่ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ได้รายงานไว้ (อานุภาพ ทองธรรมชาติ และสมนึก จารุดิลกกุล; http://www.intania. com/upload/NA06.pdf) ในขณะที่อนุภาคของไคโตซานก่อนที่นำมาละลายนั้น มีลักษณะเป็นเกล็ด และมีขนาดที่ใหญ่มาก ดังภาพที่ 4.2 ซึ่งมีขนาดถึง 111 – 112 ไมโครเมตร และสามารถสรุปขนาดของอนุภาคไคโตซานที่สภาวะต่างๆ ได้ตามตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงขนาดอนุภาคไคโตซานที่ได้จากการตรวจวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope)

สภาวะในการเตรียมอนุภาคไคโตซาน	ขนาดของอนุภาคไคโตซาน (นาโนเมตร)
ก่อนเติม Tripolyphosphate (TPP)	500
หลังเติม Tripolyphosphate (TPP)	67

จากนั้นเมื่อนำอนุภาคนาโนไคโตซานที่ได้หลังเติม TPP แล้วไปหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ ALP (จากผลการทดลองที่ 4.2) ได้นำอนุภาคนาโนไคโตซาน – ALP ที่ได้ มาทำการศึกษาขนาดอีกครั้งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ได้ผลดังภาพที่ 4.5 ได้แสดงขนาดของอนุภาคนาโนไคโตซาน – ALP อยู่ที่ 83 นาโนเมตร



ภาพที่ 4.5 ขนาดอนุภาคนาโนไคโตซาน – ALP ที่ได้จากการตรึงโดยใช้ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น ALP เริ่มต้น 11 นาโนกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร จากการวัดด้วยกล้อง TEM

นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบขนาดของอนุภาคไคโตซานที่เตรียมได้ที่สภาวะต่างๆ กัน ด้วยเครื่องวัดอนุภาค (Nanosizer) พบว่าขนาดที่ได้เป็นไปตามตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงขนาดอนุภาคไคโตซานที่ได้จากการตรวจวัดด้วยเครื่อง Nanosizer

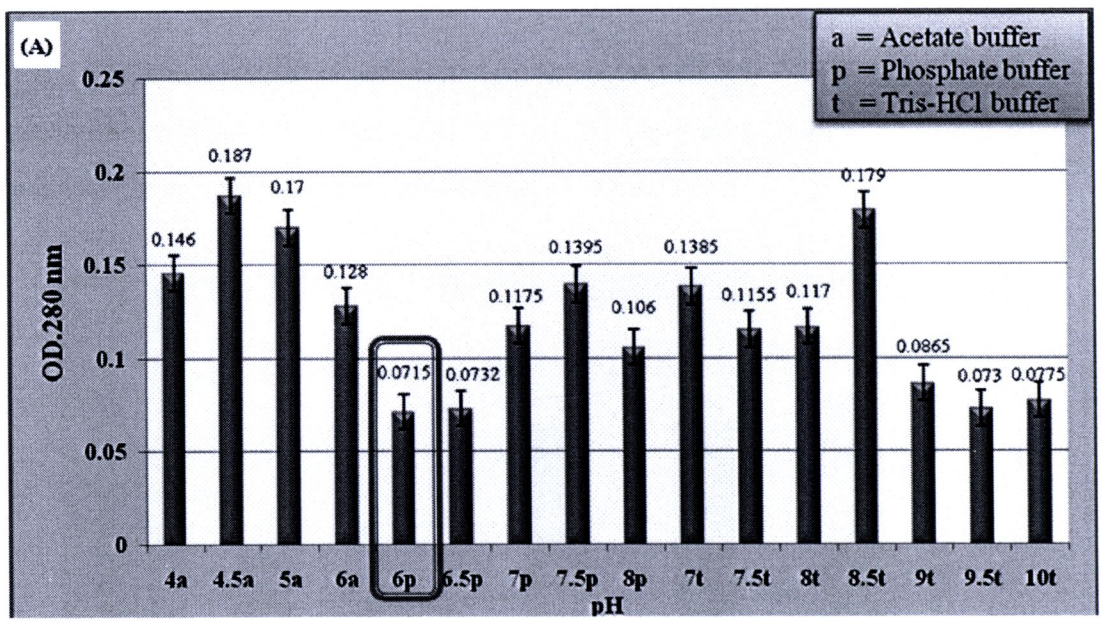
สภาวะ	ขนาด (nm)
Raw chitosan	1000
0.5 min sonicated chitosan – TPP	724
1 min sonicated chitosan – TPP	438
5 mins sonicated chitosan – TPP	215
10 mins sonicated chitosan – TPP	150
ALP – chitosan	457

พบว่าขนาดของอนุภาคไคโตซานที่ได้ทดสอบที่เวลาการ sonicate ที่แตกต่างกันให้ขนาดที่ต่างกัน โดยที่เมื่อเพิ่มเวลาการ sonicate จากทำให้ขนาดของอนุภาคเล็กลง จนถึงระยะเวลาการ sonicate ที่ 5 นาที แล้วพบว่าขนาดที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก แม้ว่าเวลา sonicate จะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่า ขนาดของอนุภาคที่วัดได้ด้วยเครื่อง Nanosizer และ TEM แตกต่างกันที่สภาวะเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากวิธีการวัดวิเคราะห์ของเครื่องมือทั้งสองแตกต่างกัน เครื่อง Nanosizer เป็นเครื่องมือที่ใช้หลักการวัดแบบการให้แสงตกกระทบกับอนุภาค แล้ววัดค่าแสงที่กระเจิง แปรค่าเป็นขนาดของอนุภาคอีกครั้งหนึ่ง อนุภาคไคโตซานเมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติของไคโตซานแล้ว พบว่าประจุของอนุภาคจะเพิ่มขึ้น เมื่อขนาดเล็กลง ทำให้อนุภาคมักรวมตัวกันเพื่อให้เกิดความเสถียรในสารละลาย ดังนั้นเมื่อทำการวัดด้วยเครื่อง Nanosizer จึงในผลขนาดที่ใหญ่กว่าวิธี TEM เพราะวิธี TEM เป็นการวัดแบบส่องภาพ ทำให้สามารถเห็นขนาดของอนุภาคได้ชัดเจน แต่ว่าเป็นกลุ่มก้อน ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากเครื่อง Nanosizer นั่นเอง (Tsai, *et al.*, 2010)

4.2 สภาวะการตรึงอนุภาคนาโนไคโตซานกับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP)

4.2.1 <u>การตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสบนอนุภาคนาโนไคโตซานที่ค่าพีเอชต่างๆ</u>

ในการศึกษาค่าพีเอชต่างๆ ที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซานนั้น ได้ทำการตรึงโดยใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ที่ค่า pH 4, 4.5, 5 และ 6 ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ที่ค่า pH 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 และทรีทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ที่ค่า pH 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 และ 10 ซึ่งจากการศึกษาค่าพีเอชในการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซานที่ค่าพีเอชต่างๆ นี้สามารถนำมาเขียนกราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ของส่วนใสรวมกับส่วนใสของตะกอนที่ได้จากการตรึงดังแสดงในภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของส่วนใส + ส่วนใสของตะกอนที่ได้จากการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซานที่ค่าพีเอชต่างๆ

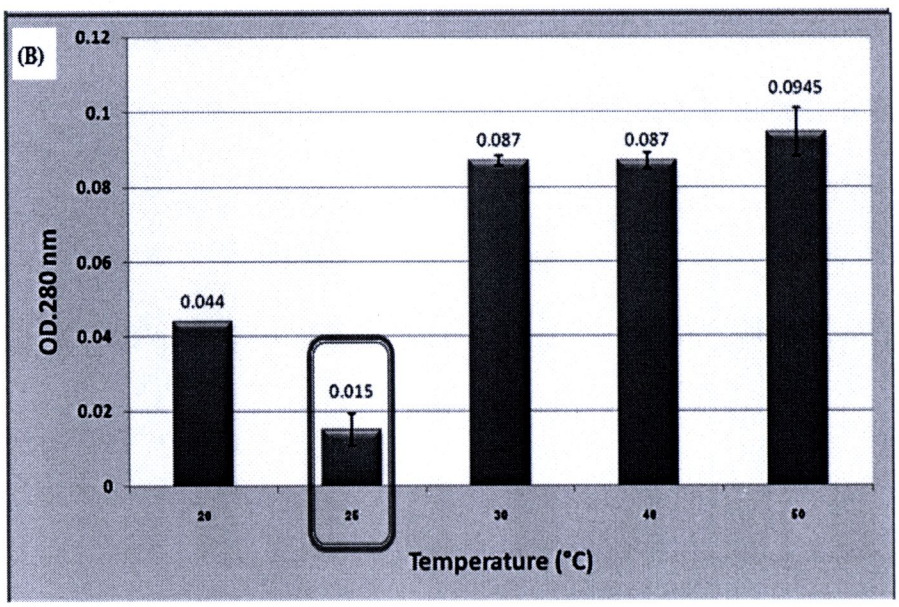
สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากกราฟข้างบนพบว่า ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ที่ pH 6 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร น้อยที่สุด คือ 0.0715 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปริมาณเอนไซม์ที่เหลืออยู่จากการตรึงนั้นมีค่าน้อยที่สุดที่สภาวะนี้ ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าที่ค่า pH นี้ เอนไซม์ ALP มีประจุรวมเป็นลบ (ค่า pI ของเอนไซม์ ALP เท่ากับ 4.5) ในขณะที่อนุภาคนาโนไคโตซานมีประจุรวมเป็นบวก (ค่า pI ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่ผ่านกระบวนการ ionic gelation กับ TPP เท่ากับ

9.5) (Silva, *et al.*, 2006 และ Maurstad, *et al.*, 2007) ซึ่งทำให้การจับกันของทั้งสองโมเลกุลเกิดขึ้นผ่านแรงยึดแบบ ionic bonding ซึ่งที่สภาวะนี้เป็นสภาวะที่แรงยึดจับกันนั้นมีค่ามากที่สุดนั่นเอง ส่วนที่ค่า pH สูง (ตั้งแต่ 9 เป็นต้นไปนั้น) ค่าการดูดกลืนแสงให้ค่าน้อยเช่นกัน คาดว่าน่าจะเกิดจากการที่ ที่ค่า pH นี้เอนไซม์ ALP ยังคงมีประจุรวมเป็นลบอยู่ (ซึ่งน่าจะแรงกว่าที่ค่า pH 6) ทำให้เกิดการจับกันกับอนุภาคนาโนไคโตซานได้เช่นกัน แต่ยังไม่มากเท่ากับที่ค่า pH ต่ำ เพราะประจุที่ผิวของอนุภาคนาโนไคโตซานเข้าใกล้ศูนย์มากขึ้น หรือเท่ากับศูนย์แล้วนั่นเอง

4.2.2 <u>การตรึงเอนไซม์ Alkaline Phosphatase บนอนุภาคนาโนไคโตซานที่อุณหภูมิต่างๆ</u>

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาหาปริมาณของเอนไซม์ ALP ที่เหลืออยู่จากการตรึงที่อุณหภูมิต่างๆ กัน โดยได้ทำการตรึงที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษานี้สามารถนำมาเขียนกราฟได้ดังแสดงในภาพที่ 4.7

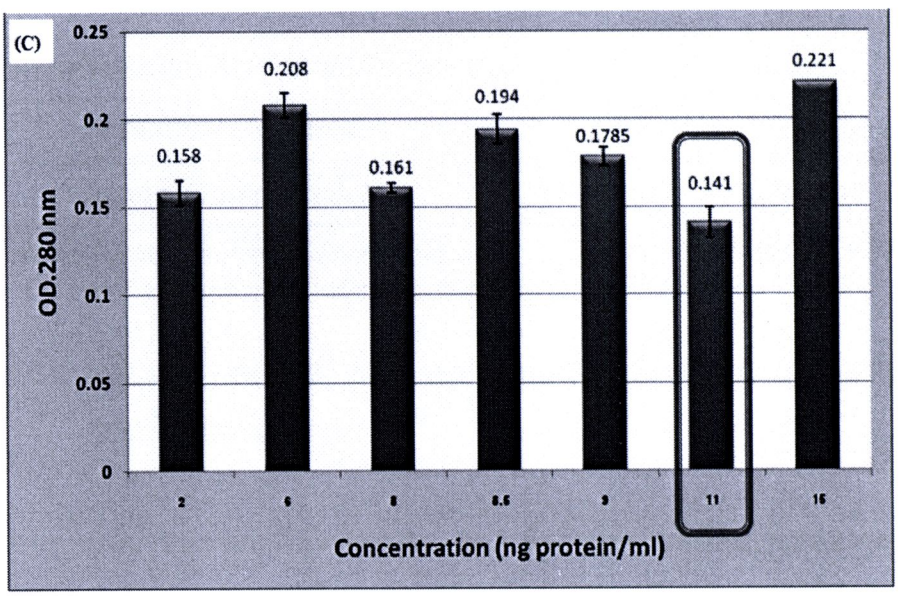


ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของส่วนใส + ส่วนใสของตะกอนที่ได้จากการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซานที่อุณหภูมิต่างๆ

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซานนี้ พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิเหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซานเนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่เหลือจากการตรึงของฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร น้อยที่สุด คือ 0.015 เนื่องจากที่อุณหภูมินี้จะไม่ไปทำลายโครงสร้างของโมเลกุลเอนไซม์ และไคโตซาน ทำให้ค่าการตรึงให้ผลที่ดีที่สุด (Altuna et al., 2007) นอกจากนี้ Öztop และคณะ (2002) ได้รายงานไว้ว่าที่อุณหภูมิมากกว่า 25 องศาเซลเซียสนั่นได้มีผลต่อโครงสร้างของไคโตซาน ซึ่งอาจจะเป็นผลทำให้การตรึงที่อุณหภูมิสูงๆ นั่นให้ผลการตรึงที่ไม่ดีเท่าที่ควร

4.2.3 การตรึงเอนไซม์ Alkaline Phosphatase บนอนุภาคนาโนไคโตซานที่ความเข้มข้นเอนไซม์เริ่มต้นต่างๆ

จากที่ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของเอนไซม์ ALP ในการตรึงกับอนุภาคนาโนไคโตซานนั้น การทดลองที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ ALP เท่ากับ 2, 6, 8, 8.5, 9, 11 และ 15 นาโนกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร ได้ผลของความเข้มข้นในการตรึงนี้ดังแสดงในภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของส่วนใส + ส่วนใสของตะกอนที่ได้จากการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซานที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ ALP เริ่มต้นต่างๆ

จากกราฟแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ ALP ที่ 11 นาโนกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรน้อยที่สุด คือ 0.141 แสดงว่าปริมาณเอนไซม์ ALP ที่เหลือจากการตรึงมีค่าน้อยที่สุด จึงเลือกให้เป็นค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซาน ถึงแม้ว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ ALP ที่น้อยกว่า 11 นาโนกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร นั่นให้ค่าที่ใกล้เคียงกัน (โดยเฉพาะที่ 8 นาโนกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร) แต่จะเห็นได้ว่าค่าที่ได้จะไม่คงที่ อาจเป็นเพราะปริมาณของเอนไซม์ ALP ที่ใช้น้อยเกินไป และถ้าดูที่ความเข้มข้นสูงกว่า 11 นาโนกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร จะพบว่าปริมาณเอนไซม์ที่เหลือจากการตรึงมีมาก ซึ่งเป็นการใช้ปริมาณเอนไซม์ ALP ที่มากเกินไปนั่นเอง

และจากผลการศึกษาการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซานที่ค่าพีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นเริ่มต้นของเอนไซม์ต่างๆ นั้นสามารถสรุปผลการทดลองได้ตามตารางที่ 3

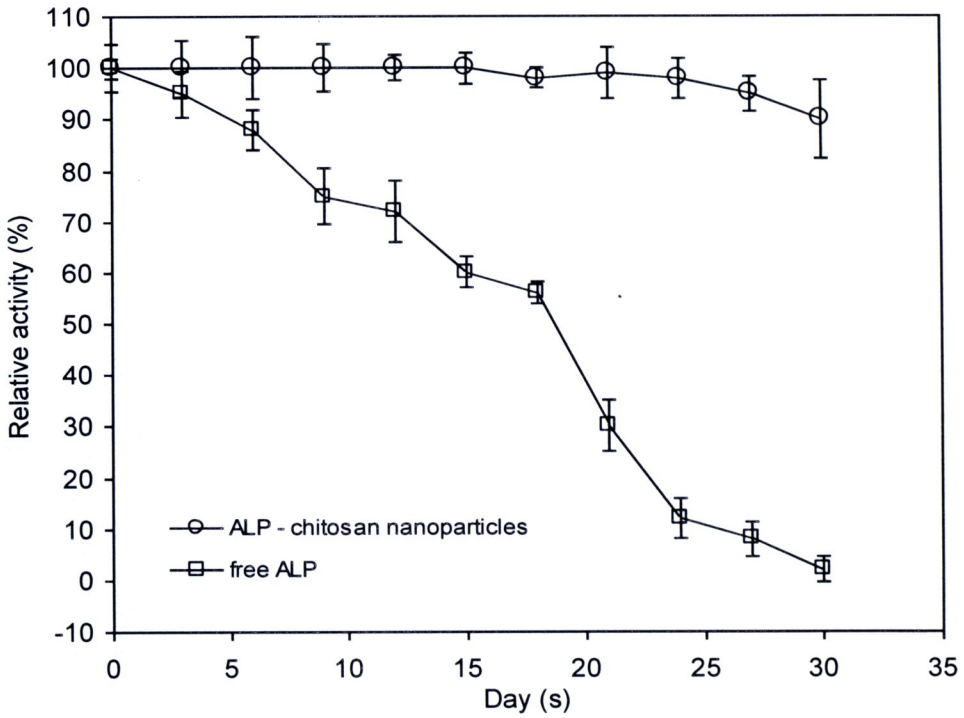
ตารางที่ 4.3 แสดงสรุปผลสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาการตรึงเอนไซม์ ALPบนอนุภาคนาโนไคโตซาน

สภาวะการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคไคโตซาน	ผลการทดลอง
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	Phosphate buffer pH 6
อุณหภูมิ (Temperature)	25 องศาเซลเซียส
ความเข้มข้น ALP เริ่มต้น (Concentration)	11 นาโนกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร

4.2.4 เสถียรภาพของเอนไซม์ Alkaline Phosphatase ที่ถูกตรึงบนอนุภาคนาโนไคโตซานที่สภาวะที่เหมาะสม

จากนั้นได้นำอนุภาคนาโนไคโตซาน – ALP ที่ตรึงที่สภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้างต้น มาทำการทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ เปรียบเทียบกับเอนไซม์ ALP อิสระ โดยนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ก่อนนำมาทดสอบค่ากิจกรรม

เอนไซม์ ALP ด้วยวิธี Diethanolamine Assay จะต้องนำตัวอย่างมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเสมอ ผลค่าเสถียรภาพของเอนไซม์แสดงได้ดังภาพที่ 4.9

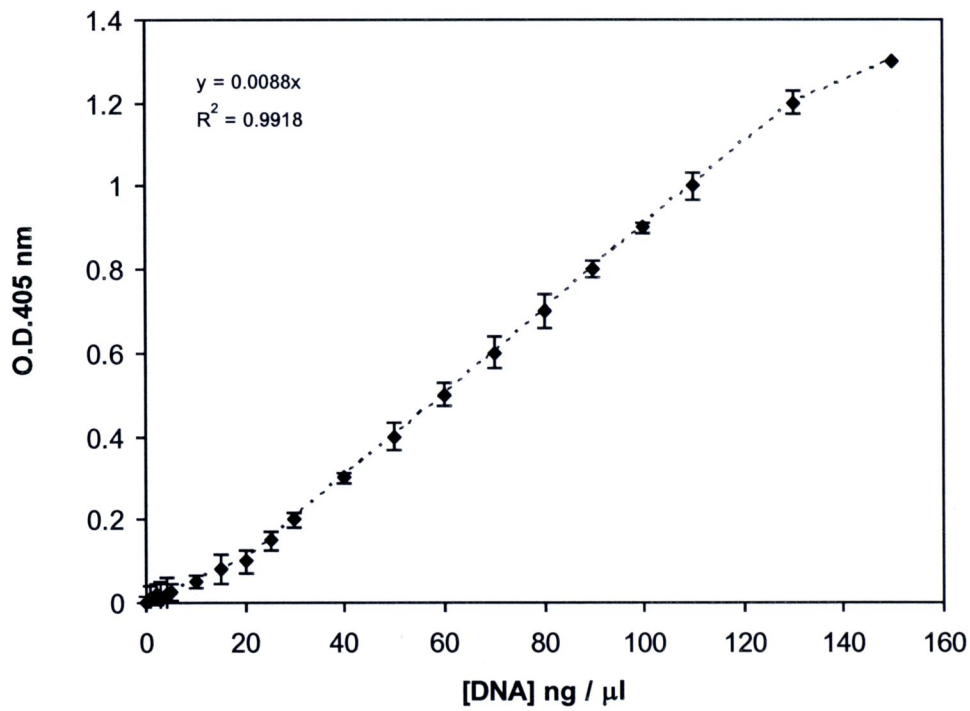


ภาพที่ 4.9 แสดงค่าเสถียรภาพ (storage stability) อนุภาคนาโนไคโตซาน – ALP ที่เวลาต่างๆ (วัน) เปรียบเทียบกับ เอนไซม์ ALP อิสระ

จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนไคโตซานช่วยรักษาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALP ไว้ได้เป็นอย่างดี เช่นเดียวกับผลการวิจัยที่เคยมีรายงานมาแล้วเช่นกัน (Tang, *et al.*, 2006 และ 2007) แม้ว่าเวลาจะผ่านไปถึง 30 วัน แต่ค่ากิจกรรมที่ได้ยังคงไม่น้อยกว่า 90% ในขณะที่เอนไซม์ ALP อิสระจะมีค่ากิจกรรมที่ลดลงมากกว่า 50% ตั้งแต่วันที่ 18 ของการเก็บรักษา ซึ่งจะเห็นได้ว่าอนุภาคนาโนไคโตซานนอกจากจะตรึงเอนไซม์ ALP ไว้แล้วยังช่วยรักษาการทำงานของเอนไซม์อีกด้วย อันเป็นประโยชน์ในนำไปใช้งานต่างๆ ต่อไป

4.3 การตรวจวัด DNA เซนเซอร์ต้นแบบด้วยอนุภาคนาโนไคโตซาน – ALP – ssDNA

เมื่อนำอนุภาคนาโนไคโตซาน – ALP ที่ผ่านการติด DNA probe แล้วตามวิธีของ Bivas-Benita *et al.*, 2004 และ Xu *et al.*, 2001 จากนั้นมาทดสอบกับ target DNA ที่ถูกตรึงไว้ที่ 96 micro – wells plate แล้วทำการวัดด้วยวิธี QuantiChrom™ (DALP – 250) โดยการเติม 200 µL ของ assay buffer กับ 5 µL ของ Mg Acetate (5 mM) และ 2 µL ของ p-NPP (10 mM) และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm ให้ค่า calibration curve ของ DNA sensor ดังแสดงในภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 แสดง calibration curve ของ DNA sensor ที่ได้จากการวัด target DNA ที่ 1 – 150 ng DNA/ µl ที่อุณหภูมิห้อง

จากภาพที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่า linear range ของ DNA sensor ที่ได้นี้อยู่ระหว่าง 30 – 130 ng DNA/ µl และให้ค่า sensitivity ที่ 0.0088 ng DNA/ µl นอกจากนี้ค่าต่ำสุดของ DNA ที่วัดได้ (lower detection limit) อยู่ที่ 1 ng DNA/ µl ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณของ

target DNA ที่วัดได้มีค่าที่ต่ำมาก นอกจากนี้ค่า response time และstability ของ DNA sensor นี้แสดงสรุปได้ดังในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะต่างๆ ที่ได้ของ Chitosan – ALP – DNA sensor ต้นแบบ

ลักษณะที่วัด	ค่าวัดที่ได้	หมายเหตุ
Calibration range	1 – 150 ng DNA/ μl	
Linear range	30 – 130 ng DNA/ μl	ที่เห็นได้ชัดจากกราฟ
Lower detection limit	1 ng DNA/ μl	
Sensitivity	0.0088 ng DNA/ μl	
Response time	~15 นาที	รวมเวลาตั้งแต่เริ่มใส่ probe DNA จนเห็นผล
Usage stability	14 วัน	วัดทุกวันที่อุณหภูมิห้อง เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

4.4 **การติดฉลากของ PbSe อนุภาคนาโนไคโตซาน และ DNA**

ได้ทำการเลือกใช้ อนุภาค PbSe ซึ่งเป็นอนุภาคนาโน และสามารถเตรียมได้เองในห้องทดลอง พร้อมให้ขนาดอนุภาคไม่เกิน 50 nm และให้สีที่สามารถวัดได้ การนำไปติดกับดีเอ็นเอเพื่อพัฒนาเป็นหัววัดทำได้ง่ายไม่ต้องมีขั้นตอนยุ่งยากเช่นเดียวกัน และยังเป็นการช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวอีกด้วย นอกจากนี้ได้มีการนำเอาอนุภาคไคโตซานเป็นอีกวัสดุที่ใช้ในการตรึงดีเอ็นเอ และอนุภาค PbSe เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการตรวจวัดของหัววัดที่ได้ด้วย ดังแสดงในตารางที่ 4.5

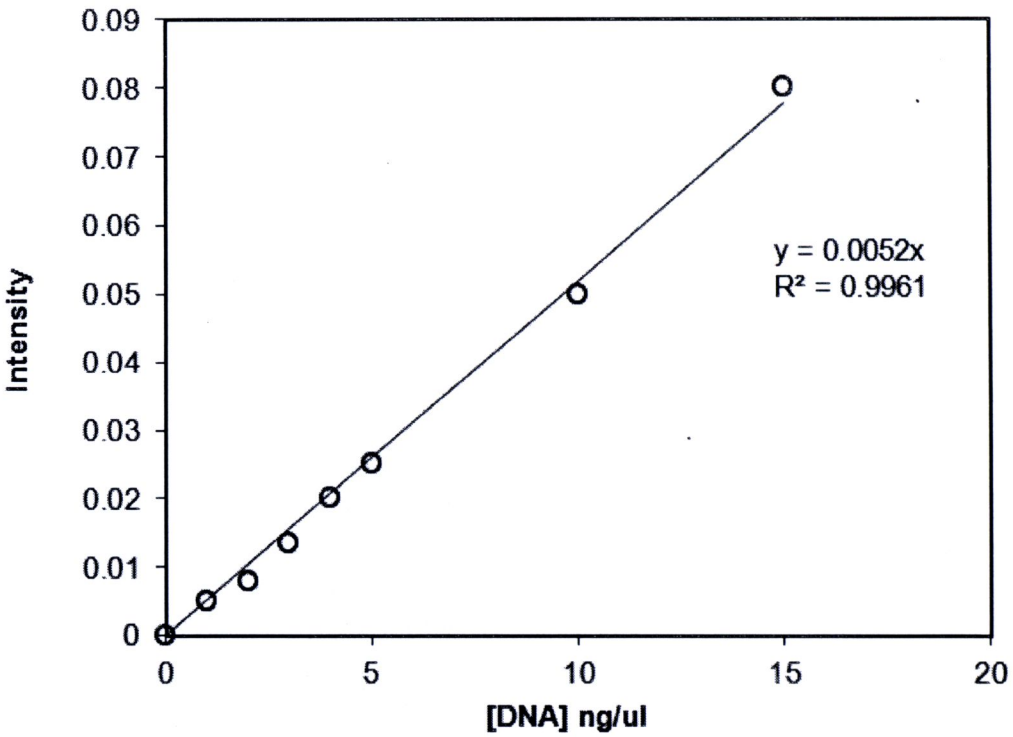
ตารางที่ 4.5 ขนาดของอนุภาคโดยเฉลี่ย และค่าซีต้าโพเทนเชียลของอนุภาคนาโนไคโตซาน และ PbSe ในสภาวะต่างๆ ด้วยเครื่อง Nanosizer (Malvern instrument)

สภาวะ	*zeta potential (mV)*	*ขนาดเฉลี่ย (nm)*
CH (0.05%)	-16.04±0.59	152
CH-DNA (0.02%)	-12.44±0.86	174
PbSe	-20.91±0.27	48
CH – PbSe (0.02%)	14.25±0.63	165
CH – PbSe – DNA (0.02%)	10.54±0.42	208

จากนั้นทำการตรวจวัด target DNA กับอนุภาคนาโนไคโตซาน / PbSe / *p* – DNA ที่ได้ พร้อมทดสอบคุณลักษณะทางเซนเซอร์ของเครื่องตรวจวัดนี้ดังแสดงได้ในตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.11

ตารางที่ 4.6 แสดงลักษณะต่างๆ ที่ได้ของ DNA sensor ที่ใช้ PbSe เป็นตัวตรวจวัด

ลักษณะที่วัด	**ค่าวัดที่ได้**	**หมายเหตุ**
Calibration range	1 – 25 ng DNA/ μl	
Linear range	1 – 15 ng DNA/ μl	ตามที่แสดงในรูปที่ 4.11
Lower detection limit	4.33×10^{-20} M DNA/ μl	หรือเท่ากับ ~1 ng DNA/ μl
Sensitivity	0.0052 ng DNA/ μl	
Response time	~ 6 นาที	รวมเวลาตั้งแต่เริ่มใส่ probe DNA จนเห็นผล
Usage stability	25 วัน	วัดทุกวันที่อุณหภูมิห้อง เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.11 แสดง calibration curve ของ DNA sensor ที่ใช้ PbSe เป็นตัวตรวจวัดที่ได้จากการวัด target DNA ที่ 1 – 15 ng DNA/ μl ที่อุณหภูมิห้อง