سيتحقق النجاح في مختبر الكيمياء الحيوية من خلال قدرتك على اختيار واستخدام أجهزة مختلفة لقياس الأحجام. تُعد الدقة والضبط أساسيتين في مجال الكيمياء الحيوية لأن إمكانية التكرار أمر لا بد منه، والأحجام المقاسة صغيرة للغاية. أنت بالفعل على دراية بكيفية قراءة دقة الأدوات الزجاجية المختبرية البسيطة (مثل الأسطوانة المدرجة) والسحاحة الأكثر تعقيدًا. ستبدأون الآن باستخدام جهاز قياس جديد يُعرف باسم الماصة الدقيقة القابلة للتعديل.

Experiment 3

Use of Micropipettes - (Accuracy vs Precision)

Introduction

Success in the biochemistry lab will come with your ability to choose and use various devices for measuring volumes. Accuracy and precision are fundamental in the field of biochemistry because reproducibility is a must and measured volumes are extremely small. You are already familiar with how to read accuracy of simple laboratory glassware (i.e., graduated cylinder) and the more complicated burette. You are now going to begin use with a new measuring device known as an adjustable micropipette.

These devices are expensive and somewhat delicate. To obtain accurate and precise data, correct operation of the micropipettes is essential. For this reason, we are going to start the course with an exercise to familiarize everyone with the micropipettes.

هذه الأجهزة باهظة الثمن وحساسة إلى حد ما. للحصول على بيانات دقيقة، من الضروري التشغيل الصحيح للماصات الدقيقة. لهذا السبب، سنبدأ الدورة بتمرين لتعريف الجميع بالماصات الدقيقة.

I. Objective: to learn how to use adjustable micropipettes and maintain two things: accuracy and precision.

الهدف: تعلم كيفية استخدام الماصات الدقيقة القابلة للتعديل والحفاظ على أمرين: الدقة والضبط.

A. Parts of a micropipette

The volume indicator consists of three number dials and is read from bottom to top. The digits on dial display indicate the volume selected.

يتكون مؤشر الحجم من ثلاثة أقراص رقمية، ويُقرأ من الأسفل إلى الأعلى. تشير الأرقام على شاشة القرص إلى الحجم المحدد.

تأتي الماصات الدقيقة في هذا المختبر بثلاثة أحجام مختلفة، كل منها يقيس نطاقًا مختلفًا من الأحجام. الأحجام الثلاثة هي P10 وP50 وP1000. تُسمى الماصات الدقيقة بناءً على الحد الأعلى لنطاق الحجم.

B. Different sizes of micropipettes

The micropipettes in this laboratory come in three different sizes each of which measures a different range of volumes. The three sizes are P10, P50 and P1000. Micropipette are named based on the upper range volume.

Micropipette Size	Lower – upper volume range
P-10	0.5-10µl
P-50	5-50µl
P-1000	100-1000µl

P-10, range (0.5-10 µL)
Display: 6.6 µL

P-50, range (5-50 µL)
Display: 23.5 µL

P-1000, range (100-1000 µL)
Display: 530 µL

Volume is read from bottom to top.

Most micropipettes are adjustable and can deliver variable volumes (e.g., P-1000 can deliver 500, 735, 945µl) depending on the volume set by the user. Variable volume micropipette comes with different ranges and upper & lower limits of measurement. In such cases, error percentage may vary as per the measured liquid. Trying to dispense less than the lower value of the range will result in inaccurate liquid measurements, whereas trying to dispense over the upper range will completely fill the tip and allow the liquid to enter into the pipette body.

تتميز معظم الماصات الدقيقة بإمكانية ضبطها، حيث يمكنها ضخ أحجام متغيرة (على سبيل المثال، يمكن للماصة P-1000 ضخ 500، 735، 945 ميكرولتر) حسب الحجم الذي يحدده المستخدم. تأتي الماصات الدقيقة ذات الحجم المتغير بنطاقات قياس وحدود عليا وسفلى مختلفة. في هذه الحالة، قد تختلف نسبة الخطأ تبعًا للسائل المقاس. محاولة ضخ كمية أقل من الحد الأدنى للنطاق ستؤدي إلى قياسات غير دقيقة للسائل، بينما محاولة ضخ كمية أكبر من الحد الأعلى للنطاق ستملأ طرف الماصة بالكامل وتسمح بدخول السائل إلى جسم الماصة.

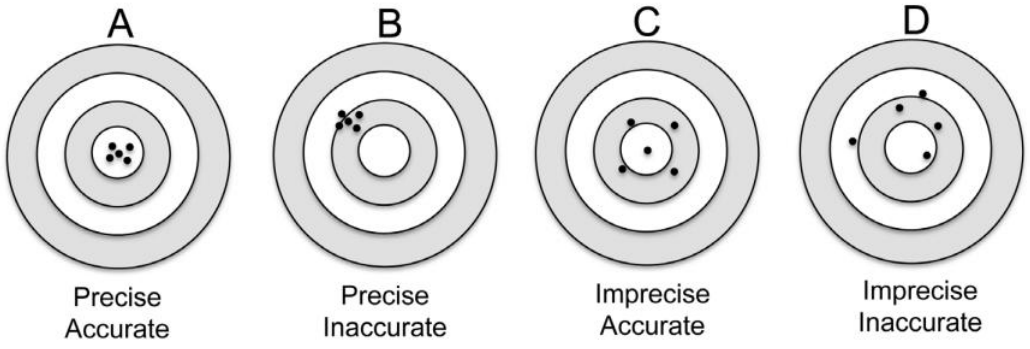
precise هي قرب النتائج على بعضها

Accuracy هي قرب المحاولات للنتيجة المطلوبة

تعتمد الدقة على الماصة الدقيقة التي تقدم الحجم الصحيح. النتائج الدقيقة قابلة للتكرار. تخيل أن أربعة طلاب يحاولون ضرب نقطة الهدف خمس مرات. الطالبان A وB دقيقان، بينما الطالبان A وC دقيقان.

C. Accuracy and precision

Accuracy depends on the micropipette delivering the correct volume. Precise results are reproducible. Imagine that four students try to hit the bulls-eye five times. Students A and B are precise, while students A and C are accurate.



Manufacturers determine the accuracy and precision of micropipettes by using them to transfer defined volumes of distilled water that is then weighed on an analytical balance. This is called the gravimetric method which determines the delivered mass of distilled water at a reference temperature (25˚C), given that the density of water is 1.0 gram per mL at 25˚C. This means that every (µl) should weigh exactly 0.001g.

1 g → 1000 µl

?? → 1 µl X= 1/1000= 0.001g

?? → 500 µl X= 1*500/1000= 0.500 g

يحدد المصنعون دقة وضبط الماصات الدقيقة باستخدامها لنقل أحجام محددة من الماء المقطر، ثم وزنها على ميزان تحليلي. تُسمى هذه الطريقة بالطريقة الوزنية، والتي تحدد كتلة الماء المقطر عند درجة حرارة مرجعية (25 درجة مئوية). علمًا بأن كثافة الماء هي 1.0 غرام لكل مل عند 25 درجة مئوية. هذا يعني أن كل ميكرولتر يجب أن يزن 0.001 غرام بالضبط.

The process is repeated several times during the calibration process, and the data is used to calculate the accuracy and precision of a micropipette.

تُكرر هذه العملية عدة مرات أثناء عملية المعايرة، وتُستخدم البيانات لحساب دقة وضبط الماصة الدقيقة.

Accuracy: is the closeness of the dispensed volume to the true (standard/nominal) volume as set on the pipette. Accuracy is expressed as mean error or % error, the percent by which the mean value of a large number of replicate measurements of the same volume will deviate from the expected or "true" volume.

The accuracy of these micropipettes is determined by the factory calibration as shown in **Table 1** and checked gravimetrically using distilled water and an analytical balance.

تُحدد دقة هذه الماصات الدقيقة من خلال معايرة المصنع كما هو موضح في الجدول 1، ويتم التحقق منها وزنيًا باستخدام الماء المقطر وميزان تحليلي.

الدقة: هي مدى قرب الحجم الموزع من الحجم الحقيقي (القياسي/الاسمي) كما هو مُحدد على الماصة. تُعبر الدقة عن متوسط الخطأ أو النسبة المئوية للخطأ، وهي النسبة المئوية التي ينحرف بها متوسط قيمة عدد كبير من القياسات المتكررة لنفس الحجم عن الحجم المتوقع أو "الحقيقي".

Average (mean)= sum of all values/total number of values

$$\% \text{ Error (\%Accuracy)} = \frac{|\text{Experimental Value} - \text{Standard Value}|}{\text{Standard Value}} * 100$$

$$\% \, Accuracy = \frac{(Mean\ volume - nonimal\ volume)}{nominal\ volume} \times 100$$

الدقة: توفر الدقة معلومات حول قابلية تكرار القياسات، وتُشير إلى "تشتت" القياسات الفردية حول متوسط القياسات المتكررة، دون أي إشارة إلى معيار. يُستخدم الانحراف المعياري النسبي (% الدقة) عادةً للتعبير عن مدى دقة البيانات. يُطلق عليه أحيانًا معامل التباين (%cv).

Precision: Precision provides information about reproducibility of your measurements and refers to as the "scatter" of individual measurements around the mean of replicate measurements, without any reference to a standard. % Relative Standard Deviation (%precision) is usually used to express how precise is your data. Sometimes it is called coefficient of variation (cv%).

$$\text{Standard deviation (SD)} = \sigma = \sqrt{\frac{\Sigma\,(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

$$\% \text{ RSD (\% Precision)} = \frac{\text{sample standard deviation}}{average\ measurment} * 100$$

where X_i is one of n individual values in the data set, and $\bar{X}$ is the data set's mean (average) value. The %precision is used to calculate the accuracy and precision of a micropipette, which is determined by the factory calibration as shown in **Table 1**.

حيث X هي إحدى القيم الفردية n في مجموعة البيانات، وX هي القيمة المتوسطة (المتوسطة) لمجموعة البيانات. يتم استخدام الدقة المئوية لحساب دقة الماصة الدقيقة وإحكامها، والتي يتم تحديدها بواسطة معايرة المصنع كما هو موضح في الجدول 1.

Table 1: Calibration guidelines for the listed pipettes from the International Organization for Standardization's (ISO) - EN ISO 8655.

Range	Volume (µl)	Accuracy (±%)	Precision (±%)
0.2-2µl	2	4.00	2.00
	1	8.00	4.00
	0.2	40.00	20.00
2-20µl	20	1.00	0.50
	10	2.00	1.00
	2	10.00	5.00
10-100µl	100	0.80	0.30
	50	1.60	0.60
	10	8.00	3.00
200-1000 µl	1000	0.80	0.30
	500	1.60	0.60
	200	4.00	1.50
1-5ml	5000	0.8	0.30
	2500	1.60	0.60
	1000	4.00	1.50
1-10ml	10000	0.6	0.30
	5000	1.20	0.60
	1000	6.00	3.00

A well calibrated pipette will give better accuracy and precision than these limits, but these values represent a 'worst case scenario' for a calibrated pipette. Accepted accuracy% and %precision limits for values of volumes within the numbers stated in the table are within the limits of that of the highest and lowest volume for that micropipette. ستوفر الماصة المعايرة جيدًا دقةً ووضوحًا أفضل من هذه الحدود، لكن هذه القيم تمثل أسوأ سيناريو ممكن للماصة المعايرة. تقع حدود الدقة المقبولة (9%) وحدود الوضوح (%) للأحجام ضمن الأرقام المذكورة في الجدول ضمن حدود أعلى وأدنى حجم لتلك الماصة الدقيقة.

For example a volume of 80µL, the accepted accuracy% sets between 0.8 and 1.6%, whereas accepted precision% sets between 0.3 and 0.6% (if less values are obtained, it is even better). على سبيل المثال، لحجم 80 ميكرولتر، تتراوح الدقة المقبولة بين 0.8 و1.6%، بينما تتراوح الووضوح المقبولة بين 0.3 و0.6% (إذا تم الحصول على قيم أقل، يكون ذلك أفضل).

Example 1: calculate the SD of the following data set (84, 84, 89, 91, 110, 114, and 116)?

Mean = 84+84+89+91+110+114+116) ÷ 7= 98.3

$$SD = \sqrt{\frac{(84-98.3)^2 + (84-98.3)^2 + \ldots + (116-98.3)^2}{7-1}} = 14.4$$

Standard deviations are very sensitive to extreme values (outliers) in the data. For example, if the highest value in the dataset had been 150 instead of 116, the SD would have gone up from 14.4 to 23.9.

الانحرافات المعيارية حساسة للغاية للقيم المتطرفة (القيم الشاذة) في البيانات. على سبيل المثال، إذا كانت أعلى قيمة في مجموعة البيانات 150 بدلاً من 16، لكان الانحراف المعياري قد ارتفع من 14.4 إلى 23.9.

Example 2: For results of 1000µl pipette set to 900µl I got: SV

- 910µl, 887µl, , 882µl, 902µl, and 921µl.
- Mean=900.4 µl
- Sample standard deviation = 16

$$\%\ Accuracy = \frac{(Mean\ volume - nonimal\ volume)}{nominal\ volume} \times 100$$

$$\%\ Accuracy = \frac{(903\mu l - 900\mu l)}{900\mu l} \times 100 = 0.1\%$$

Accuracy: Comparing this to Table 1 this is well within calibration limits.

$$\%\ Precision = \frac{sample\ stanard\ deviation}{mean\ volume} \times 100$$

$$\%\ Precision = \frac{16}{900.4\mu l} \times 100 = 1.8\%$$

Precision: This is above the calibration limits shown in Table 1 so this pipette should not be used as the results are very variable between pipetting. However, it could also be poor pipetting technique! So, it may be worth checking with someone else.

الدقة: هذه القيمة أعلى من حدود المعايرة الموضحة في الجدول 1، لذا لا ينبغي استخدام هذه الماصة لأن النتائج متغيرة للغاية بين عمليات السحب. ومع ذلك، قد يكون السبب أيضًا ضعف تقنية السحب! لذلك، قد من المفيد التحقق من ذلك مع شخص آخر.

hold it vertically

D. How to use a Micropipette (Operation of the Microliter Pipette):

1. اضبط الحجم عن طريق تدوير مقبض ضبط الحجم في نهاية الماصة حتى يظهر الحجم الصحيح على المؤشر.

1. Set the volume by turning the volume adjustment knob at the end of the pipette until the correct volume shows on the indicator.

ملاحظة: لا تتجاوز أبدًا نطاق الماصة! اعرف هذه النطاقات في جميع الأوقات.

Note: Never go above or below the range of the pipettor! Know these ranges at all times.

2. Attach a new disposable tip to the pipette shaft. Press firmly with a slight twisting motion. Make sure you are using tips of the correct size for each pipette.

2. قم بتوصيل طرف جديد قابل للاستخدام مرة واحدة بعمود الماصة. اضغط بقوة مع حركة لف طفيفة. تأكد من استخدام أطراف بالحجم الصحيح لكل ماصة.

3. to aspirate the liquid in the tip, press the plunger to the first stop. This part of the stroke is the calibrated volume displayed on the digital volume indicator. Do not press the plunger all the way down, or you will draw up too much solution.

3. لشفط السائل من الطرف، اضغط على المكبس حتى المحطة الأولى. هذا الجزء من السكتة الدماغية هو الحجم المعايرة المعروض على مؤشر الصوت الرقمي. لا تضغط على المكبس بالكامل حتى لا تسحب كمية كبيرة من المحلول.

4., immerse part of the disposable tip into the sample.

4.، اغمر جزءًا من الطرف القابل للتصرف في العينة.

5. Allow the push-button to return slowly to the up position. Never let it snap up! (If it does happen, tell a TA so that the microliter pipettor may be dismantled and cleaned to prevent corrosion and the contamination of your succeeding samples.) Do this slowly and keep the tip submerged in the solution to prevent any air bubbles from entering the tip-this will mess up your volume measurement.

5. دع زر الضغط يعود ببطء إلى الوضع العلوي. لا تدعه يرتفع فجأة! (إذا حدث ذلك، فأخبر مساعد المختبر حتى يتم تفكيك ماصة الميكرولتر وتنظيفها لمنع التآكل وتلوث العينات اللاحقة). افعل ذلك ببطء مع إبقاء الطرف مغمورًا في المحلول لمنع دخول أي فقاعات هواء إلى الطرف - فهذا سيؤثر على قياس الحجم.

6. Wait a few seconds to ensure that the full volume of sample is drawn into the tip.

6. انتظر بضع ثوانٍ للتأكد من سحب كامل حجم العينة إلى طرف الماصة.

7. Withdraw the tip from the sample liquid. You should observe the liquid in each type of tip with each pipettor so that you can become aware if there is a significant problem with the pipettor. This is an incredibly important part of the technique and becoming efficient at pipetting small volumes.

7. اسحب طرف الماصة من سائل العينة. ينبغي عليك مراقبة السائل في كل نوع من أنواع رؤوس الماصات مع كل ماصة لتتمكن من معرفة ما إذا كانت هناك مشكلة كبيرة فيها. يُعدّ هذا جزءًا بالغ الأهمية من التقنية، ويُسهم في إتقان سحب كميات صغيرة من السوائل.

8. To dispense the liquid, touch the tip end to the sidewall of the receiving vessel and depress the plunger slowly to the first stop. Wait two seconds. Then press the plunger to the second stop (the bottom stroke), expelling any residual liquid in the tip.

8. لتوزيع السائل، المس طرف الماصة بجدار الوعاء المستقبل واضغط على المكبس ببطء حتى يتوقف. انتظر ثانيتين. ثم اضغط على المكبس حتى يتوقف للمرة الثانية (الضربة السفلية)، لإخراج أي سائل متبقٍ في الطرف.

9. With the plunger fully depressed, withdraw the microliter pipettor from the vessel carefully, with the tip sliding along the wall of the vessel.

٩. مع الضغط الكامل على المكبس، اسحب ماصة الميكرولتر من الوعاء بحرص، مع انزلاق طرفها على طول جدار الوعاء.

10. دع المكبس يعود ببطء إلى الوضع العلوي.

10. Allow the plunger to return slowly to the up position.

١١. تخلص من الطرف. استخدم طرفًا مختلفًا في كل مرة تجمع/توزع فيها مواد مختلفة. إذا لم تفعل ذلك، ستكون تركيزات المحاليل غير دقيقة، وبالتالي ستكون بياناتك غير دقيقة أيضًا.

11. Discard the tip. You want to use a different tip each time you are gathering/dispensing different materials. If you don't do this, your concentrations of solutions will be inaccurate, and as a result, so will your data.

Note: To prevent liquids from being drawn into the microliter pipettor shaft pipette slowly and never invert or lay microliter pipettor on its side with liquid in the tip.

ملاحظة: لمنع دخول السوائل إلى عمود الماصة الميكرولترية، استخدم الماصة ببطء ولا تقلبها أبدًا أو تضعها على جانبها مع وجود سائل في رأسها.

Position 1 is where the pipette is at rest

Position 2 (First Stop) is reached by pushing down on the plunger until resistance is met

Position 3 (Second Stop) is reached by pushing down from position 2

The plunger will stop at two different positions when it is depressed. The first of these stopping points is the point of initial resistance and is the level of depression that will result in the desired volume of solution being transferred. The second stopping point is when the plunger is depressed beyond the initial resistance until it is in contact with the body of the pipettor. At this point, the plunger cannot be depressed further. This second stopping point is only used for the complete discharging of solutions from the plastic tip.

سيتوقف المكبس عند موضعين مختلفين عند الضغط عليه. نقطة التوقف الأولى هي نقطة المقاومة الأولية، وهي مستوى الضغط الذي سيؤدي إلى نقل الحجم المطلوب من المحلول. نقطة التوقف الثانية هي عندما يتم الضغط على المكبس بما يتجاوز المقاومة الأولية حتى يلامس جسم الماصة. عند هذه النقطة، لا يمكن الضغط على المكبس أكثر. تُستخدم نقطة التوقف الثانية هذه فقط لتفريغ المحاليل بالكامل من الطرف البلاستيكي

E. **Safeguards for a pipette. (**INFORM YOUR INSTRUCTOR IMMEDIATELY).

Each micropipette is very expensive. To keep these pipettors functioning properly it is important that they be handled with care. Please follow these rules to keep from breaking the micropipettes

كل ماصة دقيقة باهظة الثمن. للحفاظ على عمل هذه الماصات بشكل سليم، من المهم التعامل معها بعناية. يُرجى اتباع هذه القواعد لتجنب كسر الماصات الدقيقة

1. Never adjust the volume beyond the range of the micropipettor. No micropipette should be adjusted below zero µl. The P20 should never be adjusted above 20µ, the P200 over 200 ul and the P1000 over 1ml.

1. لا تقم أبدًا بضبط الحجم خارج نطاق الماصة الدقيقة. لا ينبغي ضبط أي ماصة دقيقة على أقل من صفر ميكرولتر. لا ينبغي أبدًا ضبط P20 على أكثر من 20 ميكرولتر، وP200 على أكثر من 200 ميكرولتر، وP1000 على أكثر من 1 مل.

2. لا تضغط أبدًا على قرص ضبط مستوى الصوت. إذا أصبح من الصعب ضبط المقبض، فهذا يعني على الأرجح أنك تجاوزت الحدود المسموح بها للماصة أو أن الماصة تالفة. الرجاء الإبلاغ عن المشكلة إلى المدرب أو TA.

2. Never force the volume adjustor dial. If the knob becomes difficult to adjust it probably means that you are exceeding the limits for the pipette or the pipette is damaged. Please report the problem to the instructor or TA.

3. Keep the pipette clean and unclogged at all times. If you feel excessive resistance when you depress or release the plunger, then the pipette is clogged and needs to be cleaned.

3. حافظ على نظافة الماصة وعدم انسدادها في جميع الأوقات. إذا شعرت بمقاومة مفرطة عند الضغط على المكبس أو تحريره، فهذا يعني أن الماصة مسدودة وتحتاج إلى التنظيف. 4. لا تسقط الماصات الدقيقة.

4. Do not drop the micropipettes.

5. Always use a smooth motion when using the pipetters. This will help give you accurate measurements and also prevent breakage of pipettes.

5. استخدم دائمًا حركة سلسة عند استخدام الماصات. سيساعدك هذا على الحصول على قياسات دقيقة ويمنع أيضًا كسر الماصات.

6. Always choose to appropriate size pipette for the volume you are measuring.

7. Always dispose of tips in appropriate waste containing.

6. اختر دائمًا الماصة ذات الحجم المناسب للحجم الذي تقيسه. 7. تخلص دائمًا من رؤوس الماصات في حاويات النفايات المناسبة.

F. Procedure: Calibrating and Using a Micropipette and the Mass of Water

In this experiment you will learn to use the adjustable micropipettes of various sizes and measure their accuracy, precision, and calibration. Pipette a known volume of degassed water onto a balance and weight it. With the digital top loading balance in our laboratory.

في هذه التجربة، ستتعلم كيفية استخدام الماصات الدقيقة القابلة للتعديل بأحجام مختلفة وقياس دقتها وضبطها ومعايرتها. اسحب حجمًا معروفًا من الماء منزوع الغازات باستخدام الماصة على الميزان وقم بوزنه. باستخدام الميزان الرقمي ذي التحميل العلوي في مختبرنا.

1. Place a weighing dish on a balance and tare it.

2. Pipette 750 µL using the correct model of pipette 4 times into the weigh dish and record the mass.

3. Pipette 50 µL using the correct model of pipette 4 times into the weigh dish and record the mass.

4. Pipette 10 µL using the correct model of pipette 4 times into the weigh dish and record the mass.

5. To save time and materials, just tare the balance between each addition of the defined volume of water. Make sure that the balance shows 0.000g before adding any additional water.

6. Record these values in the report sheet table and determine the average and standard deviation. If your value is accurate and precise as determined by the standard values, you will have successfully completed the exercise.

Pipetting accurately and precisely is a major component to getting good data in this course.

How Pipetting Technique Contributes to Error

مسح طرف الماصة. قد يؤدي مسح طرف الماصة دون داعٍ إلى فقدان المادة.

- Tip Wiping. Unnecessary tip wiping can lead to material loss.
- Choosing the Wrong Pipetting Mode. ... • اختيار وضع السحب بالماصة الخاطئ. ...
- Working Too Quickly. ... العمل بسرعة كبيرة. ..
- Pipetting at an Angle. ... السحب بالماصة بزاوية. ...
- Using the Wrong Pipette Tips استخدام رؤوس ماصة خاطئة
- If at any time a pipette is dropped or for any reason you suspect the pipette is not functioning properly INFORM YOUR INSTRUCTOR IMMEDIATELY.

إذا تم إسقاط الماصة في أي وقت أو كنت تشك لأي سبب من الأسباب في أن الماصة لا تعمل بشكل صحيح، فأبلغ مدربك على الفور.

YouTube link:

https://www.youtube.com/watch?v=5ecmMl-VsTo

*** Regarding your lab report:**

At the end of the lab session, submit your pre- lab report as well as your measurements/ readings to the instructor so that they can be recorded for you.