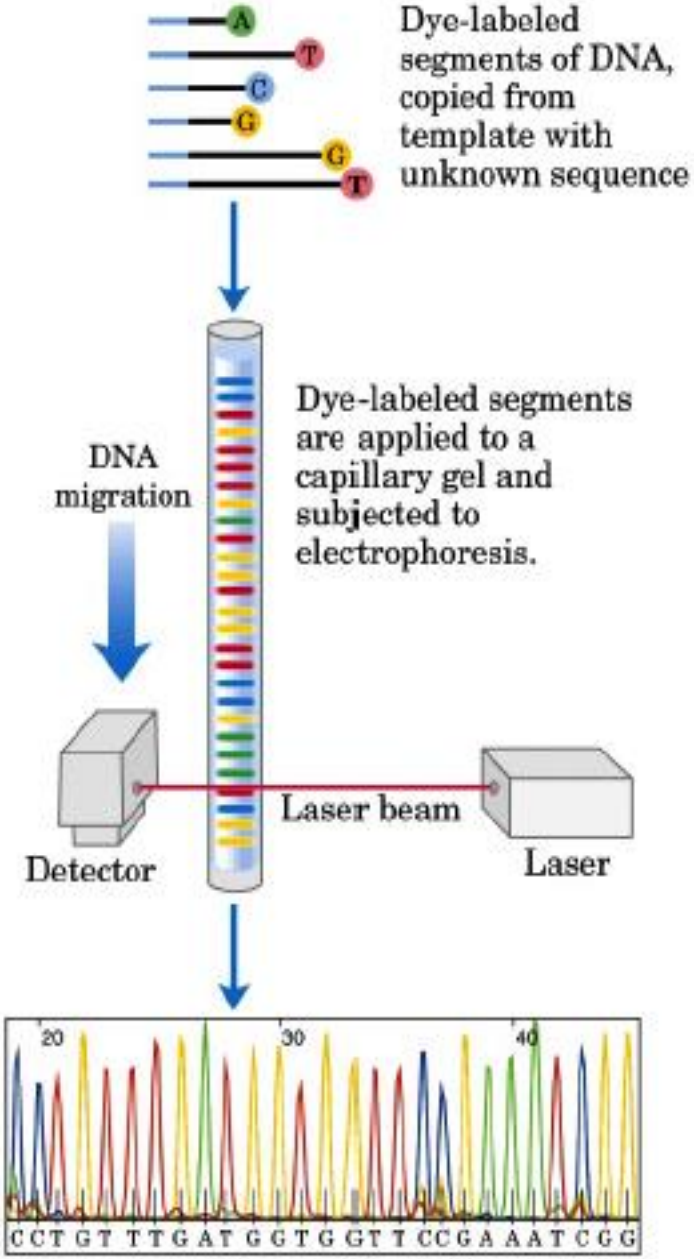
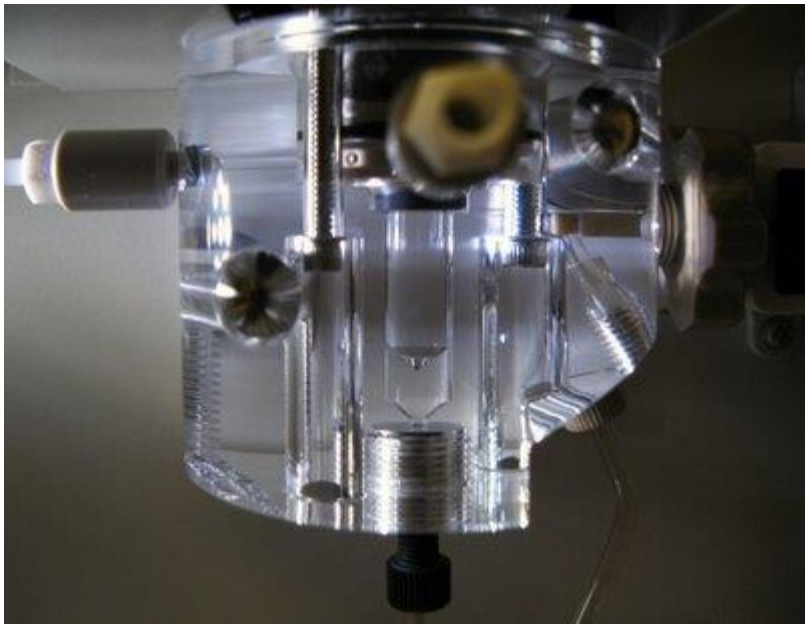
Il sequenziatore automatico



Computer-generated result after bands migrate past detector

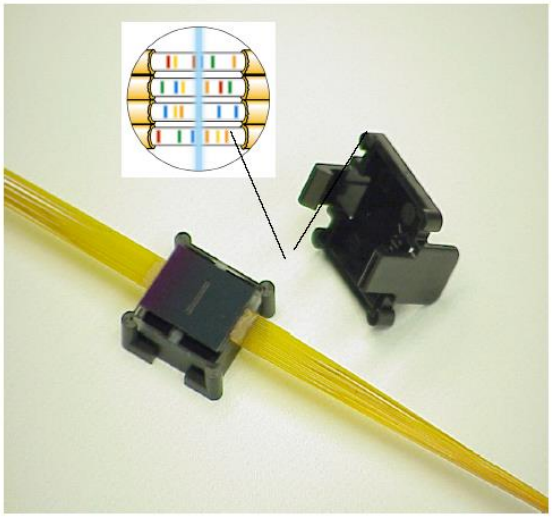
Forno per mantenere
la temperatura controllata

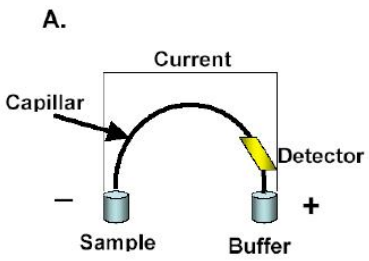
Alloggi per tampone di corsa e piastra portacampioni.



Pompa per il caricamento forzato del polimero ("setaccio") che permette la separazione delle molecole in base alla loro massa molecolare

La corsa elettroforetica dei frammenti fluorescenti avviene in un capillare del diametro di 50 μm contenente un polimero di corsa



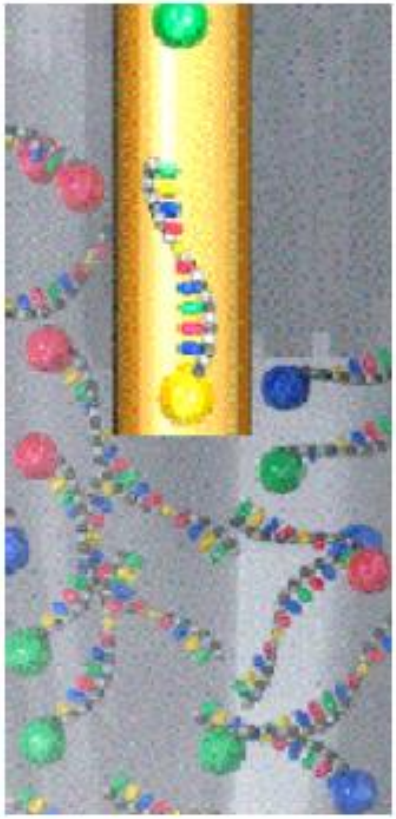


il sistema carica automaticamente il capillare con il polimero di corsa

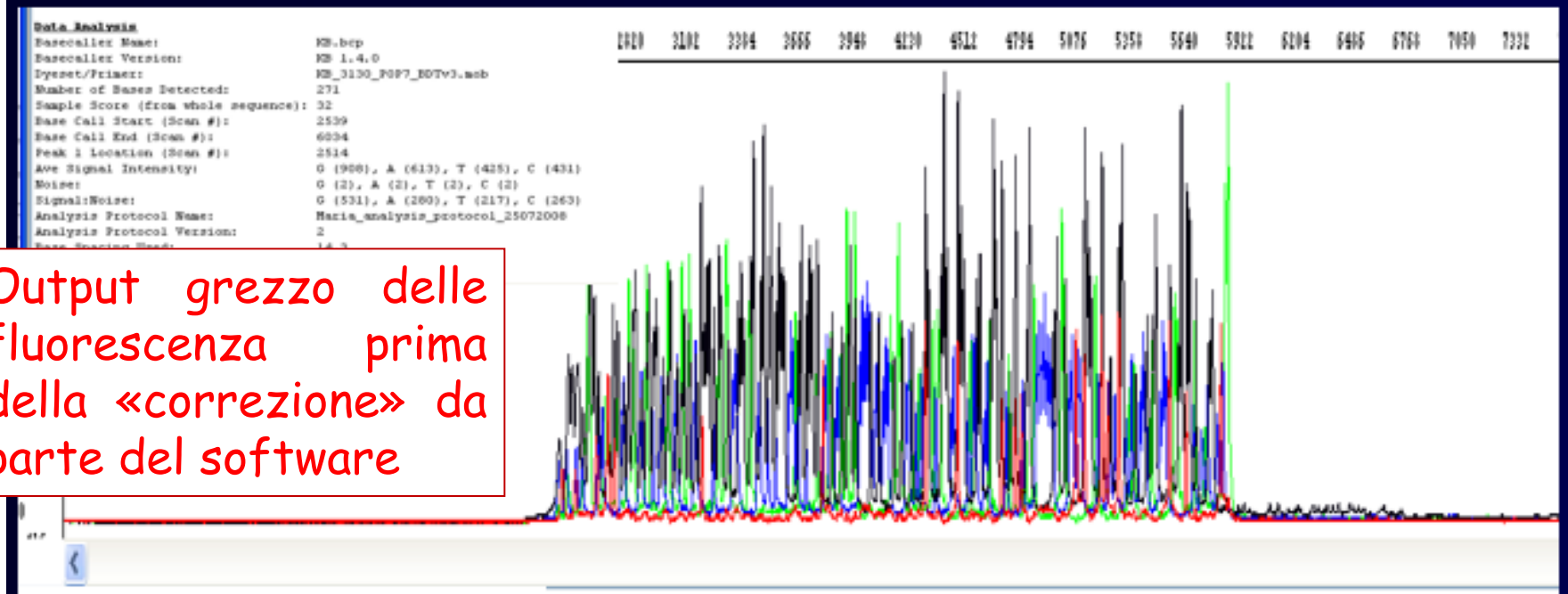
i frammenti marcati di DNA vengono rilevati man mano che correndo lungo il capillare, raggiungono la "detection window"

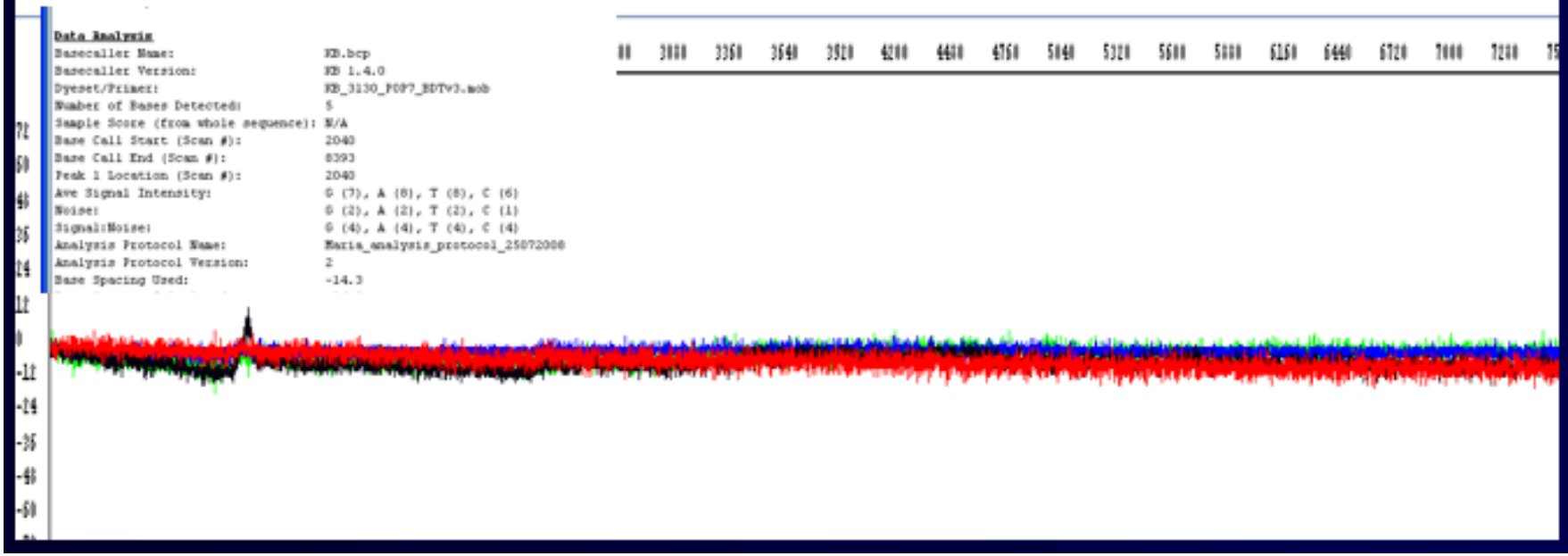
Caricamento del elettrocinetico delcampione

- Capillary and electrode are placed into the sample
- Voltage is applied
- - charged DNA enters the capillary and it migrates toward the "+" electrode at the other end of the capillary



Output grezzo delle fluorescenza prima della «correzione» da parte del software





Parametri per la separazione elettroforetica

Status Overview

Instrument ID: AB3130XL
Run ID: Run_AB3130XL_2008-03-27_16-16_1672
Plate Name: MARIA27_marzo_2008
System Status: Processing

Sensor States

Laser:	On
EP:	On
Oven:	On
Front Doors:	Closed
Oven Door:	Closed
Autosampler:	Return

Sensor Values

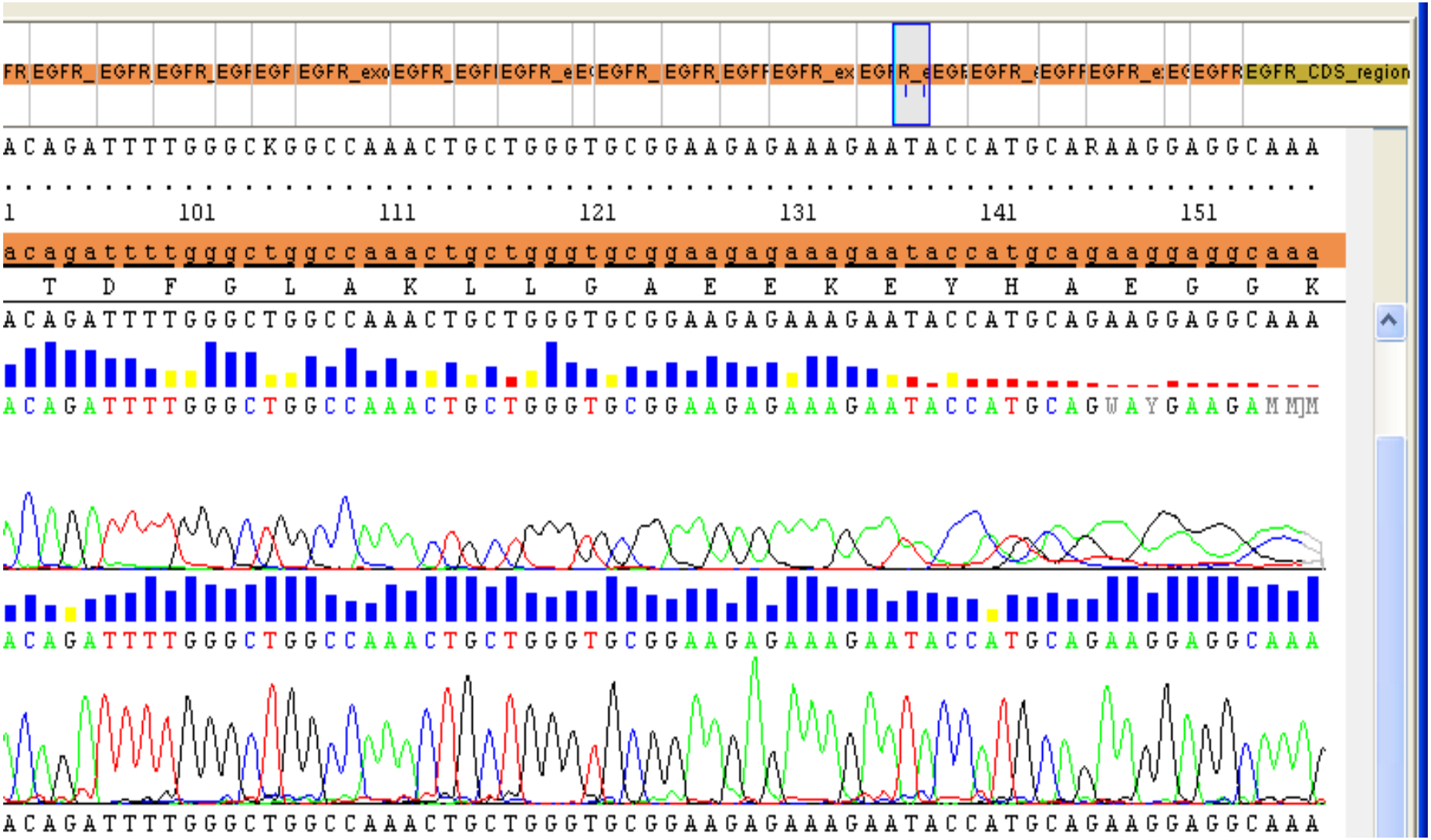
EP Voltage	8.3	8.5
EP Current	100.7	
Laser Power	15.0	15.0
Laser Current	5.4	
Oven Temp	60.0	60.0
Cell Heater	49.6	

Events

```
16:31:51 Collecting data...
16:31:50 Collecting data...
16:29:50 Waiting for data...
16:23:17 Starting Electrophoresis
16:23:06 Moving Buffer Reservoir to Capillaries
16:22:53 Washing Capillaries in water after Sample Injection
16:22:45 Injecting Samples
16:22:36 Moving Sample Tray to Capillaries
16:22:18 Washing Capillaries in water
16:22:18 End of Pre-Run
16:19:17 Starting Pre-Run
16:19:15 Testing for Normal Current.
16:19:03 Moving Buffer Reservoir to Capillaries
16:18:54 Washing Capillaries in water
16:18:26 Filling Array with Polymer.
16:17:26 Waiting for Oven to Stabilize at Run Temperature
16:17:26 Filling Polymer Pump
16:16:59 Initializing Autosampler
16:16:58 Turning Array Heater On.
16:16:57 null
```

Errors

Cosa sono le barre blu/gialle rosse?



Determinazione della qualità delle sequenze: **algoritmo Phred**

Phred assegna un punteggio di probabilità di accuratezza di identificazione di ogni base mentre legge i tracciati elettroforetici

Phred analizza gli elettroferogrammi e applica metodi statistici per esaminare l'andamento delle 4 basi nella regione che precede e segue ogni picco.
Il Processo di analisi è suddiviso in diverse tappe

Determinazione della qualità delle sequenze: **algoritmo Phred**

valore di affidabilità: Phred-score

Phred-score = $-10 \log_{10} P$ (probabilità di errore)

Phred-score = 10	P=1/10	
Phred-score = 20	P=1/100	ok
Phred-score = 30	P=1/1000	

Al termine dell'analisi, Phred genera un file a cui ogni base è assegnato il corrispondente Phred-score