

# Troubleshooting

This troubleshooting guide has also been placed on the desktop of all the FACS Facility computers.

In the event of a problem with the machine, please seek Berta Raposo or Yolanda Noriega (**Ext 4499/4526**). If he is not available please report your problem to him later via the notebook provided on top of the cytometers or email (**[citometria@cbm.uam.es](mailto:citometria@cbm.uam.es)**). You may also call Becton Dickinson for help. Their BD phone number is located on the side of FACS Calibur S along with the serial numbers of all the machines in the facility.

**NOTE:** The CellQuest Status window from Cytometer menu can be used to help diagnose STATUS problems.

## **System Stays In NOT READY**

Check the following:

- Sheath reservoir empty
- Waste reservoir full
- Initial 5-minute warm up is not complete
- Electrical connector on sheath probe is loose or disconnected

## **System Stays In STANDBY (System Not Pressurized)**

When the system is not pressurized, installation of a sample tube with the fluidics control button set to RUN will not change the status to READY it will remain in STANDBY. Pressure may be leaking from the reservoir caps or the vent valve, or the sample tube has not been pressurized properly. The sample either does not flow to the flow cell or flows poorly, and the FACSCalibur produces poor data.

Check the following:

- Air escaping from the sheath reservoir (tighten cap)
- Vent valve in clown position
- Cracked sample tube
- Bal seal worn out
- Blue connector for sheath reservoir not correctly seated

Bubbles are registered as events, producing spurious data. Bubbles can also cause alteration in the sample flow path, resulting in less than optimal data. The fluidic system should be re-primed. If the sheath reservoir was run dry, refill sheath and RUN system for 5 to 10 minutes with a test tube of distilled water before using for sample acquisition. This will remove bubbles and air from the sheath lines.

### **No Events on the Computer Screen**

Check the following:

- If the system remains in STANDBY, check items under System Stays in STANDBY above.
- If the STATUS window displays READY, make sure sample concentration is adequate and properly mixed.
- Ensure instrument settings are correct for applications being run.
- Ensure threshold is not eliminating the populations by being set too high.
- Check the CellQuest Status window from Cytometer menu to see if readings are being updated. If the readings are not being updated, communication between the instrument and the computer is not present. Turn off the computer and the FACSCalibur, turn them back on, and resume where you left off.
- Prime the fluidics to remove air bubbles that may be trapped in the flow cell. These trapped air bubbles can deflect the sample stream away from the laser beam, causing no events to be detected.

## AYUDA PARA RESOLVER PROBLEMAS HABITUALES EN EL CITÓMETRO

Esta guía de ayuda para resolver problemas usuales del citómetro también se encuentra disponible en el escritorio de todos los ordenadores de adquisición de FACSCalibur.

En el momento en que haya un problema con el equipo de citometría se ruega contacten con Berta Raposo o con Yolanda Noriega (**Ext 4499/4526**). En caso de que no se encuentren disponibles en ese momento informen del problema lo antes posible a través del cuaderno de notas que aparece junto al equipo o vía e-mail (**citometria@cbm.uam.es**). Pueden también llamar a Becton Dickinson solicitando su ayuda. El número de teléfono de BD se encuentra apuntado en el lateral del equipo FACSCalibur junto con el número de serie del equipo correspondiente.

**NOTA:** La ventana de estado del citómetro que aparece al abrir el programa CellQuest o CellQuestPro dentro del menú Cytometer pinchando en Status puede utilizarse como ayuda para el diagnóstico de problemas del STATUS.

### **Si nos indica: System Stays In NOT READY**

Se deben hacer las siguientes comprobaciones:

- Ver si el recipiente Sheath está vacío (rellenar hasta la marca, nunca más de tres cuartos de su capacidad)
- Ver si el recipiente Waste está lleno más de tres cuartos (vaciarlo y añadir un chorrito de lejía aproximadamente 100ml)
- El tiempo que necesita el equipo desde que se enciende hasta que está READY aún no ha transcurrido (entre 5 y 10 minutos)
- El conector eléctrico del sheath se ha aflojado o desconectado

### **Si nos indica: System Stays In STANDBY (El sistema no tiene presión)**

Si el sistema no está presurizado, al colocar el tubo de la muestra y pulsar el botón RUN del equipo el status no cambia a READY sino que permanece en STANDBY. La presión puede fugarse a través del tapón del recipiente del sheath o a través de la válvula, o puede que el tubo de muestra no se haya presurizado correctamente. La muestra tampoco fluye hacia la zona donde interacciona con el láser o lo hace pobremente, de forma que el FACSCalibur produce datos insuficientes y de mala calidad.

Se debe comprobar lo siguiente:

- Ver si hay fuga de aire en el recipiente del sheath (ajustar el tapón)
- La válvula de la presión está en posición off (ponerla en on)
- El tubo de muestra está rajado o no ajusta bien (cambiarlo)
- La arandela que sella herméticamente el tubo de muestra se ha estropeado o dado de sí
- El conector azul del recipiente del sheath no ajusta correctamente

Las burbujas se registran como si fueran eventos produciendo datos erróneos. Además, pueden causar alteraciones en el fluido que contiene la muestra dando peores resultados. El sistema debe estar libre de burbujas que se eliminan pulsando el botón PRIME. Si el recipiente del sheath estaba vacío y el sistema estaba en RUN, debe rellenarse el sheath y poner el sistema en RUN durante 5 o 10 minutos con un tubo de agua destilada en el tomamuestras antes de colocar la muestra para adquirir datos. Esto hace que se eliminen las burbujas y el aire del circuito.

### **Si no aparecen Eventos en la pantalla del ordenador de adquisición**

Se deben hacer las siguientes comprobaciones:

- Si el sistema permanece en STANDBY, se deben realizar las comprobaciones indicadas anteriormente en el caso de que System Stays in STANDBY.
- Si la ventana de STATUS indica que el equipo está READY, se debe comprobar que la concentración de la muestra es la adecuada y que está mezclada adecuadamente.
- Se debe comprobar que los instrument settings son los adecuados para la muestra y el análisis.
- Se debe comprobar que el threshold no está demasiado alto de modo que se están eliminando poblaciones.
- Se debe comprobar desde el menú Cytometer del CellQuest pinchando en Status que si el sistema esta ready eso se está visualizando en la ventana de Status. De no ser así, significa que el citómetro no está conectando con el ordenador de adquisición, de forma que habría que apagarlo todo tanto el equipo como el ordenador, esperar 20 minutos a que se enfríe el láser, volver a encender todo (primero el citómetro y a los 30 segundos el ordenador) y continuar con el trabajo.
- Se debe hacer un Prime para eliminar las burbujas de aire que pudieran quedar atrapadas en la zona donde interacciona la muestra con el láser, ya que estas burbujas pueden hacer que el haz de luz del láser que atraviesa la muestra se desvíe de forma que no se detecten eventos.