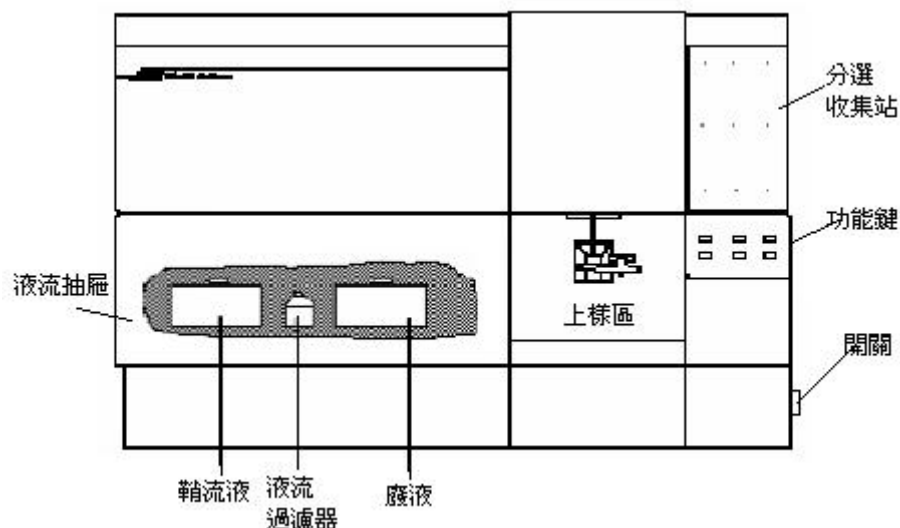


## 第 3 章 FACSCalibur 日常操作

### 3.1 FACSCalibur 基本結構

#### 3.1.1 儀器本體：

1. 電源開關：在FACS Calibur儀器右側下方，先啟動儀器本體，再打開電腦。



#### 2. 儀器面板：

儀器前方面板的右下方有三個流速控制鍵、及三個功能控制鍵。

##### 流速控制：

LO： 樣品流速：12  $\mu\text{l}/\text{min}$

MED： 樣品流速：35  $\mu\text{l}/\text{min}$

HI： 樣品流速：60  $\mu\text{l}/\text{min}$

##### 功能控制：

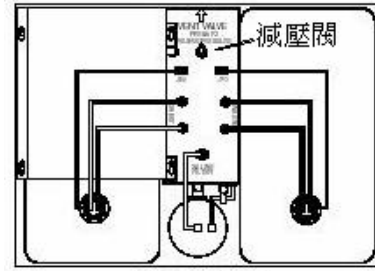
**RUN：** 此時上樣管處加壓，使細胞懸液從進樣針進入流動室。（正常顯示燈號：綠色；黃色時表示儀器不正常，請檢查是否失壓。）

**STANDBY：** 無樣品或暖機時之正常位置，此時鞘液停止流動，雷射功率自動降低。

**PRIME：** 去除流動室中的氣泡，流動室施以反向壓力，將液流從流動室沖入廢液筒，持續一定時間後，鞘液注滿流動室。PRIME 結束，儀器恢復 STANDBY 狀態。

### 3. 儲液箱抽屜：

在主機左下方之儲液箱抽屜。可向前拉開，內含鞘液筒、廢液筒、鞘液過濾器Sheath Filter，及空氣濾網 Air filter。請注意氣路減壓閥VENT TOGGLE之位置。



儲液箱抽屜

**鞘液筒：** 容積4升，位於抽屜左側。裝滿鞘液筒，儀器可以運行大約 3小時。筒上裝有液面感應器，鞘液用完時，電腦軟體會有顯示。鞘液筒蓋上有環扣，保證鞘液筒密閉。

**廢液筒：** 容積4升，位於抽屜右側。筒上裝有液面感應器，廢液滿時，電腦軟體會有顯示。注意廢液可能有潛在的生物傳染性。

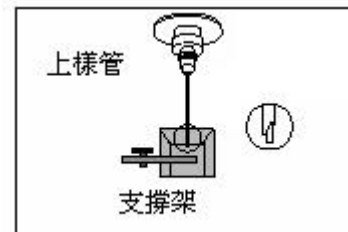
**鞘液過濾器：** 0.22 $\mu$ m過濾器，去除鞘液中的雜質，保證進入流動室的鞘液是乾淨的。

**氣路減壓閥：** 沿箭頭方向移動閥門開關以進行加壓或減壓。在鞘液筒裝鞘液時，需要減壓。

**空氣過濾網：** 用於過濾冷卻雷射的空氣。

### 4. 上樣品區：

上樣品區是樣本管的上樣位置。它包括三個部分，一個是進樣針Sample Injection Tube，將樣本輸入流動室，還有就是支撐架 Tube Support Arm、和液滴存留系統Droplet Containment System。



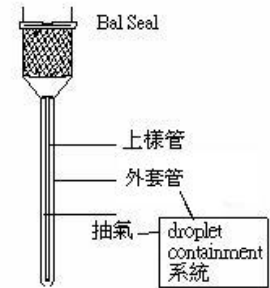
**進樣針：** 是一根不鏽鋼管，將細胞從樣本針中吸入流動室。進樣管外有一套管，是液滴保留系統的一部分。

**支撐架：** 用於支撐樣本管、並負責啟動液滴存留系統。支撐架有三個位置：位於樣本管之下的中位，樣本管左側或右側。

液滴存留系統：

系統由支撐架、真空幫浦和外套管組成。當支撐架位於左側或右側位置時，真空幫浦就會啓動，將液體從外管吸入廢液筒內。上樣時，須注意將支撐架位於中位，以避免過多樣品被抽吸到廢液筒內（當支撐架位於中位，真空幫浦停止工作）。更換樣品時，讓儀器保持

**RUN** 的模式，使得進樣針可以反沖。切換到 **STANDBY** 模式前，確保液路已沖洗徹底以免碎片沈積到流動室中。



### 3.1.2 Macintosh 電腦與印表機：



## 3.2 FACS Calibur 開機

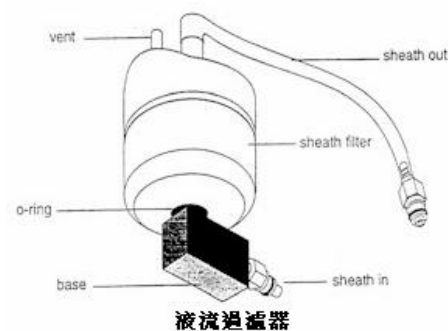
FACSCalibur 的設計將儀器的維護工作減至最少，但是，為了保證儀器的正常運轉和測定結果的可靠，儀器開機前後仍需要進行一些必要的常規維護。

### 3.2.1 開機標準程序：

1. 開啓細胞儀電源。
2. 開啓其他周邊配備電源，如印表機及 M. O.。
3. 開啓電腦。
4. 確認鞘液筒(4L)有八分滿的 FACS FLOW，確實旋緊。
5. 將廢液倒掉，並在廢液筒(4L)中加入總體積1/10量家用漂白水。
6. 將氣壓閥方向調在加壓（Pressurize）位置。
7. 排除液流過濾氣中的氣泡。
8. 執行 PRIME 功能兩次。
9. HIGH RUN 兩分鐘，即可開始分析樣品。

### 3.2.2 檢品上機前之再確認事項：

1. 是否已將檢品濃度調至  $1 \times 10^6$  cells/ml？一般實驗只需 1 ml 之檢品。
2. 是否已小心地去除檢品中之細胞團塊，以防止管路堵塞？可使用附濾網 FALCON 試管 (Cat. No.2235) 或 30-50  $\mu\text{m}$  的尼龍篩網。
3. 是否已將檢品放至 FALCON 2052 試管中？試管是否有裂痕？
4. 是否已將專用鞘液筒充填至八分滿？
5. 是否已將廢液倒掉，並在廢液筒中加入足量漂白水？
6. 是否已將液流過濾器中之氣泡排空？
7. 是否已將所有管線及管路裝置妥善？並將氣壓閥方向調至正確定位？
8. 是否已執行 Prime 兩次以將管路及 Flow Cell 中之氣泡排空？
9. 請填寫使用登記表。



### 3.3 FACS Calibur 關機

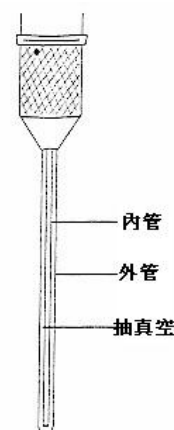
實驗結束後，請於關機前清潔加樣針的外管和內管，防止加樣針堵塞或有染料殘留。

#### 3.3.1 執行「日常除污」與「清洗」時機：

- 如在使用了一些特殊螢光染劑（如PI、AO、TO等）後，需執行「日常除污」與「日常清洗」。
- 全血樣品如進行Lyse/No Wash分析（如 ProCount, VAC34 Stem Count），需執行「日常除污」與「日常清洗」。
- 某些樣本中含有大量蛋白成分，這些蛋白成分在上樣針中會殘留，積聚過多，會影響實驗檢測。需執行「日常除污」與「日常清洗」。
- 一般細胞株、或全血樣品進行Lyse /Wash分析，只需執行「日常清洗」。

#### 3.3.2 「日常除污」程序

1. 執行 PRIME 功能3-5次。
2. 將樣品支持架左移。
3. 取 2 c.c. FACS Rinse 上樣品，讓儀器的真空系統抽取約1 c.c. 的液體。
4. 將樣品支持架回正，按 HI RUN，然後讓FACS Rinse 清洗管路10分鐘。
5. 取 2 c.c. dH2O 上樣品，重覆上述步驟1-3。



#### 3.3.3 「日常清洗」程序 應用時機：關機前必要動作（嚴格要求）。

6. 執行 PRIME 功能3-5次。
7. 將樣品支持架左移。
8. 取 2 c.c. FACS Clean 上樣品，讓儀器的真空系統抽取約 1 c.c. 的液體。
9. 將樣品支持架回正，按 HI RUN，然後讓FACS Clean 清洗管路10分鐘。
10. 取 2 c.c. dH2O，重覆上述步驟1-3。
11. 注意最後只留約 1 c.c. dH2O 在試管中。

#### 3.3.4 FACS Calibur 關機

10. 按Standby 以冷卻雷射，Standby五分鐘後關閉細胞儀。（務必等五分鐘後再關 FACSCalibur 電源，以延長雷射光源壽命。）
11. 倒掉廢液，並回填足量漂白水。

12. 將氣壓閥放在「漏氣」位置。將鞘流液筒充填至八分滿（前人種樹後人乘涼）。
13. 確認退出電腦中所有BD應用軟體，所有數據資料已儲存備份。關程式“File” → “Quit”（選擇“Don't save”）
14. 關閉蘋果電腦。“Special” → “Shutdown”。

### 3.3.5 清洗液的選擇

- **FACS Clean** 清洗液：流式細胞儀的常規清洗用液，直接使用，可有效去除儀器管路內的樣本、染料等造成的污染。
- 漂白水—NaClO 溶液：流式細胞儀的常規清洗用液。目前市場上的漂白水有效氯濃度多為 5-10%。0.45mm 濾膜過濾後備用。
- **FACS Rinse** 清洗液：流式細胞儀的清洗液，直接使用，可有效去除儀器管路內積聚的蛋白成分。
- 表面活性劑—Triton：使用濃度為 0.1%，0.45mm 濾膜過濾後備用。使用表面活性劑時，注意上樣管中不要加滿，也不要反沖，防止操作不當造成液體進入氣路，或進入壓力控制器。
- 蒸餾水：為了防止管路內殘留有清洗液，形成結晶或造成管路介面的腐蝕，在使用清洗液清洗完畢後，一定要用蒸餾水，再次沖洗管路。0.45mm 濾膜過濾後備用。

**BD FACS Rinse 與 FACS Clean**～專為細胞儀日常除污與清潔設計。

- 生物檢品常含有核酸蛋白質，細胞碎片等，容易在管路與流動室中堆積，造成低解析度、低敏感度、高CV值降低分選效能等。**FACS Rinse** 與 **FACS Clean**可為您解決上述問題。
- **FACS Rinse** 是除污用清潔劑，可去除核酸蛋白質堆積物，通暢管路。
- **FACS Clean** 是清潔用，以漂白水為基質，可消毒生物危險性檢品，清淨管路，是日常清洗必用溶液。即時可用配方。

**BD FACS Flow 鞘流液**～專為流式細胞技術設計之平衡緩衝液。

- 即時可用配方，不須溶解，毋須稀釋。
- 製程中以0.1 um 的濾紙過濾，保證無鹽粒。
- 降低血球細胞的自體螢光。
- 絕不含 Sod Azide 防腐劑。
- 可回收 20 公升包裝。

## 3.4 FACS Calibur 每月維護

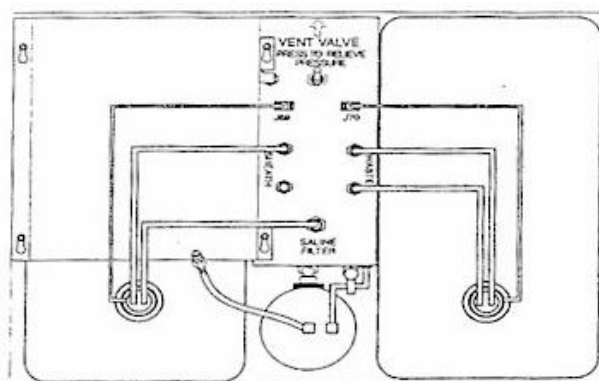
流式細胞儀使用一段時間後，在鞘液管路、廢液管路和流動池中會有殘留的碎片、污染物等，因此，需要定期清洗管路，要求至少每個月做一次，如果處理樣本量很大，或經常使用附著性染料（如PI、AO等），則需要增加管路清洗頻率。清潔管路時使用含有效氯（NaClO）濃度為1-2%的稀釋漂白水。注意用漂白水清洗管路完畢後，必須換蒸餾水，再次沖洗管路，以防止管路有漂白水殘留。

### 3.4.1 使用時機：

- 此程序應列入貴科／室／所之標準作業程序，並應確實登錄執行日期。
- 執行 FACS Comp 時，發現螢光訊號的敏感度下降時，如 FSC Sensitivity 下降。
- 分析樣品時，發現螢光訊號之背景值升高，懷疑是管道不淨所致時。

### 3.4.2 月保養程序：

1. 在儀器減壓後，取下鞘液筒，倒空。如有必要，應清洗鞘液筒。
2. 用備用的鞘液筒，裝一公升 FACS Clean，取代原有鞘液筒。
3. 如下圖，釋放來自過濾器的出水接頭，並將原來鞘液筒的出水接頭，接到原來過濾器的出水接頭的入口。如此可將鞘液濾器短路，使鞘液不流經濾器，直接沿鞘液管路進入流動室。
4. 以 2 ml FACS Clean 為樣品，HI RUN 20分鐘。
5. 取下FACS Clean樣品。
6. 取另一備用鞘液筒，內裝兩公升dH<sub>2</sub>O，安裝妥當。
7. 以 2 ml dH<sub>2</sub>O為樣品，HI RUN 20分鐘。
8. 裝回原來的鞘液筒（含FACS Flow者）。
9. 將液流過濾器的接頭恢復原狀，確認接卡筭密合。
10. 如無需分析樣品，PRIME 兩次，Standby 5分鐘後，即可關機。



越過液流過濾器

### 3.5 定期維護保養

儀器管理人需要定期進行儀器檢查和清潔，這裏主要談一談空氣濾網的清潔：空氣濾網位於鞘液筒上方，可以用吸塵器或水洗的辦法清潔。空氣濾網需要定期檢查，發現濾網髒了，就需要清洗了。

1. 外抽取下空氣濾網。
2. 清潔濾網，如果水洗處理，應等濾網完全乾了以後，再進行安裝。
3. 裝回濾網，將其慢慢推回原位。安裝時注意濾網的方向，氣流由下往上通過。

#### 需定期更換耗材與更換時機：

需定期更換耗材	更換時機	BD目錄號
FACS Flow	上機用平衡緩衝液。體積 20公升。	342003 (騰達行 02-27202215)
FACS Clean	專為細胞儀日常清潔設計。體積 5 公升。	340345 (騰達行 02-27202215)
FACS Rinse	專為細胞儀日常除污設計。體積 5 公升。	340346 (騰達行 02-27202215)
液流過濾器 saline filter	每半年。	343542 (BD 0800211528)
Laser Filter	每年。	343537 (BD 0800211528)
Bal Seal	樣品管會漏氣時。上樣品時覺得鬆鬆的。	343509 (BD 0800211528)
FACS Flow 用水龍頭	As needed.	343532 (BD 0800211528)
鞘液筒 & 廢液筒	會漏氣時。	343665 (BD 0800211528)
新鞘液筒蓋	會漏氣時。	344283 (BD 0800211528)
Falcon 352052 試管	上機專用試管。	Falcon 2052 (汎泰公司 0800213029)
Falcon 352235 試管	附濾網FALCON試管，上機前去除樣品中之細胞團塊，防止管路堵塞。	Falcon 2235 (汎泰公司 0800213029)
印表機紙張	用罄時。	(請自行向電腦周邊器材供應商購買)
印表機墨水	用罄時。	(請自行向電腦周邊器材供應商購買)
Mesh Filter	以尼龍篩網去除樣品中之細胞團塊，防止管路堵塞。	Hydro-Bios 55 $\mu$ m (信安儀器02-23654317)



### 3.6 重要操作程序

根據美國臨床病理學會的規定，實驗室的負責人應建立一套制度來維護與品管流式細胞儀。技術員應定期進行儀器的功能測試，看儀器是否有功能上的缺失，或不穩度，及任何會影響測試數據的因素。並應將維護保養、維修及品管的資料登錄成冊。

#### 3.6.1 重要操作程序：

1. 開機與關機程序是否確實。
2. 日常除污與日常清潔工作是否落實。
3. 儀器的校正與品管（FACS Comp + CaliBrite Beads）
4. 經常觀察 Cytometer Status 視窗。
5. 疑難排解程序：參考下表。

#### 3.6.2 細胞儀疑難排解程序

徵狀	可能原因	排除問題方向
<b>※ 細胞儀問題</b>		
上樣管無法抽真空，即液滴留置系統(DCS)無法正常運作	1.0 上樣管留置器 O-Ring 磨損。	1.1 汰換 O-Ring。
	2.0 上樣管外管鬆脫。	2.1 鬆脫上樣管留置器，推外管進定位，裝回上樣管外管，栓緊。 2.2 旋緊外管。
	3.0 上樣管外管忘了裝回。	3.1 鬆脫上樣管留置器，推外管進定位，裝回上樣管外管，栓緊。
	4.0 廢液排出管被壓迫，或阻塞，不暢通。	4.1 檢視廢液排出管。
	流動室無法回填鞘液	5.0 沒有液流壓力（失壓）。

	5.6	RUN時，檢查Sample Voltage，正常值應低於7volts。
6.0	鞘流液用罄。	6.1 用FACSFlow鞘流液充填至八分滿。
7.0	液流過濾器有氣泡。	7.1 去除氣泡。
樣品試管上不去	8.0 誤用不適合的試管。	8.1 請用Falcon 2052
9.0	試管支持架需調整。	9.1 旋轉調整試管支持架（順時鐘向下、逆時鐘向上）。
10.0	Bal Seal 磨損。	10.1 汰換 Bal seal
<b>※ 數據顯示問題</b>		
收集數據時，不見細胞信號	若狀態視窗Status顯示 <b>READY</b> ，檢視下列可能：	
11.0	儀器條件設定錯誤。設閾參數信號沒有適當放大。	11.1 提高設閾參數信號之倍增（Amp Gain）指數。
12.0	閾值設太高。	12.1 降低閾值。
13.0	選錯設閾參數信號	13.1 檢查設閾參數（一般螢光分析 FSC；DNA分析 FL2-H）。
14.0	沒有放樣品，或細胞濃度不足。	14.1 試試其他樣品或以標準品確認之。
15.0	沒有搖勻樣品，細胞沉澱。	15.1 搖勻樣品。
16.0	上樣管阻塞。	16.1 以漂白水替換樣品、Prime數次、HI RUN十分鐘。如仍阻塞，叫修0800-211528。
17.0	圖譜有設圈選功能，但所檢測的細胞皆不符圈選條件。	17.1 去除圈選功能。
18.0	錯用分析用圖形	18.1 進入圖形格式，改選收集 (Acquisition)格式
19.0	細胞儀與電腦連線失敗。	19.1 關閉細胞儀與電腦，重新開機（先細胞儀、後電腦）以建立連線。
若狀態視窗Status顯示 <b>STANDBY</b> ，檢視下列可能：		
20.0	沒有按 RUN。	20.1 按 RUN。
21.0	沒上樣品管，或樣品管沒放正。	21.1 上樣品管或將樣品管放正。

22.0 樣品管破裂，漏氣。	22.1 換新樣品管。	
23.0 鞘液筒沒有蓋緊，漏氣。	23.1 蓋緊鞘液筒。	
24.0 鞘液筒保護鐵蓋沒有放回原位。	24.1 鞘液筒保護鐵蓋放回原位並卡緊。	
25.0 漏氣閥放在漏氣位置 (VENT)。	25.1 漏氣閥放在加壓位置 (PRESSURIZE)。	
26.0 鞘液管或鞘液濾過液管沒有接通、接好。	26.1 檢視鞘液管或鞘液濾過液管。	
27.0 Bal Seal 磨損。	27.1 汰換 Bal seal。	
<b>若狀態視窗Status顯示 NOT READY，檢視下列可能：</b>		
28.0 雷射正在暖機。	28.1 等五分鐘	
29.0 雷射無法激發光。	29.1 檢查Status視窗之雷射電源，若為 0 mWatts，則將所有儀器與周邊設備關閉，並重新開機。若重複開機2-3次，仍未見電源回復至15mW，叫修 0800-211528。	
30.0 鞘液用罄，或廢液過滿。	30.1 檢視鞘液或廢液水位。	
31.0 鞘液或是廢液液面電子感應器沒有接好或斷線。	31.1 檢查鞘液或是廢液液面電子感應器。	
32.0 鞘液流區有漏氣	32.1 RUN時，將樣品支撐架右移，檢視Status視窗，Sample Voltage應為10.2。若低於10，則更換鞘液筒與筒蓋內橡皮軟墊。	
<b>細胞信號出奇地高</b>	33.0 流動室中有氣泡。	33.1 按PRIME進行流動室的清洗 (Drain/Fill)結束後會自動回復STANDBY，重複至少10次。
	34.0 液流過濾器有氣泡。	34.1 去除氣泡。
	35.0 閾值設太低。	35.1 調高閾值。
	36.0 設閾參數信號放大得太強，連小氣泡都有信號。	36.1 調降參數信號放大設定。

	37.0 細胞濃度太濃。	37.1 稀釋樣品。理想細胞濃度： 1x10 <sup>6</sup> cells/mL；HIGH RUN時 最高可容許5x10 <sup>6</sup> cells/mL， LO RUN時最高可至1x10 <sup>7</sup> cells/mL
	38.0 樣品濃度過高，且流速 設於HIGH。	38.1 將樣品流速改成 MED or LO。 (最佳濃度見37.1)
<b>細胞信號異常得低</b>	39.0 閾值設太高。	39.1 降低閾值。
	40.0 設閾參數信號沒有適當 放大。	40.1 調高參數信號放大設定。
	41.0 忘記搖勻樣品。	41.1 搖勻樣品。
	42.0 細胞很稀。	42.1 濃縮樣品以提高細胞濃度。一 般應用多使用HI或MED流速進 行樣品數據收集。
	43.0 進樣管發生阻塞	43.1 PRIME數次，並使用10%漂 白水與溫dH <sub>2</sub> O進行清洗20分 鐘，流速為HI RUN。然後使 用dH <sub>2</sub> O清洗10分鐘。
<b>細胞信號忽高忽低</b>	44.0 樣品管破裂。	44.1 換新樣品管。
	45.0 Bal Seal 磨損。	45.1 換新 Bal seal.
	46.0 進樣管部份阻塞。	46.1 儀器置於STANDBY，換上廢 液管，進行PRIME數次後，換 上10%漂白水與dH <sub>2</sub> O HI RUN 10分鐘，以清空進樣管。若仍 訊號仍不穩定，則取下進樣 管，以超音波震盪器進行清 理。
	47.0 樣品遭受污染	47.1 確定樣品管乾淨，並重新準備 樣品。
<b>細胞圖形撇掉或移位</b>	48.0 需重調儀器設定。	48.1 執行儀器設定最佳化步驟。
	49.0 流動室中有氣泡。	49.1 執行PRIME數次以清洗流動 室。
	50.0 液流過濾器有氣泡。	50.1 以排氣引流管排除氣泡。
	51.0 流動室太髒。	51.1 進行月保養大清洗程序。
	52.0 誤用了高張溶液。	52.1 檢查緩衝液pH值(7.2-7.4)

	53.0 鞘液筒漏氣。	53.1 取下樣品管，儀器於STANDBY狀態，檢查STATUS視窗之Sample Voltage值應為10.2。若低於10，則更新鞘液筒、筒蓋、與橡皮軟墊，並確認鞘液液面電子感應器與過濾器接頭是否於正確位置。
碎片雜訊過多	54.0 閾值設太低。	54.1 調高閾值。
	55.0 液流過濾器不清潔。	55.1 換新液流過濾器。
	56.0 樣品前處理傷害細胞，造成碎片。	56.1 顯微鏡檢樣品。
	57.0 鞘液液遭污染。	57.1 以dH <sub>2</sub> O沖洗鞘液筒，再灌入新的鞘液液或是新批號鞘液液。
	58.0 流動室不清潔。	58.1 進行月保養大清洗程序。
	數據的變異係數過高 (high CV)	59.0 流動室中有氣泡。
60.0 樣品流速太高 (DNA分析宜用LO)。		60.1 依實驗應用目的，將樣品流速改為MED或LO。
61.0 不正常液流壓力。		61.1 檢查鞘液筒蓋是否栓緊，所有接頭均放置正確。
		61.2 檢查STATUS視窗之Sample Voltage(參考32.1)
62.0 流動室不清潔。		62.1 進行月保養大清洗程序。
63.0 不良的樣品製備方法造成。		63.1 詢求技術指導以改進樣品製備。
64.0 液流過濾器有氣泡。		64.1 打開排氣引流管以排除氣泡。
65.0 誤用不適合的溶液製備標準品 (FACS Flow for CaliBrite Beads)。		65.1 使用相同緩衝液作為鞘液液與樣品製備液。
	65.2 若使用Calibrite beads進行儀器表現檢測時，應使用FACSFlow作為鞘液液與樣品製備液。	

	66.0 標準品過期失效 ( CaliBrite Beads or QC Particles ) 。	66.1 更換新批號Calibrite beads並 重新進行品管程序檢測。
<b>※ 桌上型分選器問題</b>		
分選細胞未流入收集管 或是按壓Purge鈕無液 體流入收集管	67.0 分選管路阻塞	67.1 執行分選管路清洗程序。
	68.0 無分選圈選設定	68.1 於Sort Setup視窗選擇合適的 分選圈選設定。
	68.0 分選細胞速率超過300 cells/sec	69.1 稀釋樣品。
	70.0 沒有按RUN。	70.0 按RUN。
分選後細胞死亡	71.0 分選時使用FACSFlow 作為鞘流液。	71.1 分選時應選用PBS (無Ca <sup>++</sup> 、 Mg <sup>++</sup> ) 。
	72.0 收集管內壁未包覆 4%BSA。	72.1 依包覆步驟進行管壁包覆 4%BSA。
	73.0 分選前細胞已死亡。	73.1 分選前進行存活率檢測。
	74.0 欲分選細胞無法長時間 活於PBS。	74.1 收集管內注入5ml含20%FBS 之適當細胞培養液作為緩衝 層。
細胞回收率過低	75.0 收集管內壁未包覆 4%BSA。	75.1 依包覆步驟進行管壁包覆 4%BSA。
	76.0 離心轉速過高。	76.1 一般細胞離心轉速為1000 – 1200rpm，5-10分鐘。
分選後細胞純度低	77.0 選用RECOVERY分選 模式。	77.1 應選用Single Cell或Exclusion 分選模式以提高分選細胞純 度。
	78.0 分選流速選用MED或 HI。	78.1 分選時應選用LO。
	79.0 分選後進行複檢分析 時，樣品內有氣泡。	79.1 樣品上機前應輕輕搖勻混合樣 品以避免氣泡產生。
	80.0 流動室內有氣泡。	80.1 執行PRIME數次以清洗流動 室。
	81.0 液流過濾器內有氣泡。	81.0 打開排氣引流管以排除氣泡。

	82.0 分選時，閾值設定過高。	82.1 調降閾值。	
<b>※ 四色螢光分析問題</b>			
<b>FL4-%FL3光補償調節值較平常值高出二倍</b>	83.0 鞘液筒蓋未栓緊。	83.1 將鞘液筒蓋栓緊。	
	84.0 流動室內有氣泡。	84.1 執行PRIME數次以清洗流動室。	
	85.0 液流過濾器內有氣泡。	85.0 打開排氣引流管以排除氣泡。	
	86.0 藍光雷射與紅光雷射間時間差不正確。	86.1 執行Time-Delay校準。	
<b>Time-Delay校準時出現信號不足之錯誤訊息</b>	87.0 校準時選用錯誤儀器設定。	87.1 執行正確Time-Delay校準程序。	
	<b>Time-Delay校準時出現信號偏差之錯誤訊息</b>	88.0 鞘液筒蓋未栓緊。	88.1 將鞘液筒蓋栓緊。
		89.0 流動室內有氣泡。	89.1 執行PRIME數次以清洗流動室。
		90.0 液流過濾器內有氣泡。	90.0 打開排氣引流管以排除氣泡。
91.0 不正常液流壓力。		91.1 檢查鞘液筒蓋是否栓緊，所有接頭均放置正確。	
		91.2 檢查STATUS視窗之Sample Voltage(參考32.1)	