How to use SEC-SAXS (UPLC (Waters ACQUITY) 2018.11.19)

# 1 Exchanging buffer / Equilibration of SEC column

1A Using PF's SEC column (The SEC column was already connected to UPLC system). 1B Using your SEC column.

# <u>1A Using PF's SEC column (The SEC column was already connected to UPLC system).</u>

At the beginning of your BT, the BL staff set up the system as described below.

- UPLC system, UV spectrophotometer and PILATUS have been connected and started.
- The SEC column has been connected to UPLC system and equilibrated with MilliQ (or other buffer). The flow rate is set to low [for example 0.05 ml/min].
   (Buffer should be filtered and degassed. Degassing your buffer @Biophysics & Molecular physiology Lab. of PF is recommended.)
- Empower3 (UPLC control software) can be operated by remote desktop on BL control PC.

#### 1A-1 Flow rate window

Click the flow rate display [XXXX mL/分] (1) in the QSM (クォータナリーソルベントマネージ ャ:quaternary solvent manager) part of the direct control panel of the UPLC control software. [流量設定] flow rate window will open.

Holass_TUV プロジェク	<sup>ナト</sup> = BL10C ユーサ	f—= Syst	em/Adn	ninistrator - ク	イックス	タート - [サ	ンプルの分析]									
マイル(E) 編集(E) 表	表示(⊻) 注入( <u>I</u> ) :	アクション	( <u>A</u> ) カ:	スタマイズ( <u>C</u> )	管理( <u>M</u> )	ヘルプ(出	)									
			16 0	100 s.c. X	<b>B</b>	分析のみ	2	・ フォールト	でも継続	-	•	テーブル設定	の適用	サンプノ	レセットメソッ	ĸ
わプルの分析				-			ђ	ンプルセットメ	ソッド: 無題	12548		16002+1	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			
トンブルキュー 💷	┋ プレート/ウェル	注入量 注 (µl) [0	払 勤 >べ	ル サンブル名	レベル	機能	メンッドセット / レポートメノッド	ラベル レファレンス	プロセス	前間	開始	待機時間	自動 追加注入	サンブル重量	希釈率	
											011	(7)				
ロジェクト参照																
HY I'Y B'M										0						
一々表示							-						-			
リポ表示																
ゆドセット	-															
新																
				1									-	27. I)		
	∢♪♪↓サンブル	ん サンブル	ノセット ん	実行中 /		E		•							300	-231
							サンブルセットの残り	時間: 0:00	00:00							
ガイダンス							合計サンブルの残り	時間:   0:00	00:00							
							新規サンブルセットの	時間: 0:00	00:00	サン	ノブル	セット	0000	0.002 0.004	0.006 Joh Jk	0.008 0.010
70込みビュー 💶			A -													
	B	 ሬዎイドル	똏				rolucaia		5.00	600	7.00	8.00 9	00 100	0		
	<u>*</u>				ect	Cont	Torpani	21~~ ~~	*				1			
	クォータナリンルベ (1) <sub>-2</sub> A <u>1000</u> % B <u>0.0</u> %		7 <b>9</b> nc/ %	€ 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10	ンブルマネー 12) サンブル	-9¥FTN 25.0 ℃ オユ	лэд 24.6°С дд 📑	TUV検出 シャッター A	17 7 280 nm	<u>ال</u>	/	• 707 1				
ノノを開く時はF1キーを	押してくたさい。															
りォータナリ	איייע (1)	マネ・	-71	QSN	1	ارگ										
-2	psi	0.0	<u>00</u> п	L/分 F	low	rate										
m <u>100.0</u>	% U	<u>u</u>	<u>.0</u> %	D	6	0										

# 1A-2 Stopping the flow

D

0.0 %

0.0 %

В

Enter [<mark>0</mark>] mL/分 in [流量]: flow rate (2) and [100.0] % in [溶媒 A]: Solvent A (3).

Click [green check mark] (4) to stop the flow and wait several minutes until the reduction of the pressure.

清量:Flow rate	0.000	mL/分 (2)
溶媒 A: Solvent A	100.0	<b>% (3)</b>
溶媒 B:	0.0	8
溶媒C:	0.0	8
溶媒 D:	0.0	8
		ОК

#### 1A-3 Placing the buffer bottle

Place your buffer bottle on the tray of the UPLC system. Put [A] line (yellow labelled) into your buffer bottle, and cover the spout of the bottle with parafilm.

\*Keep Purge line (orange labelled) in MilliQ bottle. [Operation rule was changed on 2018.8.27.]

## 1A-4 Priming Solvent window

Right-click the QSM (クォータナリーソルベントマネージャ:quaternary solvent manager) part of the direct control panel of the UPLC control software and select [溶媒のプライム]: Priming Solvent (second line) (5).

[溶媒のプライム]: Priming Solvent window will open.



# 1A-5 Priming Solvent [A] line

In [溶媒のプライム]: Priming Solvent window, check [溶媒ラインごとのプライム]: Priming each solvent line (first line in the left side column) (6), check [A] line (second line in the left side column) (7). and enter [5] minute in [ラインごとの期間]: Priming period (bottom line on the left side column) (8).

Click [開始]: Start (9), [A] line solvent will exchange. (Proceed 1A-7 without the finish of this step.)



#### 1A-6 Equilibration of the SEC column

After the priming [A] line solvent, set the flow rate as described 1A-1 and 1A-2, and start the

equilibration of the SEC column. (for example: Superdex 200 increase 10/300: 0.4 ~0.5 ml/min) Equilibrate the column completely.

\*If you enter the flow rate (10) and the composition of solvent (11) at the final condition area: right side column, the UPLC will continue working. When you want to stop the UPLC after priming, you should enter [0] ml/min at the final condition area: right side column.

#### 1A-7 Washing needle

Right-click the FTN (Sample Manager with Flow-Through Needle) part (12) of the direct control panel of the UPLC control software and select [ニードル洗浄]: washing needle (second line) (13). Enter [6] second for washing period, and click [OK]. Washing needle in sample manager will start.

 プライム...

 (13)
 ニードル洗浄...

 コンソールの起動

 SMリセット

 ヘルプ

#### 1A-8 FTN priming window

Right-click the FTN (Sample Manager with Flow-Through Needle) part (12) of the direct control panel of the UPLC control software and select  $[\mathcal{T} \not\supseteq \mathcal{I} \bigtriangleup]$ : FTN priming (first line) (14).



#### 1A-9 FTN priming

In the priming window, enter [15] sec in [洗浄溶媒]: washing solvent line (15) and [10] times in [パージ溶媒] in purging syringe (16) and click [OK] (17). Priming injector will start. (Proceed 1A-10 and after without the finish of 1A-9.)



## 1A-10 Sample temperature setting

Right-click [オフ] (blue letters) (18) next to サンプル: sample temperature in the FTN part of the direct control panel of the UPLC control software. [値設定]: temperature window will open, enter sample temp value (4 ~ 60°C)(19) and click [green check mark] (20). \* If you enter [0], the sample temperature is set to ambient temperature.



# 1A-11 Column temperature setting

Right-click [オフ] (blue letters) (21) next to カラム: column temperature in the FTN part of the direct control panel of the UPLC control software. [値設定]: temperature window will open, enter column temp value (4 ~ 60°C) (19) and click [green check mark] (20).

\* If you enter [0], the column temperature is set to ambient temperature.

#### 1A-12 Checking UV lamp status

Check the indicator on the upper-right corner of the TUV part of the direct control panel of the UPLC control software (Green: UV lamp ON, Black: UV lamp OFF).



## 1A-13 Turning on UV lamp

If the UV lamp is OFF, click the lamp icon on the lower-right corner (22). [ランプ設定]: Lamp setting window will open. Click [はい]:Yes (23), and UV lamp will turn on.



# 1A-14 Changing wavelength of UV detector

If you need to change wavelength of UPLC UV detector. Right-click the wavelength number on the TUV part (24) of the direct control panel of the UPLC control software. [波長 A 設定]: wavelength setting window will open.

Enter the wavelength (25) and click [green check mark] (26).

波長A設定 Wavelength setting	
<b>λ Α</b> 25) 28000nm	
26) 🧭 🛞	

When the column is equilibrated with other buffer, perform step 1A-1~9 with MilliQ [A line] and equilibrate the column with MilliQ for 5 minute. And then perform step 1A-1~9 with new buffer [A line]. When you want to change buffer from ligand-free buffer to new ligand-plus buffer, you could perform step 1A-1~9 with new ligand-plus buffer immediately.

# <u>1B Using your SEC column.</u>

At the beginning of your BT, the BL staff set up the system as described below.

- UPLC system, UV spectrophotometer and PILATUS have been connected and started.
- UPLC system is equilibrated with MilliQ and the flow rate is set to low [for example 0.05 ml/min].
- Empower3 (UPLC control software) can be operated by remote desktop on BL control PC.

CAUTION: The equilibration of column at Lab. is recommended to save time.

When the column is stored with 20% ethanol etc.

Perform step 1B-1~7with MilliQ [A line] and then wash column with more than 1 column volume MilliQ to eliminate ethanol in the column. Perform step 1A-1~14 with buffer [A line] and start the equilibration of column.

WARNING: Use filtered and degassed buffer : (<0.2 um filter). To degass buffer @Biophysics & Molecular physiology Lab. of PF again is recommended.

#### 1B-1 Flow rate window

Click the flow rate display [XXXX mL/分] (1) in the QSM (クォータナリーソルベントマネージャ:quaternary solvent manager) part of the direct control panel of the UPLC control software. [流量設定]: flow rate window will open.



# 1B-2 Stopping the flow

Enter [<mark>0</mark>] mL/分 in [流量]: flow rate (2) and [<mark>100.0</mark>] % in [溶媒 A]: Solvent A (3).

Click [green check mark] (4) and wait several minutes until the reduction of pressure.

Solvent A	100.0	<b>%</b> (3)
溶媒 B:	0.0	8
溶媒C:	0.0	8
溶媒 D:	0.0	8

## 1B-3 Placing the buffer bottle

Place your buffer bottle on the tray of the UPLC system. Put [A] line (yellow labelled) into your buffer bottle, and cover the spout of the bottle with parafilm.

\*Keep Purge line (orange labelled) in MilliQ bottle. [Operation rule was changed on 2018.8.27.]

1B-4 Priming Solvent window

Right-click the QSM (クォータナリーソルベントマネージャ:quaternary solvent manager) part of the direct control panel of the UPLC control software and select [溶媒のプライム]: Priming Solvent (second line) (5).

[溶媒のプライム]: Priming Solvent window will open.



1B-5 Priming Solvent [A] line

In [溶媒のプライム]: Priming Solvent window, check [溶媒ラインごとのプライム]: Priming each solvent line (first line in the left side column) (6), check [A] line (second line in the left side column) (7). and enter [5] minute in[ラインごとの期間]: Priming period (bottom line on the left side column) (8).

Click [開始]: Start (9), [A] line solvent will exchange. (Proceed 1B-7 without the finish of this

step.)

溶媒のプライム Primi	ng Solvent			
(6) 「マ 容媒ラインごとのプライ	イム	ムーーーー最終動作条件	Flow	ate after priming
(7) C Priming	each A: 25.0 %	(10) 🚠量: 0.000	/分 Flow	ate
solvent	B: 25.0 %	(11) <u>A: 100.0</u>	🔳 Solvei	nt A
	C: 25.0 %	B: 0.0	8	
	D: 25.0 %	C: 0.0	<b>%</b>	
ラインごとの期間	期間:	D: 0.0	<b>%</b>	
(8) 5.0 分	3.0 分			
Priming period	per each line	(9) 開始	- 閉じる	

## 1B-6 Equilibration of the SEC column

After the priming [A] line solvent, set the flow rate as described 1B-1 and 1B-2, and start the equilibration of the UPLC system to remove the remaining buffer. (for example:  $0.4 \sim 0.5$  ml/min for 5minutes)

\*If you enter the flow rate and the composition of solvent at the final condition area: right side column, the UPLC will continue working. When you want to stop the UPLC after priming, you should enter [0] ml/min at the final condition area: right side column.

# 1B-7 Setting up the SEC column

Set the flow rate to 0.2 ml/min as described 1B-1 and 1B-2. Connect your column between orange PEEK tube (upstream) and black PEEK tube (downstream).

(The connector is 1/16 inches connector (No.10-32UNF, Tricorn column (GE) could connect directly.)

Set the appropriate flow rate and start the equilibration of the column.

#### 1B-8 Washing needle

Right-click the FTN (Sample Manager with Flow-Through Needle) part (12) of the direct control panel of the UPLC control software and select [ニードル洗浄]: washing needle (second line) (13). Enter [6] second for washing period, and click [OK]. Washing needle in sample manager will start.

#### 1B-9 FTN priming window

Right-click the FTN (Sample Manager with Flow-Through Needle) part of the direct control panel of the UPLC control software and select  $[\mathcal{T} \not \neg \mathcal{I} \land ]$  :FTN priming (first line) (14). FTN priming window will open.

# 1B-10 FTN priming

In the FTN priming window, enter [15] sec in [洗浄溶媒]: washing solvent line (15) and [10] times in [パージ溶媒]: purging syringe (16) and click [OK] (17). Priming injector will start. (Proceed 1B-11 and after without the finish of 1B-10.)

	Washing solvent	line	sec
~	洗浄溶媒:	15	
~	パージ溶媒:	10	
	Purging syringe		times
	(17)	ОК	キャンセル

# 1B-11 Sample temperature setting

Right-click [オフ] (blue letters) (18) next to [サンプル]: sample temperature in the FTN part of the direct control panel of the UPLC control software. [値設定]: temperature window will open, enter sample temp value (4 ~ 60°C) (19) and click [green check mark] (20).

\* If you enter [0], the sample temperature is set to ambient temperature.

	値設定 Temperature
サンブルマネージャFTN 分析	サンプル温度 Sample temp.
Sample temp. サンプル 25.0 で カラム 24.6 で (18) オユ (21) オユ (第1)	(20) 🧐 🛞
Ambient temp Ambient temp.	

1B-12 Column temperature setting

Right-click [オフ] (blue letters) (21) next to [カラム]: column temperature in the FTN part of the direct control panel of the UPLC control software. [値設定]: temperature window will open, enter column temp value (4 ~ 60°C) and click [green check mark].

\* If you enter [0], the column temperature is set to ambient temperature.

# 1B-13 Checking UV lamp status

Check the indicator on the upper-right corner of the TUV part of the direct control panel of the UPLC control software (Green: UV lamp ON, Black: UV lamp OFF).



## 1B-14 Turning on UV lamp

If the UV lamp is OFF, click the lamp icon on the lower-right corner (22). [ランプ設定]: Lamp setting window will open. Click [はい]:Yes (23), and UV lamp will turn on.



# 1B-15 Changing wavelength of UV detector

If you need to change wavelength of UPLC UV detector. Right-click the wavelength number on the TUV part (24) of the direct control panel of the UPLC control software. [波長 A 設定]: wavelength setting window will open.

Enter the wavelength (25) and click [green check mark] (26).

波長A設定 \	Vavelength setting	
λΑ (25) 2800	nm	
(26) 🚫 (	8	

# 2 Preparation of SAXS flow cell and sample vials

# 2A Preparation of SAXS flow cell.

## 2A-1

If you want to perform the absolute scattering intensity calibration with water, you need to perform measurements of dark, air, empty cell and MilliQ, and then wash and dry SAXS flow cell with peristaltic pump and air pump.

# 2A-2 Connecting SAXS flow cell and tubing

Connect the inlet of SAXS flow cell to PEEK tube (cream color) of UPLC with the fittings and union, and connect the outlet of SAXS flow cell to silicone tube. And set the waste cup on experimental bench. Fix the waste cup and silicone tube with adhesive tape.



# 2A-3 Setting up SAXS flow cell and tubing

Check no air bubbles in the flow cell window and flow path. And set flow cell in the cell holder properly. To avoid tilting the cell position, fix the PEEK tube with the adhesive tape.



# 2B Preparation of the sample vial

2B-1 Dispensing sample solution into sample vial

Samples should be filtered or supernatant after centrifugation (15krpm 15min). Dispense sample (the minimum volume is the injection volume + 10 ul) into the exclusive glass vial (water maximum recovery (P/N: 186000385c)).

(The maximum injection volume is 250 ul for UPLC.)

Avoid making air bubbles in the bottom narrow section. (The yellow tip is useful for dispensing sample.)



2B-2 Setting up sample plate

Open the front door of FTN, and the plate 1 will move this side. Take the plate 1 out by pulling the grey handle.

The A1 position is the cutout side of the plate 1. Set the sample vial to the plate 1 and return the plate (A1 should be the left back side), and push the handle and close the door again.

Before taking the plate, pull the grey handle to avoid touching the injecting needle (wire).



#### **SEC-SAXS** measurement

To measure SEC-SAXS data, three equipment (UPLC, UV spectrophotometer, PILATUS) are needed. Three options are offered to start them.

#### 3 Manual mode

Each three equipment are started manually. (After the start of UPLC, click run icons of PILATUS and UV spectrophotometer.)

# 4 PILATUS-UV spectrophotometer synchronization mode

After the start of UPLC, click run icon of PILATUS. UV spectrophotometer will start automatically.

## **5** Synchronization mode

After the start of UPLC, PILATUS and UV spectrophotometer will start automatically.

(2017.06.08 Manual mode is default setting.)

PILATUS is controlled from BL measurement PC. UPLC and UV spectrophotometer are controlled with the remote desktop outside experimental hatch [UPLC: BL control PC, UV spectrophotometer: BL measurement PC.]

## 3 Manual mode

Each three equipment are started manually. (After the start of UPLC, click run icons of PILUTUS and UV spectrophotometer.)

# 3A SAXS measurement of the background (buffer)

3A-1 Lowering the flow rate

After the equilibration of the column, lower the flow rate to 0.05 ml/min ((same as measure at peak fraction.) 0.1 ml/min@BL-15A2) and wait several minute until the pressure will be stable.

3A-2 Confirmation [Control program mode] of PILATUS Measurement Control Software Set [PILATUS with shutter control] in [Control program mode] (1) of PILATUS Measurement Control Software.

PILATUS Measurement Control Software at Photon Factory
File Option
Detector
Piletus 1       Directory       2       Z¥user¥       Gain       Cubic 1         No, images       5       222       File type       tif       0 cbf (4)         No, images       5       222       Cubic 1       Directory       Dir
Pos. 2       Ver 0       Hor 0         Image: The state in t
No, images     1       Exp. time [sec]     100       Exp. period [sec]     100       Exp. delay [sec]     0.1       Start wait [sec]     A: [Exp. Delay]     B: [Exp. period] - [Exp. time]       No. cycle     1     Cycle interval [sec]     0.001 + A + B + 0
Internal mode       Single trigger mode     Multi trigger mode       (11)     Run
pilatuscontrolscript Done.
Control program mode Pilatus with shutter control  (1)

3A-3 Measurement of background images

Measure SAXS image of background (buffer) [for example 20sec x 15 times@BL-10C, 10sec x 15 times@BL-15A2].

Set parameters in [PILATUS Measurement Control Software] as described below.

Directory [enter your folder] (2) File Prefix [enter your file prefix] (3) File type [select cbf or tif] (4) (If you want to process the data by other than SAngler, select tif.) No.images [15] (5) Exp. Time [20] @BL-10C default, [[10] @BL-15A2] (6) Exp.period [20.01] @BL-10C default, [[10.01] @BL-15A2] (7) Exp. Delay: (This parameter is unable to be input with [PILATUS with shutter control] mode.) Start wait [0] (For SEC-SAXS experiment) (8) No.cycle [1] (For SEC-SAXS experiment) (9) Check [internal mode] (10).

Close the experimental hatch to open X-ray shutter before start. Click [Run] (11) to start measurement.

# <u>3B Setting of UV spectrophotometer software.</u>

3B-1 Initial setting of UV spectrophotometer software

Confirm that [積分時間]: integration period is [1sec] (12) in OPwave+EXT-K (UV spectrophotometer software). If different period is set, the re-adjustment of the UV spectrophotometer is needed, see p.5 of OPwave manual or Appendix 4.

Confirm that OPwave+EXT-K is [live mode].

If the icon next to menu icon is grey and the spectra is renewed every sec, OPwave+EXT-K is set to [live mode].

If the icon next to menu icon is green, Click that green icon (13), and set OPwave+EXT-K to [live mode].



3B-2 measurement of reference spectra with UV spectrophotometer Check SAXS flow cell position properly and no air bubble in the window and the flow path. And check the flow rate is [0.05 ml/min]@BL-10C. [[0.1 ml/min] @Bl-15A2] And then click the yellow bulb icon (14) to get reference spectra.

•

Measurement Example

Column : Superdex200 increased 10/300 (CV: 24ml) Flow rate: 0.5 ml/min @0~14 ml(0~28 min) and 0.05 ml/min @14~16.5 ml(28~78min) (0.1 ml/min @14~16.5 ml(28~53min) @BL-15A2). (Measure peak fractions with slower flow rate.) SAXS (expose 20sec/image, exp period 20.01sec), UV measurement period is set to 10sec as default (twice frequency as X-ray). (@BL-10C default value. @BL-15A2 SAXS expose 10sec/image, period 10.01sec, UV 5sec) Total number of measurements are  $78 \times 60 / 20.01 = 234$  (SAXS) [53 x 60 / 10.01 = 318 @BL-15A2]  $78 \times 60 / 10 + 1 = 469$  (UV) [53 x 60 / 5 + 1 = 637 @BL-15A2]

# **<u>3C Setting parameters of PILATUS measurement control software</u>**

3C-1 Confirmation [Control program mode] of PILATUS Measurement Control Software Set [PILATUS with shutter control] (15) in [Control program mode] of PILATUS Measurement Control.

PILATUS Measurement Control Software at Photon Factory	
File Option	
Detector	ntrol
Filatus 1       Directory       (16)       Z¥user¥       Image: Control of the second of	Gain autos eeration F
Manual Pos.1 Ver 0 Hor 0 (24) Pos.2 Ver 0 Hor 0 © Internal mode Single trigger mode Multi trigger mode External enable mode Pliatus 2 Directory Z¥user¥hishida¥20161201¥yokoyama	
No, images       1         Exp. time [sec]       100         Exp. period [sec]       100         Exp. period [sec]       0.1         Start wait [sec]       A: [Exp. Delay]         No. cycle       1         Oycle interval [sec]       0.001 + A + B + 0	
Internal mode       Single trigger mode     Multi trigger mode       Run     Stop	
Control program mode Pilatus with shutter control <b>v</b> (15)	

3C-2 Setting up of PILATAS measurement parameters

Set parameters in PILATUS Measurement Control Software as described below.

Directory [enter your folder] (16)

File Prefix [enter your file prefix] (17)

File type [select cbf or tif] (18) [If you want to process the data by other than SAngler, select tif.]

No.images [234] @BL-10C default, [[318] @BL-15A2] (19)

Exp. Time [20] @BL-10C default, [[10] @BL-15A2] (20)

Exp.period [20.01] @BL-10C default, [10.01 @BL-15A2] (21)

Exp. delay : (This parameter is unable to be input with [PILATUS with shutter control] mode.)

Start wait [0] (For SEC-SAXS experiment) (22)

No.cycle [1] (For SEC-SAXS experiment) (23)

Check [internal mode] (24).

# 3D Setting parameters of OPwave+EXT-K

3D-1 Setting parameters of OPwave+EXT-K

Click Menu icon (25), and select [連続計測(領域波長)]: serial measurements (spectra) (forth line) (26).

[連続計測(領域波長)]: serial measurements (spectra) window will open.



Set parameters in the window as described below.

[領域波長]: wave length range(27) 200 – 450 nm (28) [保存ピッチ]: pitch / [全て]: all (29), Check [計測値]: measured value (30) [計測モード]: mode / [吸光度]: absorbance (31) [保存ファイル名]: file name / check [データ保存] :save data (32), [enter UV file name (\*\*\*\_UV)] (33) [保存間隔パラメータ]: parameters for measurement period section

[保存間隔]: measurement period: [10] sec @BL-10C [[5] @BL-15A2] (34) and check [秒]:sec (35).

Check [計測回数]: No. of measurement (36), enter [469] @BL10C [[637] @BL-15A2] (37).

[ウォームアップ時間]: time for warm-up / [<mark>0</mark>] (38) and check [秒]: sec (39).

[計測開始方式]: starting method / Check [ノーマル]: Manual (40).

[保存パラメータ]: other parameters for saving section

Check [タイマー]: Timer(41) and Check all 7 boxes in [時刻フォーマット]: time format (42).

Check [パラメータを保存]: save parameters check box (43).

Click [設定]: Set icon (44).

Notification window will open. Click OK.

● 連続計測(領域波長)取得パラメータ	
分光器1(QEPB0040) 分光器2 分光器3 分光器4 分光器5 分光器6	
● <sub>全波長</sub> Start End pitch	
(2) ◎ 領域波長 (28) ◎ 領域波長 ○ 150000 - 150000 (27) (28)	
(30)  計測値 ● 祥均値 ● 積分値	
計測モード Measured value	
◎ スコープ ◎ 透過率 ◎ 反射率 ◎ 絶対反射率	
(31)  (31)   (31)   (31)   (31)	
保存ファイル名	
(32) マデー対保存 Y¥user¥Yonezawa¥20161029¥OA Ald SEC01¥OA Ald SEC UV280 01txt 指定 (35	3)
Save enter UV file name with full path	
保存間隔パラメータ (35)	
保存間隔 10 (34) ◎時 ◎分 ◎秒 ◎0.1秒	
Measurement period sec	
◎ 保存時間 50 ◎ 時 ◎ 分 ◎ 秒 ◎ 0.1秒	
(36) ● 計測回数 469 (37) 回 No. of measurement	
(39)	
ウォームアップ時間 0 (38) ◎ 時 ◎ 分 ◎ 秒 ◎ 0.1秒	
Time         FOF         Sec           新聞時日回知         「福田市山市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市市	
計測開始方式 Starting method	
(4U) 07-マル 0 TCP/IP の外部内方 //1	
(41)● タイマー◎ 時刻	all 7 boxes
timer	
(43) アラメータを保存 (44) 酸定 キャンセル	
Save parameter Set	

3D-2 preparation for serial measurement

Click stop icon (red icon) (45) to stop [live mode].



# 3E Setting of UPLC

#### 3E-1 Opening [SEC-SAXS] method



Select [SEC-SAXS] (47) in the [装置メソッド]: equipments and method, and click [装置]: equipments (48) in the navigation bar. [クイックスタート]: quick start window will open, select [いいえ]: No (49).



# 3E-2 Setting flow rate of [SEC-SAXS] method

Click [ACQ-QSM] icon (50), and move to [全般]: general tab (51).

Set [圧力限界]: pressure limits (52) (for example [最高]: max 2500 psi for Superdex200 increase 10/300) \*Pressure limit depends on the column, check manual or catalogue.

② SEC_SAXS プロジェクト= BL10C ユーザー= System/Administrator - クイックスタート - [装置メソッド表示] ファイル(E) 表示(Y) 管理(M) ヘルプ(H)	
サンブルの分析 サンブルの分析 サンブルの分析 サンブルペントマネージャ シンドロールパネル (50) 人のCO_COSM	Auto*Blend Pluc(TN) RP
プロジェクト参照 データ表示 (55) AcQ-FTN Weters し 、 、 、 、 、 、 、 、 、	版: [0] psi 新: [2500 psi 先)海周期: [5.00 分
メンクド2支行: メンクド2カト メンクド2カト 法法 解析         ACQ-TUV         グラジェント: (53)         第2         第3         NO         NO <t< td=""><td>Gradient program</td></t<>	Gradient program
ガイダンス 用のり減みをaー	
ヘルプを開く時はF1キーを押してください。	メゾッドセット:SEC_SAXS 装置メゾッド:SEC_SAXS
Waters (52) 圧力限界 Pressure limit	

Waters	( The second			
Quaternary Solvent	最低:	0	psi	Limit (low)
Manager ACQ-QSM	最高:	2500	psi	Limit (high)

2	ブラジェン	F: Gradie	nt progran	n				(54)	
	⊼۳	時間	流重 (mL/分)	жA	яв	жo	жD	曲線	•
(53)	1	初期値	0.500	100.0	0.0	0.0	0.0	初期値	
	2	28.00	0.050	100.0	0.0	0.0	0.0	11	
	3		0				0		
	4							·	•

Set flowrate in the [グラジェント]: gradient section table (53).

	時間	流量	%A	%В	%C	%D	曲線
	time	Flow rate					curve
1	初期値	0.5	100.0	0.0	0.0	0.0	初期値
	initial						initial
2	28	0.05	100.0	0.0	0.0	0.0	11
		0.1 [BL-15A2]					

Set [11] in the curve field (54). ([11] means that the flow rate will change ASAP.) You can increase the steps by right-clicking on the table. 3E-3 Setting temperatures of [SEC-SAXS] method

Click [ACQ-FTN] icon, and move to [全般]: general tab (56).

Set column and sample temperatures (57) in [温度コントロール]: temp section. <u>Do not check</u> [警告範囲]: warning range section.



# サンプルマネージャFTN

(56) 全般 データ 希釈 イベント	Temparature
General 溶媒	(57) 温度コントロール ?
洗浄溶媒名: Water	カラム:Column 警告範囲: 25.0 ▼ ℃ □ ± 5.0 ℃
パージ溶媒名: Water	サンブル:Sample 25.0 ▼ ℃ □ ± 5.0 ℃
注入前洗净: 0 秒	□ □ ループオフライン:
注入後洗浄: 6 秒	自動  _▼  分  □ 先行ロード
,	アクティブプレヒーター:
אעאב:	
1	

# 3E-4 Saving modified [SEC-SAXS] method

Click save icon (58) to save modified method,

%To save parameters is needed to run modified method. If you do not click save icon, UPLC will not work proper method.



Click [ $\psi \vee \mathcal{T} \mathcal{N} \neq \neg$ ]: sample queue (59) in the navigation bar.

	Q Helass_TUV プロジェク	フト= BL100	ローザ	-= Sy:	stem/.	Admini	strator - ク	イックスタ	7ート - [t	ヤンプルの分析]										
	ファイル(E) 編集(E) る					77.55			分析のみ	1)	• フォールト	でも継続	-	-	テーブル設定	Eの適用	(サンプ)	ルセットメン	ノッド	
- 1	#>=1104#									++	つプルセットメ	いんド: 毎期	-							
59)	サンプルキュー	San	), <u>p</u> le		<b>I</b> €I ∰	<u>ję</u> r	サンブル名	レベル	機能	ン メノッドセット / レポートメノッド	ラベル レファレンス	プロセス	分析 時間 (分)	データ開始(分)	次の注入 待機時間 (分)	自動 追加注入	サンブル重量	希釈率		
				_																
	プロジェクト参照																			
l	データ表示													_						
			-		-								-							
	メソッド表示 メリッドセット		0							0										
	装置 解析	-																		
		A P P A	ンブル	(サンプ	ルセッ	ト【実	行中 /				· 1		_							_
										サンプルセットの残り	時間: 0:00	0:00:00								
	ガイダンス									合計サンプルの残り	時間:   0:01	0:00:00								
										新規サンブルセットの	時間: 0:01	0:00:00	サン	ブル	セット	0000	0.002 0.004	0.006 JvFJk	10 8000	510
	取り込みビュー 📮	2							An											
		100							Pu											
									-											
			123		14		0		e.											
		머니	システレ	アイドル				_	100											
	(60)		Fai	uilik	nra	tio	n an	d cui	tah	manite	<b>100</b> 4.00	5.00	6.00	7.00	8.00.8	00 10.0	0			
			Lqu	int.	Ла	tio	ii ain	u sys		monite	/	分								
		クォータナ	リソルペ	ントマネー	ージャ		<mark>е</mark> †	ンプルマネー	ジャFTN	● 分析	TUV検出				• 77					
		-:	2 psi	0.00	<mark>)0</mark> mL/5	÷					シャッター	- 20-1								
		A <u>100.</u> B <u>0.</u>	<u>0</u> % 0%	с <u>0.</u> D <u>0.</u>	<u>.0</u> % .0%	(	8	サンブル	<u>최고</u>	カラム 24.0 0	A	<u>280</u> nm			۲					
	ヘルプを開く時はF1キーを	押してくださ	±ι١.																	

3E-5 Starting equilibration and system monitor

Click [平衡/システムモニター]: equilibration and system monitor icon (60). [平衡/システムモ ニター]: equilibration and system monitor window will open.

Select [SEC\_SAXS] (61) in the [装置メソッド]: equipment and method box, and click [平衡/モ ニター]: equilibration and system monitor button (62). Buffer will flow as the initial values of [SEC-SAXS] method (Sample injection does not start.)



#### 3E-6 Setting up plate parameters

Click [プレート編集]: editing plate icon (63), The plate edit window will open.



In the plate edit window, select [ANSI-48 Vial 2ml Holder 1] (64) in the left side, and select [A1] position (65) in the right side.

Click [挿入]: insert icon (66) and click [OK] (67).

. t	ナンフ	プルセットメソッドのプレートを設定			×
	I	2790のレイアウト(L) プレートの種類の	新規作成( <u>N)</u> ブレートの消去( <u>C</u> )	プレート注入モード	
	Ē	プレートの種類名	プレートのレイアウト位置		
(64)	1	ANSI-48Vial2mLHolder	1	(65) 🕙 🗠 📣	(A4) (A3) (A8) (A7) (A8)
1	2	ANSI-48Vial2mLHolder	2	B,1 B,2 B,3	B,4 B,3 B,8 B,7 B,3
	-				
1					(R4) (R3) (R8) (R7) (R8)
-	-			(E,1) (E,2) (E,3)	(E,4) (E,5) (E,8) (E,7) (E,8)
				(F,1) (F,2) (F,3)	(F4)         (F3)         (F8)         (F7)         (F8)
	E	(67)			(66) Insert
		(C.) OK キャンセ/	↓ ヘルプ(H)	標準試料注入	▼ 挿入(1) 追加(A)

#### 3E-7 Setting up injection parameters

Set paramet Plate/well p	Set parameters for the injection of UPLC (68). Plate/well position No. of injection									F	unction				
	Inject	tion volur	me		Sai	mple	name	9		_		Meth	od set/Re	eport m	ethod
)	ェル	注入量 (70)	注入 回数	ラベル	νt	tンプ) (72	心名	L^	マレ		機能 (73)		メノッドセッ レポニトメ (74)	ット / ンッド	
1 1:A,1		100	1			tes	t			未知	战科注入	SE	EC_SAXS		
			Analy	ysis tim	ne				U	Inknov	vn sample	9	SEC-SA	XS	-
ラベル レファレンス	-	プロセス	(75)	分析 時間 (分)	デー 開 (分	-タ - タ - 約 - )	次の 待機 (5	注入 時間 分	自 追加	動 注入	サンブル	⁄重量	希釈率		
	設定	このまま		78	0	.00		0.00			1.	00000	1.00000		

[プレート/ウェル]: plate and well position / [1:A,1] (plate 1, A-1 position) (69), input have completed at 3E-6

[注入量]: injection volume (ul) / enter injection volume (max 250 ul) (70).

[注入回数]: No. of injection / [1] (71).

[サンプル名]: sample name / enter sample name (72).

[機能]: function / select [未知試料注入]: injection of unknown sample (second line) (73).

[メソッドセット/レポートメソッド]: method set and report method / select [SEC\_SAXS] (74).

[分析時間]: analysis time (min) / enter [78] [[53] @BL-15A2] (75)

# **<u>3F Execution of SEC-SAXS</u>**

3F-1 Start of the UPLC injection

Prepare SAXS flow cell and sample vial.

Close the experimental hatch and open DSS.

Click [execute sample set] icon (test tubes icon) (76), [execute sample set] window will open.

	1	Intelevel to Le	al apla	1.01	In Last	v la le l						+00						
de l'ered	XQ.			6	III 1.2.	2. 哈哈	分析のみ		▼ フォールトでも継続	•	テーフル観知道のか	便用	サン	ブルセットメソ	ッド		•	
ンブルの分析									サンブル・	セットメンッド: 無	20	1.0.0						
ンプルキュニ 💷	E	プレート/ウェル	注入量	詠	ラベル	サンブル名	レベル	根能	メノッドセット /	ラベル	プロセス	分析時間	データ	次の注入	自物	サンブル重量	希釈率	
シトロールバネル	-	1.0.1	20.0	1				±4n=#83/+ 1	SEC SAVE		静定のまま	106.00	(75)	(75)	Page and the	1 00000	1.00000	
ロジェクト参照	Ė	1.001	30.0					JANUAR MIT	020,0800		BUEUJKK	100.00	0.00	0.00		1.00000	1.00000	
一身表示	H						サンプルセッ	/トの実行			×							
ソッド表示	F						サンプルセッ Exe	<sup>⊪≋:</sup> cute sa	mple set	windo	W	E						
ソッドセット 満 新	Þ						-このサンプ	ルセットに対する設定	「コーザーの入力待	5		E						
	E							分析モ−ド: │	分析のみ									
	H						2.	-タビリティモード:	フォールトでも継続	-	o semin f	E						
ガイダンス	H						7929	•			リンタの加留択	H				-		
	T	トサンブル ん	サンブルセ	21 63	町一 /		シャット	ダウンメソッド:			•				-	1		
的这份纪一 💷								ローザーによる4	中断中はシャットダウンメソ	ドを実行しない								
												pó ó	00 00	o4 obos U∋hJb	0 80à0	<u>d</u> 10		
(76)	2		0.0470									4						
			o anna									-						
	Ы		<u></u>	â.	- 6	165.67			開始(B)	キャンセル	ヘルプ							
			Sall	pie	: 50		L.J	-				1						
	-	F  t_y=+						0.040	15000 15000	160.00	16400 16							
	3						1			9	10120 10							
	Ŋ;	ォータナリソルへいト	-77-34		RR	サンブルマネ	-97FTN	<del>វ</del> ាត	TUV検出器		907							
		63 psi	0.050 ml	193			0.2.32	10.0.72	0.0117 AU									
	A	100.0 % C	0.0 %			サンプル		カラム	A		60							

Enter [サンプルセット名]: sample set name (77) (You can set the same as the sample name and the sample set name or enter any sample set name).

Click [開始]: Start icon (78) to start injection process.

t	ナンプルセットの実行 ×
	サンブルセット名: (77) Sample set name
	このサンブルセットに対する設定
	分析モード: 分析のみ ▼
	スータビリティモード: フォールトでも維続 💌
	プリンタ: プリンタの選択
	シャットダウンメソッド:
	▶ ユーザーによる中断中はシャットダウンメソッドを実行しない
×	Start
	(78) 開始(B) キャンセル ヘルブ

## 3F-2 Waiting time for the UPLC injection

The injection window will open. Just wait for the injection (waiting period:160 sec for 250 ul injection)



# 3F-3 Checking start of UPLC injection

Check that the injection of UPLC start (the timer starts to count up.)

	Image: Image	Check here
--	--	------------

# 3F-4 Starting PILATUS measurement

<u>Immediately after starting UPLC</u>, click [Run] icon in PILATUS measurement software to start PILATUS. While PILATUS is running, a part of PILATUS measurement soft window will become pink in color and measured images will be displayed on the PILATUS mage viewer software window. (You need to change PILATUS mage viewer software to [measurement mode].)

# 3F-5 Starting UV spectrophotometer measurement

<u>Immediately after starting UPLC</u>, click [serial measurement icon] (clock icon) (79) to start UV spectrophotometer on OPwave+EXT-K. While the serial measurement of UV spectrophotometer, the progress bar window will open and update spectra on OPwave+EXT-K window.

Menu ▶ 🔤 🤇	(79) Serial measurement	
		X
	68%	

3F-6 Preparation for next measurement

After the SEC-SAXS measurement finish, increase the flow rate to re-equilibrate the column on UPLC control software (because UPLC continue the flow at final programmed condition.) Right-click the parameter line in the sample set tab and select delete (80).

CAUTION: executed sample parameters does not deleted automatically. If you forget to delete them, the same methods will be performed on next run.

And Notification window will open on OPwave+EXT-K, click OK and re-start [live mode] again by clicking green start icon (81) of OPwave+EXT-K.





## 4 PILATUS-UV spectrophotometer synchronization mode

In this mode, you need to click run icon of PILUTUS manually after the start of UPLC injection. And then UV spectrophotometer will start automatically.

# 4A SAXS measurement of the background (buffer)

#### 4A-1 Lowering the flow rate

After the equilibration of the column, lower the flow rate to 0.05 ml/min ((same as measure at peak fraction.) 0.1 ml/min@BL-15A2) wait several minute until the pressure will be stable.

4A-2 Confirmation [Control program mode] of PILATUS Measurement Control Software Set [PILATUS with shutter control] in [Control program mode] (1) of PILATUS Measurement Control.

PILATUS Measurement Control Software at Photon Factory	
File Option	
Detector   PILATUS 1   PILATUS 1 and 2 (1)	Control program mode Pilatus with shutter control
Filetus 1         Directory       (2)         Z¥user¥         File prefix         No, images       (5)         Exp. time [sec]       (6)         Exp. period [sec]       (7)         201       Exp. period [sec]         Exp. delay [sec]       0         A. [Exp. Delay]       B. [Exp. period] - [Exp. time]         No. cycle       (9)         Oycle interval [sec]       0.001 + A + B + 0         Detector position       Fix         O Auto       Relative to Current         Manual       Pos. 1         Ver       Hor         0       Hor	Optional Settings       Gain       Energy (eV) 12398 *         Image: Settings       Gain       autog         Image: Settings       Individual       Integration         Shutter Burst Mode       ON       OFF
● Internal mode       Single trigger mode       Multi trigger mode       External enable mode         Pliatus 2       Directory       Z¥user¥hishida¥20161201¥yokoyama       Image: Constraint of the state o	
Internal mode Single trigger mode Multi trigger mode External enable mode     (11) Run     Stop pilatuscontrolscript Done.	
Control program mode Pilatus with shutter	control 🔹 (1)

#### 4A-3 Measurement of background images

Measure SAXS image of background (buffer) [for example 20sec x 15 times@BL-10C, 10sec x 15 times@BL-15A2].

Set parameters in PILATUS Measurement Control Software as described below.

Directory [enter your folder] (2)

File Prefix [enter your file prefix] (3)

File type [select cbf or tif] (4) (If you want to process the data by other than SAngler, select tif.)

No.images [15] (5)

Exp. Time [20] @BL-10C default, [[10] @BL-15A2] (6)

Exp.period [20.01] @BL-10C default, [[10.01] @BL-15A2] (7)

Exp. delay : (This parameter is unable to be input with [PILATUS with shutter control] mode.)

Start wait 0 (For SEC-SAXS experiment) (8)

No.cycle 1 (For SEC-SAXS experiment) (9)

Check [internal mode] (10).

Close the experimental hatch to open X-ray shutter before start. Click [Run] (11) to start measurement.

4A-4 Changing [Control program mode]

After measurement, Set [SEC-SAXS-UV measurement] (12) in [Control program mode] of PILATUS Measurement Control to synchronize the start of PILATUS and UV spectrophotometer.

Control program mode SEC-SAX-UV measurement (12)

#### 4B Setting of UV spectrophotometer software.

4B-1 Initial setting of UV spectrophotometer software

Confirm that [積分時間]: integration period is [1sec] (13) in OPwave+EXT-K (UV spectrophotometer software). If different period is set, the re-adjustment of the UV spectrophotometer is needed, see p.5 of OPwave manual or Appendix4.

Confirm that OPwave+EXT-K is [live mode].

If the icon next to menu icon is grey and the spectra is renewed every sec, OPwave+EXT-K

is set to [live mode].

If the icon next to menu icon is green, Click that green icon (14), and set OPwave+EXT-K to [live mode].



4B-2 Measurement of reference spectra with UV spectrophotometer

Check SAXS flow cell position and no air bubble in the flow path. And check the flow rate is 0.05 ml/min@BL-10C [0.1 ml/min@BI-15A2]

And then click the yellow bulb icon (15) to get reference spectra.



Measurement Example

Column : Superdex200 increased 10/300 (CV: 24ml) Flow rate 0.5 ml/min @0~14 ml(0~28 min) and 0.05 ml/min @14~16.5 ml(28~78min) (0.1 ml/min @14~16.5 ml(28~53min) @BL-15A2). (Measure peak fractions with lower flow rate.) SAXS (expose 20sec/image, exp period 20.01sec), UV measurement period is set to 10sec as default (twice frequency as X-ray).

(@BL-10C default value. @BL-15A2 SAXS expose 10sec/image, period 10.01sec, UV 5sec) Total number of measurements are

78 x 60 /20.01 = 234 (SAXS) [53 x 60 / 10.01 = 318 @BL-15A2]

78 x 60 /10 +1 = 469 (UV) [53 x 60 / 5 +1 = 637 @BL-15A2]

# 4C Setting parameters of PILATUS measurement control software

4C-1 Confirmation [Control program mode] of PILATUS Measurement Control Software Set [SEC-SAXS-UV measurement] (16) in [Control program mode] of PILATUS Measurement Control.

PILATUS Measurement Control Software at Photon Factory						
File Option						
Detector	PILATUS 1     O PILATUS 1 and 2	Control program mode SEC-SAX	<-UV measurement →	(16)rey Information		
Pilatus 1 Directory File prefix No, images Exp. time [sec] Exp. period [sec] Exp. delay [sec] Start wait [sec] No. cycle Detector position © Auto	Z¥user¥         Image: Second se	Optional Settings ✓ Plot environment profiles to 1 file Counter Output	dual O Integration OFF	Energy (eV) 8265 * Gain autos Energy update		
Manue     Internal mode     Pliatus 2     Directory     File prefix     No, images     Evo, time [sec]	al Pos. 1 Ver 0 Hor 0 Pos. 2 Ver 0 Hor 0 Single trigger mode Multi trigger mode External enable mode Z# File type @ tif cbf					
Exp. period [sec] Exp. delay [sec] Start wait [sec] No. cycle	A: [Exp. Delay] B: [Exp. period] - [Exp. time] A: [Exp. Delay] B: [Exp. period] - [Exp. time] Cycle interval [sec] 0.001 + A + B + 0					
internal mode	Single trigger mode Multi trigger mode External enable mode					
pilatuscontrolscript Done.						

Control program mode	SEC-SAX-UV measurement	•	(16)

#### 4C-2 Setting up of PILATAS measurement parameters

Set parameters in [PILATUS Measurement Control Software] as described below.

[Pilatus 1]				
Directory (17)	Z:¥user¥			
File prefix (18)	File	etype 🔘 tif 💿 cbf (19)		
No, images (20)	234 🚔			
Exp. time [sec] (21)	20			
Exp. period [sec](22)	20.01			
Exp. delay [sec]	0.1			
Start wait [sec] (23)	0 A: [Exp	A: [Exp. Delay] B: [Exp. period] - [Exp. time]		
No. cycle (24)	1 🔄 Cycle interval	l [sec] 0.001 + A + B + 0		
Detector position	Fix O Change	Stage control		
) Auto	Relative to Current			
🔘 Manual	Pos. 1 Ver 0	Hor 0		
(25) internal mode ()	Pos. 2 Ver 0	] Hor 0		

Directory [enter your folder] (17)

File Prefix [enter your file prefix] (18)

File type [select cbf or tif] (19) (If you want to process the data by other than SAngler, select tif.)

No.images [234] @BL-10C [[318] @BL-15A2] (20)

Exp. Time [20] @BL-10C default, [[10] @BL-15A2] (21)

Exp.period [20.01] @BL-10C default, [[10.01] @BL-15A2] (22)

Exp. delay : (This parameter is unable to be input with [SEC-SAXS-UV measurement] mode.)

Start wait 0 (For SEC-SAXS experiment) (23)

No.cycle 1 (For SEC-SAXS experiment) (24)

Check [internal mode] (25).

# 4D Setting parameters of OPwave+EXT-K

4D-1 Setting parameters of OPwave+EXT-K

Click Menu icon (26), and select [連続計測(領域波長)]: serial measurements (spectra) (forth line) (27).


[連続計測(領域波長)]: serial measurements (spectra) window will open.



Set parameters in the window as described below.

● 連続計測(領域波長)取得パラメータ	X
分光器1(QEPB0040) 分光器2 分光器3 分光器4 分光器5 分光器6	
② 全波長 ② 全波長 ③ 領域波長 ② 全波長 ③ 領域波長 ③ 領域波長 〇 全波長 〇 全波長 〇 全波長 〇 全波長 〇 全波長 〇 全波長 〇 全波長 〇 200 〇 空波長 〇 200 〇 200 〇 〇 200 〇	itch ピッチ波長[nm]
- 保存ファイル名	
33) 🗹 データ保存 Z¥user¥	(34)
Save enter UV file name with full path	
(36)	
保存間隔 10 (35) ◎時 ◎分 ◎秒 ◎0	.1秒
Measurement period         Sec           ◎         保存時間         ○         ● <td>1秒</td>	1秒
(37) ● 計測回数 469 (38) 回 No. of measurem (40)	ent
ウォームアッフ時間 ₀ (39) ◎時 ◎分 ◎秒 ◎0	.1秒
Timの最もしません。 Sec 保存データ数は、「計測回数・1回」となります。	
計測開始方式-Starting method	
回数 つ ノー(A1) (● TCP/IP 一 の 外部ドリガ 18001 TCP/IP	
(44) マパラメータを保存 (45) <u>設定</u> キャンセル	
Save parameter Set	

[領域波長]: wave length range (28) 200 – 450 nm (29)

[保存ピッチ]: pitch / [全て]: all (30), Check [計測値]: measured value (31)

[計測モード]: mode / [吸光度]: absorbance (32)

[保存ファイル名]: file name / check [データ保存] :save data (33), [enter UV file name (\*\*\*\_UV)] (34)

[保存間隔パラメータ]: parameters for measurement period section

[保存間隔]: measurement period / [10] sec [[5]sec @BL-15A2] (35) and check [秒]:sec (36).

Check [計測回数]: No. of measurement (37), enter [<mark>469</mark>] [[<mark>637</mark>] @BL-15A2] (38)

[ウォームアップ時間]: time for warm-up / [0] (39) and check [秒]: sec (40).

[計測開始方式]: starting method / Check [TCP/IP] (41).

[保存パラメータ]: other parameters for saving section

```
Check [タイマー]: Timer (42) and Check all 7 boxes in [時刻フォーマット]: time format (43)
```

Check [パラメータを保存]: save parameters check box (44).

Click [設定]: Set icon (45).

Notification window will open. Click OK.

#### 4D-2 preparation for serial measurement

Click [stop] icon (red icon) (46) to stop [live mode], and click [serial measurement] icon (clock icon) (47) to start waiting state for the start signal from PILUTAS.



## 4E Setting of UPLC

#### 4E-1 Opening [SEC-SAXS] method

Click [メソッドセット]: Method set (48) in the navigation bar (left side of UPLC control software).



Select [SEC-SAXS] (49) in the [装置メソッド]: equipment and method, and click [装置]: equipment (50) in the navigation bar.

0 無題 プロジェクト= BL	10C ユーザー= System/Administrator -	- クイックスタート - 【メソッドセット表示】	
ファイル(E) 表示(V) 智	言理(M) ヘルプ(H)		
	0 6 8 8		
サップルの分析			Equipment and method
サンブルキュー		(49) 装置メックト SEC_SAXS	
コントロールパネル	日 日 よソッドセット		
-*n-*- bi # 07	一人 生成チャンネル	既定のレポートメソッド	
ノロンエリト参照		チャンネル名     解析メソッド	レポートメソッド
=. h==			
J 34203			
A LUNIK SECT			
AVANETANE	Equipment	エクスポートメソッド	
	Lquipment		
ガイダンス			
取り込みビュー			
Control of Second Second			
		· · · · · · · · · · · ·	1. Array
ヘルフを開く時はF1キーを	押してください。	メソッドセッ	(下: 黒龍

[クイックスタート]: quick start window will open, select [いいえ]: No (51).



4E-2 Setting flow rate of [SEC-SAXS] method

Click [ACQ-QSM] icon (52), and move to [全般]: general tab (53).

Set [圧力限界]: pressure limit (54) (for example [最高]: max 2500 psi for Superdex200 increase 10/300) \*Pressure limit depends on the column, check manual or catalogue.

Q+ SEC_SAXS プロジェクト= BL10C ユーザー= System/Administrator - クイックスタート - [装置メソッド表示]	
ファイル(E) 表示(Y) 管理(M) ヘルプ(H)	
サンプルの分析 クォータナリソルペントマネージャ Autot Blond	
プングレイエー     プンゲロールドネル (52)     「金紙」 「金紙」 「金紙」 「金紙」 「金紙」 「金紙」 「金紙」 「	
(57) AGO-FTM C 単一 単 単 単 単 単 単 単 単 単 単 単 単 単 単 単 単 単	
データ表示 D → シール浅砂周期: 5.00 分	
7592DA: (56)	
- 第二番	
<u> </u>	
用(9) 达动 / 4 二 📃	
へルブを開く時はF1キーを押してください。 メソッドセット:SEC_SAXS 装置メソッド:SEC_SAXS	
[(54) 压力限界	
Waters Waters Waters Waters Waters Waters	
最低: 0 PSi Limit (low)	

 
 Worters
 Control Pressure Infinit

 Gusternary Solvent Manager
 最低:
 0
 psi
 Limit (low)

 最高:
 2500
 psi
 Limit (high)

(52

2	ブラジェン	<b>Gradier</b>	nt program	<u>ו</u>				(56)	
	⊼≞	時間	流重 (mL/分)	жA	ЯB	жe	ЖD	曲線	•
(55)	1	初期値	0.500	100.0	0.0	0.0	0.0	初期値	
	2	28.00	0.050	100.0	0.0	0.0	0.0	11	
	3			0		0			_
	4		1	¢		•••••			•

Set flow rate (55) in the [グラジェント]: gradient section table.

	時間	流量	%A	%В	%C	%D	曲線
	time	Flow rate					curve
1	初期値	<mark>0.5</mark>	100.0	0.0	0.0	0.0	初期値
	initial						initial
2	<mark>28</mark>	<mark>0.05</mark>	100.0	0.0	0.0	0.0	11
		0.1 [BL-15A2]					

Set [11] in the curve field (56). ([11] means that the flow rate will change ASAP.) You can increase the steps by right-clicking on the table. 4E-3 Setting temperatures of [SEC-SAXS] method

Click [ACQ-FTN] icon (57), and move to [全般]: general tab (58). Set column and sample temperatures (59) in [温度コントロール]: temp section. <u>Do not check</u> [警告範囲]: warning range section.



サンフルマネージャFTN	
(So) General 一次   布秋   竹〇 I'	Iemperature (59) 《理度文法国本地
洗浄溶媒名: 洗浄溶媒名: パージ溶媒名: 図 注入前洗浄: 0 秒 注入後洗浄: 6 秒	<ul> <li>★ 1000000000000000000000000000000000000</li></ul>
אלאב:	·····································

4E-4 Saving modified [SEC-SAXS] method

Click save icon (60) to save modified method.

%To save parameters is needed to run modified method. If you do not click save icon, UPLC will not work proper method.



Click [ $\psi \vee \mathcal{T} \mathcal{V} \neq \neg -$ ]: sample queue (61) in the navigation bar.

	Q Holass_TUV プロジェク ファイル(E) 編集(E) 集		10C ユーザ きょ(I) コ	-= Sy:	stem//	Admini	strator - ク	イックスタ 管理(M)	7ート - [±	ナンプルの分析] 小										_ 0
	27.170(L) (MR(L) 2		3 B  <u>h</u>			@ III			分析のみ	1) 	フォールト	でも継続		•	テーブル議会	官の適用	(サンプ	ルセットメン	ノッド	
(61)	サンブルの分析 サンブルキュー	\$a	mple	)±∕r∎		te.	#`::::!!!	Logil	10046	サ	ンブルセットメ ラベル	ソッド: 無題	分析	データ	次の注入	自動	++、-ゴル番母	*****	1	
	עאאערסזעב		mpar	- (A4) -			522774	0.00	10% HE	レポートメソッド	レファレンス	JUEX	(分)	(分)	(%)	追加注入	リンフル重量	1000		
	プロジェクト参照									0										
									-											
	丁一头衣示	-				_			-											
	メソッド表示									0										
	装置解析																			
						1=	c+ /													
		INIPA	9220	<u>x 922</u>	1/12/91	1 人 夫	T# 7			サンプルセットの残り	制: 0:0	):00:00								1
	ガイダンス									合計サンブルの動り	制: 0.0	2:00:00						0.005		
		<b>.</b>	1 660					_1	:0.0	####UUUUUU	4160: 0:00		0,	////	296			U9111	0.00 0.00	
	420込みビュー -	<u></u>																		
						_														
	(62)	립	- 1週 - システム	ምイドル	ιųĝ	-1	0	_ '												
		2	Equ	ilib	rat	ior	n and	l sys	tem	monito	3.00 4.00	5.00 %	é do	7.00	00.8	9.00 10.0	10			
		ウォー	タナリソルペ	ントマネー	ジャ		• †:	ンプルマネー	ジ₩FTN	9 98	TUV検出				<b>0</b> 51/7					
Λ			-2 psi	0.00	<mark>0</mark> mL/5	}					シャック・	- 20-1								
		A <u>1</u> B	<u>00.0</u> % <u>0.0</u> %	C <u>0.</u> D <u>0.</u>	<u>0</u> % 0%	(	8	サンブル	20.0 C 22	カラム 24.6 C オン 🚮	A	280 nm			۲					
	ヘルプを開く時はF1キーを	押してく	ださい。				E.													

4E-5 Starting equilibration and system monitor

(62)

Click [平衡/システムモニター]: equilibration and system monitor icon (62). [平衡/システムモ ニター]: equilibration and system monitor window will open.

Select [SEC\_SAXS] (63) in the [装置メソッド]: equipment and method box, and click [平衡/モ ニター]: equilibration and system monitor button (64). Buffer will flow as the initial values of [SEC-SAXS] method (Sample injection does not start.)



#### 4E-6 Setting up plate parameters

Click [プレート編集]: editing plate icon (65), The plate edit window will open.



In the plate edit window, select [ANSI-48 Vial 2ml Holder 1] (66) in the left side, and select [A1] position (67) in the right side.

Click [挿入]: insert (68) and click [OK] (69).

. t	わフ	プルセットメソッドのプレートを設定			×
:	Г	2790のレイアウト(L) プレートの種類	D新規作成(N) ブレートの消去(C)	プレード注入モード	
•	E	プレートの種類名	プレートのレイアウト位置		
(66)	1	ANSI-48Vial2mLHolder	1	(67) (42) (43)	) (A4) (A3) (A8) (A7) (A8)
1	2	ANSI-48Vial2mLHolder	2	B1 B2 B3	) (B,4) (B,5) (B,8) (B,7) (B,8)
					) (4) (3) (8) (7) (8)
	-			0,1 0,2 0,3	) 0,4 0,3 0,8 0,7 0,8
				E,1 E,2 E,3	) E,4 E,5 E,8 E,7 E,8
	$\vdash$			F.1 F.2 F.3	) (F,4 (F,5 (F,8 (F,7 (F,8 (F,8 (F,7 (F,8 (F,8 (F,8 (F,8 (F,8 (F,8 (F,8 (F,8
		(69)			(68) Insert
		OK ++>t	フル ヘルプ(日)	標準試料注入	✓ 挿入(1) 追加(A)

#### 4E-7 Setting up injection parameters

Set parameters for the injection of UPLC (70). Function Plate/well position No. of injection Injection volume Sample name Method set/Report method 注入量 注入 ッドセット / ニトメノッド ブレ・ (71) ト/ウェル ラベル サンブル名 レベル 機能 Е (72) (74)(75)1:A,1 test 未知試料注入 100 1 SAXS SEC Unknown sample SEC-SAXS Analysis time 分析時間 データ 開始 (分) 次の注入 待機時間 自動 追加注入 ラベル ブロセス サンブル重量 希釈率 レファレンス (分) (分) 設定のまま 78 0.00 0.00 1.00000 1.00000

[プレート/ウェル]: plate and well position / [1:A,1] (plate 1, A-1 position) (71) input have completed at 4E-6

[注入量]: injection volume (ul) / enter injection volume (max 250 ul) (72).

[注入回数]: No. of injection / [1] (73)

[サンプル名]: sample name / [enter sample name] (74).

[機能]: function / select [未知試料注入]: injection of unknown sample (second line) (75).

[メソッドセット/レポートメソッド]: method set and report method / select [SEC\_SAXS] (76).

[分析時間]: analysis time (min) / enter [78] [[53] @BL-15A2] (77)

# **4F Execution of SEC-SAXS**

4F-1 Start of the UPLC injection

Prepare SAXS flow cell and sample vial.

Close the experimental hatch and open DSS.

Click [execute sample set] icon (test tubes icon) (78), [execute sample set] window will open.

· · · ·	20	BB BB		6	而記	X 16 6	分析のみ		▼ フォールトでも継続		テーブル設定の	ē用	195	プルセットメン	9F			]
ンブルの分析							1		サンゴル	マットメンッド: 無	25		-					
ンプルキュー レトロールパネル	E	プレート/ウェル	注入量 (µL)	注入 回数	ラベル	サンブル名	レベル	根能	メンッドセット / レポートメンッド	ラベル レファレンス	プロセス	分析 時間 (分)	データ 開始 (分)	次の注入 待機時間 (分)	自動 追加注入	サンブル重量	希釈率	
ロジェクト参照	1	1:A1	80.0	1				未知試料注入	SEC_SAXS		設定のまま	106.00	0.00	0.00		1.00000	1.00000	
一块表示	E						サンプルセ	ットの実行	-		×							
<b>ソッド表示</b> ノットゼット 差 新							サンブルセ Exe	ット名: Cute sai リルセットに対する設定	nple set □ ᠴ᠆ᡃᠮ᠆ወᡘᢣᠯቑᡟ	windo	W							
21/20.7							ス	分析モード: 「 ータビリティモード: 「 R: 「	分析のみ フォールトでも継続	•	リンタの選択(							
714903	1	ヘサンブル ん	ナンブルセ	21 63	题行中 /		シャット	, ダウンメソッド:			•							
(78)			C_SAVS		- 0	185.67		F 2-9-6234	朝中はシャットダウンメン: 開始( <u>D</u> )	ドを実行しない	N17			od odos Ustuk	o dos o	āīo		
	<b>□</b>	ECUTE ΕΞΦ-Φ	sam <sub>२३-२१</sub>	pie	set	サンブルマネ	-ジャFTN	0.040-	155,00 150,00	162.00 9	164.00 16	- 						
	A	63 psi	0.050 ml	193		4514	8.2 °C	9987	<b>実行中</b> 0.0117 AU		797							

Enter [サンプルセット名]: sample set name (79) (You can set the same as the sample name and the sample set name).

Click [開始]: Start icon (80) to start injection process.

t	ナンプルセットの実行	×
	サンブルセット名: (79) Sample set name	
	−このサンブルセットに対する設定 □ ユーザーの入力待ち	
	分析モード: 分析のみ 🔽	
	スータビリティモード: フォールトでも維続 👤	
	プリンタ: プリンタの選択	
	シャットダウンメソッド:	
	ユーザーによる中断中はシャットダウンメソッドを実行しない	
	Start	
	(80) 開始(B) キャンセル ヘルプ	

4F-2 Waiting time for the UPLC injection

The injection window will open. Just wait for the injection (waiting period:160 sec for 250 ul injection)

手動注入	x i i i i i i i i i i i i i i i i i i i
	クイックスタートで手動注入の作成を行う準備ができました。
	手動注入バルブがロード位置にあり、サンブルが手動インジェクタに入っていることを確認してください。
	準備ができたら、手動注入バルブを注入位置にしてください。
	終了したら手動注入バルブをロード位置に戻すのを忘れないようにし てください。
	この注入を作成しない場合、にの注入を中止]を押してください。
	注意:このダイアログは注入が始まると消えます。
	この注入を中止

## 4F-3 Checking start of UPLC injection

Check that the injection of UPLC start (the timer starts to count up.)

		Check here
--	--	------------

#### 4F-4 Starting PILATUS measurement

Immediately after starting UPLC, click [Run] in PILATUS measurement software to start PILATUS. While PILATUS is running, a part of PILATUS measurement soft window will become pink in color and measured images will be displayed on the PILATUS image viewer software window. (You need to change PILATUS image viewer software to [measurement mode].) Confirm the serial measurement of UV spectrophotometer start simultaneously, while the serial measurement of UV spectrophotometer, the progress bar window will open and update spectra on OPwave+EXT-K window.

	23
68%	

#### 4F-5 Preparation for next measurement

After the SEC-SAXS measurement finish, increase the flow rate to re-equilibrate the column

on UPLC control software (because UPLC continue the flow at final programmed condition.) Right-click the parameter line in the sample set tab and select delete (81).

CAUTION: executed sample parameters does not deleted automatically. If you forget to delete them, the same methods will be performed on next run.

And Notification window will open on OPwave+EXT-K, click OK and re-start [live mode] again by clicking [green start icon] (82) of OPwave+EXT-K.





#### **5** Synchronization mode

In this mode, PILUTUS and UV spectrophotometer will start automatically after the start of UPLC.

## 5A SAXS measurement of the background (buffer)

5A-1 Lowering the flow rate

After the equilibration of the column, lower the flow rate to 0.05 ml/min (same as measurement at peak fraction.) 0.1 ml/min@BL-15A2) and wait several minute until the pressure will be stable.

5A-2 Confirmation [Control program mode] of PILATUS Measurement Control Software Set [Single trigger mode serial shutter] in [Control program mode] of PILATUS Measurement Control to start PILATUS by external trigger from UPLC

PILATUS Measurement Control Software at Photon Factory	_ <b>_</b> X
File Option	
Detector   PILATUS 1  PILATUS 1 and 2  (1)	ntrol program mode Single trigger mode serial shutter 💌 Energy Information
	Energy (eV) 8265 *
	ional Settings Gain autog
	Plot environment profiles to 1 file.
Hile pretix (4) UA_Ald_SECUT File type tit @ cbt (3) Co	unter Output   Individual  Integration  Energy update
No, Images 0 300 F	utter Burst Mode ON OFF
Exp. nerind [sed] (7) 20	se Generator Setting (2)
Exp. delay [sec(9)]	ernal Trigger 💿 ON 🔿 OFF
Start wait [sec] 1 () A: [Exp. Delay] B: [Exp. period] - [Exp. time]	sger Level [V] 2.5 CHD Module#1 O ON OFF
No. cycle (11) 🔄 Cycle interval [sec] 22 + A + B + 0 Trig	seer Edee 🛛 💿 RISE. 🔿 FALL. Mode Single Pulse Shot
Detector position  Fix  Change Stage control	ay Shutter Setting Pulse Width [sec] 0.005
Auto     Relative to Current	Itter Open Delay [sec] Pulse Delay [sec]
Manual Pos. 1 Ver Hor 0	itter Close Delay [sec] Pulse Polarity @ POS. O NEG.
(12) Pos. 2 Ver 0 Hor 0	E Module#2 ON OFF CHF Module#3 ON OFF
🔘 Internal mode 🖲 Single trigger mode 🕤 Multi trigger mode 💮 External enable mode	Mode Single Pulse Shot Mode Single Pulse Shot
Plane 0	Pulse Width [sec] 0.005 Pulse Width [sec] 0.005
Pilatus 2 ] Directory 74	Pulse Delay [sec] Pulse Delay [sec]
File type (a) tif (2) chf	Pulse Polarity 💿 POS. 💿 NEG. Pulse Polarity 💿 POS. 💿 NEG.
No, images 1 🔄	
Exp. time [sec]	G Module#4 ON OFF CHH Module#5 ON OFF
Exp. period [sec]	Node Single Pulse Shot Mode Single Pulse Shot
Exp. delay [sec]	Vilse Width [sec]
Start wait [sec] A: [Exp. Delay] B: [Exp. period] - [Exp. time]	
No.cycle 1 🗢 Cycle interval [sec] 22 + A + B + 0	uise Polarity III PUS. INEG. Puise Polarity III PUS. III NEG.
💿 Internal mode 🔵 Single trigger mode 🔵 Multi trigger mode 🔵 External enable mode	
(12)	
(I3) Hun Stop	
pilatuscontrolscriptQC9600QC9528SingleTrigger Done.	
Control manyour model Single triagen model and	$L_{\rm obuttor} = (1)$
Control program mode   Single trigger mode seria	i snutter 🔻 📢

#### 5A-3 Changing external trigger mode

Check External Trigger [OFF] (2) in Pulse Generator Setting Area.

Pulse Generator Se	tting	
External Trigger	🔘 ON (2)	OFF
Trigger Level [V]	2.5	
Trigger Edge	ISE.	🔘 FALL.

5A-4 Measurement of background images

Measure SAXS image of background (buffer) (for example 20sec x 15 times@BL-10C, 10sec x 15 times@BL-15A2.)

Set parameters in [PILATUS Measurement Control Software] as described below.

Directory [enter your folder] (3) File Prefix [enter your file prefix] (4) File type [select cbf or tif] (5) (If you want to process the data by other than SAngler, select tif.) No.images [15] (6) Exp. Time [20] @BL-10C default, [[10] @BL-15A2] (7) Exp.period [20.01] @BL-10C default, [[10.01] @BL-15A2] (8) Exp. delay [0] (9) Start wait [0] (For SEC-SAXS experiment) (10) No.cycle [1] (For SEC-SAXS experiment) (11) Check [Single trigger mode] (12).

Close the experimental hatch to open X-ray shutter before start. Click [Run] (13) to start measurement.

5A-5 Restoring the change of external trigger mode

<u>After measurement of background, Check External Trigger [ON] in Pulse Generator Setting</u> <u>Area.</u>

## **<u>5B Setting of UV spectrophotometer software.</u>**

5B-1 Initial setting of UV spectrophotometer software Confirm that [積分時間]: integration period is [1sec] (14) in OPwave+EXT-K (UV spectrophotometer software). If different period is set, the re-adjustment of the UV spectrophotometer is needed, see p.5 of OPwave manual or Appendix4.

Confirm that OPwave+EXT-K is [live mode].

If the icon next to menu icon is grey and the spectra is renewed every sec, OPwave+EXT-K is set to [live mode].

If the icon next to menu icon is green, Click that green icon (15), and set OPwave+EXT-K to [live mode].



5B-2 measurement of reference spectra with UV spectrophotometer

Check SAXS flow cell position and no air bubble in the flow path. And check the flow rate is 0.05 ml/min@BL-10C [0.1 ml/min@Bl-15A2]

And then click the yellow bulb icon (16) to get reference spectra.



Measurement Example

Column : Superdex200 increased 10/300 (CV: 24ml)

Flow rate 0.5 ml/min @0~14 ml(0~28 min) and 0.05 ml/min @14~16.5 ml(28~78min) (0.1

ml/min @14~16.5 ml(28~53min) @BL-15A2).

(Measure peak fractions with slower flow rate.)

SAXS (expose 20sec/image, exp period 20.01sec), UV measurement period is set to 10sec as default (twice frequency as X-ray). (@BL-10C default value. @BL-15A2 SAXS expose 10sec/image, period 10.01sec, UV 5sec) Total number of measurements are  $78 \times 60 / 20.01 = 234$  (SAXS) [53 x 60 / 10.01 = 318 @BL-15A2]  $78 \times 60 / 10 + 1 = 469$  (UV) [53 x 60 / 5 + 1 = 637 @BL-15A2]

## 5C Setting parameters of PILATUS measurement control software

5C-1 Confirmation [Control program mode] of PILATUS Measurement Control Software Set [Single trigger mode serial shutter] (17) in [Control program mode] of PILATUS Measurement Control.

PILATUS Measur	ement Control Soft	tware at Photon Facto	ry					= ×
File Option								
Detector	PILATUS 1	O PILATI	JS 1 and 2	Control program mod	de Single trigger mode	serial shutter 🔸	ersy Informat	ion
Pilatus 1				Ontional Settings		E	nergy (eV) 82	.85 *
Directory	7:¥user¥Yonezawa¥	20161029¥OA Ald SEC01		Plot environment o	rofiles to 1 file	6	Jain au	tog.
File prefix	OA AId SEC01	File type 🔘 tif	() chf	Counter Output	Individual	Integration		
No, images	355			Shutter Burst Mode		OFF	Energy up	date
Exp. time [sec]	20			Shartor Barot Modo	0 0.0		-	
Exp. period [sec]	20.01			Pulse Generator Set	<sup>ting</sup> (18)			
Exp. delay [sec]	0			External Trigger	💿 ồn 🤺 🔘 OFF			
Start wait [sec]	0	A: [Exp. Delay] B: [E	xp.period] - [Exp.time]	Trigger Level [V]	2.5	CHD Module#1	ON 🕐	OFF
No. cycle	1 🔶 Cyc	le interval [sec]	2.2 + A + B + 0	Trigger Edge	ISE. O FALI	Mode	Single Puls	e Shot
Detector position	Fix (	🕥 Change	Stage control	X-ray Shutter Settin	K.	Pulse Width [sec]	0.005	
Auto		Relative to Current		Shutter Open Delay [s	ec]	Pulse Delay [sec]		
🔘 Manua	ll 🔲 Pos. 1 – V∈	er 0 Hor 0		Shutter Close Delay [s		Pulse Polarity	POS.	O NEG.
	🔲 Pos. 2 🛛 Ve	er 0 Hor 0		CHE Module#2	💿 ON 🛛 💿 OFF	CHF Module#3	ON 🔘	OFF
🔵 Internal mode 🧕	Single trigger mode	🔵 Multi trigger mode 🌔	) External enable mode	Mode	Single Pulse Shot	Mode	Single Puls	e Shot
				Pulse Width [sec]	0.005	Pulse Width [sec]	0.005	T
Pilatus 2	1-0			Pulse Delay [sec]		Pulse Delay [sec]		
Directory Cite methy	L:#			Pulse Polarity	O POS. O NEG.	Pulse Polarity	POS.	NEG.
No images	1	File type 🔘 til	O CDI					
Exp. time [sec]				CHG Module#4	ON OFF	CHH Module#5	O ON	OFF
Exp. period [sec]				Mode	Single Pulse Shot	Mode	Single Puls	e Shot
Exp. delay [sec]				Pulse Width [sec]	0.005	Pulse Width [sec]	0.005	
Start wait [sec]		A: [Exp. Delay] B: [E	xp.period] - [Exp. time]	Pulse Delay [sec]		Pulse Delay [sec]		
No. cycle	1 🔄 Oyc	le interval [sec]	2.2 + A + B + 0	Pulse Polarity	POS. O NEG.	Pulse Polarity	POS.	O NEG.
) Internal mode (	Single trigger mode	🕤 Multi trigger mode 🖡	External enable mode					
			_	]				
(29)	Run	Stop						
pilatuscontrolscript	C9600QC9528Sing	leTrigger Done.						



5C-2 Confirmation parameters of Pulse generator setting Confirm parameters (18) in Pulse Generator Setting Area.



5C-3 Setting up of PILATAS measurement parameters

Set parameters in PILATUS Measurement Control Software as described below.

Pilatus 1			
Directory (19) Z:¥user¥Yon	ezawa¥20161029¥OA_A	Id_SEC01	
File prefix (20) OA_Ald_SEC	01 File type	🔘 tif 💿 cbf (21)	
No, images (22) 234 🚖			
Exp. time [sec] (23) 20			
Exp. period [sec](24320.01			
Exp. delay [sec] (25) 0			
Start wait [sec] (26) 0	A: [Exp. Dela	ay] B: [Exp. period] - [Exp	.time]
No. cycle (27) 1 🚔	Cycle interval [sec]	2.2 + A + B +	)
Detector position 💿 Fix	🔘 Change	Stage co	ntrol
Auto	Relative to C	urrent	
👝 Manual 📃 Pos. 1	Ver 0 Hor	0	
Pos. 2 (28)	Ver 0 Hor	0	
📀 Internal mode 💿 Single trigge	r mode 💿 Multi trigge	r mode 🔘 External enable	mode

Directory [enter your folder] (19)

File Prefix [enter your file prefix] (20)

File type [select cbf or tif] (21) (If you want to process the data by other than SAngler, select tif.)

No.images [234] @BL-10C [[318] @BL-15A2] (22)

Exp. Time [20] @BL-10C default, [[10] @BL-15A2] (23) Exp.period [20.01] @BL-10C default, [[10.01] @BL-15A2] (24) Exp. delay [0] (25) Start wait [0] (For SEC-SAXS experiment) (26) No.cycle [1] (For SEC-SAXSexperiment) (27) Check [Single trigger mode] (28).

#### 5C-4 Starting PILATUS measurement

Click [Run] icon (29), PILATUS starts waiting state for the start signal from UPLC. A part of PILATUS measurement software window will become pink in color.

# 5D Setting parameters of OPwave+EXT-K and Pulse Generator Control for UV spectrophotometer.

Both of UV spectrophotometer control software (OPwave+EXT-K) and Pulse Generator Control for UV spectrophotometer are needed for synchronization mode.

#### 5D-1 Setting parameters of OPwave+EXT-K

Click Menu icon (30), and select [連続計測(領域波長)]: serial measurements (spectra) (forth line) (31).

[連続計測(領域波長)]: serial measurements (spectra) window will open.





5D-2 Setting parameters of OPwave+EXT-K

Set parameters in the window as described below.

	● 連続計測(領域波長) 取得パラメータ	×	
	分光器1(QEPB0040) 分光器2 分光器3 分光器4 分光器5 分光器6		
(3	● 全波長 Start End pitch 2) ● 領域波長 (22) ● 領域波長[nm] 総了波長[nm] 保存ビッチ波長[nm]		
V	(33) 200,000 - 450,000 全て (34)	AII	
	(35) ● 計測値 ◎ 平均値 ◎ 積分値		
	計測モード Measured value		
	◎ スコープ ◎ 透過率 ◎ 反射率 ◎ 絶対反射率		
(36	) ● 吸光度 Abserbancedde ● ラマン		
	保存ファイル名		
(3	/) アデータ保存 「Y¥user¥Yonezawa¥20161029¥O A Ald SEC01¥O A Ald SEC UV280 01.txt 指定	(38)	
	Save enter UV file name with full path		
	保存間隔パラメータ (40)		
	保存間隔 10 (39) ◎ 時 ◎ 分 ◎ 秒 ◎ 0.1秒		
	Measurement period sec		
	◎ 保存時間 50 ◎ 時 ◎ 分 ◎ 秒 ◎ 0.1秒		
	<ul> <li>計測回数</li> </ul>		
	(42)		
	(41) ウォームアップ時間 0 ◎時 ◎分 ◎秒 ◎0.1秒		
	Time for warm-up ※開始 回目のデータは保存されません。 Sec 保存データ数は、「計測回数-1回」となります。		
	計測開始方式 Starting method		
	回数 のノーマル の TCP/(邦名) (● 外部ドリガ 469 (44)		
	External trigger		
	「採存パフメータ		
(	45) ● タイマー ◎ 時刻	eck a	all 7 boxes
	timer		
(	47) 1 パラメータを保存 (48) 設定 キャンセル		
	Save parameter Set		
	Save parameter		

[領域波長]: wave length range (32) 200 - 450 nm (33)

[保存ピッチ]: pitch / [全て]: all (34), Check [計測値]: measured value (35)

[計測モード]: mode / [吸光度]: absorbance (36)

[保存ファイル名]: file name / check [データ保存] :save data (37), [enter UV file name (\*\*\*\_UV)] (38)

[保存間隔パラメータ]: parameters for measurement period section

[保存間隔]: measurement period / [<mark>10</mark>] sec [[<mark>5</mark>] sec @BL-15A2] (39) and check [秒]: sec (40). [ウォームアップ時間]: time for warm-up / [0] (41) and check [秒]: sec (42).

[計測開始方式]: starting method / Check [外部トリガ]: external trigger (43) and enter [<mark>469</mark>] [[<mark>637</mark>] @BL-15A2] (44).

[保存パラメータ]: other parameters for saving section

Check [タイマー]: Timer (45) and Check all 7 boxes in [時刻フォーマット]: time format (46) Check [パラメータを保存]: save parameters check box (47).

Click [設定]: Set icon (48).

Notification window will open. Click [OK].

## 5D-3 Starting UV spectrophotometer measurement

Click [stop icon] (red icon) to stop [live mode], and click [serial measurement icon] (clock icon) to start waiting state for the start signal from PILUTAS.



5D-4 Setting Pulse Generator Control software for UV spectrophotometer

Confirm the status of [Spectrum Pulse Generator Control Panel] is [Connected] (50). Enter the parameters in "Time Control".

Spectrum Pulse Generator Control Panel     Option		Status: Connected (50)
Status : Connected Time control Number of images 469 (*) Exposure (rine (sec) 1 Exposure Period (sec) 10 Pan Stop Single pulse Run single pulse	appgang-solutionflow exerute SPECTRUMPUGEN -romoleanel - TimeSTART 711 1000 10000 qcsolutionflowChangedIsBusy1 qcsolutionflowChangedIsBusy0	Time control Number of images 469 (51) Exposure time [sec] 1 (52) Exposure Period [sec] 10 (53) (54) Run Stop
Executing manual stop		

<u>These parameters should be the same values which are entered in OPwave+EXT-K, see 5D-2.</u> Number of images [469] : measurement number [[637] @BL-15A2] (51) Exposure time [sec] [1] : integration period (The default value is 1sec) (52) Exposure Period [sec] [10] : measurement interval [[5] sec @BL-15A2] (53)

5D-5 Starting Pulse Generator Control software for UV spectrophotometer

Click Run icon (54) to start waiting state for the start signal from PILATUS.

The status of [Spectrum Pulse Generator Control Panel] will be changed to [Running] and a part of the window will changed to pink in color.

While the serial measurement of UV spectrophotometer, the progress bar window will open.

(Before the injection of UPLC, the progress value is kept 0 %.)

↩ 領域波長計測		23
	68%	

# 5E Setting of UPLC

#### 5E-1 Opening [SEC-SAXS] method

Click [メソッドセット]: Method set (55) in the navigation bar (left side of UPLC control software).

Q Hclass_TUV プロジェク ファイル(E) 編集(E) 表	クト- BL10C ユーザー- System/Administrator - クイックスタート - [サンブルの分析] 表示(Y) 注入(I) アクション(A) カスタマイズ(C) 管理(M) ヘルプ(H)
	20 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
サンブルの分析	サンブルセットメンッド: 無題
サンプルキュー -	■ ゴレート/ウェル 注入量 注入 「山山」 自動 ラベル サンブル名 レベル 機能 メンッドセット / ラベル レブボートメンッド レブアレンス ブロセス 研想 開き 開き しか サンブル重量 無限率
プロジェクト参照	
データ表示	Method set
- MarK丰二	
メンッドセット	
装置 解析	
	957/1/2970/95/1+filt U000000 会計サンプルの物料時間: 0000000
ガイダンス	新規サンブルセットの時間: 0000000 サンブルセット▼ 0000 0002 0004 0006 0008 0010
和的运动栏工	
	P 9235L77151
	クォータナリソルやトマネージャ     ● 所置     サンプルマネージャFTN     ● 分別     TUV後出器     ● ラジブ
	-2 psi <u>0.000</u> mL/分 A 100.0 % C 0.0 % 例 サンプル 25.0 ℃ カラム 24.6 ℃ ジャッター <b>クローズ</b> A 200.0 % C 0.0 % 例 サンプル オコ カラム 24.6 ℃

Select [SEC-SAXS] (56) in the [装置メソッド]: equipment and method, and click [装置]: equipment (57) in the navigation bar.

ſ	0 無題 プロジェクト= BL	10C ユーザー= System/Administrator -	クイックスタート - [メソッドセット表示]				
	ファイル(E) 表示(⊻) 管	『理(M) ヘルプ(H)					
		□ 📽 🖬 🕼					
	<b>サンブルの分析</b> サンブルキュー コントロールパネル	日- <b>日</b> メソッドセット - ディ データチャンネル	(56) 装置メソッド 医 既定の解析メソッド 既定のドボートメソッド	EC_SAXS (ンポートデータ) lliance EC_SAXG	Equ	uipment and met	hod
	ブロジェクト参照 データ表示	ーズ、土 <b>か</b> オヤンイル	<ul> <li>チャンネル名</li> <li>・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・</li></ul>	解析メンッド	レポートメソッド		
(57)	メンデ授示 -Vinktook 装置 解析	Equipment	Ιΰλπ-Γκννγκ Γ		<u> </u>		
	ガイダンス						
	取り込みゼュー 💶						
	ヘルプを開く時はF1キーを	」 厚してください。		メソッドセット	: 無題		

[クイックスタート]: quick start window will open, select [いいえ]: No (58).



5E-2 Setting flow rate of [SEC-SAXS] method

Click [ACQ-QSM] icon (59), and move to [全般]: general tab (60).

Set [圧力限界]: pressure limit (61) (for example [最高]: max 2500 psi for Superdex200 increase 10/300) \*Pressure limit depends on the column, check manual or catalogue.

Q: SEC_SAXS プロジェクト= BL10C ユーザー= System/Administrator - クイックスタート - [装置メソッド表示]	- 0
□ 2771/(E) 表示(Y) 管理(M) へいて(H)	
サンプルの分析 サンプルキュー フォータナリソルベントマネージャ (C1) Auto*Blend Plus(TW)	
Votes メリルに表示 レレレー ガラジェント: (63)	
<u> </u>	
FRG12.8-FEa-	
へルプを開く時はF1キーを押してください。 スソッドセット: SEC_SAXS 装置メソッド: SEC_SAXS	
Waters (61) 圧力限界 Pressure limit	
↓ Contendary 最低: 0 psi Liffiit (IOW)	

2	ブラジェン	F: Gradier	nt program	١				(63)	
	⊼۳	時間	流重 (mL/分)	<b>K</b> A	ЖВ	жo	жD	曲線	
(62)	1	初期値	0.500	100.0	0.0	0.0	0.0	初期値	
	2	28.00	0.050	100.0	0.0	0.0	0.0	11	
	3			••••••	0		0	0	
	4								•

psi

# Set flowrate (62) in the [グラジェント]: gradient section table.

最高: 2500

(59) ACQ-QSM

	時間	流量	%A	%В	%C	%D	曲線
	time	Flow rate					curve
1	初期値	<mark>0.5</mark>	100.0	0.0	0.0	0.0	初期値
	initial						initial
2	<mark>28</mark>	<mark>0.05</mark>	100.0	0.0	0.0	0.0	11
		0.1 [BL-15A2]					

Set [11] in the curve field (63). ([11] means that the flowrate will change ASAP.)

You can increase the steps by right-clicking on the table.

5E-3 Setting temperatures of [SEC-SAXS] method

Click [ACQ-FTN] icon (64), and move to [全般]: general tab (65).

Set column and sample temperatures (66) in [温度コントロール]: temp section. Do not check [警告範囲]: warning range section.



(65) 全般 General 2014	Temperature
7 <sup>2</sup> 69 <sup>3</sup> 洗浄溶媒名: /<-ジ溶媒名: Water 注入前洗浄: 0 秒 注入後洗浄: 6 秒	[25.0] ▼ ℃ □ ± 5.0 ℃     [25.0] ▼ ℃ □ ± 5.0 ℃     [100] ▼ ℃ □ ± 5.0 ℃     [100] ▼ ℃ □ ± 5.0 ℃     [100] ▼ ℃ □ ± 5.0 ℃     [100] ▼ ♡ □ ± 5.0 ℃
אַעאַב: 	アクティフフレビーター: (無効) ・ 詳細設定…

5E-4 Saving modified [SEC-SAXS] method

Click save icon (67) to save modified method.

%To save parameters is needed to run modified method. If you do not click save icon, UPLC will not work proper method.



Click [ $\psi \vee \mathcal{T} \mathcal{V} \neq \neg -$ ]: sample queue (68) in the navigation bar.

Q・Hclass_TUV プロジェク ファイル(E) 編集(E) 表	ト= BL10C ユーサ 示(Y) 注入(I) :	f—= Syster アクション( <u>A</u>	m/Adminis A) カスタ	trator - ク マイズ( <u>C</u> )	イックスタ 管理( <u>M</u> )	ート - [サ ヘルプ(Ŀ	ンプルの分析]  )									
			<b>6 0</b> 10	н.с. Х		分析のみ		・ フォールト	でも継続		•	テーブル語気	Eの適用	サンプ	ルセットメンシ	۴
58 サンブルの分析	Sample	que	Ne.	モンブルタ	بالاصل	標能	サージンシャドセット /	ンプルセットメ	ソッド: 無題 ブロセフ	分析時間	データ問題	次の注入	。自動,	サンプル番冊	希釈座	
עגאאעריסזעב	a so ripan		97 - V	55570-6	0 40	DANG.	レホートメンッド	レファレンス	5400	( <del>3</del> )	(分)	(分)	15700王人	555WILL		
プロジェクト参照																
データ表示																
<b>メソッド表示</b> メソッドセット																
装置解析																
<i>1</i> 71877	<b>↓</b> ↓↓↓↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓	( ชุวฮมส	2ット 【実行	ite /			サンブルセットの残り 合計サンブルの残り 新規サンブルセットの	申問: 0.00 申問: 0.00 申問: 0.00 申問: 0.00	):00:00 ):00:00 ):00:00		・ブル・	セット・	0000	0.002 0.004	- onoe	0.00 0.010
100923982	Image: State in the state															
	クォータナリソルペ -2 psi A <u>100.0</u> % B <u>0.0</u> %	ントマネージャ <u>0.000</u> m C <u>0.0</u> % D <u>0.0</u> %	u/#	*** #:	ップルマネー: サンプル <sup>2</sup>	Ø₩FTN 5.0 °C 42	∲ля л∋ь 24.6°С д2 <b>П</b>	TUV検出 シャッター A	:春 - クローズ <u>280</u> nm			• 707				
ヘルプを開く時はF1キーを持	甲してください。															

5E-5 Starting equilibration and system monitor

Click [平衡/システムモニター]: equilibration and system monitor icon (69). [平衡/システムモ ニター]: equilibration and system monitor window will open.

Select [SEC\_SAXS] (70) in the [装置メソッド]: equipment and method box, and click [平衡/モ ニター]: equilibration and system monitor button (71). Buffer will flow as the initial values of [SEC-SAXS] method (Sample injection does not start.)



#### 5E-6 Setting up plate parameters

Click [プレート編集]: editing plate icon (72), The plate edit window will open.



In the plate edit window, select [ANSI-48 Vial 2ml Holder 1] (73) in the left side, and select [A1] position (74) in the right side.

Click [挿入]: insert (75) and click [OK] (76).

. t	ナンフ	プルセットメソッドのプレートを設定			×
:	Г	2790のレイアウト(L) <b>ブレートの種類</b>	D新規作成(N) フレートの消去(C)	ブレート注入モード	
	E	プレートの種類名	プレートのレイアウト位置		
(73)	1	ANSI-48Vial2mLHolder	1	(74) (74) (42) (43)	(A4) (A3) (A8) (A7) (A8)
	2	ANSI-48Vial2mLHolder	2	B,1 B,2 B,3	B4 B3 B8 B7 B8
				(1) (2) (3)	(4) (5) (5) (5) (5)
	-			0,1 0,2 0,3	0,4 0,5 0,8 0,7 0,8
1				E,1 E,2 E,3	E,4 E,5 E,8 E,7 E,8
	$\vdash$			F,1 F,2 F,3	F,4         F,5         F,8         F,7         F,8
					Incort
	L	(76) OK **>t	」 フル ヘルプ( <u>H)</u>	標準試料注入	(75) IIISert ・ 挿入(1) 追加(A)

#### 5E-7 Setting up injection parameters

Set parameters for the injection of UPLC.

	Plate/well position No. of injection											unction				
		Inject	tion volui	me		Sa	mple	name					Meth	od set/Re	eport n	nethod
)	ブレート/ウ (77)	エル	注入量 (78)	注7	5~	11 +	ナンナ (80	儿名	<i>ل</i> م	υL		機能 (81)		メノッドセ: しポートメ (82)	ット / ンッド	
	1 1:A,1		100		1		tes	st			未知	试料注入	SE	C_SAXS		]
	Analysis time									U	nknov	vn sample		SEC-SA	XS	
	ラベル レファレンス	1	プロセス	(83)	分析 時間 (分)	デー開()	-タ 始 分	次の) 待機( (分	注入 時間 分	自 追加	動 注入	サンブル	重量	希釈率		
		設定	このまま		78		0.00		0.00			1.0	0000	1.00000	)	

 $[\mathcal{T} \vee - \mathbb{N} / \mathcal{D} \pm \mathcal{W}]$ : plate and well position / [1:A,1] (plate 1, A-1 position) (77), input have completed at 5E-6

[注入量]: injection volume (ul) / [enter injection volume (max 250 ul)] (78).

[注入回数]: No. of injection / [1] (79)

[サンプル名]: sample name / [enter sample name] (80).

[機能]: function / select [未知試料注入]: injection of unknown sample (second line) (81).

[メソッドセット/レポートメソッド]: method set and report method / select [SEC\_SAXS] (82).

[分析時間]: analysis time (min) / enter [78] [[53] @BL-15A2] (83).

## **5F Execution of SEC-SAXS**

5F-1 Start of the UPLC injection

Prepare SAXS flow cell and sample vial.

Close the experimental hatch and open DSS.

Click [execute sample set] icon (test tubes icon) (84), [execute sample set] window will open.

	X			6	師見	2 階層	分析のみ		▼ フォールトでも継続	•	テーブル設定の対	重用	サン	プルセットメソ	ッド		•	I
サンブルの分析									サンプル・	セットメンッド: 無	120							
サンプルキュー 😐 コントロールパネル	E	プレート/ウェル	注入量 (µL)	注入回数	ラベル	サンブル名	レベル	根能	メンッドセット / レポートメンッド	ラベル レファレンス	プロセス	分析 時間 (分)	データ 開始 (分)	次の注入 待機時間 (分)	自動 追加注入	サンブル重量	希釈率	
プロジェクト参照		1:A,1	80.0	1				未知試料注入	SEC_SAXS		設定のまま	106.00	0.00	0.00		1.00000	1.00000	
データ表示	E						サンプルセッ	ットの実行		1	×							
<b>メソッド表示</b> メソッドセット 活業 解析							Exe	PCUTE SA	mple set	windc	w							
THE							ス	分析モード: ータビリティモード: P:	分析のみ フォールトでも継続	• •	カンタの選択							
1001达券ビュー 💶	ग	トーサンプル ん	サンブルセ	wh K	夷行中 /		シャット	ಥೆರುಸುಕ್: 🔽	甲折中はシャットダウンメン	ドを実行しない	•					1		
						1						0 <sup>0 0</sup>	903 . 99	o4 odos Ustuk	o dos o	1010		
(84)	Ć		C_SAXS	A 15					開始(日)	*#>1211	~JIJ	1						
		Xecute 2 Eta-#	sam	iple	e slei	186.67		0.040-	158'20 180'20	162.00 分	164.00 161	- 500						
	ŋ	*-\$_19711-07	-77-34		e RR	サンブルマネ	ジ≠FTN	সন্ধ	TUV検出器 実行中		- 907							

Enter [サンプルセット名]: sample set name (You can set the same as the sample name and the sample set name).

Click [開始]: Start icon to start injection process.

	サンブルセットの実行 × サンブルセット名: (85)
	- このサンブルセットに対する設定 「ユーザーの入力待ち 分析モード:  分析のみ
	スータビリティモード: フォールトでも継続
	□ ユーザーによる中断中はシャットダウンメソッドを実行しない
(84)	Start (86) 開始(B) キャンセル ヘルブ

5F-2 Waiting time for the UPLC injection

The injection window will open. Just wait for the injection (waiting period:160 sec for 250 ul

#### injection)



#### 5F-3 Checking start of UPLC injection

Check that the injection of UPLC start (the timer starts to count up.)

シ     ●       ●     ●       ●     ●       ●     ●       ●     ●       ●     ●       ●     ●       ●     ●       ●     ●       ●     ●       ●     ●       ●     ●       ●     ●       ●     ●       ●     ●       ●     ●	Check here
---	------------

Both PILUTUS and UV spectrophotometer will start simultaneously.

While PILATUS is running, a part of PILATUS measurement soft window will become pink in color and measured images will be displayed on the PILATUS image viewer software window. (You need to change PILATUS image viewer software to [measurement mode].)

Confirm the serial measurement of UV spectrophotometer is working. While the serial measurement of UV spectrophotometer, the progress bar window will proceed and update spectra on OPwave+EXT-K window.

	EX .
68%	

#### 5F-4 Preparation for next measurement

After the SEC-SAXS measurement finish, increase the flow rate to re-equilibrate the column on UPLC control software (because UPLC continue the flow at final programmed condition.) Right-click the parameter line in the sample set tab and select delete (87). CAUTION: executed sample parameters does not deleted automatically. If you forget to delete them, the same methods will be performed on next run.

And Notification window will open on OPwave+EXT-K, click OK and re-start [live mode] again by clicking [green start icon] (88) of OPwave+EXT-K.



Start

## **6 Procedure after SEC-SAXS experiment**

#### 6-1

Perform step 1A-1 ~5 with MilliQ [A line]. And then flow MilliQ [A line] at low flow rate (0.05ml/min with Superdex 200 increase 10/300). \*Keep eye on the remaining amount of MilliQ.

6-2 Disposal of waste fluid (waste cup and brown glass bottle), pipette tips and vials.

- Waste fluid: plastic container for hydrous organic solvents [in case of buffer without heavy metal ions] @ Chemistry Lab. of PF.
   The primary and secondary washing solution must be collected in the plastic container.
   And then rinse cup and bottle with tap water and place them on the shelf @ Biophysics & Molecular physiology Lab. of PF.
- Pipette tips and vial caps: Trash can for cap, plastics @ Biophysics & Molecular physiology Lab. of PF.
- Vial: Trash can for glassware @ Biophysics & Molecular physiology Lab. of PF.

#### 6-3

Wash the flow cell with peristaltic pump and dry it with air pump. Rinse the unions and ferrules with MilliQ.

If you find a stain on the window of the flow cell, note it on the log book.

## FAQ

An error occurred on UPLC control software.
 See Appendix 1, and eliminate the cause of trouble.

2) The UV drift on OPwave-EXT-K is large.

The UV baseline is changed by flow rate. Therefore UV base line must be set at the same flow rate as the sample elution period.

In case of unstable and large UV drift, try to change SAXS flow cell.

3) OPWave-EXT-K is frozen or stacked.

See Appendix4, and restart OPWave-EXT-K and perform initial setting.

## 付録 1 Error of UPLC (Empower3)

#### 1

An UPLC error occurs, the error message appears at the display part of Empower3 window.



#### 2

Right-click the QSM (クォータナリーソルベントマネージャ:quaternary solvent manager) part (1) of the direct control panel of the UPLC control software and select [コンソールの起動]: Start Console Window (fifth line) (2).



## 3

The Console Window will open, Click  $[\Box \mathcal{D}]$ : log (3) in the left side.



Check the latest error message. If the error message at the proper time stamp doesn't appear, click [更新]:update icon (right side) (4).

₩ コンソール システム= Hd	lass_TUV ノード= BL10H	PLC - [ログ]	1 1		
システム ウォータキリンルスペルマネー	コントロール 設定保守	トラブルシュー	ティング ヘルプ		
サンブルマネージャFTN	日付:	内容:	システムま	とは モジュール:	
<ul> <li>TUV検出器</li> </ul>					
プロット	[]] ]]]] ]]]	[I>-	▼ 現在のシン	<i>.</i>	(4)
「米寸カワンタ	記録				
60	DIA DIA	1571U	注題	2	
	2017/09/06 0.97	物設計	ACO-TUV#A16T		
	2017/03/06 9:28	吉古	ACO-TUV#A16T	「「キャリブレーション中にリモートコマンドを受信しました	
	2017/03/06 9:26	10000000000000000000000000000000000000	ACO-TUN#A16T	キャリアレンション中にリモートコマンドを受信しました	EDRI
	2017/03/06 9:26	T5-	ACO-TUN#A16T	<ul> <li>● 単信フェイル、ACO-TIB/#A16TIB/199A</li> </ul>	
	2017/03/05 19:05	整生	ACO-FTN#M15S	1、11.031 座の招湯(-84)	
	2017/03/02 16:42	整生	ACO-TUD/#A16T	シャリブルージョン中にリモートコマンドを受信しました	U
	2017/08/01 22:50	1 1 1	ACQ-TUV#A16T	キャリブレーション中にリモートコマンドを受信しました	ホーム
	2017/02/27 21:18	警告	ACQ-TUV#A16T	キャリブレーション中にリモートコマンドを受信しました	
	2017/02/27 9:32	警告	ACQ-TUV#A16T	キャリブレーション中にリモートコマンドを受信しました	
	2017/02/27 9:32	T5-	ACQ-TUV#A16T	<ul> <li>         ・         ・         ・</li></ul>	
	2017/02/27 4:03	15-	ACQ-QSM#M15Q	● 通信フェイル ACQ-QSM#M15QSM341A	
	2017/02/27 3:45	エラー	ACQ-FTN#M15S	● 通信フェイル ACQ-FTN#M15SDI985G	
	2017/02/27 2:06	エラー	ACQ-FTN#M15S	● 通信フェイル ACQ-FTN#M15SDI985G	
	2017/02/27 2:02	エラー	ACQ-QSM#M15Q	e 通信フェイル ACQ-QSM#M15QSM341A	
	2017/02/27 2:02	エラー	ACQ-FTN#M15S	<ul> <li>●信フェイル ACQ-FTN#M15SDI985G</li> </ul>	
	2017/02/26 23:51	エラー	ACQ-QSM#M15Q	😐 通信フェイル ACQ-QSM#M15QSM841A	
	2017/02/26 23:51	エラー	ACQ-FTN#M15S	● ●信フェイル ACQ-FTN#M15SDI985G	
	2017/02/26 21:40	エラー	ACQ-FTN#M15S	🛛 🏚信フェイル ACQ-FTN#M15SDI985G	
	2017/02/26 21:38	エラー	ACQ-QSM#M15Q	😐 :●信フェイル ACQ-QSM#M15QSM341A	
🕗 システムステータス	2017/02/26 21:36	エラー	ACQ-QSM#M15Q	* ポンプ(ハードウェア)圧力超過	
	2017/02/26 20:10	警告	ACQ-FTN#M15S	サンブル吸引率の超過(-34.9)	
	2017/02/26 16:52	エラー	ACQ-FTN#M15S	😐 <mark>単</mark> 信フェイル ACQ-FTN#M15SDI985G	
	2017/02/26 16:51	エラー	ACQ-FTN#M15S	・ サンプル圧力センサー ハードウェア不良(204.8)	
	2017/02/26 16:46	エラー	ACQ-FTN#M15S	<ul> <li>         ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・</li></ul>	
	2017/02/26 16:32	エラー	ACQ-FTN#M15S	<ul> <li>         ・         ・         ・</li></ul>	
	2017/02/26 16:32	エラー	ACQ-QSM#M15Q	● ポンプ(ハードウェア)圧力超過	
	2017/02/26 16:30	T	ACO-FTN#M15S	*)プル圧力センサー ハードウェア不良(207.1)	
	ログの詳細				
	キャリブレーション中にリモート	トコマンドを受信	しました	неір	*
					· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
	1				
e	1.100				

## 5

Click red circle icon (5) on the left side of the error message to open the help window, and

follow that help message to remove the cause of error.

If the error message about pressure appears, check these points.

- Use only fresh filtrated buffer (less than 0.2 um filter).
- Use only supernatant after centrifugation (15k rpm, 10 min) or filtrated solution (less than 0.2 um filter) as the sample.
- Remove and install the connections between PEEK tube and Column.
   Set 5mm length PEEK tubing is projected from the tip of the fitting, connect the fitting and the column by hand.
- Perform longer needle wash (30 sec) and many times of FTN priming (15 sec of washing solvent line and 25 times of purging syringe), see 1A-8,9.
- Set the drawing sample rate lower, see Appendix 5.

#### 4

Errors and Warnings occurred until now.

#### <u>Warning (UPLC doesn't stop): サンプル吸引率の超過[aspirated sample volume is low.]</u>

警告 ACQ-FTN#M15S サンブル吸引率の超過(-34.9)

The aspirated sample volume is less than the programmed sample volume. (You can continue the program. [It is better to check how much volume of sample is injected from the remaining volume of sample vial. Or you can interrupt the program (reequilibration is needed for the next experiment.)

The particle in sample or buffer may be responsible for this warning.

- The sample solution must be supernatant (15krpm, < 10min) or filtered (0.2 um).
- Perform longer washing needle of FTN (60sec), see 1A-7.
- Perform longer priming of FTN [15] sec in [洗浄溶媒]: washing solvent line and [25] times in [パージ溶媒]: purging syringe, see 1A-8,9.
- Set the drawing sample rate lower, see Appendix 5.

#### Error:通信フェイル[Connection failed.]

エラー	ACQ-TUV#A16T	● 通信フェイル ACQ-TUV#A16TUV122A
エラー	ACQ-QSM#M15Q	😐 通信フェイル ACQ-QSM#M15QSM341A
エラー	ACQ-FTN#M15S	❷ 通信フェイル ACQ-FTN#M15SDI985G

The connection between PC and UPLC is failed.

通信フェイル

メッセージの説明	解決法
設定上の問題:装置用 LAN と Ethernet 通信の設定が正しくない	<ol> <li>Ethernet の設定を確認へ、必要に応じて誤りを訂正します。</li> <li>問題があった装置をJセットします。</li> <li>警告が継続する場合は、システムまたはモジュールの電源を一旦 切断してからまた人れ直します。</li> <li>それでも警告が継続する場合は、Waters テクニカルサービスにご 連絡ください。</li> </ol>
電源に問題があるため、装置がワークステーションとネットワーク接続で きない	<ol> <li>装置とワークステーションの電源とケーブルを確認します。</li> <li>装置とワークステーションの電源が入っていることを確認します。</li> <li>通信に問題があった装置をリセットします。</li> <li>警告が継続する場合は、システムまたはモジュールの電源を一旦 切断してからまた入れ直します。</li> <li>それでも警告が継続する場合は、Waters テクニカルサービスにご 連絡ください。</li> </ol>
Ethernet ケーブルが不適切または欠陥がある	シールドされた Ethernet ケーブルと交換します。

6

- Check LAN cables of the backside of UPLC equipment and PC in the experimental hatch.
- Reset the corrected equipment. [Right-click the area of the corrected equipment of direct control panel and select [リセット]: reset.]
- If the same error persists, reboot UPLC and PC system, see Appendix 3.

#### <u>Error:システム圧力超過[Over pressure of system pressure]</u>

エラー ACQ-QSM#M15Q 0 システム圧力超過(5953)

System pressure is higher than pressure limit (high) that you set in Empower3.

システム圧力超過(番号)

ンルベントマネージャー内の圧力が、ユーザーがソルベントマネージャーメンッド編集で設定した高圧限界を超えました。 括弧で囲んだ数字は、エラーの原因となる圧力です。

メッセージの説明	対処法
メンッドバラメーターが不正確	メノッドバラメークを確認し、流量設定が高すぎたり、温度設定が閉違っ てしないか確認します。
最大圧力の設定が低すぎる	メノッドとシステムで許容されている場合、最大圧力の限界値を上げます。
流路のチューブの障害また」は制助	<ol> <li>クロマトグラフィ湾球を10秒間プライムします。ポンプのプライムの際 に過剰な資圧がないなら、詰まっているのはペントバルブインレット より下流です。</li> <li>フィッティングを残めてチューブの流習に詰まりがないか点検し、圧 力を確認します。カラムから始め、ポンプへ向かう方向と逆方向に点 検作業します。</li> <li>詰まっているチューブをプリーニングまたは交換します。</li> </ol>
カラムの問題	カラムを外し、圧力の読み取り値を確認します。カラムが警告の原因に なっている場合は、カラムをクリーニングまたは交換します。
内部的な問題	Watersテクニカルサービスに連絡してください。

- Check the setting values of the flow rate and the system pressure limit. Set the lower flow rate or higher pressure limit.
- Check the clogging of tubing or channel of the system.
   Perform priming [A] line for 0.2 min to check See 1A-4, 5. If the back pressure value is still high, the clogging is downstream from the pump. Search the clogging part with loosening the fitting one by one. The direction to search is from the column to the pump. If the clogging parts are identified, clean or change them.
- Check the clogging of the column.
   Confirm the pressure value without the column. If the column is clogged, clean the column or change the column.
#### <u>Error:リークが検出されました[Leakage has been detected.]</u>

エラー ACQ-QSM#M15Q 0リークが検出されました

#### The buffer is leaking.

リークが検出

メッセージの説明	溶液
リークセンサー内に液体がある	<ol> <li>リークの原因を探し出して、モジュールを修理します。</li> <li>センサーズ取り外して乾かします。</li> <li>リークセンサーリザーバの液体を廃棄して、リザーバを乾かします。</li> <li>センサーを有度取り付けます。</li> <li>ソルベントマネージターをりセットします。</li> <li>管告が継続する場合は、電源をいったん切って、再度入れ直します。</li> <li>それでも警告が継続する場合は、Watersテクニカルサービスに連続してください。</li> </ol>

- Open the doors of each equipment, and identify the leakage position.
- Remove and reinstall that connection. Clean the leakage sensor and the reservoir of leakage sensor (wiping and drying) and reset QSM.
- If the same error persists, reboot UPLC and PC system, see Appendix 3.

#### <u>Error:Z 軸移動 ハードウェア不良[Hardware failure of Z axis movement of FTN.]</u>

エラー	ACQ-FTN#M15S	😐 Z軸移動 ハードウェア不良
-----	--------------	-----------------

Zp軸移動のハードウェア不良

メッセージの説明	溶液
ニードルがセンサーフラグを防げています。	ニードルが正しく取り付けられ、フラグを妨げていないことを確認してください。
プレートの寸法が正しく設定されていないかANSDパージョンのプレートで はありません	ブレートの寸法が正しく設定され、ANSDバージョンのブレートが使用されていることを確認します。
Z軸のキャリブレーションが正しくありません	Z軸のキャリブレーションが正しいことを確認します。
間違ったブレートが挿入されています	正しいプレートを挿入する。
ブレートの挿入が正しくありません	ブレートが正しく挿入されたことを確認してください。
Z軸が何かにぶつかっています	サンプルマネージャーの電源を一度切って、再度入れます。
内部的次問題	それでも警告が継続する場合は、Watersテクニカルサービスに連絡し てください。

- Set the sample plate properly in the FTN, turn off the power of FTN and turn on the power of FTN.
- If the same error persists, reboot UPLC and PC system, see Appendix 3.

## <u>Error:ニードルアーム移動 ハードウェア不良[Hardware failure of needle arm of</u> <u>FTN.]</u>

エラー ACQ-FTN#M15S @ニードルアーム移動ハードウェア不良

#### R軸 移動のハードウェア不良

メッセージの説明	溶液
内容的分析問題	<ol> <li>サンブルマネージャーをリセットします。</li> <li>警告が継続する場合は、電源払いったん切って、再度入れ直します。</li> <li>それでも警告が継続する場合は、Watersテクニカルサービスに連絡してくたさい。</li> </ol>

- Reset FTN.
- If the same error persists, turn off the power of FTN and turn on the power of FTN.
- If the same error persists again, reboot UPLC and PC system, see Appendix 3.

#### <u>Error: サンプル送液最大圧力[Sample fluidics high pressure limit.]</u>

エラー	ACQ-FTN#M15S	❷ サンプル送液最大圧力(215.7)
エラー	ACQ-FTN#M15S	Sample fluidics high pressure limit (219)
サンブル流路系の	最大圧力	
値は、送液システムが重	最大圧力を超えたこと(50 psigより上)を示してい	ます。
メッセージの説明		溶液
ニードルまたは内部バ り、または破損などの:	ルブ出入り口の送液ラインに、詰まり、折れ曲が システム障害がある	<ul> <li>トランスデューサから下流までに詰まりがないか点報します。</li> <li>チューブ(ニードル)の折れ曲がりや破損の有無を確認し、損傷した チューブを交換します。</li> </ul>
内部的な問題		<ol> <li>サンブルマネージャーを)セットします。</li> <li>警告が継続する場合は、電源ないったん切って、再度入れ直します。</li> <li>それでも警告が継続する場合は、Watersテクニカルサービスに連続してくたさい。</li> </ol>

- Perform longer washing needle of FTN (60sec), see 1A-7.
- Perform longer priming of FTN [15] sec in [洗浄溶媒]: washing solvent line and [25] times in [パージ溶媒]: purging syringe, see 1A-8,9.
- Reset FTN.
- Set the drawing sample rate lower, see Appendix 5.
- If the same error persists, turn off the power of FTN and turn on the power of FTN.
- If the same error persists again, reboot UPLC and PC system, see Appendix3.

#### Error : System not calibrated. Try to Calibrate

15- ACQ-TUV#A16T • System not calibrated. Try to Calibrate.

システムはキャリブレーションされていません。キャリブレーションしてください。

メッセージの説明	溶液
システムがキャリブレートされていません、キャリブレーションしてください	検出器を再キャリブレーションします。

- Reset TUV.
- If the same error persists, reboot UPLC and PC system, see Appendix3.

#### <u>Error: サンプル圧力センサー ハードウェア不良[Hardware failure of Sample pressure</u>]

#### <u>sensor]</u>

エラー ACQ-FTN#M15S 0 サンプル圧力センサー ハードウェア不良(204.8)

サンブル圧力センサーのハードウェア不良

メッセージの説明	溶液
内部的分割費	<ol> <li>サンブルマネージャーをノセットします。</li> <li>警告が継続する場合は、電源をいったん切って、再度入れ直します。</li> <li>それでも警告が継続する場合は、Watersテクニカルサービスに運給してください。</li> </ol>

- Reset FTN.
- If the same error persists, turn off the power of FTN and turn on the power of FTN.
- If the same error persists again, reboot UPLC and PC system, see Appendix3.

#### <u>Error:Mux ADC デフォルト登録エラー[Mux ADC default register error]</u>

エラー	ACQ-TUV#A16T	● Mux ADCデフォルト登録エラー
エラー	ACQ-TUV#A16T	Mux ADC default register error.

Mux ADC デフォルトレジスターエラー

メッセージの説明	溶液
マルチブレクサ (Mux)アナログデジタルコンバーター(ADC)規定値登録 エラー	<ol> <li>・ 検出器をJセットします。</li> <li>それでも警告が継続する場合は、検出器の電源を入れ直します。</li> <li>それでも警告が継続する場合は、Watersテクニカルサービスに連絡してください。</li> </ol>

- Reset TUV.
- If the same error persists, turn off the power of TUV and turn on the power of TUV.
- If the same error persists again, reboot UPLC and PC system, see Appendix 3.

## <u>Error:バッテリー駆動メモリーのハードウェアフェイル[Battery backed memory h/w</u> <u>failure]</u>

15-	ACQ-FTN#M15S	😐 バッテリー駆動メモリ ハードウェアフェイル
15-	ACQ-FTN#M15S	Battery backed memory h/w failure

バッテリー駆動メモリーのハードウェアフェイル

注意:すべてのキャリブレーションバラメータが消失した可能性があります。問題の解決後、設定値をリストアするか、キャリブレーション必繰り返す必要があります。

メッセージの説明	溶液
ランブの破損	Watersテクニカルサービスに連絡してください。

• Reboot UPLC and PC system, see Appendix 3.

# <u>Error:プレートまたはバイアルが見つからない、または設定が間違っています[Sample\_plate or vial is not found, or Incorrect parameters are set.</u>

エラー ACQ-FTN#M15S 😐 プレートまたはバイアルが見つからない、または設定が間違っています

ブレートまたはバイアルが見つからない、または設定が間違っています

ナンブルマネージャーがバイアルまたはブレートの正しい高さを検知しないか、期待したバイアルまたはブレートと異なるものを検知しています。	
メッセージの説明	溶液
ブレート/バイアルがありません	指定したプレートまたはバイアルが正しい位置にあるか確認します。バイ アルが正しい位置にあり、正しいプレートが選択され、ANSDバージョンの ブレートが取り付けられていることを確認します。
ブレート/バイアルが正しく指定されていません	ブレートがソフトウェアで正しく指定されていることを確認します。
プレートバイアルが期待したものより短い	正しいブレート/バイアルを選択して、ANSIバージョンのブレートを使用します。
内部的な問題	Watersテクニカルサービスに連絡してください。

- Check the sample vial type, vial position and the placement of plate.
- Confirm the vial and plate setting on Empower3, see 3E-6, 7.

#### <u>Error:ポンプ(ハードウェア)圧力超過[Overpressure of pump pressure]</u>

エラー ACQ-QSM#M15Q • ポンプ(ハードウェア)圧力超過

#### ボンブ(ハードウェア)圧力超過

システム圧力が最大圧力を3450 kPa (34.5 bar、500 psi)上回ると、ポンプハードウェア圧力超過エラーの原因となります。 メッセージの説明 溶液 システムに対して流量が高すぎます。 メンッドパラメータを確認し、流量設定が高すぎたり、温度設定が低 すぎたりしないか確認します。 2. 送液を停止し、圧力を逃がします。 適切な流量を設定します。(メソッドとシステムで許容されている場合、上限を上げます。) ベントバルブがブロック位置にあるときに、ユーザーが流量を設定しようと しました。 ベントバルブの交換 ポンプハードウェアの詰まり ヒント:システムの流路のあらゆる部分が、明らかなベントバルブあるい はカラムの問題の原因となることがあります。 ミキサー/フィルタアウトレットのフィッティングを緩め、圧力が低下す るかどうかを観察します。低下する場合は、サンブルマネージャーで 同じテストを実行します。 圧力が維持されている場合、システムの流路の次のフィッティングを 緩め、圧力が低下するかどうかを観察します。 ステップ2を繰り返し、圧力の低下が見つかるまで、システムの流路 をポンプまで調べます。 4. 問題の原因となっている部分を修理、または交換します。 それでも問題が解決しない場合は、Watersテクニカルサービスに 連絡してください。 内部的な問題 Watersテクニカルサービスに連絡してください。

- Check the setting values of the flow rate, the system pressure limit and temperature.
- Set the lower flow rate, higher pressure limit or higher temperature.
- Check the clogging of tubing or channel of the system.
  - Search the clogging part with loosening the fitting one by one. The direction to search is from the column to the pump. If the clogging parts are identified, clean or change them.

## **Appendix 2 Solvent Inlet Line**

UPLC system has seven solvent inlet line. A (yellow), B (blue), C (red), D (green): buffer line, [B, C, D (not in use) ->50% Ethanol] WASH (white): needle wash SEALWASH (brown): pump seal wash PURGE (orange): sample syringe purge

Please set solvent inlet lines as described below. CAUTION: Change the bottles for the inlet line after the flow was stopped.

(1) During storage

20% Ethanol : A(yellow), WASH(white), SEALWASH(brown), PURGE(orange)

(2) During flow MilliQ

Milli Q Water : A(yellow), WASH(white), SEALWASH(brown), PURGE(orange)

(3) During flow buffer

Milli Q Water : WASH(white), SEALWASH(brown) , PURGE(orange)

Buffer : A(yellow)

	A(yellow)	WASH(white)	SEALWASH	PURGE	B, C, D
			(brown)	(orange)	
Storage	20% Ethanol	20% Ethanol	20% Ethanol	20% Ethanol	50% Ethanol
MilliQ	Milli Q	Milli Q	Milli Q	Milli Q	50% Ethanol
Buffer	buffer	Milli Q	Milli Q	Milli Q	50% Ethanol

## Appendix 3 How to start UPLC Control Software (Empower3).

#### 1

Click the Empower3 icon (1) on remote desk top.



## 2

In the login window, enter user name: system (2), and password: manager (3). And click OK (4).



#### 3

Click "サンプルの分析": Analyze Sample (5) in Empower3 Server Window.



In Analyze Sample Window, select BL10C in [データを取り込むプロジェクト]: Project area (left side) (6), and select [HClass\_TUV] in [分析システム]: System area (right side) (7). And then click [クイックスタートを使用]: quick start mode (8).

サンプルの分析	
データを取り込むプロジェクト: □-つ プロジェクト ② BLOC (6) ③ Derauns ④ ③ Waters_FSE	(7) 分析システム 「サンプルの分析」を使って、ワークステーション で新しいサンプルを分析します。 表示されているリストからプロジェクトとシステム を選択してください。 サンプルの分析画面で、システムを平衡化する にはシステムントロールパネルを使ってくださ (ハ。システムで分析したいサンプルセットの作成 手順を踏みたい場合はサンプルセットのイザード を使ってください。 Quick start mode (8) りイックスタートを使用(9) ウォークアップを使用(9) のK キャンセル ヘルプ

## 5

Confirm that [システムアイドル]: system idle is displayed in the message area and QSM, FTN and TUV panels are displayed in the direct control panel of Empower3 window.

	ABB I			M L X	20	分析のみ		· 7+-14	CEANS	-	•	テーブル設立	の適用	サンプ	uterbyer
201000006						0		シゴルセットメ	シッド: 黒師		-				
27041- 280-0300	■ プレート/ウェル	注入量 (µl)	識⇒	ベル サンプル名	1-471	(4%)	ジンデセット / レポートメンッド	ラベル レファレンス	プロセス	分析期(5)	7-8-19	次のぼう入 「専調時間 (分)	道加主人	サンブル重量	著訳単
ロジェクト参照				_											
快表示															
<b>ソッド表示</b> JoFitori 通 新															
	10 A 9274	1923	Utzył.	(実行中 /	_			1.							
₩1922							サンブルセットの900 合計サンブルの900 新規サンブルセットの	時間: 000 時間: 000 時間: 000	10040	サン	/ブル	セット	0.000	0.00 ± 0.00	ados odce
ntati- 😦						350 350 350									
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	<u>ይ</u> ምብ ドル	4	0	כ		00 1.00 2.00	3.00 4.00	5.00 9	6.00	110	8.00 5	do 10.	20	
	<b>9</b>														
	9 <u>2</u> 7x-97978	C/F4\$-	ÿ¥	е <sup>н</sup>	ソプルマネー	÷ŹψFTN	98	TUV被S	155			207			

システムアイドル

System idle -> initializing OK

りォータナリソルペントマネージャ		サンブルマネージゃFTN	<b>●</b> 分析	111V検出器	・ ランプ
-2         psi         0.000         mL/55           A         100.0         %         C         0.0         %           B         0.0         %         D         0.0         %	8	サンブル <sup>25.0 ℃</sup> カ <u>オフ</u>	ラム 24.6 ℃ 丸乙 📑	シャッター <b>クローズ</b> A <u>280</u> nm	1

#### 6

When any error message is appeared in the message area. Perform the re-recognition of equipment.

Close the quick start window, and click [システムの再構成]: reconfiguration of system (9) in



#### 7

Select [ / - F]: node (10) in system management window, and right-click [BL10C] (11) and

select [プロパティ]: property (fifth line) (12) in the center table.

	1075-000								
ファイル(E) 編集(E) 表示(⊻)	記録 ツール	ヘレフ(日)							
2 5 5 5 X 3	111 111 111		74月9名:	の期間定		• E1-	5編集( <u>W</u> )	更新(山)	行の最大数
三番 Empower 3の設定	1312-K	名「ノードの	絶話 オーナー	ノードの課題		(11)			
● ● プロジェクト	1 BI10h	pic Empower	System	В					
J) 💵 🔤 no	de 💻	-		<b>—</b>					
D JATA		-		-	-				
🗈 🤣 ライプラリ		-			-				
🖲 👓 eCord									
- g 1-9-				0					
22 ユーザークルーノ		-							
のプレートの通知					-				
STAT-TANA	Left.	-			-				
オフラインシステムオー	ディッ			2					
		-			-				
		-		-	-				
		-			-				
				2					
		-							
		-			-				
		-			-				
		-			-				
				0					
		_							
					-				
		-	-		-				
					-				
	<u> </u>								
					-				
4 m	•	-			1				
✓ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □	, ださい。								1合計
・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・	・ (ださい。				]			•	1 승래
いしプを描く時はF1キーを押してく System/Administrator システル ファイル(F) 横鹿(F) 表示(V) 200	* * *********************************	)	G. Augustadi		]				1 21
	* (ださい。 ダール ヘルプ(H 町) 「 この	() 2411/24	£: <b>↑3期</b> 預定		• <u>61-6</u>	編集( <u>U)</u> 更新(	) (fo&)		1 611
	* (ださい。 ジール・ヘレブ(H 高) 「 」 ヨノード名 ノー 日日10415 「Free	i) フィル24 ドの種類 オー	5: 初期設定 - テー [ノーFの初期] Man		• 22-6	aru) <u>z</u> m.	j (†0€/	<b>- X</b>	1 合計
	* メール ヘルブ(H マール ヘルブ(H マードを ノー 日日の+を Enge	() アの接頭 オー 新規作	5: [初期設定 テー [ノードの初期] 成(m)	•	· 2	a未近  王K(	0   170€7		1 合計
	* メガン・ メリール ヘルプ(H 配 「 「 」 マール ヘルプ(H 配 /-P名 ノー T EXICatio Enou	l) - Pの優望 オー 新規作 単球(D	E: [初期設定 -ナー [ノーFの訳明] Mana (N) ))	•	· 2	編集(y) _ 更新(	<b>0</b>   170€7	<b></b>	1 61
	* メガール へルプ(H 配 「 こ … フール へルプ(H 配 ノードる ノー T Elicatio Enor	l) - Pの優望 オー - 新規作 単球(D - テキス 	E: 初期設定 	,	- <u>1</u>	編集(M)   夏秋()	्र ) 170सिर	C	1 61
Comparison 1000 (1000)     Comparison 1000     Compar	、 たさい。 マール へいブ(H 四 厂 「 四 / 一F 6 / 一 日 Elitatio Entri	) 2012年 70億頃 オー 部後作 単常の 第一 第一 第一 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10	5: [初期設定 -ナー [2-Fの訳明] 成(N) )) トヘエクスポート(E	,	• <u>*</u>	a≉⊗ _ 東紙	<b>》</b> 行0最大	<b>1</b> 32 1000	1 승計
	、 ださい。 ジール へいブ(H 電 「「」 コール へいブ(H 電 /一下名 /一 丁 Ettapo Enoi	) アクルタ アクルタ アクリタ マクルタ マクロ マクロタ マクロタ マクロタ マクロ マクロタ マクロタ マクロタ マクロ マクロ マクロ マクロ マクロ マクロ マクロ マクロ	5: 「初期時度定 レードの38時 レードの38時 レードの38時 ト(E ト(E ト(E ト(E) ト(E) 	rope	• <u>*</u> ••	<u>ar∞∣ zek</u> 12)	(	<b>1</b> 32 1000	1 821
C 1000 (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1)	、 ださい。 ダール へいブ(H ) 「 」 ジール へいブ(H ) 「 」 ) 「 」 ) 「 」 ) 「 」 ) 「 」 ) 「 」	) フィル対 ドの種類 ア・マー 新規作 予キュス フロ・ペ フロ・ペ フロ・ペ フロ・ペ フロ・ペ フロ・ペ フロ・ペ フロ・ペ フロ・ペ フロ・ペ フロ・ペ マー マー マー マー マー マー マー マー マー マー	E: 173期日5元 ナー 12-170分現明 15500 (15000 (15000 ティ(P) P (C)	rope	erty (	<u>هعنی م</u>	<u>ل</u> هم الم	<b>1 1 1 1 1 1 1 1 1 1</b>	1 88
	* メデオン・ ダール へしブ(H 配 「「 ローン・ 「 」 「 」 」 」 」 」 」 」 」 」 」 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	) - アクルと対 - アクル - アクルと対 - アクル・ジャン - アクル・ジャン - アクル・ジャン - アクル・ジャン - アクル・ジャン - アクル・ジャン - アクル・ジャン - アクル・ジャン - アクル・ - アクル・ - アクル・ - アクル・ - アクル・ - アクル・ - アクル・ - アクル・ - アクル・ - アクーク・ -	E: 行動転発定 ナー   2- F の表現明 (な)。 水(ハ) トヘエクスポート(E マー) マ(ア) P (C) ない別(州)	rope	• <u>*</u>	•••) •••	ر ۱۹۵۸ و	<b>1</b>	1 631
(	・ メーレーへいしプ(H マーレーへいしつ) マーレーへいしつ) マーレーへいしつ(H マーレーへいしつ) マーレーへいしつ(H マーレーへいしつ) マーレーへいしつ(H マーレーへいしつ) マーレーへいしつ(H マーレーへいつ) マーレーへいしつ(H マーレーへいしつ) マーレーへいしつ(H マーレーへいつ) マーレーへいつ) マーレーへいしつ(H マーレーへいつ) マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレー マーレ マーレ	) 2010頃 17-00 100 100 100 100 100 100 100	E: 「3月1日数定 - フーレードの3月1日 成(N) ) トレエクスポート(F トレエクスポート(F の) アディ(F) P (C) の) のの(H) 列を表示(S)	rope	• <sup>2</sup>	ब्हाल <u>हल</u> 12)	u inati	C X 1000	1.681
(	・ デ ジール・ヘルプ(H デ / 一下 8 ジール・ヘルプ(H マ / 一下 8 ジール・ヘルプ(H マ / 一下 8 ジール・ヘルプ(H マ / ート 8 ジール・ヘルプ(H マ / ール・ヘルプ(H マ / ール・) / ール・(H マ / ール・) / ール・) / ール・(H マ / ール・)	) フィルタ ドの接接 単次の デキス フロパ フロパ フロパ フロパ フロパ フロパ フロパ フロパ	5: Familyを 	rope	• <u>erty</u> (		0 1908 <i>;</i>	<b>1</b>	1 631
(	* ジール へいブ(h) 第一 :: 1 310gc (m)	) 2012頃 第一次 1070頃 1070頃 1070	Ex [730年53年 -ナー「27638月 (の) ・ トンエクスポート(F (の) ティ(F)… P (の)	rope	erty (	ажы) кис 12)	<u>р</u> ноёл	t32 1000	1 83
(	・ たさい。 第一 フール・ペンプ() 第一 マール・ペンプ() 第一 マール・ペンプ() 第二 マール・ペンプ() 第二 マール・ペンプ() 第二 マール・ペンプ() 第二 マール・ペンプ() 第二 マール・ペンプ() 第二 マール・ペンプ() 第二 マール・ペンプ() マール・	) 2010分 第級日 第級日 2010 20	E: 「JMRAJE	rope	• <u>ca-</u> erty (	ब्द्र <u>ाण</u> हास 12)	0 1108.1	<b>1</b>	1 681
	・ (ださい。 ボージール へいブ(h ツール へいブ(h マール へいブ(h))))))))))))))))))))))))))))))))))))	) 2012頃 1970頃頃 第一 第6時間 第6時間 フロイ 支示し 全ての テーブ テーブ 列のプ	E: 行動発生 テーレーFの分割 (な)、 ) トエクスポート(F トンエクスポート(F トンエクスポート(F (C) (C) (C) (D) (D) (D) (D) (D) (D) (D) (D	rope	• <u>*</u> ***	<del>الله ال</del>	0 1908 <i>1</i>	<b>1 1 1 1 1 1 1 1 1 1</b>	1 631
	・ ださい。	) 2012頃 107(12)	E: 「初期日本在	rope	<u> </u>	ब्दुः छ <u>हास</u> 12)	(	1000 x	1 81
	・      ・     ・     ・      ・     ・      ・     ・     ・     ・      ・     ・      ・     ・      ・     ・     ・     ・	) 2012年 1907年19月 1970年19月 1970年19月 2017年 1970年19月 1970年1970年1970年1970年1970年19	E: 行動転転 F - アーアの説明 成(N) トムエクスポート(E G) なの(H) 和反示(C) ルのジョ(N) レのジョ(マイ(N)	rope	• = ==================================	<sup>∎8</sup> ∞) <u></u> ₹₩0	0 1958.*	C X 1000	1 61
<ul> <li> <ul> <li>■</li> <li< td=""><td>・ たさい。 第 </td><td>) 201/20 ドク/2017 17-10 新規作 フロパ コピー スマン フロパ コピー スマーフ テーフ 列のプ</td><td>Ex 「初時設定 - ナー「- F-73税務 成(N)… トトエクスポート(F ディ(P)… P ジラ(N)… りんの空間(N)… しんのプロ(ディ(N)…</td><td>rope</td><td>erty (</td><td>ब्द्राण <u>हल</u> 12)</td><td><u>ل</u></td><td>100</td><td>1 81</td></li<></ul></li></ul>	・ たさい。 第 	) 201/20 ドク/2017 17-10 新規作 フロパ コピー スマン フロパ コピー スマーフ テーフ 列のプ	Ex 「初時設定 - ナー「- F-73税務 成(N)… トトエクスポート(F ディ(P)… P ジラ(N)… りんの空間(N)… しんのプロ(ディ(N)…	rope	erty (	ब्द्राण <u>हल</u> 12)	<u>ل</u>	100	1 81
(	・ たさい。 # プール へいづけ アール へいづけ マール へいづけ マール	) 2010日 100世紀 17-0 100世紀 フラキス フロビー 表示し 全ての フーフ 列のプ	Er (1985年	rope	• <===	a≋⊗ <u>₹</u> ₩	o Hok	52 1000	181
	・      ・     ・	) 2015頃 17-5 1920頃 17-5 1940 2010 2010 2010 2010 2010 2010 2010 2010 2010 2010 2010 2015	Ex F3MERを ナーノーF9名税用 或(v)     P トレエクスポート(E の) ので(f) いんごのスポート(E の) のの目的です(f)     P のの目的です(f)     C ので(f)     C	, rope	•rty (	aria) rm. 12)	<u>, 1108</u> 7	- X 100	1 69
<ul> <li>● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ●</li></ul>	x         x           y→x         x           y→x         x           x         x           y→x         x           x         x           y→x         x	) 2018頃 第一 97年2 第二 7日パ 二 フロパ 二 フロパ 二 フロパ 二 フロパ 二 一 の 長 に し 二 一 の 長 に 、 二 一 の 長 に 、 二 一 の も 見 に つ こ に う キ ネ ス 二 の も 見 に う キ ネ ス 二 の し 、 の も し に の し 、 の し の し の し の し の し の し の し の し の し の し の し の し の し の し の し の し の し つ の の う れ し つ の の う れ し つ の の し つ の の つ つ の つ の つ の つ の つ の つ の つ の つ つ の つ の つ の つ の つ の つ の つ の つ の つ の つ つ の つ つ の つ の つ つ の つ つ の つ つ の つ つ つ つ つ つ つ つ つ つ つ つ つ	E: FamEが定 	rope	erty (*	a≞⊚) _ Σ₩0	<u>ل</u>	100 × 100	1.63
	・     ・     ・     ボさい     ・      ・     ・     ・     ・     ・     ・     ・     ・    ・      ・	) 2012年 2012年 2012年 10月1日 10月1日 2012年 10月1日 2012年 10月1日 10月11日 10月11		, rope	erty (	ब्द <u>े⊛∣ हल</u> 12)	<u>,</u> 1108/1	2 X 100	1 69
	・      ・     ・     ・     ・     ・     ・     ・     ・      ・      ・    ・      ・     ・     ・    ・     ・      ・     ・     ・    ・     ・     ・     ・      ・     ・     ・    ・     ・	0 2018年 10日日 2018年 1日 2018年 1日 2019年 2019 2019 2019 2019 2019 2019 2019 2019 2019 2019 201	Ex 「利用計畫	, rope	erty (	ख≇∞ <u>)</u> हसल 12)	9 195#.*	32 100	1 68
	・      ・	0) フルレめ 第一日 マル クレ	た. 「3時代支産 フラーレードの説明 (の) ・ン・マンフボート(F ・ン・マンフボート) (C) ない少い) ・シーン・アン 「 の ・シーン・アン ・ (C) ない少い) ・ アート・ ・ アート・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・	rope	• <u>a-</u>	ब्द <u>ाळ]</u> हास 12)	joen		1681
(	・	) 2019月9日 1943日 1943日 2017日 20		, , rope	<u>•</u> •	₩₩£00) ₹₩6	0 1108/	100 X 100	1 68
	・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・	) 2013年3月11日 11月11日 2013年3月11日 2014 2014 2014 2014 2014 2014 2014 2014	E: 「初紙表面	rope	• 6-4	ब्ह <u>्य  </u> हस्ल	<b>∞</b>	100 1000	] élt

Confirm that [OK?] column in equipment tab of property window is [yes]. If three columns are [Yes], three equipment are connected to PC. If more than one column is [No], Click [装置 のスキャン]: re-scan (13) to retry to connect to PC.

/ード BI:	10hj	olc のプロハ	हिर				×
全般	装置	き  シリアルオ	Ҟート│DHCP設定│アクセス	1			
	E	種類	アドレス	OK?	シリアル番号	前回のサービス	
	1	ACQ-TUV	ACQ-TUV#A16TUV122A	Yes			
	2	ACQ-FTN	ACQ-FTN#M15SDI985G	Yes			
	3	ACQ-QSM	ACQ-QSM#M15QSM341A	Yes			
					1		
	100	3	6 () ()		20 		
	4				10		
		Longitude					
		_					
		(13)	装置のスキャン		装置の削除		
		· / -	Do. ccan				
			Re-Scall				
			(14)	OK	<b>+</b> ti	1211 A	いげ
_				-			

Click [OK] (14) in property window and close the system management window, and return to Step3.

## 10

If re-start steps fail, Close all Empower3 windows and return to Step1. If re-re-start steps fail, reboot PC and UPLC sytem.

Shut down procedure

Check that UPLC flow stop. Close Empower3 windows. Shut down PC Turn off UPLC (QSM, FTN, TUV (front side) and Column cooler (right side)).

Reboot system

Turn on Column cooler.

Turn on PC and wait until Windows OS start.

Turn on QSM, FTN and TUV and wait until initializing equipment (several minutes). Start Empower3.

Start remote desktop from the control PC outside the experimental hatch.

The short cut icon of the remote desktop is placed on the desktop of the control PC.

- BL-10 用 HPLC@10C
- HPLC リモート@15A2

# Appendix 4 How to start UV spectrophotometer control software [OPwave+EXT-K]

### 1

Click OPwave+EXT-K icon.



#### 2

Confirm that [積分時間]: integration period is [1sec] in OPwave+EXT-K (UV spectrophotometer software). If not, set [1sec] (1).



### 3

Confirm that OPwave+EXT-K is [live mode]. If the icon next to menu icon is grey and the spectra is renewed every sec, OPwave+EXT-K is set to [live mode]. If the icon next to menu icon is green, Click that green icon (2), and set OPwave+EXT-K to [live mode].



Loosen and remove light fiber cable from UV spectrophotometer, and install metal cap to shield from light (3). Click dark save icon (blue bulb) and click minus dark icon (blue bulb with white bar). The icon will be changed to blue bulb with red bar.





5

Re-connect UV spectrophotometer and light fiber cable. Confirm that the shutter of light source is open, if not, push shutter button of light source (6).



Set SAXS flow cell (filled up with MilliQ or buffer) to cell holder.



Select [基本スペクトル]: Basic spectra tab in OPwave+EXT-K.



8

Adjust light intensity with attenuator (actual maximum counts should be less than 70~80 % of maximum (QE65Pro: 16bit, QEpro: 18bit).

(Example: when transparent protein solution is measured (range 220 – 400 nm), adjust about 30000 counts (QE65Pro) and 120000 counts (QEpro) [about 70% of maximum]).

How to adjust with attenuator

Loosen white lock screw (7) and rotate black wheel (8) to adjust aperture. (When the lock screw will be tightened, light intensity is easy to change.)



7

Click baseline icon (yellow bulb) (9) to make reference, and then click [A] icon (Absorbance mode) (10) to make absorbance tab. Select [吸光度 1]: absorbance 1 tab (11).







C OPwave+EXT-K Ver3.08		• ×
ファイル 分光器 キャプチャー グラフィック ラマン	> 設定 ヘルプ	
Menu 🕎 🧧 🌒 🌰 😤 🗎 📋	□ 単 図 非線形緒正 円がたード /-マル ・ 分析波長 ピーク波長 ・ 相関色温度 3100	
積分時間 1 🚽 sec 👻 平均回数 1 🚖	▶ スムージン 2014年 01년 10 パラメー対称存 10 Lamp 10 ELDerk 12 連続 色度回 0 xy 0 uv 0 シャッター ノーマル	
プロパティ		
分光器1:QEPB0040		
	4	
	38	
	36	
	34	
	3	
	28	
	26	
	24-	
	22 1 2	
生データ		
65,000	1.6	
60,000 - 55,000 -	14	
50,000		
¥5,000 -	0.8	
<u>3</u> 35,000 -	0.8	
6 25,000 -	0.4	
15,000	02	
10,000		
s,uu	200 250 500 500 500 400 450 500 550 600 650 700 750 800 850 900 950 波根[nm]	<u>ا</u>
200 400 600 800 波長[nm]	111111111111111111111111111111111111	
	CAMBEDDARD 76/LUR /6/20/0/101111 ( //2/1011/6/100 0/02/000	1
		1

Click the remote desktop icon of the measurement PC outside experimental hatch.

- Flow&QE65pro Remote Desktop@10C
- UV for HPLC & Solution Flow@15A2



10

## Appendix5 How to change the drawing sample rate

If errors about the sample injection occur frequently, Try to set the drawing sample rate lower.

Warning: サンプル吸引率の超過[aspirated sample volume is low.], see Appendix 1. Error: サンプル送液最大圧力[Sample fluidics high pressure limit.], see Appendix 1.

1-1



Select [SEC-SAXS] (2) in the [装置メソッド]: equipments and method, and click [装置]: equipments (3) in the navigation bar.

[クイックスタート]: quick start window will open, select [いいえ]: No (4).

Q 無題 プロジェクト= BL1	0C ユーザー= System/Administrator - ク	イックスタート - [メソッドセット表示]			
ファイル(E) 表示(V) 管					
サンブルの分析 サンブルキュー コントロールパネル・ プロジェクト参照 データ表示	日 🕒 ジットセット 「メッテージチャンネル 「メッテージチャンネル 「メッ 生成チャンネル	(2) 現定の解析メソッド 現定の解析メソッド 現定の解析メソッド 調査シェルトメソッド	EC_SAXS (ンポートデータ) lilance ならうAXS 解析オンッド	Equ	ipment and method
メリバ サリバ マンド マンド マンド マンド マンド マンド マンド マンド	Equipment	エウスポートメリッド		×	
•	Do you want to sa このメソッドセット	ave the default m は無題ですが、保存	ethod set 字しますか?	?	
	(\$L1)(Y)	(4) いいえ( <u>N</u> ) No	キャン	tur	

## 1-2 Setting the drawing sample rate

Click [ACQ-QSM] icon (5), and move to [全般]: general tab (6).

Click [詳細設定]:property icon(7), and set the drawing sample rate in the property window(8). And then click [OK] (9) to close the property window.

(The drawing sample rate has been set to <u>30ul/min</u> from July 2018. If errors about the sample injection occur frequently, try to set the drawing sample rate 15ul/min.)

ℚ SEC_SAXS プロジェクト	≻= BL10C ユーザー	= System/Administrator - クイックス	スタート - [装置メ)	ノッド表示]		
ファイル(E) 表示(⊻) 管	理(四(10)ルプ(日)					
1						
<b>サンブルの分析</b> サンブルキュー コントロールパネル	Waters Gesternary Solvent ACO-OSM	サンブルマネージャFTN ) 全般 <b>Gien P#訳</b>   イベント				
_ プロジェクト参照	Waters Sample Manager FN	│溶媒 洗浄溶媒名:  Water  パージの増タ・	• 🔟	-温度コントロール	警告範囲: □ ± 5.0 ℃	?
データ表示	ACQ-FTN Waters	ハージャッス Water 注入前洗浄:	•	4.0 ▼ ℃	C ± 5.0 ℃	
<mark>メソッド表示</mark> メソッドセット 装置 解析	Detector ACQ-TUV	10 注入後洗浄: 「6 秒		自動 <u></u> 「 先行ロード アクティブプレヒーター:  無効	] 分 (7)	
		אַלאַב:			X 詳細設定 Property	

詳細設定			×
自動設定を変更するには下記のオプションを有	す効にしてください。		?
(8	)		
▼ シリンジ吸引レート	30	μL/分	Drawing sample rate
🔽 ニードル位置 (底から)	5.0	mm	
□ エアギャップ プレアスピレート	自動		
ポストアスピレート	自動		
匚 注入なし			
□ 混合サイクル	自動		
□ 混合ストローク容量	自動		
(9) OK	キャンセル		

## 1-2

Click save icon (10) to save modified method.

%To save parameters is needed to run modified method. If you do not click save icon, UPLC will not work proper method.



## 1-3

After your beam time, restore the drawing sample rate and save modified method again.