

取得効率やX線損傷を 考慮したデータ収集例

京都大学大学院理学研究科 藤橋雅宏

話 題

X線による結晶の損傷

データの取得効率を高めるために

X線による結晶のダメージ

- ・Photon fluxが大きいほど損傷は大きい
- ・集光度が高いビームは大きな損傷を与える

→ このような事を表す概念として、放射線に関わる単位Gyがある

1 Gy(グレイ): 電離放射線により物質 1 kg につき 1 J の仕事に
相当するエネルギーが与えられるときの吸収線量

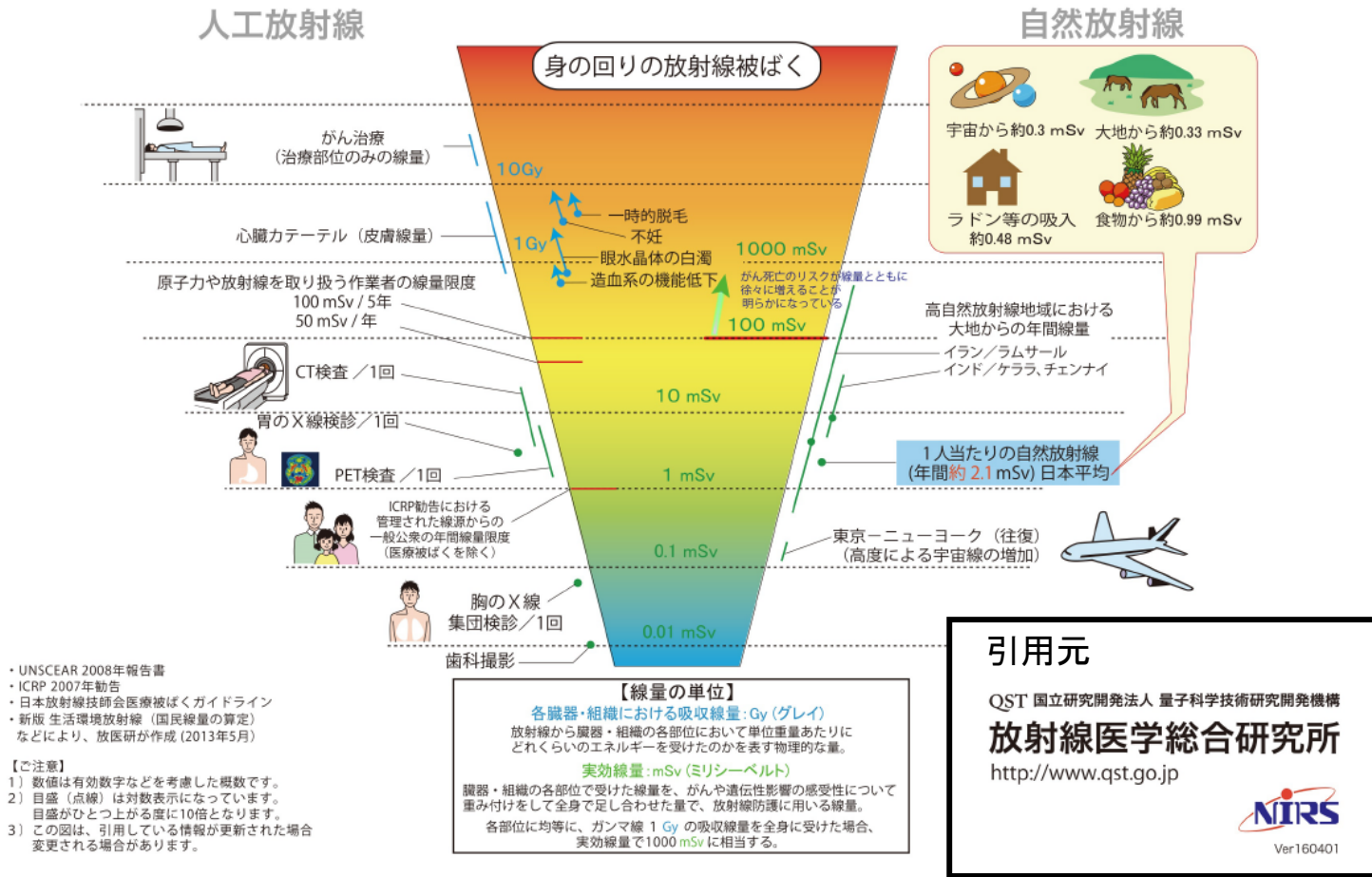
→ Henderson limit Henderson R. (1990) *in Proc. R. Soc. London Ser. B* **241**, pp 6–8.

凍結結晶がどのぐらいのX線照射に耐えられるかの目安

20 MGy と、されていますが、個人的には数MGyが限界と思います。

20 MGyの吸収線量とは？

放射線被ばくの早見図



ヒトは10Gy(≒10Sv)程度全身被爆を受けると、99%以上死亡すると言われてています

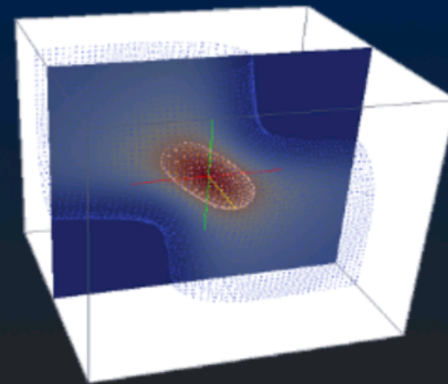
Henderson limitは20 MGyなので、結晶はヒトよりも数十万倍以上の放射線量に耐えることになります。

吸収線量の計算法

Raddose 3D <http://www.raddo.se/> の利用が便利

RADDOSE-3D

Calculate the dose
absorbed by a crystal



吸収線量の計算法



Raddose 3D

<http://www.raddo.se/>

ファイル(E) 編集(E) 表示(V) 履歴(S) ブックマーク(B) ツール(T) ヘルプ(H)

Raddose-3D - calculate th x +

www.raddo.se/php/

よく見るページ KUMail 中級者講習会 PF-PX manual Pubmed Kyoto-u PF研究会 PISA Reaxys set

RADDOSE-3D

Calculate the dose absorbed by a crystal

Email
Get an email notification when your job is ready

Job Title
A brief description of the job

Crystal

Crystal Type
Cuboid or Spherical

Crystal Dimensions*
Dimensions of the crystal in X,Y,Z in μm .
Z is the beam axis, Y the rotation axis and X completes the right handed set

Pixels per Micron
The resolution of the grid used to calculate dose in voxels/ μm . Defaults to 0.5.

Absorption Coefficient
The method for calculating the absorption and attenuation coefficients. Average uses average atomic crystal compositions based on a PDB survey. RADDOSE explicitly calculates the coefficients using the crystal parameters.

Beam

Beam Type*
Either Gaussian or TopHat. If it is Gaussian, you must specify FWHM for the beam.

Full Width at Half Maximum*

吸収線量の計算法

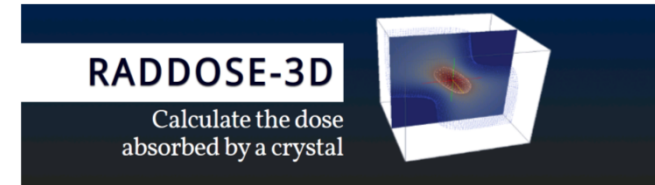


Raddose 3D

<http://www.raddo.se/>

入力項目	内容
Email	計算によってはそれなりに時間が必要
Job Title	計算終了時にお知らせしてくれる
Crystal Type	結晶の形: 通常はcuboid
Crystal Dimensions	結晶の縦/横/高さ(cuboidの場合)
Pixels per micron	計算mesh(値が大きいほど細かい) ビームサイズの1/10の逆数が目安 (50 μ mのビームなら、50/10=5の逆数で0.2)
Absorption coefficient	AverageまたはRaddose Averageで十分だが、Raddoseだと複雑な設定が出来る

吸収線量の計算法



Raddose 3D

<http://www.raddo.se/>

入力項目	内容
Beam Type	Gaussian または Top Hat PFはTop Hat (collimatorでビームをカットしている)
Flux	ビームラインの情報参照 https://www2.kek.jp/imss/sbrc/beamline/px/beamline-info/SBGbeamlinesE.pdf
Energy	波長から計算 ($12.4 = E(\text{keV}) \times \lambda(\text{\AA})$) https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/cnvcalc.htm
Rectangular Collimation	ビームサイズ
Wedge	Totalの回転角
Exposure Time	Totalのビーム照射時間

KEK構造生物学研究センター
 結晶構造解析用ビームラインの利用(PX)
<https://www2.kek.jp/imss/sbrc/beamline/px.html>
 「一覧と使用の比較」のリンクから

SBRC beamline list in the Photon Factory

updated on

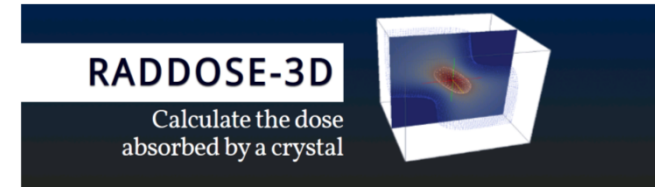
2015/11/12

Beamline	BL-1A	BL-5A	BL-17A	AR-NW12A	AR-NE3A
Starting year	2010	2004	2006	2003	2009
Status	Operational	Operational	Operational	Operational	Operational
Synchrotron Ring	PF 2.5GeV			PF-AR 6.5GeV	
Injection	Top-up			Twice a day (8:30,20:30)	
Light Source	Short-gap undulator	Multipole wiggler	Short-gap undulator	Undulator	Undulator
Wavelength available (Å)	0.96 - 1.1 2.7 - 3.3	0.75 - 1.9	0.9 - 2.1	0.75 - 1.9	0.75 - 1.9
Energy resolution (deltaE/E)	-	2.5×10^{-4}	2.5×10^{-4}	2.5×10^{-4}	2.5×10^{-4}
Typical beam size (H x V) (mm)	0.013 x 0.013	0.20 x 0.20	0.040 x 0.016	0.20 x 0.20	0.20 x 0.08
Photon flux (photons/sec)	0.9×10^{11} (@ 1.1 Å)	2×10^{11} (@ 1.0 Å)	3.1×10^{11} (@ 0.98 Å)	3.9×10^{11} (@ 1.0 Å)	1.2×10^{12} (@ 1.0 Å)
Detector	Eiger X4M	Quantum 315r	Pilatus3 S6M	Quantum 270	Pilatus 2M-F
Type	PAD	CCD	PAD	CCD	PAD
Active area (mm ²)	155.2 x 162.5	315 x 315	423.6 x 434.6	270 x 270	254 x 289
Pixel size (μm ²)	75 x 75	102 x 102*	172 x 172	64.8 x 64.8	172 x 172
Pixel number	2070 x 2167	3072 x 3072*	2463 x 2527	4168 x 4168	1475 x 1679
Frame data size (MByte)	2	19*	6.2	34	2.5
Readout time (sec.)	0.000003	0.25*	0.00203	1.1	0.003
Max. frame rate (Hz)	750	-	25	-	60
Detector distance (mm)	60 - 450	60 - 950	185 - 750	60 - 950	80 - 500
Detector vertical offset (mm)	-	0 - 150	-	0 - 120	0 - 150
Sample exchanger	PAM-HC	PAM			
Software for image processing	HKL2000, iMosflm, XDS				

* "binning" mode (default).

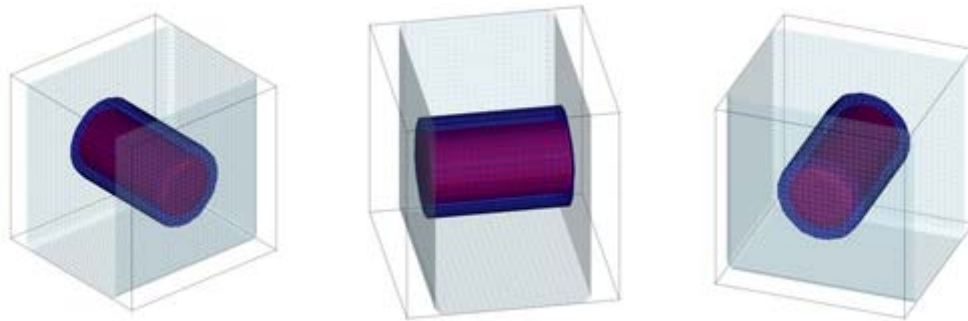
Photon Fluxなど、ビームライン依存の条件はこの表の値を使う

吸収線量・計算結果



Raddose 3D

<http://www.raddo.se/>

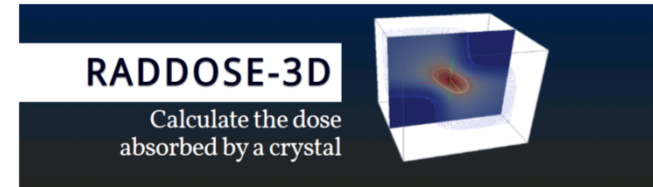


Dose isosurfaces drawn at
0.1 MGy, 20 MGy and 30 MGy.

NE3Aで、0.3 x 0.3 x 0.3 mmの結晶に
並進無し・減衰無しで波長1Åの光を
1度あたり10秒照射し、
180度のデータを収集
(total 1800秒照射)

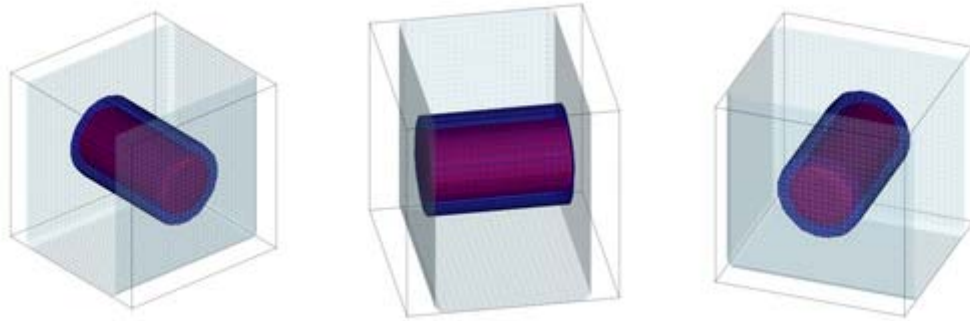
Average Dose (Whole Crystal):	10.47 MGy
Average Dose (Exposed Region):	14.96 MGy
Max Dose :	50.82 MGy
Dose Contrast (Max/Threshold Av.):	3.19
Used Volume:	70%

吸收線量・計算結果

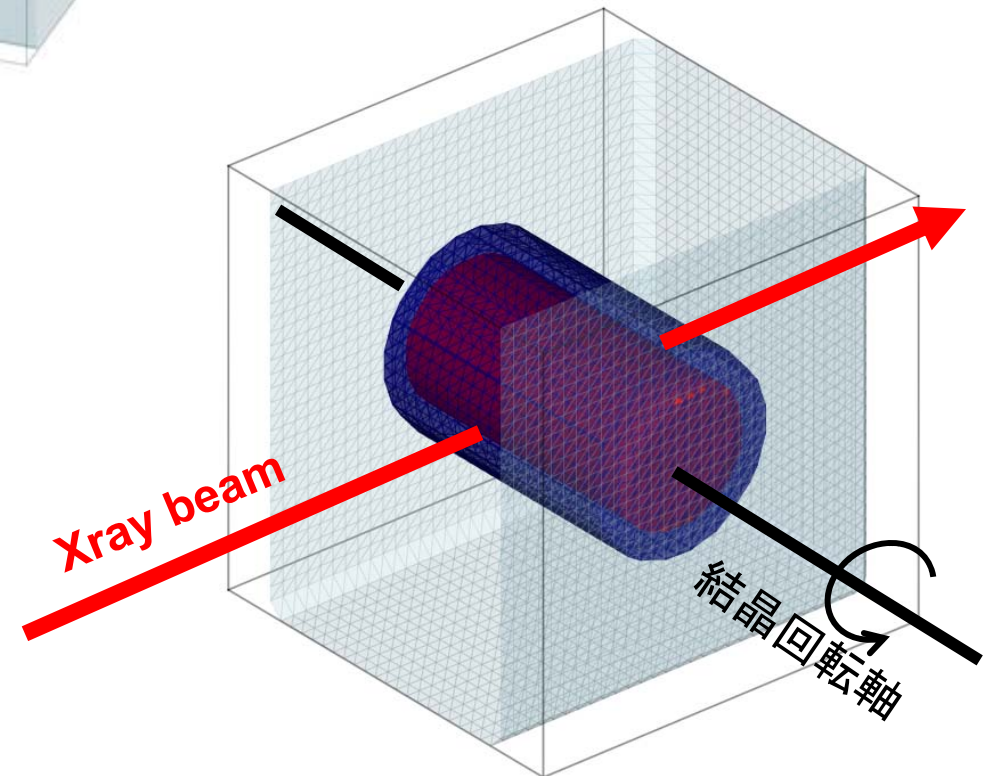


Raddose 3D

<http://www.raddo.se/>



Dose isosurfaces drawn at
0.1 MGy, 20 MGy and 30 MGy.



吸収線量 計算結果の活用

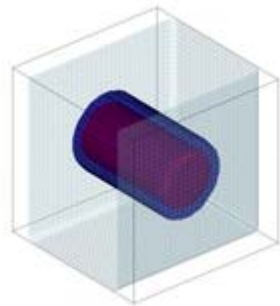


Raddose 3D

<http://www.raddo.se/>

結晶の損傷は吸収線量に依存するので、

- ・照射時間に比例
- ・強度(attenuatorの透過率)に比例

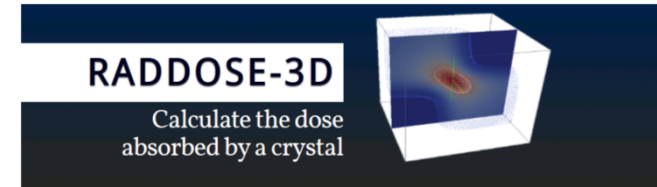


NE3Aで、0.3 x 0.3 x 0.3 mmの結晶に
並進無し・減衰無しで波長1Åの光を
1度あたり10秒照射し、180度のデータを収集
(total 1800秒照射)

Max Dose → 50.82 MGy

→ 1度あたり1秒なら、Max Dose 5.1 Mgy
(おおむね適切)

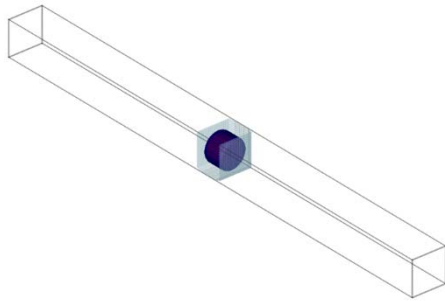
吸収線量 計算結果の活用



Raddose 3D

<http://www.raddo.se/>

- ・ビームに対して結晶が大きければ、照射位置を分散できる



BL1Aで、0.02 x 0.02 x 0.3 mmの結晶に、並進・減衰無しで波長1.1Å, 0.02 mm x 0.02 mmの光を1度あたり1秒照射し、180度のデータを収集

→ Max Dose 34.2 MGy

結晶は長さ300μmなので、幅20 μmの光の15倍の長さ

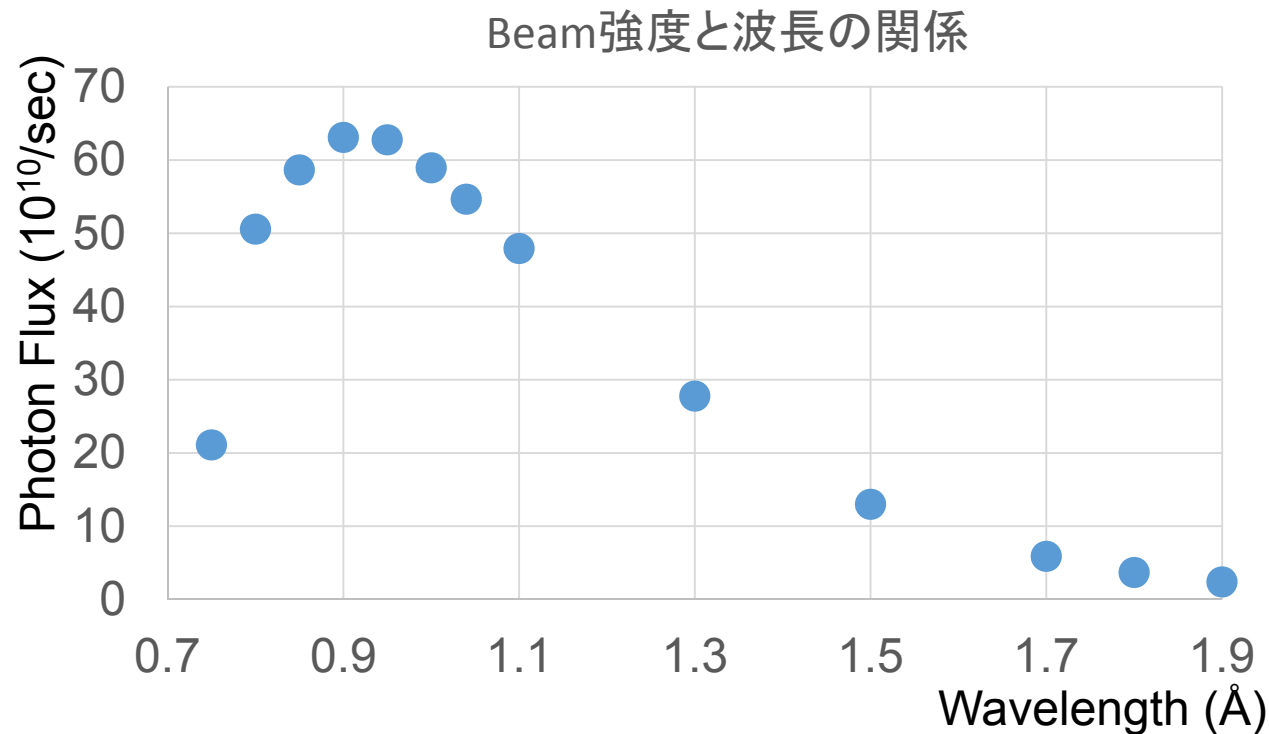
→ 結晶を並進すると、 $34.2 \div 15 = \text{約}2.3 \text{ MGy}$

→ もう少し耐えられそうなので、 $34.2 \div 15 \times 2 = \text{約}4.6 \text{ MGy}$

→ 並進しながら1度あたり2秒でデータ収集すると、4.6MGyになる

Dose計算において 波長変更は要注意

- ・同じPhoton Fluxでも、波長によって吸収率が異なる
- ・シンクロトロン輝度は、波長によって異なる



→ 波長を変更したら、Raddoseで再計算が必要

いわゆるDefault条件のDose

Beamline	Condition	Max Dose
BL-1A	1枚あたり: 0.2°, 0.2 sec (1° あたり1 sec) Total: 180° (900枚), 3 min Transparency 10%, Wavelength 1.1 Å	3.4 MGy
BL-5A	1枚あたり: 1°, 5 sec (1° あたり5 sec) Total: 180° (180枚), 15 min Wavelength 1 Å	1.7 MGy
BL-17A	1枚あたり: 0.2°, 0.2 sec (1° あたり1 sec) Total: 180° (900枚), 3 min Transparency 10%, Wavelength 0.98 Å	3.5 MGy
AR-NW12A	1枚あたり: 1°, 2 sec (1° あたり2 sec) Total: 180° (180枚), 6 min Wavelength 1 Å	1.4MGy
AR-NE3A	1枚あたり: 0.2°, 0.2 sec (1° あたり1 sec) Total: 180° (900枚), 3 min Wavelength 1 Å	5.3 MGy

Beamsizeは<https://www2.kek.jp/imss/sbrc/beamline/px/beamline-info/SBGbeamlinesE.pdf>の
Typical beam sizeの値で計算

どのぐらいのDoseが適切か？

- ・ 2倍のDoseで損傷は2倍になる
 - ・ 2倍のDoseで $\| \sigma(l) \|$ は $\sqrt{2}$ 倍にしかない
- 限度を超えて強くX線を照射するのは損？

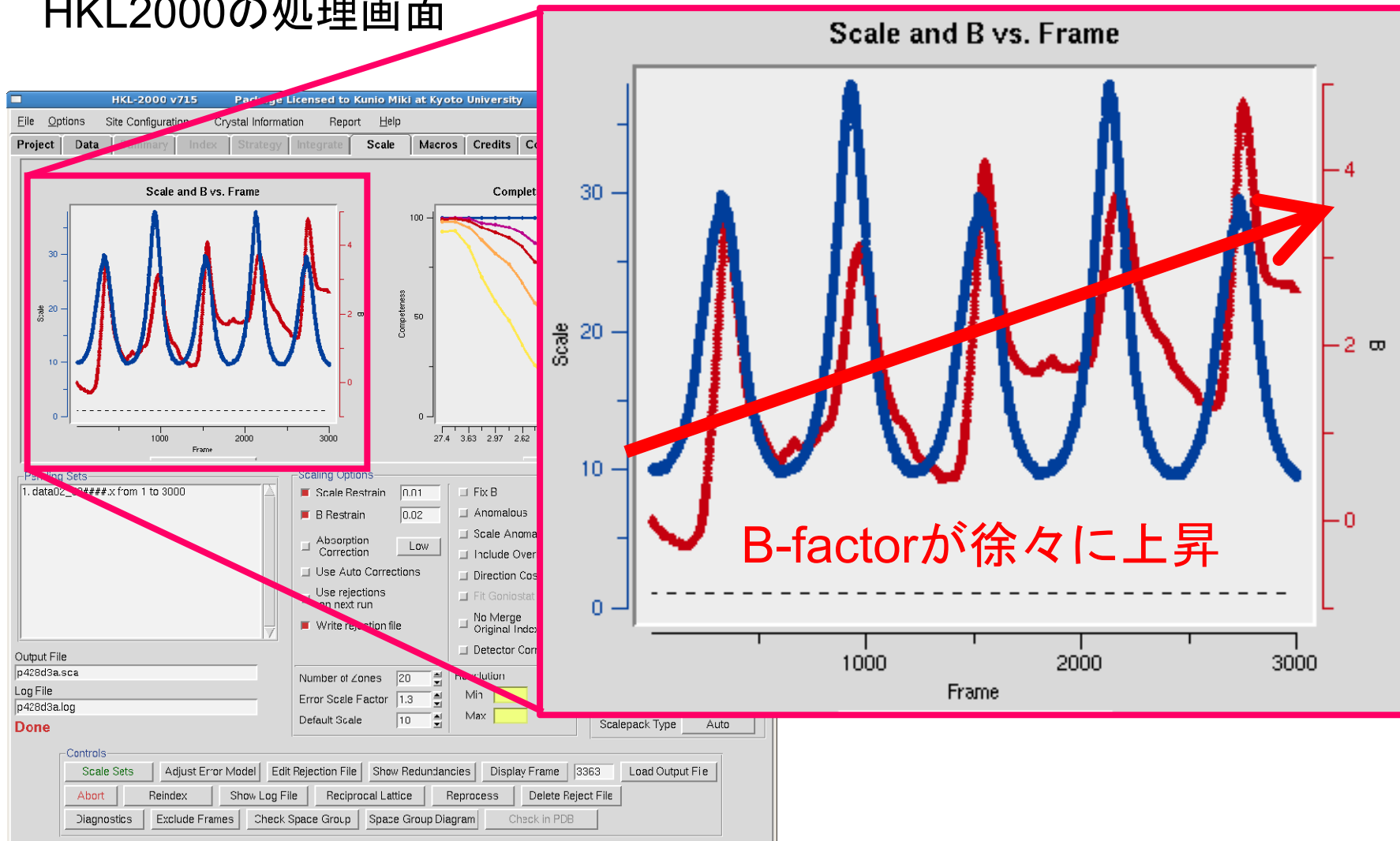
● 実験目的に応じた照射量が必要

- ・ 炭素・窒素・酸素の大まかな位置を知りたい
 - ・ ドメイン間の位置関係を知りたい
- 少々の損傷は許容？

- ・ 高分解能で精細な分子構造を知りたい
 - ・ 酸化還元に影響されやすい置換基等
- 損傷の影響は大きい可能性

Relative B による損傷の見積もり

HKL2000の処理画面



Relative B による損傷の見積もり

HKL2000のIntensity補正式

$$I_{\text{補正後}} = \frac{\exp\left\{2B \left(\frac{1}{d}\right)^2\right\}}{\text{scale}} \times I_{\text{補正前}}$$

scale: scale因子, *B*: B-factor, *d*: 分解能

この式から、*B* factorと損傷の関係を見積もる

*scale*因子一定と仮定すると、反射強度は基準(補正後)と比べて

$$\exp\left\{-2B \left(\frac{1}{d}\right)^2\right\} \text{ 減衰している}$$

Relative B による損傷の見積もり

B-Factor	Resolution												
	10.0A	7.0A	4.5A	4.0A	3.8A	3.6A	3.5A	3.4A	3.3A	3.2A	3.1A	3.0A	2.9A
1	0.995	0.990	0.976	0.969	0.966	0.962	0.960	0.958	0.955	0.952	0.949	0.946	0.942
2	0.990	0.980	0.952	0.939	0.933	0.926	0.922	0.917	0.912	0.907	0.901	0.895	0.888
3	0.985	0.970	0.929	0.911	0.901	0.891	0.885	0.878	0.871	0.864	0.855	0.846	0.837
4	0.980	0.960	0.906	0.882	0.871	0.857	0.849	0.841	0.832	0.823	0.812	0.801	0.788
5	0.975	0.950	0.884	0.855	0.841	0.825	0.815	0.806	0.795	0.783	0.771	0.757	0.743
6	0.970	0.941	0.862	0.829	0.812	0.793	0.783	0.771	0.759	0.746	0.732	0.717	0.700
7	0.966	0.931	0.841	0.804	0.785	0.763	0.751	0.739	0.725	0.710	0.695	0.678	0.660
8	0.961	0.922	0.821	0.779	0.758	0.734	0.721	0.707	0.693	0.677	0.660	0.641	0.621
9	0.956	0.912	0.801	0.755	0.732	0.707	0.693	0.678	0.662	0.644	0.626	0.607	0.586
10	0.951	0.903	0.781	0.732	0.707	0.680	0.665	0.649	0.632	0.614	0.594	0.574	0.552
12	0.942	0.885	0.744	0.687	0.660	0.629	0.613	0.595	0.576	0.557	0.536	0.513	0.490
14	0.932	0.867	0.708	0.646	0.616	0.583	0.565	0.546	0.526	0.505	0.483	0.459	0.435
16	0.923	0.849	0.674	0.607	0.575	0.539	0.520	0.501	0.480	0.458	0.435	0.411	0.386
18	0.914	0.832	0.641	0.570	0.536	0.499	0.480	0.459	0.438	0.415	0.392	0.368	0.343
20	0.905	0.815	0.610	0.535	0.500	0.462	0.442	0.421	0.399	0.377	0.353	0.329	0.305
24	0.887	0.783	0.553	0.472	0.436	0.396	0.375	0.354	0.332	0.310	0.287	0.264	0.240

分解能・B factorに対する $\exp\left\{-2B\left(\frac{1}{d}\right)^2\right\}$ の値 (減衰の度合い)

Relative B による損傷の見積もり

Relative

B

分解能

	2.8A	2.7A	2.6A	2.5A	2.4A	2.3A	2.2A	2.1A	2.0A	1.9A	1.8A	1.7A	1.6A
0.25	0.984	0.983	0.982	0.980	0.979	0.977	0.975	0.972	0.969	0.966	0.962	0.958	0.952
0.50	0.969	0.966	0.964	0.961	0.958	0.954	0.950	0.945	0.939	0.933	0.926	0.917	0.907
0.75	0.953	0.950	0.946	0.942	0.937	0.932	0.925	0.918	0.911	0.901	0.891	0.878	0.864
1.0	0.938	0.934	0.929	0.923	0.917	0.910	0.902	0.893	0.882	0.871	0.857	0.841	0.823
1.5	0.909	0.902	0.895	0.887	0.878	0.868	0.856	0.844	0.829	0.812	0.793	0.771	0.746
2.0	0.880	0.872	0.862	0.852	0.841	0.828	0.813	0.797	0.779	0.758	0.734	0.707	0.677
2.5	0.853	0.842	0.831	0.819	0.805	0.790	0.772	0.753	0.732	0.707	0.680	0.649	0.614
3.0	0.826	0.814	0.801	0.787	0.771	0.753	0.734	0.712	0.687	0.660	0.629	0.595	0.557
3.5	0.800	0.787	0.772	0.756	0.738	0.718	0.697	0.672	0.646	0.616	0.583	0.546	0.505
4	0.775	0.760	0.744	0.726	0.707	0.685	0.662	0.635	0.607	0.575	0.539	0.501	0.458
5	0.727	0.710	0.691	0.670	0.648	0.623	0.597	0.567	0.535	0.500	0.462	0.421	0.377
6	0.682	0.663	0.642	0.619	0.594	0.567	0.538	0.506	0.472	0.436	0.396	0.354	0.310
7	0.640	0.619	0.596	0.571	0.545	0.516	0.485	0.452	0.417	0.379	0.340	0.298	0.255
8	0.600	0.578	0.553	0.527	0.499	0.469	0.438	0.404	0.368	0.330	0.291	0.251	0.210
10	0.528	0.504	0.477	0.449	0.420	0.389	0.356	0.322	0.287	0.250	0.214	0.177	0.142

Relative B による損傷の見積もり

Relative

B

分解能

	1.55A	1.50A	1.45A	1.40A	1.35A	1.30A	1.25A	1.20A	1.15A	1.10A	1.05A	1.00A	0.95A
0.05	0.990	0.989	0.988	0.987	0.986	0.985	0.984	0.983	0.981	0.980	0.978	0.975	0.973
0.10	0.979	0.978	0.976	0.975	0.973	0.971	0.969	0.966	0.963	0.960	0.956	0.951	0.946
0.20	0.959	0.957	0.954	0.950	0.947	0.943	0.938	0.933	0.927	0.921	0.913	0.905	0.895
0.3	0.939	0.936	0.931	0.926	0.921	0.915	0.908	0.901	0.893	0.883	0.873	0.861	0.847
0.4	0.920	0.915	0.909	0.903	0.896	0.888	0.880	0.870	0.860	0.848	0.834	0.819	0.801
0.5	0.901	0.895	0.888	0.880	0.872	0.862	0.852	0.841	0.828	0.813	0.797	0.779	0.758
0.6	0.883	0.875	0.867	0.858	0.848	0.837	0.825	0.812	0.797	0.780	0.762	0.741	0.717
0.7	0.864	0.856	0.847	0.836	0.825	0.813	0.799	0.784	0.767	0.749	0.728	0.705	0.679
0.8	0.847	0.837	0.827	0.815	0.803	0.789	0.774	0.757	0.739	0.719	0.696	0.670	0.642
0.9	0.829	0.819	0.807	0.795	0.781	0.766	0.750	0.732	0.712	0.689	0.665	0.638	0.607
1	0.812	0.801	0.788	0.775	0.760	0.744	0.726	0.707	0.685	0.662	0.635	0.607	0.575
1.2	0.779	0.766	0.752	0.736	0.719	0.701	0.681	0.659	0.635	0.609	0.580	0.549	0.514
1.4	0.747	0.733	0.717	0.700	0.681	0.661	0.639	0.615	0.589	0.561	0.530	0.497	0.460
1.6	0.717	0.701	0.684	0.665	0.645	0.623	0.599	0.574	0.546	0.516	0.484	0.449	0.412
1.8	0.688	0.670	0.652	0.632	0.610	0.587	0.562	0.535	0.506	0.475	0.442	0.407	0.369
2	0.660	0.641	0.621	0.600	0.578	0.553	0.527	0.499	0.469	0.438	0.404	0.368	0.330
2.2	0.633	0.613	0.593	0.571	0.547	0.522	0.495	0.466	0.435	0.403	0.369	0.333	0.296
2.5	0.594	0.574	0.552	0.528	0.504	0.477	0.449	0.420	0.389	0.356	0.322	0.287	0.250
3	0.536	0.513	0.490	0.465	0.439	0.412	0.383	0.353	0.322	0.289	0.257	0.223	0.190

高分解能では小さなRelative Bでも大きく影響する

XDSで処理した場合の relative B factor

XDSで積分した後、Pointless -> AimlessでScalingする
AimlessのIntensity補正式

$$I_{\text{補正前}} = C h l \times S h l \times \exp \left\{ 2B \left(\frac{1}{d} \right)^2 \right\} \times I_{\text{補正後}}$$

Chl: scale因子, *Shl*: 非等方性の補正に関わる因子, *B*: B-factor, *d*: 分解能

HKL2000のIntensity補正式

$$I_{\text{補正後}} = \frac{\exp \left\{ 2B \left(\frac{1}{d} \right)^2 \right\}}{\text{scale}} \times I_{\text{補正前}} \quad \begin{array}{l} \text{scale: scale因子,} \\ B: \text{B-factor, } d: \text{分解能} \end{array}$$

B factorの式は同じ形だが、Aimlessでは補正後の $\|$ に対する補正項なので
損傷を受けると B は負の値になる。

X線による結晶の損傷

データの取得効率を高めるために

データの効率的な収集法について

●ビームラインに入る前の計画が重要

データ収集が早くなり、自動処理も可能になった今

ビームラインで考え込むようでは効率的な実験とは言えない

悩んでいる間に、ビームラインによっては3分でデータが撮れてしまう。

→ ビームラインで悩まないよう、**予め計画を立てておく**ことが必要

●結晶交換ロボットの利用

数十秒で結晶交換からループセンタリングまで完了する。

マニュアル交換ではなかなかここまで効率化できない

●自動処理(Premo)の活用

撮ったデータの統計値を自動で見積もってくれる

データ収集の下準備・条件設定

●結晶のセンタリング

手作業の入る余地が大きい

ループのセンタリングは自動で可能

ループ内の結晶が見えるかが、効率に大きく寄与する

●露光時間・ビームの減衰率

Total Doseを決めれば簡単な計算で求められる。

予め標準的な条件の計算をしておき、それを基に比例計算

データ収集の下準備・条件設定

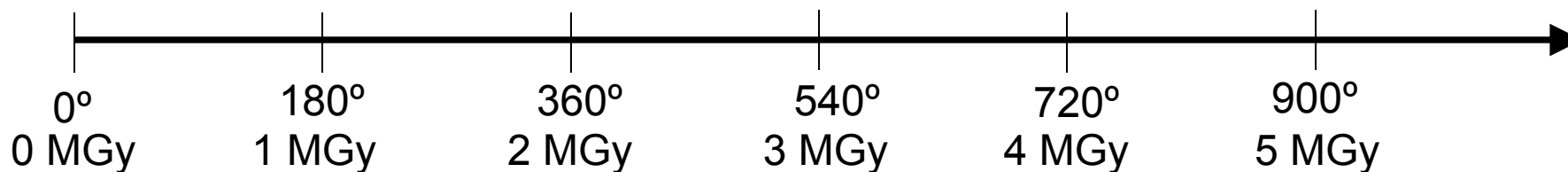
●1枚あたりの振動角

Pilatus/Eigerの場合、shutterless撮影を行えば

1枚あたり振動角を小さくしても、totalの読み取り時間は伸びない。

●どの程度のDoseなら許容されるか

1°あたりの露光量を下げ、redundancyを稼ぐ



どこまでのデータなら使えるか?

低露光データの重ね合わせ (天体写真の場合)



1枚撮り



37枚重ね合わせ処理

撮影者HUQさん, 名古屋近郊(名古屋駅まで約12km)のマンションベランダより

- ➔ 重ね合わせにより、明らかにきれいな写真になる。
回折データ収集でも、薄焼きのmergeは有効???

Redundancy向上の効果

Data	Dataset 1	Merge 1-3	Merge 1-6	Merge 1-10
Dose/position (MGy)	0.3	0.9	1.8	3.0
Resolution (Å)	50-1.03	50-0.99	50-0.96	50-0.94
(Outer Shell (Å))	1.06-1.03	1.02-0.99	0.98-0.96	0.96-0.94
Redundancy	6.5	19.6	39.2	65.4
$I/\sigma(I)$	13.69 (1.91)	21.94 (2.13)	29.07 (2.16)	33.77 (2.00)
R_{sym} (%)	5.5 (83.7)	5.9 (131.5)	6.1 (176.5)	6.6 (244.8)
R_{meas} (%)	6.0 (90.7)	6.0 (135.0)	6.1 (178.8)	6.7 (246.7)
CC(1/2)	99.9(77.1)	100.0(82.8)	100.0(85.7)	100.0(81.8)

Data取得条件 細長い結晶を用いて、並進しながらデータを取得
1結晶から同じ条件で10回測定
ただし開始角は、18°ずつ移動させる。

データの効率的な収集法について

- ビームラインに入る前の下準備・実験計画は重要
- 結晶交換ロボットの利用
- 人が介在しなくてもデータ収集条件が決まるなら
 - 全自動測定が極めて有効

まとめ

●結晶の損傷について

- ビームの強さと集光度に依存
- Raddose 3Dの利用が便利
- 吸収線量の目安は 数MGy程度
実際の値は結晶や実験目的による

●効率的なデータ収集

- 事前の実験計画・下準備が極めて重要
- 結晶交換ロボットの利用
- データ収集条件を完全に事前設定できるなら、
全自動測定も有効