

物理實作課程-顯微鏡

一、實驗目的：

- (1) 了解透鏡的成像
- (2) 了解科勒照明如何為顯微鏡提供均勻照明
- (3) 了解物鏡的基本規格(放大率等)
- (4) 了解無限遠光學系統及有限光學系統的差別
- (5) 了解顯微鏡是如何放大物體的影像
- (6) 學習搭建一個以 CCD 作為擷取影像感測器的顯微鏡系統
- (7) 學習調整、優化已搭建的顯微鏡系統的光路
- (8) 觀察顯微鏡解析度的極限

二、相關知識：

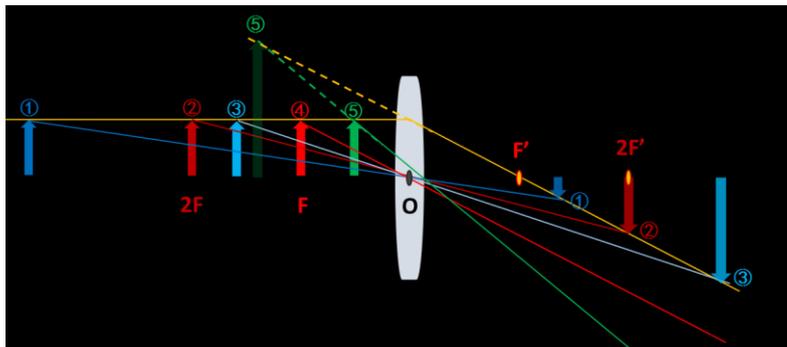
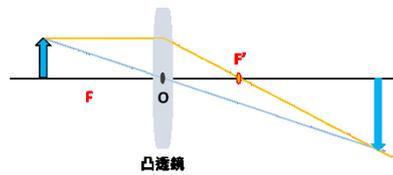
1. 透鏡成像

✓ 依循規則：

- (1) 凸透鏡-中央厚、邊緣薄的透鏡，對光線有匯聚作用。
- (2) 光心(O)-透鏡的中心，通過此點的光線，其方向不改變。
- (3) 焦點(F)-與主軸平行之光線入射於透鏡後，折射聚集在主軸上的點。
通過焦點的光折射後平行主軸。
- (4) 焦距-焦點到光心的距離。

✓ 凸透鏡的成像：

光線經過透鏡折射後偏折，而產生物體的像，而此像的性質（虛像或實像，正立或倒立，放大或縮小）及位置會隨物體與透鏡的距離而不同，如<圖一>所示，物體由遠靠近焦點 F 時，像會逐漸遠離凸透鏡另一邊的焦點 F'，且越來越大，為倒立實像(①~③)；物體在焦點 F 上時，像在無窮遠處，因此無法成像(④)，相對若將物體放至無窮遠處，像會成在焦點上；物體由焦點 F 靠近凸透鏡時，像會出現在與物體同側的一邊，並逐漸靠近凸透鏡，且越來越小(但不小於物體)，為正立虛像(⑤)。

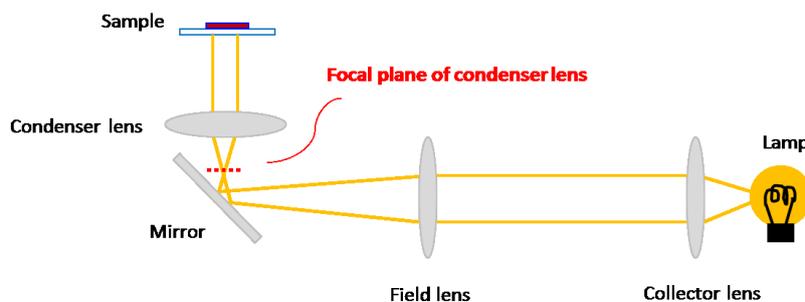


<圖一>

2. 顯微鏡光源的光路設計

✓ 科勒照明(Köhler illumination) :

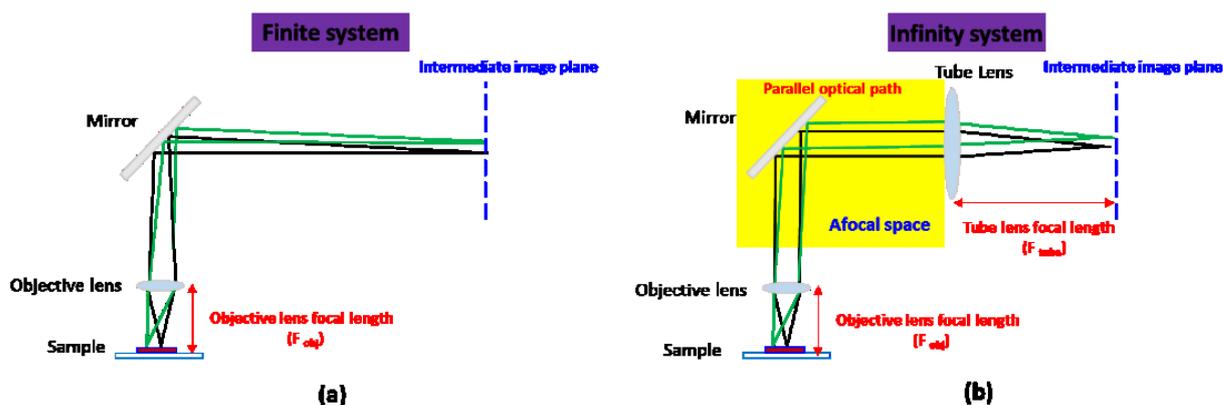
是一種用於穿透和反射式光學顯微鏡系統的照明方式，此照明設計目的是產生均勻的照明，並保證照明光源的影像（例如鹵素燈燈絲）在結果影像中不顯現，以達正確量測，是現代光學顯微鏡鏡照明的主要技術，光路如<圖二>所示。集光透鏡(Collector lens)收集光源發出的光線，再經過場透鏡(Field lens)，光線最後聚焦在聚焦透鏡(Condenser lens)的焦平面(Focal plane)上，因而產生平行束光，均勻照射樣品。



<圖二>

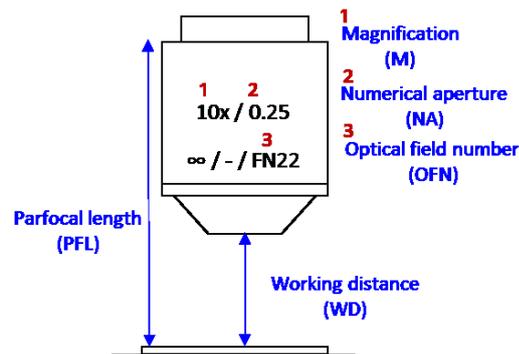
3. 有限與無限遠光學系統

以光學元件配置來說，無限遠光學系統<圖三(b)>所示相較有限光學系統<圖三(a)>，除了物鏡是使用遠場補正物鏡(Infinity corrected objective)，光路中還多了一個筒鏡(Tube lens)；以應用來說，有限光學系統僅依靠一般物鏡來作影像之放大及呈像，而物到影像成像之距離為固定距離。而無限遠光學系統中，光被遠場補正物鏡轉換成平行光束後，再經由筒鏡將影像聚焦成像，這使無限遠光學系統相較有限光學系統有更大的彈性空間，因為遠場補正物鏡和筒鏡之間的平行光區域，可插入額外的光學元件(例如濾光片或分光鏡)，這並不會引起焦點的改變，也不會發生像差或倍率的變化，利於使用者增加研究所需之配件，此區域稱為「第一次成像空間」(Afocal space)，如<圖三(b)>中黃色區域所示。



<圖三>

4. 物鏡基本規格



<圖四>

✓ 放大倍率(Magnification, M) :

指像的大小對應樣品實際大小的長度比值。例：放大倍數為 10x，指的是實際長度是 $1\mu\text{m}$ 的樣品，經物鏡放大後，所成的像長度是 $10\mu\text{m}$ 。定義為 $M = F_{\text{tube}} / F_{\text{obj}}$ (放大倍率=筒鏡焦距/物鏡焦距)，可參考<圖三(b)>，因此顯微鏡的放大倍率為導出值，根據筒鏡及物鏡焦距計算而得。但每間顯微鏡廠商可能會採用不同的筒鏡焦距，如<表一>，因此若要搭配使用不同廠商的物鏡及筒鏡時，需要計算實際放大率(物鏡焦距 F_{obj} 需由該廠商提供的筒鏡焦距除以該物鏡的放大率的得知)。

例:有一顯微鏡系統為 NIKON 製造，將其物鏡換為標示 20 倍放大率的 Olympus 物鏡，那實際放大率為 $=200 / (180 / 20) = 22.222$ ，約為 22 倍放大率。

Manufacturer	Tube Lens Focal Length (mm)
Leica	200
Nikon	200
Olympus	180
Zeiss	165

<表一>

✓ 數值口徑(Numerical aperture, NA) :

用來衡量物鏡的錐形收光範圍，而物鏡的光學解析度是由它及照明光線的波長(λ)所決定，定義為 $0.61\lambda / \text{NA}$ 。

✓ 工作距離(Working distance, WD) :

指物體成像時，物鏡的前端透鏡到樣品表面的距離。而物鏡的工作距離與物鏡的焦距有關，物鏡的焦距越長，放大倍率越低，其工作距離越長。

三、實驗使用之器材與軟體:

- 柱
- 柱的支架
- 底座
- 鏡子
- 分光鏡
- Mightex CCD 及可調透鏡
- mini-A USB 線 <連接 CCD 與電腦>
- LED 燈座及可調透鏡
- LED 燈之 5V 電源供應器
- 10 倍物鏡
- 三軸調整樣品台
- 樣品: 1) TEM grid on fluorescent plate 2) 晶片樣品
- 軟體: 1) U-OM 2) ImageJ

四、實作注意事項:

不碰觸任何光學物件的表面 (鏡子, 透鏡, 分光鏡, 物鏡)

五、實作步驟:

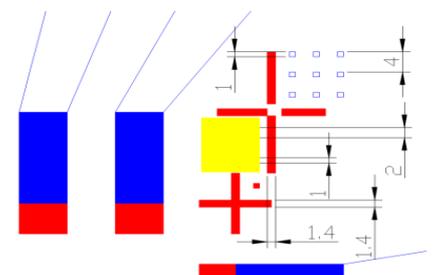
- (一) 繪製顯微鏡系統光路圖，並標註系統各個元件之名稱。
- (二) 打開 U-OM 軟體，並確認其可以正確的顯示 CCD 影像。過程中可藉由調整積分時間(Integration time)及強度(Gain)值來得到適當亮度及對比度之影像圖。接著，將 Mightex CCD 及可調透鏡一同拆下，架設於另一高支架上，在不通過顯微系統下，利用其來獲取房間中某個物體的聚焦影像。再觀察可調透鏡的位置要如何改變才可以成功地聚焦在近或遠的物體上? 最後，如何藉由移動可調透鏡位置，使 Mightex CCD 處在可調透鏡的焦點上?調整之。
- (三) 將 Mightex CCD 及可調透鏡(透鏡位置不再更動，為甚麼?)，一併安裝回原本的顯微鏡系統中。將網格樣品放上樣品台，調整系統中之鏡子、分光鏡、CCD 的角度及高度，以獲得物鏡底下的網格樣品影像(用 U-OM 擷取影像)。試著思考，以光路來說，哪項或哪些元件會相對影響較大? (10 倍物鏡之工作距離為 10.6mm)
- (四) 試著調整系統中的組件以使得 Mightex CCD 能擷取到放大的影像，將照明光源調至明亮且均勻的狀態(藉由 U-OM 擷取的影像做判斷)。另外，想一想，移動哪項或哪些元件不會影響系統的收光光路? 系統調整至最佳化後，請在電腦上存下網格樣品影像。

(五) 把網格樣品換成晶片樣品。在影像中找到 4 乘 4 點陣(如問題 7 附圖中的黃色區域)，聚焦和調整 U-OM 參數後在電腦上存下最佳的晶片樣品影像圖。

(六) 調整 Mightex CCD 前的可調透鏡位置(第三步說不再做調整的透鏡)。觀察可調透鏡位置如何影響 Mightex CCD 影像?

六、問題討論:

1. 在實作的第二步驟中，我們要如何知道 Mightex CCD 的位置已在，或靠近透鏡的焦點?
2. 改變分光鏡的角度和位置會如何影響 Mightex CCD 的校準?為甚麼?
3. 如果改變了 Mightex CCD 前的可調透鏡的位置，會對 CCD 的視野大小帶來什麼影響?(參考實作第六步驟)
4. 使用 ImageJ 軟體來判斷實作第四步驟所擷取之網格樣品影像的大小，來決定 CCD 影像視野大小。(網格實際間隔距離約為 $130\ \mu\text{m}$)
5. 請計算用 Olympus 10 倍物鏡所觀測的視野大小，Olympus 的無限遠光學系統之筒鏡焦距為 180mm。(CCD 感測元件大小為 $4.8\ \text{mm} \times 3.6\ \text{mm}$)。
6. 比較量測的視野大小(問題 4)及計算出來的視野大小(問題 5)差別，並解釋之。
7. 使用的 Olympus 10 倍物鏡之預期解析度是多大? 判斷實作第五步驟所取得的 4 乘 4 點陣圖，是否有符合此預期解析度?請解釋。(點陣圖的大小和距離已經在右圖中標記(μm))。



七、相關資料

1.透鏡的成像

http://www.phyworld.idv.tw/Nature/Jun_2/htm/B3_4-3_POINT.html

2.顯微鏡光源的光路設計

<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/kohler.html>

<https://sites.google.com/site/experimentalloptics/investigations/light-microscope>

<https://www.olympus-ims.com/zh/insight/making-the-most-of-kohler-illumination/>

3.有限與無限遠光學系統

<https://www.tiri.narl.org.tw/Files/Doc/Publication/InstTdy/120/01200060.pdf>

4.物鏡的基本介紹

<http://web.nchu.edu.tw/~rootdis/plant%20pathology/97Session/002-970926/ch4microsco>

pe.pdf

<http://www.pantsiao.com/wiki/%E6%98%BE%E5%BE%AE%E7%89%A9%E9%95%9C%EF%BC%88microscope-objective%EF%BC%89/>

5.Image J 使用方式

<http://ukko.life.nctu.edu.tw/~u0317033/final/Final.html>