

國立成功大學
機械工程學系

NSAP 暑期訓練

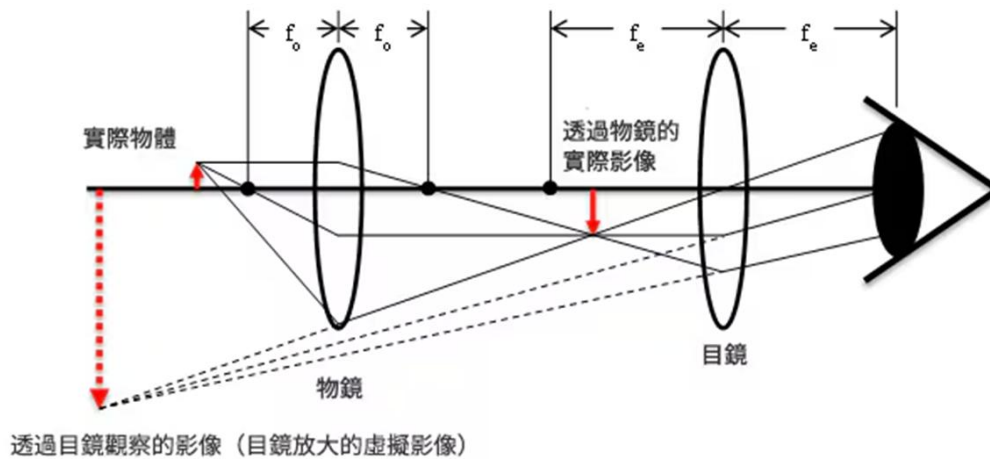
光學顯微鏡工作原理及操作介紹

編寫：胡定墉

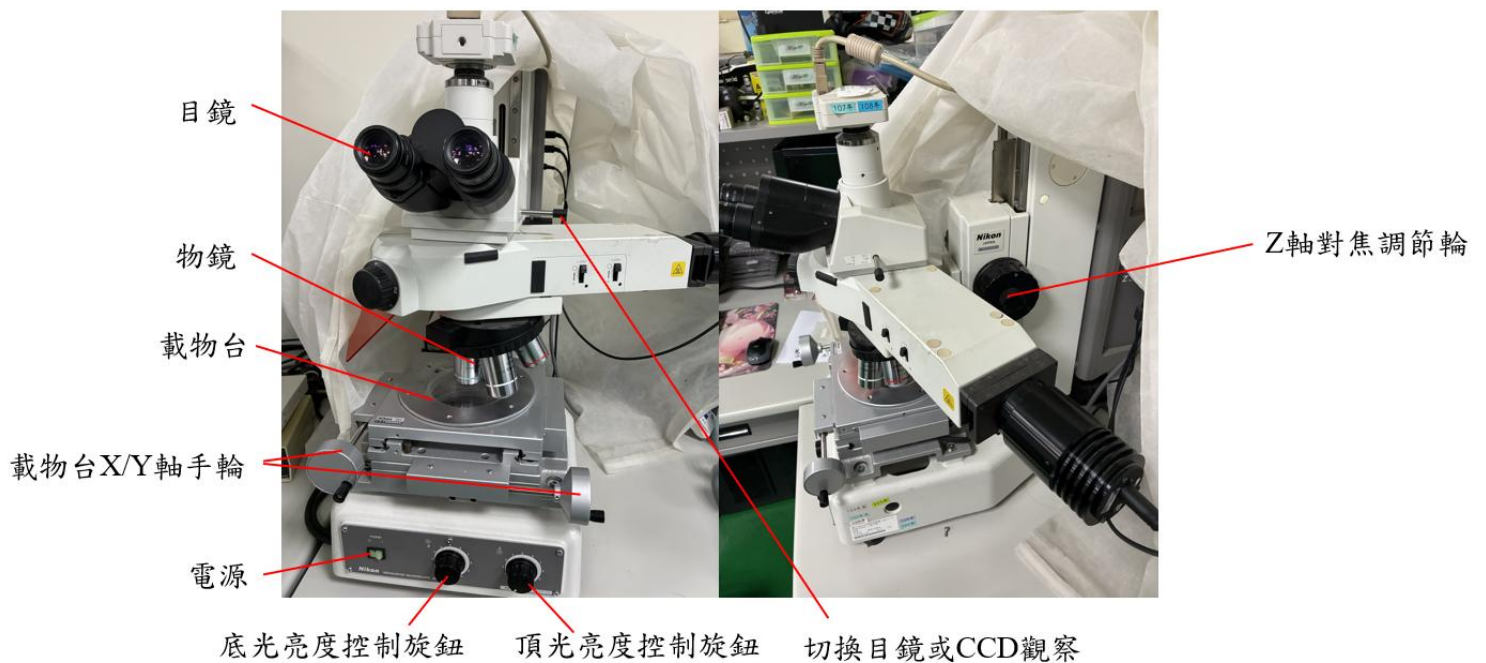
指導教授：李永春教授

中華民國 115 年 7 月 30 日

顯微鏡的基本結構和原理



設備簡介：

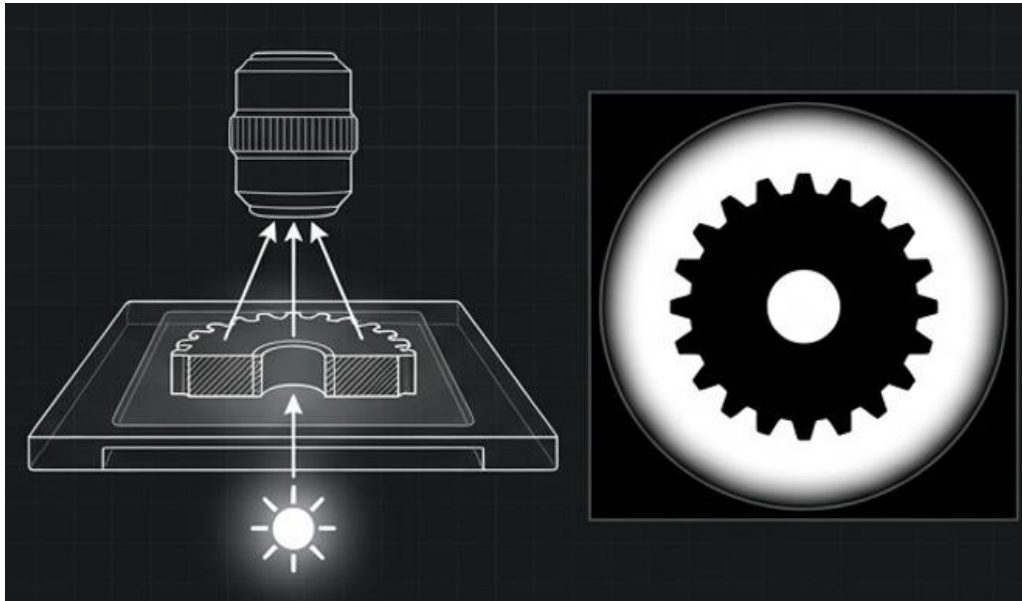


光源應用介紹：

- Dia 透射照明(底光)

原理：光源由下往上穿透

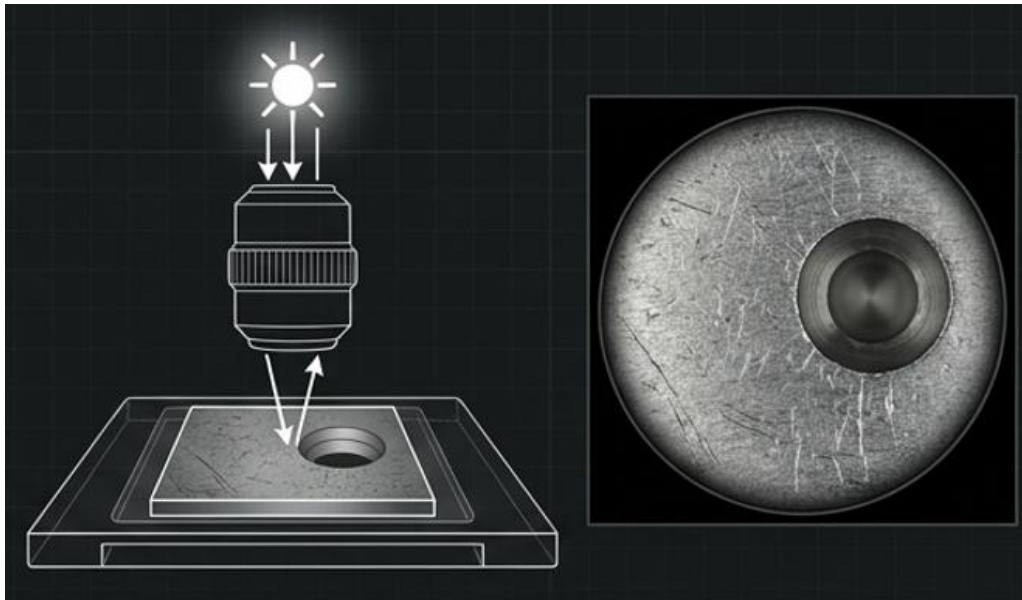
應用：測量工件的邊緣輪廓



- Epi 反射照明(同軸頂光)

原理：光源由上往下反射

應用：觀察不透明工件的表面紋理與盲孔細節



物鏡介紹：



圖 1 左：外觀與標示 (Exterior & Markings)

Nosepiece Threads (物鏡轉盤螺紋)：

用於鎖緊固定於顯微鏡物鏡轉換器上的螺紋部位。

Manufacturer (製造商)：

圖中標示為 OLYMPUS。

Barrel (鏡筒外殼)：

物鏡的金屬外殼主體。

Objective Specifications (物鏡規格標示)：

印於鏡筒上的光學參數 (如 UPlanApo/IR 代表平場複消色差/近紅外校正、60x/1.20w 代表 60 倍/數值孔徑 1.20 水浸鏡、 $\infty/0.18-0.21$ 代表無限遠遠程校正與適用蓋玻片厚度範圍)。

Correction Collar (校正環 / 補償環)：

可手動旋轉調節，用以補償因蓋玻片厚度不均或溫度變化產生的球焦點像差。

Magnification Color Code (放大倍率色環)：

用於快速識別放大倍率的標準顏色環 (例如藍色代表 60x)。

Immersion Color Code (介質/浸液色環)：

用於區分介質類型的色環 (例如水浸、油浸等)。

Cover Glass Thickness (蓋玻片厚度刻度)：

配合校正環使用的蓋玻片厚度對應刻度 (單位為 mm，圖中為 0.11 至 0.23)。

Objective Front Lens (物鏡前鏡片)：

位於物鏡最前端、最貼近觀察樣品的透鏡。

圖 1 右：內部剖面結構 (Internal Structure)

Objective Rear Aperture (物鏡後孔徑 / 後開口)：
位於物鏡頂部的光線進出開口。

Lens Mount (透鏡固定座)：
內部用於精準固定各透鏡單元的金屬座結構。

Triplet Lens Group (三合透鏡組)：
由三片不同折射率透鏡黏合而成的複合鏡片組，主要用於高度校正色差與像差。

Meniscus Lens (彎月形透鏡)：
一側呈凹面、另一側呈凸面的特殊透鏡。

Hemispherical Lens Element (半球形透鏡元件)：
位於物鏡最前端內側的半球狀精密透鏡。



常見的光學術語：

MTF(Modulation Transfer Function):

1. 是衡量光學成像系統「成像品質」的指標。
2. 調制制度 (Modulation, M)(對比度 Contrast)(縱軸):

$$M = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}}$$

I : 光強度

3. 空間頻率 (Spatial Frequency, f)(橫軸):

在 1 mm 中有多少個線對(line pair)(一黑一白算一個線對)

- MTF 的測量方式

靶標法 (Test Target Method)

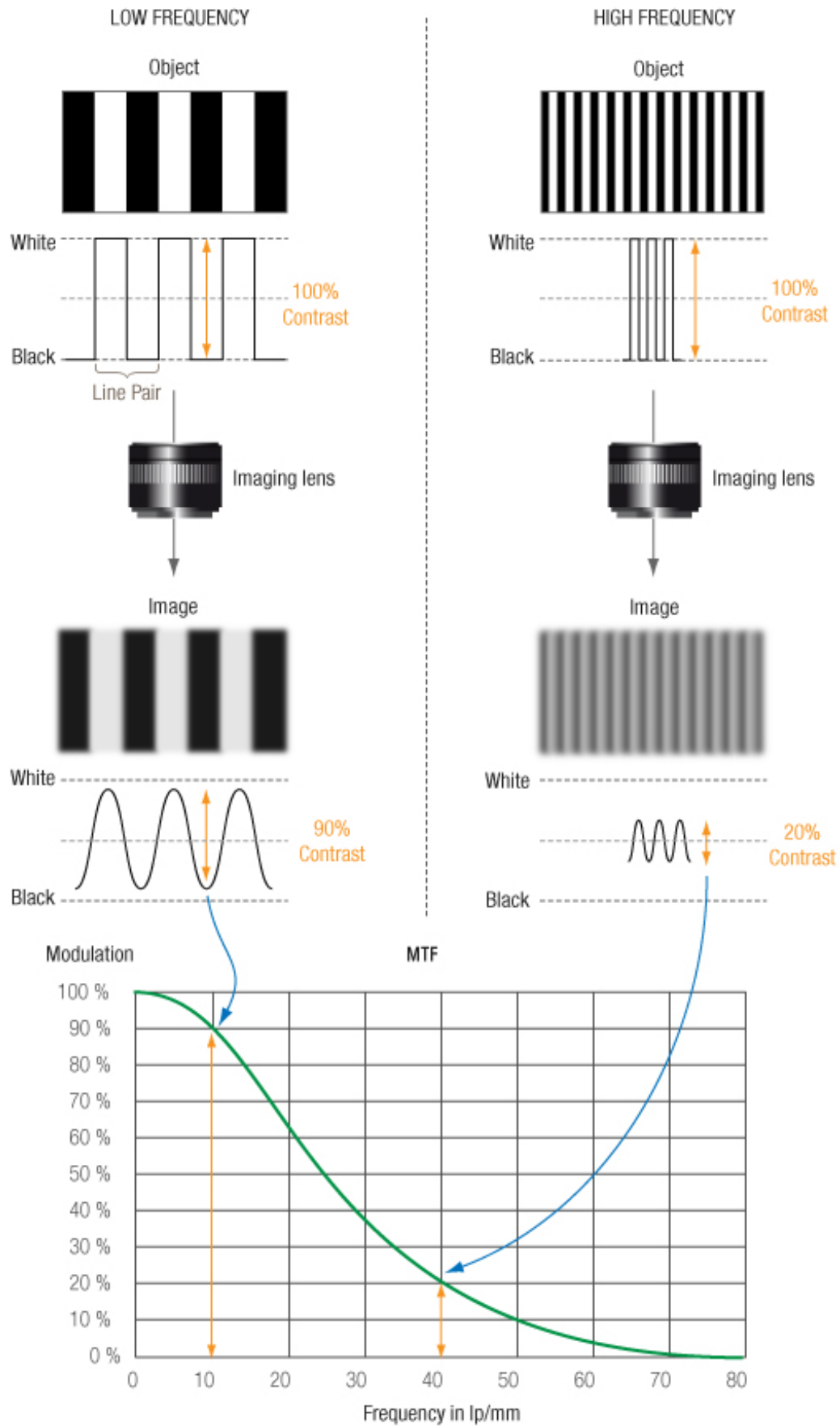
方式：拍攝一組包含不同粗細條紋的靶標

斜邊法 (Slanted Edge Method)

方式：拍攝一個稍微傾斜的黑白邊

點/線擴散函數法 (PSF/LSF Method)

方式：使用一個極小的針孔 (Pinhole) 作為物體



深度參數：

- 景深 (Depth of Field, DOF)：

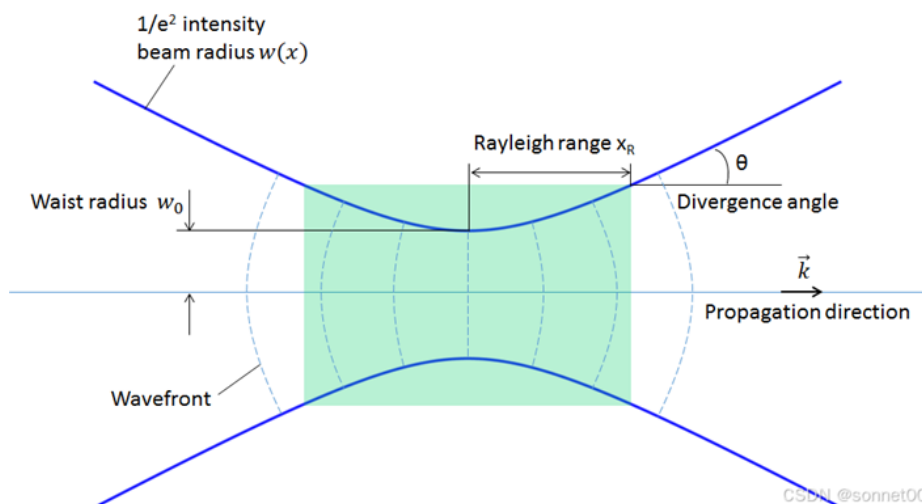
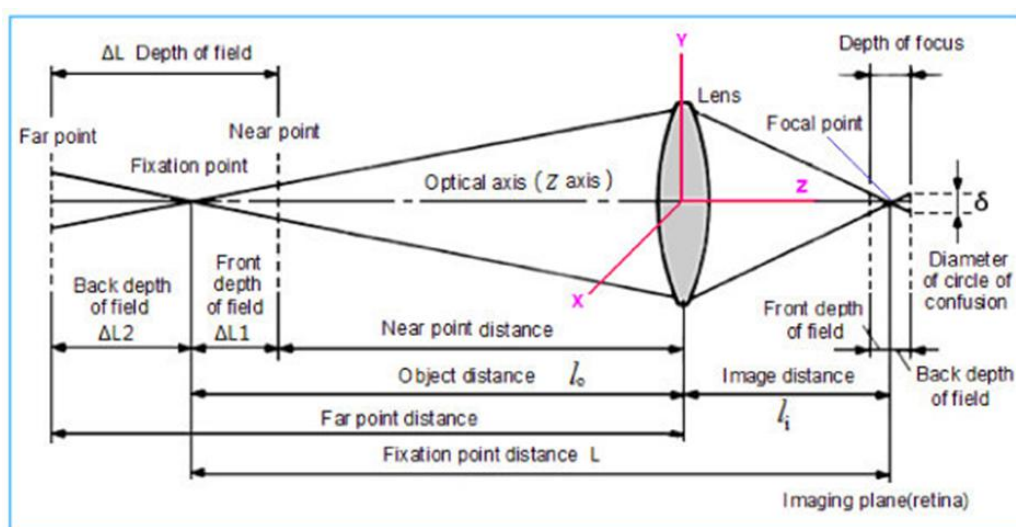
定義：在物空間中，影像保持「足夠清晰」的前後距離。

$$DOF = 2X_R = \frac{2\pi W_0^2}{\lambda}$$

- 焦深 (Depth of Focus)：

定義：在像空間（感測器端）中，感測器可以位移而不導致影像模糊的範圍。

關係：焦深 $\approx$ 景深 $\times$ 放大倍率的平方



數值孔徑 (Numerical Aperture, NA)

- 定義：描述光線從「物體」進入鏡頭時的張角。

$$NA = n \sin(\alpha)$$

- 影響：

- 解析度 (Resolution, d)：最小可分辨距離

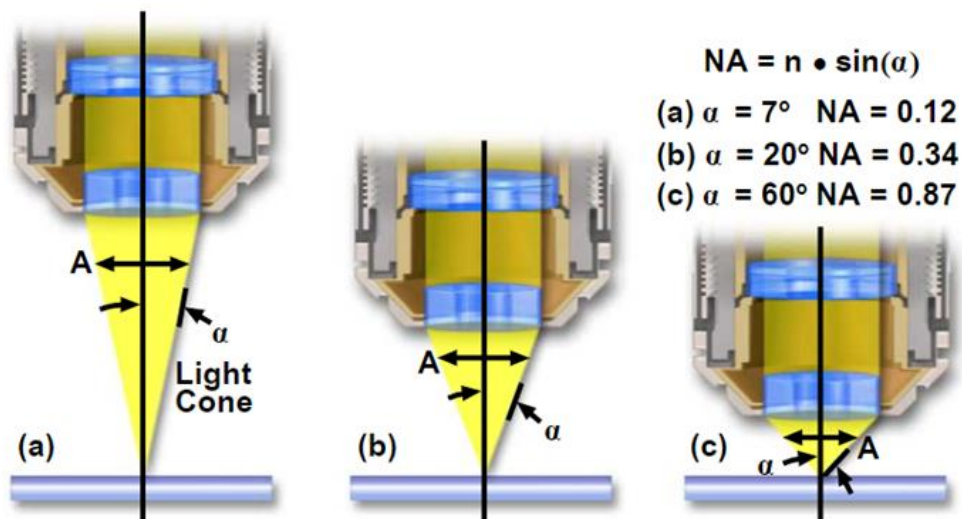
$$d = \frac{0.61\lambda}{NA}$$

- 聚光能力：系統收集到的光能量與 NA^2 成正比

- 景深 (DOF)：高 NA 會導致景深極端變淺

$$DOF \approx \frac{n \lambda}{NA^2}$$

Figure 1 - Numerical Aperture



F-number(F/#)

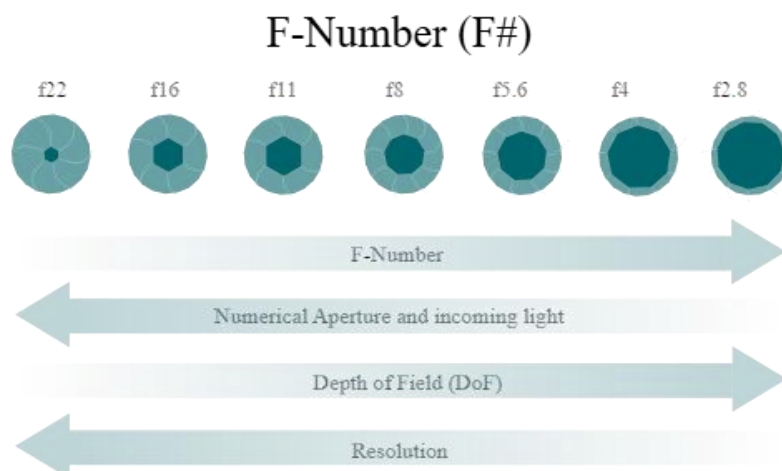
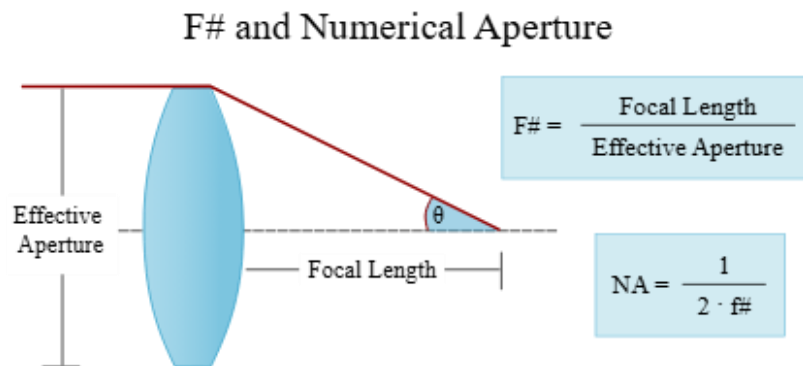
- 定義：描述鏡頭的「進光量」與「焦平面上的亮度」。

$$F/\# = \frac{f}{D}$$

f ： 鏡頭的有效焦距 (Focal Length)

D ： 入瞳直徑 (Entrance Pupil Diameter，即有效光圈大小)

- 影響：
 - 影像亮度 (Irradiance)：進光量與 F/#的平方成反比
 - 像差控制：F 數越小，邊緣光線的折射角度越大，系統的像差（如球差、彗差）會急遽增加



賽德像差 (Seidel Aberrations)

- 球差 (Spherical Aberration)

通過鏡片邊緣的光線與通過鏡片中心的光線，無法聚焦在同一個點上

- 彗差 (Coma)

來自離軸 (Off-axis) 物點的光線，在成像面上形成像彗星一樣帶尾巴的光斑

- 像散 (Astigmatism)

垂直方向的光線 (Tangential) 與水平方向的光線 (Sagittal) 聚焦在不同的平面上

- 場曲 (Field Curvature / Petzval Curvature)

鏡頭成像的「清晰面」不是一個平面，而是一個碗狀的弧面

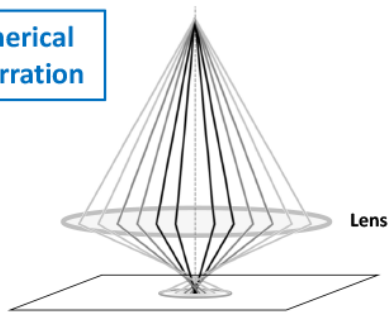
- 畸變 (Distortion)

影像的形狀發生變形，分為「桶形畸變」與「枕形畸變」

Ray path

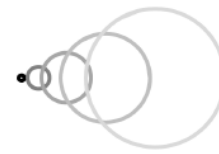
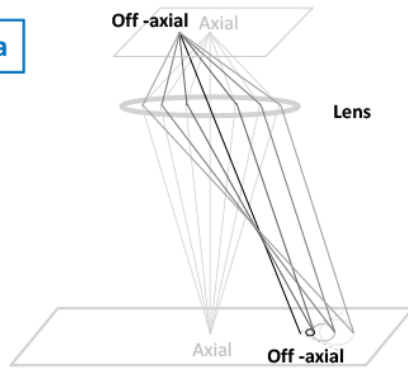
Shape of blur or distortion

Spherical Aberration



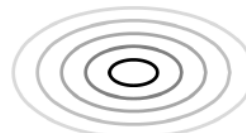
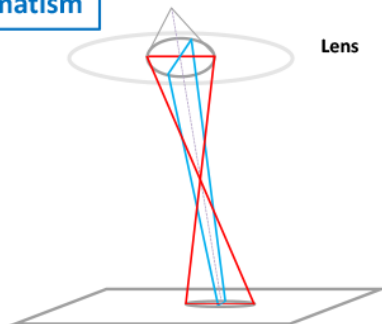
Beam shape of blur by "spherical aberration"

Coma



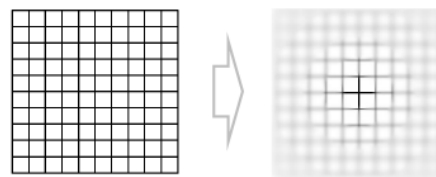
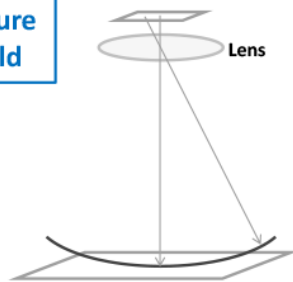
Beam shape of blur by "coma"

Astigmatism



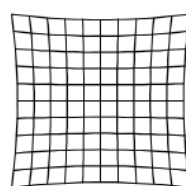
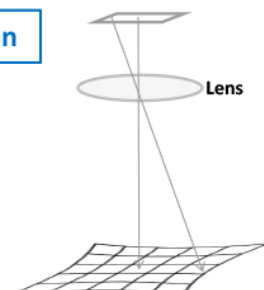
Beam shape of blur by "astigmatism"

Curvature of field

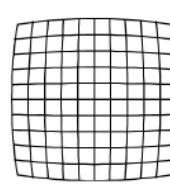


Blur at the edge of the field of view by "curvature of field"

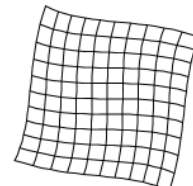
Distortion



Pin-cushion distortion



Barrel distortion



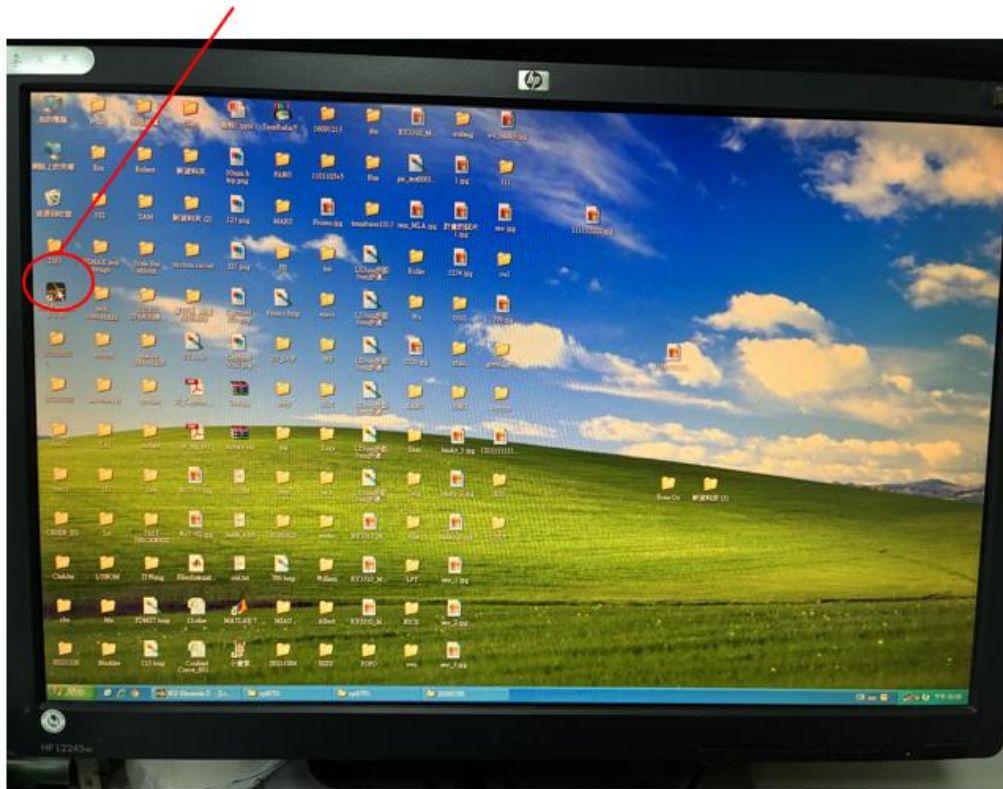
S-shape distortion

Distortion of the field of view by "distortion"

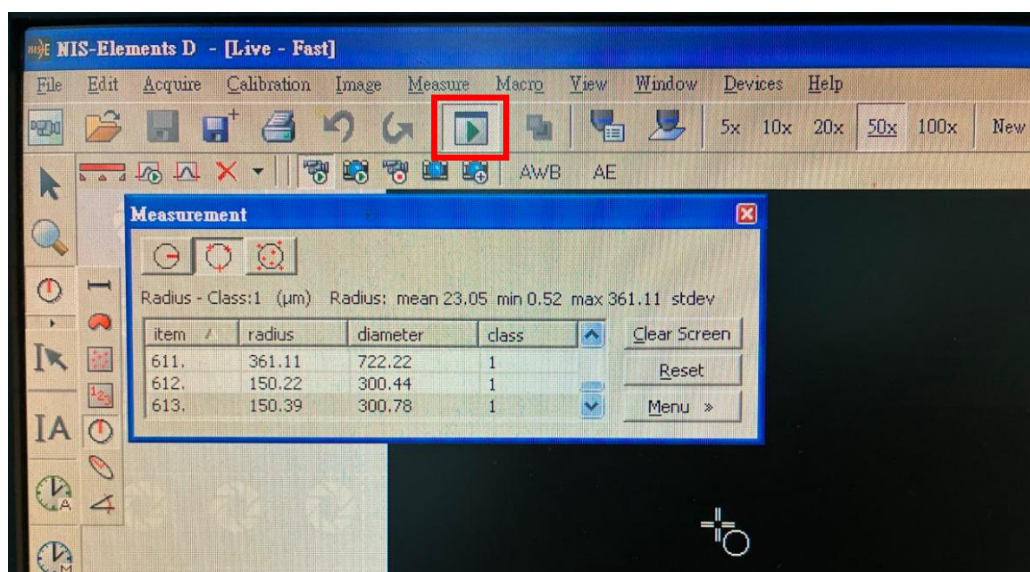
顯微鏡操作流程

桌面→NIS-Elements D 2.30→Measure 開始測量

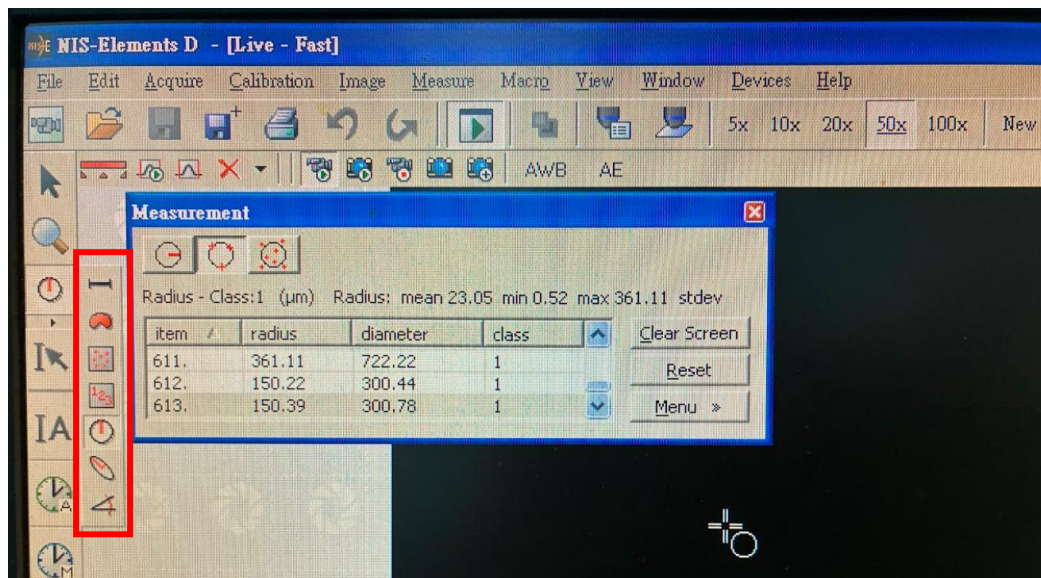
電腦測量所使用的程式



確定 CCD 為 Live 的狀態



Measure 開始測量，選擇要量測的類型(直線、橫線、圓形等)

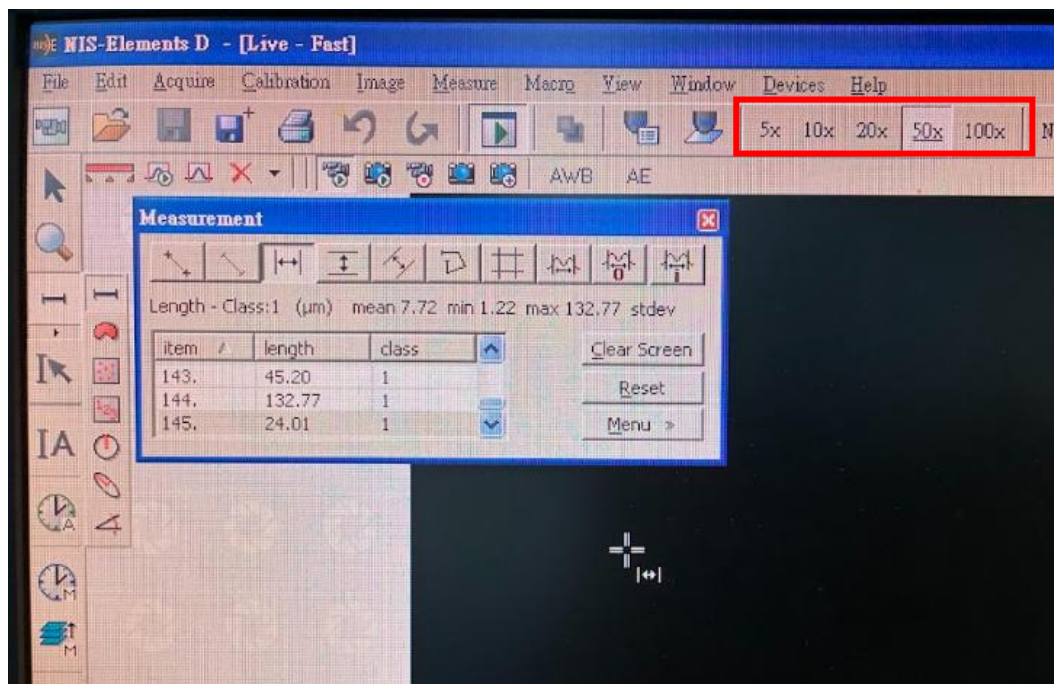


將試片中欲測量的位置一至鏡頭下方

調整 Z 軸對焦旋鈕，至能看清楚影像的位置

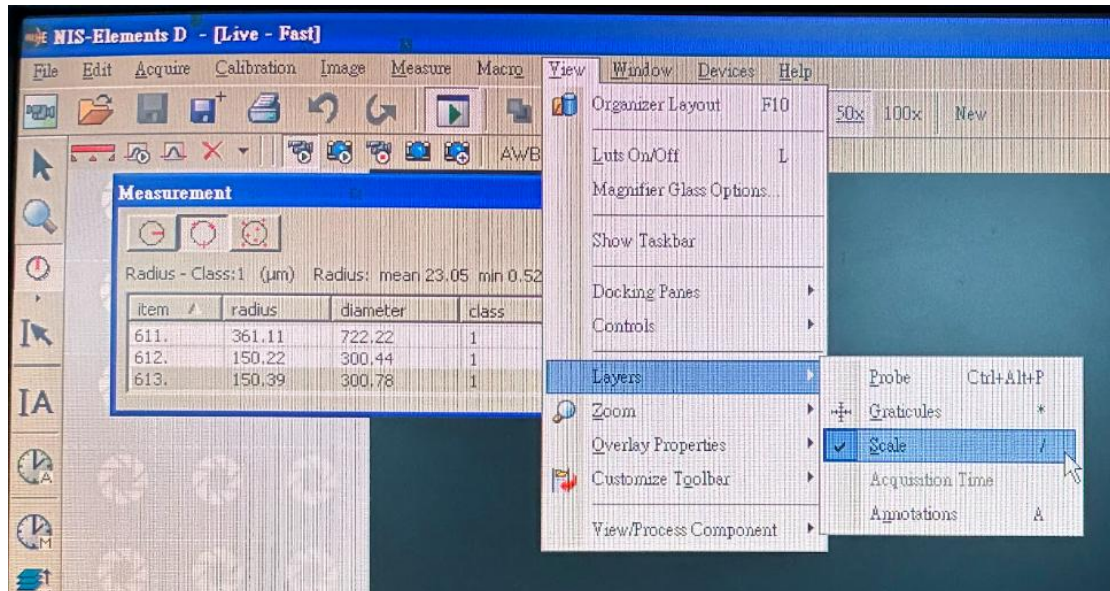
每調整一次放大倍率都要調整 Z 軸對焦旋鈕

將程式中放大倍率依照所使用的物鏡倍率做調整

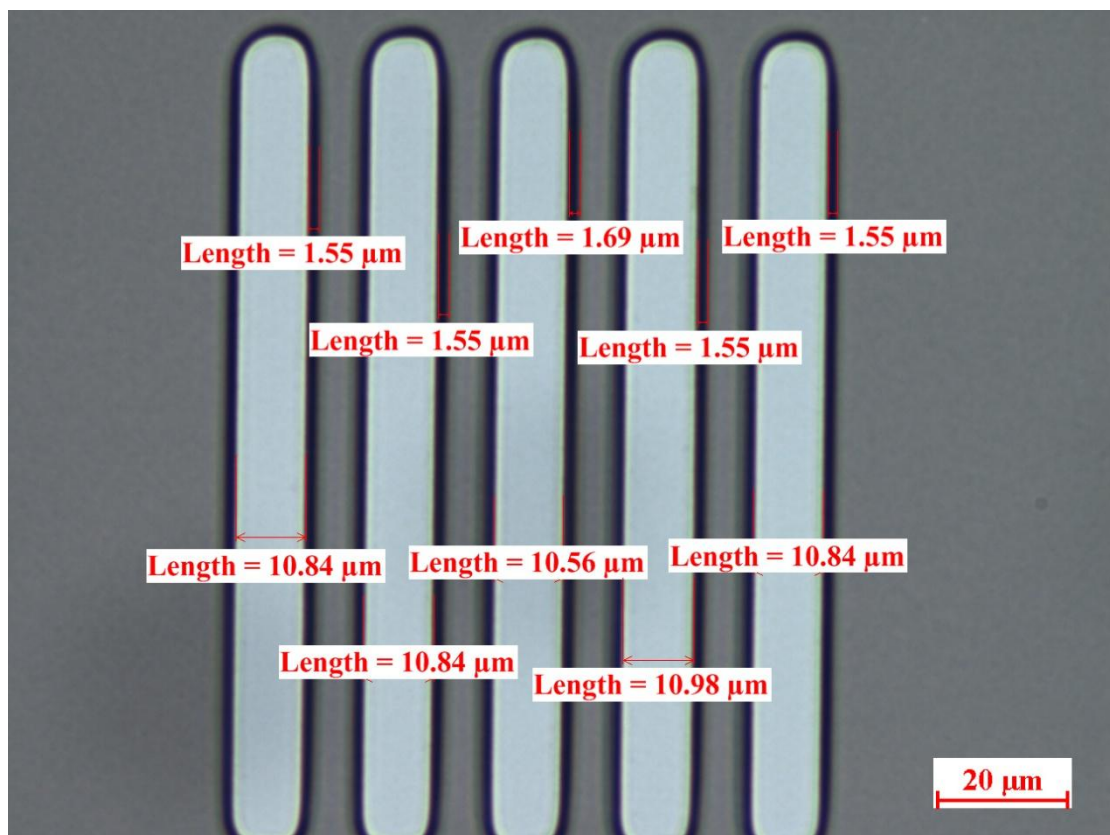


比例尺(Scale bar)設定

View→Layers→Scale



量測後的結果



作業

- 寫出我們實驗室中光學顯微鏡的物鏡規格
- 存一張測量後的結果，要有 Scale Bar

參考資料

https://www.keyence.com.tw/ss/products/microscope/microscope_glossary/basic/basic_structure_and_principle_of_microscopes.jsp

<https://evidentscientific.com/zh/microscope-resource/knowledge-hub/anatomy/objectives>

<https://www.cnblogs.com/ybqjymy/p/16149622.html>

<https://www.dxomark.com/glossary/mtf-2/>

<https://blog.csdn.net/qingzhuyuxian/article/details/82415279>

<https://www.lin.com.tw/news/8AQ6Y6.html>

<https://www.meetoptics.com/academy/f-number?srsltid=AfmBOores9NwL0hXcKN1cDLo2b1pd-JlGN5ihdiCDOAMx1klGewexpWQ>

https://www.meetoptics.com/academy/f-number?srsltid=AfmBOorz3chiPVLCQq_XR12PHwYHysAGwaAjsx_hPOLZo9i4r9q9g1KMZ

<https://www.jeol.com/words/emterms/20121023.035259.php>