

適用於大生物樣本之大口徑顯微物鏡開發

Development of Large Aperture Microscope Objectives for Large Biological Samples

彭偉捷、陳志文、陳銘福

Wei-Jei Peng, Chih-Wen Chen, Ming-Fu Chen

層光螢光顯微技術可提供動態的三維空間高解析成像，為目前應用於生物醫學檢測的重要技術，近年來以層光螢光顯微術進行全腦取像更是對於腦神經科學的重大應用。由於傳統商用物鏡的視場角限制，目前仍需要進行影像拼接以觀測高解析大型生物樣本；然而移動物鏡進行拼接相當耗時，且圖像產生拼接痕跡亦造成圖像不連續與解析度下降等問題。因此客製一個大視場的顯微物鏡是取得高解析完整影像的必要方式，以本計畫的物鏡需求規格而言，須具備寬視場 $\Phi 22$ mm 可完整拍攝鼠腦影像，以及工作距離大於 30 mm 以針對大型生物樣本作完整深度掃描，更重要的是解析度須達 $1\ \mu\text{m}$ 以觀察活體細胞結構。由於大視場的因素，場平坦度與縱向色差的修正更是具挑戰性；超低色散材料搭配消色差膠合鏡應用於物鏡系統的設計與製作，以有效校正縱向色差。其相關光學設計、光機設計與光學檢測等均詳述於本文中。

Light sheet fluorescence microscopy (LSFM) can provide dynamic three-dimensional high-resolution image, which is an important technology currently used in biomedical science. In recent years, whole-brain image by LSFM has become a major application in neuroscience. Due to the limited field of view of traditional commercial objectives, imaging stitching is still required to observe high-resolution large biological samples. However, moving the objective lens for stitching is time-consuming, and the stitching traces in the image causes problems such as discontinuity of the image and reduction of resolution. Therefore, a customized microscope objective with a large field of view is indispensable to acquire a high-resolution complete image. According to the requirements of this project, specifications include a wide field of view of $\Phi 22$ mm to detect the whole mouse brain, and a working distance larger than 30 mm to scan deep biological samples. Most importantly, the resolving power should achieve $1\ \mu\text{m}$ to observe living cells. Correction of field flatness and longitudinal chromatic aberration is more challenging due to the wide field of view. The ultra low dispersion material is employed in the achromatic doublets design to correct chromatic shift appropriately. The process of optical design, opto-mechanical design and measurement are described in detail in this study.

一、前言

層光螢光顯微技術 (light sheet fluorescence microscopy, LSFM) 可提供動態的三維空間高解析成像以及低光毒性等優點，為目前應用於生物醫學檢測相當重要的技術⁽¹⁻¹²⁾。其基本架構係以兩個正交物鏡，激發光物鏡用以產生層光，偵測物鏡用以接收激發光產生之螢光。極薄的層光可提供良好的軸向解析度，以及避免離焦的雜光干擾，可取得良好的三維空間解析度。

近年來 LSFM 於腦神經科學有重大的應用，已有研究針對全腦影像作三維拍攝，例如拍攝鼠腦的細胞及神經元進行相關研究⁽¹⁻³⁾。由於商用物鏡受限於各家廠牌的齊焦距離 (parfocal length)，導致其視場角 (field of view, FOV) 受到侷限，若要拍攝高解析度大型生物樣本如鼠腦，只能以影像拼接 (image stitching) 的方式完成。圖 1 為 Niedworok 等人以層光螢光顯微術拍攝之鼠腦拼接影像⁽¹⁾，其拼接痕跡清晰可見，其圖像的不連續問題不利於影像解析度，取像速度更因拼接拍攝而耗費相當多的時間。因此建構一個大視角的顯微物鏡是必須的，可得到完整無拼接痕跡、高解析的大型生物樣本影像。

Zhang 等人由 343 個商用物鏡專利內建構 484 組設計結構，並以光展量 (etendue G-value) 為鏡頭作統計，G-value 定義如下所示⁽¹³⁾：

$$G = \frac{\pi}{4} (2y_{obj} \cdot NA)^2 \quad (1)$$

其中 NA 為數值孔徑， y_{obj} 為物高 (即為 FOV)。經統計超過 90% 的物鏡其 G-value 介於 0.0243 至 0.9503 mm² 之間，如圖 2 中藍色與紫色的曲線範圍內。本案客製化物鏡的物高 11 mm、NA 0.3，G-value 達 34.2 mm²，其標註於圖 2 的星號位置。很明顯已脫離一般商用物鏡的 G-value 範圍，介於曝光機鏡頭與商用物鏡之間，因此屬於客製化物鏡系統的範疇。雖然 G-value 尚未至曝光機鏡頭等級，然而曝光機鏡頭為單色光設計，此客製化物鏡仍需作消色差設計，因此在設計與製作上仍屬不易。

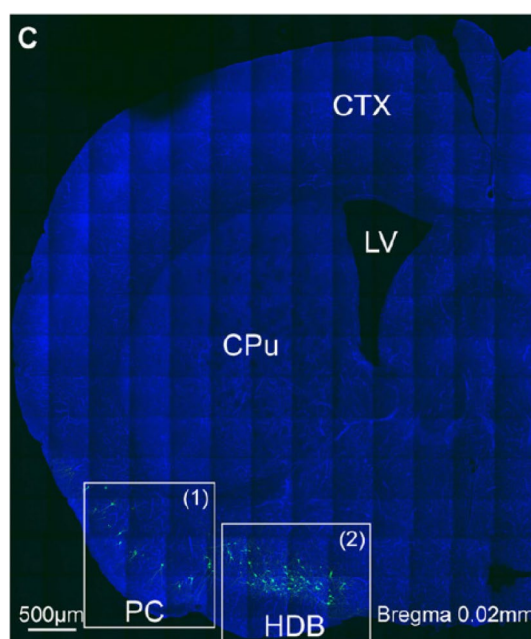


圖 1. 以層光螢光顯微術拍攝之鼠腦拼接影像⁽¹⁾。

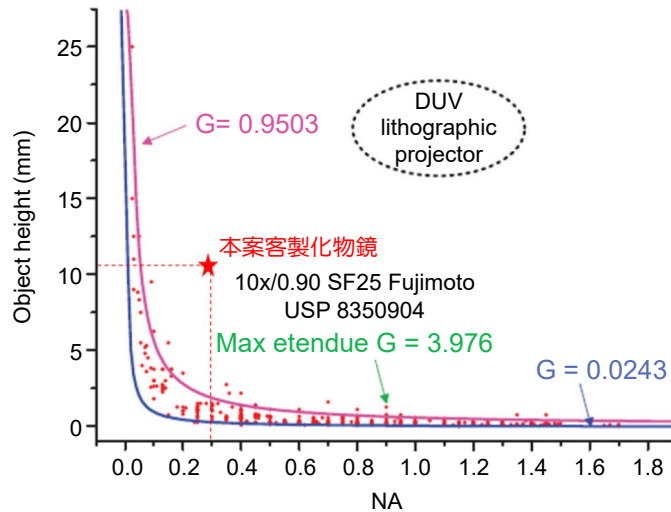


圖 2. 一般物鏡的 FOV 與 NA 關連圖⁽¹³⁾。

二、顯微物鏡系統規格

為了觀察大生物樣本，視場角維持設定為 $\Phi 22$ mm，其可涵蓋完整鼠腦的範圍。由於激發光產生的螢光光譜分別落在 520、600 及 670 nm，我們將物鏡系統的工作波長制定於 520–670 nm 的範圍內。系統解析度 (resolving power) 的需求為 $1 \mu\text{m}$ ，以便能夠觀察到細胞結構，根據 Abbe 的繞射極限公式如公式 (2)，其中 d 為解析度， λ 為光波波長，NA 為數值孔徑 (numerical aperture, NA)，以系統中心波長 $0.6 \mu\text{m}$ 估算，NA 必須達到 0.3 方可達到解析度 $1 \mu\text{m}$ 需求。

$$d = \frac{\lambda}{2\text{NA}} = \frac{\lambda}{2n \sin \theta} \quad (2)$$

為了在垂直方向完整掃描大生物樣本，以鼠腦為例，由機構外緣 (mechanical flange) 起算的工作距離 (working distance) 至少需達 30 mm，工作距離愈大，則樣本可掃描的深度愈深。由於生物樣本必須浸泡於油或水之中，此物鏡系統設計為可共用於油浸 (oil dipping) 或水浸 (water dipping)，以增加實用性與節省成本。顯微物鏡系統規格彙整如表 1 所示。

表 1. 顯微物鏡系統規格。

Specification of microscope objective system	
Immersion media	Oil/Water dipping
Wavelength	520/ 600/ 670 nm
NA	0.3
FOV	$\Phi 22$ mm
Working distance	≥ 30 mm

為利於鏡頭檢測、避免整組鏡頭過長及過重、並保留放大率調整彈性及平行光段利於置入光學元件而不影響光學品質等因素⁽¹⁴⁾，我們將物鏡系統分拆為物鏡 (objective lens) 及筒

鏡 (tube lens)，且皆為無限共軛 (infinity-conjugate)。無限共軛利於鏡頭的光學檢測，可使用如 Trioptics MTF 檢測儀⁽¹⁵⁾ 以狹縫準直光或 Zygo 干涉儀⁽¹⁶⁾ 以雷射準直光進行調制傳遞函數 (modulation transfer function, MTF) 的檢測。MTF 可針對光學系統品質進行量化的評價，係利用不同空間頻率的弦波，計算經由鏡頭成像後的調制程度。顯微物鏡系統規劃架構如圖 3，物鏡端提供高解析力以觀察樣本，筒鏡端則提供符合相機畫素的解析度並控制系統的放大率。為了訂定筒鏡與系統的光學參數，系統於物端與像端的光學參數關連性如公式 (3) 所示：

$$M = \frac{H_T}{H_O} = \frac{F_T}{F_O} = \frac{NA_O}{NA_T} \quad (3)$$

其中 M 為系統放大率， H_T 為筒鏡的像高， H_O 為物鏡的物高， F_T 為筒鏡的焦距， F_O 為物鏡的焦距， NA_O 為物鏡的 NA， NA_T 為筒鏡的 NA。系統於物端與像端的光學參數如圖 4 所示。

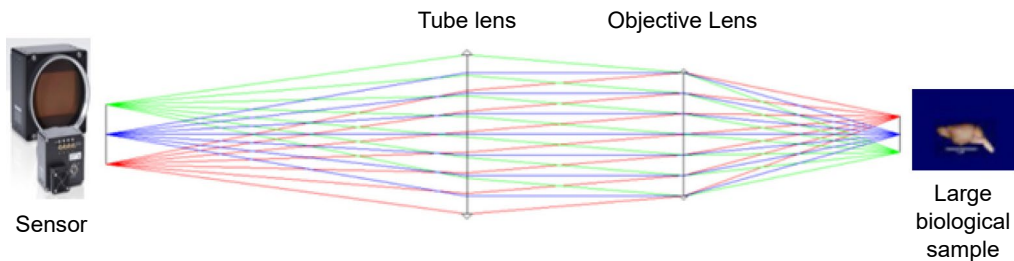


圖 3. 顯微物鏡系統架構圖。

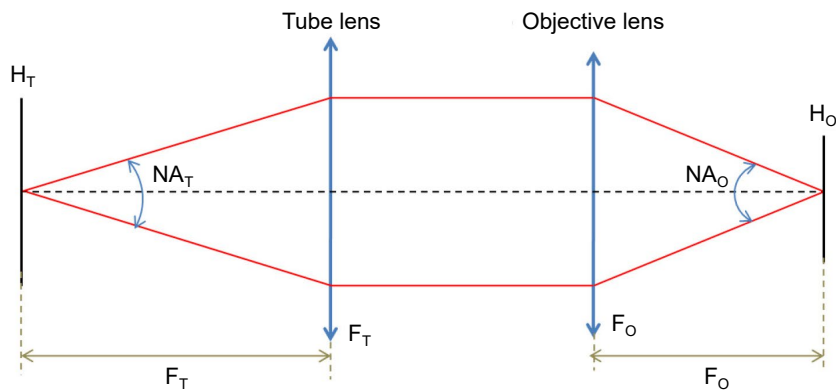


圖 4. 系統於物端與像端的光學參數。

筒鏡端的相機預計使用型號為 SVS-VISTEK shr411⁽¹⁷⁾，此相機具備 1.5 億畫素，解析度為 14192×10640 pixels；感測器有效區為 53.36×40.01 mm，畫素尺寸為 $3.76 \mu\text{m}$ 。經討論希望能將物鏡的 FOV 影像完整呈現，因此筒鏡成像圈被設計為符合相機有效區的短邊，使用範圍如圖 5 所示，筒鏡成像圈訂定為 $\Phi 40$ mm。此時由公式 3 可計算出系統的放大率為 1.82 倍 ($40/22$)，物鏡端的繞射極限光斑 (Airy disk) 為 $2.44 \mu\text{m}$ ($1.22 \lambda/NA = 1.22 \times 0.6/0.3$)，經放大於筒鏡端的光斑為 $4.44 \mu\text{m}$ ，相機畫素尺寸 $3.76 \mu\text{m}$ 小於光斑尺寸，因此可順利解析光斑影像。筒鏡端的 NA 經計算得 0.16 ($0.3/1.82$)，筒鏡與物鏡的光學規格彙整如表 2。

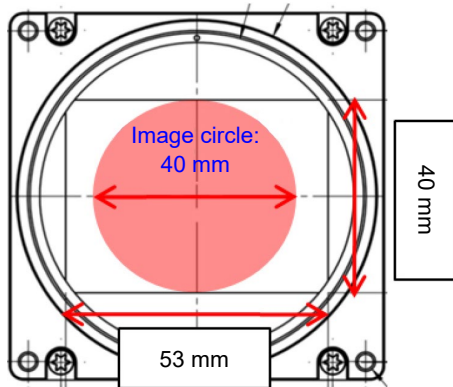


圖 5. 筒鏡成像圈於相機的使用範圍。

表 2. 筒鏡與物鏡的光學規格。

Specification of objective lens and tube lens		
Magnification		1.82 X
Objective Lens	Conjugate	Infinity-corrected
	NA	0.3
	FOV	Φ22 mm
	Airy disk	2.44 μm
Tube Lens	Conjugate	Infinity-corrected
	NA	0.16
	Image Circle	Φ40 mm
	Magnified Airy disk	4.44 μm

三、顯微物鏡光學設計

由於客製化物鏡的視場角達 Φ22 mm，相較於一般同 NA 的商用物鏡，視場角大約是 10 倍左右，像差的抑制會變得更加困難，因此物鏡設計使用了 12 枚大口徑球面透鏡以校正場平面度 (field flatness) 與色差 (chromatic shift)。最大鏡片通光口徑 (clear aperture) 位於 L11 達 Φ110 mm (如圖 6 與圖 7)，由於鏡片口徑大，需選擇熔融頻率 (melt frequency) 較高的材料⁽¹⁸⁾，並需與材料商確認是否有足夠大的塊材，以及交期 (lead time) 是否能符合時程。

關於物鏡設計架構，Zhang 等人提出相對工作因子 (relative working factor, k) 的物鏡設計結構分類方式⁽¹³⁾，如公式 (4) 所示：

$$k = \frac{W.D.}{f} \quad (4)$$

其中 W.D. 為工作距離 (working distance)， f 為物鏡的有效焦距 (effective focal length)。分類方式如下：當 k 小於 0.5，屬短工作距離，歸類於一般物鏡架構；當 k 介於 0.5 至 2 之間，屬長工作距離的雙高斯 (double-Gauss) 架構；當 k 大於 2 以上，屬超長工作距離的反遠距

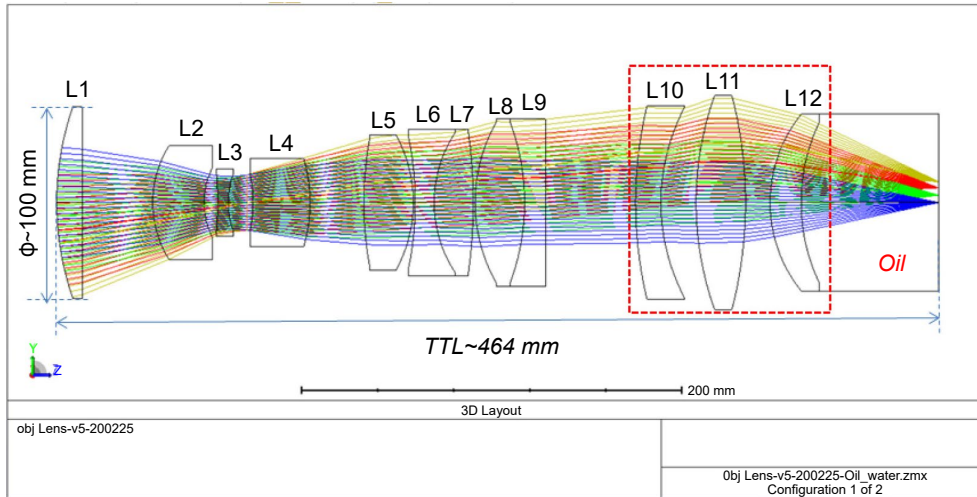


圖 6. 油浸物鏡設計架構。

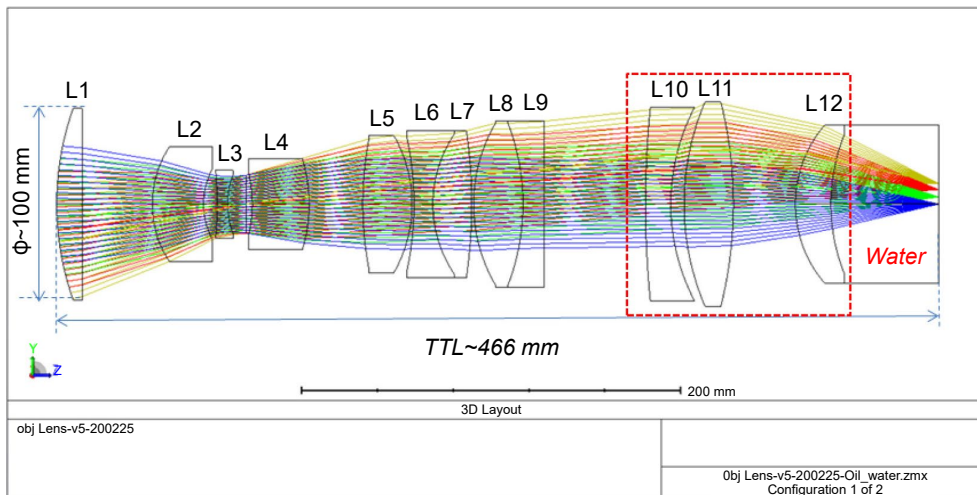


圖 7. 水浸物鏡設計架構。

(retrofocus) 架構。此客製物鏡油浸狀態軸上工作距離設計為 72.3 mm，有效焦距設計為 96.3 mm，因此 k 值為 0.75 (72.3/96.3)，設計結構屬雙高斯架構，有利於長工作距離與良好的公差容忍度。

為了達到油浸與水浸的使用相容性，L10-L12 分別針對油浸與水浸作設計，L1-L9 則為共用部分以節省成本。油浸物鏡設計架構如圖 6，鏡頭總長 (total track length, TTL) 為 464 mm，軸上工作距離為 72 mm；水浸物鏡設計架構如圖 7，鏡頭總長為 466 mm，軸上工作距離為 57 mm。

以均方根 (root-mean-square, RMS) 光斑尺寸作物鏡優化的像質評價，評價視場由中心至最外視場 $\Phi 22$ mm，評價波長由 520 至 670 nm。於油浸設計中，均方根光斑半徑 (RMS spot radius) 由中心的 $0.63 \mu\text{m}$ 至最大視場的 $1.15 \mu\text{m}$ ，如圖 8 所示。於水浸設計中，均方根光斑半徑由中心的 $0.63 \mu\text{m}$ 至最大視場的 $0.9 \mu\text{m}$ ，如圖 9 所示。所有視場的均方根光斑半徑皆小於 $1.22 \mu\text{m}$ 的繞射極限光斑半徑 (Airy radius)。

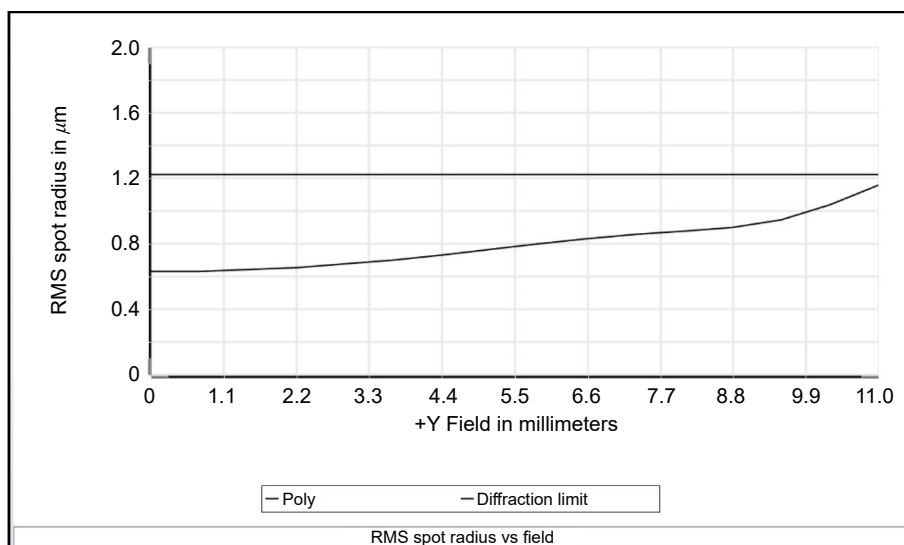


圖 8. 油浸物鏡的均方根光斑半徑尺寸圖。

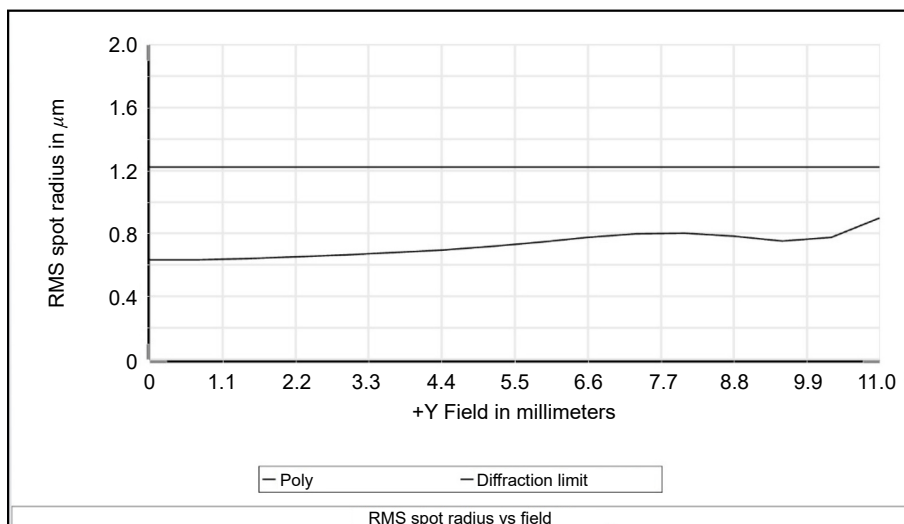


圖 9. 水浸物鏡的均方根光斑半徑尺寸圖。

MTF 一直以來為商用鏡頭的評價指標，因此亦是光學設計像質評價的重要指標。由於需求解析度為 $1 \mu\text{m}$ ，因此制定空間頻率 (spatial frequency) 250 lp/mm 為 MTF 評價基準。於油浸設計中，中心區域 MTF 約 0.6，全視場 MTF 大於 0.48，如圖 10 所示；於水浸設計中，中心區域 MTF 約 0.6，全視場 MTF 大於 0.5，如圖 11 所示。理想上物鏡 MTF 設計值愈貼近繞射極限，其模擬像質愈好，但實際狀況常常會受限於鏡片外形與製程、材料選取與取得等因素，數值會略有下降。由於物鏡設計的光學品質較貼近於繞射極限，伴隨而來的經常是高公差敏感度 (high tolerance sensitivity) 的問題，解決方式包含設計架構的選取 (例如雙高斯架構通常有較佳的公差容忍度)、避免鏡片之間的光線有過大的轉折、鏡片的偏心補償等方式⁽¹⁹⁻²⁵⁾。因此光學設計階段需留意公差分析結果是否能符合需求規格，以避免發生設計模擬數值極佳，但製作與組裝後無法達到預期規格的問題。

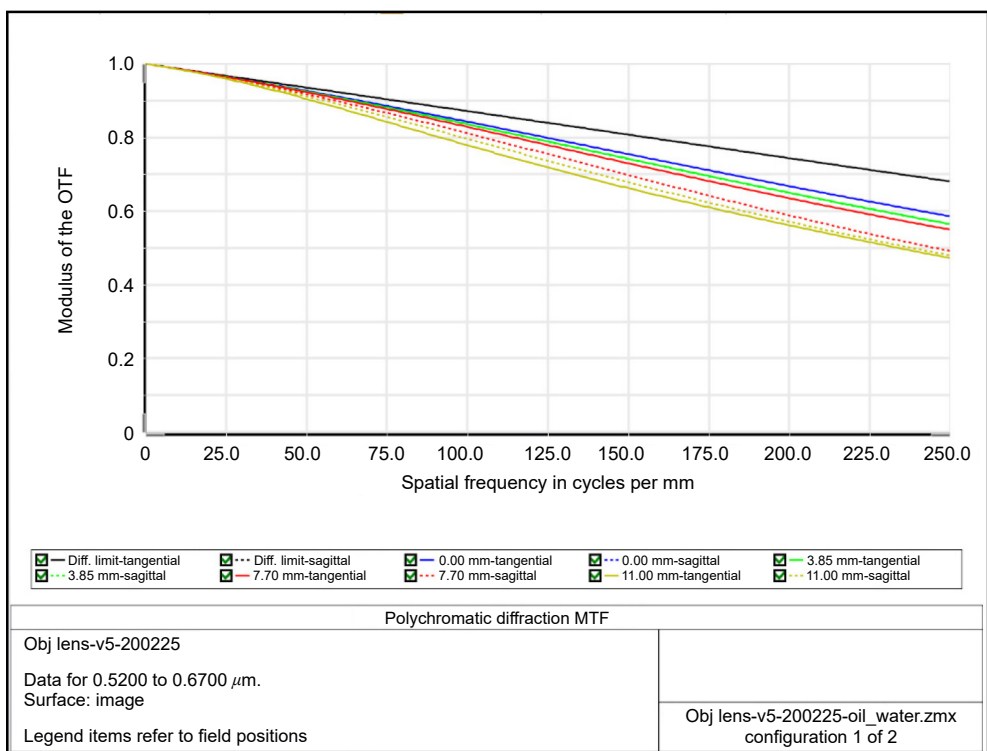


圖 10. 油浸物鏡的 MTF 圖。

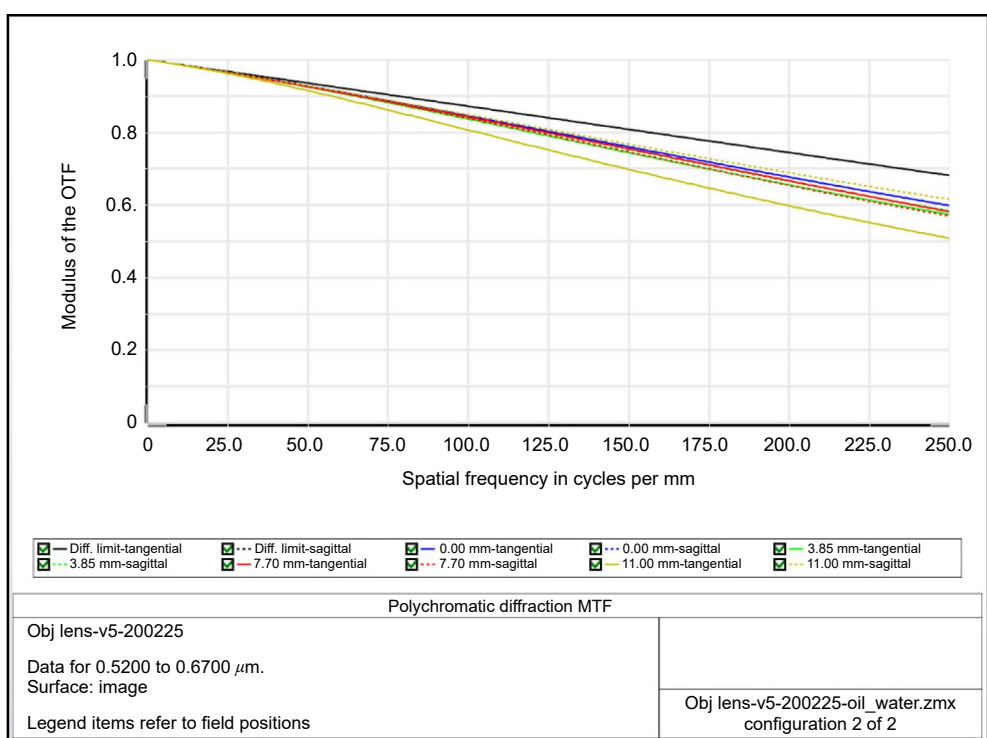


圖 11. 水浸物鏡的 MTF 圖。

四、顯微物鏡色差修正

顯微物鏡一般以軸上色差 (longitudinal chromatic shift) 校正程度與場平坦度 (field flatness) 作分級⁽¹³⁾。判斷軸上色差的修正程度，一般會與焦深 (depth of focus, DOF) 作比較，焦深公式如公式 (5) 所示⁽²⁶⁾：

$$DOF = \frac{n\lambda}{NA^2} \quad (5)$$

其中 n 為浸泡介質的折射率， λ 為工作中心波長，NA 為數值孔徑。本案油浸狀態的 DOF 為 $9.7 \mu\text{m}$ ($1.45 \times 0.6 / 0.3^2$)，水浸狀態的 DOF 為 $8.9 \mu\text{m}$ ($1.33 \times 0.6 / 0.3^2$)。物鏡傳統上以色差作分類分別為消色差 (achromate)、螢石 (fluorite) 與複消色差 (apochromate) 物鏡三種⁽¹³⁾。消色差定義紅、藍的雙波段在 $2 \times DOF$ 內；螢石定義紅、綠、藍的三波段在 $2.5 \times DOF$ 內；複消色差則定義紅、綠、藍的三波段在 DOF 內。這裡的紅、綠、藍波段定義之光譜分別為 656 nm (C)、 588 nm (d)、 486 nm (F)。為了修正主要頻譜色差 (primary spectrum chromatic aberration)，於物鏡設計內使用了兩組消色差膠合鏡 (achromatic doublets) (L6/L7、L8/L9)，其膠合鏡分別以火石 (flint) 材料的凹透鏡及冕冕材料 (crown) 材料的凸透鏡所組成。根據複消色差理論，當兩種材料的部分色散 (partial dispersion) 差值愈小，則二次頻譜色差 (secondary spectrum chromatic aberration) 會愈小⁽²⁷⁾。為了達到二次頻譜色差的修正效果，超低色散材料 (ultra low dispersion material) Ohara S-FPL55 被使用於鏡片 L7 及 L8⁽¹⁸⁾。

圖 12 為 Ohara 材料的部分色散與色散係數 (Abbe number) 關係圖，部分色散 P_{gf} 可由公式 (6) 定義：

$$P_{gf} = \frac{n_g - n_F}{n_F - n_C} \quad (6)$$

其中 n_g 、 n_F 與 n_C 分別為折射率於 G-line (436 nm)、F-line (486 nm) 與 C-line (656 nm)。一般常用光學玻璃均位於 normal line 附近，為圖 12 的 PBM2 與 NSL7 的連線⁽¹⁸⁾。當兩個材料均在 normal line 附近時，則無法產生較小的部分色差的差值；因此當其中一個材料是超低色散材料如 S-FPL55，其色散係數大於 90 並遠離 normal line (如圖 12 左下紅圈處)，其對於二次頻譜色差的修正可產生極佳的修正效果。

經光學材料優化，油浸狀態的軸上色差修正為 $11.6 \mu\text{m}$ ，略大於 DOF $9.7 \mu\text{m}$ ，如圖 13 所示 (粉色區域為焦深範圍)，色差控制在 $1.2 \times DOF$ ，設計上介於複消色差與螢石之間；水浸狀態的軸上色差修正為 $6.8 \mu\text{m}$ ，色差低於 DOF $8.9 \mu\text{m}$ ，如圖 14 所示，設計上屬複消色差。

五、筒鏡設計

筒鏡 (tube lens) 的功能在於收集物鏡的光線、控制系統放大率並符合相機畫素的解析度需求。由前述章節的估算，NA 需設計為 0.16、成像圈設計為 $\Phi 40 \text{ mm}$ ，光學參數如表 2 所示。筒鏡設計為可共用於油浸與水浸物鏡，以節省成本。由於物鏡的焦距設計為 96.3 mm ，因此筒鏡的焦距設計為 175 mm ，以符合 1.82 倍的系統放大率，使影像能夠完整呈現於相機

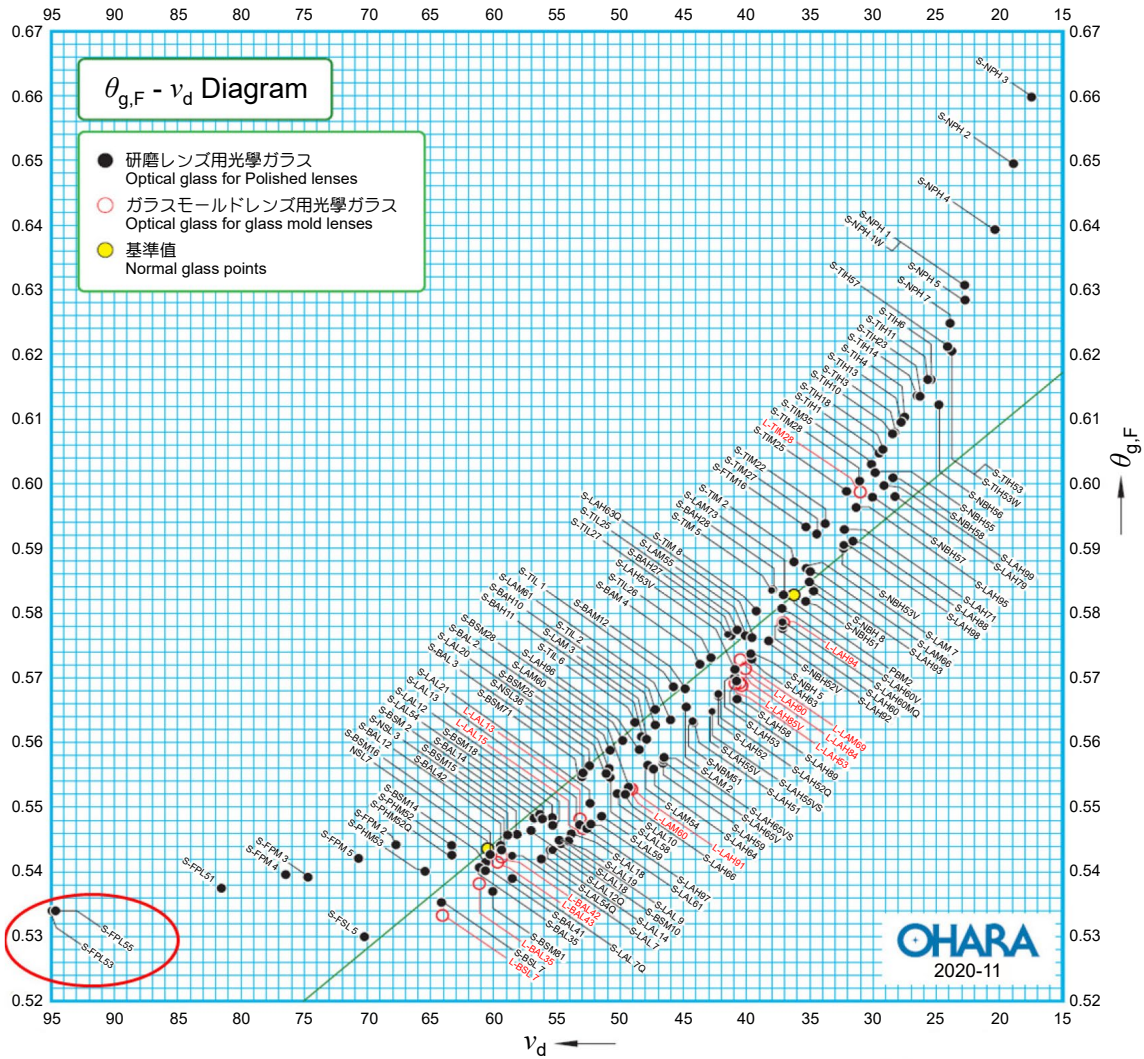


圖 12. Ohara 材料的部分色散與色散係數關係圖(18)。

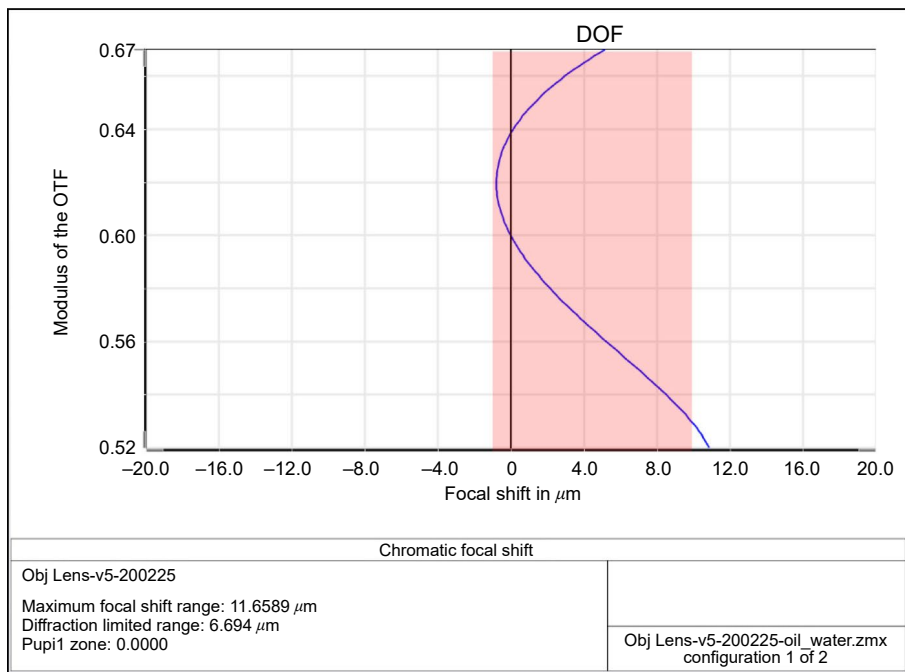


圖 13. 油浸狀態的軸上色差修正。

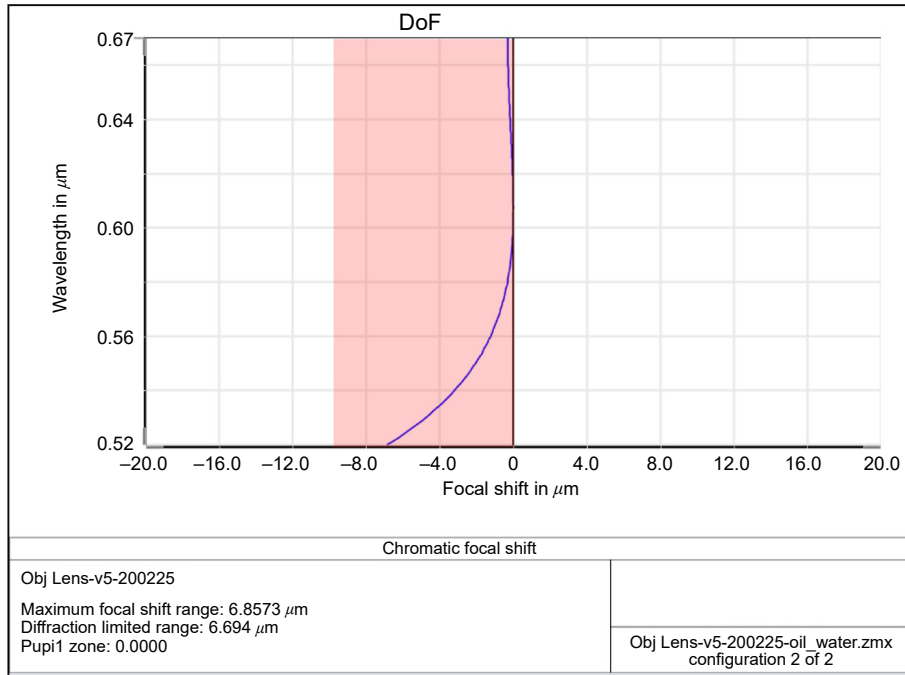


圖 14. 水浸狀態的軸上色差修正。

感測器。由於主要頻譜色差與焦距成正比，因此軸上色差的校正於更長焦距的筒鏡會變得更加困難。為此筒鏡設計內使用了一組三膠合鏡 (triplet lens)、兩組雙膠合鏡以消除色差，共由 11 組大口徑球面鏡片所組成，設計架構如圖 15 所示。因相機畫素尺寸 $3.76 \mu\text{m}$ ，其奈奎斯特頻率 (Nyquist frequency) 約 130 lp/mm ，此為相機的解析度極限，因此設定為筒鏡 MTF 評價的空間頻率。如圖 16 所示，中心視場 MTF 大於 0.6，最大視場 MTF 大於 0.4。

關於物鏡與筒鏡的對接，兩者的光瞳位置與口徑必須匹配，以避免光線遮蔽 (light shading) 問題，因此筒鏡的出瞳位置與口徑必須與物鏡的入瞳位置與口徑相匹配⁽²⁸⁾。物鏡的入瞳位置由物鏡第一片鏡片頂點往鏡頭內起算 180 mm，油浸物鏡的入瞳口徑為 $\Phi 58 \text{ mm}$ ，

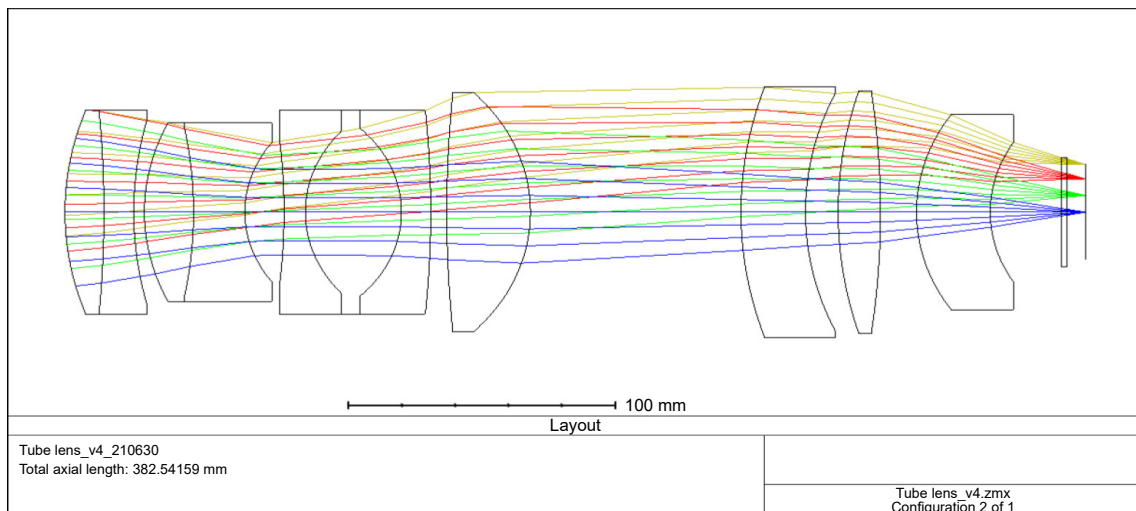


圖 15. 筒鏡設計架構。

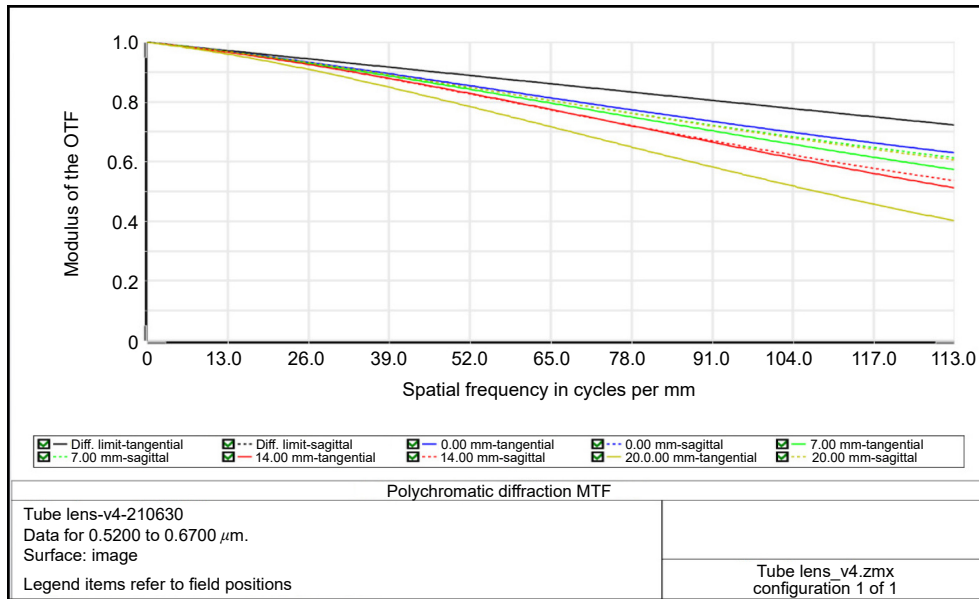


圖 16. 筒鏡的MTF圖。

水浸物鏡的入瞳口徑為 $\Phi 62 \text{ mm}$ ；因此筒鏡的出瞳位置由筒鏡第一片鏡片頂點往鏡頭外起算設計為 220 mm (預留 40 mm 作為筒鏡與物鏡間的空氣間距)，筒鏡的出瞳口徑設計為 $\Phi 62 \text{ mm}$ ，以涵蓋油浸與水浸物鏡的入瞳口徑，兩者光瞳相匹配以避免光線遮蔽，光瞳數據彙整如表 3 所示。圖 17 為組合物鏡與筒鏡之完整顯微物鏡系統光路圖。

表 3. 筒鏡與物鏡的光瞳數據。

項目		入瞳 (出瞳) 距離	入瞳 (出瞳) 口徑
物鏡	油浸	180 mm	$\Phi 58 \text{ mm}$
	水浸	180 mm	$\Phi 62 \text{ mm}$
筒鏡		220 mm (40 mm 作為空氣間距)	$\Phi 62 \text{ mm}$

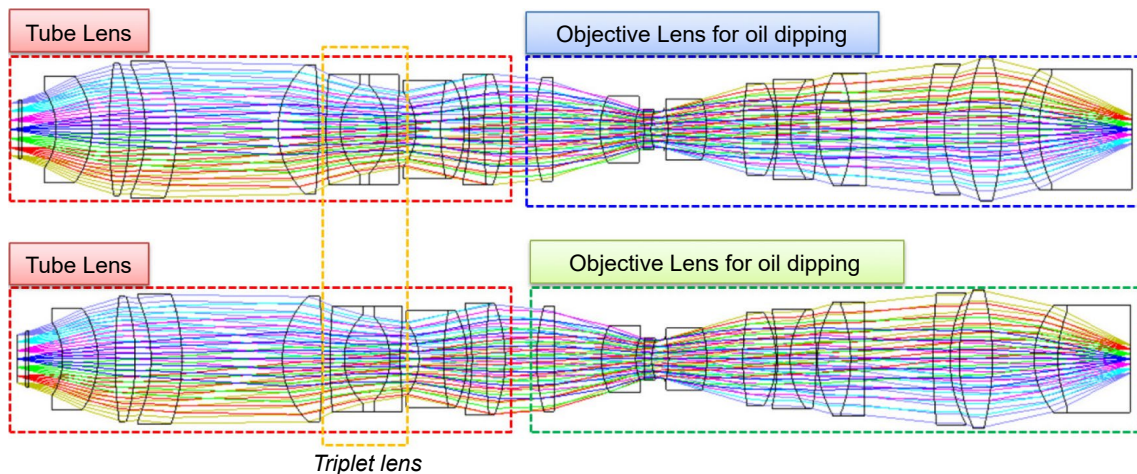


圖 17. 組合物鏡與筒鏡之完整顯微物鏡系統光路圖。

六、顯微物鏡系統工程體

物鏡的光機設計 (opto-mechanical design) 如圖 18 所示，係以邊緣承靠 (edge mounting) 作定位，使用投入式組裝 (drop-in assembly) 的方式達成。為了使光軸達到良好的同心度 (concentricity)，使用一個大套筒內含五個次套筒的方式進行光機設計⁽²⁹⁾。根據公差分析結果，鏡片 L10 作偏心補償 (de-center compensation) 可得到較佳的成像品質良率結果。因此 L10 被承靠於一個獨立的內套筒，與外圍套筒有一間隙可使用頂針以推動內套筒作偏心補償。此外鏡片 L12 與其次套筒間有環形槽，以便填入環氧樹脂 (epoxy) 膠以避免油或水的滲漏。所有的機構件以鋁合金 (Al 5056) 製造並作染黑處理以避免雜散光干擾。物鏡的機構總長度為 423 mm，最大外徑 $\Phi 170$ mm。

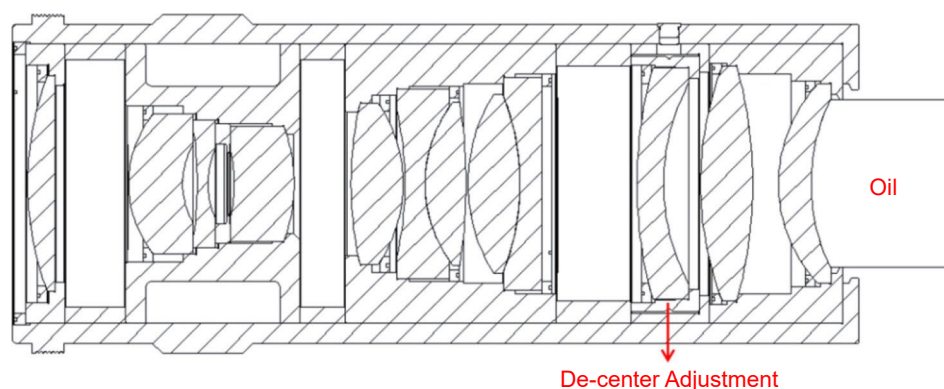


圖 18. 物鏡的光機設計。

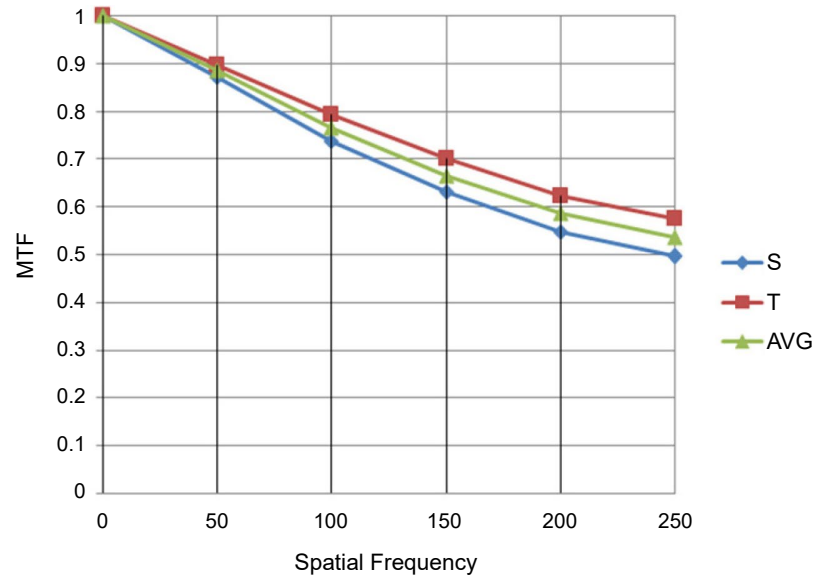
Trioptics Opticentric⁽¹⁵⁾ 被使用於此無限共軛物鏡的 MTF 檢測。然而光路的最後一段為液體，造成光學檢測的極大挑戰。若實際使用液體，除了治具製作不易，其液體的高度控制會是一大問題，經由公差分析得知，液體的高度公差如同鏡片厚度公差的等級，因此靈敏度高難以精準控制。為了解決此問題，我們使用折射率相近的鏡片 (index-matching lens) 取代液體作檢測⁽²³⁾。生物樣本使用的甘油 (Glycerol oil) 折射率為 1.455 (Nd)，與熔融石英 (fused silica) 的折射率 1.458 (Nd) 是接近的，因此我們製作熔融石英的平凸透鏡取代甘油作檢測。如圖 19 為 MTF 檢測架構，紅框處即為透鏡取代甘油的部分。

MTF 調整流程：物鏡立於空氣軸承 (air bearing) 上，藉由旋轉調整至上下光路同軸心，再以 NA 匹配之物鏡於上方作收光量測 MTF，此時以頂針推動 L10 次套筒作偏心調整，過程中可得到最佳 MTF 結果。MTF 實測於空間頻率 250 lp/mm 的平均值約 0.54，可符合設計規格需求與公差分析預期 (如圖 19)。

至於筒鏡的製作與檢測方式，其與物鏡是接近的，在此就不做贅述。圖 20 為物鏡與筒鏡組裝結合之工程體，左方為筒鏡，右方為物鏡，中間段為連接環。筒鏡的機構總長度為 378 mm，最大外徑 $\Phi 180$ mm，整體物鏡系統機構總長度約 840 mm。

七、結論

適用於大生物樣本檢測之寬視場顯微物鏡系統的工程體已順利完成開發。利用無限共軛的原理，將系統拆分為物鏡與筒鏡，以利於鏡頭檢測、製作與使用彈性。此客製化顯微物鏡



Number	S 0 lp/mm	T 0 lp/mm	S 50 lp/mm	T 50 lp/mm	S 100 lp/mm	T 100 lp/mm	S 150 lp/mm	T 150 lp/mm	S 200 lp/mm	T 200 lp/mm	S 250 lp/mm	T 250 lp/mm
1	1.000	1.000	0.877	0.896	0.747	0.798	0.642	0.709	0.560	0.632	0.510	0.585
2	1.000	1.000	0.868	0.896	0.730	0.789	0.621	0.693	0.536	0.613	0.479	0.565
Average	1.000	1.000	0.873	0.896	0.738	0.794	0.631	0.701	0.548	0.623	0.495	0.575
Std. Dev.	0.000	0.000	0.006	0.000	0.012	0.006	0.015	0.011	0.017	0.013	0.022	0.014

圖 19. MTF 檢測架構與其結果。



圖 20. 物鏡與筒鏡組裝結合之工程體。

可達到 $\Phi 22\text{ mm}$ 大視場、 72.3 mm 的油浸工作距離與 $1\ \mu\text{m}$ 的解析度。縱向色差則以超低色散材料修正二次頻譜色差，將物鏡的軸上色差控制在 $1.2\times\text{DOF}$ 。筒鏡設計則與物鏡匹配光瞳的位置與口徑，以避免兩者對接導致的光遮蔽問題。根據公差分析結果，以鏡片 L10 進行偏心補償可得到較佳之成像品質良率，實際於 MTF 檢測儀進行偏心調整與檢測，可得到符合需求規格之最佳化 MTF。最後物鏡與筒鏡的工程體皆已完成光學 MTF 檢測，並交由客戶進行後續的層光螢光顯微術取像。期待藉由本次的客製化顯微物鏡系統開發，能夠為國內層光螢光顯微技術的進展貢獻一份心力！

誌謝

感謝中央研究院應用科學研究中心陳壁彰副研究員的委託研究客製案，讓我們得以進行此特規物鏡的研究與開發。

參考文獻

1. Christian J Niedworok, Inna Schwarz, Julia Ledderose, Gunter Giese, Karl-Klaus Conzelmann, Martin K Schwarz, *Cell reports*, **2** (5), 1375 (2012).
2. Pawłowska, M., Stefaniuk, M., Legutko, D., & Kaczmarek, L., Light-Sheet Microscopy for Whole-Brain Imaging, *Advanced Optical Methods for Brain Imaging*, pp. 69-81. Singapore: Springer (2019).
3. Zhouzhou Zhang, Xiao Yao, Xinxin Yin, Zhangcan Ding, Tianyi Huang, Yan Huo, Runan Ji, Hanchuan Peng, Zengcai V Guo, *Frontiers in neuroanatomy*, **63**, (2021).
4. Mariana Diales Rocha, Daniel Normen During, Philipp Bethge, Fabian F Voigt, Staffan Hildebrand, Fritjof Helmchen, Alexander Pfeifer, Richard Hans Robert Hahnloser, Manfred Gahr, *Frontiers in neuroanatomy*, **13**, (2019)
5. Christopher A Werley, Miao-Ping Chien, Adam E Cohen, *Biomedical optics express*, **8** (12), 5794 (2017).
6. Yu-Jui Fan, Han-Yun Hsieh, Yen-Ru Huang, Chieh Tsao, Chia-Ming Lee, Hidetoshi Tahara, Yi-Chun Wu, Horn-Jiunn Sheen and Bi-Chang Chen, *Lab on a Chip*, **22** (3), 584 (2022)
7. Po-Yen Lin, Sheng-Ping L. Hwang, Chi-Hon Lee, Bi-Chang Chen, *Journal of Biomedical Optics*, **26** (11), 116503 (2021).
8. Chia-Ming Lee, Xuejiao Tian, Chieh Tsao, Peilin Chen, Tzyy-Nan Huang, Yi-Ping Hsueh, and Bi-Chang Chen, *Discoveries*, **9** (3), (2021).
9. Chu, L. A., Chang, S. W., Tang, W. C., Tseng, Y. T., Chen, P., & Chen, B. C., *Current Opinion in Genetics & Development*, **67**, 77 (2021).
10. Fan, Y. J., Hsieh, H. Y., Tsai, S. F., Wu, C. H., Lee, C. M., Liu, Y. T., ... & Chen, B. C., *Lab on a Chip*, **21** (2), 344 (2021).
11. Chang, B. J., Tang, W. C., Liu, Y. T., Tsai, Y. C., Tsao, C., Chen, P., & Chen, B. C., *Journal of Physics D: Applied Physics*, **53** (4), 044005 (2019).
12. Li-An Chu, Shu-Wei Chang, Wei-Chun Tang, Yu-Ting Tseng, Pei lin Chen, Bi-Chang Chen, *Nature communications*, **10** (1), 1(2019).
13. Yueqian Zhang and Herbert Gross, *Advanced Optical Technologies*, **8** (5), 313 (2019).
14. 林良平, 科儀新知, **22** (4), 6 (2001).
15. Please refer to the website: <https://trioptics.com/>
16. Please refer to the website: <https://www.zygo.com/>
17. Please refer to the website: <https://www.svs-vistek.com/en/index.php>
18. Please refer to the website: <https://www.oharacorp.com/>
19. Mark Jeffs, "Reduced manufacturing sensitivity in multi-element lens systems", *International Optical Design Conference*, December 23, (2002).
20. John R. Rogers, "Using global synthesis to find tolerance-insensitive design forms", *International Optical Design Conference*, June 4-8, (2006).
21. James P. McGuire, "Designing easily manufactured lenses using a global method", *International Optical Design Conference*, June 4-8 (2006).
22. David S. Grey, *Computer-Aided Optical Design*, **147**, 63 (1978).
23. Wei-Jei Peng, Wen-Lung Lin, Hui-Jean Kuo, Cheng-Fang Ho, Wei-Yao Hsu, *Optical Design and Testing VII*, **10021**, 378 (2016)
24. Jin Woo Kim, Jae Myung Ryu, and Young-Joo Kim, *Journal of the Optical Society of Korea*, **18** (6), 720 (2014).
25. Lucimara Cristina Nakata Scaduto, Jose Sasian, Mario Antonio Stefani, and Jarbas Caiado de Castro Neto, *Optics Express*, **21** (6), 6851 (2013).
26. Yueqian Zhang and Herbert Gross, *Advanced Optical Technologies*, **8** (5), 349 (2019).
27. Joseph M. Geary, *Introduction to lens design: with practical ZEMAX examples* Richmond, Va. : Willmann-Bell, 110 (2002).
28. Smith, G. Pupils and Stops, *Encyclopedia of Optical and Photonic Engineering*, Second Edition, New York: CRC, pp. 1-9 (2015).
29. Paul Yoder, Daniel Vukobratovich, *Opto-mechanical systems design*, New York: CRC, (2005)

作者簡介

彭偉捷先生為國立中央大學光電科學與工程碩士，現為國家實驗研究院台灣儀器科技研究中心副研究員。

Wei-Jei Peng received his M.S. in the Department of Optics and Photonics from National Center University. He is currently an Associate Researcher at Taiwan Instrument Research Institute, NARLabs.

陳志文先生為國立中央大學機械工程碩士，現為國家實驗研究院台灣儀器科技研究中心副研究員。

Chih-Wen Chen received his M.S. in the Department of Mechanical Engineering from National Center University. He is currently an Associate Researcher at Taiwan Instrument Research Institute, NARLabs.

陳銘福先生為國立臺灣大學機械工程碩士，現為國家實驗研究院台灣儀器科技研究中心研究員兼任組長。

Ming-Fu Chen received his M.S. in the Department of Mechanical Engineering from National Taiwan University. He is currently a Research fellow and Division Director at Taiwan Instrument Research Institute, NARLabs.