

# 光學顯微鏡之最新進展

## - 無限遠補正光學系統

無限遠補正光學系統 (CFI) 被成功地開發後，已廣泛應用於光學顯微鏡之理論。除顯微鏡結構及性能上之改善外，在筒鏡使用平行光之原理、提升對焦長度、同步焦距及鼻輪直徑之功能上貢獻良多。此結果顯微鏡具有較長工作距離、較高 NA，供 0.5 倍物鏡用，另外得到更清楚的微分干涉差、更長的呈像空間以及視野平面之簡化。

林良平

### 一、緒言

此項顯微鏡系統已被廣泛應用於各製造廠商之產品，蔡司 (Zeiss) 首先以「ICS optics」，即無限遠消色差系統 (infinity color-corrected system)，提出產品。歐林巴士 (Olympus) 所採用的光學系統為 UIS 光學系統 (universal infinity system)，尼康 (Nikon) 採用 CFI 無限遠光學系統，萊卡 (Leica) 則以平衡管理系統 (harmonic component system) 設計其顯微鏡之光學系統 (optical system)。無論何種觀察法，都可以得到高解像度、高對比度之光學系統。此系統採用由物鏡 (objective lens) 與投射鏡 (project lens) 各自獨立，將包含色差及球面像差在內的所

林良平先生為美國路易斯安那州立大學博士，現任台灣大學農業化學研究所教授，國科會台灣大學貴重儀器中心電子顯微鏡專家及中華民國顯微鏡學會榮譽理事，並為亞太及國際電子顯微鏡聯盟國家委員。

有像差完全補正，獨自開發之無限遠光學系統。物鏡與投射鏡間的平行光束，若插入其他中間鏡筒配件 (intermediate attachments) 或濾鏡，既不引起焦點 (focus) 之改變，也不發生像差及倍率之變化。即能在完全補正投射鏡所產生之像差下，形成中間影像 (intermediate image)。

綜合以上各系統，其目的在使整個顯微鏡系統之各部間呈現調和 (一致) 之機能，因此對使用者保證相當恆定且應用方便之益處。本系統逼近使用光學技術之極限。此項系統之技術為：

光學系統及搭配上的機械尺寸，協調性改進。

光學系統各部分間之互相配對，功能更強。

以先進製造技術，使光學系統表現最佳的性能。

物鏡解像能力及工作距離的性能提昇。

由於 Nikon Eclipse 系列無限遠光學顯微鏡係最新設計完成之產品，本文就以本實驗室所使用之 Nikon E600 型的無限遠補正光學系統 (CFI<sub>60</sub>) 為例 (圖 1)，說明其結構與機能，以便初學者參考。



圖 1. 具備 CFI<sub>60</sub> 之 Nikon Eclipse E600 型光學顯微鏡。

自從 1976 年 Nikon 公司就已經完成消除色差 (chromatic aberration free, CF) 之顯微系統，此一系統的設計目的在於生產視野清澈而完美之物、目鏡，並且同時校正縱橫向之像差。於 1996 年發展出具有無限遠光學之顯微系統 (CFI)，CFI<sub>60</sub> 光徑示於圖 2。值得注意的是經由 CFI<sub>60</sub> 物鏡後至鏡筒之間的較長平行光徑 (longer parallel optical path)，物鏡對焦距離為 60 mm，凡存在此光徑之光學顯微鏡即為無限遠光學顯微鏡 (infinity optical microscope)。當然，四大顯微鏡廠商 (蔡司、萊卡、歐林巴士、尼康) 所生產之光學顯微鏡，各家的平行光徑長度皆不盡相同，平行光徑越長者越有利於使用者增加研究所需之配件，但都是無限遠光學顯微鏡。

在 80 年代，消除物、目鏡像差是項顯微鏡艱難而創新之舉。藉由光學補償原理，有些關於橫向

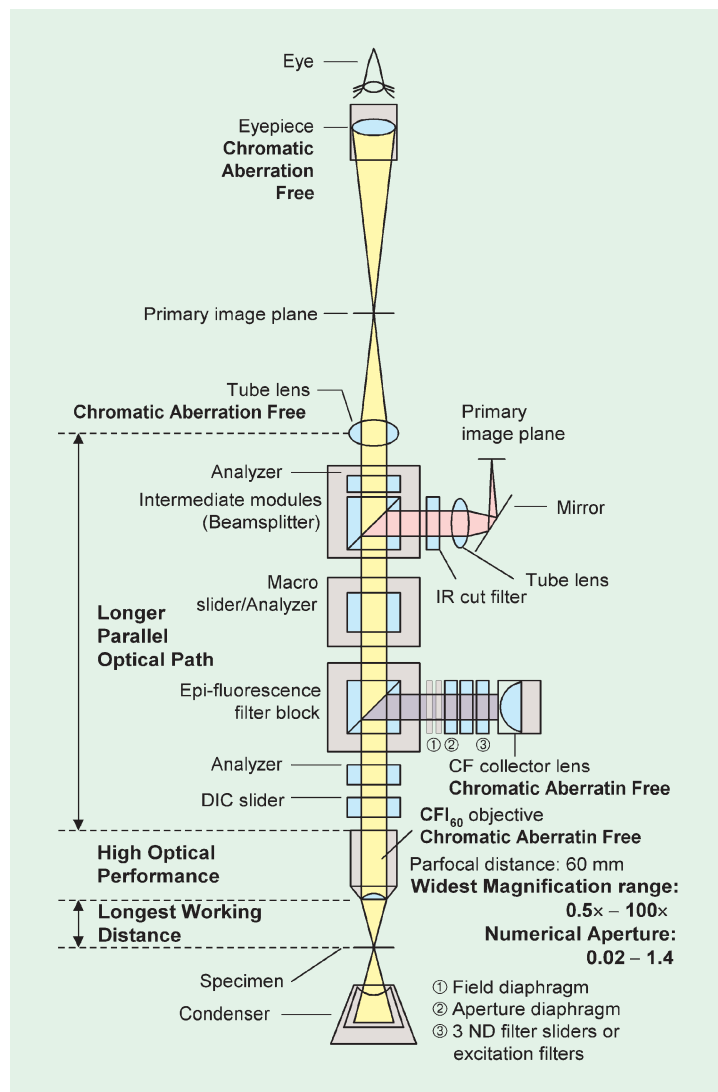


圖 2. CFI<sub>60</sub> 結構及光徑圖。

消除像差的方式仍停留在以目鏡來改善物鏡的方式進行。但是 CFI 系統不但由縱向並且由橫向一併來改善物、目鏡之色差。到目前大部份顯微鏡製造商不但承認 CFI 系統之高品質，且遵循並製造他們的顯微鏡。在研習更進步的顯微鏡過程中，都決定加入無限遠光學做為更有潛力的光學發展方向。有限與無限遠光學之結構比較示於圖 3。

## 二、傳統及無限遠光學系統

傳統光學系統僅依靠物鏡來作影像之放大及呈像，由物到影像成像之距離為固定距離，而物鏡之

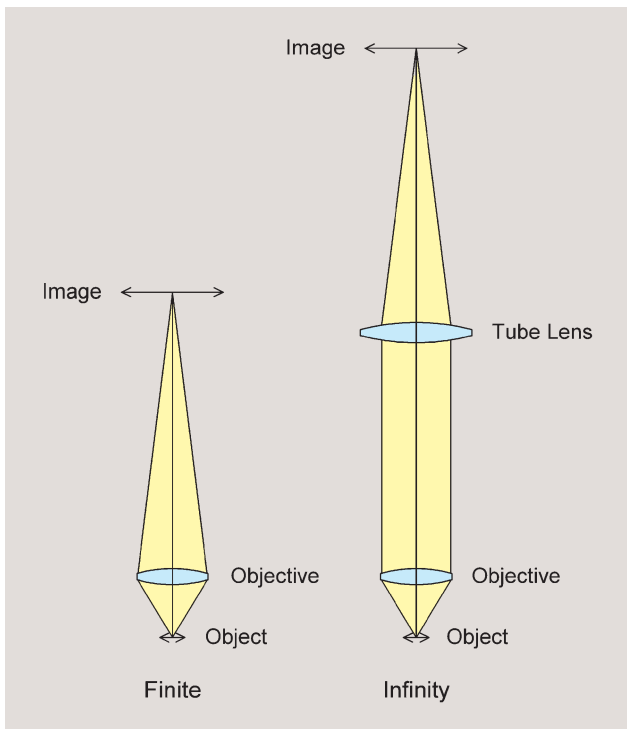


圖 3. 有限與無限光學之結構比較圖。

設計亦針對此固定之狀況。但是基本上而言，在一些簡易而小型的顯微鏡下，傳統光學系統的性能與無限遠的光學系統功能相似。

在無限遠光學系統中，物鏡中包括了一個物鏡，或稱第一物鏡，以及另外一個筒鏡，或稱第二物鏡。光由聚光鏡投射到樣品上，經物鏡轉換為平行光，影像在此階段並未成形，再經由筒鏡使影像呈像。介於物鏡和筒鏡之間之平行光徑叫做「第一次呈像空間」(afocal space)，凡存在此第一呈像空間之顯微鏡就叫做無限遠顯微鏡 (圖 4)。

### 三、CFI 光學系統之優勢

CFI 光學系統在光學及應用上皆已完善。它有三組數字，200 mm 筒鏡焦距 (focal length of tube lens)、60 mm 物鏡同步對焦距離及 25 mm 鼻輪直徑。此三項數字成就了較長工作距離、高數值口徑 (numerical aperture, NA) 值及放大視野，CFI 系統更擴張了第一次呈像空間。

#### 1. 筒鏡焦距

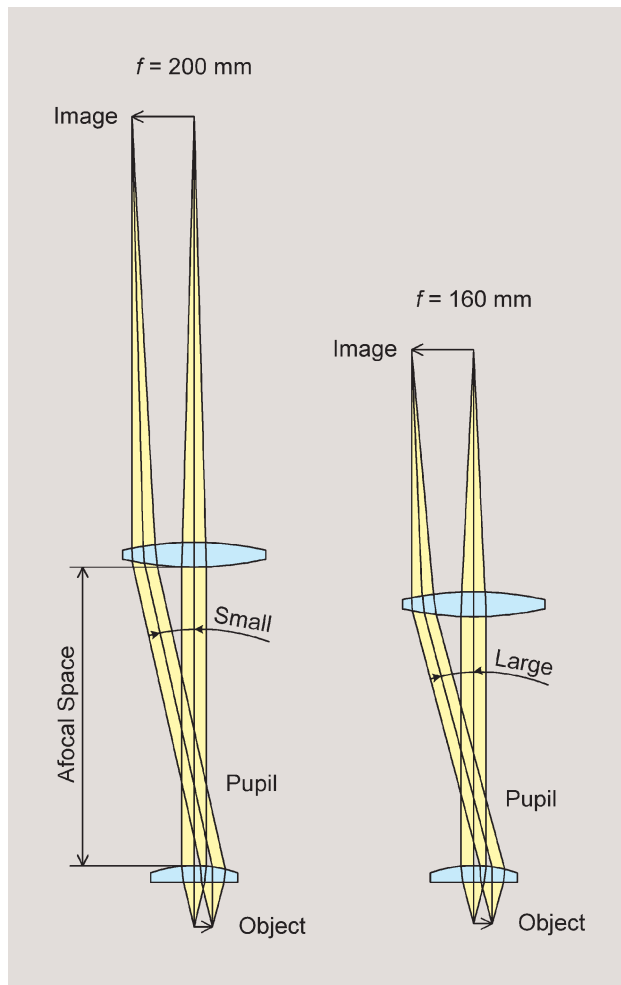


圖 4. 鏡筒內焦距長度之差別。

在無限遠光學系統中，物鏡被區分為二個鏡區，呈像高度為  $Y$  時，筒鏡焦距為  $f_b$ ，平行光入射至筒鏡的角度為  $\theta$ ，可以下列方式列出算式：

$$Y = f_b \cdot \tan \theta$$

上列算式表示有各種不同入射角  $\theta$  的平行光，存在於第一次呈像空間，而當筒鏡具有較長之焦距  $f_b$  時，通過第一次呈像空間之偏軸光線其角度較小 (圖 4)。左圖  $f_b$  200 mm 之角度較右圖  $f_b$  160 mm 者小。

#### (1) 螢光顯微鏡 (Fluorescence Microscope)

螢光顯微鏡使用一組螢光濾片，包括一個激發濾片，一個集光鏡和一片阻擋濾片，將樣品的螢光與激發器光源分離。高功效干涉濾片已被改良為能

夠適應寬幅波長之產品，干涉濾片由多層氣相沈積之金屬隔以介電質構成。

穿透之波長(光)是由上述濾片之層結構，及光線穿透它們時的角度來決定，因此穿透光之波長隨投射角度之改變而跟著改變。為了達到週邊及中心視野之高功效，波長與設計值之差異要儘量減小。

## (2) 微分干涉差 (Differential Interference Contrast)

### 配件

在微分干涉差配件中有一個 DIC 稜鏡，通常是由二個楔形單軸的晶體，如石英，以光軸互相交錯的方式互相接合。其目的在於分離每一光線成為二條偏振互相垂直的光，使形成一特定設計之分歧角度。此稜鏡由其結構亦稱為 Wollaston 稜鏡或 Nomarski 稜鏡。

此稜鏡在物鏡和聚光鏡方面必須在分歧角度上互相對應，才能產生微分干涉差之效果。另外，稜鏡之厚度也須加以計算，使能補償光徑長度(圖 5)。

雖然 DIC 稜鏡的厚度被設計來補償光徑之長度，但是仍然只有在視野中心點才能得到最佳的對比。在單軸晶體中，非常光線之速率改變，係依入射角度與光軸而定。如果有較小的入射角度，則所有視野皆可以改善。這是因為形成外緣影像之光線進入 DIC 稜鏡時之角度，必定與理想設計值有差異，因此，補償光徑長度也會有些偏差。舉例而言，在一個高 NA 值的聚光鏡中，使用 10 倍物鏡觀察相位差樣品，有一些凹凸不平的影像會在視野的邊緣產生。由於高 NA 值聚光鏡的焦距相對的較短，如此才能使 NA 值較高，因此像 10 倍物鏡這種屬於大視野的物鏡，影像的凹凸不平，在邊緣最為顯著，這是因為光線的俯角(傾角)通過 DIC 濾鏡後，在聚光鏡那邊是比物鏡大。相同的現象也會發生在物鏡上，因為經過 DIC 稜鏡後，與物鏡同側之光線角度，跟我們以前提到的  $Y = f_b \cdot \tan\theta$  相吻合，在較小  $\theta$  的情況下，筒鏡的焦距長度增加 20%，而光源的角度大概會減少 17%，如此一來就會減少視野的凹凸不平的程度(圖 5)。

## (3) 相位差顯微鏡 (Phase Contrast Microscope)

相位差顯微鏡的工作原理和微分干涉差類似，

光線以愈小的角度進入相位差板，會使波長之偏移較小而有較佳之呈像能力。無論如何，相位差的影響是非常輕微的，並沒有明顯的視野清晰差異發生在相位差顯微鏡上。

## (4) 第一次呈像空間之延伸 (Expansions of Afocal Space)

前已提及長焦距物鏡可使光線以小角度進入筒鏡，而在制定顯微鏡系統的延展性中，較長焦距也是非常重要的。第一次呈像空間就是物鏡到筒鏡間的距離，在此一空間中可放置許多模組，如螢光光源、分光器、倍率投影鏡，如果第一次呈像空間越大，可放置並延伸之模組就越多。

CFI 光學顯微鏡有 200 mm 的筒鏡焦距，因此它可擁有較長的第一次呈像空間，原因可由下列公

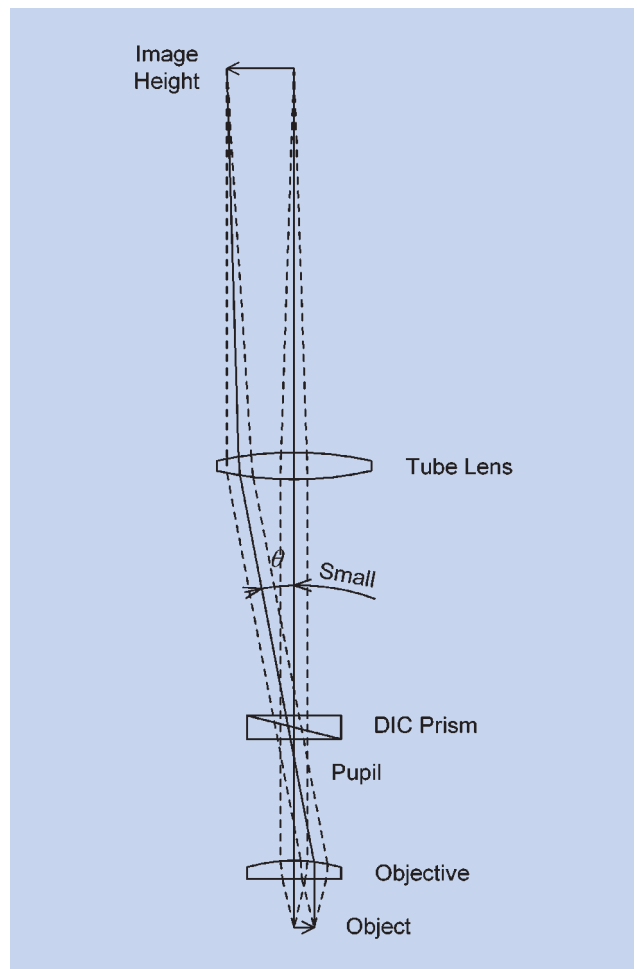


圖 5. 第一次呈像空間之 DIC 稜鏡。

式表達：

$$\phi = 2 \cdot t \cdot \tan\theta + 2 \cdot (NA' y_{\max}) f_b$$

$\phi$  代表筒鏡直徑， $t$  是第一次呈像空間中，由物鏡光瞳到第一片筒鏡之距離， $\theta$  是最大影像高度的偏軸光角度， $NA' y_{\max}$  是物鏡在最大影像高度時，其鏡後之 NA 值  $f_b$  是筒鏡焦距。

比較  $f_b = 200 \text{ mm}$  及  $f_b = 160 \text{ mm}$ ，第一次呈像空間  $t$  可計算如下。代入筒鏡直徑  $30 \text{ mm}$ ， $y_{\max} = 12.5 \text{ mm}$  (視野  $25 \text{ mm}$ )， $NA' y_{\max} = 0.015$ ， $NA' y_{\max}$  係由在最大影像高度呈現模糊時約 70% 所決定。

$$t = 192 (f_b = 200) \text{ 及 } t = 161 (f_b = 160)$$

明顯的表示出無限遠光學中，在相同的筒鏡直徑中，有較長的筒鏡焦距，也就是有較長的可使用第一次呈像空間。

## 2. 同步對焦和鼻輪直徑 (Parfocal Distance and Thread Size of Objective)

在無限遠光學系統中放大比例為  $\beta$ ，代表物鏡焦距  $f_a$  和筒鏡焦距  $f_b$  之比例。 $\beta = f_b/f_a$ ，因此，在所需之放大倍率下，物鏡焦距由筒鏡焦距決定。在  $200 \text{ mm}$  筒鏡焦距時，一個 1 倍的物鏡，依據公式推算有  $200 \text{ mm}$  之物鏡焦距，在 0.5 倍的物鏡之下則有  $400 \text{ mm}$  之物鏡焦距，如果需要一個  $200 \text{ mm}$  之物鏡焦距則需要  $60 \text{ mm}$  同步對焦距離，因為要將較長焦距放入此一有限的空間中。

同理，無限遠光學系統中可擁有較短的物鏡同步對焦距離，因此較低的物鏡倍率被限制。凡是利用  $60 \text{ mm}$  同步對焦之物鏡，皆稱為 CFI<sub>60</sub> 物鏡。

一個較長的同步對焦同時也有較長的工作距離與較高的 NA 值，選擇  $25 \text{ mm}$  作為鼻輪直徑目的在於可以有較高的 NA 值，所得到的結果就是高解像螢光。我們以下列公式計算螢光亮度 ( $L$ )：

$$L \propto (NA/mag)^2 \cdot T_{\text{ex}} \cdot T_{\text{em}}$$

(ex: exciting, em: emission)

$T_{\text{ex}}/T_{\text{em}}$  表示物鏡在激發波長及放射波長之穿透比，

NA 表示物鏡之 NA 值，mag 表示放大倍率。

在光源的考量中，如果一個光源填滿物鏡的第二次對焦開口，則公式改變如下：

$$L \propto (NA/mag)^4 \cdot T_{\text{ex}} \cdot T_{\text{em}}$$

為了取得較亮的影像，必須選擇高 NA/mag 之物鏡，故這些都是廠商決定生產 CFI<sub>60</sub> 物鏡的原因。

## 四、像差

像差在鏡頭折射形成影像時便會產生，其中一種是色差。色差形成之原因是因為玻璃的折射率會隨波長改變。另外一種像差則是單色差，發生的原因則是鏡片的曲度，與光的波長無關。單色差表現在五種所知的像差中，也就是我們所謂的賽得爾 (Seidel) 五像差。這五種像差包括色差、球面像差、彗形像差、像散性及像場彎曲。因為這些均與影像高度有關，使得長焦距對於改進這些像差得到非凡的成就。

## 五、減少色差

在舊有的補償長焦距呈像系統中，僅使用目鏡來更正物鏡的橫向色差。在無限遠光學系統卻可以用筒鏡做物鏡橫向色差之補償。在此一方式下，因為上述原理，減少橫向色像差變得較為容易。

如果我們在利用第一次呈像空間時，只使用物鏡，則我們必須做出一個新的設計，來做橫向之消除像差的工作。CFI 光學系統可以分別對物鏡和筒鏡獨立調節其縱向及橫向色差 (圖 6)。

越長的焦距造成越多的色差消除問題，因為色差與物鏡焦距及玻璃的色散度成正比。也就是物鏡的焦距越長，色散比例越大。以  $60 \text{ mm}$  來作為物鏡同步對焦的焦距，對於得到矯正色差的效果，及適應較大的  $200 \text{ mm}$  筒鏡距離都是很重要的。

## 六、結論

光學無限遠顯微系統 (CFI) 於 1996 年被開發成功，其目的在光學顯微鏡之理論及應用方面都臻

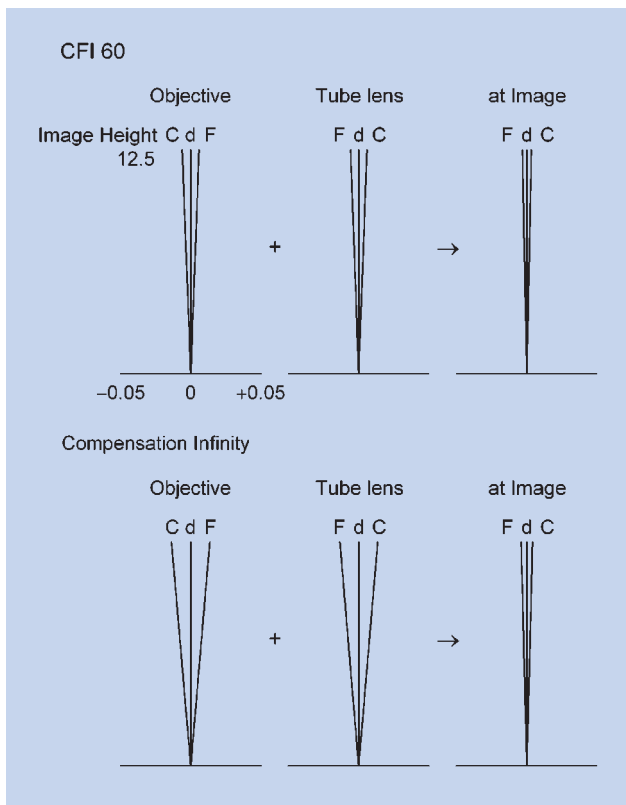


圖 6. 橫向色差之補償方法。

於完善。以 CFI 光學系統對於無限遠光學作了重新的定义，由於 CFI 光學系統之筒鏡新增加了平行光原理，使 200 mm 對焦長度、60 mm 同步焦距、25 mm 鼻輪直徑此一系統，完成了許多光學上的性能改善。例如較長工作距離、較高 NA 值、提供 0.5 倍物鏡做觀察、更清晰的微分干涉差、更長的第一次呈像空間，以及視野平面之簡化。在此文章中，我們解釋了新一代的顯微鏡工作方式，也比較了前一代的形式，並指出了新設計的優勢。

在 CFI 光學系統中，色差分別在物鏡及筒鏡

中被消除，CFI 光學延展了第一次呈像空間的有效利用，並使視野周邊可以有清晰的影像。歐系與日系光學方面的成就自是不可同日而語，然而，日系光學系統投注之研發心力、人力，使其原先處於落後之地位亦迎頭趕上。不難想像其對人類日後無論在科技之發展及生活品質之提升方面，都會有莫大的影響。如果此光學系統介紹能夠帶來在顯微鏡上的深思與應用，特別是在 Nikon CFI 光學的領域中更進一步的發展，吾人值得去學習及探討。

## 誌謝

本文係日本 Nikon 株式會社大瀧達朗技師提供基本資料，並參考國祥、美嘉、台灣、元利股份有限公司之說明書，編撰而成，特致謝意。感謝集可企業祁敏先生之協助，更感謝台灣大學物理系蔡尚芳教授之指正，使本文順利完成。

## 參考文獻

1. T. G. Rochow and P. A. Tucker, *Introduction to Microscopy by Means of Light, Electron, X-rays, or Acoustics*, 2nd ed., New York: Plenum Pub. Co. (1997).
2. S. Anzai, *American Lab.*, **4**, 50 (1978).
3. M. Spencer, *Fundamentals of Light Microscopy*, London: Cambridge Univ. Press (1982).
4. M. J. Abramowitz, *Am. Biotech. Lab.*, **7** (4), 42 (1989).
5. Nikon Corporation, *The New-generation Research Microscopy-Eclipse E 800 Redefines Infinity*, Nikon E-News August 1996. Nikon Co., Tokyo, Japan (1996).
6. S. Bradbury and B. Bracegirdle, *Introduction to Light Microscopy*, Hong Kong: Springer-Verlag (1997).
7. 福井希一，染色體—genome 解析機器之最近進步；福井編，Chromosome—植物染色體情報之解析與利用，Tokyo: Universal Academy Press, Inc. (1998).