

Micro Mapping System Calibration

鄭泊聲*

11th SEP. 2020

本系統由一組以 Canon EOS RP 數位單眼為基礎的光學顯微鏡, 與一組雷射掃描共厄焦顯微鏡 LSCM 結合, 系統的結合目標是讓使用者能夠在視野範圍相當大的 OM 中選取 ROI, 再到 LSCM 下做觀測。以 Suzuga seiki K102 motorized stage 加上 D212 controller 為載物平台系統, 在兩部顯微鏡之間移動。本報告簡要描述我如何校正本系統的光路及座標。

1 OM

OM 系統沿用 Canon OM, 採用 20 公分的 tube lens 以及 SM2 光路。除了各部件的垂直水平外,¹ 這個系統的校正, 主要在於以下兩部分:

1. 焦距的匹配
2. 可視範圍與暗角

1.1 焦距匹配

本系統中載物平台位於第一層光學板上, 而兩部顯微鏡系統位於第二層光學板上。Canon OM 是以可調高度的支柱裝置於第二層光學板上。因此 Canon OM 的高度調整有以下兩個可變動構件:

1. 兩層光學板間的可調式支柱

*台大經濟系大二, 雙主修生物機電工程學系。聯絡: b07611002@ntu.edu.tw

¹本系統爲了要對齊 LSCM 與 stage, 部分零件並沒有達到水平。

2. Canon OM 裝置於第二層光學板上的可調式支柱

透過調整這兩個構件的高度，希望可以達到當 Canon OM 的物鏡載台調整到最下方時，正好能對焦到載物平台，一旦達成該目標，即確保所有置於載物平台之上的物體，都能清楚被對焦。由於該物鏡高度還須與 LSCM 的物鏡對齊，再綜合其中各個構件的可調範圍後，第二層光學板的支柱高度必須比其的最低高度抬升約 2mm。

1.2 可視範圍與暗角

該部分的調整較為單純，透過相機畫面觀察，調整各個轉接盒中 beam splitter 或反射鏡的角度，即可平移影像，求得最大的可視範圍與最輕微的暗角。

2 LSCM

雷射掃描共軛焦顯微鏡的校正，主要集中在光路的部分。由於爲了在光學板上裝置鋁擠型，整體 LSCM 有稍微移動，爲了確保光路筆直且準確對焦，又執行了以下兩項校正：

1. 光路筆直: extended tube + pinhole
2. 準確對焦: Ocean Optics USB2000 光譜儀

2.1 光路筆直

爲了確保光路在 tube 中筆直前進，先將雷射光抵達物鏡前的直角轉接箱拆下，裝上靶心 (在 a 處)，發現雷射光並沒有準確打在中心，此時接著調整其中一面反射鏡 (α 鏡) 的角度，直到雷射光準確打至中心爲止。接著拆下靶心，裝上一延伸管，再裝上靶心 (在 b 處)，此時發現雷射光又偏離靶心，其光路仍然非筆直。於是調整另一面反射鏡 (β 鏡)，直到雷射光於此延伸管末端處也能打至正中央爲止。此時若將延伸管拆除，靶心再裝回原處 (a 處)，雷射光已經又偏離正中央。若雷射光能在兩處皆打至靶心正中央，即代表雷射光筆直且平行於 tube 前進，爲了達到此目標，再次調整原反光鏡 (α 鏡)，直到雷射光打至靶心中央。可以想見，此時若再將

靶心裝至 b 處, 雷射光又會偏離正中央, 因此需不斷重複上述兩個位置的校正, 才能讓雷射光在兩處都非常「逼近」靶心正中央。

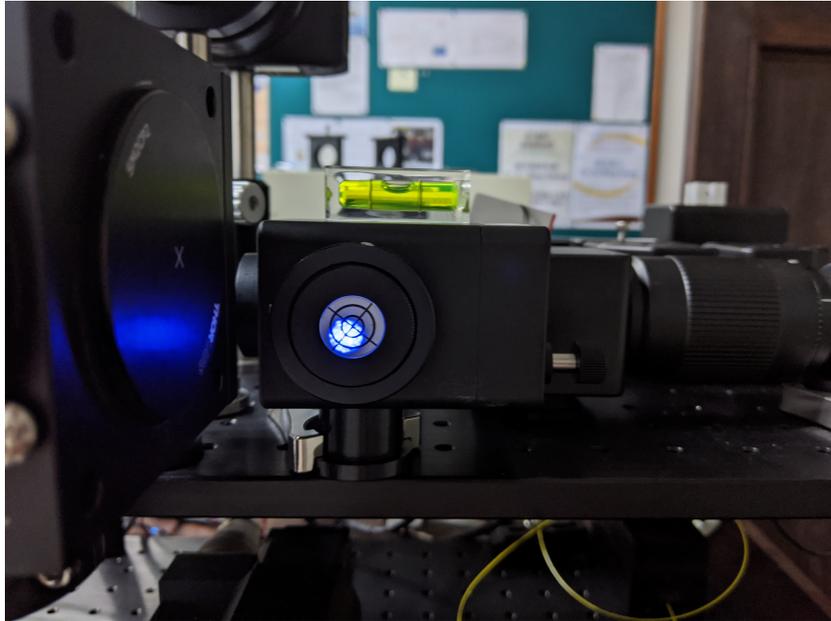


圖 1: 透過靶心校正雷射光的筆直。

2.2 準確對焦

爲了確保 LSCM 的反射光能在收光 fiber 處準確對焦, 以一簡單的光譜儀, 接至收光 fiber 接孔, 並旋轉可旋式鏡筒調整鏡片位置,²確保光譜儀呈現出的峰值能達到最大, 即訂爲最「準確對焦」之處。特別需要注意的是, 該調整過程中, 在很大的一段區間內, 光譜儀讀出的峰值都沒有顯著變化。

3 Motorized stage

3.1 定中點

訂出 stage 中點座標的方式, 基本上是先將 stage 移至大約中心處, 以這點爲原點, 並記錄該點 go org 後須走多少步進抵達該點。接著嘗試將 stage 向兩側移動

²該部分調整結束後,LSCM 系統又有更動, 原本調整的可旋式鏡筒已經移除, 因此本部分的校正並非系統的最終狀態。但該更動並非由我執行。

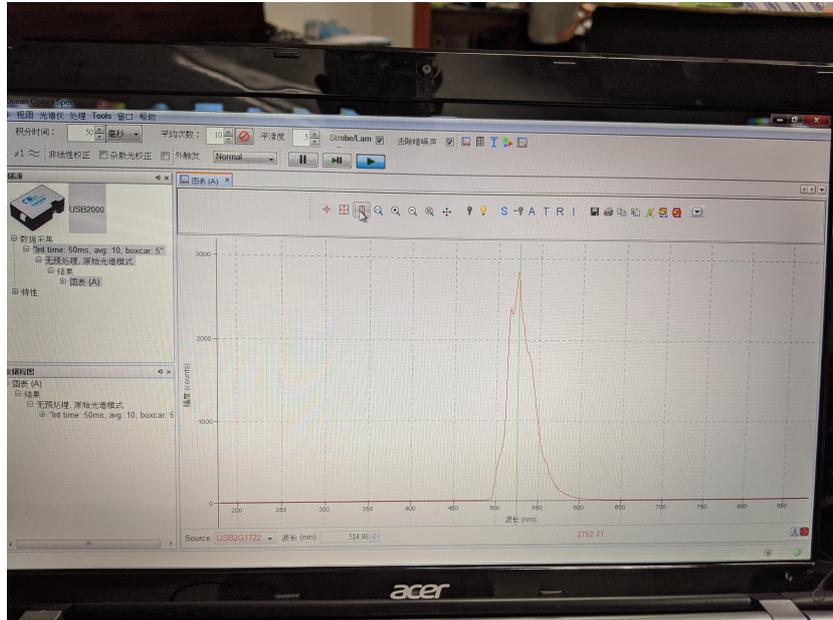


圖 2: 透過光譜儀校正 LSCM 反射光的聚焦。

約 4.5 公分，再以較小的步進（約 $100 \mu\text{m}$ ）向邊界推進。若在總移動距離（4.5cm + 幾個步進）達到 5 公分之前就已經先遇到 stage 的硬體極限，即再回到原初的原點，以剛才達到硬體極限的移動方向與步進數，稍微調整原點位置，直到從原點出發向兩側移動都能超過 4.9 公分，³即訂該原點為 stage 中點。

3.2 垂直水平移動

訂出 stage 中點後，將該中點與兩座顯微鏡的中點對齊，即可知道應將 stage 放置在何處。但 stage 放置的角度仍需要調整。以兩座顯微鏡觀測銅網螢光片，在初始狀態下，就算將銅網的擺放角度調整至與成像畫面水平垂直，移動 stage 時，會發現銅網網格並沒有水平垂直的移動。舉例，將 stage 垂直（y 軸）移動時，若 stage 與顯微鏡系統的成像達成垂直水平，理論上網格中的 y 軸格線不應該有任何 x 方向的偏移，但起初在影像上這樣的偏移非常明顯。簡而言之，這個狀況代表 stage 只有移動 y 方向，但畫面卻同時有 x 與 y 方向的移動。

³以 go org 所訂出的機械原點，並非 stage 真正的硬體極限，但從該 go org 所訂出的機械原點出發，並不能真的往反方向移動 10 公分（會先遇到另一側的硬體極限），亦即 stage 真正可用的移動範圍並不足 10 公分，因此不建議從中點向兩側推進超過 4.9 公分。詳見我的另一份報告。

校正方式簡述如下：

1. 些微旋轉 stage 擺放角度。
2. 旋轉網格螢光片的擺放角度，直到其網格與成像畫面垂直水平。
3. 單向移動 stage，觀察網格是否有另一方向的偏移。
4. 根據網格的偏移方向，再回到步驟 1 做調整。

這部分的校正式個人認為做困難的一項，主因是並沒有合適的工具去微調 stage 或銅網螢光片的角度，只能透過手部去做推移，很難控制如此微小的轉量。由於校正後期每次的偏轉量都很小，主要都是以 LSCM 的 PMT 畫面作為觀測依據。

4 Offsets Measurement

本分部主要是需要量測以下幾組數據：⁴

1. go org 後,x 軸需移動 18213、y 軸需移動 57520 個步進，使 stage 的中心抵達 Canon OM 的畫面中心。將該點訂為 stage 座標的原點。
2. 從原點出發，移動至 (28977, 0) 處，即為 stage 的中點。
3. 將 stage 移動至 (66382, -2870)，此時 stage 的中心抵達 LSCM 的畫面中心。

4.1 中點對齊

為了得知 stage 移動到何處時，其中心會正好對準畫面中心，首先將螢光片的角落，對準放置在 stage 上中心點的鉛筆線十字處。接著將 stage 移動到畫面下。

- 在 Canon OM 畫面下，使用相機或軟體的網格判斷，以 stage 將螢光片的角落對準畫面中心，並記錄 stage 座標。

⁴在校正完之後，stage 的機械原點稍有偏移，因此本部分描述的座標值不再適用。

- 在 LSCM 畫面下，透過 Scanner 軟體的 ROI 工具計算畫面中螢光片所占位置，當螢光片在畫面中所占範圍正好是 1/4 且集中在畫面角落時，就代表此時 stage 中心對準 LSCM 畫面中心。

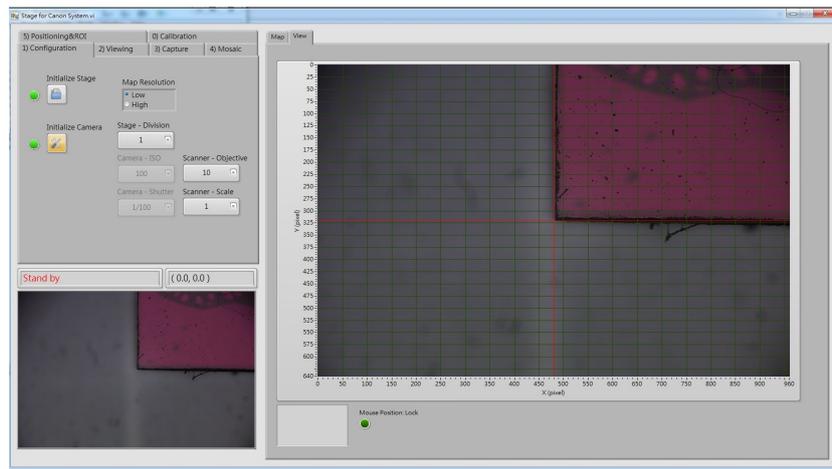


圖 3: 使 OM 的畫面中心與 stage 中心對齊。

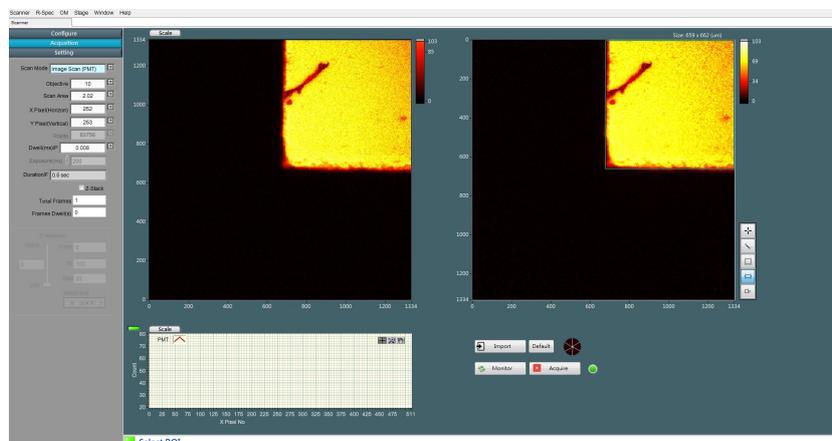


圖 4: 使 LSCM 的 PMT 畫面中心與 stage 中心對齊。掃描尺寸為 512×512 , ROI 選取範圍的尺寸 252×253 。此為 flip-y 模式下的畫面，與肉眼所見的相對位置相同。

4.2 座標系統

訂出兩座顯微鏡的畫面中心座標後，將其與原先紀錄的原點與 go org 後位置之距

離, 做簡單的計算, 即可得知 Canon OM 畫面中心與 go org 後位置的距離, 並以此資訊將 Canon OM 畫面中心定為整個系統的原點。同時, 也可以算出 stage 中心點、LSCM 畫面中心在系統的座標。