

國立臺灣大學工學院機械工程學研究所

碩士論文



Department of Mechanical Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master's Thesis

樂高層光顯微鏡研製於試件微變形量測與分析之應用

Development of LEGO-Based Light Sheet Microscope for Micro-
Deformation Measurement and Analysis of Specimens

黃文城

Wun-Cheng Huang

指導教授：王建凱 博士

Advisor: Dr. Chien-Kai Wang

中華民國 113 年 7 月

July 2024



誌謝

首先，我要由衷的感謝我的指導教授王建凱教授，感謝您在整個研究過程中提供的寶貴指導和不懈支持。您的專業知識、耐心和鼓勵使我能夠克服研究中的種種挑戰，順利完成論文。就算在休息時間，您也是不厭其煩的回應我，讓我在研究上面對困難時可以立即獲得指導，從訂定論文題目開始，到最後完成研究，若沒有您的幫忙，我無法想像這將會是一個多麼困難的過程，您的專業知識與寶貴建議對我完成研究起到了非常大的幫助。同時，也非常感謝吳筱梅老師、董奕鍾老師、陳壁彰老師、鍾孟庭博士與詹國基老師的殷勤指導，參與我學位論文的口試並給予我珍貴的建議與指教。

我也非常感謝我的父親與母親的支持，讓我可以無後顧之憂的完成我的碩士學位。也要感謝實驗室的學長柯秉良以及同學周嶧毅、林柏廷、蔡汶憲、何書鳴、李庭屹、陳宣仔、廖紹宏、曾高捷、楊昕珮，謝謝你們願意和我一起討論研究、一起吃飯、一起唱歌、一起出遊，有你們的陪伴讓我的碩士生活變得更多采多姿。

最後，也感謝在研究過程中提供過幫助和支持的所有人。有你們的關心和幫助，才能讓我順利完成論文，感謝你們的付出和幫助。

黃文城 筆於 2024/07/16 台北公館



摘要

數位影像關聯法（Digital Image Correlation, DIC）為一種非接觸式的光學量測技術，可應用於跨尺度與跨領域的工程問題以及實驗力學研究上，其原理為透過數位影像分析，追蹤樣本影像表面特徵產生的變化，來取得樣本的位移場與應變場等物理量；於先進光學技術方面，層光顯微鏡具備高訊躁比、快速的影像採樣速率以及較低的生物光毒性與光損傷效應等特點，使其被廣泛運用在生物醫學領域，小至單細胞到大型生物器官都能夠進行觀測。本論文首先將介紹樂高層光顯微鏡的系統設計以及搭建步驟，並在樂高層光顯微鏡之載物台上將樣本進行平移與旋轉以及引致變形的操作，再以數位影像關聯法量測樣本的位移場，並將量測位移量與理論值對照是否相符，以此方法來驗證樂高層光顯微鏡系統的穩定度。

論文內容：第一章說明了本論文的研究動機與背景，並簡要介紹本研究開發的技術和相關應用的方法；第二章將介紹層光顯微技術的發展歷史以及層光顯微鏡運作的原理，並描述層光顯微鏡的特點，以及其適合觀察生物樣本的優勢；第三章將介紹數位影像關聯法數學理論，並說明如何在 MATLAB 中操作數位影像關聯法開源軟體 NCORR；第四章為以樂高積木搭建層光顯微鏡的詳細說明，也會一併介紹顯微鏡各項元件與控制系統，並展示以樂高層光顯微鏡觀察樂高積木樣本的成果；第五章為以數位影像關聯法分析光學量測影像的結果；第六章為本論文結論與未來展望。

關鍵字：層光顯微術、樂高、實驗力學、數位影像關聯法、微變形量測分析



Abstract

Digital Image Correlation (DIC) is a non-contact optical measurement technique that can be applied to cross-scale and cross-domain engineering problems as well as experimental mechanics research. The principle of DIC is to track the changes in the surface features of a sample through digital image analysis to obtain the physical quantities such as displacement field and strain field of the sample. Light sheet microscopy, characterized by high signal-to-noise ratio, rapid image sampling rates, and lower biological phototoxicity and photodamage effects, is widely used in the biomedical field, and enabling observation ranging from single cells to large biological organs. In this paper, we will firstly introduce the system and the construction steps of the LEGO light sheet microscope, then observe the sample on the microscope's stage through translation, rotation, and deformation, and then measure whether the displacement field of the samples matches with the actual displacement by digital image correlation method, so that the stability of the LEGO light sheet microscope can be verified.

Paper content: Chapter 1 provides a literature review on the development and background of the digital image correlation method and light sheet microscopy. Chapter 2 introduces the development history of light sheet microscopy technology, and the principle of operation of light sheet microscope, then compares the advantages and disadvantages of layered light microscopy. Also show the reasons why it is suitable for observing biological samples. Chapter 3 introduces the theory of digital image correlation and explains how to operate NCORR for digital image correlation in MATLAB. In Chapter 4, we will detail how to build a simple light sheet microscope using LEGO bricks, as well as introduce the microscope's control system and experimental procedures of digital image correlation measurements. Chapter 5 presents the measurement results of digital image correlation and compares them with experimental data for discussion. Chapter 6 concludes the paper and provides future prospects.

Keywords: Light Sheet Microscope, LEGO, Digital Image Correlation, Micro-Deformation Measurement and Analysis.



目次

誌謝	iii
摘要	ii
Abstract.....	iii
目次	iv
圖次	vi
表次	ix
第一章 緒論	1
1.1 研究動機	1
1.2 研究背景	2
1.3 研究方法	4
1.4 研究內容	4
第二章 先進層光顯微鏡原理與介紹	5
2.1 層光顯微鏡的發展與運作原理	5
2.2 虛擬層光技術介紹	8
2.3 層光顯微鏡與雷射掃描共軛焦顯微鏡之比較	10
2.3.1 成像速度	11
2.3.2 對生物樣本造成的傷害	11
2.4 層光顯微鏡的基本構造	12
第三章 數位影像關聯法應用原理與實作	13
3.1 數位影像關聯法介紹	13
3.2 數位影像關聯法原理	15
3.3 數位影像關聯法軟體 Ncorr 實作	19
第四章 樂高層光顯微鏡系統搭建與分析	25
4.1 搭建樂高層光顯微鏡系統之零件介紹	25



4.1.1	樂高顯微鏡支架與實驗載台	25
4.1.2	樂高顯微鏡支架與實驗載台	31
4.1.3	樂高層光顯微鏡光學成像與觀測系統	33
4.2	樂高層光顯微鏡的組裝流程	36
4.3	樂高層光顯微鏡的操作步驟與實驗流程	40
4.4	樂高層光顯微鏡觀測樂高積木樣本之成果與討論	45
4.4.1	透明方形樂高積木之觀測	45
4.4.2	透明橋形樂高積木之觀測	47
4.4.3	特殊形狀樂高積木之觀測	49
4.4.4	樂高積木在微觀尺度下之觀測	51
第五章	數位影像關聯法分析結果	54
5.1	數位影像關聯法實驗	54
5.2	巨觀尺度分析	54
5.2.1	平移剛體運動分析	54
5.2.2	旋轉剛體運動分析	57
5.2.3	壓印變形分析	59
5.3	微觀尺度分析	63
5.3.1	平移剛體運動分析	63
5.3.2	旋轉剛體運動分析	65
5.4	懸臂樑實驗分析	67
5.4.1	巨觀尺度下之懸臂樑實驗分析	67
5.4.2	微觀尺度下之懸臂樑實驗分析	69
第六章	結論與未來展望	71
6.1	結論	71
6.2	未來展望	71

圖次



圖 2-1 層光螢光顯微技術示意圖	6
圖 2-2 層光顯微技術擷取三維空間影像的方式	6
圖 2-3 多視角擇面照明螢光顯微術示意圖	7
圖 2-4 高斯光束(上圖)與貝索光束(下圖)示意圖	8
圖 2-5 貝索光束在背景值產生的同心圓	9
圖 2-6 雷射掃描共軛焦顯微鏡構造與成像原理	10
圖 2-7 共軛焦顯微鏡(左側)與層光顯微鏡(右側)成像方式的差別	11
圖 2-8 層光螢光顯微鏡基本構造示意圖	12
圖 3-1 數位影像關聯法特徵點追蹤示意圖	13
圖 3-2 數位影像關聯法操作流程	14
圖 3-3 參考坐標系與參考影像(左側)、目前座標系與目前影像(右側)	16
圖 3-4 NCORR 操作介面	20
圖 3-5 NCORR 參考影像(左)與目前影像(右)設定	21
圖 3-6 ROI 設定	21
圖 3-7 NCORR 參數設定	22
圖 3-8 NCORR 子集合中心位置設定	22
圖 3-9 數位影像聯法影像像素與實際尺寸轉換設定	23
圖 3-10 數位影像關聯法設定完成畫面	23
圖 3-11 調整數位影像關聯法分析結果參數	24
圖 4-1 樂高基板	26
圖 4-2 樂高積木組合支架結構	26
圖 4-3 具備平移機構之載物台	28
圖 4-4 具備旋轉機構之載物台	28
圖 4-5 觀察樣本變形實驗時之壓印機構	29



圖 4-6 顯微鏡控制系統與無線操控搖桿	31
圖 4-7 雷射光源與裝設於前方之柱面透鏡	34
圖 4-8 樹莓派與相機模組	34
圖 4-9 放大物鏡與 3D 列印之鏡頭座	34
圖 4-10 樂高層光顯微鏡組裝步驟流程圖	36
圖 4-11 樂高基板安裝完成圖	37
圖 4-12 控制系統安裝完成圖	38
圖 4-13 樂高層光顯微鏡各部件相對位置與光路示意圖	39
圖 4-14 樂高層光顯微鏡操作流程圖	40
圖 4-15 使用 ARDUINO IDE 編譯器上傳控制程式	42
圖 4-16 進入樹莓派 RASPI 設定畫面將相機功能開啟	43
圖 4-17 使用樹莓派內建軟體以程式控制相機模組運行	44
圖 4-18 輸入指令開啟相機預覽視窗調整拍攝參數	44
圖 4-19 方形樂高積木三視圖(A:15.8MM、B:9.6MM)	45
圖 4-20 尚未開啟層光功能拍攝之樂高積木	46
圖 4-21 左側為層光照射樣本之示意圖、右側為實際拍攝樣本照片	46
圖 4-22 左側為層光照射樣本之示意圖、右側為實際拍攝樣本照片	47
圖 4-23 橋形樂高積木三視圖(A:7.8MM、B:15.8MM、C:30.5MM)	47
圖 4-24 尚未開啟層光功能拍攝之橋形樂高積木	48
圖 4-25 左側為層光照射樣本之示意圖、右側為實際拍攝樣本照片	49
圖 4-26 特殊形狀樂高積木三視圖(A:30.5MM)	50
圖 4-27 上層為尚未使用層光拍攝之圖片、下層為使用層光後凸顯的樣本特徵 ..	51
圖 4-28 特殊形狀樂高巨觀(左側)與微觀(右側)尺度比較圖	52
圖 4-29 使用層光技術觀測微觀尺度下的樂高積木表面	52
圖 4-30 微觀尺度下直接觀察樣本(左側)與使用層光技術觀察樣本(右側)	53

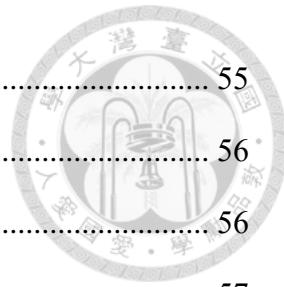


圖 5-1 數位影像關聯法分析之參考影像(左)與目前影像(右).....	55
圖 5-2 樣本位移時 X 方向的位移量 U	56
圖 5-3 樣本位移時 Y 方向的位移量 V	56
圖 5-4 數位影像關聯法分析之參考影像(左)與目前影像(右).....	57
圖 5-5 樣本位移時 X 方向的位移量 U	58
圖 5-6 樣本位移時 Y 方向的位移量 V	58
圖 5-7 數位影像關聯法分析之參考影像(左)與目前影像(右).....	59
圖 5-8 樣本受輕壓狀態下的 X 方向變形量(上圖)與 Y 方向變形量(下圖)	60
圖 5-9 樣本受重壓狀態下的 X 方向變形量(上圖)與 Y 方向變形量(下圖)	61
圖 5-10 樣本在卸載狀態下的 X 方向變形量(上圖)與 Y 方向變形量(下圖)	62
圖 5-11 數位影像關聯法分析之參考影像(左)與目前影像(右).....	63
圖 5-12 樣本位移時 X 方向的位移量 U	64
圖 5-13 樣本位移時 Y 方向的位移量 V	64
圖 5-14 數位影像關聯法分析之參考影像(左)與目前影像(右).....	65
圖 5-15 樣本位移時 X 方向的位移量 U	66
圖 5-16 樣本位移時 Y 方向的位移量 V	66
圖 5-17 數位影像關聯法分析之參考影像(左)與目前影像(右).....	67
圖 5-18 樣本位移時 X 方向的位移量 U	68
圖 5-19 樣本位移時 X 方向的位移量 U	68
圖 5-20 數位影像關聯法分析之參考影像(左)與目前影像(右).....	69
圖 5-21 樣本位移時 X 方向的位移量 U	70
圖 5-22 樣本位移時 Y 方向的位移量 V	70

表次

表 4-1 樂高層光顯微鏡支架零件表	27
表 4-2 樂高層光顯微鏡實驗載台零件清單	30
表 4-3 樂高層光顯微鏡實驗載台零件清單	32
表 4-4 樂高層光顯微鏡光學與觀測系統零件清單	35





第一章 緒論

1.1 研究動機

在生醫研究領域中，觀察生物器官內部的原始影像始終是科學家們想要努力解決的難題，從最早的顯微技術發展至今，科學家們發明了各種類型的顯微影像技術運用在生物及醫學樣本上，隨著時間的演進，許多未曾遇到的生物謎題慢慢浮現眼前，對於複雜和活體生物樣本的觀察需求日益增長，並且科學家們開始希望觀察生物樣本的內部構造時，不必再像早期的顯微術，需要將樣本切割妥善處理後，還必須在有限的時間內做好觀察與記錄，因此許多非破壞性的顯微術進而開始誕生，層光顯微術便是其中之先進研究。因為層光顯微鏡可以提供良好的三維空間分辨率、高訊躁比以及成像快速等許多優點，並且對生物樣本的損壞效果非常小，讓其在現代生醫領域扮演了非常重要的角色。而為了研製原型顯微光學設備，使用層光對宏觀乃至微觀尺度的樣本進行觀察，因此本論文嘗試開發一套使用者自行操控並且使用樂高積木搭建的樂高層光顯微鏡系統，並且利用數位影像關聯法 (Digital image correlation, DIC) 觀察層光顯微鏡樣本移動與變形引致的位移場與實際位移量相比對，來確認層光顯微鏡的成像品質是否受到機構運作產生的誤差所影響。

本論文主要分成三個部分，第一部分是層光顯微技術的發展歷史與演進以及層光顯微術使用的原理與其在現代生醫領域上的應用。接著介紹數位影像關聯法軟體 Ncorr[22]影像辨識原理以及操作過程。第二部分為層光顯微鏡系統的搭建，將詳細說明搭建顯微鏡所需的樂高與電子零件、樂高層光顯微鏡的詳細操作方法，以及進行數位影像關聯法實驗前的準備步驟。第三部分則是展示樂高層光顯微鏡使用數位影像關聯法的分析結果，透過分析樣本的運動、變形及懸臂樑實驗，觀察樂高層光顯微鏡整體系統的穩定性以及因機構作動可能產生的誤差。



1.2 研究背景

自十七世紀 Antoni van Leeuwenhoek 進行最早的顯微技術研究至今，已經發展出無數的顯微技術[1]，成為科學家觀察微觀尺度的關鍵基礎。隨著顯微鏡的改良與放大倍率的提升，微觀世界的樣貌也越來越被人們所發現。然而，在 1873 年由 Abbe 和 Helmholtz 首次發現了光學顯微鏡存在著繞射極限的現象，這是由於光的波動性造成的干涉與繞射，導致顯微鏡所能得到的最小解析度，僅能是二分之一個用來觀測的光波長，假如利用波長為 500 奈米的黃光進行觀測，其所能得到的最高解析度僅有 250 奈米。其中解析度極限 d 被定義為 $d = \frac{\lambda}{NA}$ ， λ 是光的波長， NA 為數值孔徑。由於繞射極限，使得光學顯微鏡在解析度有所侷限，為了使得光學顯微技術可以更加突破達到更高的解析度，科學家開始利用不同方式的光學設計來搭建顯微鏡，像是三維結構照明顯微技術（3D-SIM）[2]、光激活定位顯微技術（PALM）[3,4]、隨機光學重建顯微術（STORM）[5]和晶格層光顯微技術（LLSM）[6,7]來達到超越繞射極限的解析度。在眾多的顯微技術中，螢光顯微術最常被用作於觀察生物細胞或生物分子，藉由將螢光分子附著在細胞上特定的蛋白質，便可以從螢光的分布來了解細胞的微觀構造。然而縱使螢光顯微術不受繞射極限的阻礙，卻因其用來激發螢光分子的汞燈與雷射能量巨大，以傳統方式將光源照射在整片樣本上激發螢光，一段時間後便會對細胞產生損害。因此科學家開發出一種新技術，讓激發光源只精準地照射到生物樣品中所要觀察的焦平面上，減少不必要照明所產生的光毒性。由於只使用了薄薄的一層光源使螢光分子激發，因此對於生物樣本的損害尤其小，便在當今的生物醫學影像中至關重要。

近年來，層光顯微鏡在生物成像的研究中，大幅的發展與應用，層光顯微術的基本原理是產生一層薄薄的雷射光片，而雷射光片與相機的觀測方向垂直，通過物鏡照亮樣品的單一平面，將樣品沿著層光移動，便可以逐層地獲取影像，從而在整個樣品中快速獲得三維影像。此外，層光顯微鏡具有快速平面掃描器，如電子倍增感光耦合器（EMCCD）或金屬氧化物半導體（CMOS）的鏡頭，具有非常高的靈



敏度，可以進行高速記錄和高品質的成像。而由於層光顯微鏡的樣本只有小部分的區域會暴露在照射光下，因此它比傳統的光學共軛顯微鏡更具有優勢，例如：

- a. 減少樣本暴露在照射光之下，從而減少了光對細胞產生的漂白。
- b. 消除了光的散射效應，改善了信噪比，以及在焦平面的上方與下方不會對樣本造成損害。

然而，這些進步也帶來了一些技術挑戰，例如：當以非常高的解析度記錄三維影像時會產生大量的數據，在儲存和分析這些大量的影像不僅需要專用和穩定的軟硬體，還需要對大量的數據進行分析，而要如何快速地從層光顯微鏡拍攝的大量資料內篩選出有用的數據也成為一項新的挑戰。

本文將根據過去的參考文獻，介紹層光顯微鏡發展過程中使用的各種光學原理，各種類型層光顯微鏡的成像效果與應用，與搭建層光顯微鏡所需的基本零部件。並根據文獻中的基礎原理，使用容易取得的樂高積木搭建一組簡易型層光顯微鏡。綜觀文獻，層光顯微鏡因為有精密觀測的需求，常會將顯微鏡架設在光學防震桌上並搭配精密滑軌，以減少樣品在位移時產生誤差。考量上述震動誤差，本研究亦確認樂高層光顯微鏡載台是否能夠獲得精準的位移量，本文將使用數位影像關聯法量測載台移動時產生的位移量，以進行以上確認程序，得知本論文研究搭建顯微鏡，具有一定程度的準確度，得以於微小尺度拍攝樣本照片。



1.3 研究方法

本研究論文從事中央研究院應用科學研究中心陳壁彰老師指導之層光顯微技術，以樂高積木為架構，搭配 3D 列印零件、步進馬達及樹梅派相機等元件，開發建構了一款具備基礎層光及顯微功能的樂高層光顯微鏡。並透過此樂高層光顯微鏡作為實驗平台，對載物台上的樣本進行了位移及變形的操控，並利用顯微鏡觀測樣本的變化。同時，我們採用數位影像關聯法來量測樣本的位移及變形場，並將實驗數據與計算結果進行對比分析，以評估樂高層光顯微鏡系統的精度及穩定性。

1.4 研究內容

論文內容：第一章回顧數位影像關聯法與層光顯微技術的發展背景與相關研究文獻。第二章將介紹層光顯微技術的發展歷史以及層光顯微鏡運作的原理，並比較層光顯微鏡的優缺點以及其適合觀察生物樣本的原因。第三章將介紹數位影響關聯法的理論，並說明如何在 MATLAB 中操作數位影響關聯法開源軟體 NCORR。第四章我們將詳細介紹如何使用樂高積木搭建簡易的層光顯微鏡，也會一併介紹顯微鏡的控制系統以及進行數位影像關聯法量測的實驗步驟。第五章將呈現數位影像關聯法的測量結果，並將結果與實驗數據進行比較討論。第六章為本論文的結論與未來展望。



第二章 先進層光顯微鏡原理與介紹

本章節將探討先進層光顯微鏡的發展歷程[8]，介紹層光顯微技術的原理，並與傳統顯微技術進行比較，分析其差異與優缺點。同時，本章節將詳細說明搭建層光顯微鏡所需的各項必要元件，並探討層光顯微鏡目前在各項領域上的應用情況。

2.1 層光顯微鏡的發展與運作原理

在 1903 年，層光(Light sheet)的概念被首次提及，在當時由德國的科學家 Siedentopf 與 Zsigmondy 開發的一種超顯微術(Ultramicroscopy)[9]，透過聚焦陽光產生的層光來觀察奈米尺寸的黃金顆粒。但真正的應用在顯微技術上是在 1993 年由 Voie 實驗室所提出的正交平面螢光光學切面(Orthogonal plane fluorescence optical sectioning, OPFOS)[10]，其原理是透過圓柱透鏡聚焦雷射光產生的層光，經過掃描樣本之後，產生三維的影像。如圖 2-1 所示，為基本的 OPFOS 架構，也就是現今常稱的層光螢光顯微技術(Light sheet fluorescence microscopy, LSFM)，在這個系統中，層光是利用圓柱透鏡所產生。架設方面有兩個正交物鏡，一個為激發物鏡，用來產生層光，另一個為偵測螢光訊號的偵測物鏡，並將樣本置於兩個物鏡之間，透過可以移動 x、y、z 方向以及旋轉角度 r 的四維平台進行控制，而透過移動四維平台控制待測物樣本通過雷射掃描，記錄不同位置下樣本截面的變化，再組合成三維影像如圖 2-2 所示，便是發展層光顯微鏡最主要達成的技術。

在 1995 年，Stelzer 和 Lindek 詳細討論了層光螢光顯微鏡 (LSFM) 的理論和設計。在這些研究中，使用針孔來塑造光源的形狀，並將激發物鏡安裝在與偵測物鏡呈 102° 的位置。該系統也被稱為共焦 theta 顯微鏡[11]。儘管 Voie 在 1993 年就推廣使用層光作為生物影像的成像工具，但層光的技術直到 2004 年才開始蓬勃發展。2004 年，Huisken 等人將層光的技術應用在螢光顯微鏡上，也就是所謂的擇面照明螢光顯微術 (Selective plane illumination microscopy, SPIM)[12]來觀察青鱈和黑腹果蠅的胚胎。此系統的基本設計與 OPFOS 類似，使用柱面透鏡來產生層光，並將偵測物鏡放在與照明物鏡垂直的位置。

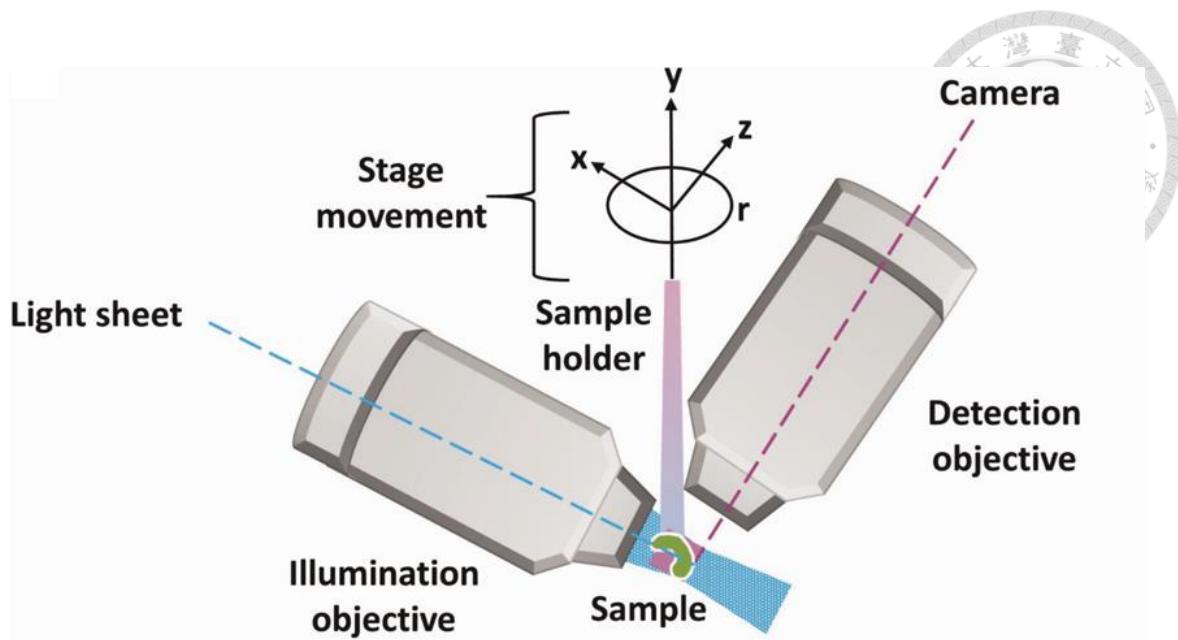


圖 2-1 層光螢光顯微技術示意圖[10]

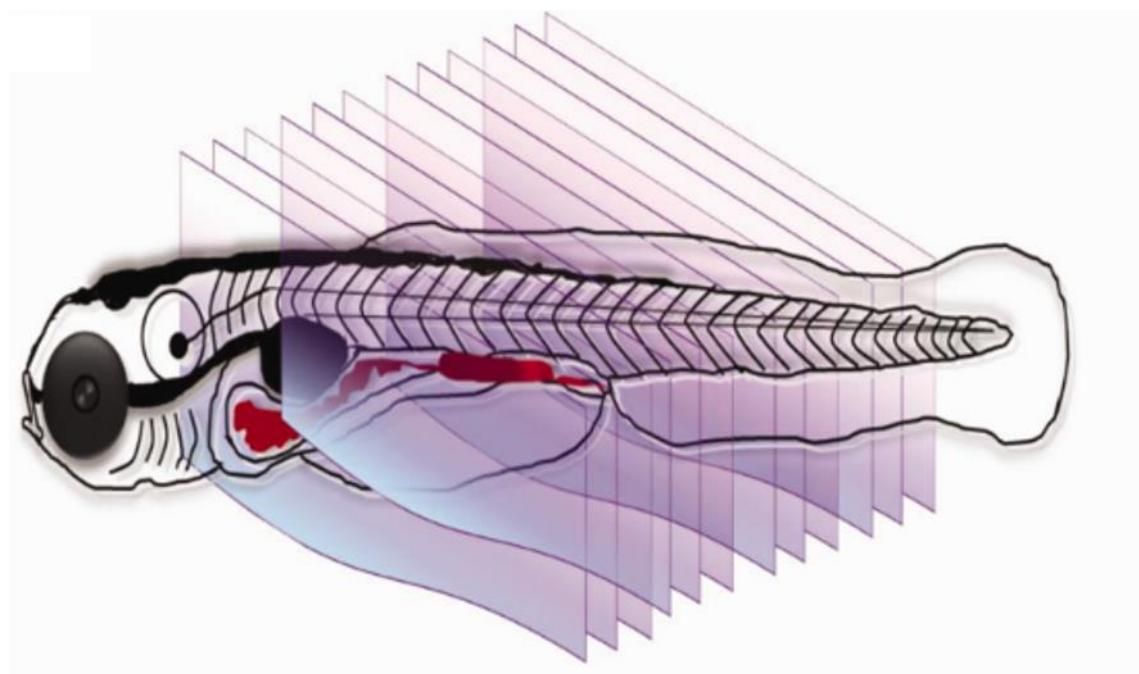


圖 2-2 層光顯微技術擷取三維空間影像的方式[10]



2008 年，為了實現大型標本的快速成像以及良好的成像質量，Keller 等人開發了數位掃描式雷射層光螢光顯微鏡（DLSM）[13]。這項技術的基本概念是利用雷射掃描儀和 f-theta 透鏡，通過快速掃描雷射穿透樣本，形成虛擬的層光。該系統的主要優點在於，通過掃描整個樣本的雷射光線，可以產生出均勻強度的層光，這對於大型樣本的定量成像非常適合。此外，這項技術還允許在許多不同方向上對單一個樣本進行成像，從而增加了觀察樣本時獲取的資訊量。

而自從 SPIM 和 DLSM 技術的開發，這些發展大量改善了層光顯微鏡的成像性能。然而，在層光顯微鏡中，單一的光源使層光只照亮樣本的一部分，而光穿過樣本造成的散射和吸收對大型樣本來說尤為嚴重。因此，科學家認為有必要從不同的角度對大型樣本進行成像，以減少散射和吸收造成的失真。然而，如果要旋轉樣本的話卻會帶來其他缺點，諸如層光對齊不準、時間上的限制等。為了解決這些問題，Krzic 等人開發了多視角層光顯微鏡（MuVi-SPIM）[14]。多視角層光顯微鏡如圖 2-3 所示，利用四個物鏡（兩個對立的雷射光源和兩個對立的觀測物鏡）沿著兩個垂直軸進行架設，從而達到同時間內記錄四個不同方向的三維影像。

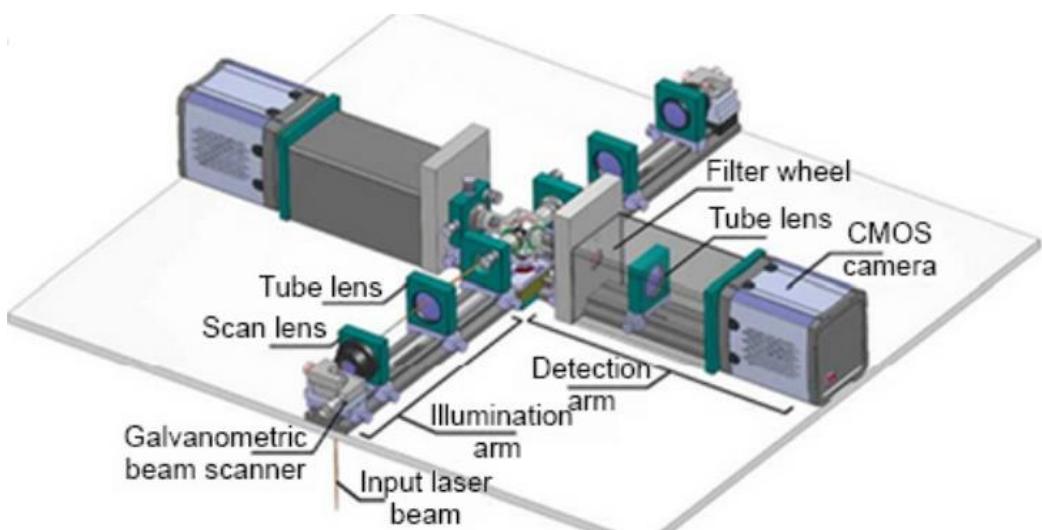


圖 2-3 多視角擇面照明螢光顯微術示意圖[14]



2.2 虛擬層光技術介紹

除了針對系統上的改進，科學家們為了提高層光顯微術在空間中的解析度，因此開始研究如何才能形成更薄的層光，與之而來的便是虛擬層光技術的發展。在標準的層光螢光顯微鏡中通常使用高斯光束(Gaussian beam)來產生層光，雖然其產生的層光可以成功的觀測到活體動態變化，但是因為高斯光束太厚的關係，所以影像解析度不夠應用於更微小的結構觀察。所以為了解決此一現象，貝索光束(Bessel beam)便油然而生[15]。如圖 2-4 所示，為高斯光束與貝索光束的示意圖[16]，貝索光束改善了高斯光束太厚和光束太短的缺點，透過產生環狀光束投射在激發物鏡的後瞳處(rear pupil)，產生出更薄且更長的光束。然而由於貝索光束的特性會在背景值產生許多的同心圓如圖 2-5 所示，還是會對樣本造成些許的影響，因此科學家們利用方法，同時產生約 100 多束的貝索光束，經由彼此間的光學干涉，而形成背景值較低且超薄光束，而這項技術則被稱之為晶格層光顯微術[17]。

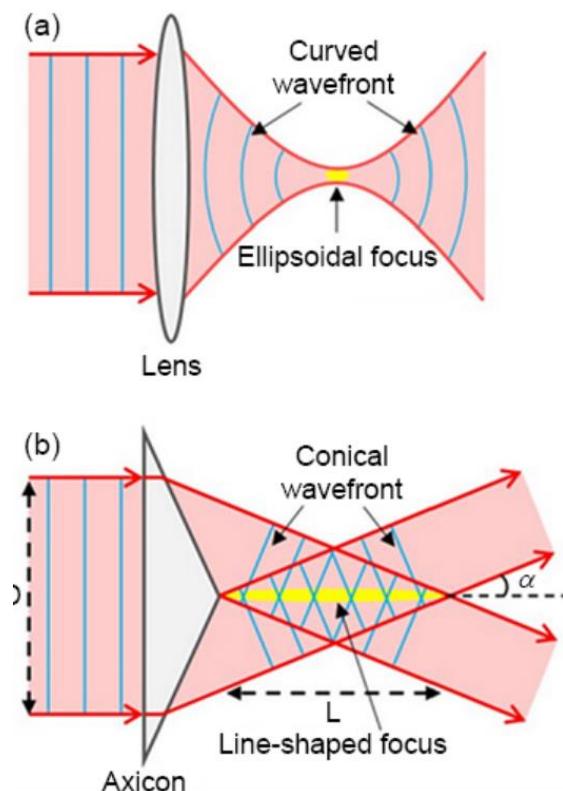


圖 2-4 高斯光束(上圖)與貝索光束(下圖)示意圖[16]

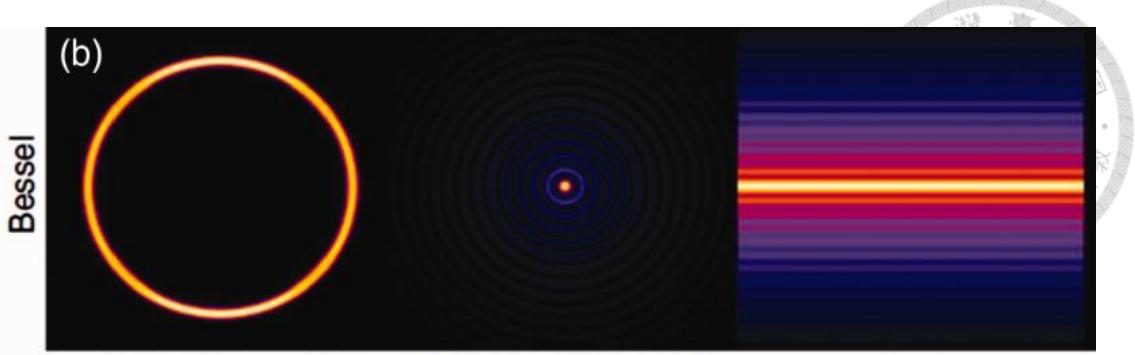


圖 2-5 貝索光束在背景值產生的同心圓[7]



2.3 層光顯微鏡與雷射掃描共軛焦顯微鏡之比較

本小節將說明，層光顯微鏡與雷射掃描共軛焦掃描式顯微鏡的差異，並說明兩者相比較後，層光顯微鏡的優勢。

雷射掃描共軛焦顯微鏡做為生物醫學影像中廣泛應用的研究工具，其主要的運作原理，如圖 2-6 所示。在雷射掃描共軛焦掃描式顯微鏡中[18]，雷射光源發射的探測光通過透鏡聚焦到被觀測的物體上，形成一個小光點，透過安裝在針孔光圈(pinhole)後的掃描器收集來自樣品聚焦面反射的光點，並透過掃描器將影像從點組成線，從線組成面，最後組成完整的立體影像，共軛焦顯微鏡還具有高解析度的特性，適合用於觀察細胞組織內的立體結構。然而，雷射掃描共軛焦顯微鏡要從一個光點組合成影像，勢必花費大量的觀測時間，並且在進行掃描時，雷射光束同時也會照亮焦平面附近的樣本，從而對樣本產生不必要的損害。而層光顯微鏡使用平面掃描的方式，一次記錄整個平面，對樣本進行快速的成像，同時也極大地減少光源激發的能量，使樣本受到的損害降至最低，兩者之間成像的差異如圖 2-7 所示。接下來我們就針對層光與共軛焦顯微鏡的成像速度與樣本損害的程度這兩項差異進行探討。

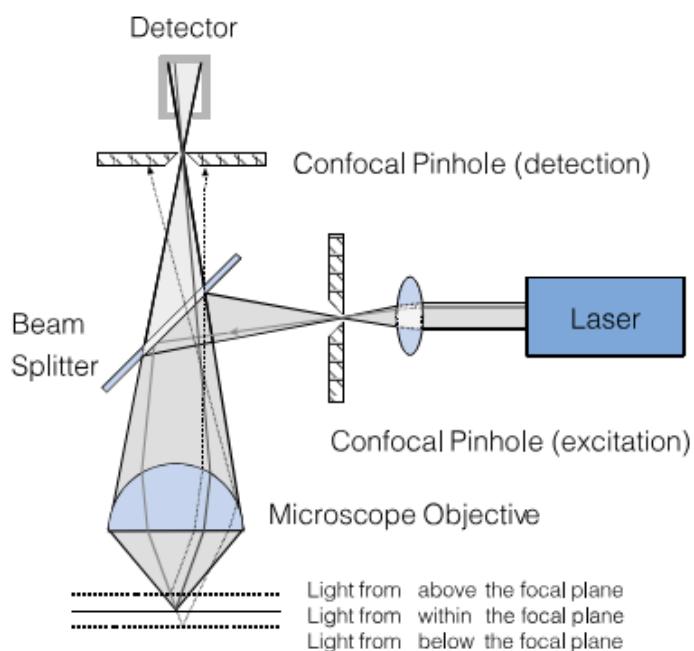


圖 2-6 雷射掃描共軛焦顯微鏡構造與成像原理[18]

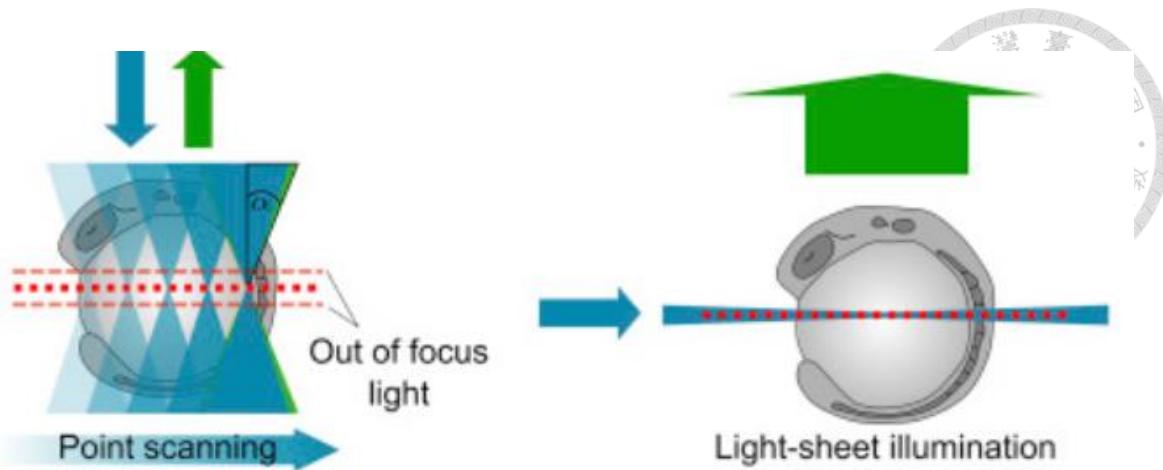


圖 2-7 共軛焦顯微鏡(左側)與層光顯微鏡(右側)成像方式的差別[19]

2.3.1 成像速度

對比共軛焦顯微鏡，層光顯微鏡將光源和觀測軸分開，極大地提高了成像速度。為了說明三維成像的速度差異，我們參考一個大約直徑為 1 毫米的樣本。對於完整的記錄此樣本，需要取樣一個 1 mm^3 的體積。使用基礎的層光顯微鏡，記錄下一個平面大約需要 50 毫秒，為了充分取樣通常需要記錄大約 500 個平面。因此，層光顯微鏡記錄一個完整的樣本將花費 25 秒。而共軛焦顯微鏡通常將 1 mm^3 體積的樣本記錄將至少需要 500 秒，花費的時間比層光顯微鏡多出了 20 倍之多。因此，層光顯微鏡高速的成像能力使其能夠追蹤生物體的快速發育，這是雷射掃描共軛焦顯微鏡所沒辦法達到的[19]。

2.3.2 對生物樣本造成的傷害

在活體生物樣本觀測中，另一個重要的考慮因素是對樣本的能量沉積。在共軛焦顯微鏡中，由於較長的曝光時間導致光毒性效應對樣本產生極大的影響。相比之下，在層光顯微鏡中，樣本接收到的能量主要取決於記錄的層數，這是由於光被控制在單一平面上。經過計算，在層光顯微鏡中，樣本暴露的光線量比在共軛焦顯微鏡中少約 100 至 1000 倍，因此層光顯微鏡非常適合在長時的情況下對樣本進行觀察[19]。



2.4 層光顯微鏡的基本構造

層光螢光顯微鏡的基本構造[19]，如圖 2-8 所示，以下將簡單介紹層光顯微鏡使用的各項零部件並介紹每個部件的功能：

1. 雷射光源：向顯微鏡的光學系統激發出高斯光束，並聚焦於樣本上。
2. 掃描鏡片：調整雷射光束接觸到樣本的位置。
3. 柱面透鏡：將雷射光束聚焦在一起，並使雷射光束在通過後能在樣本的位置形成層光。
4. 樣本室：裝載待測樣本，透過凝膠或液體將樣本固定在其中。
5. 濾光鏡：控制穿過光線的波長，消除環境中的光線與可能受到樣品散射的雷射光。
6. 面探測器：捕捉反射光線形成影像以進行後續處理。
7. 光學載台：使樣本在三維空間中穩定移動。

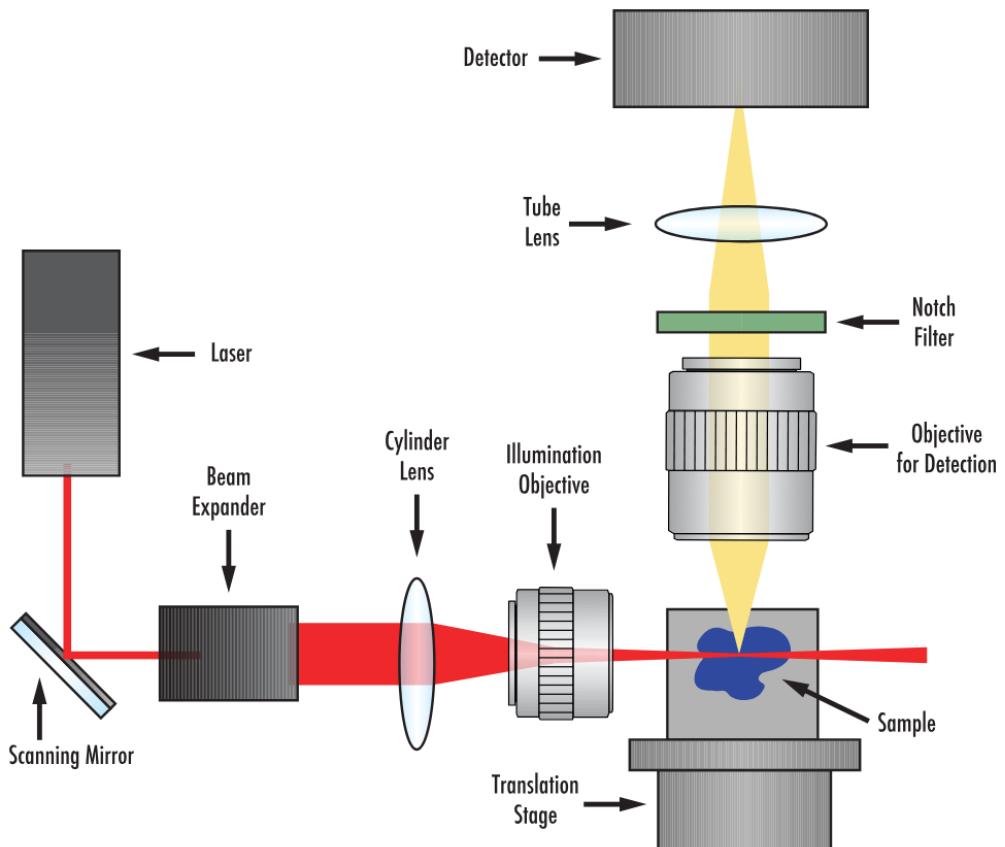


圖 2-8 層光螢光顯微鏡基本構造示意圖[20]

第三章 數位影像關聯法應用原理與實作



本章節將介紹數位影像關聯法(Digital Image Correlation, DIC)的發展與應用，以及其運用在力學量測上的優缺點，並且介紹 DIC 技術的原理，最後將詳細介紹使用在 Matlab 環境下操作數位影像關聯法開源軟體 Ncorr。

3.1 數位影像關聯法介紹

本小節將介紹數位影像關聯法的發展與應用，並說明其優缺點。數位影像關聯法(Digital Image Correlation, DIC)是一種發展成熟的非接觸式光學測量技術[21]，DIC 技術具有高精度、高分辨率和適用範圍廣的優點，廣泛應用於材料科學、機械工程、生物力學等領域。其測量原理是透過數位影像處理和數值計算影像的方法，量測材料的位移與變形。由於 DIC 透過影像處理進行計算，因此只要適當地製備樣本，並且在成像系統允許的情況下，便能在各種不同的尺度下使用 DIC 進行分析，大至數百公尺的橋梁，小至奈米等級的材料，因此 DIC 也被普遍應用在許多領域上。

目前常見的 DIC 軟體均透由圖像配準算法，追蹤材料上的特徵點在參考影像(通常為未變形影像)和目前影像(通常為變形影像)之間的相對位移，追蹤特徵點的方法如圖 3-1 所示，紅色十字為選定進行分析之特徵點，利用 DIC 精確定位出該特徵點位於影像中的位置，並利用相關法運算在參考影像和目前影像之間進行追蹤。

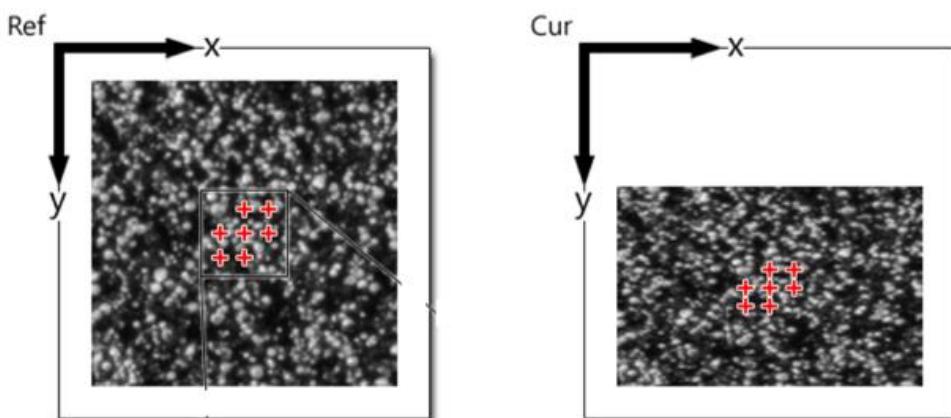


圖 3-1 數位影像關聯法特徵點追蹤示意圖[22]



數位影像關聯法分析，如圖 3-2 所示，主要操作流程分為實驗架設與影像追蹤及數據分析，而進行 DIC 分析時，有以下三點關鍵因素影響 DIC 分析的品質：

1. 特徵點是否明顯：若待測物表面有明顯斑點特徵的話，可直接進行拍攝，但通常未經處理的樣本表面不會有明顯的特徵點，此時則可利用噴墨的方式在樣本處表面製造均勻分布的特徵點。
2. 相機校正：架設穩固的相機系統，建立出正確的影像座標系統。此外若使用兩台以上的相機拍攝，則可搭配校正板建構不同相機間座標的關聯性以達到三維量測。
3. 拍攝實驗影像：為了提升 DIC 分析的精確度，在拍攝影像時要特別注意光線的調整，盡量在相同環境下拍攝目標影像，讓因影像而產生的誤差降至最低。而拍攝大量影像時則須留意資料保存與傳輸方式，以避免影像漏失的情況。

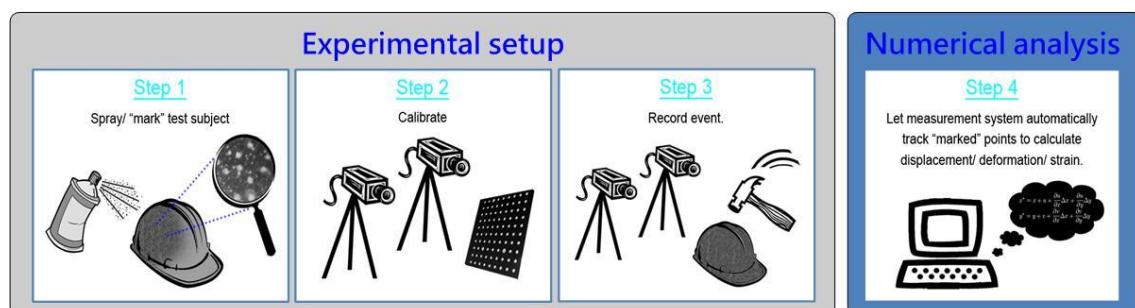
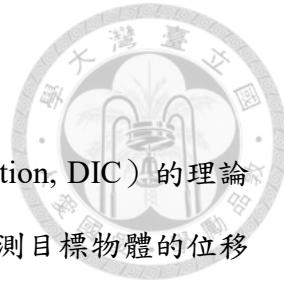


圖 3-2 數位影像關聯法操作流程



3.2 數位影像關聯法原理

本小節將介紹和推導數位影像關聯法（Digital image correlation, DIC）的理論[22]。數位影像關聯法是一種非接觸式的力學量測方法，能夠量測目標物體的位移場及應變場。由於 DIC 是以拍攝目標樣本的影像為基礎進行分析，因此對於目標影像的品質要求很高，諸如光源亮度的變化和拍攝影像的解析度都會大大影響 DIC 的分析精準度。而將 DIC 使用在力學量測中，通常是以材料在未受力變形前的狀態為基準拍攝照片，並將此影像定義為參考影像。在材料受力變形後，便拍攝另一張照片，並將其定義為目前影像。DIC 分析法通過比較參考影像和目前影像的像素點的亮度值，找出兩者之間的關聯性，以計算材料在受力變形後的位移場和應變場。在本文中，我們將使用數位影像關聯法測量樂高層光顯微鏡載台上樣本的位移變化，藉此觀察樂高層光顯微鏡系統運作的穩定度。

本研究中使用的數位影像關聯法軟體為 Ncorr[22]，Ncorr 是一款基於二維平面子集合計算方法的軟體，子集合運算法的原理是將影像分割為許多區塊，每一個區塊被稱為子集合，一張影像內可以擁有許多子集合。在圖 3-3 中參考影像內的圓形區域為子集合的半徑，而子集合的中心位置定義在參考座標系中的座標， x 的方向為 x_{refc} 、 y 的方向為 y_{refc} ，並以向下及向右為正， x_{refi} 與 y_{refi} 則為在參考坐標系中的子集點座標。而在目前座標系下，子集合中心點的 x 與 y 方向位移即為 u 與 v ， i 與 j 為相對於子集合中心的座標，因此， x_{curi} 與 y_{curj} 便為目前坐標下的子集點的 x 與 y 座標。如式(3-1)與式(3-2)所示，目前座標子集點的位置可表示為，參考座標的子集點位置加上目前座標子集合中心點位移，在加上目前座標子集合中心點的位移對 x 與 y 方向取偏微分，並乘上參考座標子集點與目前座標子集合中心點的距離，而下標 rc 則是從參考坐標系上轉移到目前坐標系，依此我們可以定義一個廣義變形向量 p 如式(3-3)所示，如式(3-4)所示，我們也可以將目前座標系的子集點位置以矩陣的形式來表示。

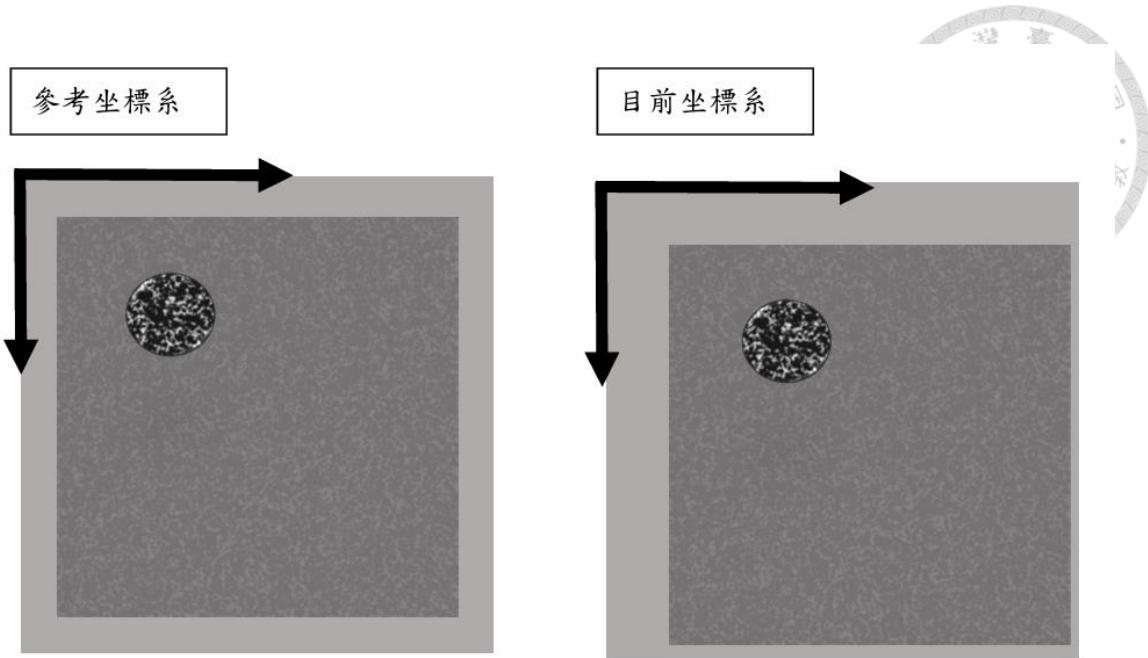


圖 3-3 參考坐標系與參考影像(左側)、目前座標系與目前影像(右側)

$$x_{curi} = x_{refi} + u + \frac{\partial u}{\partial x_{rc}}(x_{refi} - x_{refc}) + \frac{\partial u}{\partial y_{rc}}(y_{refi} - y_{refc}) \quad (3-1)$$

$$y_{curj} = y_{refj} + v + \frac{\partial v}{\partial x_{rc}}(y_{refj} - y_{refc}) + \frac{\partial v}{\partial y_{rc}}(y_{refj} - y_{refc}) \quad (3-2)$$

$$p = \begin{bmatrix} u & v & \frac{\partial u}{\partial x_{rc}} & \frac{\partial u}{\partial y_{rc}} & \frac{\partial v}{\partial x_{rc}} & \frac{\partial v}{\partial y_{rc}} \end{bmatrix}^T \quad (3-3)$$

$$\xi_{refc} + W(\Delta\xi_{ref}; P) = \begin{bmatrix} x_{refc} \\ y_{refc} \\ 1 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 1 + \frac{\partial u}{\partial x_{rc}} & \frac{\partial u}{\partial y_{rc}} & u \\ \frac{\partial v}{\partial x_{rc}} & 1 + \frac{\partial v}{\partial y_{rc}} & v \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_{refi} - x_{refc} \\ y_{refi} - y_{refc} \\ 1 \end{bmatrix} \quad (3-4)$$

接著 DIC 將拍攝影像中的像素點三原色轉化為灰階影像，並以影像中的像素點強度表示為子集合特徵，以此設定子集合的追蹤基準，轉化為灰階後的參考影像像素點強度與目前影像像素點強度則定義為 $I_{ref}(x_{refi}, y_{refi})$ 、 $I_{cur}(x_{refi}, y_{refi})$ ，轉成灰階後的參考影像平均值則定義為 I_{ref_m} 、 I_{cur_m} ， $n(s)$ 值為 S 子集合像素點的總數，詳細的平均值的計算方式如式(3- 5)與式(3- 6)所示，定義數位影像關聯法參考影像與目前影像的平均值正規化相關係數 C_{ZNCC} 如式(3- 7)所示，可利用平均值正規化相關係數來定義子集合的中心位置。



(3- 5)

(3- 6)

$$I_{ref_m} = \frac{\sum_{(I,J) \in S} I_{ref}(x_{ref_i}, y_{ref_j})}{n(S)} \quad (3- 5)$$

$$I_{cur_m} = \frac{\sum_{(I,J) \in S} I_{cur}(x_{cur_i}, y_{cur_j})}{n(S)} \quad (3- 6)$$

$$C_{ZNCC} = \left[\frac{I_{ref}(x_{ref_i}, y_{ref_j}) - I_{ref_m}}{\sqrt{\sum_{(I,J) \in S} [I_{ref}(x_{ref_i}, y_{ref_j}) - I_{ref_m}]^2}} \right]^2 - \frac{I_{cur}(x_{cur_i}, y_{cur_j}) - I_{cur_m}}{\sqrt{\sum_{(I,J) \in S} [I_{cur}(x_{cur_i}, y_{cur_j}) - I_{cur_m}]^2}} \quad (3- 7)$$

在找出子集合點中心位置後，Ncorr 使用逆合成高斯牛頓法 (Inverse Compositional Gauss-Newton, ICGN) 非線性最佳化求解器來求解目標的位移場，與微小的廣義變形向量 ΔP 。為了求解，此時需要先定義一個廣義變形向量的初始猜測值 P_{old} ，再把矩陣形式的目前座標位置帶入式(3- 4)後，即可得式(3- 8)。並且為了使平均值正規化相關係數最小化，需對平均值正規化相關係數 C_{ZNCC} 取微分後再令其為零，如式(3- 9)所示，再將其作一階泰勒展開後，即可以獲得式(3- 10)，並透過重複的迭代運算將 P_{old} 更新為 P_{new} ，如式(3- 11)所示，直到重複迭代運算到 ΔP 收斂後，即可獲得廣義變形向量，進而獲取目標影像的位移場。

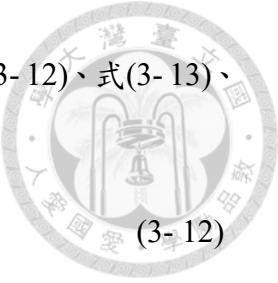
$$C_{ZNCC}(\Delta P) = \sum_{(I,J) \in S} \left[\frac{I_{ref}(\xi_{refc} + W(\Delta\xi_{ref}; \Delta P)) - I_{ref_m}}{\sqrt{\sum_{(I,J) \in S} [I_{ref}(\xi_{refc} + W(\Delta\xi_{ref}; \Delta P)) - I_{ref_m}]^2}} \right]^2 - \frac{I_{cur}(\xi_{refc} + W(\Delta\xi_{ref}; P_{old})) - I_{cur_m}}{\sqrt{\sum_{(I,J) \in S} [I_{cur}(\xi_{refc} + W(\Delta\xi_{ref}; P_{old})) - I_{cur_m}]^2}} \quad (3- 8)$$

$$\nabla C_{ZNCC}(\Delta P) = 0 \quad (3- 9)$$

$$\nabla \nabla C_{ZNCC}(0) \Delta P = -\nabla C_{ZNCC}(0) \quad (3- 10)$$

$$W(\Delta\xi_{ref}; P_{new}) = W(\Delta\xi_{ref}; P_{old}) W(\Delta\xi_{ref}; \Delta P)^{-1} \quad (3- 11)$$

取得廣義向量計算出位移場後，即可利用廣義特徵向量計算出影像的應變分佈，Ncorr 使用的計算應變方式為格林-拉格朗日應變張量法，透由此法可以在大變



形的情況下，求出較精準的橫向、縱向與剪切應變，其分別如式(3-12)、式(3-13)、式(3-14)所示。

$$E_{xx} = \frac{1}{2} \left(2 \frac{\partial u}{\partial x} + \left(\frac{\partial u}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial x} \right)^2 \right) \quad (3-12)$$

$$E_{xy} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial x} \frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x} \frac{\partial v}{\partial y} \right) \quad (3-13)$$

$$E_{yy} = \frac{1}{2} \left(2 \frac{\partial v}{\partial y} + \left(\frac{\partial u}{\partial y} \right)^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial y} \right)^2 \right) \quad (3-14)$$



3.3 數位影像關聯法軟體 Ncorr 實作

本小節將說明，本研究中使用的數位影像關聯法分析軟體 Ncorr 的操作步驟 [22,23]。Ncorr 為一款在 MATLAB 平台上運行之數位影像關聯法開源軟體，在 Ncorr 的官方網站即可下載運行的主程式以及操作手冊，並且在官方網站上也有一些範例可以提供使用者練習，接下來我們將詳細的介紹 Ncorr 的操作流程。

首先，在開啟運行 Ncorr 主程式前，需要在 MATLAB 中安裝 Image Processing 和 Statistics 的工具包以及 C++的編譯器，所以在第一次啟動前，需在 MATLAB Command Window 中輸入 "mex -setup C++" 來安裝編譯器，安裝完上述功能後即可啟動程式。Ncorr 啟動時，需在 MATLAB Command Window 輸入 handles_ncorr = ncorr 以此執行程式，一旦執行後將會彈出 Ncorr 的使用者操作介面如圖 3-4 所示，透過這個介面，我們便可在其中進行操作。

開啟使用者介面後，第一步需要在上方的工具列打開 File 選擇要進行分析的參考影像與目前影像，也就是材料位移前與材料位移後的影像設定，完成後如圖 3-5 所示。接著需要在工具列中點擊 Region of interest，設定我們想要對樣本進行分析的區域(ROI)，在這裡我們可以用矩形、橢圓形以及自訂的不規則曲線將要分析的 ROI 區域框選而成，如圖 3-6 所示，也可以用影像處理的方式，將欲觀測的區域影像以邏輯符號布林值表示選定。選定分析區域後，接著我們需要在工具列中打開 Analysis，如圖 3-7 所示設定數位影像關聯法的各項計算參數，包括子集合的半徑、子集點的間距、廣義變形向量容許誤差以及廣義變形向量容許迭代次數。設定的子集合半徑理論上愈小，計算的精準度將會提高但計算時間也會跟著提升。但是子集合的半徑設定值與樣本標記的大小差別過大，則可能發生找不到正確子集合位置的情況。參數設定完成後，數位影像關聯法的結果，將會輸出在像素點的位置上，指定方向的位移或應變數值，子集點的間距 d_{subp} 將影響輸出結果的解析度。若參考影像的解析度為 $m_{ref} * n_{ref}$ ，輸出影像的解析度則為 $m_{out} * n_{out}$ ，詳細的計算可由式(3-15)與式(3-16)得知。接著我們需要設定參考影像分析時，子集合的位



置如圖 3-8 所示。選擇時，需要將子集合的位置平均分布在參考影像中，才不會導致分析失敗，而子集合的數量與電腦中設定計算的平行運算核心的數量相同。分析完成後，需在 Analysis 中設定影像內每個像素代表的實際距離，此步驟可選定參考影像，在參考影像中畫一條線，並給定此線在現實中的實際距離，由程式自動進行轉換如圖 3-9 所示。數位影像關聯法所有設定全部設定完成後將會如圖 3-10 所示，這時便可點選 Plot 查看如圖 3-11 所示，方才分析的位移場與應變場，並且可以調整分析結果的上下限，標記出計算結果的最大最小值，也可設定 Transparency 值來過濾掉不必要的雜訊。

$$m_{out} = \frac{m_{ref}}{1 + d_{subp}} \quad (3-15)$$

$$n_{out} = \frac{n_{ref}}{1 + d_{subp}} \quad (3-16)$$

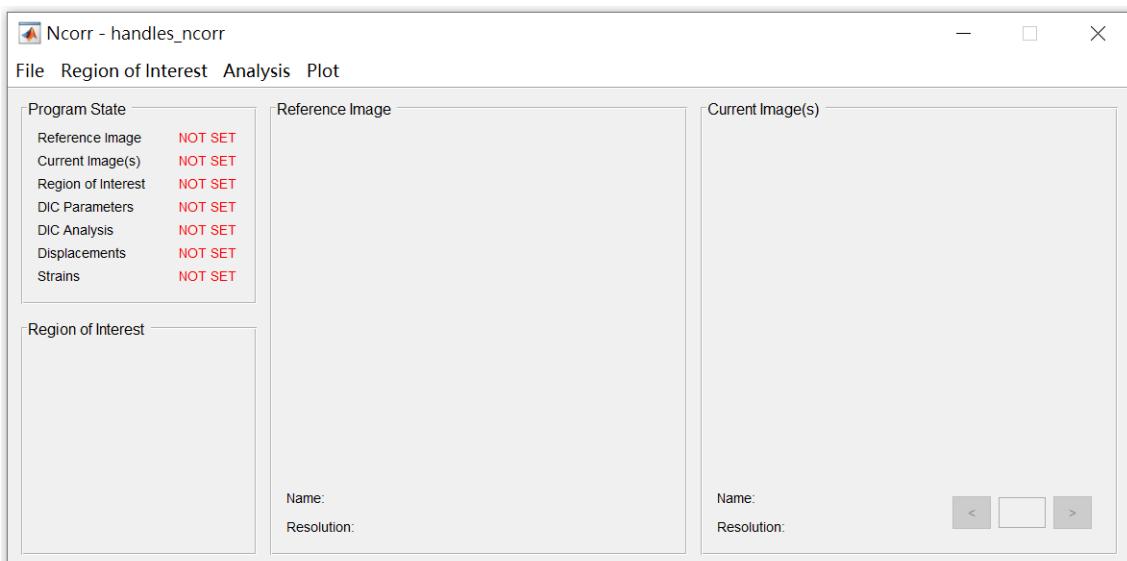


圖 3-4 Ncorr 操作介面



圖 3-5 Ncorr 參考影像(左)與目前影像(右)設定

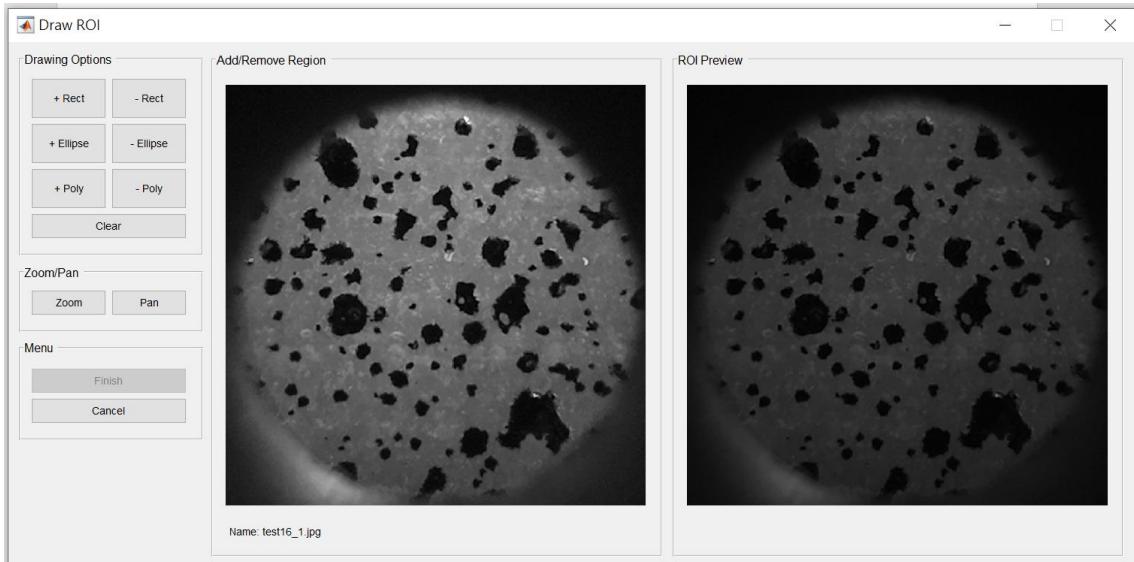


圖 3-6 ROI 設定

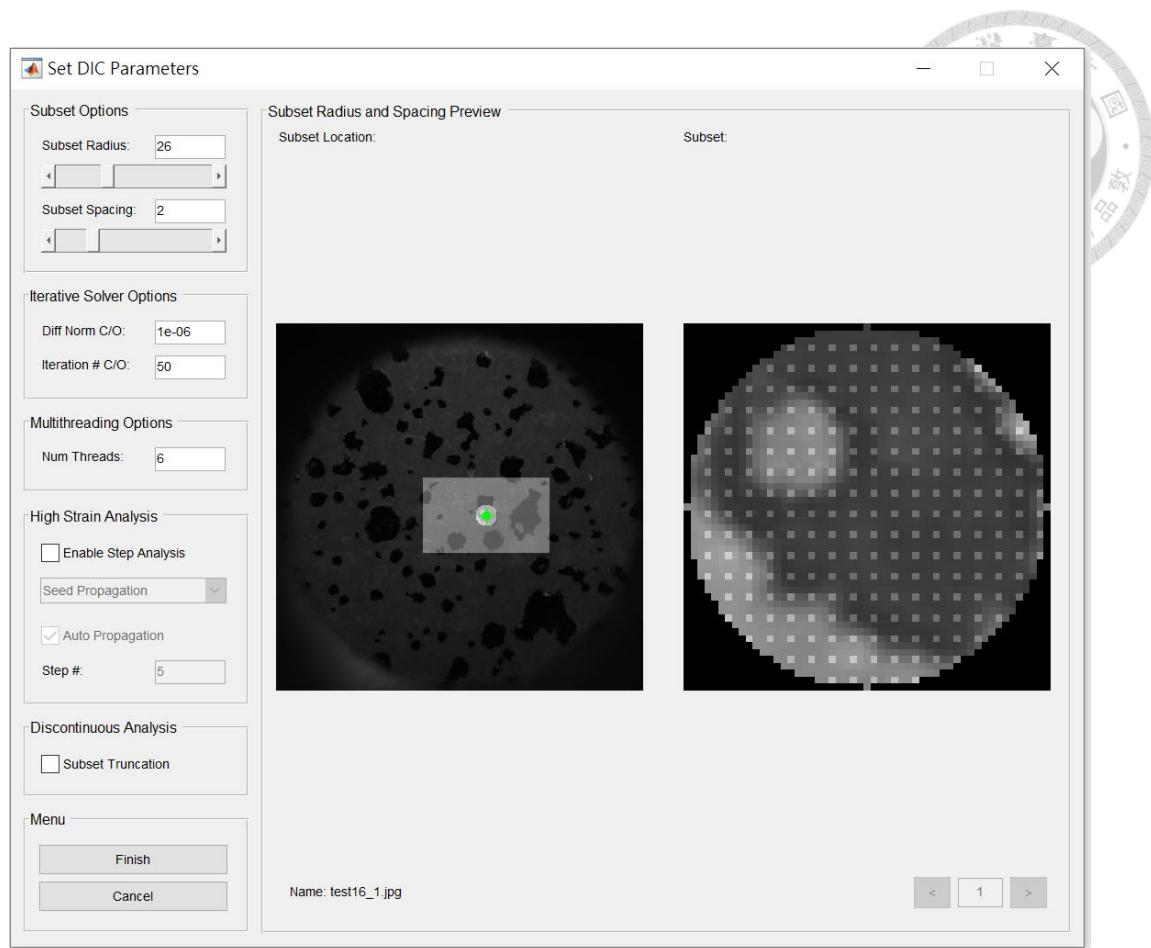


圖 3- 7 Ncorr 參數設定

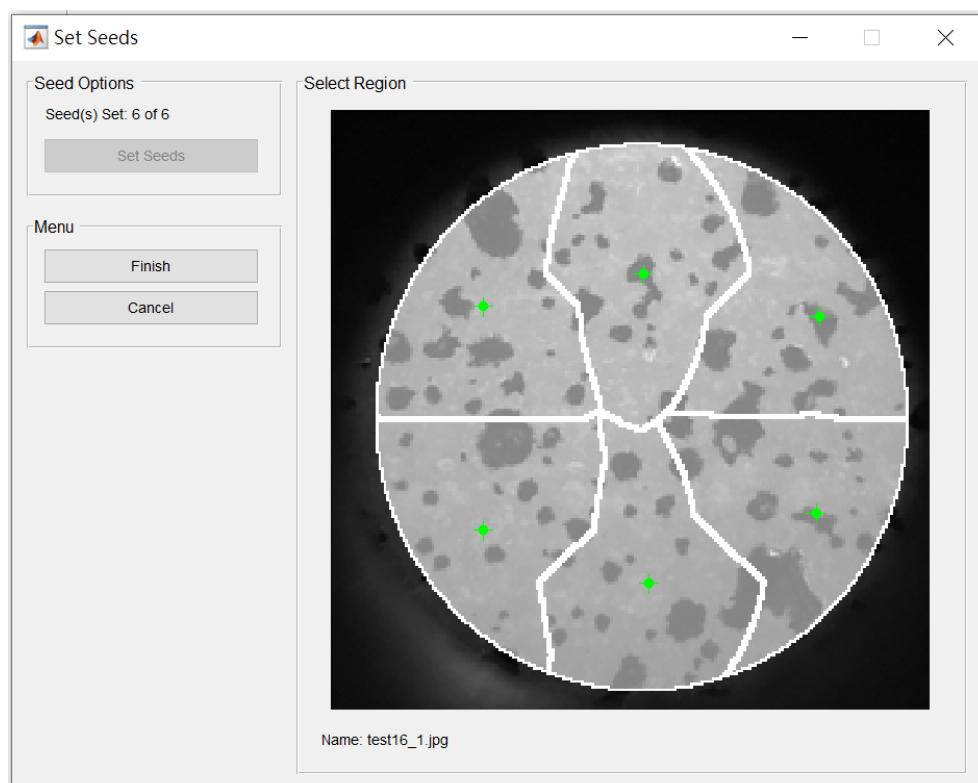


圖 3- 8 Ncorr 子集合中心位置設定

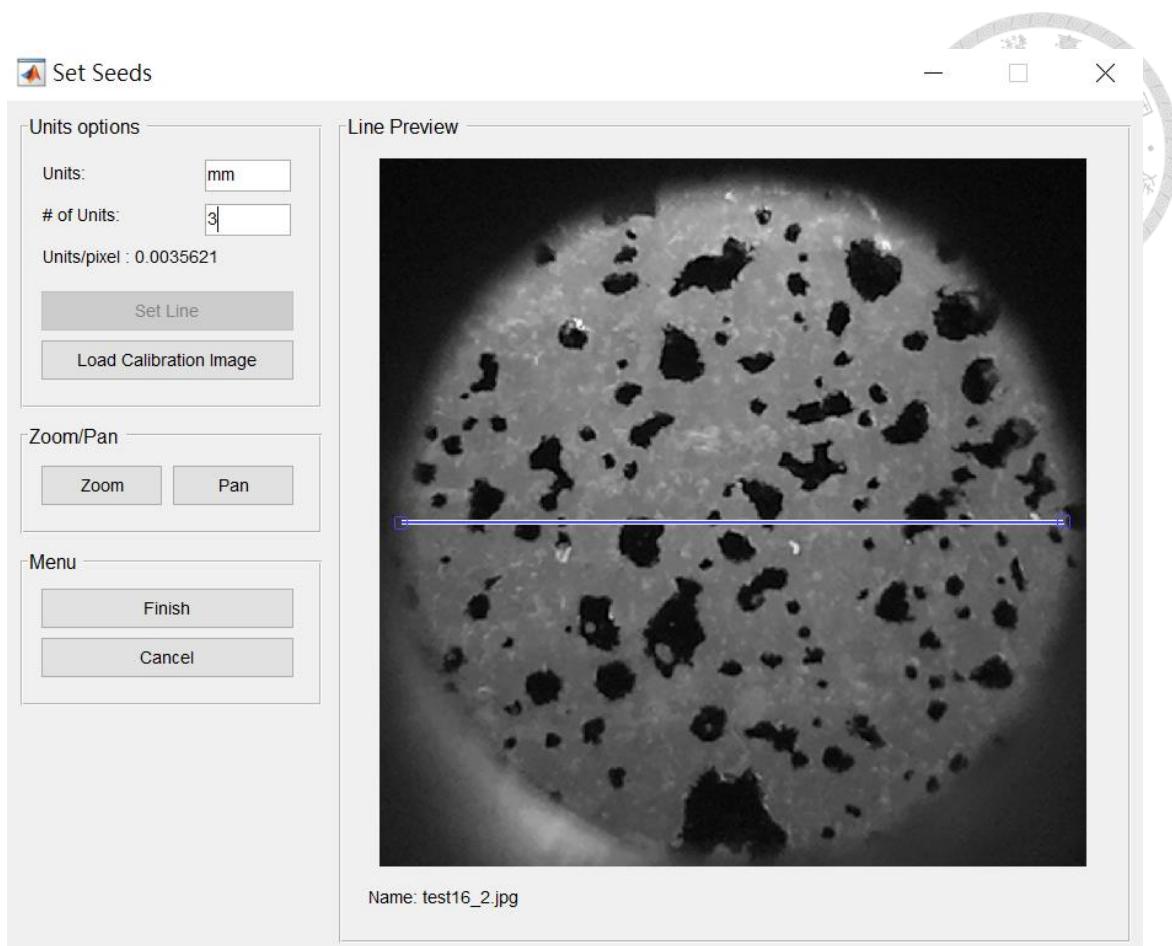


圖 3-9 數位影像聯法影像像素與實際尺寸轉換設定

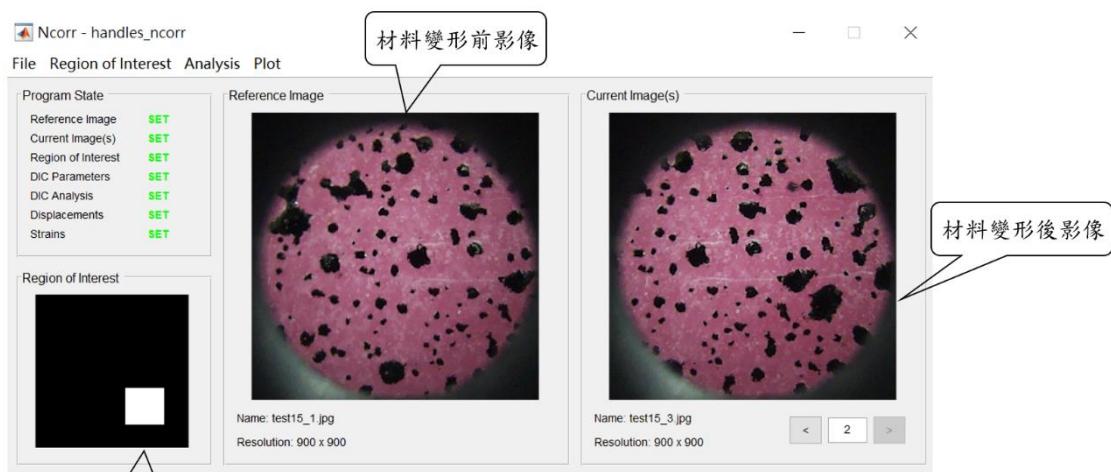


圖 3-10 數位影像關聯法設定完成畫面

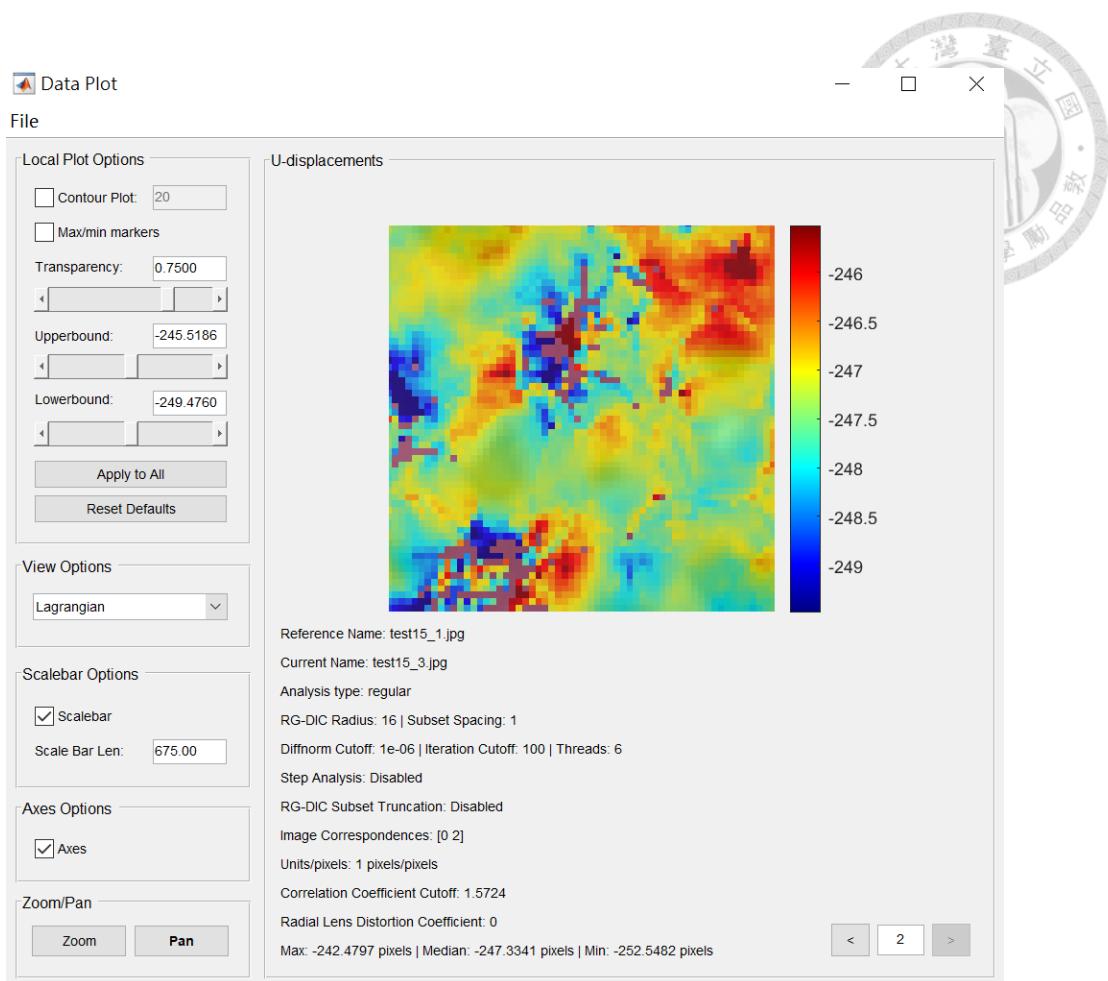


圖 3- 11 調整數位影像關聯法分析結果參數

第四章 樂高層光顯微鏡系統搭建與分析

本章節中，我們首先將介紹製作樂高層光顯微鏡所需的各個部件及材料，並對於每個零件提供詳細的規格說明。其次，將介紹如何組裝這些零件來建構樂高層光顯微鏡，以及如何確保顯微鏡運作的穩定性和功能性。再者，將描述操作樂高層光顯微鏡進行樣本觀測的方法，以及如何通過層光技術進行觀測的具體步驟。特別將強調在操作過程中需要注意的關鍵點，以確保觀測結果的準確性和一致性。最後，展示使用樂高層光顯微鏡拍攝樂高積木樣本的觀測結果。這些拍攝成果將通過圖片和示意圖的形式呈現，並對觀測到的結構和特徵進行詳細的說明。

4.1 搭建樂高層光顯微鏡系統之零件介紹

本小節將詳細介紹搭建樂高層光顯微鏡系統所使用的所有零件和材料，並將顯微鏡系統分為三個部分進行介紹：樂高顯微鏡支架與實驗載台、顯微鏡控制系統、光學成像與觀測系統。

4.1.1 樂高顯微鏡支架與實驗載台

顯微鏡支架的主要功能是提供穩定性和支撐，讓顯微鏡在使用的過程中不會造成移動或晃動，從而避免觀察過程中產生誤差。這對於獲得清晰穩定的觀察結果非常重要。因此我們採用四片如圖 4- 1 所示的大面積樂高基板做為基礎。這些基板提供了穩定且廣闊的底部支撐，防止顯微鏡在操作過程中移動。並以方塊狀樂高積木堆疊而成的柱子，與薄板形狀樂高積木組合形成支架結構，如圖 4- 2 所示，以便於固定相機和雷射模組。並且為了確保顯微鏡在移動過程中不會受到樂高積木表面凸起的影響，我們在部分基板上鋪設了光滑平面的樂高積木。這些光滑平面作為控制系統的運作軌道，使其能夠平穩地移動，提高了系統的操作精度和可靠性。完成上述組件後，我們即完成了顯微鏡支架的搭建，詳細的零件編號及其對應的零件清單請參考表 4- 1 所示。

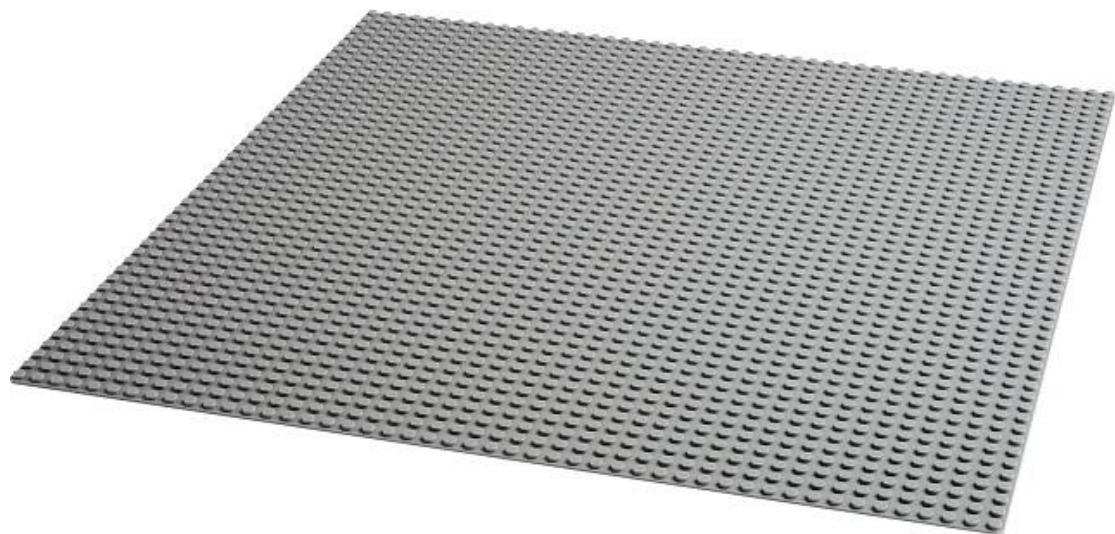


圖 4-1 樂高基板

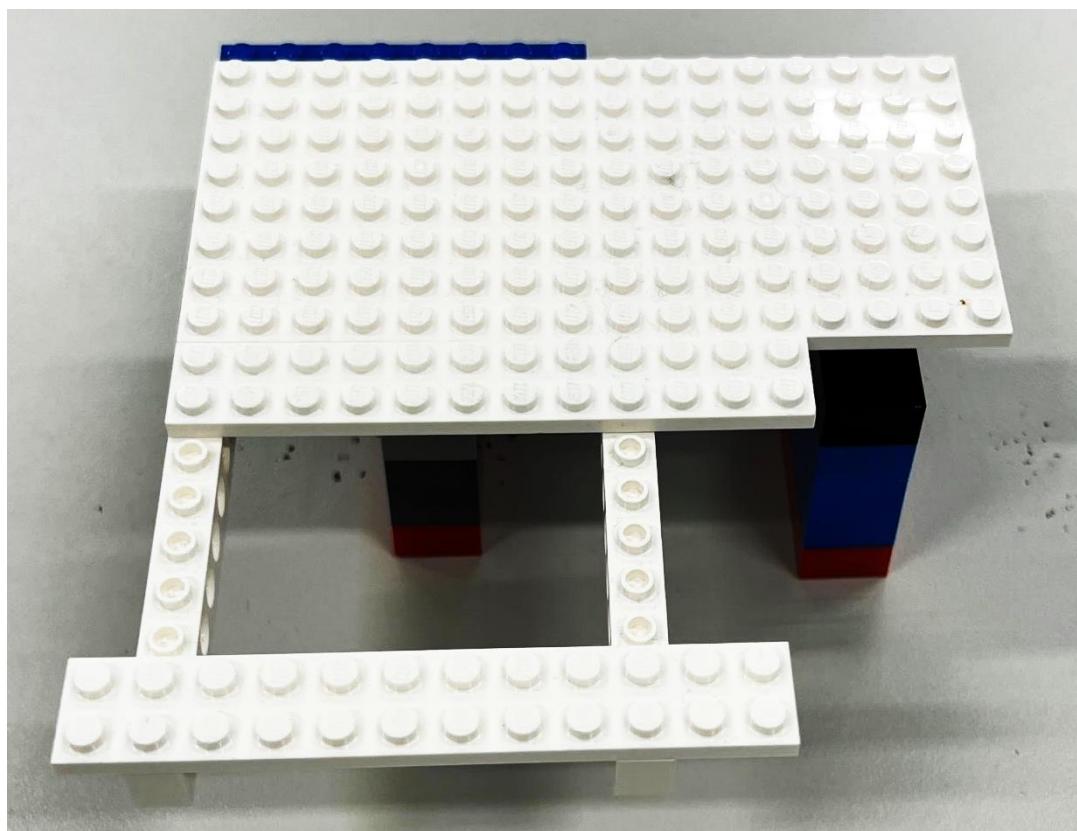


圖 4-2 樂高積木組合支架結構



表 4-1 樂高層光顯微鏡支架零件表

樂高零件名稱	樂高積木型號	數量
LEGO Brick 2×2	3003	8
LEGO Brick 2×6	2456	8
LEGO Brick 1×2	3004	4
LEGO Brick 1×4	3010	11
LEGO Brick 2×4	3001	10
LEGO Brick 1×16	3703	9
LEGO Plate 4×12	3029	2
LEGO Plate 4×4	3031	24
LEGO Plate 2×8	3034	2
LEGO Plate 6×6	3958	1
LEGO Tile 8×16 with bottom	90498	6
LEGO Base plate 48×48	11024	4

為了方便進行數位影像相關 (DIC) 實驗，我們設計並打造了三款不同運作機構的實驗載台，這些載台安裝在顯微鏡的控制元件上，使樣本能夠在載台上進行多種不同的 DIC 實驗。第一種載物台，如圖 4-3 所示，我們設計成能夠在固定的高度下進行平移運動的機構。第二種載物台，如圖 4-4 所示，能夠在固定的位置進行旋轉運動，使樣本能夠繞著 Z 軸方向進行旋轉，允許我們從不同角度觀察樣本的位移情況。第三種載台設計為固定 X、Y、Z 軸位移的載台，配合如圖 4-5 所示裝置在載台上方的壓印機構使用，允許我們觀察樣本在受到壓印變形時，產生的位移與應力應變。固定式載台的設計也有助於精確測量壓印過程中的應變分佈和變形行為。詳細的層光顯微鏡實驗載台零件清單，請參考表 4-2 所示。

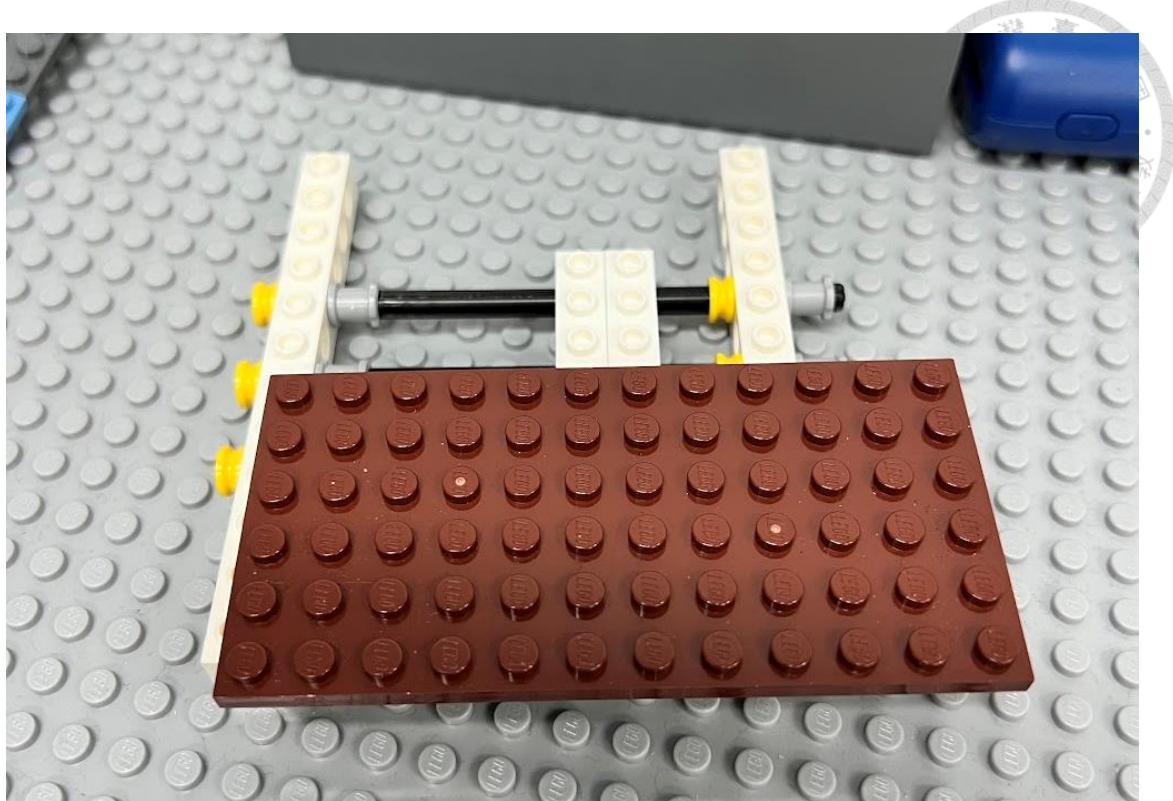


圖 4-3 具備平移機構之載物台

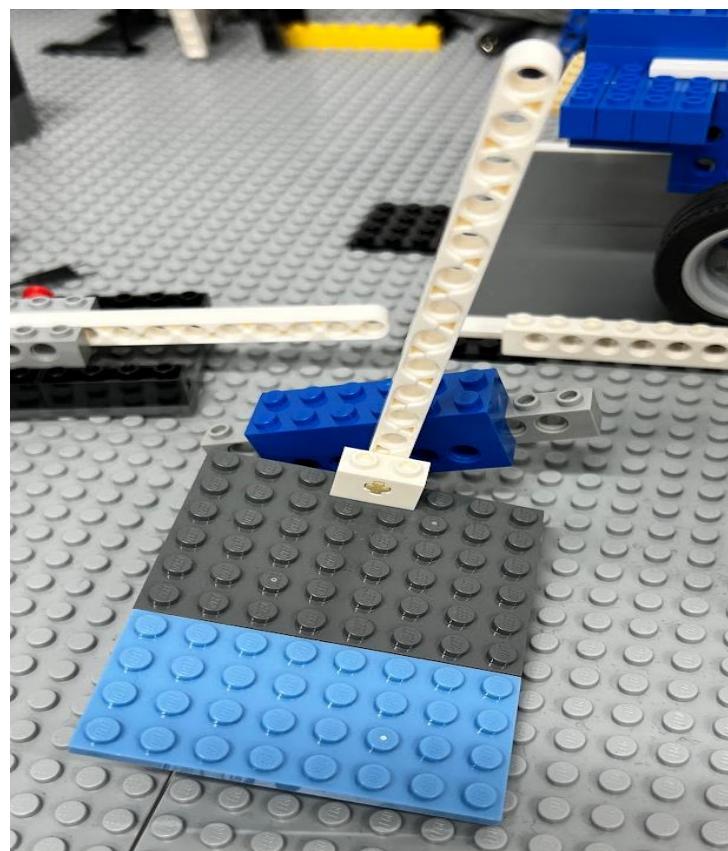


圖 4-4 具備旋轉機構之載物台

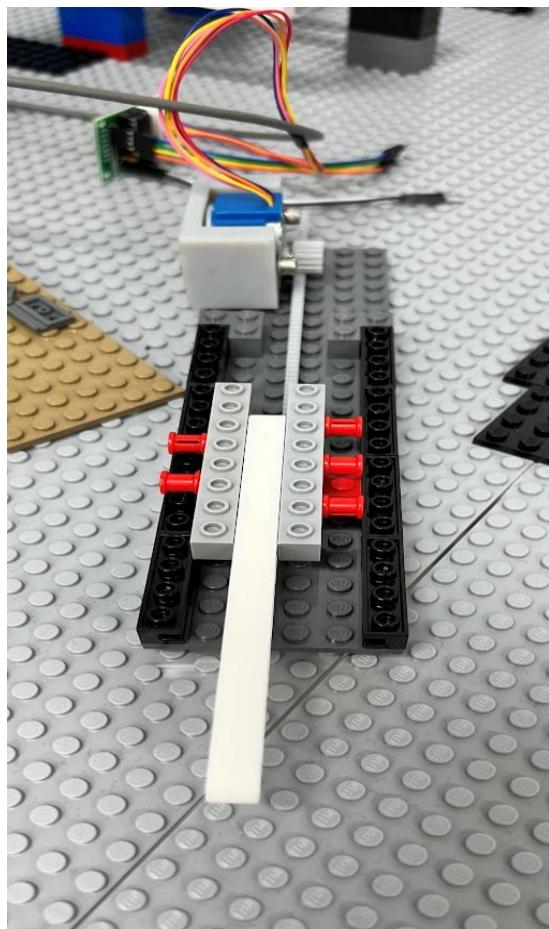


圖 4-5 觀察樣本變形實驗時之壓印機構

表 4-2 樂高層光顯微鏡實驗載台零件清單



樂高零件名稱	樂高積木型號	數量
LEGO Liftarm thick 1×11	32525	3
LEGO Liftarm thick 1×15	32278	1
LEGO Brick modified with channel 1×4	2653	8
LEGO Brick with axle hole 1×2	32064	1
LEGO Brick corner 1×2×2	2357	2
LEGO Brick 2×6	2456	3
LEGO Brick with holes 1×8	3702	5
LEGO Brick with holes 1×14	32018	2
LEGO Plate 6×12	3028	1
LEGO Plate 6×8	3036	2
LEGO Plate 4×8	3035	1
LEGO Plate 6×16	3027	1
LEGO Plate 2×4	3020	1
LEGO Plate modified with door rail 1×2	32028	2
LEGO Pin 3L	32054	5
LEGO Axle 1L with pin	43093	1
LEGO Axle 8L	3707	3
LEGO Technic bush 1/2 smooth	4265c	6
LEGO Technic bush	3713	6
3D printing gear for motor	×	1
3D printing rack	×	1
3D printing motor base	×	1
Stepper motor 28BYJ-48	×	1



4.1.2 樂高顯微鏡支架與實驗載台

本研究設計的樂高層光顯微鏡控制系統主要功能是為精確控制樣本載台沿相機觀測軸方向的位移運動。為了實現便捷組裝和高精度實驗量測，我們採用了市售的樂高積木動力組合載具，作為樂高層光顯微鏡控制系統的主要機構，並搭配步進角度 5.625° 的 28BYJ-48 步進馬達驅動載具移動，透過馬達控制程式的配合，能夠將樣本位移控制精度提升至毫米等級。然而，由於步進馬達與樂高積木載具的原始傳動機構並不相容，因此我們設計了一套新的傳動機構，由 3D 列印的齒輪與鍊條組合而成，使步進馬達能夠有效帶動傳動機構，從而實現對樂高動力載具的精確控制。

為了在樣本觀測過程中方便對顯微鏡的控制系統進行操控，我們使用 Arduino 控制器連接藍芽的無線搖桿，這樣的設計使得操作者能夠在觀察樣本位移的同時，通過螢幕實時對載台進行控制，從而提高了操作的便利性和精確性。圖 4- 6 所示為顯微鏡的控制系統與無線操控搖桿，詳細的控制系統零件清單請參考表 4- 3 所示。

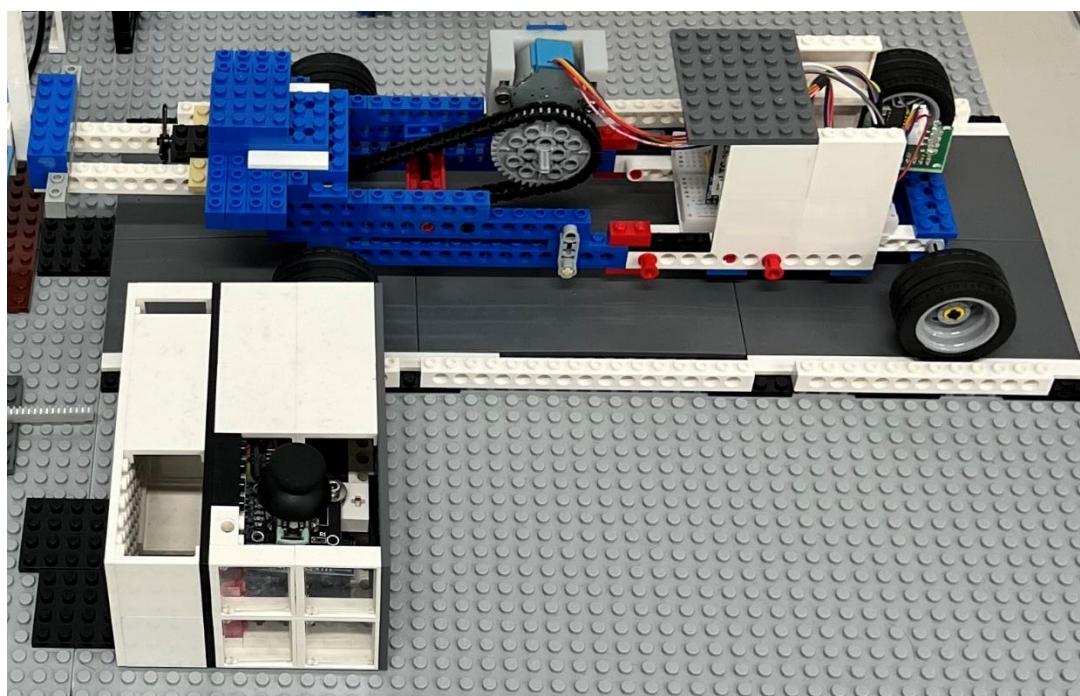


圖 4- 6 顯微鏡控制系統與無線操控搖桿

表 4-3 樂高層光顯微鏡實驗載台零件清單

樂高零件名稱	樂高積木型號	數量
樂高積木動力組合載具	×	1
Stepper motor 28BYJ-48	×	1
ULN2003 motor driver	×	1
Arduino Micro	×	2
HC-05 Bluetooth module	×	2
Arduino Joystick	×	1
Breadboard	×	2
Jumper wire	×	20
Power bank	×	2
3D printing gear for motor	×	1
3D printing motor base	×	1
LEGO gear 40 tooth	3649	2
LEGO gear 20 tooth	32269	1
LEGO link chain	3711	40
LEGO axle 6L	3706	2
LEGO plate 8×16	92438	2
LEGO panel 1×4×3	60581	16
LEGO window 1×4×3	60594	8



4.1.3 樂高層光顯微鏡光學成像與觀測系統

在本研究中，我們根據先前的文獻資料，為樂高層光顯微鏡設計並構建了一種低成本且具備豐富操作性的光學成像與觀測系統。該系統的設計主要目的是，能夠以簡單的操作，達到以層光觀測樣本不同切面的效果。並同時兼顧在巨觀與微觀的尺度下，樣本變化的觀察。

樂高層光顯微鏡的光學系統設計包括以下幾個主要部分：

a. 光源與透光鏡：

在顯微鏡的光源部份，我們選用了波長為 650nm 的低功率紅光雷射作為層光的光源，除了具有方便觀察的特性之外，低功率的光源也對生物型樣本造成的損害較低。此外，透過光學干涉雷射光源的技術，就能使產生的層光變薄，更適合進行精密的觀測。

而為了使圓柱狀的雷射光源形成薄紙形狀的層光，需要在雷射光源的前方裝設一組圓柱透鏡。透過調整圓柱透鏡與雷射激發源之間的角度與焦距，便能形成不同角度與厚度的層光，使我們能夠方便使用層光來觀測樣本。如圖 4-7 所示為雷射模組與裝設於前方的圓柱透鏡。

b. 相機與觀測系統：

為了能夠實時操作顯微鏡的觀測系統，我們使用樹莓派公司開發的 Raspberry Pi 4 做為樂高層光顯微鏡的影像處理系統，並搭配具備 1200 萬像素的 CMOS 相機模組 Raspberry Pi Camera Module 3。選擇樹莓派做為顯微鏡的觀測系統，使我們只需要準備一組螢幕與鍵盤滑鼠，便可以隨時使用樂高層光顯微鏡進行樣本觀察。圖 4-8 所示為樹莓派與相機模組。

c. 物鏡：

在放大物鏡的部份，我們採用了焦距 15.3mm 的數位放大鏡頭，該鏡頭體積小巧方便安裝，且鏡頭的視野範圍與樹莓派相機接近，可以直接裝於相機前進行微觀尺度的觀測，搭配 3D 列印製成的鏡頭基座，即可根據不同的觀察需

求選擇是否安裝物鏡。圖 4-9 所示為數位放大鏡頭與 3D 列印之鏡頭基座。光學與觀測系統的詳細零件清單，請參考表 4-4 所示。

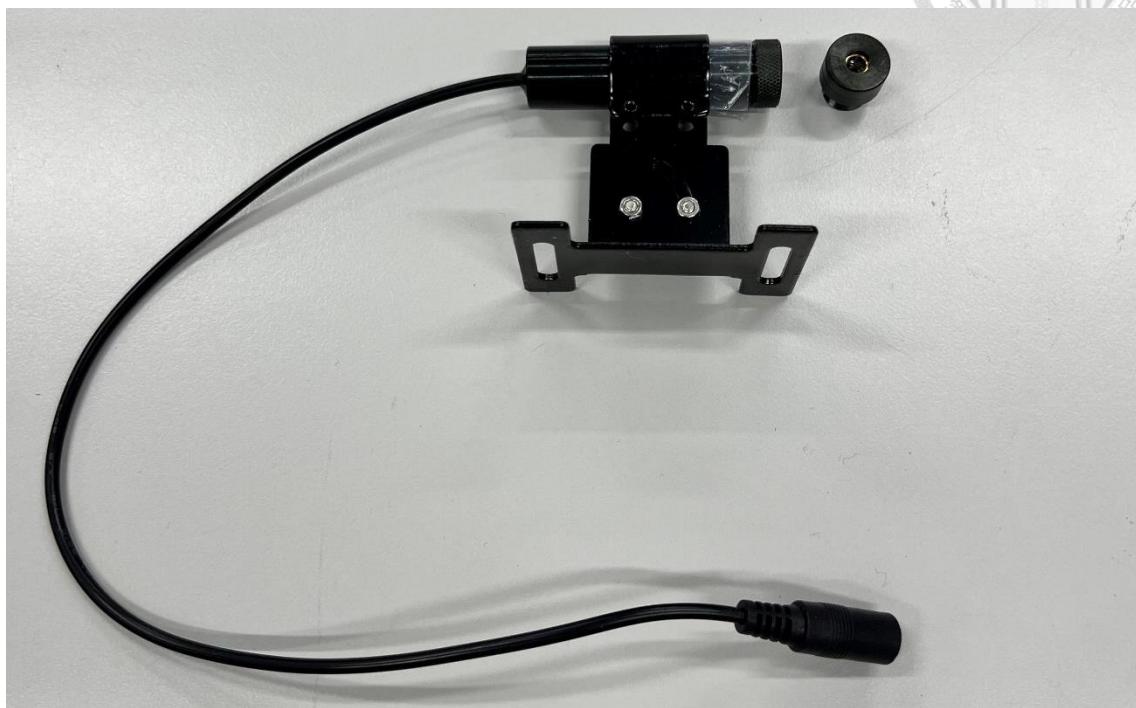


圖 4-7 雷射光源與裝設於前方之柱面透鏡

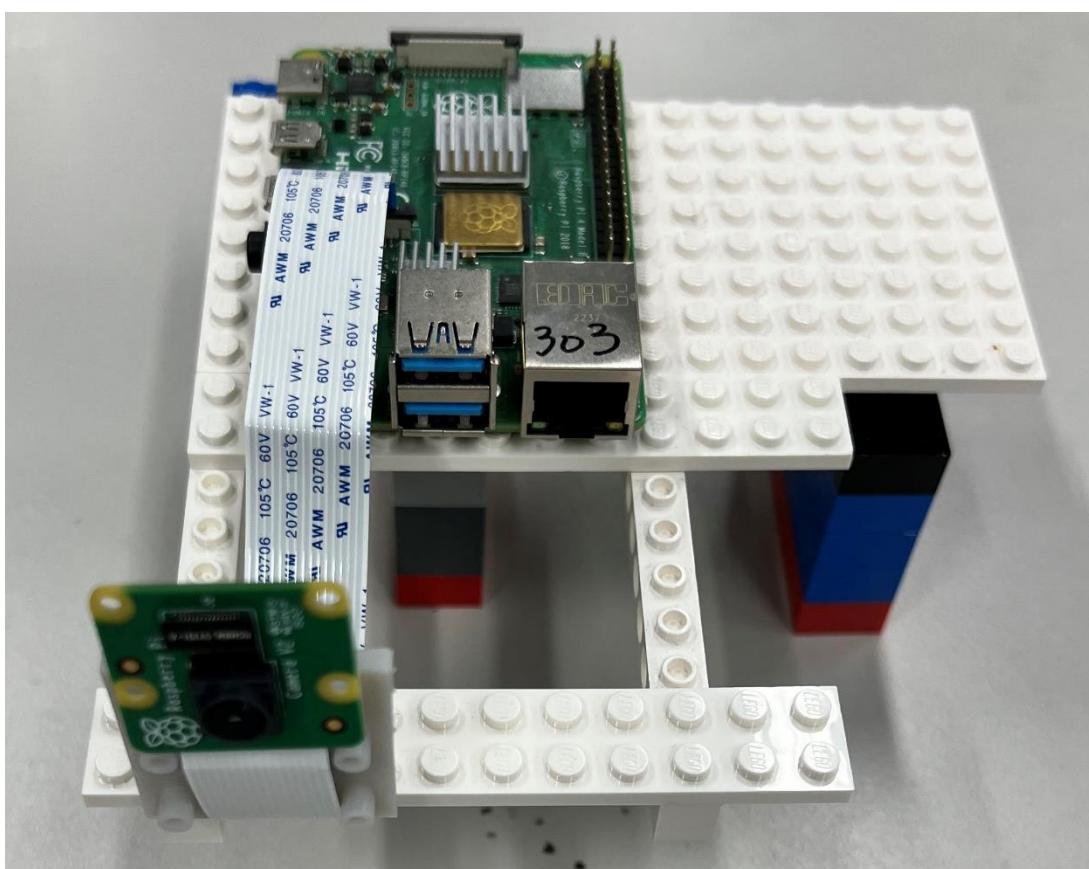


圖 4-8 樹莓派與相機模組

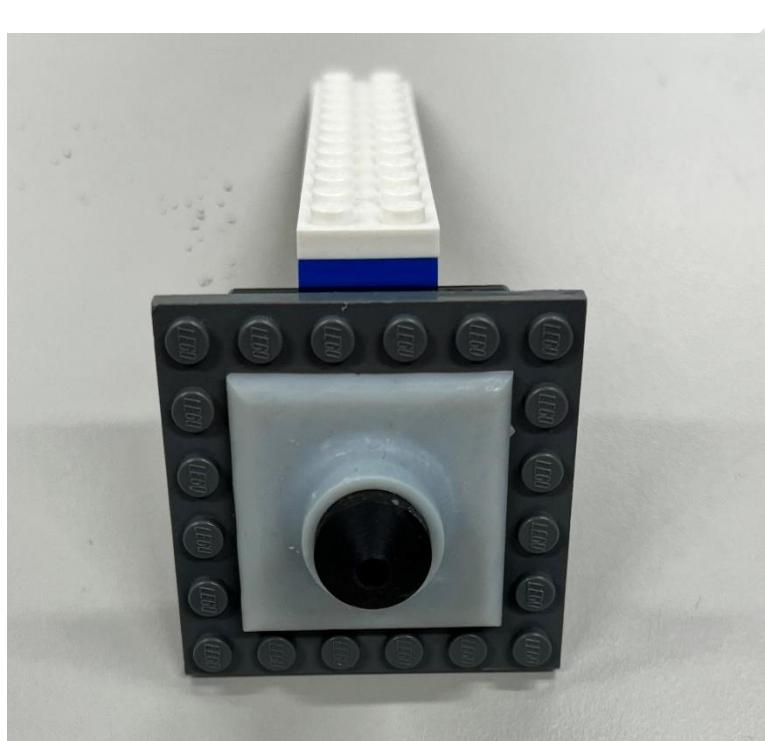


圖 4-9 數位放大鏡頭與 3D 列印之鏡頭基座

表 4-4 樂高層光顯微鏡光學與觀測系統零件清單

樂高零件名稱	樂高積木型號	數量
Raspberry Pi 4 Model B	×	1
Raspberry Pi Camera Module 3 with cable	×	1
15.3mm Digital Video magnifying lens	×	1
Micro HDMI to HDMI cable	×	1
Power bank	×	1
USB typeC cable	×	1
Monitor	×	1
Keyboard and mouse	×	1
3D printing magnifying lens base	×	1
650nm laser module	×	1
Cylindrical lens	×	1
LEGO Angular plate 1×2 - 2×2	99207	2



4.2 樂高層光顯微鏡的組裝流程

在本小節中，我們將說明樂高層光顯微鏡的組裝流程。當顯微鏡的所有部件都準備完成時，即可開始組裝顯微鏡，由於樂高基板的面積龐大且具柔軟性，因此在架設顯微鏡前，利用紙箱之類的物品墊在樂高基板的下方，提供堅固的底座將會使顯微鏡的運作更加平穩。由於 3D 列印的零件有時誤差較大，與樂高零件接合時會有些許縫隙，因此在一些容易鬆動的部位必須使用膠水加以固定。

以下將介紹樂高層光顯微鏡的組裝流程與注意事項，組裝流程圖請參考圖 4-10 所示。

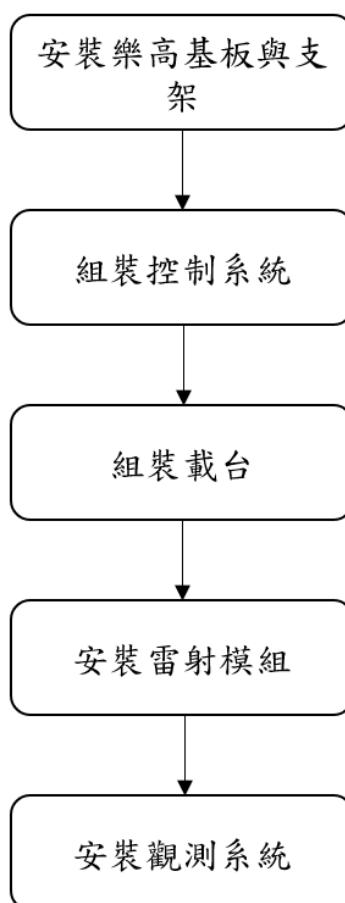


圖 4-10 樂高層光顯微鏡組裝步驟流程圖



1. 安裝樂高基板與支架：第一個步驟，首先需將樂高基板與支撑雷射源及觀測模組的支架安裝好，並將其固定於平坦的表面，如圖 4- 11 所示。
 2. 組裝控制系統：第二步將控制系統中的樂高動力載具組裝好，將步進馬達安裝於 3D 列印之馬達座中，並與馬達傳動系統一併與樂高動力載具之輪軸結合，最後將控制馬達之電路板置於載具中的適當位置，如圖 4- 12 所示。
 3. 組裝樣本載台：將各種功能之樣本在台組裝好，並安裝到控制系統之上。
 4. 安裝雷射模組：將雷射發射源或雷射筆與柱面透鏡組合，固定在樂高基板上，並與觀測模組呈 90 度垂直。
 5. 安裝觀測系統：最後將觀測系統之樹莓派主板與相機模組安裝於樣本載台的正前方，垂直於雷射模組，並根據樣本類型選擇是否安裝放大物鏡。
- 組裝完成之樂高層光顯微鏡各部件相對位置與光路示意圖，如圖 4- 13 所示。

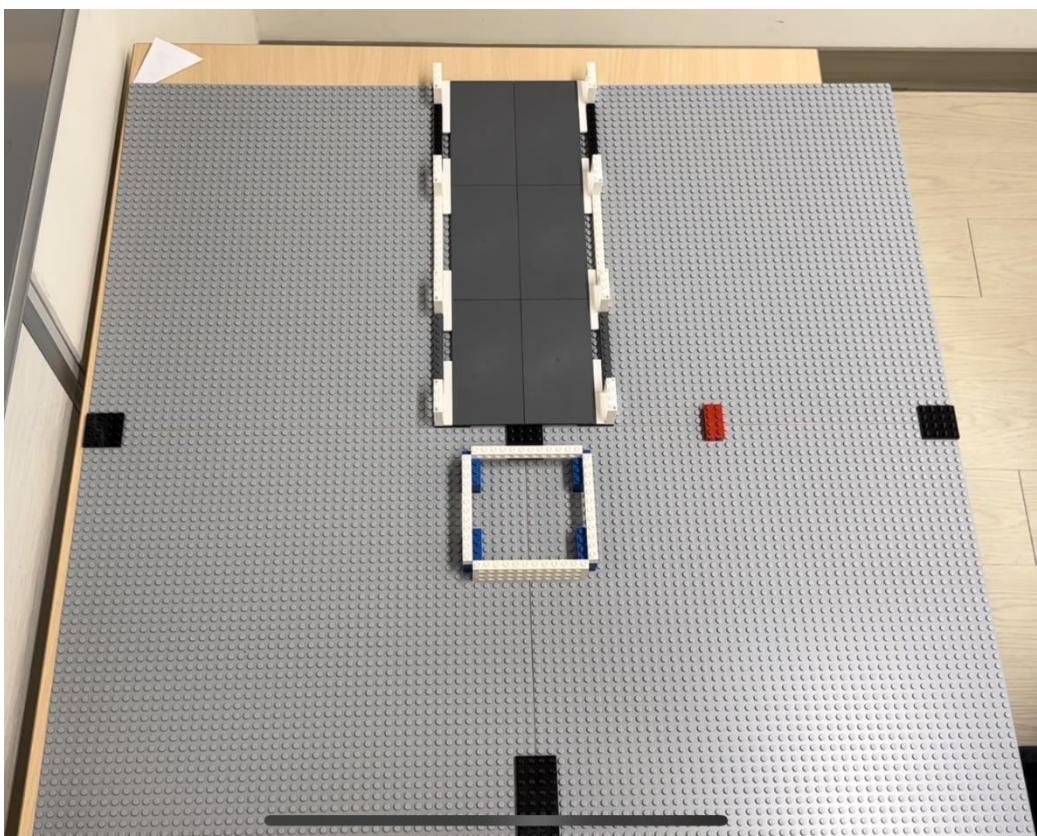


圖 4- 11 樂高基板安裝完成圖

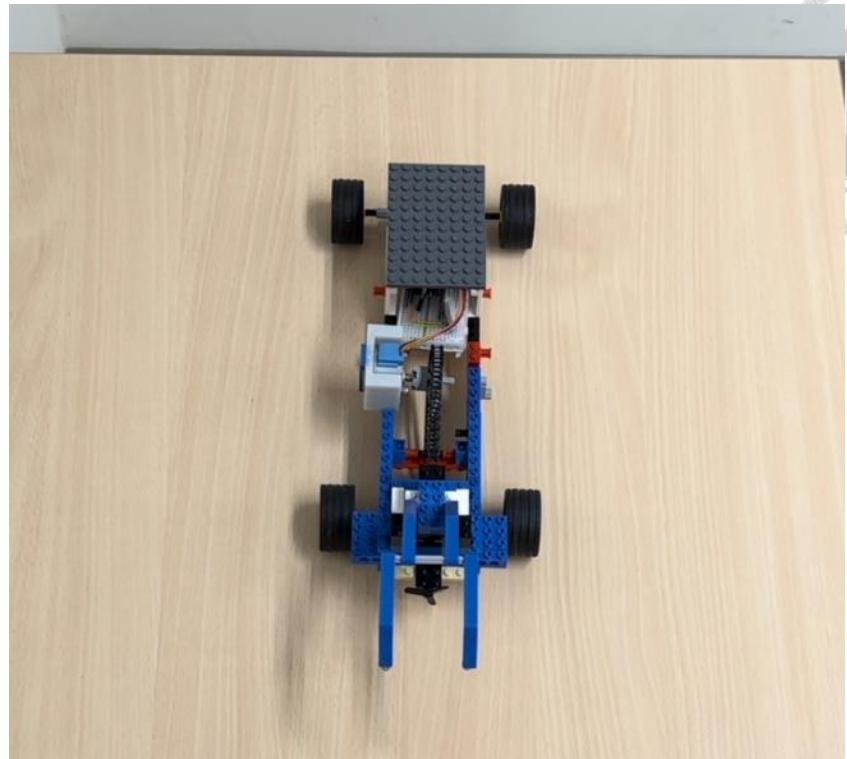


圖 4-12 控制系統安裝完成圖

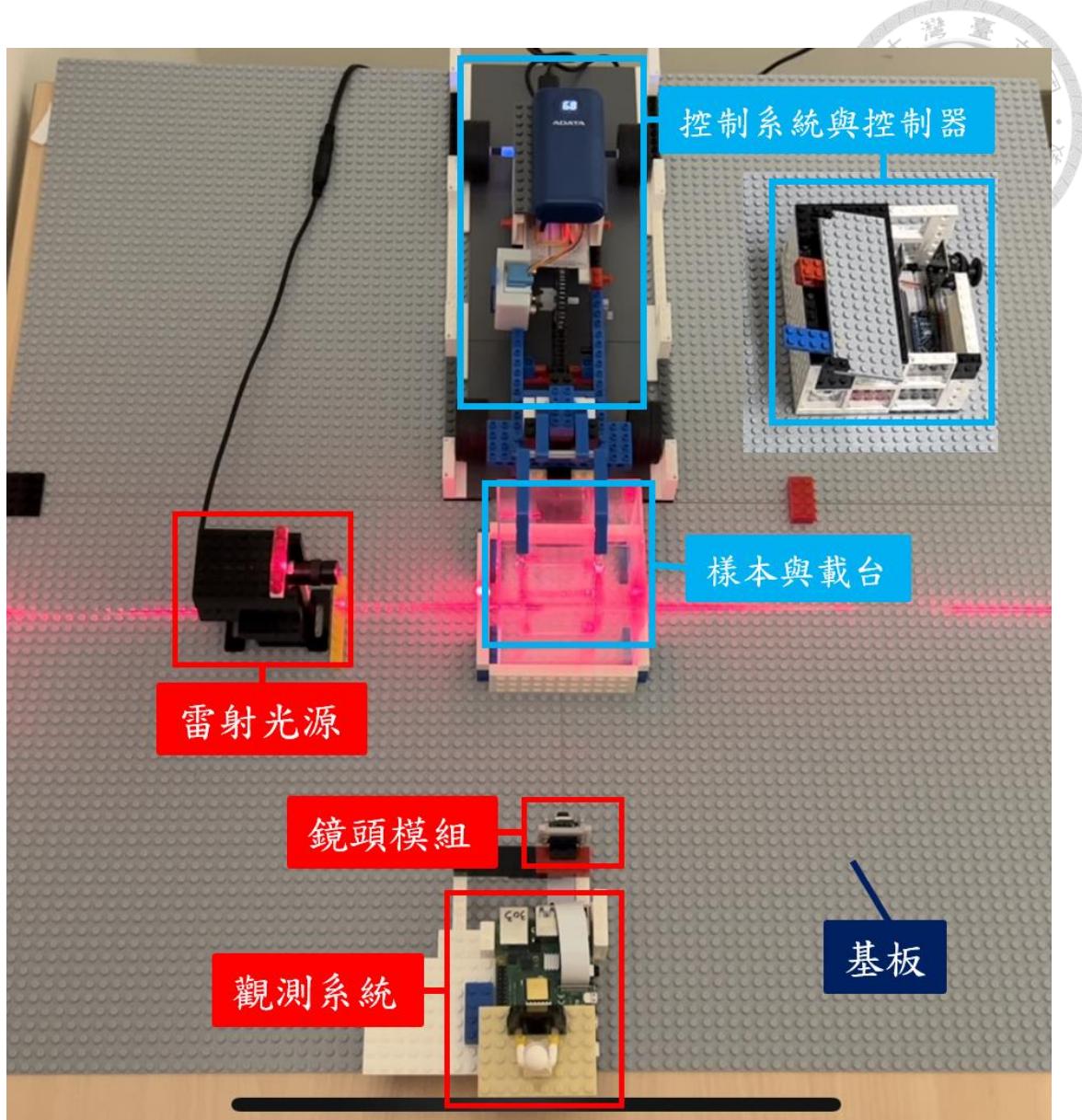


圖 4-13 樂高層光顯微鏡各部件相對位置與光路示意圖



4.3 樂高層光顯微鏡的操作步驟與實驗流程

本小節將介紹樂高層光顯微鏡的操作流程，並說明操作中需要注意的事項。操作步驟與實驗流程圖請參考圖 4-14 所示。

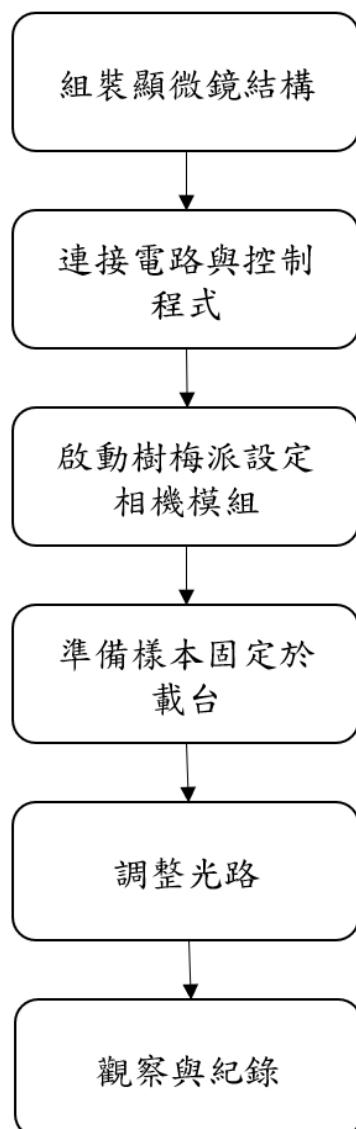


圖 4-14 樂高層光顯微鏡操作流程圖



樂高層光顯微鏡操作流程如下：

1. 依照 4-1 與 4-2 小節提供的指示，完成組裝顯微鏡結構。
2. 將控制樂高動力載具之 Arduino 主板與馬達控制模組及藍芽晶片之電路依序做連接，並將無線控制器上之 Arduino 主板與 Joystick 搖桿及藍芽晶片的電路相連接，並使用如圖 4- 15 所示之 Arduino IDE 程式編譯器，為載具及無線控制器上之 Arduino 主板分別灌入各自的控制程式。最後測試控制系統與無線控制器是否正常運行。
3. 將樹莓派相機模組之排線連接到樹莓派主板上的相機埠，並在接上螢幕與電源後開啟樹莓派。當第一次開啟樹莓派時，需要先進入如圖 4- 16 所示的 raspi 設定畫面，將相機功能開啟，並重新啟動樹莓派。接著便可使用如圖 4- 17 之內建 Python 軟體撰寫控制程式，控制相機的焦距、曝光等各項數值。
4. 將準備好的樣本固定於載台上，並開啟相機將樣本的高度調至適當地觀測位置。如果樣本內部充滿液體的話，務必將樣本進行密封處置，否則將容易造成觀測系統的損壞。且由於載台可拆裝於控制系統，如遇重量較重之樣本，需額外使用固定裝置讓樣本載台與控制系統不會因為樣本之重量而分離或傾倒。
5. 當顯微鏡系統與樣本設定好後，即可開始調整光路。首先，需將柱面透鏡裝於雷射光源的前方，並試著調整兩者之間的距離與角度，直到層光聚焦在樣本的位置。
6. 調整相機的參數使其對焦於樣本，並調整相機的拍攝範圍，使樣本位於預覽視窗的正中央。接著可視環境光線與樣本的性質斟酌調整相機的曝光時間與顏色飽和度，如圖 4- 18 所示。最後選擇拍攝相片的儲存位置，即完成所有操作步驟。

The screenshot shows the Arduino IDE interface with a sketch titled "MOTOR". The code uses SoftwareSerial to communicate with a Bluetooth module and an AccelStepper library to control a stepper motor. The setup function initializes the SoftwareSerial port and sets the stepper's maximum speed. The loop function reads from the serial port and sets the motor's speed based on the received character ('1' or '2').

```
#include <SoftwareSerial.h> // 引用程式庫
#include <AccelStepper.h>

// 定義連接藍牙模組的序列埠
SoftwareSerial BT(8, 9); // 接收腳, 傳送腳
AccelStepper myStepper(AccelStepper::HALF4WIRE, 2, 4, 3, 5);

int val;

void setup() {
    BT.begin(9600);
    myStepper.setMaxSpeed(1000);
}

void loop() {

    val = BT.read();
    if (val == '1') {
        myStepper.setSpeed(600);
        myStepper.runSpeed();
    }
    if (val == '2') {
        myStepper.setSpeed(-600);
        myStepper.runSpeed();
    }
}
```

Arduino/Genuino Micro 於 COM8

圖 4-15 使用 Arduino IDE 編譯器上傳控制程式

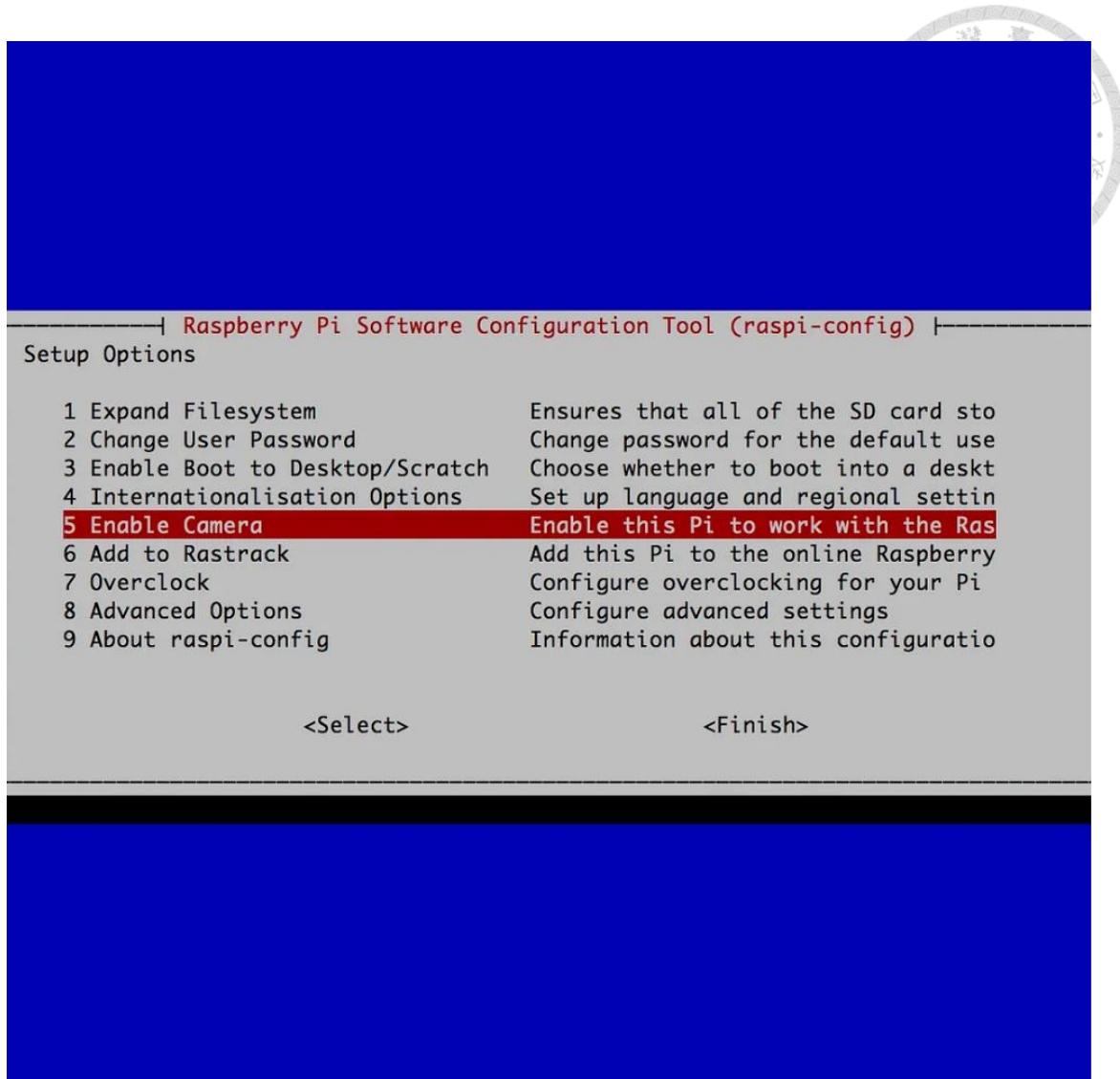


圖 4-16 進入樹莓派 raspi 設定畫面將相機功能開啟

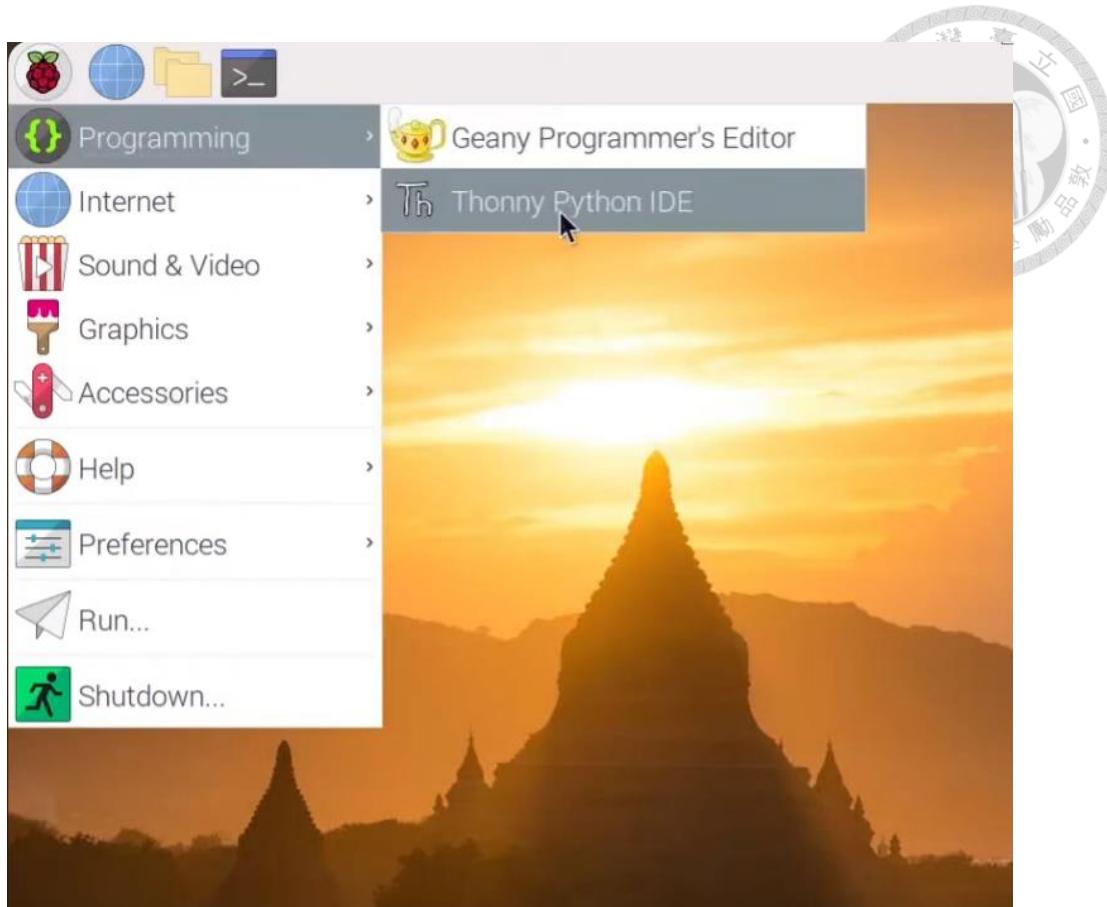


圖 4-17 使用樹莓派內建軟體以程式控制相機模組運行

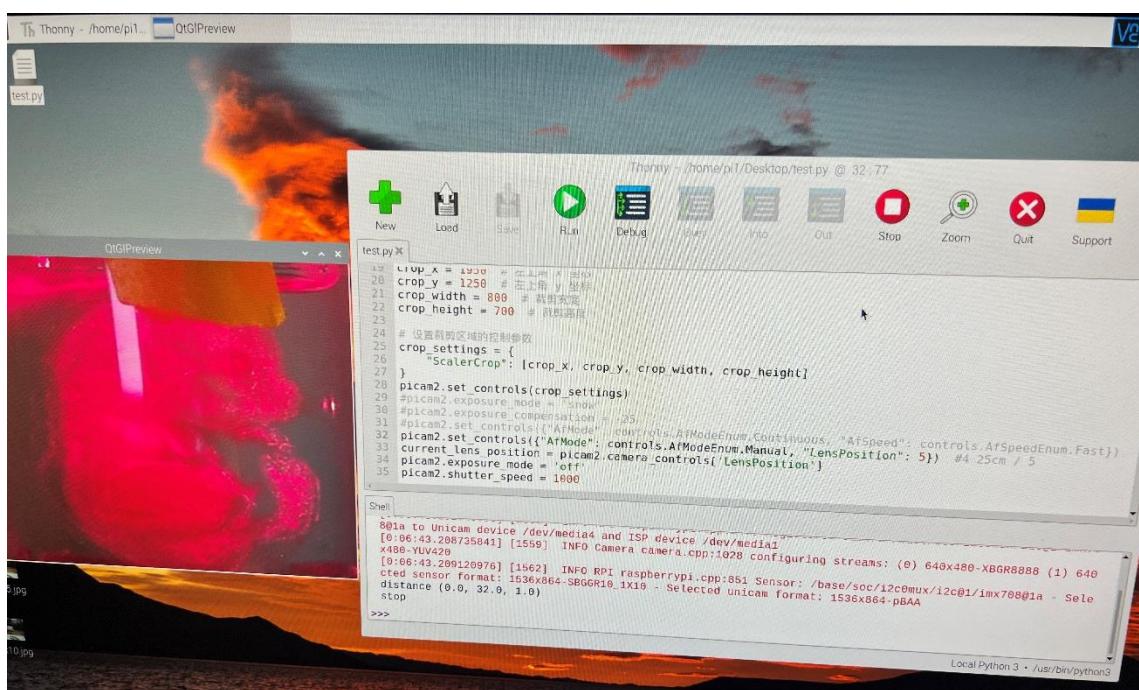


圖 4-18 輸入指令開啟相機預覽視窗調整拍攝參數



4.4 樂高層光顯微鏡觀測樂高積木樣本之成果與討論

本小節將展示我們使用樂高層光顯微鏡觀測樂高積木樣本，並說明樂高層光顯微鏡拍攝的效果。雖然層光顯微鏡目前最為廣泛的被應用在生物樣本的成像上，不過我們也對使用層光顯微鏡觀測非生物的樣本感到非常有興趣，但是考慮到層光顯微鏡的特性，並非所有樣本都適合使用層光顯微鏡進行觀察。在經過挑選與測試後，最終我們選擇使用透明顏色的樂高積木做為觀察的樣本，並且挑選做為樣本的每件樂高積木，其形狀、尺寸、截面與顏色都有很大的差異，以評估樂高層光顯微鏡在觀測不同物體表面細節和內部變化的能力。

4.4.1 透明方形樂高積木之觀測

圖 4-19 所示為方形樂高積木的三視圖，由三視圖中我們可以得知，方形樂高積木的前端有四個突起的圓柱，在這些圓柱上方印有 LEGO® 的商標，但是在尚未使用層光的情況，透由圖 4-20 我們發現樂高積木前端的商標與表面特徵並不明顯。

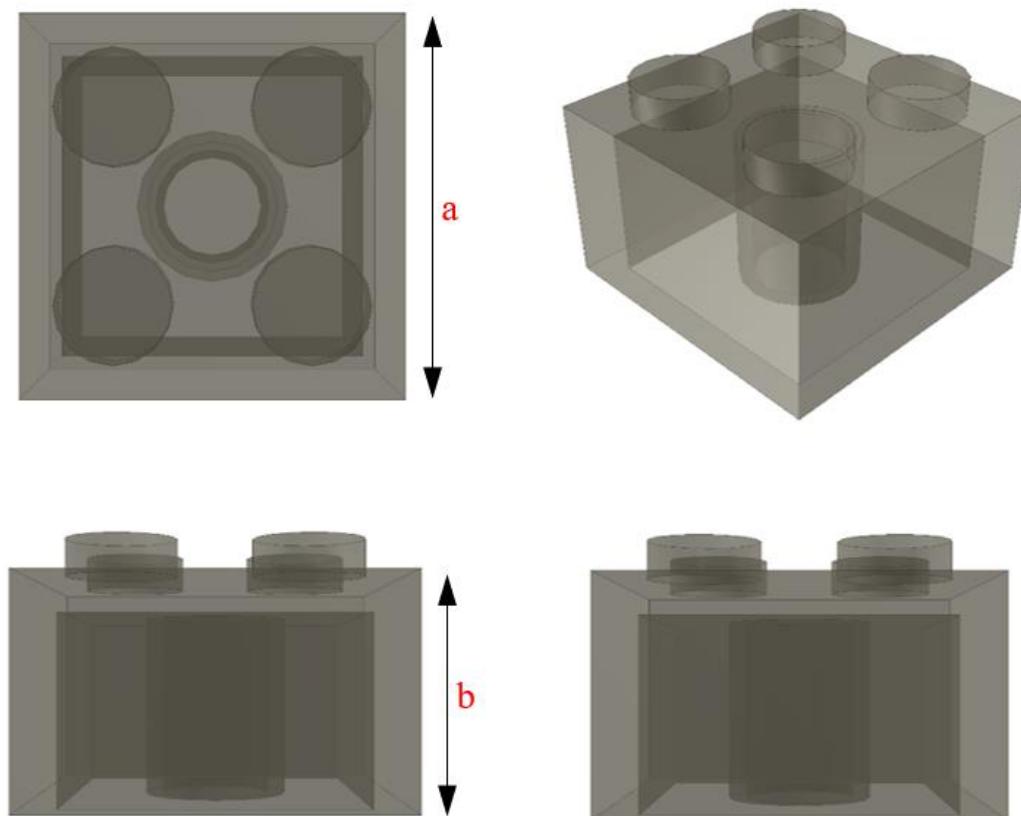


圖 4-19 方形樂高積木三視圖(a:15.8mm、b:9.6mm)

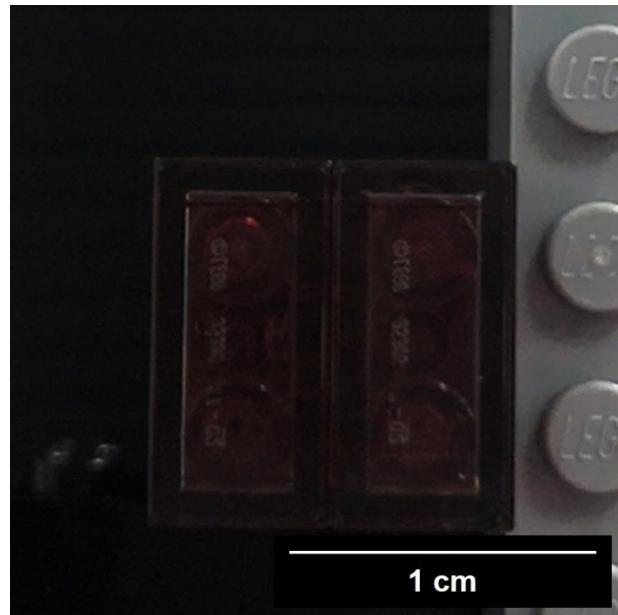


圖 4-20 尚未開啟層光功能拍攝之樂高積木

接著我們使用層光拍攝方形樂高積木之表面，這時如圖 4-21 所示，我們發現可以清楚的觀測到樂高積木表面的商標以及四個圓柱特徵。

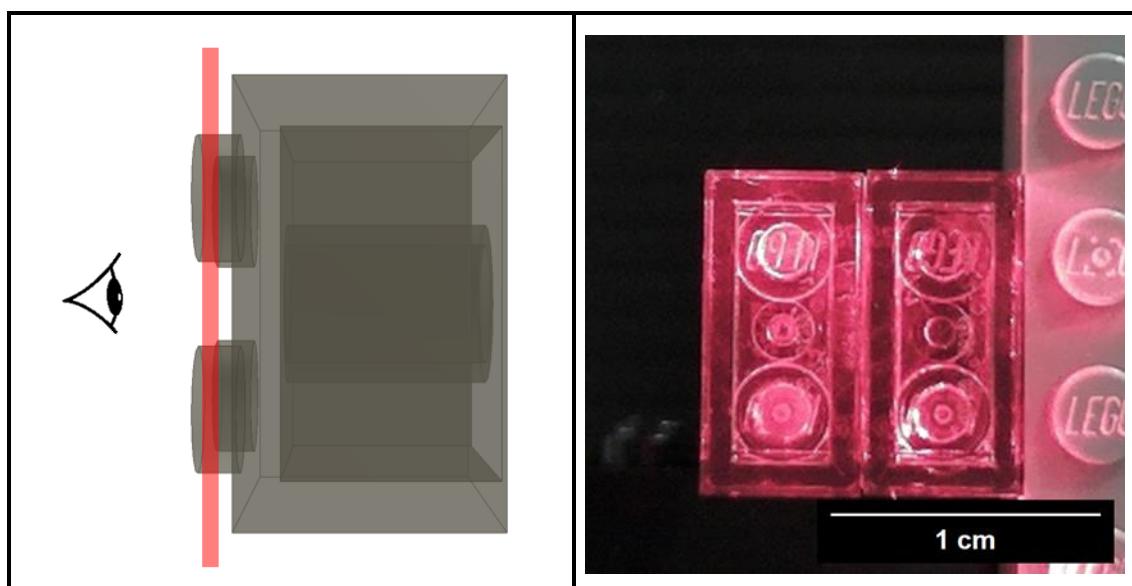


圖 4-21 左側為層光照射樣本之示意圖、右側為實際拍攝樣本照片

並且透過三視圖我們也得知，方形樂高的後端有一較大的圓柱，與其前方的截面形狀不同，因此我們移動樣本使層光照射方形樂高的後端，也發現如圖 4-22 所示，這時樂高前端的商標與表面特徵變為較不明顯，取而代之的是樂高後端的大圓柱因層光而形成的圓環截面更為明顯，因此我們依此實驗可以驗證樂高層光顯微鏡能夠使觀測者辨別樣本表面特徵與內部構造的差異。

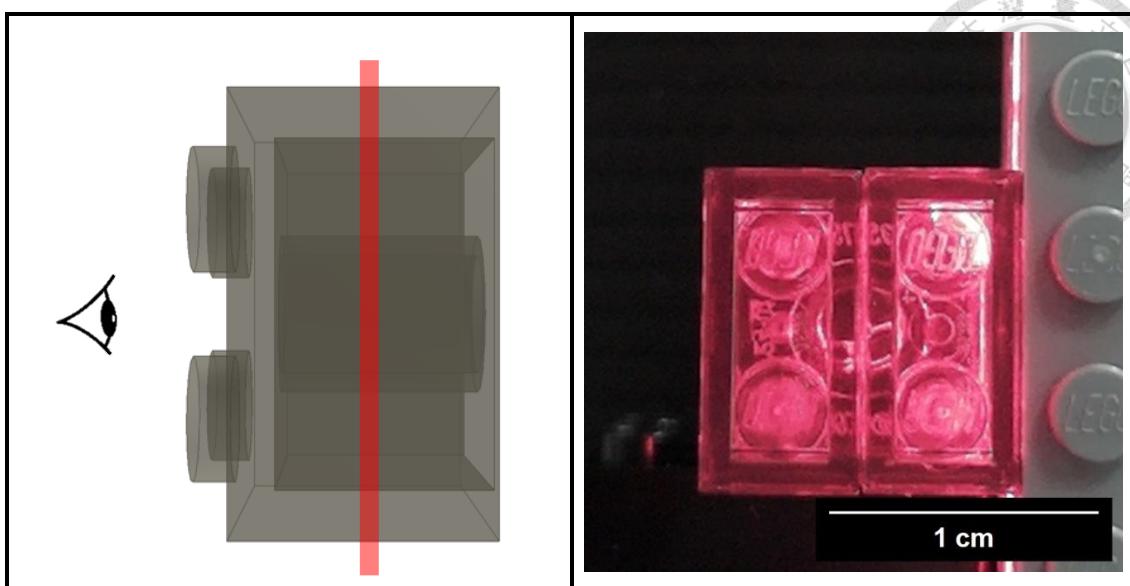


圖 4-22 左側為層光照射樣本之示意圖、右側為實際拍攝樣本照片

4.4.2 透明橋形樂高積木之觀測

圖 4-23 所示為橋形樂高積木的三視圖，前端與方形樂高積木相似，表面的圓柱印有 LEGO®商標，而橋形樂高積木的中段截面形狀則變為狹窄的ㄇ字結構，但是從圖 4-24 所示尚未使用層光拍攝的圖片，我們並無法得知樂高積木截面形狀的變化。

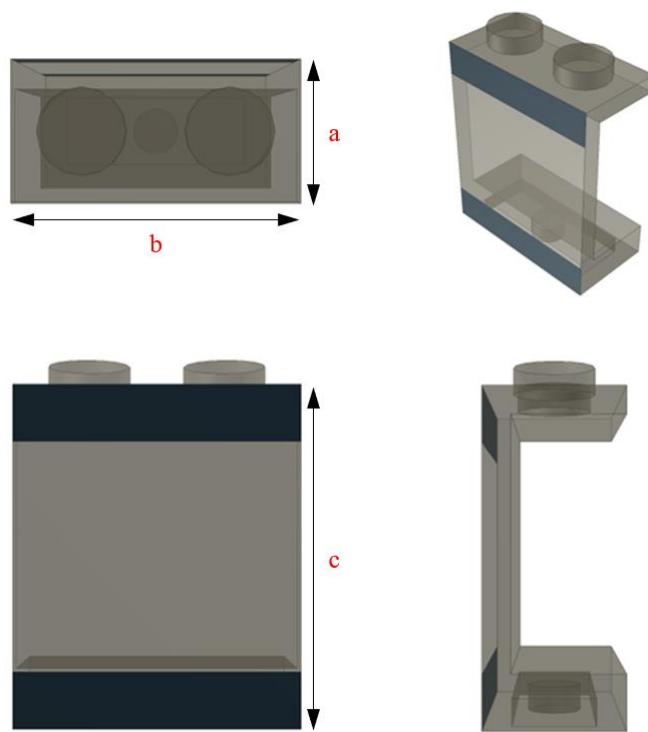


圖 4-23 橋形樂高積木三視圖(a:7.8mm、b:15.8mm、c:30.5mm)

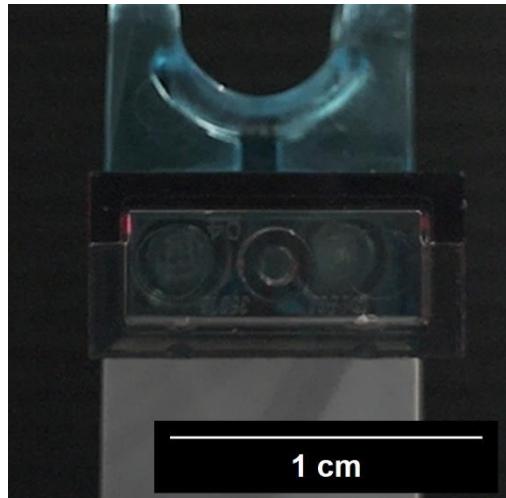
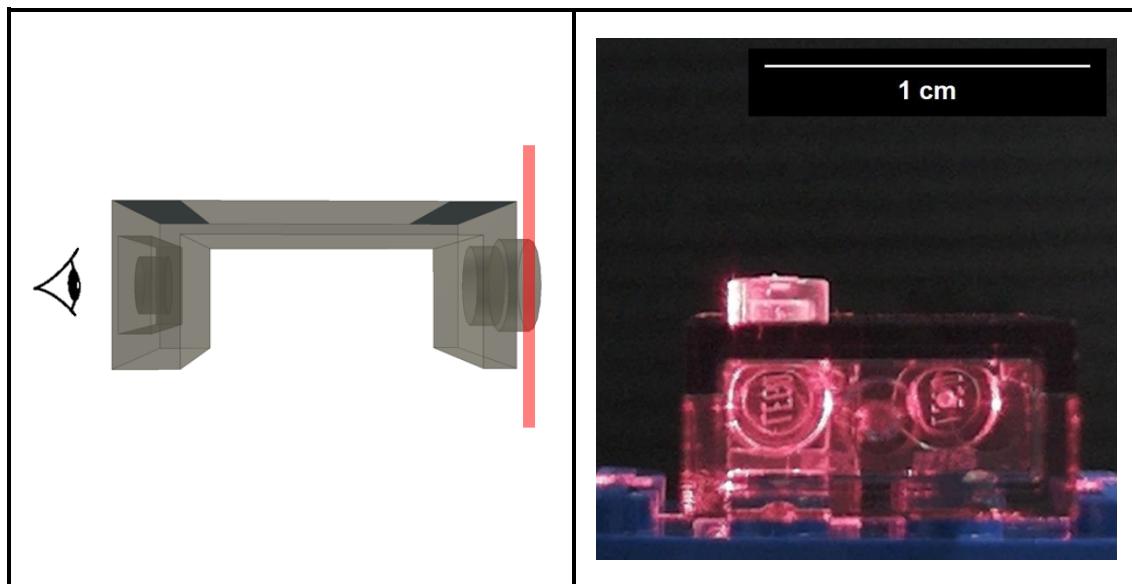


圖 4-24 尚未開啟層光功能拍攝之橋形樂高積木

這時當我們使用層光觀測樂高積木樣本時，則透過層光我們可以發現如圖 4-25 所示，橋式樂高積木的前端、中央以及後端的截面形狀各不相同。因此如果我們將層光拍攝的樂高積木截面形狀依照位置進行組合的話，我們便可透由層光拍攝的照片組合出完整的樂高積木立體模型，藉此驗證樂高層光顯微鏡具有觀測三維影像的功能。



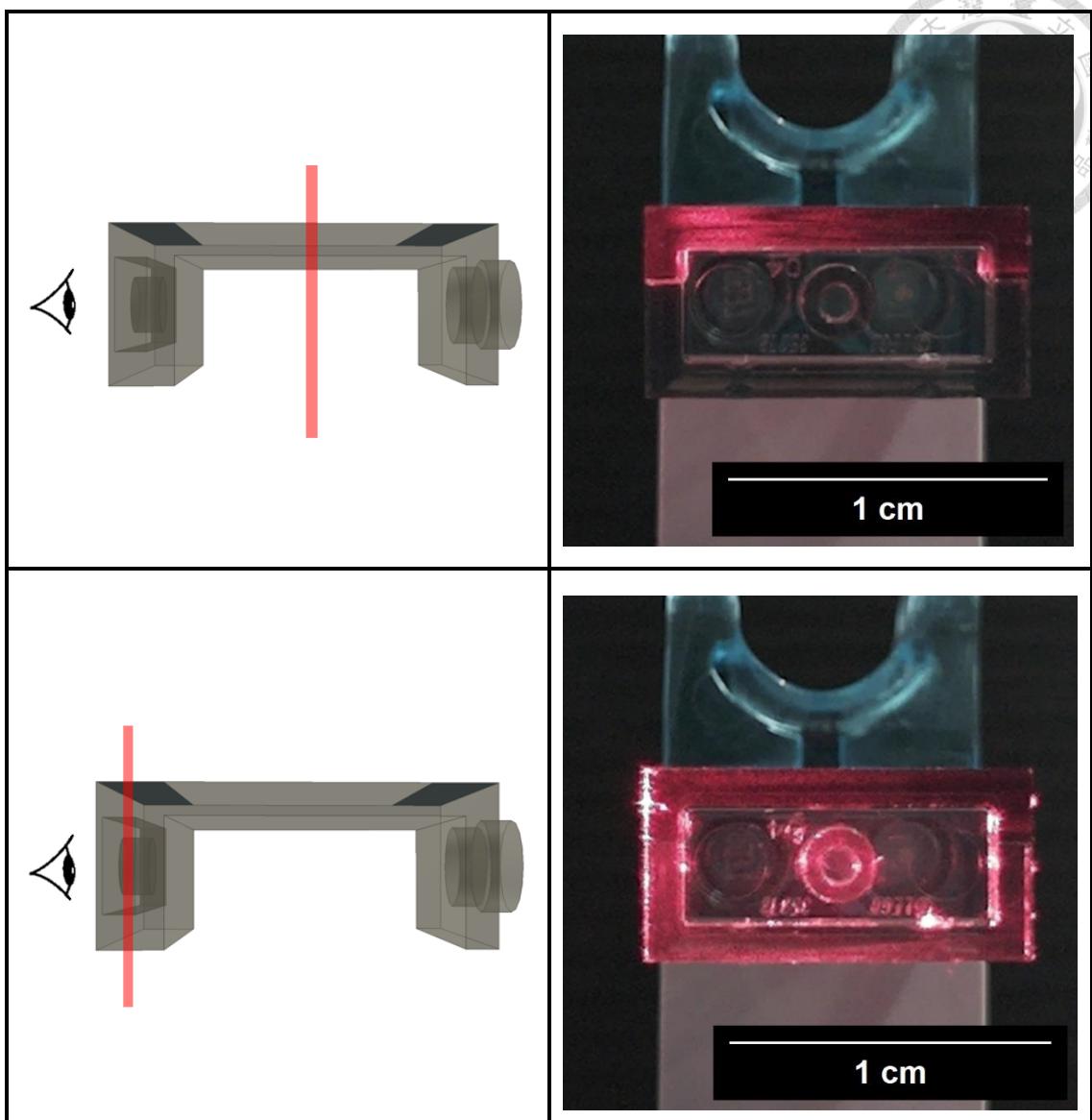


圖 4-25 左側為層光照射樣本之示意圖、右側為實際拍攝樣本照片

4.4.3 特殊形狀樂高積木之觀測

圖 4-26 所示為特殊形狀樂高積木的三視圖，本小節我們將展示使用層光技術觀測特殊形狀的樂高積木，透過調整樣本的位置使層光聚焦在樂高積木的後方。此時透由比對層光拍攝的照片圖 4-27，我們可以觀察到層光聚焦後凸顯了樂高積木後方突起的螺紋形狀與文字，使其能夠清楚的顯示。

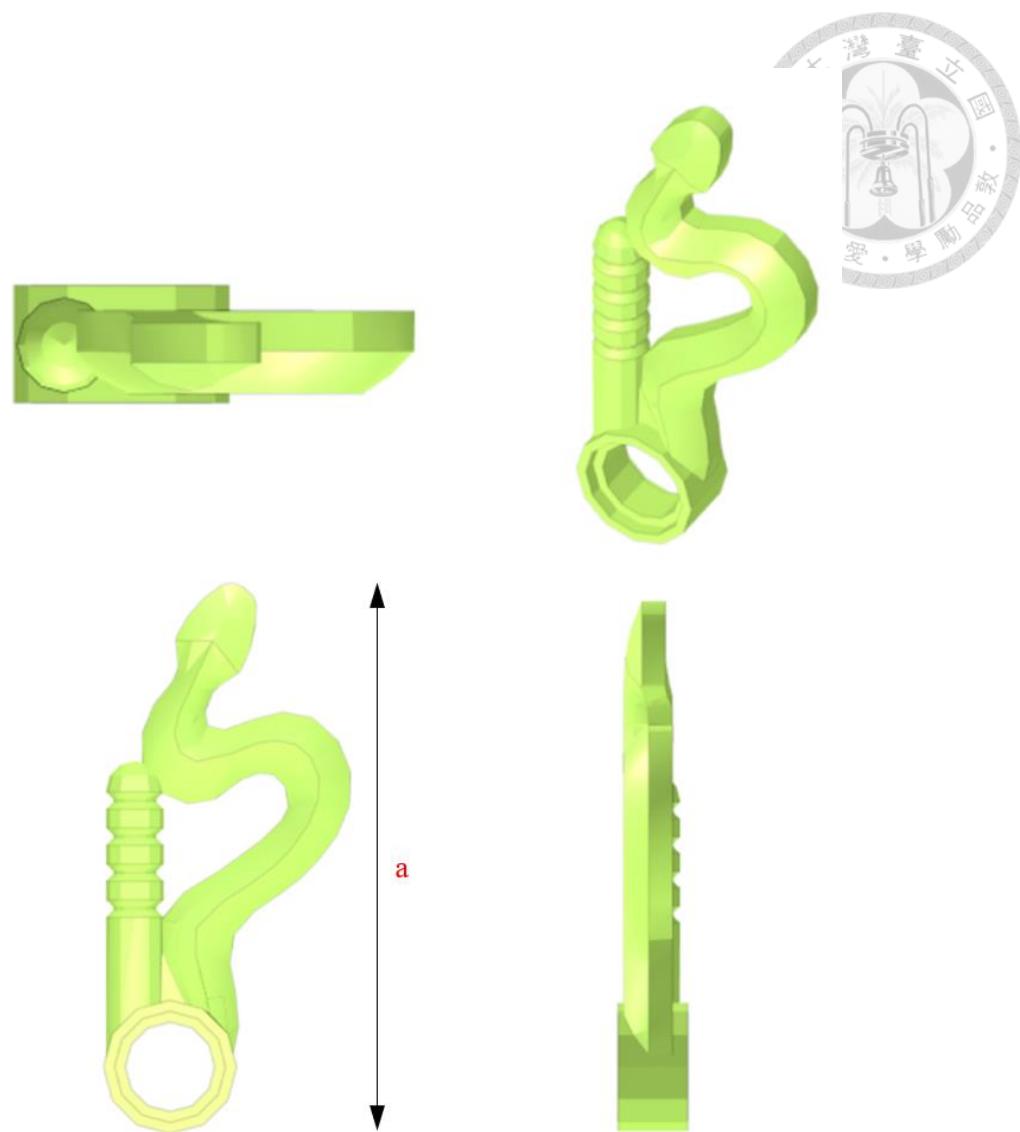
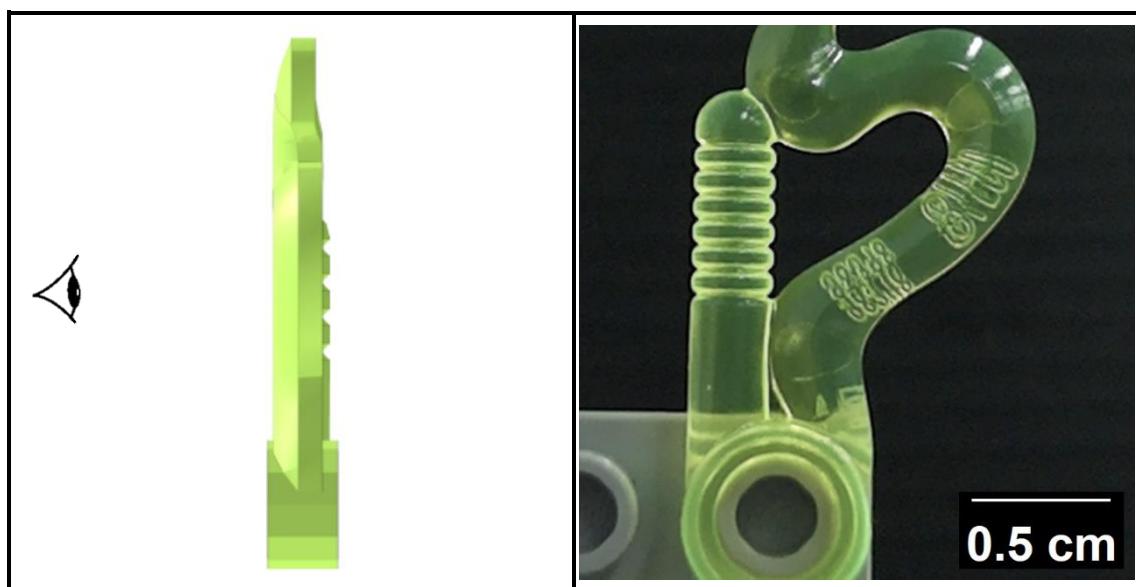


圖 4- 26 特殊形狀樂高積木三視圖(a:30.5mm)



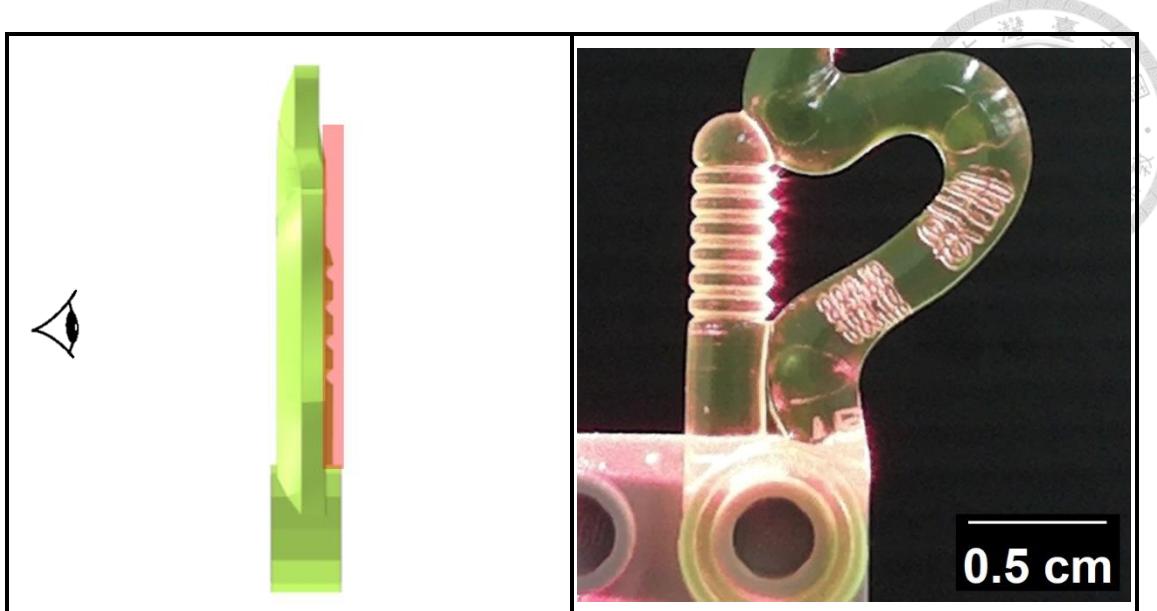


圖 4-27 上層為尚未使用層光拍攝之圖片、下層為使用層光後凸顯的樣本特徵

4.4.4 樂高積木在微觀尺度下之觀測

接下來本小節將展示，使用樂高層光顯微鏡在微觀尺度下觀察樂高積木樣本，並說明我們觀察到的樣本特徵。首先，我們在微觀尺度下觀察 4.4.3 節的特殊形狀樂高積木，透過圖 4-28 所示的巨觀與微觀尺度比較圖，此時我們可以透由巨觀與微觀尺度樣本照片的像素與實際距離的比值，推算出樂高層光顯微鏡系統整體的放大倍率約為 7.5 倍。而觀察微觀尺度下的樣本，我們可以更清晰的看到樂高積木表面的紋理，並且我們發現，推測是受到樣本折射效應的影響，樂高積木的螺紋右側亮度明顯大於左側，且與巨觀尺度的樣本呈現相同的效應。

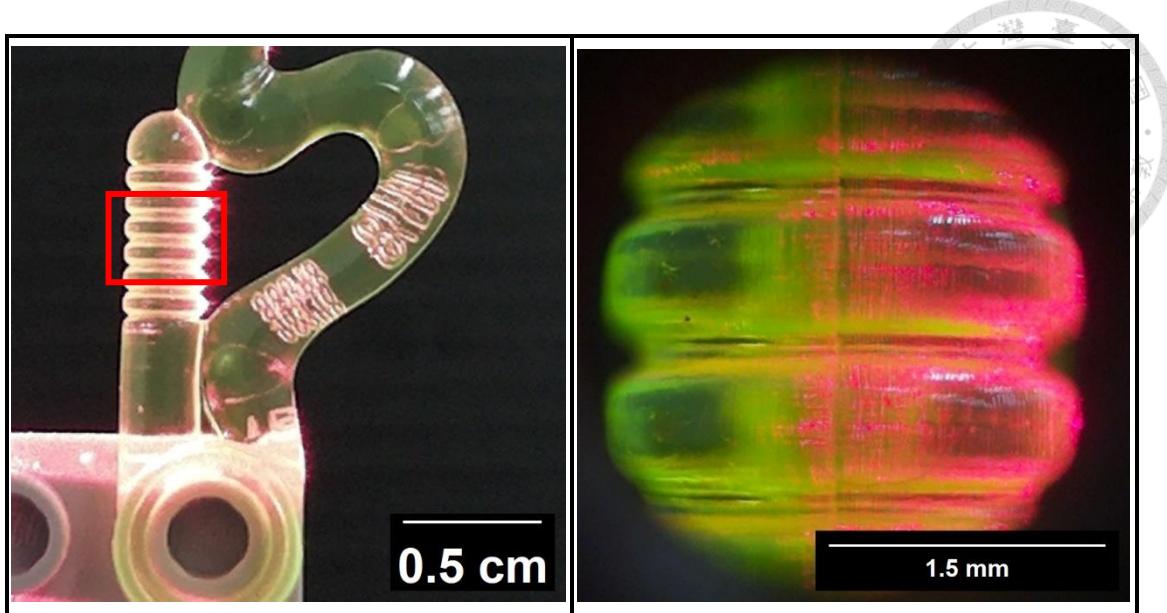


圖 4-28 特殊形狀樂高巨觀(左側)與微觀(右側)尺度比較圖

接著我們在微觀尺度下觀察樂高積木的表面突起與 LEGO®商標。此時，由圖 4-29 我們發現在微觀尺度下使用層光技術，可以讓我們清楚的觀察到樂高積木表面的裂紋與商標上塑膠成型的痕跡，以及樂高積木製造時空氣混入而形成的微氣泡。

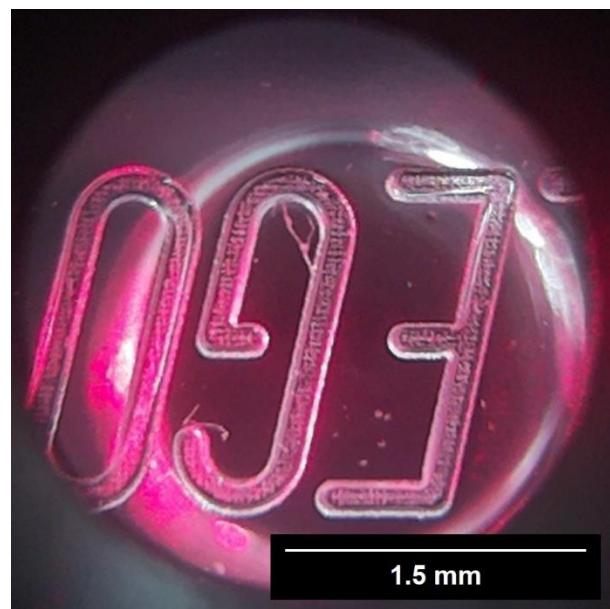


圖 4-29 使用層光技術觀測微觀尺度下的樂高積木表面



最後，我們使用層光技術，觀察在微觀尺度下寶石形狀樂高的底部孔洞。並透過如圖 4-30 的比較，我們發現在微觀尺度下，層光技術能夠使寶石形狀樂高的孔洞截面形狀更加清晰地呈現在我們面前。

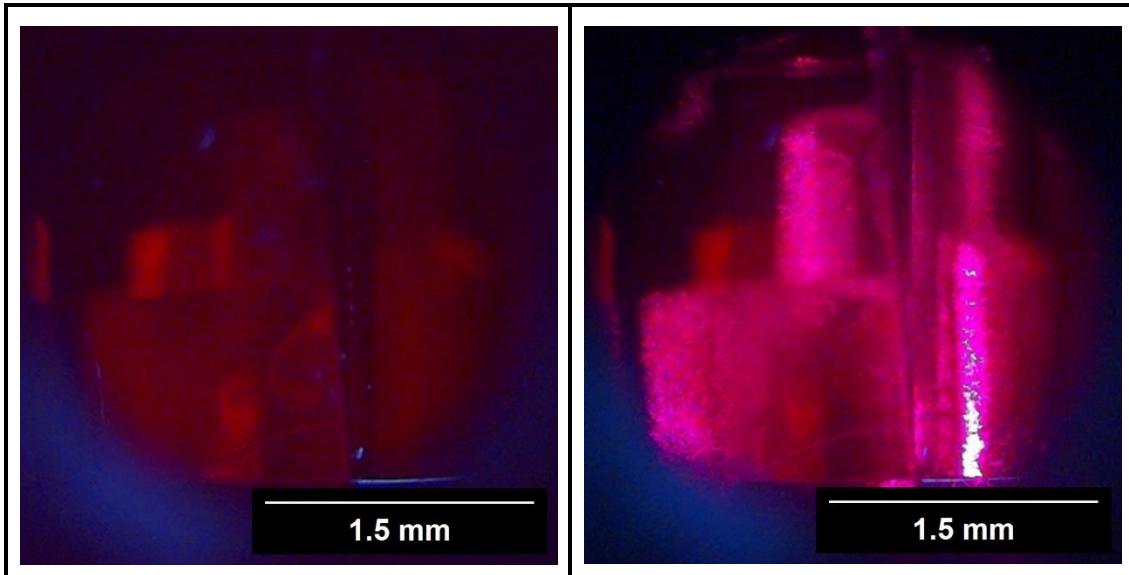


圖 4-30 微觀尺度下直接觀察樣本(左側)與使用層光技術觀察樣本(右側)



第五章 數位影像關聯法分析結果

本章節說明應用本論文研究搭建的樂高層光顯微鏡，並實作數位影像關聯法分析試件不同類型運動之位移及變形場，並探討研究結果。

5.1 數位影像關聯法實驗

由於數位影像關聯法是基於追蹤物體表面的特徵點進行分析，因此進行數位影像關聯法實驗前，須在待分析樣本的表面噴灑標記。並且由於噴灑的標記會對數位影像關聯法的分析品質產生很大的影響，噴灑均勻且大小適當的標記，便是一項重要的準備工作。

在本研究論文中，我們將在巨觀與微觀的尺度下對樣本進行分析，在製作巨觀尺度的樣本時，我們使用墨汁裝進酒精噴瓶內，對著樣本表面均勻地噴灑散斑，並且控制墨汁噴灑在樣本上的量，以避免過多的墨汁在表面集結。而製作微觀尺度的樣本時，由於酒精噴瓶噴出的散斑尺寸過大，在微觀尺度下很容易使數位影像關聯法的分析結果失真，因此我們將醫療口罩內部的病毒過濾層取下，並將其覆蓋在酒精噴瓶的噴頭上。此時，噴出的散斑尺寸便會大幅縮小，並使我們在微觀尺度下的分析更為精確。

5.2 巨觀尺度分析

5.2.1 平移剛體運動分析

本小節說明應用本論文研究搭建的樂高層光顯微鏡，實作數位影像關聯法分析平移剛體於巨觀尺度運動之分析。在本次實驗中，使用長方形軟糖做為觀測樣本，將樣本固定完成後，控制載台使樣本向右側位移 24 毫米，並使用顯微鏡的相機模組進行紀錄，參考(位移前)影像與目前(位移後)影像如圖 5-1 所示，數位影像關聯法分析的影像解析度為 1600*1200，觀測區域如圖 5-1 所示，為參考影像的紅框範圍內，數位影像關聯法設定的參數中，子集合半徑為 40(pixel)、子集點間距為 2(pixel)，數位影像關聯法的迭代次數為 100 次，平行運算核心數為 6。分析得到的



位移場如圖 5-2 所示為 x 方向的位移量 u ，圖 5-3 所示為 y 方向的位移量 v 。由此結果我們可以得知 x 方向的位移量與實際的位移量 24 毫米非常相近，且 y 方向的位移量在 0.5 毫米以內，顯示系統運作的平穩性，不會在移動樣本時產生顯著的誤差。

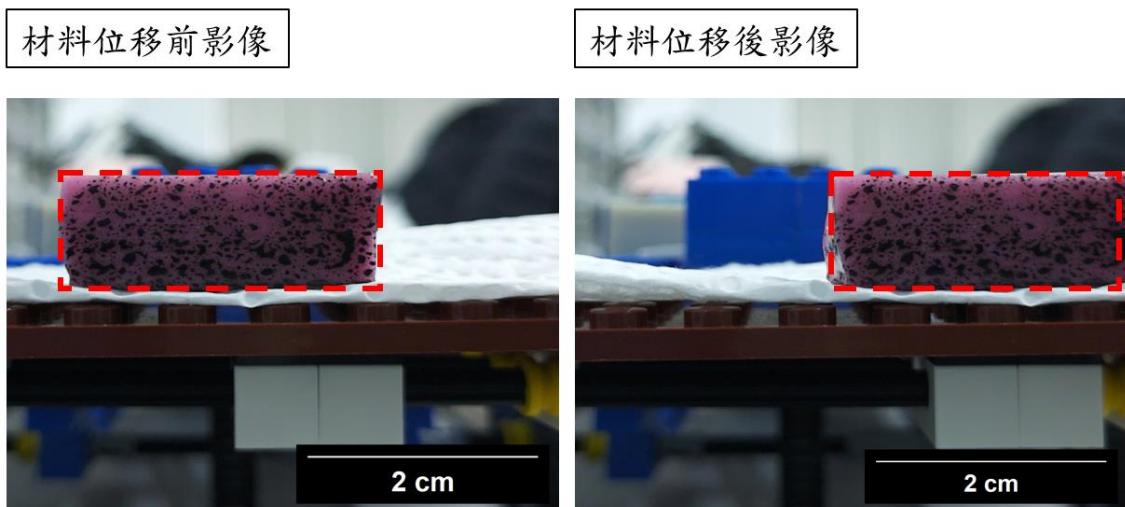


圖 5-1 數位影像關聯法分析之參考影像(左)與目前影像(右)

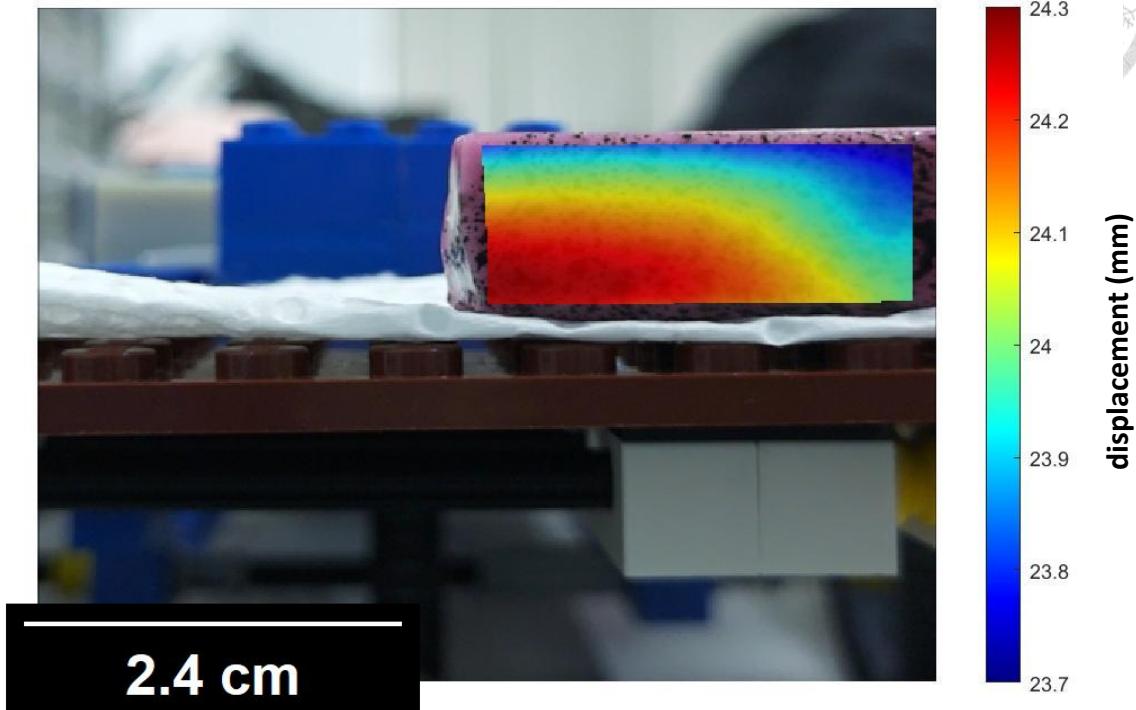


圖 5-2 樣本位移時 x 方向的位移量 u

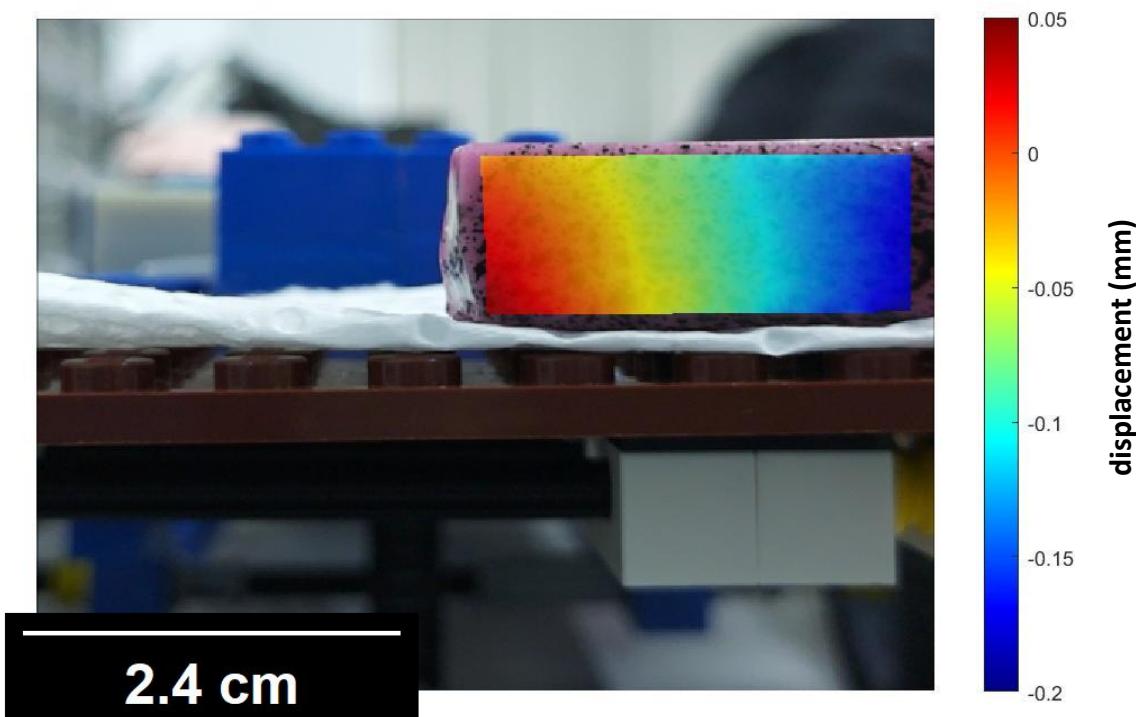


圖 5-3 樣本位移時 y 方向的位移量 v



5.2.2 旋轉剛體運動分析

本小節說明應用本論文研究搭建的樂高層光顯微鏡，實作數位影像關聯法分析旋轉剛體在巨觀尺度運動之分析。本實驗中，同樣使用方形軟糖做為觀測樣本，轉動樣本載台並使用顯微鏡相機模組進行紀錄，參考(位移前)影像與目前(位移後)影像如圖 5-4 所示，數位影像關聯法分析的影像解析度為 1600*1200，觀測區域如圖 5-4 參考影像的紅框範圍內，數位影像關聯法設定的參數中，子集合半徑為 40(pixel)、子集點間距為 1(pixel)，數位影像關聯法的迭代次數為 100 次，平行運算核心數設定為 6。分析得到的位移場如圖 5-5 所示為 x 方向的位移量 u ，圖 5-6 所示為 y 方向的位移量 v 。

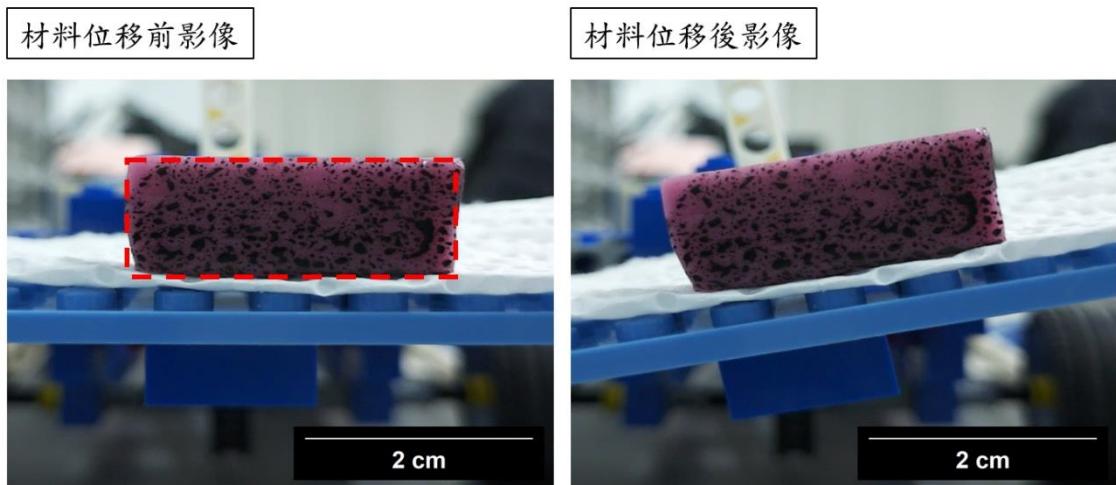


圖 5-4 數位影像關聯法分析之參考影像(左)與目前影像(右)

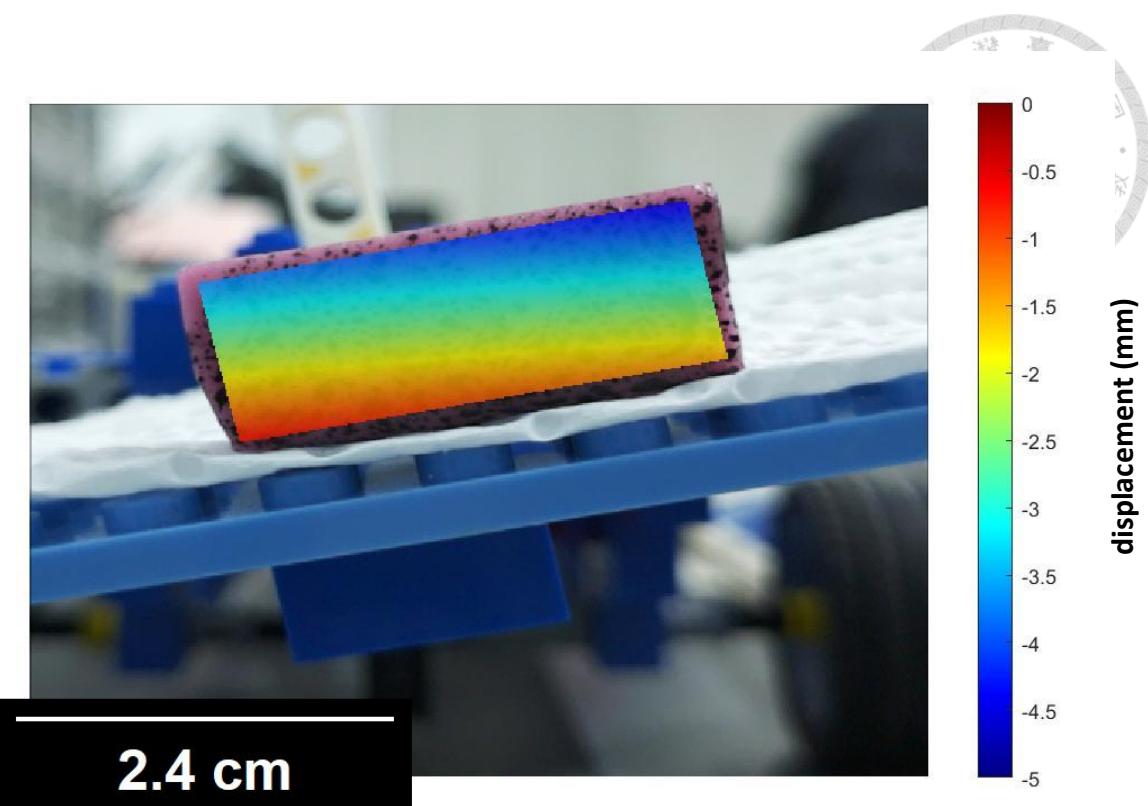


圖 5-5 樣本位移時 x 方向的位移量 u

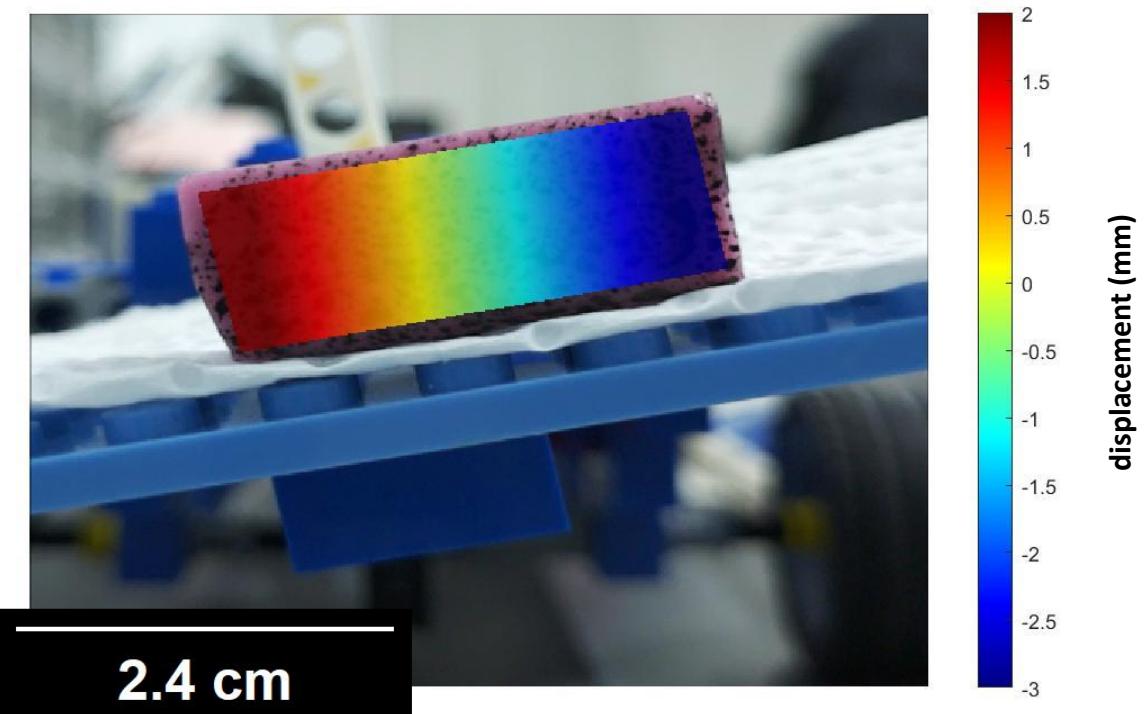


圖 5-6 樣本位移時 y 方向的位移量 v



5.2.3 壓印變形分析

本小節將展示數位影像關聯法實作在巨觀尺度中，分析樣本受到壓印產生之變形分析。本次實驗中，同樣使用方形軟糖做為觀測樣本，控制機構從上方對樣本頂部施加壓印，並分別在三種不同壓印程度下使用相機模組進行紀錄，三種壓印程度分別為使用壓印機構輕壓、重壓、以及壓印機構卸載後。樣本的參考(位移前)影像與目前(位移後)影像如圖 5-7 所示，數位影像關聯法分析的影像解析度為 1600*1200，觀測區域如圖 5-7 參考影像的紅框範圍內，數位影像關聯法設定的參數中，子集合半徑為 30(pixel)、子集點間距為 2(pixel)，數位影像關聯法的迭代次數為 100 次，平行運算核心數設定為 6。分析結果如圖 5-8 所示為輕壓狀態時樣本的 x 方向變形量 u 與 y 方向變形量 v ，圖 5-9 所示為重壓狀態時樣本的 x 方向變形量 u 與 y 方向變形量 v ，圖 5-10 所示為壓印機構卸載後樣本的 x 方向變形量 u 與 y 方向變形量 v 。由分析結果我們可以得知，在輕壓狀態時，壓印機構初接觸到樣本，因此 y 方向的變形量最大值僅有 0.55 毫米，而 x 方向的變形量表示樣本受到擠壓的緣故，以中線為分界朝兩邊膨脹變形。而在重壓狀態下，樣本的 y 方向變形量增大至 1.8 毫米，並且變形量以同心圓的方式朝兩旁遞減。而 x 方向的變形量則與前面輕壓時類似，且變形量正負的分界線呈現更垂直的狀態。而卸載後的變形場則可以讓我們觀察到，非彈性材料在受到壓力後產生的永久變形。此分析結果也顯示數位影像關聯法也能夠準確地進行小變形的分析。

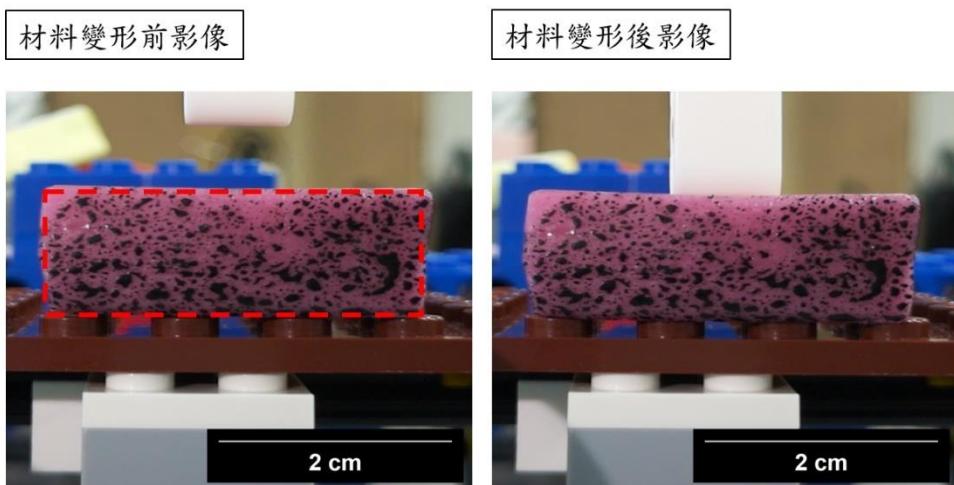


圖 5-7 數位影像關聯法分析之參考影像(左)與目前影像(右)

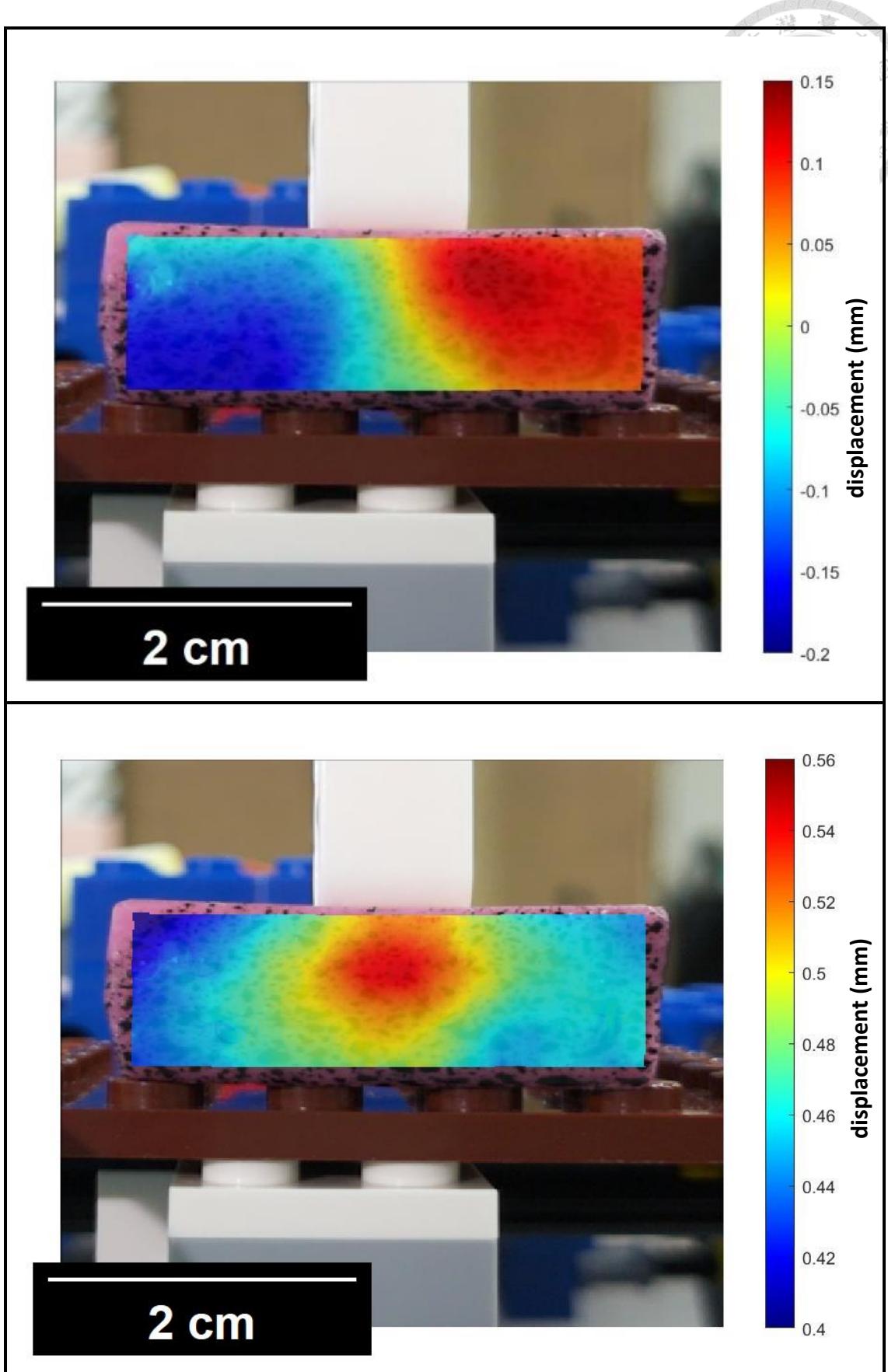


圖 5-8 樣本受輕壓狀態下的 x 方向變形量(上圖)與 y 方向變形量(下圖)

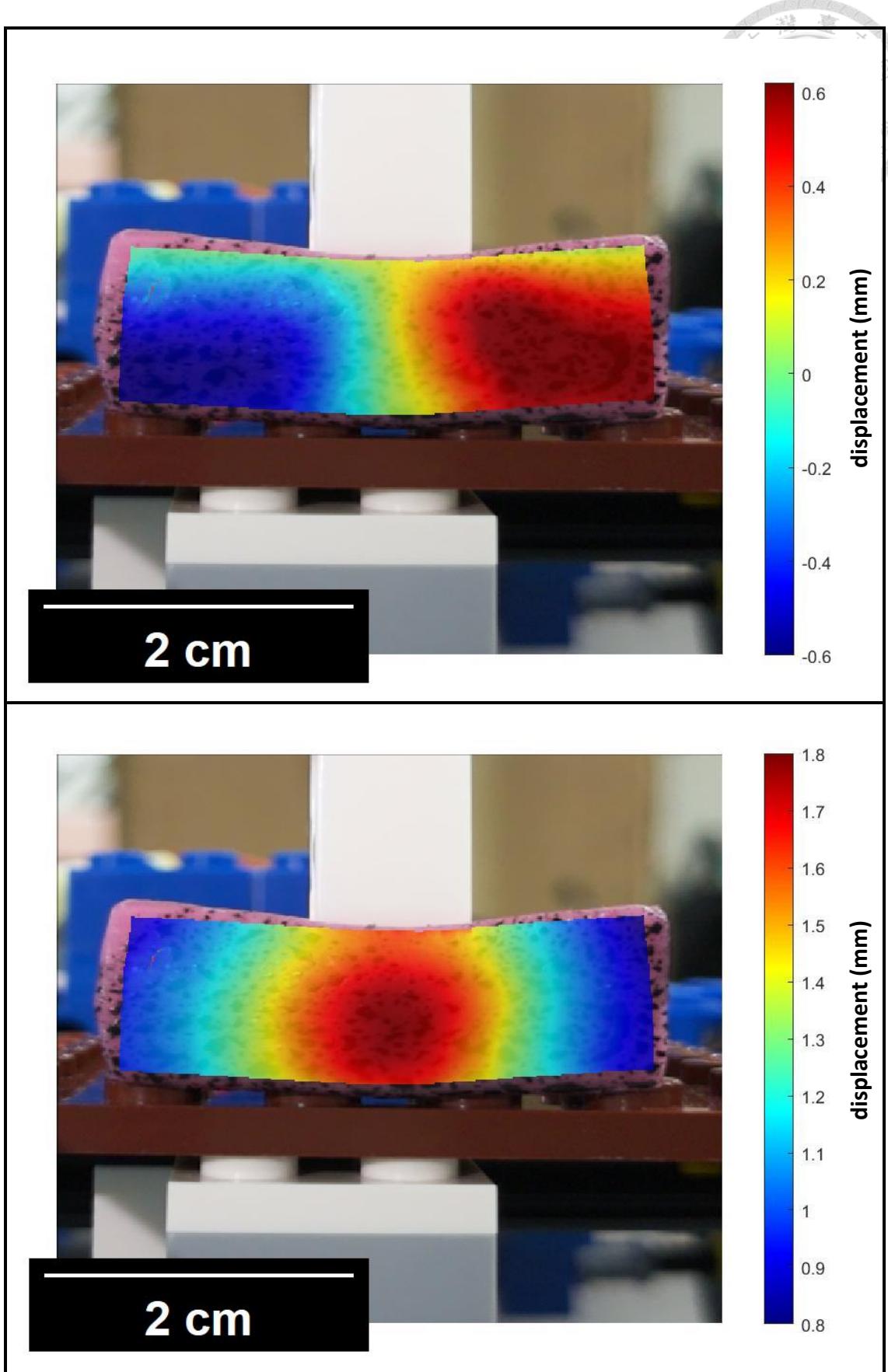


圖 5-9 樣本受重壓狀態下的 x 方向變形量(上圖)與 y 方向變形量(下圖)

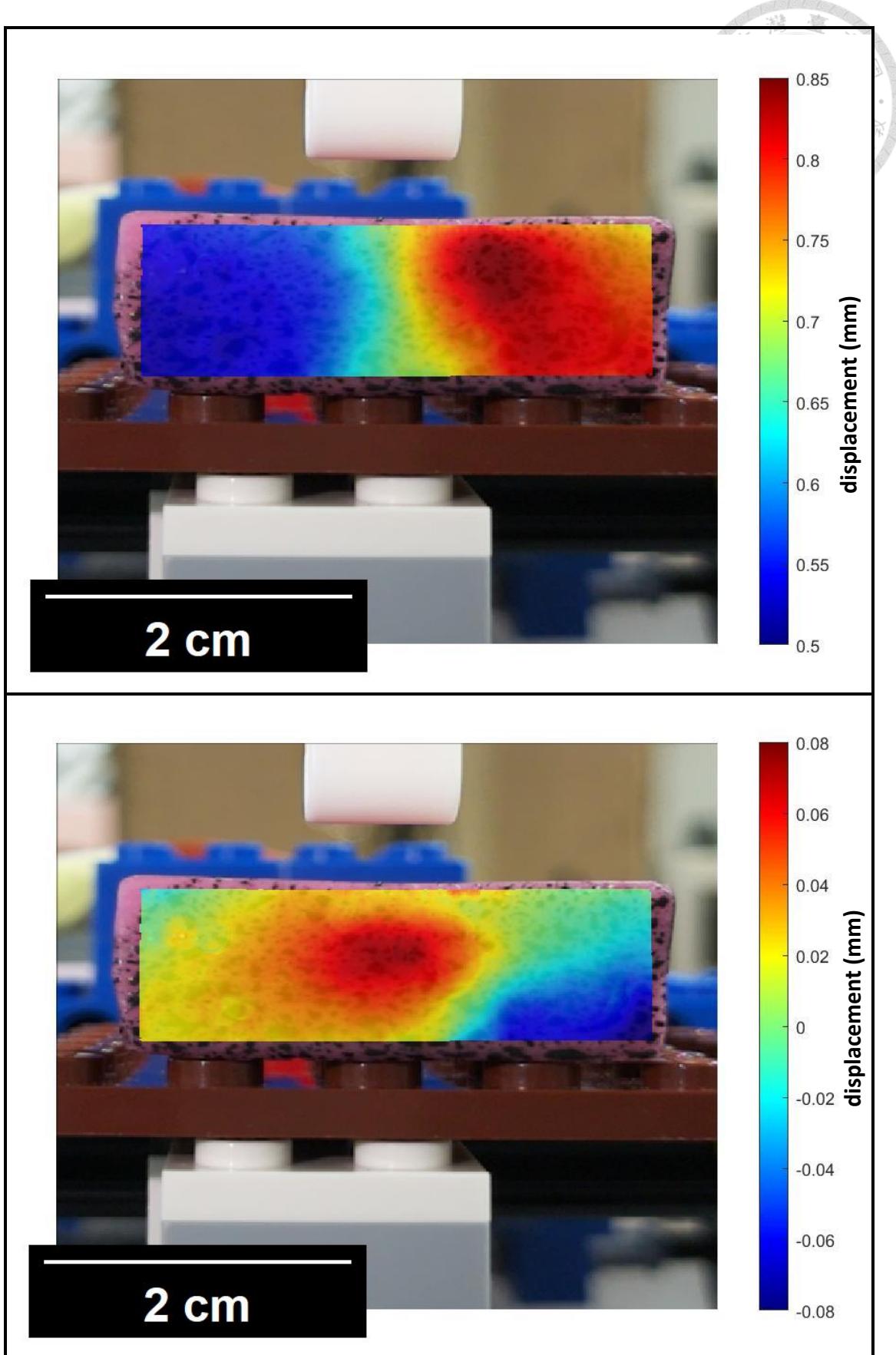


圖 5-10 樣本在卸載狀態下的 x 方向變形量(上圖)與 y 方向變形量(下圖)

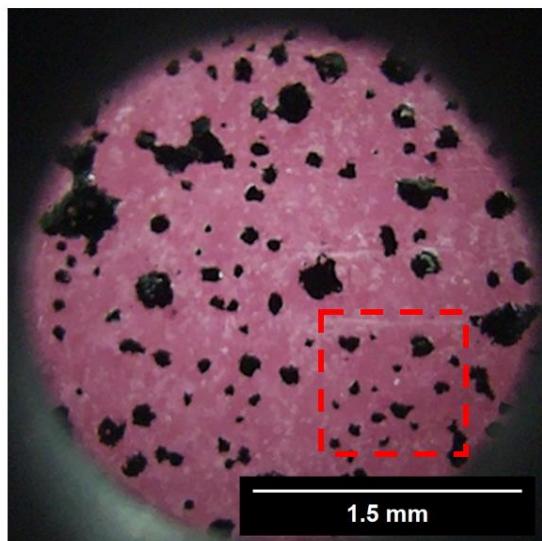


5.3 微觀尺度分析

5.3.1 平移剛體運動分析

在本次實驗中，我們在相機模組前裝上放大物鏡，使用樂高層光顯微鏡的顯微功能在微觀尺度下進行數位影像關聯法分析。使用長方形軟糖做為觀測的樣本，並在樣本固定後，移動載台使樣本向左側位移 0.9 毫米，並使用顯微鏡的相機模組進行紀錄，參考(位移前)影像與目前(位移後)影像如圖 5-11 所示，數位影像關聯法分析的影像解析度為 900*900，觀測區域如圖 5-11 所示，為參考影像的紅框範圍內，數位影像關聯法設定的參數中，子集合半徑為 16(pixel)、子集點間距為 1(pixel)，數位影像關聯法的迭代次數為 100 次，平行運算核心數為 6。分析結果如圖 5-12 所示為 x 方向的位移量 u ，圖 5-13 所示為 y 方向的位移量 v 。由此結果我們可以得知，在微觀尺度下的分析結果容易受到樣本表面標記的影響，在散班較稀疏的部分會產生許多躁點，需要透過噴灑更細緻的散班或是降躁處理，以改善此現象。儘管微觀尺度下的分析結果中出現些許躁點，但是整體的平均位移場還是與實際位移量非常接近。

材料位移前影像



材料位移後影像

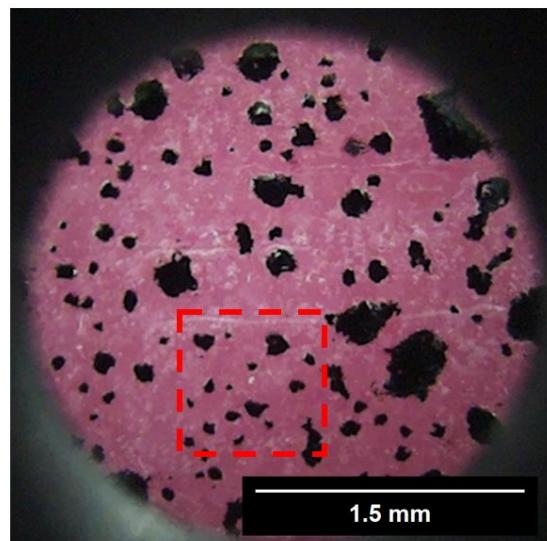


圖 5-11 數位影像關聯法分析之參考影像(左)與目前影像(右)

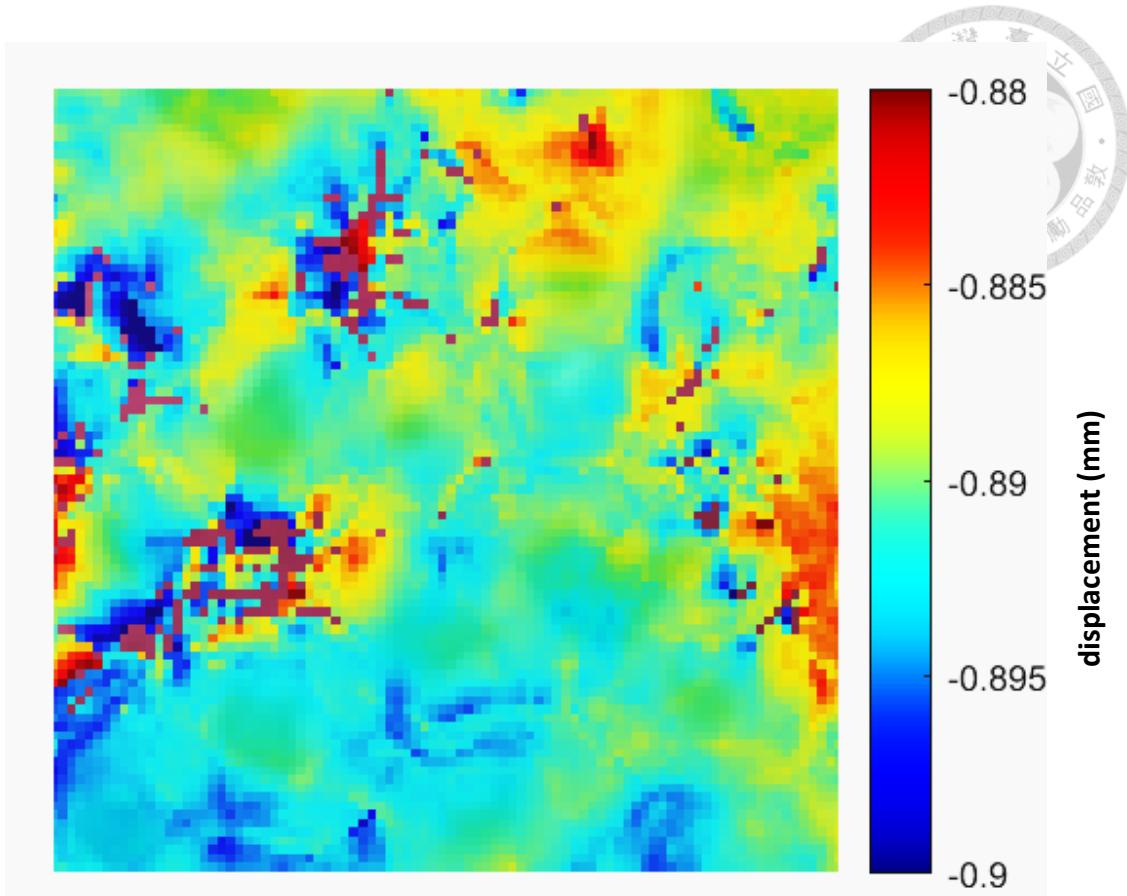


圖 5-12 樣本位移時 x 方向的位移量 u

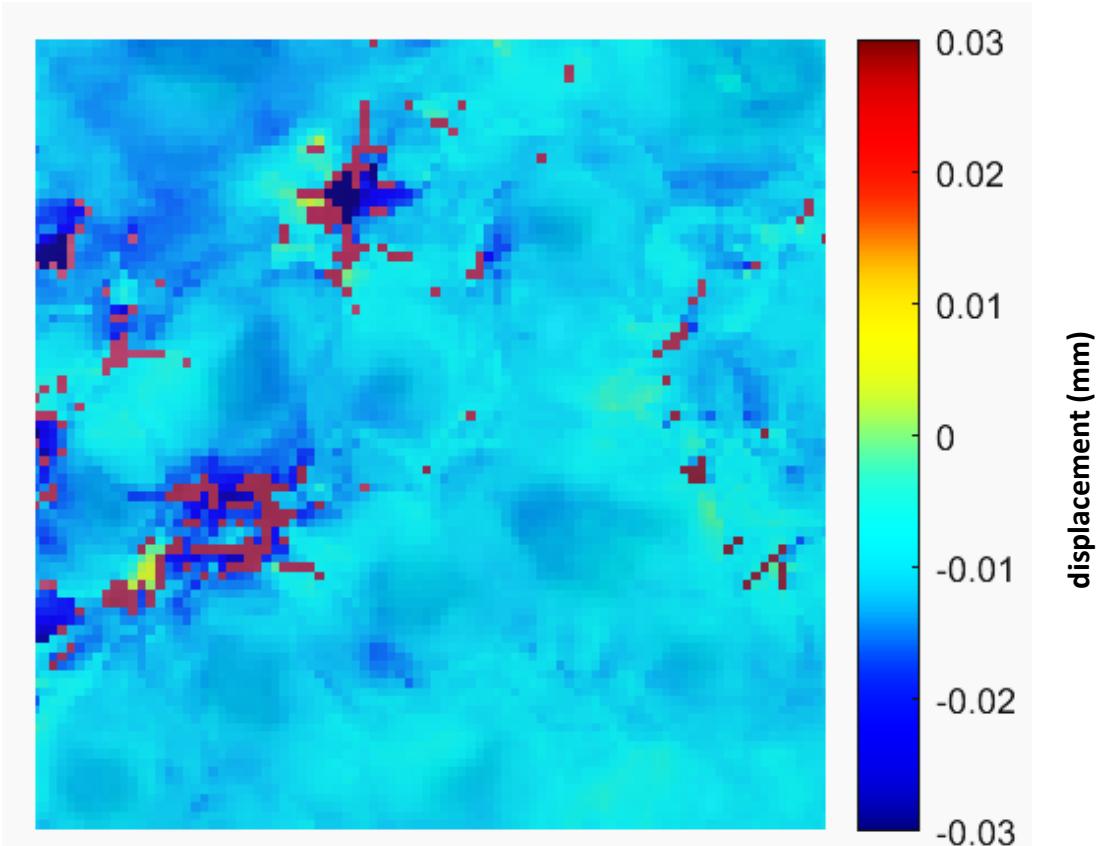


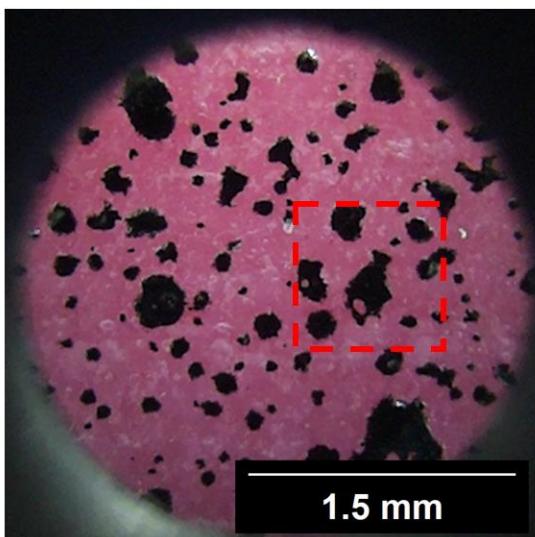
圖 5-13 樣本位移時 y 方向的位移量 v



5.3.2 旋轉剛體運動分析

本小節將展示在微觀尺度下，數位影像關聯法進行旋轉剛體運動的分析。本實驗中，同樣使用長方形軟糖做為觀測樣本，數位影像關聯法分析的參考(位移前)影像與目前(位移後)影像如圖 5- 14 所示，數位影像關聯法分析的影像解析度為 900*900，觀測區域如圖 5- 14 參考影像的紅框範圍內，數位影像關聯法設定的參數中，子集合半徑為 14(pixel)、子集點間距為 2(pixel)，數位影像關聯法的迭代次數為 100 次，平行運算核心數設定為 6。分析結果如圖 5- 15 所示為 x 方向的位移量 u ，圖 5- 16 所示為 y 方向的位移量 v 。並且從分析結果我們得知，由於 x 與 y 方向的變形量差異較大，因此分析結果較不易產生躁點，能夠獲得完整的位移場。

材料位移前影像



材料位移後影像

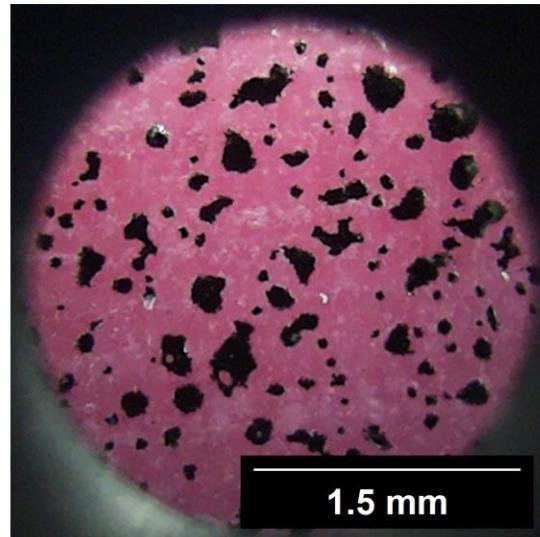


圖 5- 14 數位影像關聯法分析之參考影像(左)與目前影像(右)

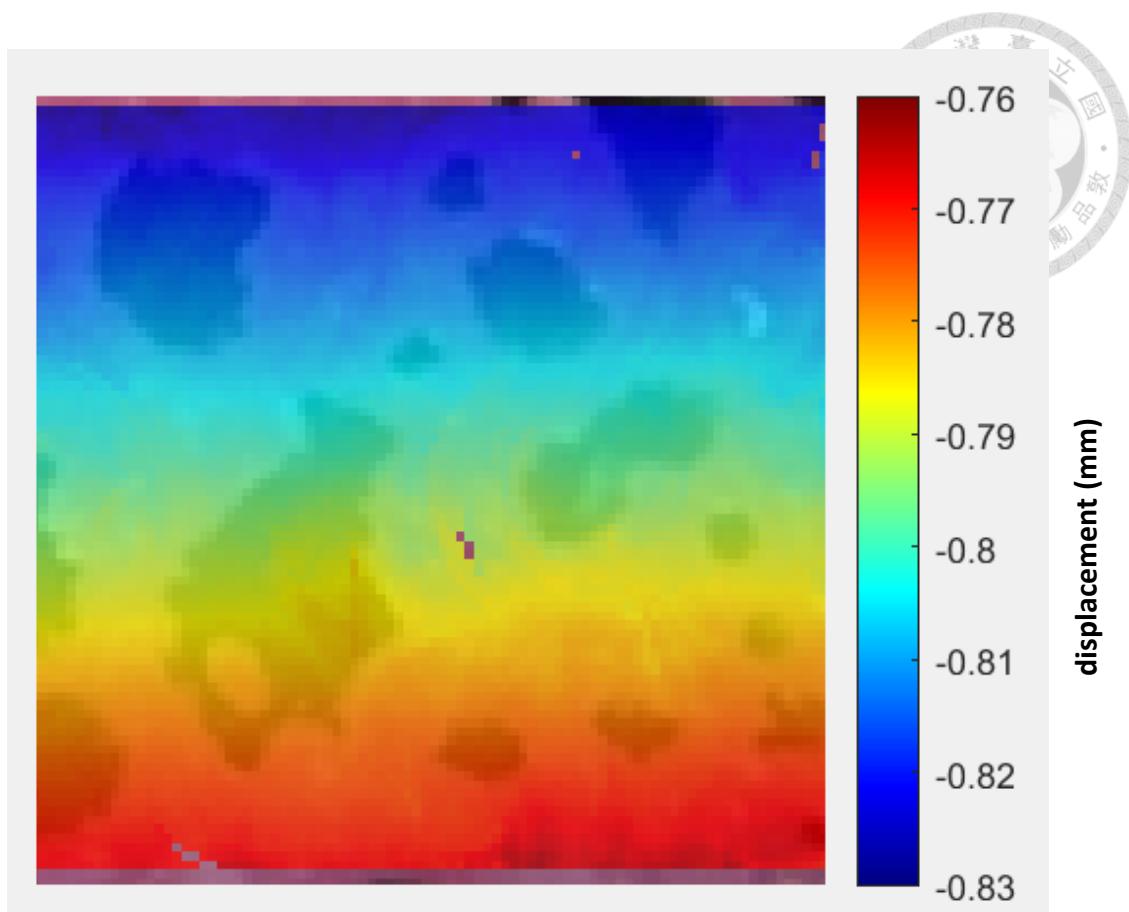


圖 5-15 樣本位移時 x 方向的位移量 u

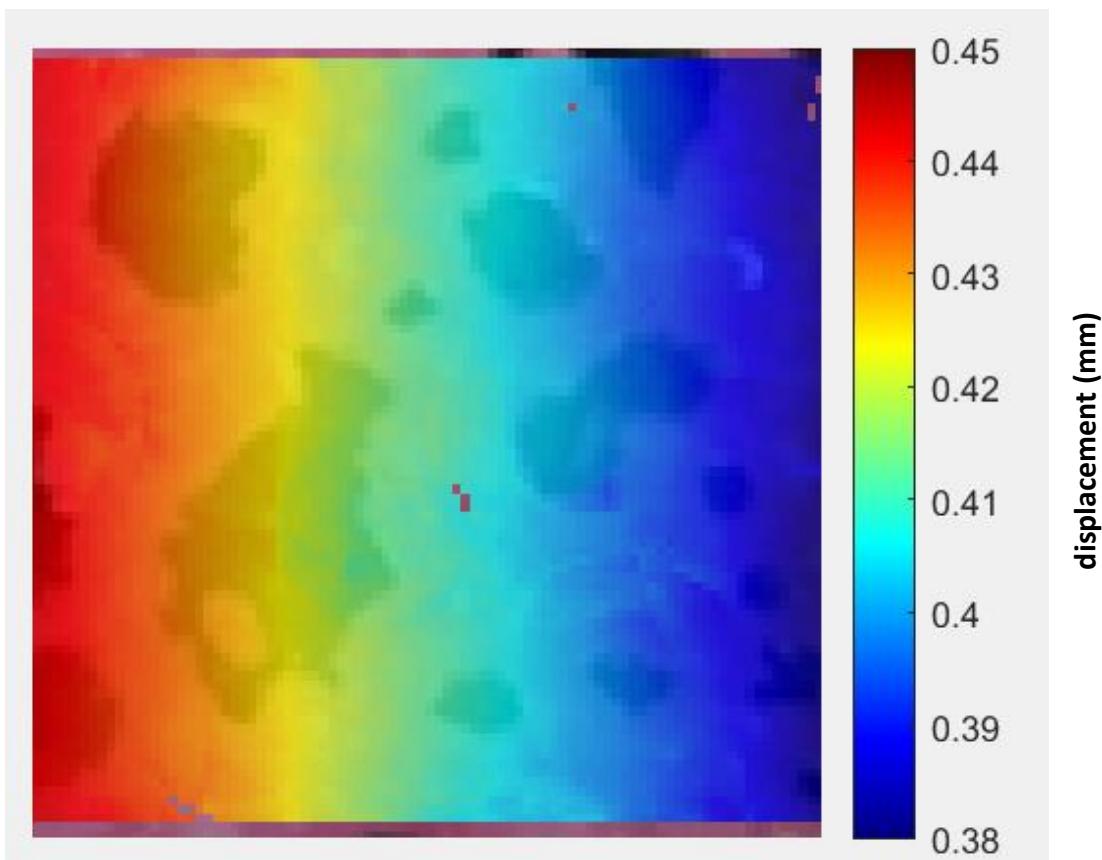


圖 5-16 樣本位移時 y 方向的位移量 v



5.4 懸臂樑實驗分析

本小節將展示以樂高層光顯微鏡為載台，進行懸臂樑在自由端受垂直集中負載之實驗，並使用數位影像關聯法在巨觀及微觀尺度下，對懸臂樑的位移場進行分析。

5.4.1 巨觀尺度下之懸臂樑實驗分析

在本次實驗中，我們使用平板狀樂高積木做為觀測的懸臂樑，利用樂高層光顯微鏡的壓印機構對樂高積木的自由端施加一集中力，使其向下位移。數位影像關聯法分析的參考(位移前)影像與目前(位移後)影像如圖 5- 17 所示，數位影像關聯法分析的影像解析度為 1600*1200，觀測區域如圖 5- 17 所示，為參考影像的紅框範圍內，數位影像關聯法設定的參數中，子集合半徑為 20(pixel)、子集點間距為 1(pixel)，數位影像關聯法的迭代次數為 100 次，平行運算核心數為 6。分析結果如圖 5- 18 所示為 x 方向的位移量 u ，圖 5- 19 所示為 y 方向的位移量 v 。

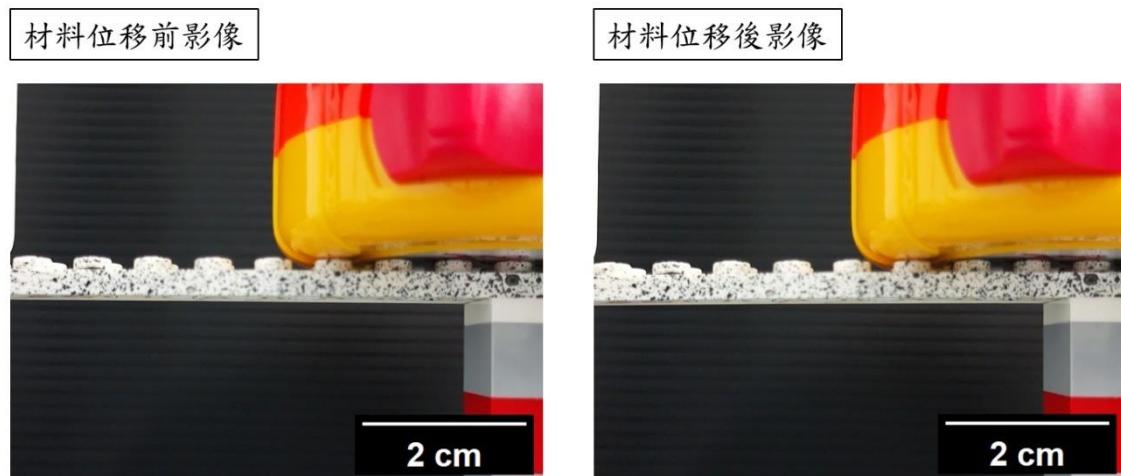


圖 5- 17 數位影像關聯法分析之參考影像(左)與目前影像(右)

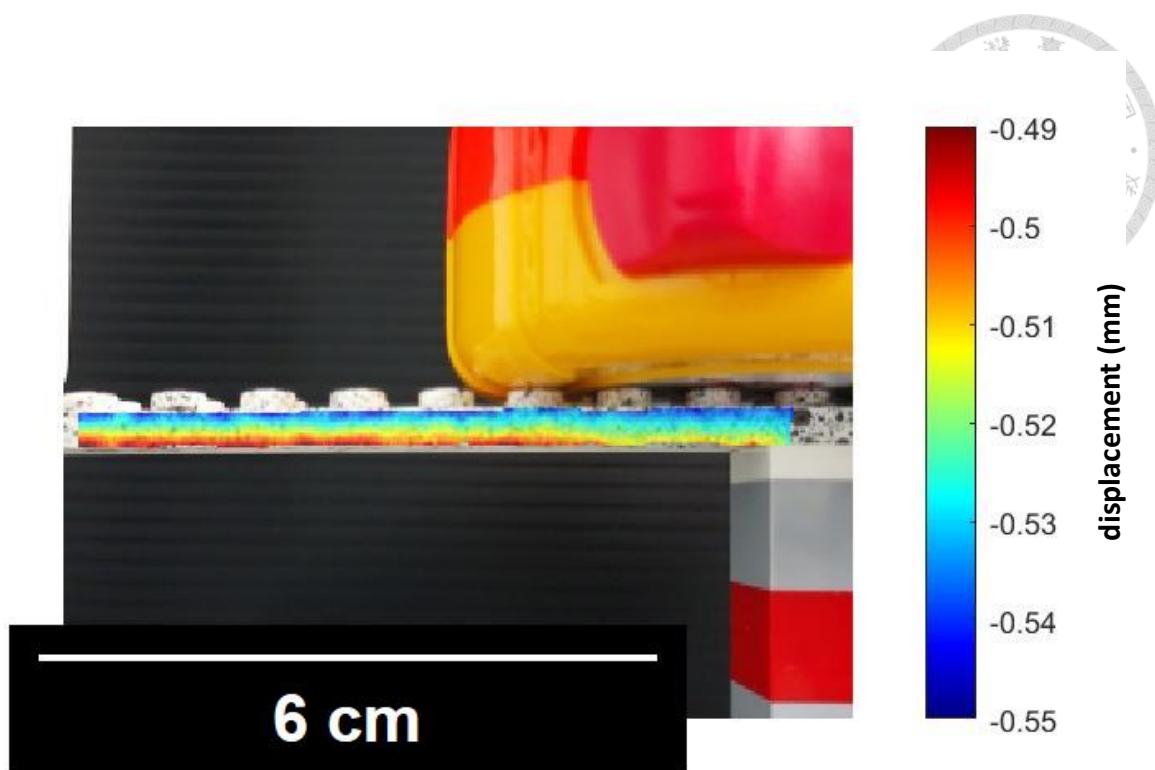


圖 5-18 樣本位移時 x 方向的位移量 u

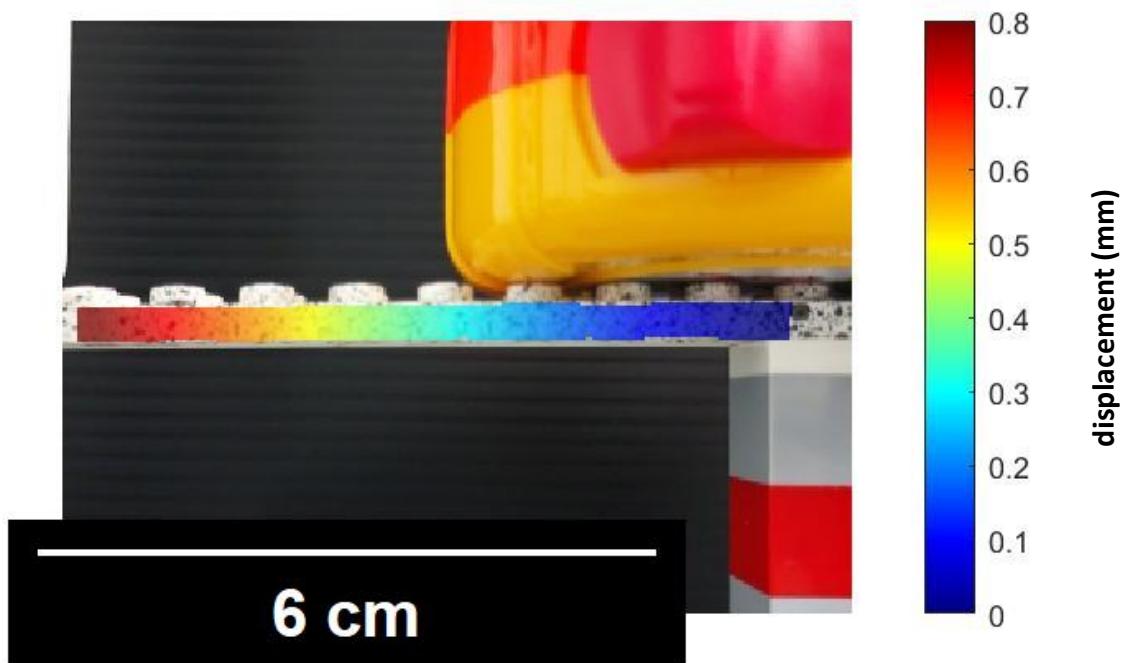


圖 5-19 樣本位移時 x 方向的位移量 u



5.4.2 微觀尺度下之懸臂樑實驗分析

本小節展示在微觀尺度下，數位影像關聯法進行懸臂樑實驗的分析。本實驗中，同樣使用平板狀樂高積木做為觀測的懸臂樑。數位影像關聯法分析的參考(位移前)影像與目前(位移後)影像如圖 5- 20 所示，數位影像關聯法分析的影像解析度為 900*900，觀測區域如圖 5- 20 參考影像的紅框範圍內，數位影像關聯法設定的參數中，子集合半徑為 10(pixel)、子集點間距為 2(pixel)，數位影像關聯法的迭代次數為 100 次，平行運算核心數設定為 6。分析結果如圖 5- 21 所示為 x 方向的位移量 u ，圖 5- 22 所示為 y 方向的位移量 v 。

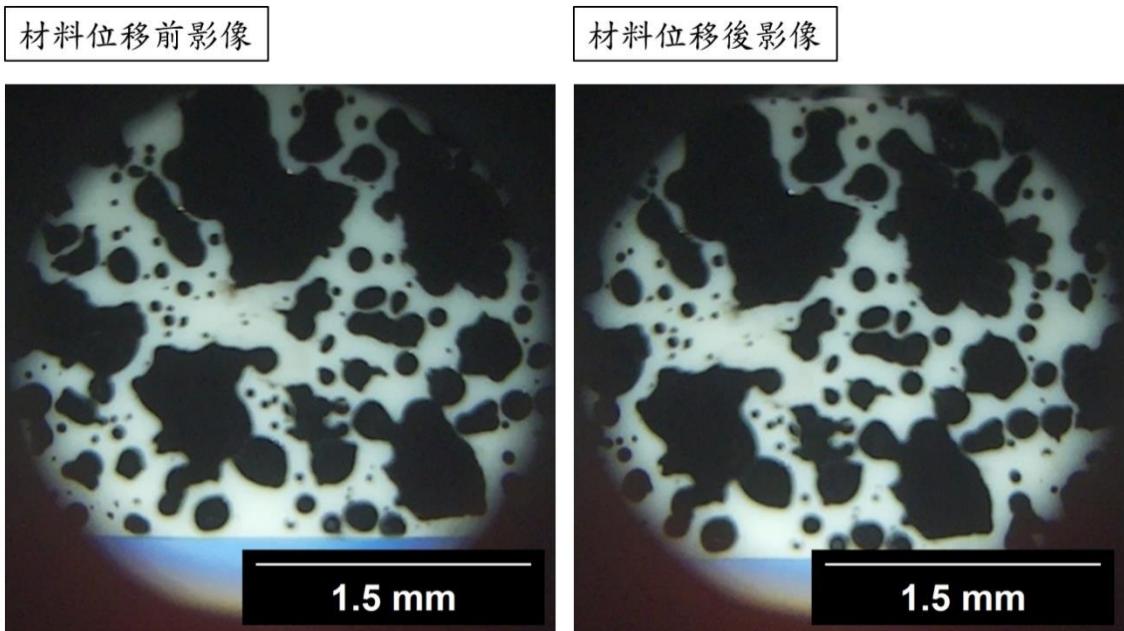


圖 5- 20 數位影像關聯法分析之參考影像(左)與目前影像(右)

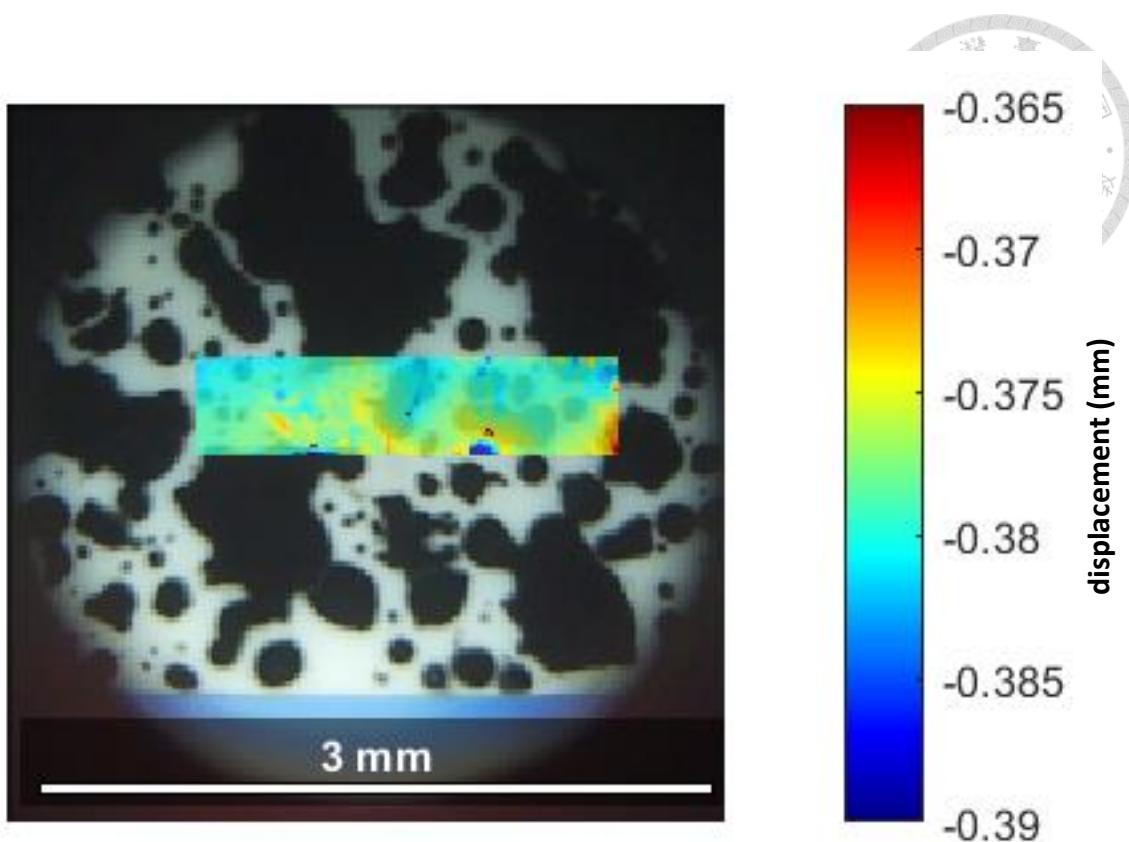


圖 5-21 樣本位移時 x 方向的位移量 u

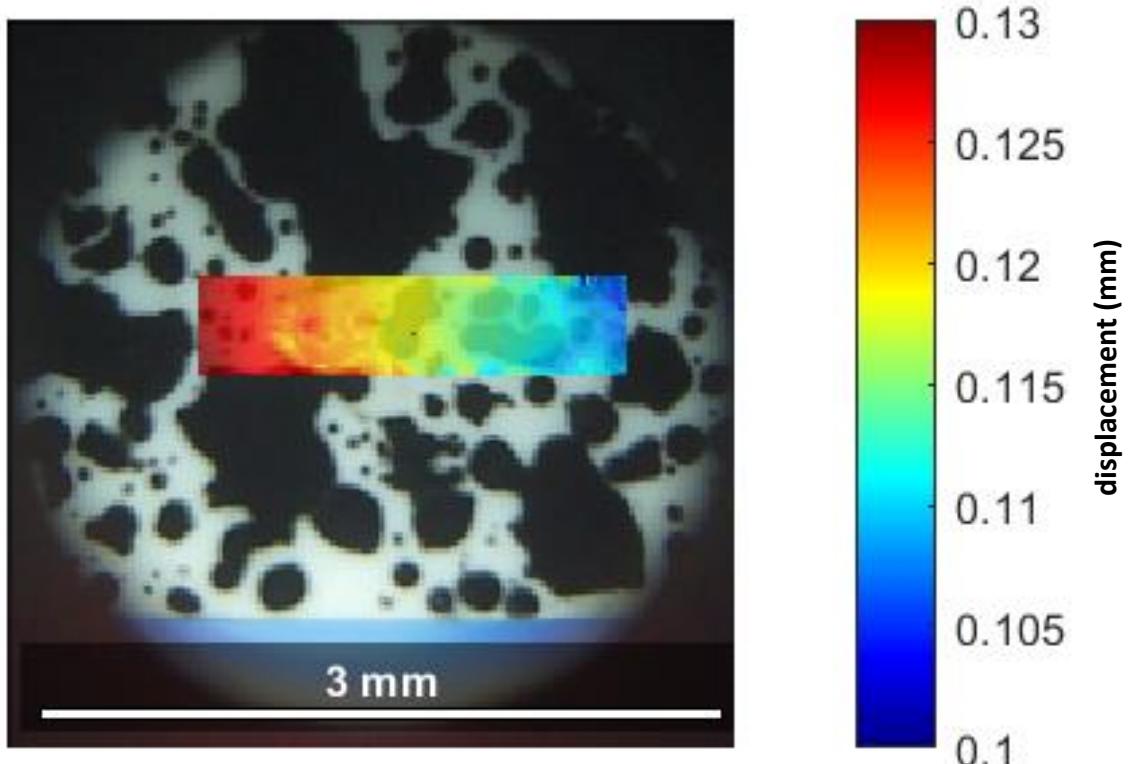


圖 5-22 樣本位移時 y 方向的位移量 v



第六章 結論與未來展望

6.1 結論

本論文以層光顯微技術為基礎，開發出以樂高積木搭建而成的樂高層光顯微鏡系統，這套系統不僅讓使用者能夠以原型方式接觸和學習層光顯微技術，還可以作為平台進行多種類型的實驗研究。且由於樂高積木組裝的靈活性，使得樂高層光顯微鏡系統可以在不同的環境下，快速的完成組裝與使用，使得樂高層光顯微鏡非常適合作為科普教育的工具。在數位影像關聯法分析的部分，我們在巨觀與微觀尺度下，對樣本進行不同類型運動與變形實驗的分析，透由觀察分析結果，我們得出以下結論：一，數位影像關聯法能夠精確的評估出樣本的位移與變形場；二，在樣本製備妥當的情況下，數位影像關聯法可以進行各種尺度下的分析；三，數位影像關聯法分析時間快速，不需大量計算成本。並且透過以上數位影像關聯法分析結果，可驗證本論文研究開發樂高層光顯微鏡系統之實驗與量測結果時，具有相當程度的穩定性與可靠性。

6.2 未來展望

本研究論文中，使用數位影像關聯法驗證樂高層光顯微鏡運行的穩定性，然而本研究尚未將此技術應用於生物樣本，因此未來發展可針對樣本的製備進行探討，使用螢光技術與光學元件的搭配，使得觀測者在利用層光技術拍攝生物樣本內部結構的同時，可以直接利用數位影像關聯法分析樣本內部構造的靜態與動態問題。

本論文中，實驗與分析之樣本皆在空氣中進行觀測，然而在生物醫學領域中，大多數的生物樣本必需保存於液體中，才能觀測到樣本中的許多重要特徵。因此未來的發展可嘗試對置於液體中的樣本進行觀測，同時必須考慮到因液體密度不同而造成的光線散射，對於樣本影像分析所造成的影响。

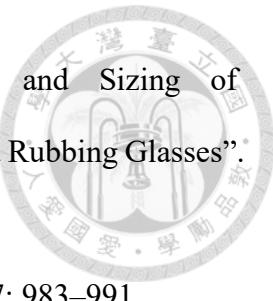
而在本研究中，使用層光技術觀察與分析之影像皆為二維影像。然而，層光技術的核心目標在於取得樣本的三維影像，因此本研究的未來展望可著重於開發影



像的定位方法，記錄顯微鏡系統拍攝的每張影像在樣本中的實際位置。透過影像的定位資料，我們才能夠準確地將顯微鏡系統拍攝的二維影像組合成三維影像，實現層光顯微鏡系統的開發目標。

參考資料

- 
- [1] Lane N. “The Unseen World: Reflections on Leeuwenhoek Concerning Little Animals”. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2015. 370(1666): 20140344.
 - [2] Schermelleh L., Carlton P.M., Haase S., Shao L., et al.(2008).Subdiffraction Multicolor Imaging of the Nuclear Periphery with 3D Structured Illumination Microscopy. *Science*.320(5881): 1332–1336.
 - [3] Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., et al.(2006).“Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution”. *Science*.313(5793): 1642–1645.
 - [4] Manley S., Gillette J.M., Patterson G.H., Shroff H., et al.(2008).“High-Density Mapping of Single-Molecule Trajectories with Photoactivated Localization Microscopy”. *Nat. Methods*. 5: 155–157.
 - [5] Huang B., Wang W., Bates M., Zhuang X. “Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy”. *Science*. 2008. 319(5864): 810–813.
 - [6] Chen C-Y, Liu Y-T, Lu C-H, Lee P-Y, Tsai Y-C, Wu J-S, Chen P, Chen B-C. The Applications of Lattice Light-Sheet Microscopy for Functional Volumetric Imaging of Hippocampal Neurons in a Three-Dimensional Culture System. *Micromachines*. 2019; 10(9):599. <https://doi.org/10.3390/mi10090599>.
 - [7] Chen B.C., Legant W.R., Wang K., Shao L., et al. “Lattice Light-Sheet Microscopy: Imaging Molecules to Embryos at High Spatiotemporal Resolution”. *Science*. 2014. 346(6208): 1257998.
 - [8] Chatterjee K, Pratiwi FW, Wu FCM, Chen P, Chen B-C. Recent Progress in Light Sheet Microscopy for Biological Applications. *Applied Spectroscopy*. 2018 ; 72(8) : 1137-1169.



- [9] Siedentopf H., Zsigmondy R. "On the Visualization and Sizing of Ultramicroscopic Particles, with Particular Application to Gold Rubbing Glasses". *Ann. Phys.* 1902. 315: 1–39.
- [10] Pittet M.J., Weissleder R. "Intravital Imaging". *Cell.* 2011. 147: 983–991.
- [11] Botcherby E.J., Corbett A., Burton R.A.B., Smith C.W., et al. "Fast Measurement of Sarcomere Length and Cell Orientation in Langendorff-Perfused Hearts Using Remote Focusing Microscopy Novelty and Significance". *Circ. Res.* 2013. 113(7): 863–870.
- [12] Huisken J., Swoger J., Del Bene F., Wittbrodt J., et al. "Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy". *Science.* 2004. 305(5686): 1007–1009.
- [13] Keller P.J., Schmidt A.D., Wittbrodt J., Stelzer E.H. "Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy". *Science.* 2008. 322(5904): 1065–1069.
- [14] Krzic U., Gunther S., Saunders T.E., Streichan S.J., et al. "Multiview Light-Sheet Microscope for Rapid In Toto Imaging". *Nat. Methods.* 2012. 9: 730–733.
- [15] Planchon T.A., Gao L., Milkie D.E., Davidson M.W., et al. Rapid Three-Dimensional Isotropic Imaging of Living Cells Using Bessel Beam Plane Illumination". *Nat. Methods.* 2011. 8: 417–423.
- [16] X., Zhang, M., and Lei, S. (December 14, 2017). "Multiphoton Polymerization Using Femtosecond Bessel Beam for Layerless Three-Dimensional Printing." *ASME. J. Micro Nano-Manuf*, 2018 ; 6(1):010901.
- [17] Betzig E. "Excitation Strategies for Optical Lattice Microscopy". *Opt. Express.* 2005. 13(8): 3021–3036.
- [18] C. J. R. Sheppard and D. M. Shotton, Confocal Laser Scanning Microscopy, *Springer, Oxon* , 2 (1997).



- [19] D. Kromm, T. Thumberger, J. Wittbrodt. (2016). An eye on light-sheet microscopy. *Methods in Cell Biology*, vol. 133, 105-123
- [20] Santi PA. (2011). Light Sheet Fluorescence Microscopy: A Review. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 59(2):129-138.
- [21] Pan, B. (2011). Recent Progress in Digital Image Correlation. *Exp Mech* 51, 1223–1235. <https://doi.org/10.1007/s11340-010-9418-3>
- [22] Blaber, J., Adair, B. & Antoniou, A. (2015). Ncorr: Open-Source 2D Digital Image Correlation Matlab Software. *Exp Mech* 55, 1105–1122.
- [23] J. Blaber, "Ncorr Instruction Manual," 0613 2017.
- [24] 蔡汶憲, "層膠材料於第一模式剝離內聚力強度之實驗量測和理論分析研究," 碩士論文, 國立臺灣大學機械工程學系, 2023.
- [25] M. Minsky, Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope, *Scanning*, 10, 128 (1988).
- [26] R Harilal and M Ramji, "Adaptation of Open Source 2D DIC Software Ncorr for Solid Mechanics Applications," International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics (2014).
- [27] Bi-Chang Chen, "Scanless lattice light sheet microscopy," *Microscopy and Microanalysis*, (2015). vol 21, Pages 715–716.
- [28] Greger K., Swoger J., Stelzer E.H.K. "Basic Building Units and Properties of a Fluorescence Single Plane Illumination Microscope". *Rev. Sci. Instrum.* 2007. 78(2): 023705.
- [29] Christoph J. Engelbrecht, Klaus Greger, Emmanuel G. Reynaud, Uroš Kržic, Julien Colombelli, and Ernst H. K. Stelzer, "Three-dimensional laser microsurgery in light-sheet based microscopy (SPIM)," *Opt. Express* 15, 6420-6430 (2007).
- [30] Christoph J. Engelbrecht and Ernst H. Stelzer, "Resolution enhancement in a light-

sheet-based microscope (SPIM)," *Opt. Lett.* 31, 1477-1479 (2006).

