

Gebrauchsanleitung

Phasenkontrast mit MIKROVAL-Mikroskopen



Durch ständige Weiterentwicklung unserer Erzeugnisse können Abweichungen von den Bildern und dem Text dieser Druckschrift auftreten. Die Wiedergabe - auch auszugsweise - ist nur mit unserer Genehmigung gestattet. Das Recht der Übersetzung behalten wir uns vor. Für Veröffentlichungen stellen wir Reproduktionen der Bilder, soweit vorhanden, gern zur Verfügung.

Phasenkontrast mit MIKROVAL-Mikroskopen

Gebrauchsanleitung

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Prinzip	3
2. Phasenkontrasteinrichtungen für MIKROVAL-Mikroskope und ihre Handhabung	4
2.1. Phasenkontrasteinrichtung für das LABOVAL	4
2.1.1. Allgemeine Beschreibung	4
2.1.2. Einstellen des Phasenkontrastverfahrens am LABOVAL	5
2.2. Phasenkontrasteinrichtung für das ERGAVAL	6
2.2.1. Allgemeine Beschreibung	6
2.2.2. Einstellen des Phasenkontrastverfahrens am ERGAVAL	6
2.3. Phasenkontrasteinrichtung für das AMPLIVAL (NU 2) bei Anwendung des pankratischen Kondensors	8
2.3.1. Allgemeine Beschreibung	8
2.3.2. Einstellen des Phasenkontrastverfahrens mit dem AMPLIVAL (NU 2) bei Anwendung des pankratischen Kondensors	8
3. Fehlermöglichkeiten beim Arbeiten im Phasenkontrast	9
4. Erläuterung der Bezugswahlen Bildteil	10

1. Prinzip

Das Phasenkontrastverfahren dient zur Untersuchung von **Phasenobjekten**, die im Gegensatz zu Amplitudenobjekten keine Änderung der Farbe oder Helligkeit des Lichtes, sondern Differenzen der optischen Weglänge bzw. Phasendifferenzen durch Dicken- bzw. Brechzahlunterschiede hervorrufen.

Derartige Phasenobjekte sind bei ungefärbten Präparaten in Biologie und Medizin, aber auch in technischen Disziplinen sehr häufig und bleiben unsichtbar oder zeigen sehr geringen Kontrast, da das Auge für Phasendifferenzen unempfindlich ist.

Mit einem 1932 von Prof. Zernike vorgeschlagenen Verfahren ist es möglich, auch diese Objekte kontrastreich sichtbar zu machen.

Nach Abbe entsteht das mikroskopische Bild durch Interferenz des direkten mit dem am Objekt gebeugten Licht. Bei Amplitudenobjekten sind die Phasen dieser interferierenden Lichtanteile 180° gegeneinander gedreht, bei den in der Praxis am häufigsten auftretenden Phasenobjekten geringer Phasendrehung jedoch nur um $\sim 90^\circ$.

Das Prinzip des Phasenkontrastverfahrens besteht darin, bei der Abbildung von Phasenobjekten die Phasendrehung der interferierenden Lichtanteile auf $\sim 180^\circ$ zu erhöhen, so daß ähnliche Verhältnisse wie bei Amplitudenobjekten auftreten und die Phasenobjekte kontrastreich dargestellt werden.

Das wird durch ein ringförmiges Phasenplättchen bewirkt, das sich in der hinteren Objektivbrennebene im Bilde einer beleuchtungsseitig angeordneten Ringblende befindet. Es ruft eine relative Phasendrehung von -90° (positiver Phasenkontrast) hervor.

Dabei erscheinen Strukturen mit wenig größerer Brechzahl oder Dicke als ihre Umgebung dunkel auf hellem Untergrund. Das gebeugte Licht breitet sich in der hinteren Objektivbrennebene um so mehr aus, je kleiner die Objektdetails sind. Bei größeren Objekten zieht sich die Beugungsfigur mehr und mehr zusammen, so daß eine getrennte Beeinflussung des direkten gegenüber dem gebeugten Licht nicht mehr gewährleistet ist. Größere Objekte zeigen aus diesem Grunde einen hellen Hof und im Inneren Aufhellungen. Diese Haloerscheinungen können Anlaß zu Fehldeutungen geben. Bei einem sehr schmalen Phasenring ist eine hinreichend gute getrennte Beeinflussung der beiden Lichtanteile auch bei größeren Objekten noch möglich. Das Verfahren arbeitet „strenger“ und Halos treten erst bei noch größeren Objekten auf und sind nicht mehr so ausgeprägt.

Zur optimalen Anpassung an größere und kleinere Objekte sind unsere Phasenkontrasteinrichtungen mit zwei Ringen unterschiedlicher Breite zur Durchführung des **variablen Phasenkontrastes** ausgerüstet. Die Ringe sind so angeordnet, daß entweder beide wirken — dabei arbeitet man im **normalen Kontrast** — oder der große, breite ist durch Betätigen der Aperturblende abgeblendet, so daß nur der kleine, schmale Ring wirkt, und man arbeitet im **strengen Phasenkontrast**. Die Bezeichnung „streng“ bezieht sich dabei

primär auf die Wirksamkeit des Verfahrens bei größeren Objekten und sekundär auf die Kontrastwirkung.

Das Phasenkontrastverfahren arbeitet nur bei einer Wellenlänge, für die der Phasenbelag dimensioniert wurde, optimal. Daher ist zur Durchführung des Verfahrens die Anwendung eines Gelbgrünfilters vorteilhaft. Durch Anwendung von Filtern unterschiedlicher Breite des durchgelassenen Spektralbereichs (der Ausrüstung sind 2 verschiedene Filter beigegeben) kann ein mehr oder weniger kräftiger Kontrast erzielt werden.

Beim Arbeiten im Phasenkontrast ist, besonders bei Anwendung hoher Vergrößerungen und Durchführung von Fotoarbeiten, die Benutzung ausreichend heller Lichtquellen erforderlich. Für visuelle Beobachtung reicht praktisch in allen Fällen eine Kleinspannungslampe 6 V 15 W als Lichtquelle aus.

2. Phasenkontrasteinrichtungen für MIKROVAL-Mikroskope und ihre Handhabung

2.1. Phasenkontrasteinrichtung für das LABOVAL

2.1.1. Allgemeine Beschreibung

Die Phasenkontrasteinrichtung für LABOVAL besteht aus folgenden Einheiten:

Phv-Kondensator, apl. 0,9/0
Achromat 6,3/0,16 160/- Phv
Achromat 16/0,32 160/0,17 Phv
Achromat 40/0,65 160/0,17 Phv
Achromat HI 100/1,25 160/0,17 Phv
Hilfsmikroskop
Gelbgrünfilter VE 55-82
Gelbgrünfilter VE 53-62
Behälter
Immersionöl $n_D = 1,515$
Doppelflasche
Vierkantaufsteckschlüssel

Der Kondensator wird mittels Paßzylinders in die Schiebehülse am Kondensatorhalter eingeschoben und durch eine Schraube befestigt.

Jede Ringblende läßt sich individuell für das zugehörige Objektiv zentrieren. An einem Markierungspunkt ist zu erkennen, für welches Objektiv die Ringblende eingeschaltet ist.

Um einen einwandfreien Übergang vom Hellfeld (Aperturblende weit geöffnet) zu normalem Phasenkontrast (Aperturblende etwas geschlossen), zu strengem Phasenkontrast

(Aperturblende noch weiter geschlossen) oder umgekehrt zu ermöglichen, muß die Aperturblende unter Umständen bei Objektivwechsel etwas zu den Ringblenden nachzentriert werden.

Beim Objektiv 6,3/0,16 ist durch Öffnen der Aperturblende bei Benutzung der zugehörigen Ringblende keine Hellfeldbeobachtung möglich.

Wird die Ringblende für das Objektiv HI 100/1,25 eingeschaltet, so ist bis zu Objektivaperturen von 0,35 eine gute Dunkelfeldbeobachtung möglich. Zur vollständigen Ausleuchtung des großen Sehfeldes, das mit dem Objektiv 6,3/0,16 untersucht werden kann, ist es unter Umständen nötig, die unter dem Kondensor angebrachte Großfeldlinse in den Strahlengang einzuklappen.

2.1.2. Einstellen des Phasenkontrastverfahrens am LABOVAL.

2.1.2.1. Gewünschtes Okular und Phasenobjektiv am Mikroskop in Gebrauchsstellung bringen.

2.1.2.2. Phasenkondensator an Stelle eines evtl. vorhandenen anderen Kondensators in die Kondensorscheibehülse einsetzen und Blendenrevolver so einstellen, daß die 0 am Markierungspunkt erscheint. Gelbgrünfilter in Filterhalter einlegen.

2.1.2.3. Präparat auf Mikroskoptisch auflegen.

2.1.2.4. Lampe einschalten und Köhlersche Beleuchtung einstellen (bei Benutzung von Ansteckleuchten Kondensator so fokussieren, daß das Bild am hellsten ist). Die Scharfstellung des Präparates und der Leuchtfeldblende erfolgt dabei mit eng gestellter Kondensatorblende. Um die Scharfstellung ungefärbter Präparate zu erleichtern, kann bereits jetzt vorübergehend ohne Rücksicht auf Zentrierung die zum benutzten Objektiv gehörige Ringblende eingeschaltet werden.

2.1.2.5. Kondensatorblende ganz öffnen, evtl. eingeschaltete Ringblende ausschalten.

2.1.2.6. Hilfsmikroskop an Stelle des Okulars in den Tubus einsetzen und durch Verschieben seines ausziehbaren Teiles scharf auf die dunklen Ringe des Phasenplättchens im Objektiv einstellen. Hierbei weder Grob-, Fein- noch Kondensortrieb verstellen!

2.1.2.7. Durch Drehen des Blendenrevolvers am Kondensator die der Maßstabzahl des benutzten Objektivs entsprechende Zahl an den Markierungspunkt stellen. Im Hilfsmikroskop ist jetzt außer den Phasenringen das Bild der Ringblenden zu sehen (Bild 3).

2.1.2.8. Bild der Ringblenden mit Hilfe der Vierkantaufsteckschlüssel, die in die der Schieböhülse am nächsten liegenden Bohrungen eingeführt werden, genau zu den

Phasenringen zentrieren (Bild 3c). Ungenaue Zentrierung gibt einseitige und schlechte Kontraste.

2.1.2.9. Aperturblende soweit schließen, daß beim Arbeiten mit normalem Phasenkontrast beide Ringe, beim Arbeiten mit strengem Kontrast nur der kleine Ring beleuchtet ist.

2.1.2.10. Hilfsmikroskop gegen Okular auswechseln. Im Mikroskop ist jetzt ein Phasenkontrastbild des Objektes zu sehen.

2.2. Phasenkontrasteinrichtung für das ERGAVAL

2.2.1. Allgemeine Beschreibung

Die Ausrüstung unterscheidet sich lediglich durch den Kondensator (Phv-Kondensator apl. 0,9/xe) von der unter 2.1.1. genannten. Außerdem ist eine zweite Einrichtung lieferbar, die an Stelle der Achromate Planachromate der gleichen Abbildungsmaßstäbe und Aperturen enthält.

Der Kondensator wird mit Hilfe einer Schwalbenschwanzführung und Klemmschraube in der gleichen Weise am Kondensortrieb befestigt, wie die übrigen Beleuchtungseinrichtungen.

Mit Hilfe von Zentrierschrauben läßt sich der Kondensator zu den Objektiven zentrieren.

Um eine vollständige Ausleuchtung des großen Sehfeldes, das mit dem Objektiv 6,3/0,16 erreicht wird, zu gewährleisten, muß die Großfeldlinse (1) unter dem Kondensator (Bild 5) in den Strahlengang eingeklappt werden.

Die Einrichtung für variablen Phasenkontrast zum ERGAVAL läßt sich auch am AMPLIVAL verwenden.

2.2.2. Einstellen des Phasenkontrastverfahrens am ERGAVAL

2.2.2.1. Gewünschtes Okular und Objektiv am Mikroskop in Gebrauchsstellung bringen.

2.2.2.2. Phasenkondensator an Stelle eines evtl. vorhandenen anderen Kondensators von links her an den möglichst weit gesenkten Kondensortrieb ansetzen und mit Klemmschraube (4) festziehen. Blendenrevolver (6) so drehen, daß die 0 am Markierungspunkt erscheint. Gelbgrünfilter in Filterhalter des Gerätes einlegen.

2.2.2.3. Präparat auf Mikroskopisch auflegen.

2.2.2.4. Lampe einschalten, Aperturblende schließen, scharf auf Präparat einstellen, Leuchtfeldblende schließen, Kondensator mit Triebknopf fokussieren, so daß Leuchtfeldblende hinreichend scharf ins Präparat abgebildet wird.

Bei Scharfeinstellung ungefärbter Präparate kann unter Umständen zur Erleichterung der Einstellung die zum benutzten Objektiv gehörige Ringblende vorübergehend eingeschaltet werden. Bei fehlerhafter Kondensorfokussierung erscheint im Feld bei eingeschalteter Ringblende ein dunkler Fleck (Bild 4).

2.2.2.5. Ist das Leuchtfeldblendenbild nicht zum Sehfeld zentriert, so schaltet man das Objektiv 40/0,65 ein, fokussiert auf das Präparat, stellt die Leuchtfeldblende scharf (falls das Licht nicht mehr im Feld zu sehen ist, öffnet man die Blende leicht, bis ihr Rand wieder im Feld erscheint), steckt die Vierkantschlüssel (Bild 5) auf die Vierkantschrauben des Kondensors auf und verschiebt mit ihrer Hilfe den Kondensor so, daß das Bild der Leuchtfeldblende zentrisch zum Sehfeld des Okulars liegt. Diese Einstellung braucht nur bei der ersten Benutzung oder nach vollständigem Umrüsten des Mikroskops durchgeführt werden.

2.2.2.6. Kondensorbende ganz öffnen, evtl. eingeschaltete Ringblende ausschalten und Leuchtfeldblende so weit öffnen, daß ihr Rand gerade aus dem Sehfeld verschwindet.

2.2.2.7. Hilfsmikroskop an Stelle des Okulars in den Tubus einsetzen und durch Verschieben seines ausziehbaren Teiles scharf auf die dunklen Ringe des Phasenplättchens im Objektiv einstellen. Hierbei weder Grob-, Fein- noch Kondensortrieb betätigen! Nach erfolgter Fokussierung Lampe so einstellen, daß die Ebene, in der sich die Phasenringe befinden, ohne Mattscheibe möglichst gleichmäßig zentrisch ausgeleuchtet und die Lampenwendel einigermaßen scharf zu sehen ist. Die Justierung der Lampe kann nach Lösen des Klemmrings an der eingebauten Beleuchtungseinrichtung durch Kippen und Verschieben der Lampenfassung erfolgen.

2.2.2.8. Durch Drehen des Blendenrevolvers am Kondensor die der Maßstabzahl des benutzten Objektivs entsprechende Zahl an den Indexpunkt stellen. Im Hilfsmikroskop ist jetzt außer den Phasenringen das Bild der Ringblenden zu sehen (Bild 3).

2.2.2.9. Bild der Ringblenden mit Hilfe der Vierkantaufsteckschlüssel (3 Bild 5), die in die dem Kondensoreinhänger am nächsten liegenden Löcher des Blendenrevolvers eingeführt werden, gut zu den Phasenringen zentrieren (Bild 3c). Ungenaue Zentrierung gibt einseitige und schlechte Kontraste.

2.2.2.10. Aperturbende so weit schließen, daß beim Arbeiten mit normalem Phasenkontrast beide Ringe, beim Arbeiten mit strengem Kontrast nur der kleine Ring hell beleuchtet ist.

2.2.2.11. Hilfsmikroskop gegen Okular auswechseln. Im Mikroskop ist jetzt ein Phasenkontrastbild des Objektes zu sehen.

2.3. Phasenkontrasteinrichtung für das AMPLIVAL (NU 2) bei Anwendung des pankratischen Kondensors

2.3.1. Allgemeine Beschreibung

Diese Einrichtung, die speziell für den pankratischen Kondensor geschaffen worden ist, zeichnet sich durch ihre relativ einfache und bequeme Handhabung aus. Diese Ausrüstung unterscheidet sich von der unter 2.1. genannten dadurch, daß sie keinen Kondensator enthält. Hierbei wird lediglich eine Ringblende mit Iris benötigt (Bild 6), die an Stelle der Irisblende am pankratischen Kondensator befestigt wird.

Die Größe des Ringblendenbildes und gleichzeitig die Größe des Leuchtfeldblendenbildes werden durch Drehen des Aperturstellringes am pankratischen Kondensator verändert und können optimal an das jeweilige Objektiv angepaßt werden, so daß die Einhaltung der Köhlerschen Beleuchtung bei Objektivwechsel recht einfach möglich ist.

Zur vollen Ausleuchtung des Feldes des Objektivs 6,3/0,16 ist die Verwendung des am Kondensatorrevolver angebrachten Lupenkondensors nötig, der nach Senken des Kondensors in den Strahlengang eingeklappt werden kann.

Beim Arbeiten im Hellfeld braucht die Phasenringblende mit Iris nicht vom pankratischen Kondensator entfernt zu werden. Der Ringblendenschieber (11 Bild 6) ist lediglich auf freien Durchgang zu schalten.

2.3.2. Einstellen des Phasenkontrastverfahrens mit dem AMPLIVAL (NU 2) bei Anwendung des pankratischen Kondensors

2.3.2.1. Gewünschtes Objektiv und Okular in Gebrauchsstellung bringen.

2.3.2.2. Ringblende mit Iris (Bild 6) an Stelle der Irisblende am unteren Ende des pankratischen Kondensors ansetzen, Ringblendenschieber (11) auf freien Durchgang stellen, Aperturstellring am Kondensator auf den Wert stellen, der der Apertur des Objektivs entspricht, Gelbgrünfilter VE 53-62 in die Filteraufnahme auf dem Fuß des Stativs einlegen.

2.3.2.3. Präparat auf den Mikroskoptisch auflegen.

2.3.2.4. Lampe einschalten, Aperturblende mittels Stellringes (14) schließen, scharf auf das Präparat mit Hilfe des Grob- und Feintriebes einstellen, Leuchtfeldblende schließen und durch Fokussieren mit dem Kondensortriebknopf scharf in das Präparat abbilden und so weit öffnen, daß ihr Rand gerade aus dem Sehfeld verschwindet. Die Scharfstellung ungefärbter Präparate kann unter Umständen schwierig sein. Zur Erleichterung der Einstellung kann vorübergehend die Ringblende (12) in den Strahlengang eingeschaltet und die Aperturblende (14) etwas geschlossen werden.

2.3.2.5. Hilfsmikroskop an Stelle des Okulars einsetzen und durch Verschieben seines ausziehbaren Teiles scharf auf die dunkel erscheinenden Phasenringe im Objektiv einstellen. Mattscheibe ausschalten und Lampenwendel nach Lösen des Klemmrings an der eingebauten Beleuchtungseinrichtung durch Kippen und Verschieben der Lampenfassung so einstellen, daß sie zentrisch zu den Phasenringen liegt und etwa scharf erscheint. Bei starken Objektiven Mattscheibe wieder einschalten.

2.3.2.6. Ringblendenschieber (11) am Kondensator in den Strahlengang einschieben (Bild 3a) und Ringblendenbild mit Hilfe der Zentrierschrauben (13) zu dem Phasenplättchen im Objektiv zentrieren (Bild 3b).

2.3.2.7. Ringblendenbild durch Drehen des Aperturstellrings am pankratischen Kondensator in seiner Größe genau an die Größe der Ringe des Phasenplättchens anpassen und gegebenenfalls nachzentrieren (Bild 3c). Die Überdeckung des Ringblendenbildes durch die Ringe des Phasenplättchens muß möglichst genau erfolgen, da sonst der Kontrasteffekt beeinträchtigt wird.

2.3.2.8. Beim Arbeiten im normalen Phasenkontrast ist die Aperturblende (14) so weit zu schließen, daß beide Ringe beleuchtet sind (Bild 7 Mitte). Beim Arbeiten im strengen Phasenkontrast ist sie so weit zu schließen, daß nur die kleine Ringblende beleuchtet ist (Bild 7 links).

2.3.2.9. Hilfsmikroskop gegen Okular auswechseln. Es ist ein Phasenkontrastbild des Objektes zu sehen.

3. Fehlermöglichkeiten beim Arbeiten im Phasenkontrast

3.1. Im zentralen Sehfeldteil erscheint ein verwaschener dunkler Fleck (Bild 4).

Ursache: Kondensator ist nicht richtig fokussiert.

Abhilfe: Kondensator so fokussieren, daß bei kleiner Leuchtfeldblende diese scharf im Präparat erscheint.

3.2. Nach Einschalten der Ringblende tritt kein Licht mehr in das Mikroskop.

Ursache: Aperturblende (Irisblende) ist zu weit geschlossen.

Abhilfe: Aperturblende (Irisblende) öffnen.

3.3. Kontraste erscheinen einseitig und schlecht.

Ursache: Ringblendenbild schlecht zu Phasenringen zentriert.

Abhilfe: Ringblendenbild unter Benutzung des Hilfsmikroskops zu den Phasenringen zentrieren.

4. Erläuterung der Bezugswahlen

- Bild 1. Phasenkontrasteinrichtung variabel für Mikroskop LABOVAL
- Bild 2. Phasenkontrasteinrichtung variabel für Mikroskop ERGAVAL
- Bild 3. Zentrieren und Justieren der Ringblenden — Phasenkontrast Phv
- Bild 4. Mangelhafte Beleuchtung infolge falscher Kondensoreinstellung (zu hoch bzw. zu tief)
- Bild 5. Kondensor aplan. 0,9/e Phv für variablen Phasenkontrast mit Großfeldlinse für ERGAVAL
- 1 Klappbare Großfeldlinse
 - 2 Vierkantaufsteckschlüssel zum Zentrieren des Kondensors
 - 3 Vierkantaufsteckschlüssel zum Zentrieren der eingeschalteten Ringblende
 - 4 Einhänger mit Klemmschraube
 - 5 aplanatischer Kondensor 0,9
 - 6 Blendenrevolver
 - 7 Zentrierschraube für die Zentrierung der Aperturblende
 - 8 Stellring zur Aperturblende
- Bild 6. Ringblende p schiebbar, für variablen Phasenkontrast mit pankratischem Kondensorsystem
- 10 Klemmschraube
 - 11 Ringblendenschieber
 - 12 Ringblende
 - 13 Zentrierschrauben
 - 14 Stellring für Aperturblende
- Bild 7. Phasenkontrast Phv, Strahlengänge im strengen Phasenkontrast, normalen Phasenkontrast, Hellfeld

VEB Carl Zeiss JENA

Vertriebsabteilung Mikroskope

Fernsprecher: Jena 830 • Fernschreiber: Jena 058 8622

Druckschriften-Nr. **30-G304f-1**