

Variable Phasenkontrasteinrichtung

KF 5

Technische Beschreibung

Einrichtung KF-5 für die Forschung mit der Methode des (Variablen) Phasenkontrastes

Technische Beschreibung und Gebrauchsanweisung

1. Verwendung

Die Einrichtung KF-5 für die Forschung mit der Methode des Phasenkontrastes wird verwendet in der Forschung der wenig kontrastreichen Objekte die unter gewöhnlichen Forschungsbedingungen unter dem Mikroskop fast unsichtbar sind. Die Einrichtung kann verwendet werden bei allen Mikroskopen die eine Kondensorkonsole mit einer Kondensoraufnahmehülse von 37 mm Durchmesser besitzen. Die Einrichtung kann verwendet werden, unter den Bedingungen des kalten oder mässigen Klima, in Räumen mit der Innenlufttemperatur von + 10 bis - 35° C.

2. Technische Daten

Phasenkontrastkondensor mit folgenden Daten:

Abstand von 11,0 mm.

Numerische Apertur 1,2

Die Kenndaten der Phasenkontrastobjektive sind wie folgt:

Objektivdaten 20 x 40

Objektiv 40x 0,65

Objektiv 70 x 1,23 Wasser

Objektiv 90 x 1,25 Öl

Abmessung: 110 x 97 x 47

Gewicht 0,45 kg

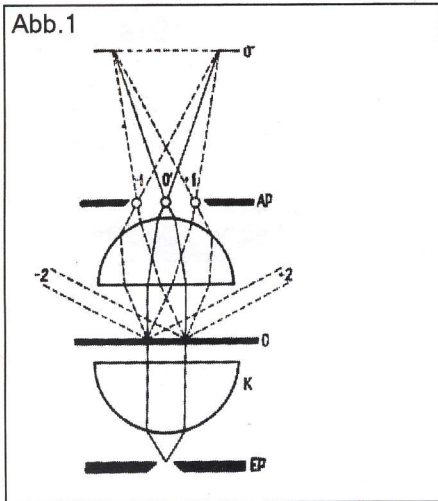
3. Zusammensetzung der Einrichtung

Die Grundteile der Einrichtung sind die Phasenkontrastobjektive und der Phasenkontrastkondensor. Die vollständige Einrichtungszusammensetzung ist.....

4. Prinzip der Arbeit

Das Präparat wird als Gitter mit regelmäßiger Struktur angesehen, wie z. B. abwechselnde dunkle und helle Linien, die sich auf gleiche Entfernungen von einander befinden. Als Ergebnis der Strahlenbrechung, wird das Licht, daß durch solch ein Gitter geht, nicht nur in die ursprüngliche Richtung gehen, sondern auch unter bestimmten Winkeln von dem ursprünglichen abgelenkt,

Der Verlauf der Lichtstrahlen im Gerät ist schematisch auf **Abb.1** dargestellt



Das Licht das aus dem Zentrum der Aperturblenne ausgeht (EP) gelangt durch den Kondensor (K) als Parallelbündel auf das Objekt 0 (Gitter). Danach gelangt das Licht in das Objektiv in seine ursprüngliche Richtung, als Ergebnis der Defraktion, in die Richtungen $+1$ und -2 die als Punktierlinien gezeichnet sind. Die Bündel der Strahlen sammeln sich in der Fokussieroberfläche des Objektivs, wo sich dadurch die Abbildung der Aperturblenne des Kondensors befindet. Sie wird im Punkt $0'$ von den Strahlen gebildet, die durch das Objekt ohne Abweichungen gegangen sind und in den Punkten $+1$ von den Strahlen, die abgelenkt worden sind.

Abb.2

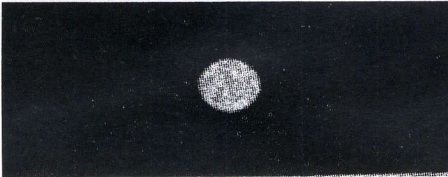
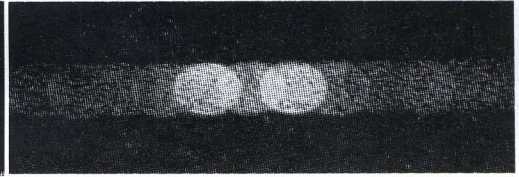


Abb.3



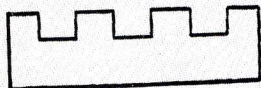
Als Ergebnis hat man in der Fokussieroberfläche des Objektivs ein sogenanntes Defraktionsspektrum. Die Strahlenbündel, die vom Defraktionsspektrum ausgehen, werden in Abbildungsflächen gesammelt $0''$, wo als Ergebnis der Interferenz sich die Abbildung vom Objekt 0 ergibt. Diese Abbildung wird nur dann zustande kommen, wenn das Objektiv wenigstens ein Defraktionsmaximum durchläßt, Nullmaximum ist ausgeschlossen. Das Defraktionsspektrum kann man sehen, wenn das Okular herausgenommen wird und man in den Tubus des Mikroskops sieht. Ohne Präparat sieht man das Bild, daß auf **Abb. 2** gezeigt wird. Wenn das Präparat als eine Art Gitter vorhanden ist, bekommt man ein Bild wie auf der **Abb.3** zu sehen ist. Die Intensität des Zentralmaximums ist wesentlich stärker als die Intensität des Seitenmaximums und die wird desto schwächer, je höher die Nummer des Maximums ist. Das helle Maximum im Zentrum ergibt sich von den Strahlen, die ohne Abweichungen sind. Das seitliche Maximums ergibt sich von den Strahlen, die von der Grenze zwischen den Strahlen die von der Grenze zwischen den dunklen und den hellen Strichen des Gitters abweichen.

Die Verteilung der Intensität des Lichts im Defraktionsspektrum ist vom Verhältnis (Korrelation) der Breite der hellen und dunklen Linien und auch von der optischer Dichtigkeit abhängig. In der Mikroskopie werden zwei Typen von Objekten zu unterscheiden.

1. Objekte mit unterschiedlicher „Lichtwelligkeit“ (Anpassung), an verschiedenen Stellen, verändern die Intensität des durch sie gehendes Lichtes, („Amplidude“). Objekte mit solch Lichtschwankung werden deshalb „Amplitudenobjekte genannt. Zur dieser Art von Objekten gehören alle gefärbten Präparate, die mit mehr oder weniger Kontrast dargestellt werden.

2. Objekte mit gleicher Lichtenpassung an verschiedenen Stellen, aber mit unterschiedlicher optischer Dicke, ohne die Intensität des durch sie gehendes Lichtes zu verändern, verändert die Phase seine Schwankung. Die Phasenlichtschwankung, die durch ein Objekt geht, verändert sich im proportionalen Verhältnis zur optischen Dicke des Präparates. Solche Objekte nennt man Phasenobjekte. Zu ihnen gehören alle ungefärbten kontrastarme (fast unsichtbare) Präparate. Phasenpräparate kann man als Defraktionsgitter betrachten, das aus abwechselnden Strichen und Spalten mit gleicher Lichtdurchlässigkeit aber mit unterschiedlicher optischer Dicke ist.

Das Phasengitter (**Abb.4**) erzeugt die Veränderung der Phasenlichtrichtung, daß durch die Spalten geht, im Vergleich zum Phasenlicht daß durch die Versprünge nicht durchgeht..

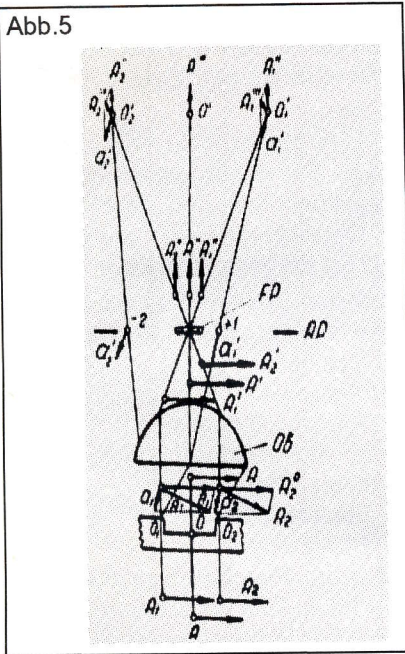


Beim Durchgehen des Lichtes durch das Phasengitter sowie durch das Defraktionsgitter wird die Defraktion des Lichtes beobachtet. In der Fokussierfläche des Objektives entsteht das Defraktionsspektrum, daß unterscheidet sich vom Defraktionsspektrum des Amplitudengitters durch die Intensität des Zentralmaximums (es wird heller), und mit der Differenz der Phasen von den Null- und Seitenmaximums. Der Defraktionstheorie

Abb.4

nach, in der Abbildungsfläche 0'' **s Abb. 1** bildet sich die Abbildung, die dem Objekt gleich ist; wenn ein unkontrastes (unsichtbares) Objekt genommen wird, dann wird es als gleichmäßiges weises Feld dargestellt. Mit Hilfe der Methode des Phasenkontrastes ist es möglich die Kontrastbildung des Objekts in der Abbildungsfläche 0'' zu bekommen, in dem die Verteilung der Lichtintensität der Verteilung der Phasen im Objekt entsprechen und somit werden unsichtbare Objekte sichtbar. Es ist nur erforderlich, das daß Defraktionsspektrum des Phasengitters mit dem Defraktionsspektrum des Amplitudengitters identisch ist. Dafür ist es erforderlich in der Fokussieroberfläche des Objektives eine Ringblende einzusetzen, die das Zentralmaximum bedeckt und dadurch seine Intensität verringert und gleichzeitig die Phasendifferenz zwischen dem Null - und Seitenmaximum auf 90° verändert. Das Prinzip des Funktionieren des Gerätes ist auf **Abb. 5** dargestellt.

Abb.5



0:0 02- Objekte sind eine Kombination aus Spalten und Versprünge von 0_1 und 0_2 . Die Amplitude der Lichtschwankung wird als Vektor bezeichnet dessen Größe die Intensität des Lichtes bestimmt und seine Richtung die Phase der Schwankung darstellt. Auf das Objekt fällt das Bündel des Lichtes mit den Amplituden a , a_1 und A_2 auf die Spalte und auf zwei Nachbars Vorsprünge entsprechend.

Wenn wir das Phasenpräparat haben, dann wird die Lichtintensität, durch das es geht nicht verändert, also wird die Größe der Vektoren AA , und A_2 auch nicht verändert. Vektor A , nachdem er die Spalte passierte, verändert weder seine Größe, noch die Phase. Die Vektoren A_1 und A_2 bleiben in ihrer Größe unverändert, allerdings verändern sie ihre Richtung über dem Vorsprung des Gitters wie auf Abbildung zu sehen ist. Die Richtung der Vektoren werden um so weniger verändert, je weniger der Unterschied in

der Objektdichte ist.

Die Vektoren A_1 und A_2 , über dem Vorsprung des Gitters, kann man in zwei Resultierende zerlegen (Regel des Parallelogramms) wenn man die Richtung und die Größe des einen von beiden gleich wie vom Vektor über der Spalte (A) nimmt. Dann wird die zweite. Resultierende (die unbedeutend von der Größe ist) mit der ersten einen Winkel nahe zu 90° bilden, der mit der Vergrößerung der Dicke (des Präparates.) auch vergrößert wird. Auf der Abbildung sind diese Resultierende als Vektoren a_1 und a_2 zu sehen.

Die Vektoren A_1 A_2 und A die in der Fläche AP als Vektoren A_1' A_2' und A' markiert sind nehmen bei der Bildung vom Nullmaximum teil sowie die Vektoren a_1 und a_2 , die in derselben Fläche (AP) als maximum $+1$ und -2 gekennzeichnet sind.

In der Fläche AP ist eine Phasenringplatte platziert die das Nullmaximum überdeckt und seine Intensität verringert und somit die Phasenschwankung auf 90° verändert.

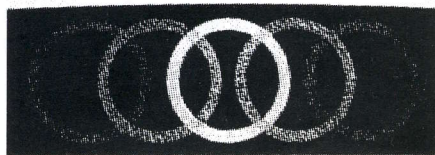
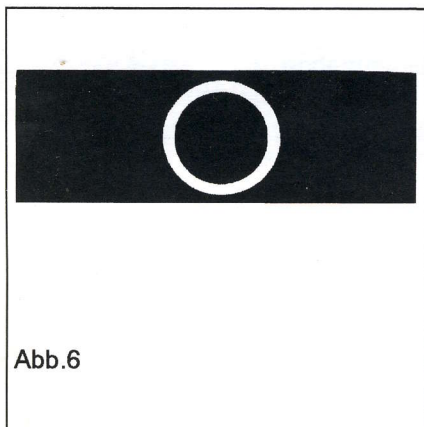
Zustand des Lichtes, das Nullmaximum bildet sich nach dem passieren der Phasenringplatte wird mit den Vektoren A_1'' , A'' und A_2'' dargestellt, die auf 90° im Verhältnis zu den Vektoren umgedreht und halb so groß wie A_1' , A' und A_2' sind. Der Defraktionstheorie entsprechend wird in der Fläche $02' 0' 01'$ die Abbildung des Objekts entstehen. In Punkt $0'$ kommt das Licht, das durch das Nullmaximum von der Spalte mit Amplitude A'' , durch gekommen ist. In die Punkte $01'$ und $02'$ - das Licht vom Vorsprung das daß Nullmaximum passierte und das

Licht das mit den Amplituden entsprechend A^2 und a^2 A'' und a' das Seitenmaximum passierte. Diese Vektoren muß man addieren (Regel des Parallelogramms). Als Ergebnis bekommt man die Vektoren A_2''' und A_1''' . Beim Vergleich ihrer Größen mit den Größen des Vektors A'' , wird festgestellt, daß sie kleiner als Vektor A'' sind. Also in verschiedenen Abschnitten der Fläche $02' 0'1'$ ist die Intensität des Lichtes auch unterschiedlich: im Punkt $0'$ ist die Beleuchtung stärker, als in den Punkten $02'$ und $01'$, die den dickeren Teil des Präparates entsprechen. Abhängig davon ob das Licht, das durch den Phasenring gekommen ist dem Licht, das am Phasenring vorbei ging zuvorkommt oder zurückbleibt wird entweder ein positiver oder negativer Phaseneffekt erreicht. Im ersten Fall die Darstellung von Teilen des Objekts mit größerer optischer Dicke diese wird dunkler als die Darstellung von Teilen mit kleinerer optischer Dicke. Im zweiten Fall- andersherum. Also im Blickfeld des Mikroskops kann man die Abbildung der Struktur des Gitters sehen, in der die Verteilung der Intensität der Veränderung von der Phasenlichtschwankung entspricht. Um die kontrastreichste Abbildung zu bekommen, ist erforderlich die Differenz zu verändern, ohne die Differenz des Ganges von dem Seitenmaximum zu verändern.

Das benutzen von Blenden und Phasenringen in Form eines Kreises ist unmöglich, weil Null- und Seitenmaximums einander überdecken s. Abb. 3. Deshalb wird die Blende und der Phasenring in der Form eines Ringes benutzt - die Überdeckung ist minimal und hat keine praktische Bedeutung.

Auf **Abb. 6** ist die Abbildung ohne Präparat dargestellt, die im Tubus des Mikroskops beobachtet wird, die beim benutzen von den Ringblenden des Kondensors und den Phasenringen in Form eines Ringes zu sehen ist..

Auf **Abb. 7** - die gleiche Bedingung mit einem Präparat.



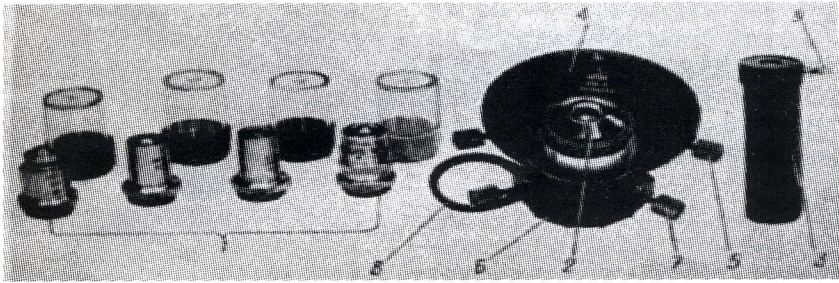


Abb.8

Allgemeiner Bau des Gerätes ist auf **Abb. 8** dargestellt. Wichtigste Teile des Geräts sind Phasenobjektive 1; Phasenkondensor 2 und Hilfsmikroskop 3.

4.1 Phasenobjektive. Objektive die zum Gerät gehören, sind für die Tubuslänge von 160mm und einer Deckglasdicke von 0,17mm geeignet. Technische Daten der Objektive sind in der Tabelle dargestellt.

Typ des Phasenkontrast Objektivs	Vergrößerung	Apperatur	Fokussierentfernung in mm	Arbeitsentfernung in mm
Achromatisch 20x0,40	20	0,40	8,40	1,70
Achromatisch 40x0,65	40	0,65	4,35	0,55
Achromatisch 90x1,25 Öl	90	1,25	1,96	0,10
Achromatisch 70x1,23 Wasser	70	1,23	2,52	0,14 - 0,04

Objektive für die Beobachtung mit den Methoden des Phasenkontrastes unterscheiden sich von üblichen achromatischen Objektiven dadurch, daß in der Fläche der „Ausgangslinse“ des Mikroskops zwei konzentrische Phasenringe vorhanden sind : einer - breit, der andere, der sich im breiten befindet - schmal. Mit Hilfe der Ringe wird die Phase des Nullmaximums auf 90° verändert und seine Intensität reduziert.

Die Phasenringe **Abb.9** sind auf die in der innere Fläche von einer der zusammengeklebten Linsen angebracht (oder auf der Ringplatte), die sich neben der „Ausgangslinse“ des Objektivs befinden.

Auf den Objektiven ist zusätzlich das Phasenkontrastzeichen PH 2, wobei die 2 für die zwei Phasenringe steht. Bei den normalen Arbeiten mit dem Mikroskop ist es nicht empfehlenswert diese Objektive zu benutzen, da sie die aufgrund der Phasenringe eine deutlich schlechtere Qualität liefern.

4.2 Phasenkontrastkondensor

Der Phasenkondensor **Abb.8** für die Beobachtung nach der Methode von Phasenkontrast, gleicht in seinem optischen Schema dem gewöhnlichen Kondensor. Davon ausgenommen sind die Doppelringblenden die sich im Blendenrevolver des Phasenkondensors befinden. Die Ringblenden werden in den Ringblendenrevolver (4) eingesetzt und sind dem ausgewählten Objektiv das benutzt wird gleich. Der Kondensor kann aber auch für die normale Hellfeldbeleuchtung benutzt werden. Für diese Arbeit gibt es in dem Ringblendenrevolver, außer den Ringblenden, eine freie Öffnung für die Durchlassung des ganzen Lichtbündels; und unter dem Ringblendenrevolver - eine Irisblende.

Der Phasenkontrastkondensor eignet sich auch für die sogenannte „schiefe Beleuchtung“ und in einigen Fällen auch zur Dunkelfeldbeleuchtung. Nach der Einstellung des MIKROSKOPS MIT DER Hellfeldbeleuchtung drehen Sie die Kondensorscheibe aus der Raste der Stellung „0“ (Hellfeld) nach links oder recht heraus und bemerken sofort den typischen, plastischen Bildeindruck, den die schiefe Beleuchtung gewährt. Kurz bevor das Gesichtsfeld bei weiterem Drehen der Scheibe ganz dunkel wird, haben Sie einseitige Dunkelfeldbeleuchtung. Reguläre, d.h. allseitige Dunkelfeldbeleuchtung können Sie mit schwachen und mittleren Objektiven erzielen, wenn Sie am Phasenkontrastkondensor solche Ringblenden einstellen, die ihre Größe wegen schon außerhalb der Objektöffnung liegen. Dieses kontrolliert man leicht durch Einblick in den Tubus bei herausgenommenem Okular.

Der Phasenkontrastkondensor wird in den Kondensorhalter eingesetzt und mit einer Schraube befestigt. Der Tausch von den Ringblenden erfolgt durch das Drehen des Ringblendenrevolver bis zum Einrasten; wobei im Fenster des Ringblendenrevolver eine Ziffer erscheint, die der Vergrößerung des benutzten Objektives oder „0“, die der freien Öffnung entspricht. Die zwei Schrauben (5) dienen dem Zentrieren der Ringblende hinsichtlich des Objektivphasenrings. Der Ring (6) ist für das Verstellen der Irisblende vorgesehen, und die Schrauben (7) - für das Zentrieren der Phasenringe des Objektivs. (8) **Abb.8** Das Gestell dient zur Aufnahme eines Lichtfilters.

4.3. Hilfsmikroskops

Das Hilfsmikroskop (3) wird für das Zentrieren der Abbildung von der Ringblende des Kondensors hinsichtlich der Phasenringe des Objektivs benutzt. Das wird in dem Tubus (Rohr) vom Mikroskop hineingesteckt (an die Stelle des Okulars) und nach der Zentrierung wieder vom Okular ersetzt. Das Hilfsmikroskop besteht aus 2 Teilen, einer Rohrhülse mit Objektiv und einer Rohrhülse mit Okular.

Die Rohrokularhülse wird in die Rohrobjektivhülse eingesetzt und kann sich darin bewegt werden. Die Feststellung der beiden Teile erfolgt durch die seitlich angebrachten Schraube (9) der Okularhülse.

5. Markierung

A jedem Teil des Gerätes sind Markenzeichennummern und Ordnungsnummer aufgebracht. Die zwei ersten Ziffern bedeuten die zwei letzten Ziffern vom Jahr der Herstellung.

6. Arbeitsordnung

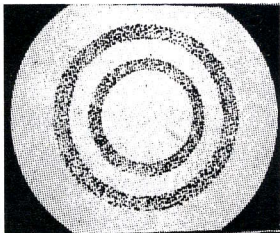
6.1 Setzen sie in den Objektivrevolver des Mikroskops das Phasenkontrastobjektiv und in den Okulartubus das ausgewählte Okular. Beim benutzen von den Objektiven 70x1,23 und 90x1,25 und für die volle Ausnutzung der Apertur vom Kondensor, bringen sie ein Tropfen Wasser oder Immersionsöl auf die flache Fläche der Frontlinse des Kondensors auf.

6.2 Setzen sie anstatt des gewöhnlichen Kondensors den Phasenkondensor ein; der Ringblendenrevolver (H) soll dabei so gedreht, daß im dort vorhandenen Fenster die Ziffer „O“ erscheint. Der Phasenkondensor kann stets am Mikroskop bleiben (mit ihm ist es möglich die Analysen im Hellfeld durchzuführen).

6.3 Plazieren sie den Objektträger mit dem Präparat auf den Mikroskoptisch und fokussieren sie das Mikroskop darauf.

6.4 Stellen sie die Beleuchtung nach den Regeln der normaler Beleuchtung ein: dabei soll die Glühwendel der Lampe von der Beleuchtung in der Fläche der Irisblenden des Kondensors abgebildet werden und die Feldblende, in der Fläche des Präparates. Die Feldblende soll zum Blickfeld des Objekts zentriert sein und zum Blickfeld des Okulars geöffnet sein.

6.5 Öffnen sie die Irisblende (6) des Kondensors vollständig.



6.6 Stecken sie das Hilfsmikroskop (3) in den Tubus hinein, und lösen sie die Feststellschraube (9) vom Hilfsmikroskop. Nun wird solange das Hilfsmikroskop verschoben bis die Phasenringe des Objektivs (Abb.9) scharf zu erkennen sind. Das Okular wird jetzt mit der Feststellschraube wieder festgestellt.

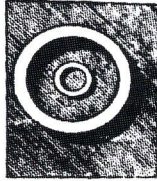
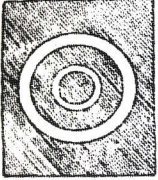
(Abb. 9).

6.7. Durch das Drehen von dem Ringblendenrevolver des Kondensors schalten sie nun die erforderliche Ringblende; im Fenster des Kondensors soll die Ziffer, die dem ausgewählten Objektiv entspricht erscheinen. Im Hilfsmikroskop werden sie außer den hellen Objektivphasenringe auch die dunkleren Kondensorphasenringe (Abb.10) sehen -

Abb. 10

Abb. 11

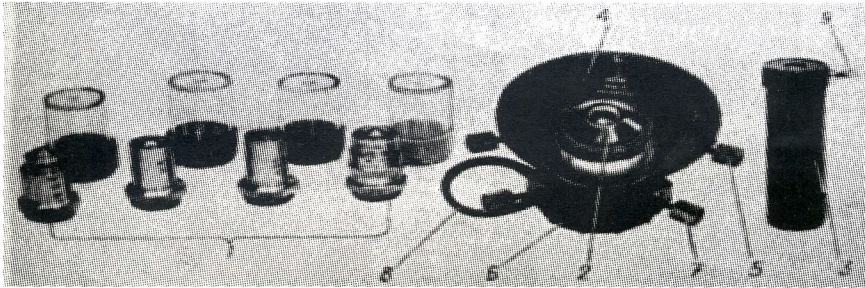
6.8 Vereinigen sie jetzt mit Hilfe der Zentrierschrauben (5) (Abb.8) die Abbildung der hellen Objektivphasenringe (Abb.11) und zentrieren sie mit Hilfe der Schrauben (7) (Abb.8) die Irisblende des Kondensors zu den dunklen Kondensorphasenringen und den hellen Objektivphasenringe.



6.9 Nehmen sie das Hilfsmikroskop aus den Tubus und tauschen sie es gegen das ausgewählte Okular.

6.10 Durch das heben bzw. senken des Kondensors stellen sie jetzt den größtmöglichen Objektabbildungskontrast ein.

Abb.8



6.11 Beobachten sie das Objekt zuerst, mit voll geöffneter Irisblende, beide Phasenringblenden sind nun wirksam (der Kontrast ist jetzt am geringsten). Danach schließen sie soweit die Kondensorsirisblende so daß die breite äußere Phasenringblende überdeckt und damit ausgeschaltet wird. Jetzt beobachten sie das Objekt nur mit der inneren schmalen Phasenringblende. Diese Methode ergibt ein sehr kontrastreiches Bild der Struktur des zu untersuchenden Objektes.

Für eine effektivere Beobachtung ist nach der Methode des Phasenkontrastes, die Benutzung des grünen Lichtfilter zu empfehlen.

Vergessen sie nicht, daß nach jedem wechseln des Objektivs oder Präparates die Zentrierung der Ringblende hinsichtlich der Phasenringe zu überprüfen. Nur in diesem Fall können sie sicher sein eine gute Kontrastabbildung des Objektes zu erhalten. Um wieder zu der normalen Hellfelduntersuchung über zu gehen ist es ausreichend, wenn sie den Revolver des Kondensors auf die Ziffer „0“ umschalten. Sie sollten dabei nicht vergessen, daß bei der Arbeit im Hellen die Phasenobjektive die Qualität der Abbildung, aufgrund der Phasenringe, leicht vermindern.

7. Staub unsaubere Objektivfrontlinsen

Während Staubteile auf dem Okular lediglich „nicht jeden Benutzer störende, Flecken im Bild verursachen, kann eine verunreinigte Objektivfrontlinse das Bild hoffnungslos unscharf, oder zumindest kontrastarm machen. Durch ihre Nähe zum Präparat und evtl. zum Immersionsöl des Deckglases, aber auch ganz besonders zur den Revolver bedienenden Hand ist die Objektivfrontlinse in erhöhtem Maße der Gefahr ausgesetzt, verschmiert zu werden. Schon der leichteste Fingerabdruck kann schwerwiegende folgen haben. Daher sollte man vor wichtigen Arbeiten jedes Objektiv abzuschrauben und einer eingehenden Inspektion mittels Lupe zu unterziehen. Am besten sieht man Schmutz dann, wenn man eine Lichtquelle sich auf der Planfläche spiegeln läßt. Bei Objektiven mit hohler Frontlinse ist der andere Weg angezeigt, nämlich von der Anschraubseite her mit einer Lupe auf die Frontlinsenfläche scharf einzustellen. Ebenso lassen sich auch die übrigen Linsen sich so kontrollieren und eventuelle Fehler (Sprünge, Einkittungen) sind leicht auszumachen.

8. Tips zur Fehlersuche

Finden sich im Bild Strukturen, die im Verdacht stehen, daß sie nicht ins Bild gehören, so geht man zur Feststellung der Fehlerquelle folgendermaßen vor.

Beseitigt eine leichte Kondensorverstellung die Störung dann liegt die Ursache im Lampenkolben, im Lampenkollektor oder im Filter davor. Hat die Kondensor Verstellung dagegen keinen Einfluß, dann verstellt man als nächstes die Scharfeinstellung, wodurch alle Störungen durch verschmutzte Kondensorlinse und verschmutztes Präparat verschwinden müssen. Ist auch dies ohne Wirkung, so dreht man zuerst das Objektiv, darauf das Okular ein wenig und erkennt sofort, in welchem Falle sich der Fremdkörper mitdreht.

Am deutlichsten sind Schmutzteilchen dann zu sehen, wenn man die Kondensorblende ganz schließt, weil in diesem Fall die Abbildungstiefe am größten ist.

9. Fehlerbeseitigung

In nahezu allen Fällen genügt ein Reinigen der außenliegenden Linsenflächen mit einem fettfreien Pinsel. Oder einem oftmals gewaschenen, absolut staubfreien Leinentuch und destilliertes Wasser. Die erforderliche Dosis Wasser erzeugt man leicht durch Behauchung der Flächen. Kann man auf ein Lösungsmittel nicht verzichten empfiehlt sich Alkohol, Benzin, bewährt hat sich auch Isoproylalkohol.