



ZEISS

**Phasenkontrast-
einrichtung**

**Beschreibung
und Gebrauchsanleitung**

Wir bitten

die Benutzer der Phasenkontrasteinrichtung, uns einen Sonderabdruck von ihren Veröffentlichungen über damit durchgeführte Untersuchungen zu überlassen, damit im Interesse jedes Benutzers eine möglichst vollständige Sammlung des Schrifttums vorgenommen werden kann.

Die Bilder sind nicht in allen Einzelheiten für die Ausführung der Geräte maßgebend. Für wissenschaftliche Veröffentlichungen stellen wir Druckstöcke der Bilder oder Verkleinerungen davon, soweit vorhanden, gern zur Verfügung. Die Wiedergabe von Bildern oder Text ohne unsere Zustimmung ist nicht gestattet. Das Recht der Übersetzung ist vorbehalten.

V E B C A R L Z E I S S J E N A

Abteilung für Mikroskopie

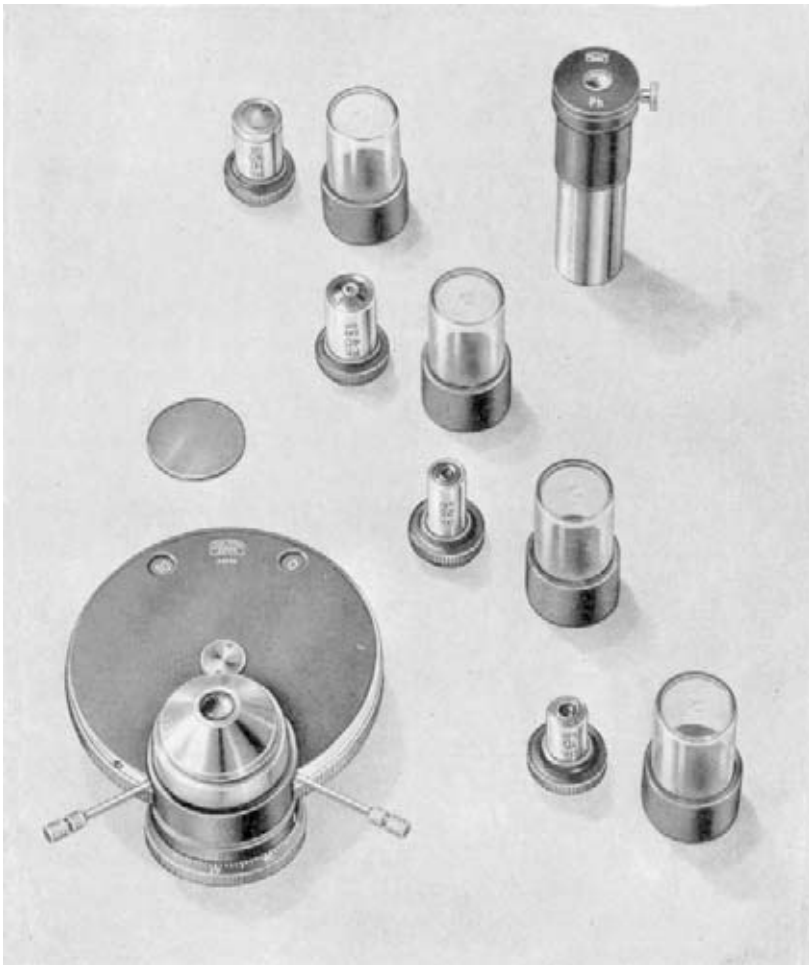


Bild 1. Phasenkontrasteinrichtung für übliche Mikroskope

300381/a

Oben rechts: Hilfsmikroskop

Mitte: Achromate Ph 10/0,30, 20/0,40, 40/0,65 und 90/1,25 H. I. mit Kapseln für die Ph-Objektive

Unten links: Phasenkondensator und Gelbgrünfilter

Um die Phasenkontrasteinrichtung richtig und erfolgreich anzuwenden, ist die Kenntnis der Grundlagen des Phasenkontrastverfahrens dringend erforderlich. Es soll daher hier zunächst das Wichtigste darüber hervorgehoben werden ¹⁾.

Das Phasenkontrastverfahren nach **Zernicke** beruht auf folgenden Tatsachen: Die in der Mikroskopie zu untersuchenden Präparate sind grundsätzlich von zweierlei Art. Es gibt einerseits Objekte, bei denen Stellen großer Lichtdurchlässigkeit und solche von sehr geringer Lichtdurchlässigkeit, also starker Absorption, miteinander abwechseln. Solche Objekte werden mit gutem Kontrast abgebildet (Bild 2a). Andererseits gibt es aber Objekte, bei denen die Struktur derart beschaffen ist, daß Stellen verschiedener Dicke oder verschiedener optischer Dichte, aber mit praktisch überall gleicher Durchlässigkeit für die Lichtstrahlen nebeneinander auftreten. Solche Objekte werden mehr oder weniger kontrastlos abgebildet (Bild 2b). Physikalisch besteht der Unterschied zwischen diesen beiden Arten von Objekten darin, daß im ersten Fall die Amplitude der einfallenden Lichtwellen Änderungen erfährt, die Phase aber nicht beeinflußt wird, während im zweiten Fall die Amplitude unverändert bleibt, aber die Phase geändert wird. Da Amplitudenänderungen sich als Intensitätsänderungen bemerkbar machen, Phasenänderungen aber nicht sichtbar sind, müssen die erwähnten Sichtbarkeitsverhältnisse auftreten. Wir nennen in Zukunft Objekte der ersten Art **Amplitudenpräparate**, solche der zweiten **Phasenpräparate**. Bei den in der mikroskopischen Praxis vorkommenden Objekten treten allerdings weder reine Amplituden- noch reine Phasenpräparate auf. Man hat vielmehr stets eine Kombination beider vor sich, bei der einmal der eine, einmal der andere Charakter vorherrscht. Aus didaktischen Gründen ist es vielfach zweckmäßig, die Objekte zu idealisieren. Als solche idealisierten Objekte benutzt man in der Mikroskopie in der Regel feine Gitter wie in Bild 2. Wir können entsprechend den beiden Arten von Präparaten Amplituden- und Phasengitter unterscheiden.

Um im einzelnen die obenerwähnten Unterschiede bei der Abbildung dieser beiden Arten von Objekten im Mikroskop zu verstehen, muß man sich zunächst an die **Abbe**schen Vorstellungen vom Abbildungsvorgang erinnern. Danach erzeugt das Objekt, als Beugungsgitter wirkend, von der beleuchtenden Lichtquelle bzw. ihrem Abbild, das durch die Kondensorblende begrenzt wird,

¹⁾ Vgl. hierzu auch Druckschrift CZ 30-304a-1 u. die Arbeit von Köhler, A. und Loos, W.: Das Phasenkontrastverfahren und seine Anwendung in der Mikroskopie. Z. Die Naturwissenschaften 29 (1941) S. 49 - 61.

ein Beugungsspektrum. In der Austrittspupille des Objektivs ist daher das direkte Abbild der Lichtquelle von Beugungsbildern umgeben (Bilder 3b und d). Ihre Anordnung hängt von der Struktur des Objektes ab, während die Zahl der in der Austrittspupille sichtbaren Beugungsbilder von der Gitterkonstanten des Objektes und von der Apertur des Objektivs bestimmt wird. Die Abbildung des Objektes ist nun als eine Interferenzerscheinung aufzufassen, die durch das Zusammenwirken der von den einzelnen Beugungsbildern ausgehenden, in der Bildebene zusammentreffenden kohärenten Lichtwellen entsteht.

Bei der Abbildung eines Amplitudengitters wird, wie erwähnt, die Amplitude des Lichtes in gewissen Stellen des Präparates geändert, in der Regel verkleinert. Das bedeutet, daß auch bei der Interferenz in der Bildebene verkleinerte Amplituden zusammentreffen und naturgemäß auch beim Zusammenwirken kleinere Amplituden ergeben. Wo im Objekt die Amplitude verkleinert ist, ist sie es auch in der Abbildung.

Bei der Abbildung eines Phasengitters dagegen erfahren die Amplituden keine Änderungen, es treten aber Phasenänderungen auf. Diese sind derart, daß die Phase des durch die Beugungsbilder gehenden Lichtes der Lichtquelle gegen die Phase des durch die direkte Abbildung gehenden verschoben erscheint. Der Kunstgriff, der dem Phasenkontrastverfahren zugrunde liegt, besteht nun darin, diese Phasenverschiebung wieder rückgängig zu machen. Dadurch wird ein Beugungsspektrum erzeugt, das hinsichtlich der Phase und der Amplitude mit dem Beugungsspektrum eines Amplitudenpräparates übereinstimmt und daher auch eine entsprechende Abbildung in der Bildebene erzeugen muß. Dieses Bild ergibt eine kontrastreiche Darstellung der Struktur des Phasengitters bzw. des Phasenobjektes überhaupt (Bild 2c).

Um das Verfahren praktisch durchzuführen, braucht man nur am Ort des Beugungsspektrums im Objektiv ein sog. Phasenplättchen anzubringen, welches das Licht des direkten Abbildes der Lichtquelle gegen das durch die Beugungsbilder gehende Licht um $90^\circ = 1/4$ Wellenlänge in der Phase verschiebt. Das geht natürlich nur, wenn die entstehende Abbildung der als Lichtquelle wirkenden Kondensorblende genau mit dem Phasenplättchen übereinstimmt. Als Form derselben hat sich die eines Ringes als am besten erwiesen (Bild 3c).



Das ringförmige Phasenplättchen ist auf einer passenden Linsenfläche der für das Verfahren vorgesehenen, durch ein Ph gekennzeichneten Objektiv angebracht. Es ist sichtbar, wenn man die Ph - Objektiv gegen eine helle Fläche hält und von hinten her hineinblickt (Bild 4).

Es werden folgende Ph - Objektiv gefertigt:

Achromat Ph 10/0,30

Achromat Ph 20/0,40

Achromat Ph 40/0,65

Achromat Ph 90/1,25 als Ölimmersion

Für jedes dieser Objektiv ist eine besondere Ringblende als Kondensorblende notwendig, die sich ebenso leicht wie die Objektiv am Revolver gegen eine andere auswechseln lassen soll. Um die Abbildung der Blenden genau mit dem Ring im Objektiv zur Deckung zu bringen, müssen sich die Blenden im Kondensor zentrieren lassen. Es ist also notwendig, einen besonderen Kondensor anzuwenden, dessen Konstruktionseinzelheiten aus Bild 5 hervorgehen. Außer diesem Spezialkondensor wird von gangbaren Beleuchtungseinrichtungen lediglich das in unserem „Lumipan“-Stativ (Druckschrift CZ 30-126a-1) eingebaute pankratische System den zu stellenden Anforderungen gerecht, sobald eine passende Ringblende mit Fassung (Bild 6) benutzt wird, die man in den Stellung der Aperturblende im Fuß einsteckt. Da mit bloßen Augen die erforderliche genaue Zentrierung des Blendenbildes zum Phasenplättchen nicht möglich ist, bedient man sich eines beigegebenen kleinen Hilfsmikroskops (Bild 7).

Das Einstellen der Geräte bei Phasenkontrastbeobachtungen erfolgt demnach für das „Lumipan“ anders als bei den üblichen Mikroskopen. Im einzelnen ist die Beachtung folgender Richtlinien zu empfehlen.

1. Einstellen eines üblichen Mikroskops mit Phasenkondensor

1.1 Gewünschtes Okular und Ph - Objektiv am Mikroskop in Gebrauchsstellung bringen.

1.2 Phasenkondensator an Stelle eines etwa vorhandenen anderen Kondensators in die Kondensatorschiebhülse einsetzen und Blendenrevolver so einstellen, daß in dem mit einem roten Punkt bezeichneten Fenster 0 erscheint.

Der Ph-Kondensator kann immer am Stativ bleiben. Er ist ein Trockenkondensator und ersetzt für die meisten Fälle auch jeden gewöhnlichen Hellfeldkondensator. Seine Frontlinse liegt in Normalstellung etwa 3 mm unter der Tischebene.

Der Ph-Kondensator läßt sich auch an Stativen fremder Firmen anwenden, deren Kondensatorschiebhülse einen Durchmesser von 39,5 mm hat.

1.3 Präparat auf den Mikroskoptisch legen.

1.4 Mikroleuchte einschalten und Beleuchtung nach den Regeln des Köhlerschen Prinzips einstellen, wobei zunächst das Präparat bei ziemlich weit geschlossener Kondensatorblende scharf einzustellen und besonders auf die einwandfreie Abbildung der Leuchtfeldblende im Präparat zu achten ist.

Das Scharfeinstellen bereitet bei ungefärbten Präparaten oft Schwierigkeiten. Man kann sich helfen, indem man die Kondensatorblende zunächst möglichst eng zuzieht, oder auch, indem man bei ganz geöffneter Kondensatorblende die zum Objektiv gehörende Ringblende im Blendenrevolver bereits jetzt vorübergehend ohne Rücksicht auf ihre genaue Zentrierung einschaltet. Die Untersuchungen mit dem Phasenkontrastverfahren erfolgen am besten bei grünem Licht. Man legt deshalb vorteilhafterweise in den Farbglasshalter des Ph-Kondensators ein Gelbgrünfilter, das bei allen Phasenkontrastarbeiten eingeschaltet wird.

Die Phasenkontrastmethode verlangt eine wesentlich hellere Lichtquelle, als sie etwa bei der gewöhnlichen Hellfeldbeobachtung erforderlich ist. Eine lichtstarke Kleinspannungslampe ist unentbehrlich, besonders, wenn die Beobachtungsergebnisse photographisch festgehalten werden sollen.

1.5 Kondensatorblende ganz öffnen.

1.6 Hilfsmikroskop an Stelle des Okulars in den Tubus stecken und durch Verschieben seines ausziehbaren Teiles scharf auf den dunklen Ring des Phasenplättchens im Objektiv einstellen (Bild 4). **Hierbei darf weder der Grob- noch der Feintrieb des Mikroskops verstellt werden.**



1.7 Durch Drehen des Blendenrevolvers des Kondensors die zu dem benutzten Objektiv gehörige Ringblende einschalten. In der Deckplatte des Blendenrevolvers befinden sich zwei Fenster, von denen das eine mit einem roten Punkt bezeichnet ist. In diesem Fenster muß die erste Zahl der Objektivbezeichnung sichtbar sein, z. B. bei Objektiv Ph 20/0,40 die 20 (Bild 5). Das zweite Fenster dient zur Orientierung. Im Hilfsmikroskop erblickt man jetzt außer dem vorher scharf eingestellten Phasenplättchen die Abbildung der Ringblende (Bild 8a).

1.8 Ringblendenbilder des Ph-Kondensors mit Hilfe der beiden Steckschlüssel (Bilder 1, 5) genau mit Phasenplättchen des jeweiligen Objektivs zur Deckung bringen (Bild 8b). Ungenaue Deckung setzt den Kontrasteffekt herab!

1.9 Hilfsmikroskop gegen Okular vertauschen. Das Mikroskop zeigt die Phasenkontrastabbildung des Präparates.

2. Einstellen des Mikroskops „Lumipan“ mit pankratischem System

2.01 Okular einsetzen und gewünschtes Ph-Objektiv vorschalten.

2.02 Präparat auf den Mikroskoptisch legen und scharf einstellen. Das Scharfeinstellen bereitet bei ungefärbten Präparaten oft Schwierigkeiten. Man kann sich helfen, indem man die Aperturblende zunächst möglichst eng zuzieht, oder auch, indem man bei ganz geöffneter Aperturblende die Ringblende mit Fassung bereits jetzt vorübergehend einsetzt.

Die Untersuchungen mit dem Phasenkontrastverfahren erfolgen am besten bei grünem Licht. Man legt deshalb ein Gelbgrünfilter in die Fassung der Ringblende (Bild 6) und benutzt es grundsätzlich bei allen Phasenkontrastarbeiten.

2.03 Leuchtfeld nach Gebrauchsanleitung CZ 30-G126a-1 überprüfen.

2.04 Aperturblende ganz öffnen.

2.05 Hilfsmikroskop an Stelle des Okulars in den Tubus stecken und durch Verschieben seines ausziehbaren Teiles scharf auf das dunkel erscheinende, ringförmige Phasenplättchen des Ph-Objektivs einstellen (Bild 4). **Hierbei darf weder der Grob- noch der Feintrieb des Mikroskops verstellt werden.**

2.06 Ringblende mit Fassung in den Stellring der Aperturblende einsetzen. Im Hilfsmikroskop erblickt man nun außer dem vorher scharf eingestellten Phasenplättchen das Bild der Ringblende. Es wird im allgemeinen kleiner oder größer als das Phasenplättchen sein und nicht konzentrisch zu diesem liegen (Bilder 9a und d).

2.07 Ringblendenbild zum Phasenplättchen zentrieren, indem man die Aperturblende mittels der dazu vorgesehenen Stellschraube seitlich verstellt und gleichzeitig dreht (Bilder 9b und e). Es ist zu beachten, daß dabei die Zenterschrauben für das Leuchtfeld auf keinen Fall verstellt werden dürfen.

2.08 Ringblendenbild beim Beobachten mit dem Hilfsmikroskop durch Drehen am Stellring des pankratischen Systems genau auf die Größe des Phasenplättchens bringen (Bild 9c). Gegebenenfalls nachzentrieren. Ungenaue Deckung setzt den Kontrasteffekt herab!

2.09 Hilfsmikroskop gegen Okular vertauschen. Das Mikroskop zeigt die Phasenkontrastabbildung des Präparates.

2.10 Einen allmählichen Übergang zwischen Phasenkontrast und Hellfeld erzielt man durch Verkleinern des Ringblendenbildes mit Hilfe des pankratischen Systems, so daß die Deckung zwischen dem Ringblendenbild und dem Phasenplättchen verschwindet.

2.11 Für jedes neu eingeschaltete Objektiv und bei jedem Präparatwechsel muß die Einstellung des Ringblendenbildes unter Benutzung des Hilfsmikroskops überprüft werden, da man sonst nicht die Gewähr hat, daß die Deckung zwischen Ringblendenbild und Phasenplättchen noch einwandfrei ist.

2.12 Als Anhalt für das Einstellen der Aperturanzeige am pankratischen System, passend zum jeweils angewendeten Objektiv, kann folgende Tabelle dienen:

Objektiv	Aperturanzeige
Ph 10/0,30	0,30
Ph 20/0,40	0,40
Ph 40/0,65	0,65
Ph 90/1,25	0,75



3. Mögliche Fehler beim Arbeiten mit einem üblichen Mikroskop bzw. mit dem „Lumipan“

3.1 Es zeigt sich im zentralen Teil des Sehfeldes ein verwaschener, dunkler Fleck (Bild 10).

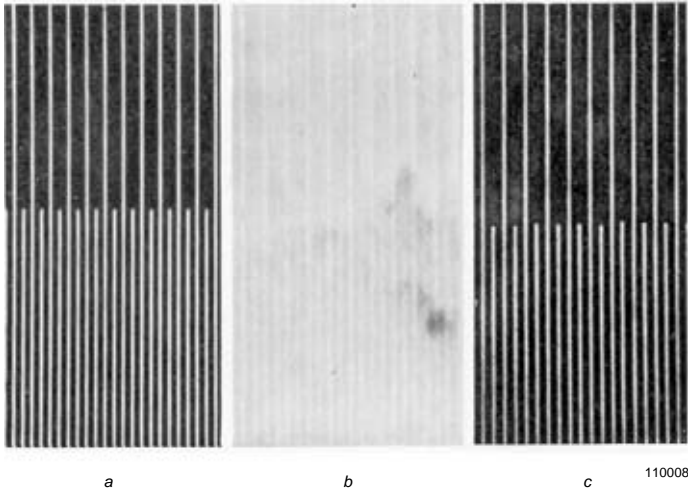
Ursache: Kondensor ist falsch eingestellt. Leuchtfeldblende wird nicht im Präparat abgebildet.

Beseitigung: Kondensor verstellen, bis die eng zugezogene Leuchtfeldblende möglichst scharf erscheint.

3.2 Nach dem Einschalten der Ringblende tritt kein Licht mehr ins Mikroskop.

Ursache: Kondensorblende (Aperturblende) wurde nicht geöffnet.

Beseitigung: Kondensorblende (Aperturblende) öffnen.



110008

a

b

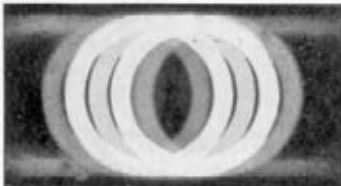
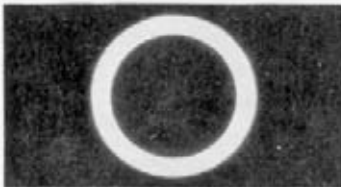
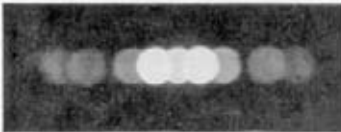
c

Bild 2. Amplitudengitter- und Phasengitterabbildungen

a Amplitudengitter (Abbesche Diffraktionsplatte) im Hellfeld

b Phasengitter im Hellfeld

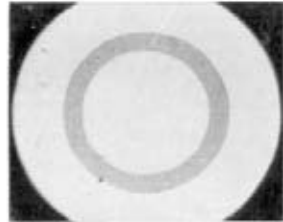
c Dasselbe im Phasenkontrast



a

b

c



110007

Bild 4. Ringförmiges Phasenplättchen in der bildseitigen Brennebene des Objektivs

d

Bild 3. Beugungserscheinungen in der Austrittspupille des Objektivs

a und c ohne Präparat

b und d mit Parallelgitter als Präparat

110009



300423 a

von oben

Bild 5. Phasenkondensator



300422 a

von unten



82003

Bild 6. Ringblende mit Fassung

Bild 7. Hilfsmikroskop



110010

300282

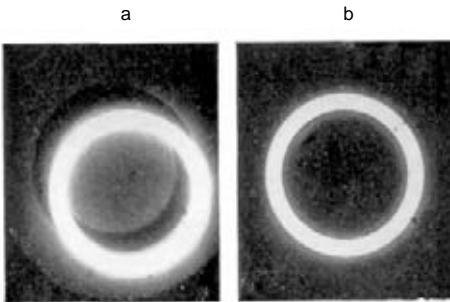
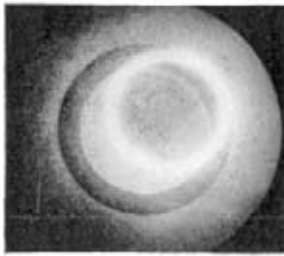
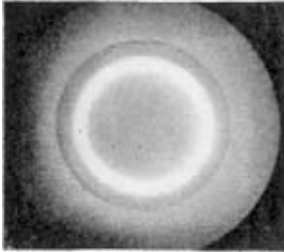


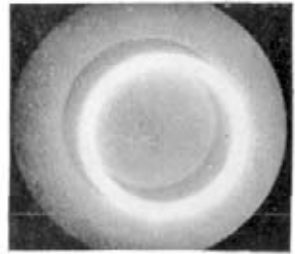
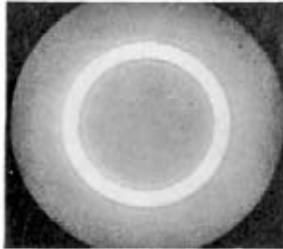
Bild 8. Ringblendenzentrierung



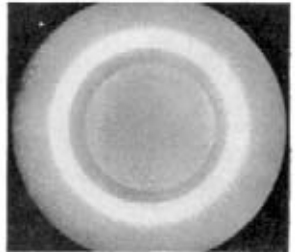
a



b



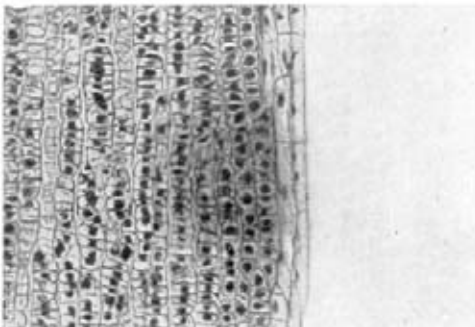
d



e



Bild 9. Zentrieren und Justieren der Ringblende



110011

Bild 10. Mangelhafte Beleuchtung infolge falscher Kondensorstellung

TRPT-Nr. 6317/52

