



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

60015

Patent dodatkowy
do patentu _____

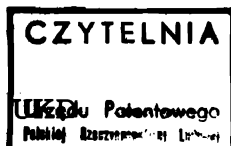
Zgłoszono: 28.VI.1967 (P 121 374)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 30.V.1970

Kl. 42 h, 15/01

MKP G 02 b 21/08



Współtwórcy wynalazku: mgr Maksymilian Pluta, mgr inż. Tadeusz Stefaniak

Właściciel patentu: Centralne Laboratorium Optyki, Warszawa (Polska)

Przysłona aperturowa kondensora do urządzeń mikroskopowych do obserwacji fluorescencyjnej i fazowo-kontrastowej

1

Przedmiotem wynalazku jest przysłona aperturowa kondensora do mikroskopowych urządzeń umożliwiająca obserwację preparatów bądź to tylko w świetle fluorescencyjnym, bądź też tylko w kontraście fazowym albo równocześnie w świetle fluorescencyjnym i kontraście fazowym oraz pozwalająca na szybkie przechodzenie od fluorescencyjnej obserwacji mikroskopowej do fazowo-kontrastowej i na odwrót.

Obecnie stosowane są dwie metody równoczesnego obserwowania preparatów mikroskopowych w świetle fluorescencyjnym i w kontraście fazowym. Pierwsza z nich polega na dwustronnym oświetleniu preparatu. Z jednej strony kieruje się na preparat przez obiektyw światło krótkofalowe (niebiesko-fioletowe lub ultrafioletowe) pobudzające fluorescencję, a z drugiej strony przez kondensor fazowo-kontrastowy — światło białe lub monochromatyczne długofalowe (na przykład zielone) służące do obserwacji w kontraście fazowym.

Druga metoda polega na stosowaniu oświetlenia jednostronnego przez kondensor, w którym zastosowana jest odpowiednia przysłona pierścieniowa, przezroczysta dla światła białego tylko w obszarze wąskiego pierścienia, optycznie sprzężonego z pierścieniem fazowym w obiektywie, natomiast dla światła krótkofalowego przezroczysta na całym swym obszarze w obrębie pełnego otworu kondensora.

Przysłony te dotychczas wykonywane są ze szkła ciemnego, przepuszczającego tylko światło fioletowe

2

lub ultrafioletowe, albo też z filtrów polaryzacyjnych o wysokim stopniu polaryzacji dla światła żółto-zielonego, a znikomo małym stopniu polaryzacji dla światła krótkofalowego. Pierwszego rodzaju przysłona wymaga stosowania specjalnego szkła ciemnego niełatwo dostępnego, zaś w przypadku drugiego rodzaju przysłony preparat przy obserwacji fazowo-kontrastowej jest oświetlony światłem spolaryzowanym liniowo, co niekiedy jest niepożądane. Poza tym wykonawstwo tych przysłon jest dość kłopotliwe i kosztowne.

Postawiono sobie zatem za cel zrealizowanie urządzenia fluorescencyjnego sprzężonego z kontrastem fazowym, które nie posiadałoby wyżej wymienionych wad i zezwalało na obserwację w świetle fluorescencyjnym i w kontraście fazowym przez stosowanie bądź to jednego źródła światła zawierającego zarówno promieniowanie krótkofalowe jak i długofalowe oraz równocześnie dwóch źródeł światła, krótkofalowego do obserwacji fluorescencyjnej i długofalowego do obserwacji fazowo-kontrastowej.

Cel ten osiągnięto dzięki zastosowaniu w kondensorze przysłony aperturowej, wykonanej w postaci dwuskładnikowego filtru interferencyjnego: jednego o kształcie pierścienia przepuszczającego światło długofalowe a nie przepuszczającego światła krótkofalowego (niebieskofioletowego lub ultrafioletowego) i służącego do obserwacji fazowo-kontrastowej oraz drugiego filtru złączonego z poprzednim i wypełniającego pozostałe pola otworu kon-

densora oraz przepuszczającego światło krótkofalowe, wywołujące fluorescencję, albo też filtru interferencyjnego przepuszczającego promieniowanie krótkofalowe w całym polu i zawierającego całkowicie przezroczysty pierścień przepuszczający wszystkie długości fal świetlnych.

Przedmiot wynalazku w przykładowym wykonaniu urządzenia przeznaczonego do równoczesnej lub rozłącznej obserwacji w świetle fluorescencyjnym, pobudzonym światłem niebiesko-fioletowym i ultrafioletowym oraz w kontraście fazowym w świetle zielonym lub innym długofalowym pokazano na rysunkach, na których fig. 1 — przedstawia płytkę szklaną pokrytą pomocniczą warstwą sadzy, fig. 2 przedstawia tę samą płytkę pokrytą sadzą z wytoczonym pierścieniem przezroczystym, fig. 3 — płytkę pokrytą warstwą z wytoczonym pierścieniem i z naparowanymi warstwami interferencyjnymi, fig. 4 — płytkę szklaną z pierścieniem interferencyjnym, fig. 5 — płytkę szklaną z pomocniczą warstwą sadzy, fig. 6 — płytkę szklaną z pierścieniem sadzowym fig. 7 — płytkę szklaną z pierścieniem sadzowym z naparowanymi warstwami interferencyjnymi, fig. 8 — płytkę szklaną z warstwami interferencyjnymi i przezroczystym pierścieniem, fig. 9 — dwuskładnikową pierścieniową przysłonę interferencyjną, fig. 10 — przysłonę przedstawioną na fig. 9 w widoku z góry, fig. 11 — schemat urządzenia fluorescencyjnego z zastosowaniem pierścieniowej przysłony interferencyjnej przedstawionej na fig. 9 i 10.

Na rysunkach przedstawiających sposób wykonania pierścieniowej przysłony interferencyjnej według wynalazku A i B — oznaczają płytki szklane (lub kwarcowe) S — pomocniczą warstwą sadzy, P₁ — pierścieniowy kanalik wytoczony w warstwie sadzy, P₂ — pomocniczy pierścień z sadzy, M₁, M₂, M₃ i M₄ — warstwy metaliczne (na przykład srebrne) naparowane w próżni, D₁ i D₂ — warstwy dielektryczne (na przykład z fluorku magnezu) również naparowane w próżni, Z — pierścieniowy filtr interferencyjny przepuszczający światło zielone, lub inne długofalowe, F — filtr interferencyjny przepuszczający światło fioletowe lub ultrafioletowe, C — kleiwo optyczne, za pomocą którego sklejone są płytki szklane A i B z wykonanymi na nich filtrami interferencyjnymi F i Z.

Kolejność postępowania prowadząca do wykonania pierścieniowej przysłony interferencyjnej, w której filtr pierścieniowy przepuszcza na przykład światło o długości fali $\lambda_1 = 546$ nm a filtr F światło fioletowe o długości fali $\lambda_2 = 405$ nm jest następująca. Na starannie oczyszczonej płytce szklanej A (Fig. 1) nanosi się znanym sposobem pomocniczą warstwą sadzy S, również w znany sposób wytwarza się przezroczysty kanalik pierścieniowy P₁ o żądanych wymiarach. Następnie w aparaturze próżniowej przy ciśnieniu około 5×10^{-5} torra naparowuje się kolejno: warstwę srebrną M₁ przepuszczającą około 9% światła o długości fali $\lambda_1 = 546$ nm, następnie warstwę fluorku magnezu D₁ o grubości optycznej $n \cdot d = 394$ nm (n — współczynnik załamania warstwy fluorku magnezu, d — grubość geometryczna warstwy) oraz drugą warstwę srebrną M₂ analogiczną do warstwy M₁.

Po wyjęciu szklanej płytki z aparatury próżniowej pomocniczą warstwę sadzy S odgrywającą rolę maski, zdejmując się wraz z osadzonymi na niej parami srebra i fluorku magnezu stosując to samo urządzenie i ten sam sposób postępowania co przy wytaczaniu pierścieniowego kanalika P₁ (Fig. 1). W rezultacie na płytce A otrzymuje się pierścieniowy filtr interferencyjny Z o maksymalnej przepuszczalności dla wybranej długości fali świetlnej $\lambda_1 = 546$ nm.

Aby ta długość fali była maksymalnie przepuszczana, a fale o krótszych i dłuższych długościach wygaszane, optyczna grubość warstwy dielektrycznej D₁ musi być ściśle określona, tak aby światło odbijające się wielokrotnie między warstwami srebrnymi M₁ i M₂ i interferujące ze sobą po przejściu przez pierścień Z maksymalnie się wzmacniało dla długości fali $\lambda_1 = 546$ nm, a osłabiało dla pozostałych długości fal świetlnych. Warunek ten jest spełniony, jeżeli grubość optyczna warstwy fluorku magnezu D₁ wynosi około 394 nm.

Z kolei bierze się drugą szklaną płytkę B pokrytą pomocniczą warstwą sadzy S i oczyszcza się ją z sadzy w środkowym i zewnętrznym obszarze, pozostawiając pierścień z sadzy P₂ o średnicy takiej samej jaką miał poprzednio przezroczysty pierścień P₁ (Fig. 2), ale o szerokości nieco większej. Stosuje się przy tym tę samą wytaczarkę co przy wykonywaniu pierścienia P₁ na płytce A. Następnie w sposób analogiczny jak poprzednio naparowuje się w próżni filtr interferencyjny przepuszczający światło fioletowe, z maksimum przepuszczalności na przykład dla długości fali $\lambda_2 = 405$ nm.

W tym celu na powierzchni płytki B z pomocniczym pierścieniem sadzowym S, spełniającym rolę maski naparowuje się kolejno: warstwę srebrną M₃ o przepuszczalności światła około 10%, warstwę fluorku magnezu D₂ o grubości optycznej $n \cdot d = 263$ nm oraz drugą warstwę srebrną M₄ analogiczną do warstwy M₃. Po wyjęciu płytki z aparatury próżniowej wykonuje się z kolei przezroczysty kanalik T wytaczając pomocniczy pierścień sadzowy S z osadzonymi na niej parami srebra i fluorku magnezu.

Następnie płytkę B skleja się z płytką A za pomocą przezroczystego kleiwa optycznego C w sposób przedstawiony na Fig. 9. W rezultacie otrzymuje się dwuskładnikowy filtr interferencyjny, w którym pierścień Z przepuszcza maksymalnie tylko światło zielone, a część środkowa i zewnętrzna F tylko światło fioletowe. Widok tego filtru z góry przedstawia Fig. 10, na której przez H oznaczono te obszary gdzie filtr zielony Z i fioletowy F częściowo na siebie zachodzą. Obszary te widoczne są w świetle przechodzącym jako wąskie ciemne obwódki.

Dobierając odpowiednio grubość warstwy D₁ oraz grubość warstwy D₂ można otrzymać filtr pierścieniowy Z i filtr F przepuszczające inne dowolne wyćinki widma długofalowego i krótkofalowego. Warstwy metaliczne M₁ i M₂ oraz M₃ i M₄ nie mają decydującego wpływu na długość przepuszczalnych fal świetlnych.

Od ich przepuszczalności zależy tylko natężenie światła przepuszczanego i wygaszanego przez filtry.

W szczególności warstwy metaliczne M_1 , M_2 i M_3 , M_4 mogą być zastąpione wielowarstwowymi powłokami zwierciadlanymi dielektrycznymi podobnie jak to się czyni przy wykonywaniu zwykłych filtrów interferencyjnych wąskopasmowych.

Przykładowe zastosowanie wyżej omówionego dwuskładnikowego filtra interferencyjnego w charakterze pierścieniowej przysłony aperturowej zezwalającej na obserwację preparatów w świetle fluorescencyjnym i w kontraście fazowym przedstawia Fig. 11, na której przez J oznaczono żarówkę, K_1 — kolektor oświetlacza, D_1 — jego przysłonę polową, L_1 — zwierciadło, E_1 — miejsce na umieszczenie filtra barwnego, R — lampę rtęciową wysokociśnieniową, K_2 — kolektor tej lampy, D_2 — jej przysłonę polową, E — miejsce na umieszczenie filtra przepuszczającego tylko światło zielone lub tylko światło fioletowe, L_2 — przesuwne zwierciadło z warstwą odbijającą W lub interferencyjną przepuszczającą światło długofalowe S_1 wychodzące z żarówki J , a odbijającą światło krótkofalowe S_2 wychodzące z lampy rtęciowej R , D — wyżej opisaną interferencyjną przysłonę pierścieniową, w której pierścień Z przepuszcza światło długofalowe (na przykład zielone), a obszary F — światło fioletowe lub ultrafioletowe, K — kondensor, P badany preparat. Ob — obiektyw z pierścieniem fazowym Ph , G — filtr optyczny tak zwany zaporowy pochłaniający światło fioletowe, Ok — okular.

Zasada działania urządzenia zgodnie z wynalazkiem jest następująca. Lampa rtęciowa wysokociśnieniowa R wysyła światło o różnych długościach fali, zarówno w części ultrafioletowej, fioletowo-niebieskiej jak i żółto-zielonej części widma. Najwięcej wysyła światła ultrafioletowego o długości fali 360—370 nm, fioletowego o długości fali 400—410 nm oraz zielonego o długości fali 546 nm.

W przedstawionym wariantcie rozwiązania urządzenia fluorescencyjnego według wynalazku światło fioletowe lampy rtęciowej R wykorzystywane jest do fluorescencji, a światło zielone do obserwacji w kontraście fazowym. W tym celu w płaszczyźnie ogniskowej kondensora K umieszczona jest interferencyjna przysłona D będąca odpowiednikiem przysłony pokazanej na Fig. 9 i 10, która w obszarze pierścienia Z przepuszcza światło długofalowe (na przykład zielone), a w obszarach F światło fioletowe lub ultrafioletowe.

Pierścień Z sprzężony jest optycznie z pierścieniem fazowym Ph , podobnie jak to jest w normalnych mikroskopach fazowych, to znaczy w tym przypadku obraz pierścienia Z po przejściu światła przez kondensor K i obiektyw Ob tworzy się na pierścieniu fazowym Ph . Jeżeli na drodze światła S_2 idącego z lampy R i odbijającego się od zwierciadła L_2 wstawi się w miejscu E filtr zielony to przez przysłonę D przejdzie tylko światło zielone w obszarze pierścienia Z i wtedy będziemy mieli do czynienia z obserwacją fazowo-kontrastową.

Jeżeli na odwrót w miejscu E wstawi się filtr fioletowy, to przez przysłonę przejdzie tylko światło fioletowe zdolne do wywoływania fluorescencji preparatu P . Światło fluorescencyjne zawsze jest bardziej długofalowe od światła pobudzającego fluo-

rescencję i aby go oddzielić od tego ostatniego stosuje się tak zwany filtr zaporowy G , który przepuszcza długofalowe światło fluorescencyjne a zatrzymuje światło fioletowe, podobnie jak to jest w zwykłych mikroskopach fluorescencyjnych. Jeżeli natomiast w miejscu E nie umieści się żadnego filtra, to na preparat będzie padać zarówno światło zielone, przechodzące przez pierścień Z , sprzężony z pierścieniem fazowym Ph oraz światło fioletowe przechodzące przez obszary F i wtedy będzie się równocześnie obserwować badany preparat P zarówno w świetle fluorescencyjnym jak i kontraście fazowym.

W tym przypadku natężenie światła długofalowego powinno być możliwie małe, aby nie „tłumiło” obrazów fluorescencyjnych, które z reguły są niezbyt jasne. Filtr Z powinien zatem przepuszczać stosunkowo niedużo światła długofalowego (kilka procent lub nawet ułamek procenta). Dla odróżnienia obrazów fluorescencyjnych, które w większości przypadków świecą światłem zielonym lub zielonkawo-żółtym, od obrazów fazowo-kontrastowych, dobrze jest te ostatnie obserwować w świetle o barwie wyraźnie różniące się od barwy światła fluorescencyjnego to znaczy czerwonym. W tym przypadku lepiej jest aby filtr pierścieniowy Z był wykonany jako filtr interferencyjny czerwony.

Niekiedy zanim przystąpi się do obserwacji fluorescencyjnej przeprowadza się przez dłuższy czas obserwacje w zwykłym oświetleniu lub w kontraście fazowym. Aby w takich przypadkach nie używać lampy rtęciowej R , zwierciadło L_2 jest przesuwane w kierunku strzałki v i wówczas można korzystać ze światła zwykłej mikroskopowej lampy żarowej J . Można również zwierciadło L_2 wykonać w taki sposób, że warstwa W będzie przepuszczać światło zielone, a odbijać światło fioletowe i wówczas przy przejściu od obserwacji fazowo-kontrastowej wykorzystującej światło żarówki J do obserwacji fluorescencyjnej, wykorzystującej wyłącznie światło lampy rtęciowej R nie trzeba przesuwania zwierciadła L_2 .

Ponadto w tym przypadku można równocześnie przeprowadzać obserwację fluorescencyjną korzystając z lampy rtęciowej R oraz w kontraście fazowym korzystając z lampy żarowej J . Takie rozwiązanie jest o tyle korzystniejsze od poprzedniego, że można zrezygnować z pierścieniowego filtra interferencyjnego Z , zastępując go przezroczystym pierścieniem przepuszczającym wszystkie długości fal świetlnych, a odpowiednią barwę obrazu fazowo-kontrastowego uzyskując przez wstawianie w bieg promieni świetlnych S_1 w miejscu E_1 odpowiednich filtrów barwnych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Przysłona aperturowa kondensora do urządzeń mikroskopowych do obserwacji fluorescencyjnej i fazowo-kontrastowej **znamienna tym**, że stanowi dwuskładnikowy filtr interferencyjny w którym jeden filtr (Z) o kształcie pierścienia przepuszcza maksymalnie światło długofalowe i służy do obserwacji fazowo-kontrastowej, a złączony z nim drugi filtr

(F) wypełniający pozostałe pola otworu kondensora przepuszcza światło krótkofalowe wywołujące fluorescencję.

2. Odmiana przysłony według zastrz. 1 do równo-

czesnej obserwacji fazowo-kontrastowej i fluorescencyjnej ~~zamienną~~ **zamienną** tym, że jej filtr (Z) stanowi przezroczysty pierścień przepuszczający wszystkie długości fal świetlnych.

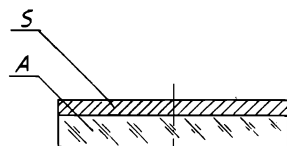


Fig. 1

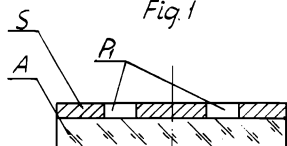


Fig. 2

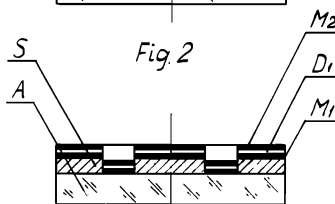


Fig. 3

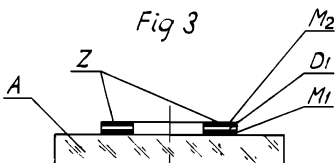


Fig. 4

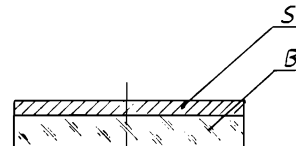


Fig. 5

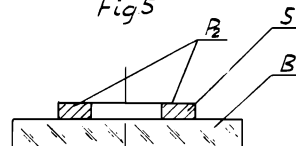


Fig. 6

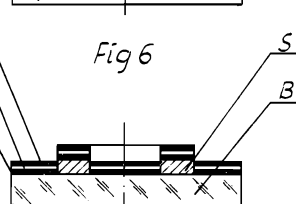


Fig. 7

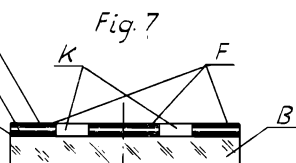


Fig. 8

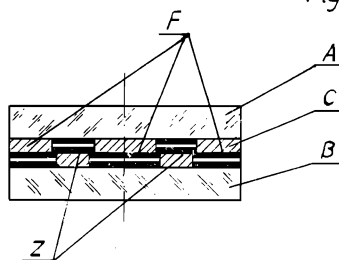


Fig. 9

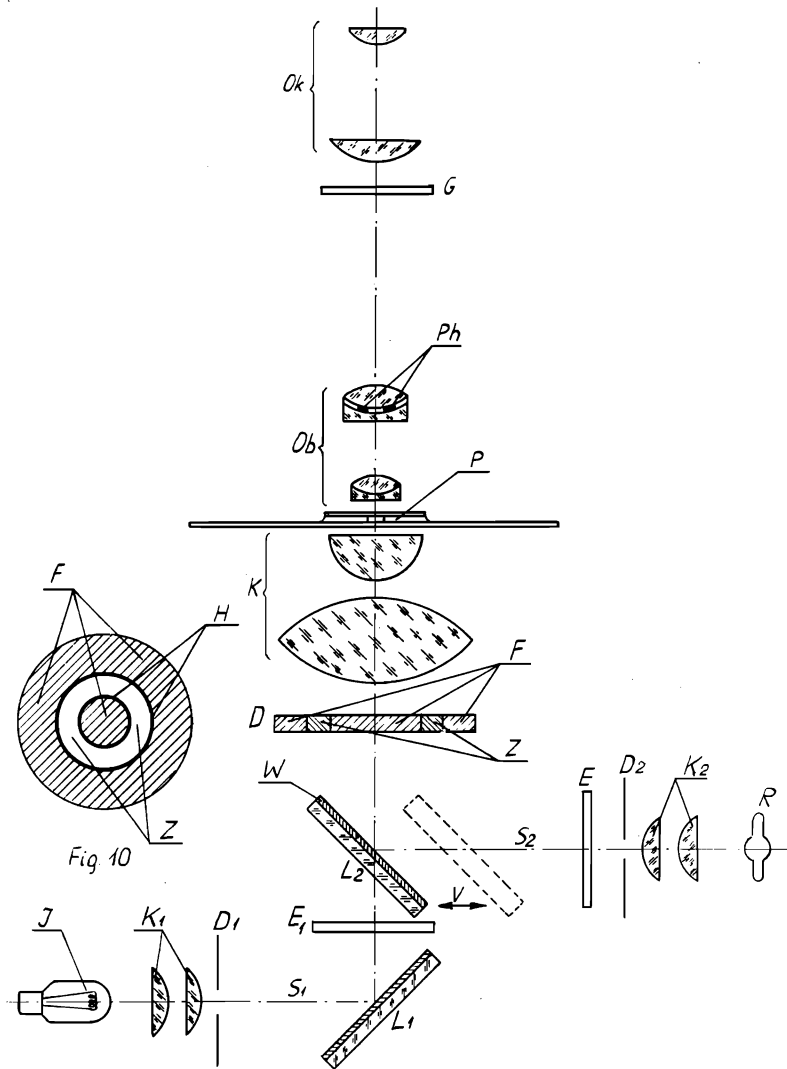


Fig. 11