



Anwendung des
C-Apochromaten 40x/1,2 W Korr
mit biologischen Präparaten
am LSM 3/4

Bedienungsanleitung

1. Aufgabenstellung

Bei der konfokalen Mikroskopie ist eine Hauptaufgabe, räumliche Strukturen in biologischen Präparaten darzustellen.

In der Regel besitzen die Proben einen Brechungsindex, der in der Nähe der Brechzahl von Wasser ($n = 1,33$) liegt. Deshalb wurde der C-Apochromat als Wasserimmersionsobjektiv entwickelt. Mit diesem Objektiv kann ein bis zu $220\ \mu\text{m}$ dickes Präparat dreidimensional untersucht werden.

Die hohen Anforderungen an die optischen Eigenschaften dieses Objektivs erfordern besondere Umsicht beim Einsatz, um die volle Leistungsfähigkeit zu nutzen.

Wichtig bei der Benutzung ist :

- die Verwendung von Deckgläsern bekannter Dicke.
- die genaue Zentrierung des Pinholes bei Einsatz am LSM.

Es müssen Deckgläser $0,17\ \text{mm}$ No.1 - H (ISO 8255/1) benutzt werden. Für genaue Messungen ist zunächst die Deckglasdicke zu bestimmen (siehe "Anleitung zur Deckglasdickenbestimmung am LSM") und danach die richtige Dicke am Korring des Objektivs einzustellen (siehe "Vorgehen beim Arbeiten mit C-Apochromat 40x/1,2 W Korr").

2. Anleitung zur Deckglasdickenbestimmung am LSM

Um die Deckglasdicke mit Hilfe des LSM 3/4 zu bestimmen, sollte wie folgt vorgegangen werden :

- Auflicht-Reflexions-Modus (keine Emissionsfilter) und Konfokal-Modus, $P = 10$ einstellen.
- Korring am Objektiv auf Deckglasdicke nach Herstellerangaben einstellen. Falls Deckglasdicke nicht bekannt, Mittenstellung auswählen ($160\ \mu\text{m}$).
- Kontrastwert auf ca. 180 stellen. Durch Fokussieren Reflex von der Deckglasoberseite suchen (erster Intensitätspeak bei Annäherung an das Präparat). Kontrast optimieren.
- Z-Line-Funktion anwählen. Parameter einstellen : "Number of Sections" = 500, "z-Intervall" = $0,4\ \mu\text{m}$, "Current Pos.Number" ≈ 460 . Die "Refractive Correction" muß auf das Verhältnis der Brechzahlen des Deckglases zum Wasser eingestellt werden, d.h. $\text{RefrCorr} = 1,51/1,33 = 1,14$. Als Ergebnis einer so ausgeführten z-Line-Messung ergibt sich die nachfolgende Abbildung. Der Intensitätspeak von der Deckglasunterseite (in der Abbildung bei ca. $214\ \mu\text{m}$) ist etwas stärker als der von der Oberseite (bei ca. $37,5\ \mu\text{m}$). Der dritte, unterste Peak (in der Abbildung bei $218\ \mu\text{m}$) stammt von der Oberseite des Objektträgers. Mit der Funktion "Measure" in der Einstellung "Ext. Rectangle" kann der Abstand der beiden Peaks, d.h. die Deckglasdicke als y-Wert direkt gemessen werden.
- Ermittelte Deckglasdicke am Korring des Objektivs einstellen. Falls die ermittelte Dicke wesentlich von der vorgegebenen Dicke abweicht, Messung mit der neuen Einstellung wiederholen.

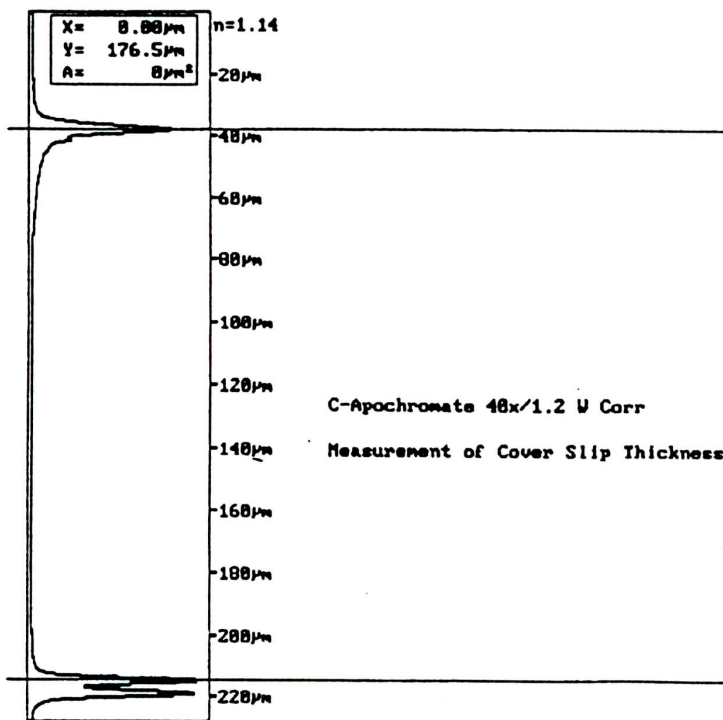
3. Vorgehen beim Arbeiten mit C-Apochromat 40x/1,2 W Korr

Der Deckglaskorrbereich beträgt (0,14...0,18) mm mit einer 2 μm Teilung und einem Überlauf von (0,13...0,19) mm. Die Korrektur gilt für Temperaturen $T_i = 23^\circ\text{C}$ (schwarze Markierung) und $T_k = 37^\circ\text{C}$ (rote Markierung).

Der Benutzer kennt die Dicke (z.B. 0,160 mm) des verwendeten Deckglases genau (Herstellerangabe oder eigene Messung) und arbeitet bei einer Temperatur $T_i = 23^\circ\text{C}$. Er stellt die schwarze Markierung unter den Strich für 0,16, fokussiert und beurteilt seine Probe. Je nach Zusammensetzung der Probe bewegt der Benutzer den Korrings in Richtung höherer Deckgläser um kleine Schritte (1 bis 2) μm und beobachtet unter Fokussierung das Bild. Er ändert die Korreinstellung solange, bis die Probe optimal in Kontrast und Auflösung erscheint.

4. Bestell-Nr. des C-Apochromaten

Die Bestell-Nr. des C-Apochromaten 40x/1,2 W Korr lautet : 44 00 52.



z-Line-Messung zur genauen Bestimmung der Deckglasdicke $y = 176,5 \mu\text{m}$

**Mikroskopie von Carl Zeiss :
Sichtbar mehr erkennen .**

Wir beraten Sie gern :



Carl Zeiss Jena GmbH
Zeiss Gruppe
Unternehmensbereich Mikroskopie
D-07740 Jena
Telefon : (0 36 41) 64-29 36
Telefax : (0 36 41) 64-31 44