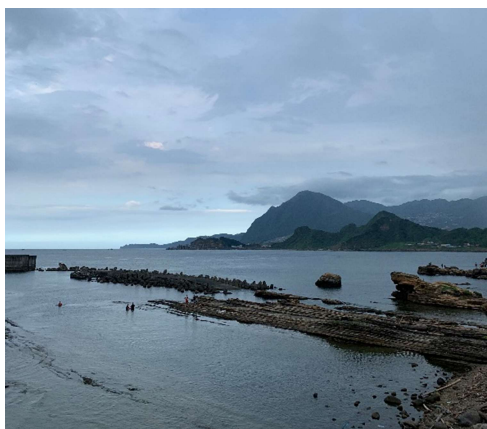


# 透明骨骼標本 個人研究紀錄

陳英翔

研究期間：2020/4～進行中



(2020/6/29 基隆潮境公園)

## 1. 研究動機

從小熱衷於生物的我，尤其成了大學生也偶爾會去基隆潮境公園附近或者東北角馬崗潮間帶捕捉海生動物做觀察。但除非有辦法提供活體完善的飼養空間，不然很難帶回去做長期的觀察。

在最近一次去士林科教館參觀的時候，偶然在生物的標本展示區看到了所謂的「透明骨骼標本」，由海洋大學所提供。當下的我非常感動，竟然有辦法將活體生前的組織完整留下，並將其硬骨與軟骨染上不同顏色，清楚的觀察到骨骼的結構。所以我起了很強烈的興趣，想要試著自己去實作。

## 2. 製作原理

透明骨骼標本的主要原理是『將樣本的肌肉、結締等組織固定之後，硬骨染上紅色染劑，軟骨染上藍色染劑，最後把組織內所含的蛋白質做分解，將樣

本含的水分用甘油做置換後就能清楚觀察其內部的骨骼組織』。

硬骨與軟骨的染色部分是使用二重染色法的技術。硬骨的染色劑是使用茜紅素，它會與硬骨內的磷酸鈣做結合，呈現紫紅色。軟骨的染色劑是使用亞里西安藍，它會與軟骨內的硫酸軟骨素做結合，呈現藍色。因為亞里西安藍的成本較高且較難入手，故軟骨染色的部分可自行選擇是否要納入。

組織的固定可以使用福馬林或者乙醇。單純討論固定力的話無疑是福馬林比較強，但是乙醇固定的話樣本滲透藥劑的速度會比較快，可以縮短標本的製作時間。較小的樣本(5cm 以內)可選擇使用酒精或者乙醇固定，較大的樣本(5cm 以上)需使用福馬林固定，原因是越大的樣本浸泡藥劑的時間會越長，為了防止樣本在製作過程中崩壞，使用固定力較強的福馬林較為佳。

組織的透明化有兩種方式，第一種是使用蛋白酶，除非擁有完善的實驗設備，不然本人不建議使用。蛋白酶是來自生物體內的分解酵素，在使用上得做精密的溫度調節，而且價格昂貴。所以一般是建議第二種方式，使用氫氧化鉀，成本較低且較好入手。透明化的最後一個步驟是使用甘油置換組織內的水分，使組織幾乎呈現完全透明，並可以清楚的觀察其內部的骨骼結構。

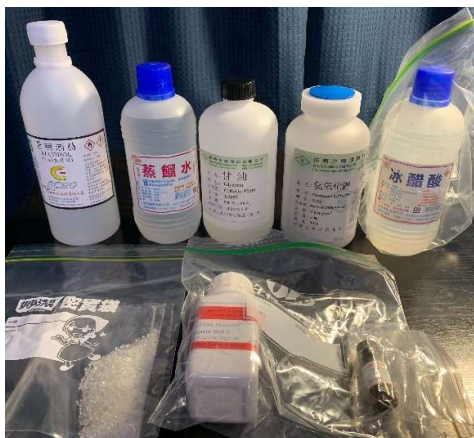
### 3. 實驗過程

#### (一)所需藥劑

○→只做硬骨染色時所需的

●→加做軟骨染色時需額外準備的

- 福馬林 【樣本的固定】※劇毒
- 茜紅素 【硬骨染色劑】
- 甘油 【組織透明化、封裝】
- 百里酚 【防腐劑】
- 氫氧化鉀 【染色劑調整、組織透明化】※劇毒
- 蒸餾水 【藥劑濃度調整】
- 亞里西安藍【軟骨染色劑】
- 無水乙醇 【脫水、染色劑調整】
- 冰醋酸 【軟骨染色劑調整】



(所需藥劑)



(自備工具)

#### (二)製作程序

※只做硬骨染色⑤~⑦可省略

##### ①樣本選定

製作透明骨骼標本較適合小型的樣本(10cm 以內)，藥劑消耗量較少且製作

時程不會過長。本人目前所使用的樣本皆是 10cm 以內的魚類活體，原因是小型魚類體內的脂質含量低，因此製作時可以省去脫脂的程序。不只魚類，爬蟲類、兩棲類、鳥類、哺乳類、甲殼類動物皆可以製作透明骨骼標本，後續的製作程序以魚類樣本為主。



(於基隆潮境公園採集的魚類)

##### ②樣本固定

本人魚類樣本偏好使用 10%福馬林做固定，較小的樣本(5cm 以內)浸泡約 3~5 天，較大的樣本(5cm 以上)建議浸泡一周以上。

##### ③樣本水洗

為了防止樣本裡有殘留的福馬林，需在水(自來水即可)中浸泡一天

##### ④樣本處理

為了有效的滲透藥劑，需要清除樣本的表皮以及鱗片。在去除表皮的時候要小心，本人技術還未熟練時，好幾次連帶魚鰭一起剝下來。內臟的部分，較小的樣本(5cm 以內)可自行選擇是否要留下，較大的樣本(5cm 以上)建議要清除內臟，以利藥劑的滲透。眼球的部分可以自行選擇是否留下，因為很難辦到完全脫色，本人基本上是會清除。

#### ⑤樣本脫水

為了使接下來的軟骨染色劑好滲透，先在 50%乙醇浸泡一天，再於無水乙醇浸泡一天，完成脫水。

#### ⑥軟骨染色

準備 無水乙醇:冰醋酸=1:4 的水溶液，加入亞里西安藍(非常少量即可)，浸泡樣本一天的時間。

#### ⑦樣本脫色

為了去除樣本內多餘的亞里西安藍，先在無水乙醇浸泡一天，再於 50%乙醇浸泡一天，完成脫色。

#### ⑧樣本透明化

第一次的透明化是在硬骨染色之前，令樣本浸泡於 2%的氫氧化鉀溶液，時間約一周至一個月，樣本透明程度到可稍微透視骨骼結構即可停止。注意，若溶液呈現混濁需重新更換。第一次的透明化之後，樣本會變得越來越脆弱，所以後續的操作務必要謹慎。

#### ⑨硬骨染色

準備 2%氫氧化鉀溶液，接著開始加入茜紅素(非常少量即可)，加到溶液的顏色不再變深，這時候溶液會呈現暗紫色。因為茜紅素的染色力很強，基本上浸泡 1~2 小時就夠了，假如偏好染出更深的顏色，可以浸泡約一天，但是超過一天樣本可能會受損。



(剛從硬骨染色劑中取出後的樣子)

#### ⑩樣本透明化

第二次的透明化是將樣本浸泡於 1%的氫氧化鉀溶液中，去除多餘的茜紅素。至於浸泡時間，若發現樣本已經停止變化，須立即進入下個步驟，不然軀體可能會瓦解。時間可能為一周至兩個月。一樣若溶液呈現混濁需重新更換。



(剛放入 1%氫氧化鉀溶液)

#### ⑪甘油置換

將 1%氫氧化鉀溶液與甘油的比例以 1:1、1:2、0:1 的順序浸泡，只要樣本完全下沉至底部，即可更換至下一組比例的溶液。



(甘油置換的過程)

#### ⑫封裝

使用適當大小的樣本瓶，倒入甘油並將樣本放入，最後加入少量的百里酚即封裝完成。注意，甘油會熱漲冷縮，故樣本瓶不須裝到全滿。



#### 4. 實驗成果



慈鯛科（於觀賞魚專賣店回收的魚屍體）



種類不明（於觀賞魚專賣店回收的魚屍體）



種類不明（於觀賞魚專賣店回收的魚屍體）



海螳螂（於基隆潮境公園採集）



紅螯螳臂蟹（於基隆潮境公園採集）

## 5. 實驗檢討

### (一)

目前軟骨染色的部分進行的不是很順利，當初認為是浸泡硬骨染劑的時間太久，導致茜紅素覆蓋了軟骨的部分，但是經過查證，不管浸泡硬骨染劑一小時還是一天都沒看到軟骨的染色痕跡，因此得出結論問題是出在軟骨染色劑溶液的調配，可能需要增加亞里西安藍染劑的量或者針對無水乙醇與冰醋酸的比例作調整。

### (二)

製作透明骨骼標本有一個很大的課題，那就是該如何處理留在樣本內的氣泡。這個問題困擾了我很久，不管製作過程多小心，難免還是會有氣泡的產生，目前我是使用針筒將氣泡一個個吸出來，但這是侵入性的操作，導致很容易傷害到樣本。因此目前正在尋找是否還有更好的解決方案。

### (三)

製作到目前為止，本人嘗試過兩次接近10cm的魚類樣本，但是都在還未完全透明之前就開始崩壞。日後為了防止再度發生，可以試著在透明化時降低氫氧化鉀的濃度，或者在處理樣本時在軀體留下幾道割痕，以利後續藥劑的滲透。

## 6. 進度規劃 & 目標

目前只有著手於魚類，接下來想挑戰兩棲類的蛙類以及哺乳類的幼齡期實驗小鼠。至於軟骨染色的部分，會先持續使用魚類的樣本作實驗。

本人的最終目標是將二重染色後的樣本使用環氧樹脂製作出一個完整的「封膜透明骨骼標本」。因此還有堆積如山的課題等著我去解決。

## 參考文獻

身近な動物個体を用いた透明骨格標本の作製

表 潤一・斉藤千映美

<http://www.eec.miyakyo-u.ac.jp/blog/data/kiyou17/05.pdf>

改良二重染色法による魚類透明骨格標本制作

河村功一・細谷和海

<http://www.bio.mie-u.ac.jp/~kawa-k/BNRIA1991.pdf>

クラブ活動（ネイチャー部）における小型脊椎

動物の透明骨格標本作製 およびその樹脂封入標

本化の試み（初年度報告）

牧野 正明

[https://www.nakatani-foundation.jp/wp-content/uploads/k42\\_h27.pdf](https://www.nakatani-foundation.jp/wp-content/uploads/k42_h27.pdf)

理学教育と道德教育を科学するふたばのブログ

透明骨格標本を作ってみた

<https://futabagumi.com/archives/12817.html#i-3>

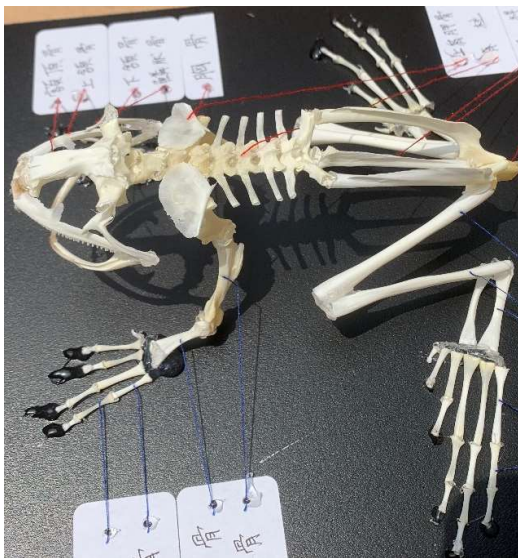
## 其他種類標本 實驗紀錄



牛蛙骨骼標本製作過程



印尼金鍬的封膜標本(未完成)



牛蛙骨骼標本(製作時程約 10 小時)