

# アラルダイト (araldit) による包埋、封入

ITO Kei, 1991 October

- ・アラルダイトは室温で数日、63 ~ 65 °C で一晩で固まる。
- ・封入、包埋、割れた茶碗の修理など多目的に使い、光学的にも透明。
- ・分注に便利なように、10-50cc のディスポシリンジに小分けして、-20 °C で凍らせて保存する。  
(ストックの作り方は4節参照)
- ・使用前に室温にしばらく出して置いて、融けたら使用し、また凍らせておく。
- ・重合前の液は発ガン性があるので、取扱い注意。手などについたら、アセトンで拭く。
- ・使用後のアラルダイトのついたゴミ類は、63 °C で一晩以上おいて重合させた後、危険物扱いで捨てる。  
日本での取り扱い：応研商事 (Tel: 03-3571-2879, 03-3572-0979)

## 1 ホールマウント封入 キャピラリー:

- ・脳、CNS、Embryo など、小さな標本に便利。
- ・顕微鏡下で horizontal, sagittal に向きを変えて観察できる。
- ・キャピラリーはとても小さいので、なくしやすい。
- ・観察には油浸レンズが適している。乾燥系レンズの場合、キャピラリーの上にカバーガラスを置くと良い。

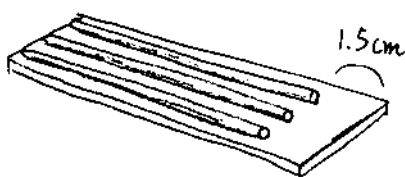
### ガレージ

- ・キャピラリーの保存用。
- ・外径1 mm、内径0.65 mm の太いキャピラリーを、ヤスリやガラス切りで60 mm 程度に切る。
- ・スライドグラスに、アラルダイトを2~4ヶ所たらす。
- ・切ったキャピラリー2~4本を、たらしたアラルダイトの上に置く。(一方の端を1.5 cm、他端を5 mm 程度あける。)
- ・60 ~ 65 °C で一晩置く。
- ・アラルダイトがキャピラリーとガラスの間に広がって、しっかり固定する。

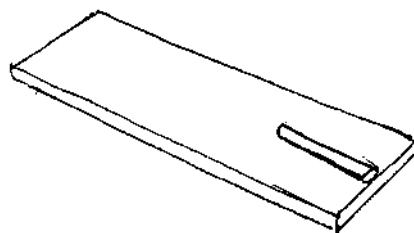
### 観察用ホルダー

- ・外径1 mm 程度のガラスキャピラリーかシリコン/プラスチックチューブを、1~1.5 cm の長さに切る。(シリコンやプラスチックの方が対物レンズにぶつかったとき傷つけないのでよい。)
- ・スライドグラスのはしに、長辺に平行にアラルダイトではりつける。

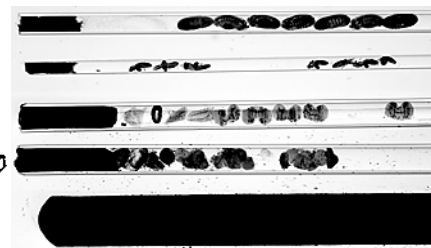
ガレージ



観察用ホルダー



上より embryo、1 令幼虫 CNS、3 令幼虫 CNS、成虫脳、シャーペンの芯

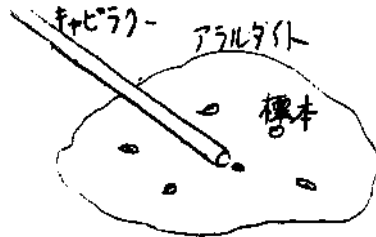


### 標本の封入

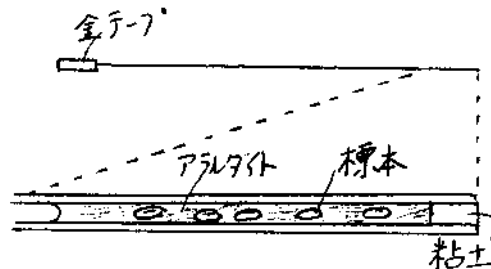
- ・用意するもの：極細キャピラリー、粘土、メタル粘着テープ (金色のセロテープ)

外径	内径	長さ	材質	ヒルゲンベルク社カタログ番号	用途
0.20 mm		65 mm	ボロシリカート	特注	1 令幼虫 CNS
0.25 mm	0.20 mm	65 mm	ボロシリカート	#1421602	胚全体、3 令 vnc
0.30 mm	0.24 mm	65 mm	ボロシリカート	#1421603	大きな胚、3 令脳
0.35 mm	0.28 mm	65 mm	ボロシリカート	#1421604	成虫脳

- ・チップの先を大きく切ったピペットマンで、標本とアラルダイトを、エッペンドルフからスライドガラスに移す。  
(アラルダイトは非常に粘度が高いので、チップの先は直径 3~4 ミリ位に大きく切る。)
- ・極細キャピラリーを1本、折れないように注意して持つ。
- ・実体顕微鏡でみながら、先をアラルダイトに入れてしばらく待つ。  
毛細管現象で、アラルダイトがキャピラリーの中に入って行く。  
いきなり先を標本にあててはいけない。



- ・アラルダイトが1~2ミリ程度入ったら、管の先を標本にあてる。  
毛細管現象で標本がゆっくりと管の中に入ってゆく。
- ・5, 6ヶの標本を吸う。
- ・アラルダイトをさらにある程度吸う。  
アラルダイトの表面は、管の先から5~10ミリまで達する。  
アラルダイトの表面と管の先端部は光学的に問題があるので、標本を置かないようにする。
- ・アセトンをしませたチリ紙で、キャピラリー表面のアラルダイトを拭き取る。  
表面にアラルダイトが付いていると硬化後固いコブができて、顕微鏡対物レンズを傷つける。
- ・キャピラリーの標本の入っている方の先を、粘土に数ミリ突き刺す。(「デンタルワックス」が良い)  
管をぐるぐると回しながら抜き取る。  
管の先に粘土が詰まって、栓になる。



- ・メタル粘着テープ(金テープ)を数ミリの幅に切って、管の標本の入ってない方の端に貼る。  
瞬間接着剤を一滴テープの上にとらし、キャピラリーとしっかり固定する。  
このテープは、顕微鏡下でキャピラリーを回すときのつまみ、兼、床に落としたときの目印になる。
- ・スライドガラス上に油浸観察用オイルを一滴とらし、そこにキャピラリーを一瞬漬ける。
- ・管を折らないように注意しながら、つまみを持って、ガレージの中にしまう。  
(油浸レンズ用の油によって、キャピラリーがガレージの内壁にくっつく。油がないとキャピラリーが抜け落ちてしまう。)
- ・ガレージ裏側に小さなラベルを貼り、中身を書いておく。

#### 観察

- ・標本の入ったキャピラリーを観察ホルダーに入れる。油浸用の油をたらし。
- ・10倍程度のレンズで、標本の位置を合わせる。
- ・ステージを下げる。(重要！)  
ステージを下げずにレンズターレットを回すと、レンズの先がホルダーのキャピ

ラリーにぶつかり、レンズを痛めてしまう。あくまで基本操作に忠実に。

- ・高倍の油浸レンズに替える。
- ・ステージを上げて、ピントを合わせる。
- ・ボールペンの先などで、金テープのつまみを回し、標本を好みの向きにする。
- ・観察後は、レンズの油をきれいに拭いておく。

低倍の乾燥系レンズで写真撮影するときは、キャピラリーの上にカバーガラスをのせると像のゆがみが少ない。

## 2 ホールマウント封入 スライドグラス:

- ・チップの先を大きく切ったピペットマンで、標本とアラルダイトを、エッペンドルフからスライドグラスに移す。

(アラルダイトは非常に粘度が高いので、チップの先は直径2~3ミリ位に大きく切る。)

- ・実体顕微鏡でみながら、細いタングステン針で標本と微量のアラルダイトをすくい取り、カバーガラスの上に標本が裏返しになるように、きれいに点々と並べる。



- ・針の先で標本の向きを整え、63°Cで3時間ほど置く。
- ・アラルダイトが固くなってきたら、カバーガラス上の標本の向きを針で最終的に調整する。
- ・スライドグラスの左右に2枚のカバーガラスを貼り、スペーサーにする。そのあいだにアラルダイトをたらし、隙間にうまく標本が来るようにカバーガラスを裏返して載せる。

とても小さな標本の場合は、スペーサーは必要ない。

あとからのせたアラルダイトが、カバーガラス中に広がらなくても良い。

- ・63°Cで一晩置く。

温度が上がる過程でアラルダイトの粘度が下がり、カバーガラス中に広がる。

カバーガラスを裏返したため、標本はカバーガラスの直下に位置している。高倍レンズでも観察しやすい。

## 3 semithin 切片:

### 固定

semithin 標本は大きなものは作れない。卵、幼虫神経系、成虫原基位の大きさが  
適当。大きなものは解剖して、必要な組織のみ固定、包埋する。

前固定 : 6% GA (Glutaraldehyd) / PBS 4°C、数時間

洗浄 : PBS 10分

固定 : 2% オスミウム (OsO<sub>4</sub>) / PBS 4°C、一晩 (遮光する)

洗浄 : PBS 数回

オスミウムの蒸気は角膜を固定するので、必ずドラフト中で扱うこと。

ストック液は4%のを作り、ネジ蓋をした上でパラフィルムで蓋を密封し、他の容器に入れて遮光して4°C保存。  
廃液の処理に注意。

ホルマリンやGDAで固定後、酵素抗体法、*lacZ* Stainingで染めた標本は、水洗完了後  
前固定無しでオスミウムで固定し、包埋できる。

### 包埋

アルコール系列 30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 100% 各 15分 (エッペンドルフ)

キシレンで透徹 15分 2回

5-10ccのスπιツチューブにアラルダイトとキシレンを等量ずつ入れ、蓋を  
してよく振る。この液は-20°Cで保存可能。

こうして作った50%アラルダイトで、室温、6時間~一晩。

先を大きく切ったピペットマンで、アラルダイトの液ごと肉池、血液凝固盤などに移す。



血液凝固板

ドラフト中で一晩おいて、キシレンを飛ばす。

肉池などに100%アラルダイトを入れ、50%中の標本を一つずつ細い針ですくって移す。

(表面張力で、うまくすくい取れる)。

室温、8-12時間。

電子顕微鏡標本用のシリコン製型枠に新しいアラルダイトを入れ、標本を針で移す。

48°C、12時間

48°Cに入れて数時間のところで型枠を取りだし、標本の向きを改めて修正する。

65°C、36時間

インキュベーターから取りだし、冷えたら出来上がり。

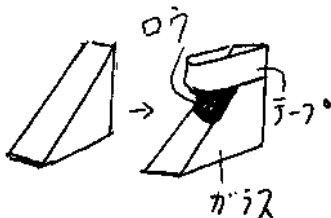
### 切片作成

電子顕微鏡切片作成に準ずる。

ガラスナイフ作成機で、刃の角度45°のガラスナイフを作る。(最も標準的なナイフ)

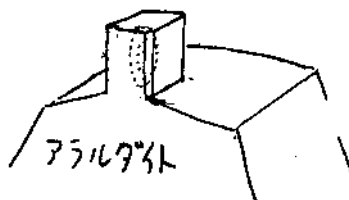
幅7ミリほどのアルミテープで、刃の先に「舟」を作る。

ロウソクの口を舟とガラスの境界にたらし、水が漏らないようにする。



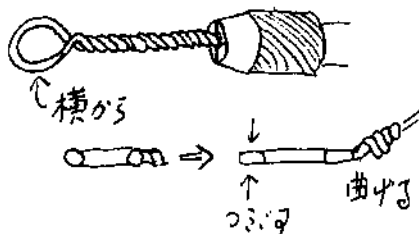
刃をウルトラマイクロームにセットする。

包埋した標本を型枠から取りだし、実体顕微鏡下で、カミソリの刃で標本の回りを正方形にトリミングする。1~2mm角が便利。向きを知るため、正方形の一頂点を小さく斜めに切っておく。



細い銀線、白金線をパスツールの細いところに一回巻き付け、そのままねじって、先に半径数ミリの輪を作る。これを柄付き針の柄にセットする。

輪の部分の針金をペンチで平たくしておくといよい。



実体顕微鏡の下にホットプレートを置き、65°Cにセットする。

その上に新しいスライドガラスを置き、そこにピントを合わせる。

ガラスナイフの舟に水を一杯に入れ、セットした標本を1μmの厚さの切片に切る。

切片はリボン状になって、水面に浮かぶはずである。

風が一切吹かないよう、部屋の扉、窓は閉める。

切片を何枚か切ったら、できたりボンのまわりの水面に、針金の輪を静かに置く。  
そのまま輪を持ち上げると、リボンは表面張力で輪の中に張った水の中にある。



輪をスライドガラスの上に持ってきて、顕微鏡でみながら適当な場所に置き、細く  
先を鋭角に切った濾紙で縁から水を吸うと、切片は熱でシワが伸びて、ガラスの上に貼り付く。  
切片を作り終わったら、65°Cで1時間程度置いて、よく乾燥させる。

#### 染色

トルイジンブルー、メチレンブルー混合染色が一般的。  
パラフィン切片のように、アルコール系列を通したり、透徹したりしなくてもよい。

#### 原液

##### 1: メチレンブルー

0.5g Borax (Na-tetraborat) を 30ml H<sub>2</sub>Oに溶かす。

0.5g Methylene blueを加える。

fill up to 50ml with H<sub>2</sub>O

ろ過して、室温保存。

##### 2: トルイジンブルー

0.2% Toluidine Blue / H<sub>2</sub>O (0.1g/50ml)

溶けたらそのまま室温保存。

使用時に、原液1、原液2、水を、1:1:18で混ぜる (つまり、各5%)。

ホットプレートを、65°Cにする。

切片の並んだスライドガラスを、乾いたままホットプレートにのせる。

染色液をスライドガラスの上にたらし、抗体反応の時のように液を盛り上げる。

乾燥しないよう、大きなシャーレー等で蓋をして、3-5分。

水道水でよく洗ったあと、蒸留水でちょっと洗う。

乾燥させる。

96穴タイタープレートの蓋などに染色液を入れ、65°Cにして、そこにスライド

ガラスを数分間ひたす方法もある。この方が実験条件の再現性がよい。

染色が薄かったら、もう一度繰り返す。

#### 封入

アラルダイトを少し、切片ののったスライドガラス上にたらし。

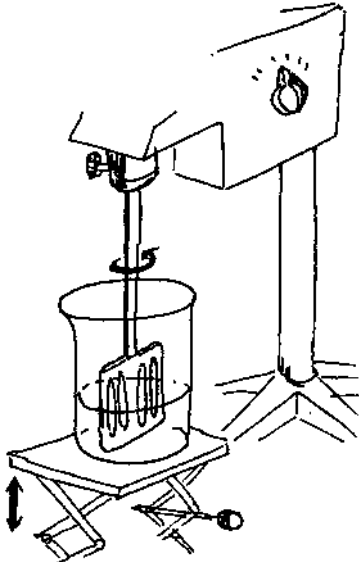
カバーガラスをのせる。アラルダイトがカバーガラス中に広がらなくても良い。

65°Cで一晩置く。

温度が上がる過程でアラルダイトの粘度が下がり、カバーガラス中に広がる。

## 4 アラルダイトストックの作り方

Araldit CY 212	(Serva, #13824, 1 kg)
Araldit hardener HY 964	(Serva, #13826, 1 kg)
Araldit softener (Phtalic Acid Dibuthyl Ester: PADE)	(Serva, #32805, 250 ml)
Araldit Beschleuniger DY 964	(Serva, #13825, 100 g)



### For semi-thin sectioning

**100 ml Araldit CY 212** into a 500 ml glass cup.

Add **100 ml Araldit hardener HY 964** slowly.

Put the rotor of a low-speed electric mixer in it.

Let the mixer slowly rotate for at least **2 hrs.** (avoid making bubbles in the solution.)

Add **10 ml Softener PADE** very slowly (drop by drop) with the mixer rotating.

Adding as little as 500 ul at once will result in uneven solution,  
which is not usable any more.

Mix for another **15 min.**

Add **5 ml Beschleuniger DY 964** very slowly (drop by drop).

Mix for another **30 min.**

Aliquot the Araldit in 10-20 ml disposable syringe.

Store frozen at -20°C.

### For whole-mount preparation

Softener PADE is not needed. Mix CY 212, HY 964, and DY 964 in this order.

Araldit for semi-thin sectioning is also applicable to whole-mount preparation, although it costs a bit more.

\*\*\*

Araldit monomer is harmful. Use gloves while handling. Wipe out with acetone in case of an accident.

Beschleuniger is a highly volatile material; work in a draft chamber.

After use, wipe the glass cup and mixing rotor with acetone and keep them at 63°C over night until remaining araldit become polymerized.