

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 3 月 7 日 (07.03.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/045482 A1

(51) 国际专利分类号:

C12M 1/22 (2006.01) *C12M 1/24* (2006.01)
C12M 1/42 (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/073078

(22) 国际申请日: 2023 年 1 月 19 日 (19.01.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202211056138.4 2022年8月30日 (30.08.2022) CN

(71) 申请人: 苏州大学 (SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省苏州市相城区经济学路
8号, Jiangsu 215000 (CN)。

(72) 发明人: 黄海波 (HUANG, Haibo); 中国江苏省苏州
市相城区经济学路 8 号, Jiangsu 215000 (CN)。 梅
世亮 (MEI, Shiliang); 中国江苏省苏州市相城区

经济学路 8 号, Jiangsu 215000 (CN)。 苗胜 (MIAO,
Sheng); 中国江苏省苏州市相城区经济学路 8 号,
Jiangsu 215000 (CN)。 庞焱 (PANG, Yan); 中国江
苏省苏州市相城区经济学路 8 号, Jiangsu 215000
(CN)。 姜德胜 (JIANG, Desheng); 中国江苏省苏
州市相城区经济学路 8 号, Jiangsu 215000 (CN)。
陈立国 (CHEN, Ligu); 中国江苏省苏州市相城
区经济学路 8 号, Jiangsu 215000 (CN)。

(74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司 (UNITALEN ATTORNEYS AT LAW CO., LTD.);
中国北京市朝阳区建国门外大街 22 号赛特
广场七层, Beijing 100004 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,

(54) Title: COMBINED ACTIVATION APPARATUS AND METHOD FOR EARLY EMBRYOS

(54) 发明名称: 一种早期胚胎的联合激活装置和方法

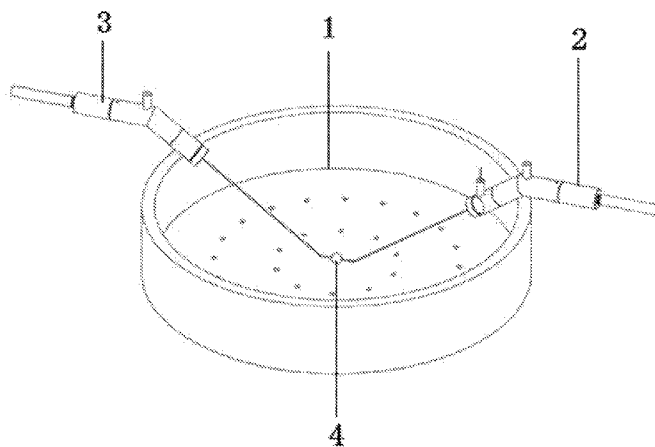


图 1

(57) Abstract: The present application provides a combined activation apparatus for early embryos. The apparatus comprises: a culture dish for storing the early embryos; a cell-holding mechanism for adjusting the posture of the early embryos and fixing the early embryos; and a combined activation mechanism, comprising a capillary micro-needle and a first needle-holding instrument. The capillary micro-needle comprises a liquid metal channel and a chemical substance channel; a liquid metal and a wire are arranged in the liquid metal channel to form a liquid-state metal electrode for electrically activating the early embryos; the chemical substance channel is used for releasing chemical substances to chemically activate the early embryos. The combined activation mechanism integrates two functions of electrical activation and chemical activation, so that the convenience of combined activation of the early embryos is improved; the capillary micro-needle can achieve the accurate combined activation of local parts such as a nuclear substance region of a single early embryo, so that excessive electrical damage or chemical damage to other parts of the early embryos is reduced, thereby improving the activation rate of the early embryos.

IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 本申请提供一种早期胚胎的联合激活装置,包括:培养皿,用于存放早期胚胎;细胞吸持机构,用于调整早期胚胎的位姿,并固定早期胚胎;联合激活机构,该联合激活机构包括毛细微针和第一持针仪,毛细微针包括液体金属通道和化学物质通道;该液体金属通道内设有液体金属和导线构成液态金属电极用于对早期胚胎进行电激活;该化学物质通道用于释放化学物质对早期胚胎进行化学激活。该联合激活机构集成了电激活和化学激活两种功能,提高对早期胚胎联合激活的便捷性,毛细微针可实现对单个早期胚胎局部部位如核物质区域的精准联合激活,减少对早期胚胎其他部位过度的电损伤或化学损伤,从而提升早期胚胎激活率。

一种早期胚胎的联合激活装置和方法

本申请要求于 2022 年 08 月 30 日提交中国专利局、申请号为 202211056138.4、发明名称为“一种早期胚胎的联合激活装置和方法”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

5 技术领域

本申请涉及胚胎工程技术领域，特别是涉及一种早期胚胎的联合激活装置和方法。

背景技术

10 在胚胎工程技术中，在早期胚胎显微操作流程的各个阶段进行早期胚胎激活是一种常用手段。在自然受精过程中，卵母细胞的细胞质激活是由精子的进入并诱导钙振荡来完成的。而在孤雌激活(PA)、胞浆内单精子注射(ICSI)、体细胞核移植中，卵母细胞的人工辅助激活是必不可少的。目前已知的人工辅助激活方式主要分为单一激活和联合激活。常用的单一激活
15 主要有机械激活、电激活、化学激活（钙离子载体 A23187、离子霉素（Ionomycin）及乙醇等）；联合激活主要是先单纯的物理激活或化学激活，之后再用蛋白质合成抑制剂、蛋白质磷酸化抑制剂或细胞松弛素 B 联合处理的一种激活方式。现在越来越多的研究证明联合激活比单一的电激活或化学激活效果好。

20 目前，常用的联合激活是先对早期胚胎进行电激活然后再将早期胚胎浸泡在包含化学物的溶液中以对早期胚胎进行化学激活，装置较为粗糙，精度很低。电激活是使用具有两块平行板电极的激活室来对一批早期胚胎进行电激活，由于宏观平行板电极的间距较大，针对单个早期胚胎的施加电刺激电压也较大并且分布不够均匀，极易对胚胎造成过度电损伤，并且
25 无法完成对早期胚胎特定部位实施精准电刺激；无法用一套激活装置完成对早期胚胎的电激活和化学激活的联合激活流程。

因此，如何实现对早期胚胎的特定部位进行刺激，以及实现一套激活装置完成对早期胚胎的联合激活，提高早期胚胎激活率是本领域技术人员

亟需要解决的问题。

发明内容

本申请的目的是提供一种面向早期胚胎的联合激活装置和方法，用于
5 实现对早期胚胎的特定部位进行包括电刺激和化学刺激在内的联合刺激，
以及实现一套激活装置完成对早期胚胎的联合激活，从而提高早期胚胎激
活率。

为解决上述技术问题，本申请提供一种早期胚胎的联合激活装置，包
括：

10 培养皿，用于存放早期胚胎；
细胞吸持机构，用于调整所述早期胚胎的位姿，并固定所述早期胚胎；
联合激活机构，所述联合激活机构包括毛细微针和第一持针仪，所述
毛细微针与所述第一持针仪连接；所述毛细微针包括液体金属通道和化学
物质通道；所述液体金属通道内设有液体金属和导线，所述液体金属位于
15 所述毛细微针尖端，所述导线用于连接激励电源，所述液体金属和所述导
线构成液态金属电极用于对所述早期胚胎进行电激活；所述化学物质通道
用于释放化学物质对所述早期胚胎进行化学激活。

优选地，所述毛细微针包括多个所述液体金属通道和一个所述化学物
质通道，多个所述液体金属通道围绕一个所述化学物质通道设置。

20 优选地，所述培养皿的底部设有阵列的微坑，所述微坑用于防止所述
早期胚胎的移动。

优选地，所述第一持针仪包括第一旋盖、第二旋盖、第一连接座、第
三旋盖和第一固定杆；

所述第一旋盖与所述第二旋盖螺纹连接，所述第二旋盖、所述第三旋
25 盖均与所述第一连接座螺纹连接，所述第一固定杆与所述第三旋盖螺纹连
接；

所述毛细微针尾部贯穿所述第一旋盖和所述第二旋盖，所述第一连接
座设有气压驱动入口，所述毛细微针中的所述化学物质通道与所述气压驱
动入口连通。

优选地，所述细胞吸持机构包括细胞吸持针和第二持针仪，所述细胞吸持针与所述第二持针仪连接，所述第二持针仪上设有导气口，所述导气口与所述细胞吸持针连通。

优选地，所述液体金属通道的直径为 $7\mu\text{m}$ 。

5 优选地，所述化学物质通道的直径为 $10\mu\text{m}$ 。

优选地，所述细胞吸持针的内径为 $15\mu\text{m}$ ，外径为 $100\mu\text{m}$ 。

优选地，所述微坑直径为 $150\mu\text{m}$ ，深度为 $50\mu\text{m}$ 。

本申请还提供一种早期胚胎的联合激活方法，应用于所述的早期胚胎的联合激活装置，包括：

10 在细胞吸持机构固定早期胚胎之后，控制联合激活机构向所述早期胚胎的目标部位持续通入高压直流脉冲，以对所述早期胚胎进行电激活；

在所述早期胚胎经过电激活后，控制所述联合激活机构释放化学物质以对所述早期胚胎进行化学激活。

本申请所提供的一种早期胚胎的联合激活装置，包括：培养皿，用于存放早期胚胎；细胞吸持机构，用于调整早期胚胎的位姿，并固定早期胚胎；联合激活机构，联合激活机构包括毛细微针和第一持针仪，毛细微针与第一持针仪连接；毛细微针包括液体金属通道和化学物质通道；液体金属通道内设有液体金属和导线，液体金属位于毛细微针尖端，导线用于连接激励电源，液体金属和导线构成液体金属电极用于对早期胚胎进行电激
15 活；化学物质通道用于释放化学物质对早期胚胎进行化学激活。本申请的毛细微针可实现对单个早期胚胎局部部位如核物质区域的精确联合激活，减少对早期胚胎其他部位过度的电损伤或化学损伤，从而提升早期胚胎激活率；并且一个联合激活机构集成了电激活和化学激活，提高对早期胚胎联合激活的便捷性；细胞吸持机构可快速调整细胞的位姿，缩减时间，减
20 少因调整细胞位姿而导致细胞死亡或者停滞发育的因素。
25

本申请实施例所提供的一种早期胚胎的联合激活方法与装置对应，效果如上。

附图说明

为了更清楚地说明本申请实施例，下面将对实施例中所需要使用的附图做简单的介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本申请的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

- 5 图 1 为本申请实施例提供的一种早期胚胎的联合激活装置的结构图；
图 2 为本申请实施例提供的一种培养皿的结构图；
图 3 为本申请实施例提供的一种联合激活机构的结构图；
图 4 为本申请实施例提供的一种毛细微针的针尖结构图；
图 5 为本申请实施例提供的一种毛细微针的针尖横截面示意图；
10 图 6 为本申请实施例提供的一种毛细微针的内部结构图；
图 7 为本申请实施例提供的一种毛细微针针尖的工艺制备流程图；
图 8 为本申请实施例提供的一种细胞吸持机构的结构图；
图 9 为本申请实施例提供的一种早期胚胎的联合激活方法的流程图；
附图标记如下：1 为培养皿、2 为联合激活机构、3 为细胞吸持机构、
15 4 为细胞、101 为微坑、201 为毛细微针、202 为第一旋盖、203 为第二旋盖、204 为第一连接座、205 为第三旋盖、206 为第一固定杆、207 为气压驱动入口、208 为导线出口、209 为第一环形垫圈、210 为第二环形垫圈、211 为化学物管道、2011 为液体金属通道、2012 为化学物质通道、2013 为导线、301 为细胞吸持针、302 为第四旋盖、303 为第五旋盖、304 为第二
20 连接座、305 为第六旋盖、306 为第二固定杆、307 为导气口、308 为气体管道、309 为第三环形垫圈、310 为第四环形垫圈、A 为毛细微针的针尖、B 为细胞吸持针的针尖。

具体实施方式

- 25 下面将结合本申请实施例中的附图，对本申请实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本申请一部分实施例，而不是全部实施例。基于本申请中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下，所获得的所有其他实施例，都属于本申请保护范围。

目前,有关哺乳动物早期胚胎激活的研究已经做了很多,方法由原来的单一激活到现在的各种方法的联合使用,已取得了一定的进展。电激活是常用的激活方法,因该方法具有操作方便、激活率高和无化学毒副作用等特点而被广大研究者所青睐。电激活的原理是早期胚胎在短暂高压直流电脉冲的作用下,膜的磷酸二酯双分子结构的稳定性发生改变,细胞膜上形成很多可恢复的微小孔洞,使细胞外的 Ca^{2+} 进入细胞,并使胞质内 Ca^{2+} 浓度升高,细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加导致 CSF 活性消失, cyclinB 被迅速降解, MPF 活性消失,细胞被激活完成第二次减数分裂并进入下一细胞周期。化学激活主要包括钙离子载体 A23187、离子霉素、乙醇激活、蛋白质合成抑制剂和蛋白质磷酸化抑制剂。钙离子载体 A23187 (CaA) 主要通过胞质内 Ca^{2+} 的释放来激活早期胚胎。离子霉素作为另一种钙离子载体,也是通过早期胚胎内 Ca^{2+} 的释放而发挥功能的。但是它不是直接促进早期胚胎内 Ca^{2+} 的释放,而是先动用细胞膜上 Ca^{2+} 通道由细胞外向胞内涌入,然后又激活内源性内质网中的 Ca^{2+} 进入早期胚胎胞质内。乙醇对早期胚胎的激活主要是引起细胞膜 IP_3 的形成,通过 IP_3 受体介导内源性 Ca^{2+} 释放,引起早期胚胎产生激活的早期反应。蛋白类细胞因子成熟促进因子 (MPF) 和细胞静止因子 (CSF) 是细胞周期的调节者,正是因为有二者的作用下卵母细胞才会停滞在 M II 期。这些因子对 Ca^{2+} 十分敏感,当卵激活胞质 Ca^{2+} 升高到一定水平时, MPF 和 CSF 便失活或消失。使用蛋白质合成抑制剂激活早期胚胎不是因为能引起 Ca^{2+} 浓度波动而起作用,而是因为能抑制这些蛋白质类细胞因子的合成,从而使早期胚胎离开 M II 期,恢复第二次减数分裂。蛋白质磷酸化抑制剂能阻止蛋白质的磷酸化进而抑制 MPF 和 CSF 的活性,同时也抑制了第二极体的排放,保证了孤雌激活卵母细胞的染色体为二倍体。

本申请的核心是提供一种早期胚胎的联合激活装置和方法。

为了使本技术领域的人员更好地理解本申请方案,下面结合附图(图 1-图 8)和具体实施方式对本申请作进一步的详细说明。

图 1 为本申请实施例提供的一种早期胚胎的联合激活装置的结构图,如图 1 所示,1 为培养皿、2 为联合激活机构、3 为细胞吸持机构、4 为细

胞。培养皿 1，用于存放早期胚胎；细胞吸持机构 3，用于调整早期胚胎的位姿，并固定早期胚胎；联合激活机构 2，联合激活机构 2 包括毛细微针 201 和第一持针仪，毛细微针 201 与第一持针仪连接；毛细微针 201 包括液体金属通道 2011 和化学物质通道 2012；液体金属通道 2011 内设有液体金属和导线 2013，液体金属位于毛细微针 201 尖端，导线 2013 用于连接激励电源，液体金属和导线 2013 构成液态金属用于对早期胚胎进行电激活；化学物质通道 2012 用于释放化学物质对早期胚胎进行化学激活。

本申请实施例所提供的一种早期胚胎的联合激活装置，包括：培养皿，用于存放早期胚胎；细胞吸持机构，用于调整早期胚胎的位姿，并固定早期胚胎；联合激活机构，联合激活机构包括毛细微针和第一持针仪，毛细微针与第一持针仪连接；毛细微针包括液体金属通道和化学物质通道；液体金属通道内设有液体金属和导线，液体金属位于毛细微针尖端，导线用于连接电源，液体金属和导线构成电极用于对早期胚胎进行电激活；化学物质通道用于释放化学物质对早期胚胎进行化学激活。本申请的毛细微针可实现对单个早期胚胎局部部位如核物质区域的精确联合激活，减少对早期胚胎其他部位过度的电损伤或化学损伤，从而提升早期胚胎激活率；并且一个联合激活机构集成了电激活和化学激活两种功能，提高对早期胚胎联合激活的便捷性；细胞吸持机构可快速调整细胞的位姿，缩减时间，减少因调整细胞位姿而导致细胞死亡或者停滞发育的因素。

本申请实施例对培养皿 1 形状和规格不作具体限定，图 2 为本申请实施例提供的一种培养皿的结构图，如图 2 所述，培养皿 1 的底部设有阵列的微坑 101，微坑直径为 $150\mu\text{m}$ ，深度为 $50\mu\text{m}$ 。培养皿 1 相当于整个装置的操作台，细胞 4 放在培养皿 1 里，底部的微坑 101 使早期胚胎不能轻易的流动，方便抓取。

图 3 为本申请实施例提供的一种联合激活机构的结构图，如图 3 所示，联合激活机构 2 包括毛细微针 201 和第一持针仪。第一持针仪包括第一旋盖 202、第二旋盖 203、第一连接座 204、第三旋盖 205、第一固定杆 206、

气压驱动入口 207、导线出口 208、第一环形垫圈 209、第二环形垫圈 210、化学物管道 211。A 为毛细微针 201 的针尖部分。第一旋盖 202 与第二旋盖 203 螺纹连接，第二旋盖 203、第三旋盖 205 均与第一连接座 204 螺纹连接，第一固定杆 206 与第三旋盖 205 螺纹连接；毛细微针 201 尾部贯穿

5 第一旋盖 202 和第二旋盖 203，第一连接座 204 设有气压驱动入口 207，毛细微针 201 中的化学物质通道 2012 通过化学物管道 211 与气压驱动入口 207 连接。当然，在毛细微针 201 的侧壁靠近尾部设有通孔，对应的第二旋盖 203 设有导线出口 208，方便液体金属通道 2011 中的导线 2013 引出。本申请实施例对毛细微针中的化学物质通道 2012 和液体金属通道 2011 的

10 个数不作具体限定，毛细微针 201 可以包括多个液体金属通道 2011 和一个化学物质通道 2012。气压驱动入口 207 可以与显微注射泵连接，显微注射泵增加化学物质通道 2012 的气体压强，以使化学物质通道 2012 中的化学物释放出来。图 4 为本申请实施例提供的一种毛细微针的针尖结构图，图 5 为本申请实施例提供的一种毛细微针的针尖横截面示意图，结合图 4 和

15 图 5，包括 6 个液体金属通道 2011 和一个化学物质通道 2012，6 个液体金属通道 2011 围绕一个化学物质通道 2012 设置；液体金属通道 2011 的直径为 $7\mu\text{m}$ ，化学物质通道 2012 的直径为 $10\mu\text{m}$ 。图 6 为本申请实施例提供的一种毛细微针的内部结构图，如图 6 所示，液体金属通道 2011 内设有液体金属和导线 2013，液体金属位于毛细微针 201 的针尖，导线 2013 从针尖

20 至靠近针尾的通孔引出，导线 2013 用于连接电源，液体金属与导线 2013 构成电极可对细胞进行电激活。为了便于联合激活机构 2 的位置调整，第一持针仪的第一固定杆 206 可以与机械臂（图中未示出）连接，通过控制机械臂实现联合激活机构的位置调整。第一持针仪中的第一环形垫圈 209 和第二环形垫圈 210 用于在受到旋盖的挤压时发生形变固定毛细微针 201

25 的尾部。本申请实施例中的毛细微针 201 与第一持针仪可拆卸连接，可以方便更换毛细微针 201。

为了更加清楚地了解上述联合激活机构的结构，图 7 为本申请实施例提供的一种毛细微针针尖的工艺制备流程图，下面结合图 7 介绍联合激活机构中毛细微针的针尖的工艺制备流程：

(1) 拉制玻璃管形成毛细微针。作为优选方案，用毛细微针拉针仪加热并拉制玻璃管至设定形状和尺寸，对玻璃管拉伸之前，玻璃管为预制的，玻璃管形状为中间有直径 1mm 的化学物质通道，围绕化学物质通道周围有六个直径为 0.7mm 的微管（液态金属通道）。玻璃管被拉针仪加热并拉制成一个 10 μ m 的化学物质通道和六个 7 μ m 的液态金属通道。

(2) 从毛细微针玻璃管尾部向六根直径为 7 μ m 的玻璃微管注入液态金属。作为优选方案，用高精度注射器从毛细微针尾部注入液态金属，本装置中液态金属为镓基液态金属，但液态金属不限于镓基液态金属。在注入液态金属时需要将化学物质通道堵塞，避免液态金属流入化学物质通道。

(3) 将液态金属甩向毛细微针尖端。作为优选方案，利用离心机高速产生的巨大离心力将液态金属甩向毛细微针尖端，直至在显微镜下观察液态金属填满针尖同时没有气泡，在离心机工作前，设置离心机的转速为 6500r/min，持续时间 1-2 分钟，也可以根据毛细微针的直径进行转速和时间的调整。

(4) 修剪毛细微针电极尖端。作为优选方案，利用锻针仪修剪毛细微针尖端，使得修剪后的尖端直径满足要求，经过锻针仪截断及打磨，最后尖端形成 10 μ m 的化学物质通道和 7 μ m 的液态金属通道。在液态金属氧化凝固前，毛细微针玻璃管尾部引出六根导线，从毛细微针玻璃管尾部引出导线以用于连接电源，形成液态金属毛细微针电极。液态金属暴露于空气中表面很快被氧化形成一层薄薄的约 1nm 的固态氧化膜，这有助于稳定液态金属毛细微针电极的形状，避免液态金属从毛细微针尖端处流出，影响毛细微针电极的性能。

图 8 为本申请实施例提供的一种细胞吸持机构的结构图，如 8 所示，细胞吸持机构包括细胞吸持针 301 和第二持针仪，细胞吸持针 301 与第二持针仪连接，第二持针仪上设有导气口 307，导气口 307 与细胞吸持针 301 连通。第二持针仪包括第四旋盖 302、第五旋盖 303、第二连接座 304、第六旋盖 305、第二固定杆 306、导气口 307、气体管道 308、第三环形垫圈 309、第四环形垫圈 310。B 为细胞吸持针的针尖。本申请实施例对细胞吸

持针 301 的不作具体限定，细胞吸持针 301 的针尖使用预制的玻璃软管制造，内径为 $15\mu\text{m}$ ，外径为 $100\mu\text{m}$ ，在工作时利用负压的原理将早期胚胎吸住，使细胞处于一个相对稳定状态，细胞吸持机构 3 可随时放下或者吸持细胞，更重要的一点是，在细胞被放置在培养皿上时，将细胞吸持机构 3 移动到细胞周围不同的位置，然后再将细胞吸持，实现调整细胞位姿的目的，非常便利的，具有很高的便利性和重复性。为了便于细胞吸持机构 3 的位置调整，第二持针仪的第二固定杆 306 可以机械臂（图中未示出）连接，通过控制机械臂实现细胞吸持机构 3 的位置调整。第二持针仪中的第三环形垫圈 309 和第四环形垫圈 310 用于在受到旋盖的挤压时发生形变固定细胞吸持针 301 的尾部。

在上述实施例中，对于早期胚胎的联合激活装置进行了详细描述，本申请还提供早期胚胎的联合激活方法对应的实施例。

图 9 为本申请实施例提供的一种早期胚胎的联合激活方法的流程图，如图 9 所示，早期胚胎的联合激活方法包括：

S10：在细胞吸持机构固定早期胚胎之后，控制联合激活机构向早期胚胎的目标部位持续通入高压直流脉冲，以对早期胚胎进行电激活。

S11：在早期胚胎经过电激活后，控制联合激活机构释放化学物质以对早期胚胎进行化学激活。

上述方法可以是通过与细胞吸持机构和联合激活机构相连接的控制器进行控制。早期胚胎的目标部位包括核物质区等。具体的过程如下：

（1）早期胚胎固定阶段：利用小鼠或者猪的卵母细胞与精子进行体外融合，形成受精卵。将早期胚胎放置在培养皿上，再用细胞吸持机构 3 将其固定，防止早期胚胎发生移动或者旋转。

（2）早期胚胎的激活阶段：使用联合激活机构 2 对早期胚胎进行激活，电激活过程中，持续通入较高压直流脉冲，电压大小为 3.2V ，脉宽为 $50\sim 100\mu\text{s}$ ，当早期胚胎受到电激活后，细胞膜的通透性增加，此时释放化学物质溶液通过细胞膜进入早期胚胎，快速激活早期胚胎内的一系列代谢反应。

(3) 早期胚胎调整位姿阶段: 当使用联合激活机构 2 激活早期胚胎的一侧细胞膜后, 应该改变细胞的姿态, 此时应使用细胞吸持机构 3(负压的原理)调整早期胚胎的姿态, 在早期胚胎被放置在培养皿上时, 将细胞吸持机构 3 移动到早期胚胎周围不同的位置, 然后再将早期胚胎吸持, 实现调整胚胎位姿的目的, 调整完后再重复胚胎激活阶段的操作。

本申请实施例所提供的一种早期胚胎的联合激活方法, 电激活早期胚胎的细胞膜, 导致膜的磷酸二酯双分子结构的稳定性发生改变, 细胞膜上形成很多可恢复的微小孔洞, 此时化学激活释放的钙离子载体, 离子霉素等通过微小孔洞进入细胞, 激活了早期胚胎中一系列的代谢反应, 达到胚胎的发育成活率大大增加的目的, 对于早期胚胎体外发育过程具有重大意义。

以上对本申请所提供的一种早期胚胎的联合激活装置和方法进行了详细介绍。说明书中各个实施例采用递进的方式描述, 每个实施例重点说明的都是与其他实施例的不同之处, 各个实施例之间相同相似部分互相参见即可。对于实施例公开的装置而言, 由于其与实施例公开的方法相对应, 所以描述的比较简单, 相关之处参见方法部分说明即可。应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本申请原理的前提下, 还可以对本申请进行若干改进和修饰, 这些改进和修饰也落入本申请权利要求的保护范围内。

还需要说明的是, 在本说明书中, 诸如第一和第二等之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来, 而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。而且, 术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含, 从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素, 而且还包括没有明确列出的其他要素, 或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。在没有更多限制的情况下, 由语句“包括一个……”限定的要素, 并不排除在包括所述要素的过程、方法、物品或者设备中还存在另外的相同要素。

权 利 要 求

1、一种早期胚胎的联合激活装置，其特征在于，包括：

培养皿，用于存放早期胚胎；

细胞吸持机构，用于调整所述早期胚胎的位姿，并固定所述早期胚胎；

5 联合激活机构，所述联合激活机构包括毛细微针和第一持针仪，所述毛细微针与所述第一持针仪连接；所述毛细微针包括液体金属通道和化学物质通道；所述液体金属通道内设有液体金属和导线，所述液体金属位于所述毛细微针尖端，所述导线用于连接激励电源，所述液体金属和所述导线构成液态金属电极用于对所述早期胚胎进行电激活；所述化学物质通道
10 用于释放化学物质对所述早期胚胎进行化学激活。

2、根据权利要求1所述的早期胚胎的联合激活装置，其特征在于，所述毛细微针包括多个所述液体金属通道和一个所述化学物质通道，多个所述液体金属通道围绕一个所述化学物质通道设置。

3、根据权利要求1所述的早期胚胎的联合激活装置，其特征在于，所
15 述培养皿的底部设有阵列的微坑，所述微坑用于防止所述早期胚胎的移动。

4、根据权利要求1所述的早期胚胎的联合激活装置，其特征在于，所述第一持针仪包括第一旋盖、第二旋盖、第一连接座、第三旋盖和第一固定杆；

所述第一旋盖与所述第二旋盖螺纹连接，所述第二旋盖、所述第三旋盖均与所述第一连接座螺纹连接，所述第一固定杆与所述第三旋盖螺纹连
20 接；

所述毛细微针尾部贯穿所述第一旋盖和所述第二旋盖，所述第一连接座设有气压驱动入口，所述毛细微针中的所述化学物质通道与所述气压驱动入口连通。

25 5、根据权利要求1所述的早期胚胎的联合激活装置，其特征在于，所述细胞吸持机构包括细胞吸持针和第二持针仪，所述细胞吸持针与所述第二持针仪连接，所述第二持针仪上设有导气口，所述导气口与所述细胞吸持针连通。

6、根据权利要求1所述的早期胚胎的联合激活装置，其特征在于，所

述液体金属通道的直径为 $7\mu\text{m}$ 。

7、根据权利要求 1 所述的早期胚胎的联合激活装置，其特征在于，所述化学物质通道的直径为 $10\mu\text{m}$ 。

8、根据权利要求 5 所述的早期胚胎的联合激活装置，其特征在于，所述细胞吸持针的内径为 $15\mu\text{m}$ ，外径为 $100\mu\text{m}$ 。

9、根据权利要求 3 所述的早期胚胎的联合激活装置，其特征在于，所述微坑直径为 $150\mu\text{m}$ ，深度为 $50\mu\text{m}$ 。

10、一种早期胚胎的联合激活方法，其特征在于，应用于权利要求 1-9 任一项所述的早期胚胎的联合激活装置，包括：

10 在细胞吸持机构固定早期胚胎之后，控制联合激活机构向所述早期胚胎的目标部位持续通入高压直流脉冲，以对所述早期胚胎进行电激活；

在所述早期胚胎经过电激活后，控制所述联合激活机构释放化学物质以对所述早期胚胎进行化学激活。

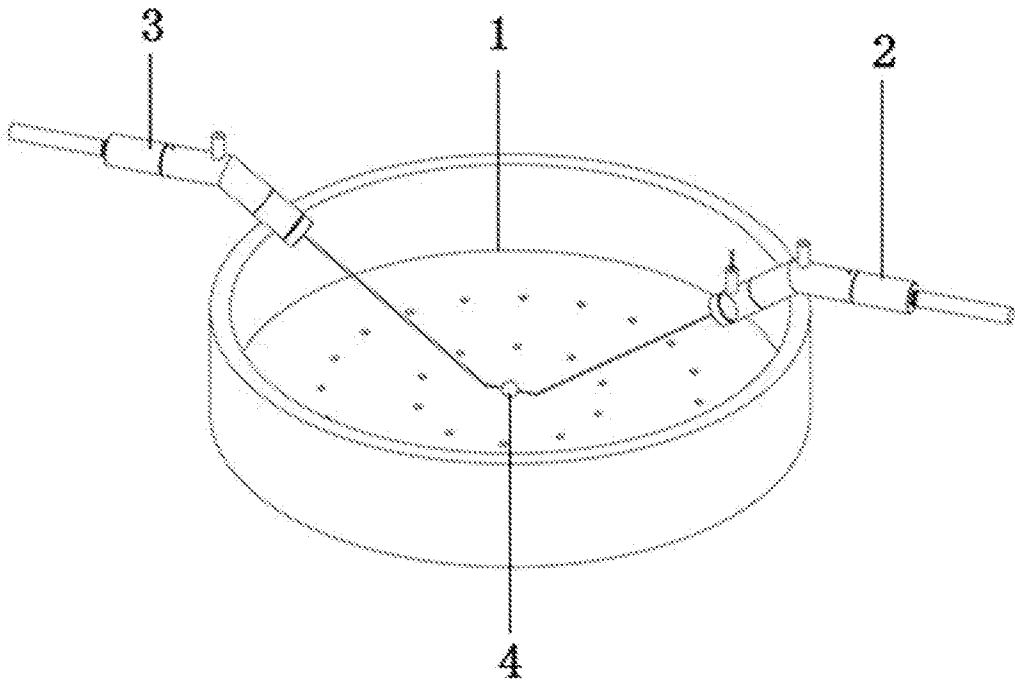


图 1

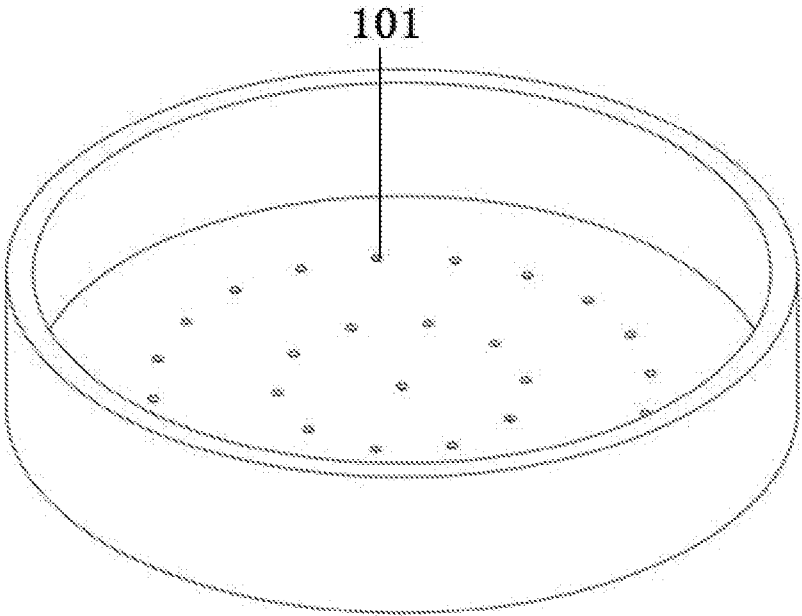


图 2

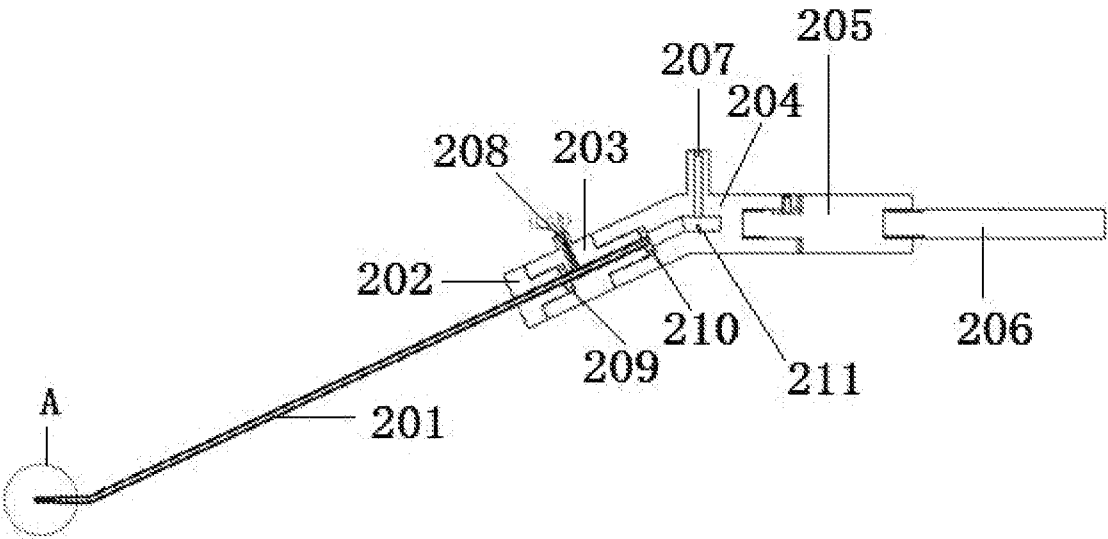


图 3

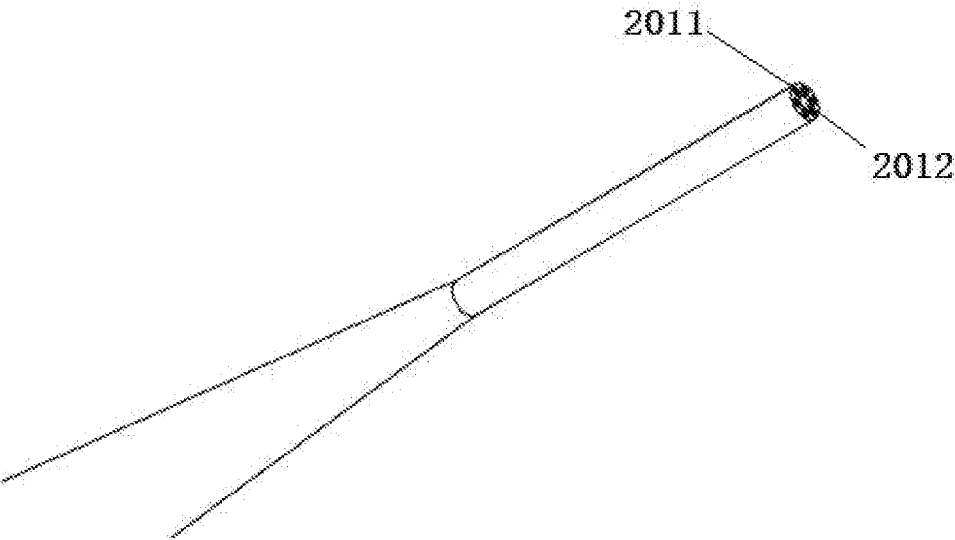


图 4

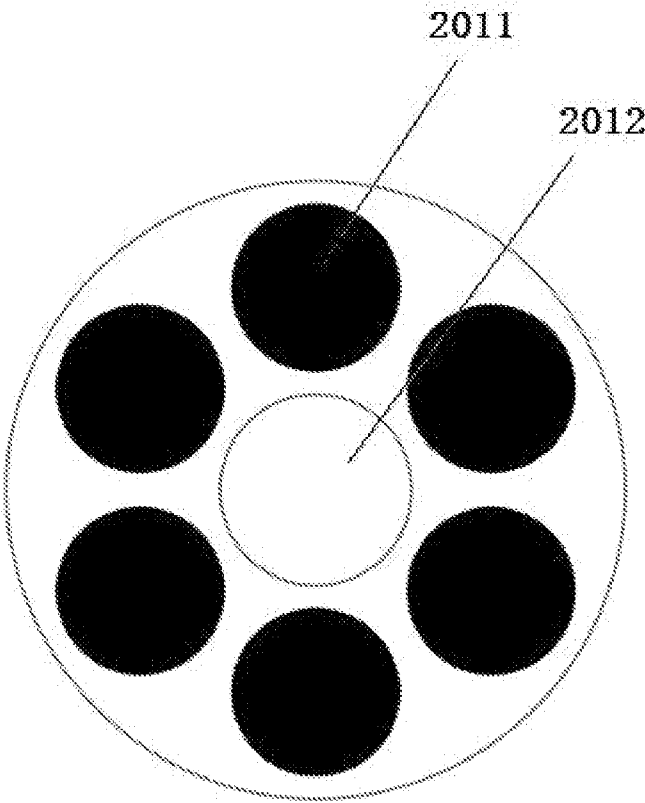


图 5

—4/6—

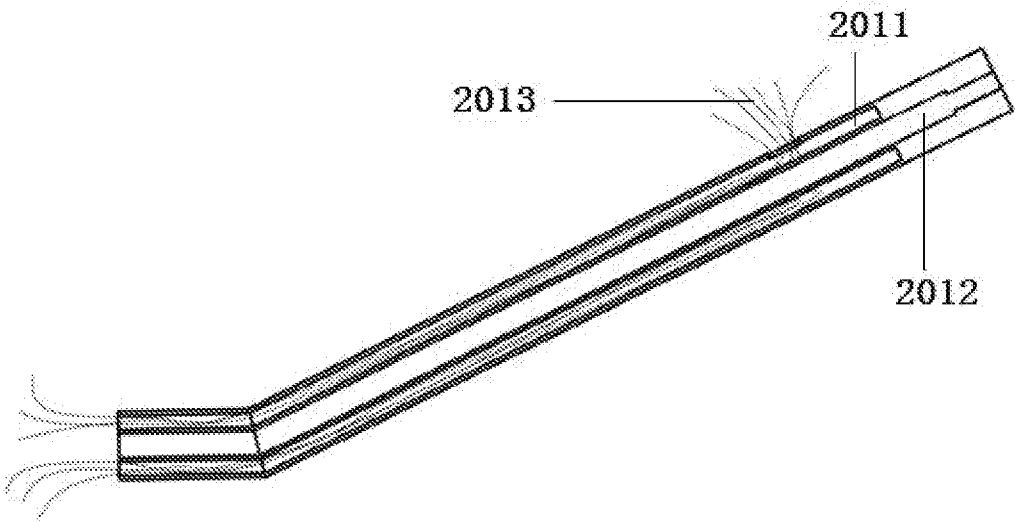


图 6

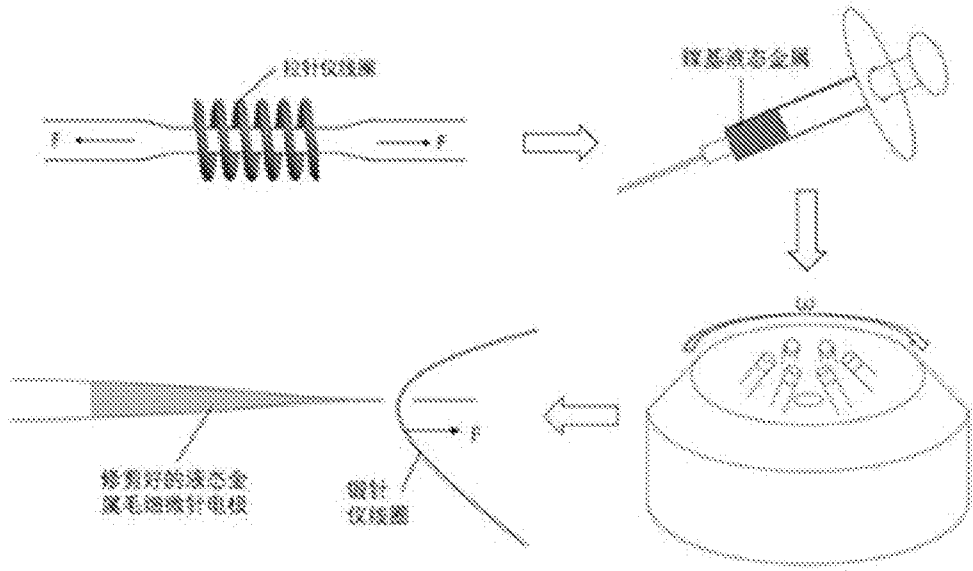


图 7

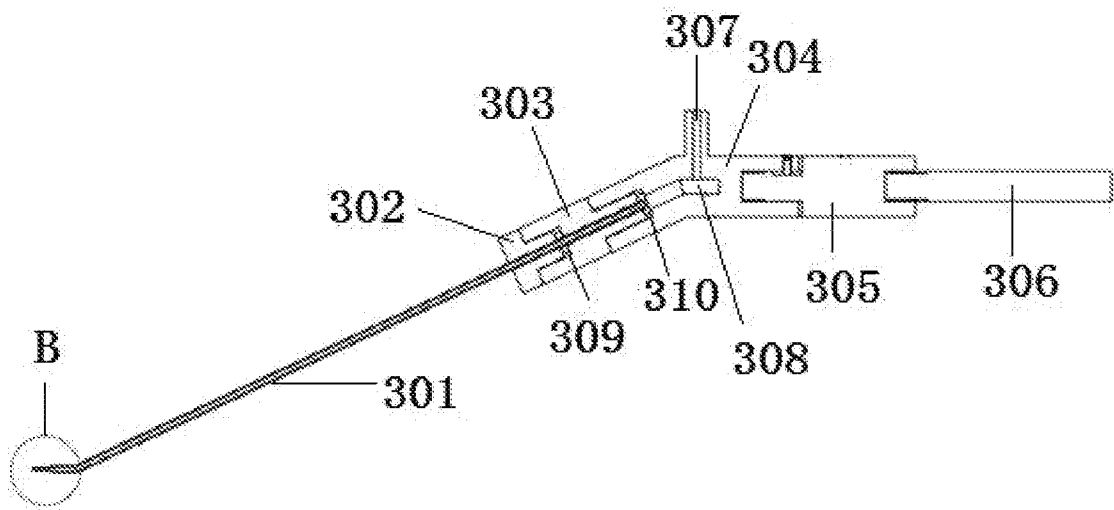


图 8

—6/6—

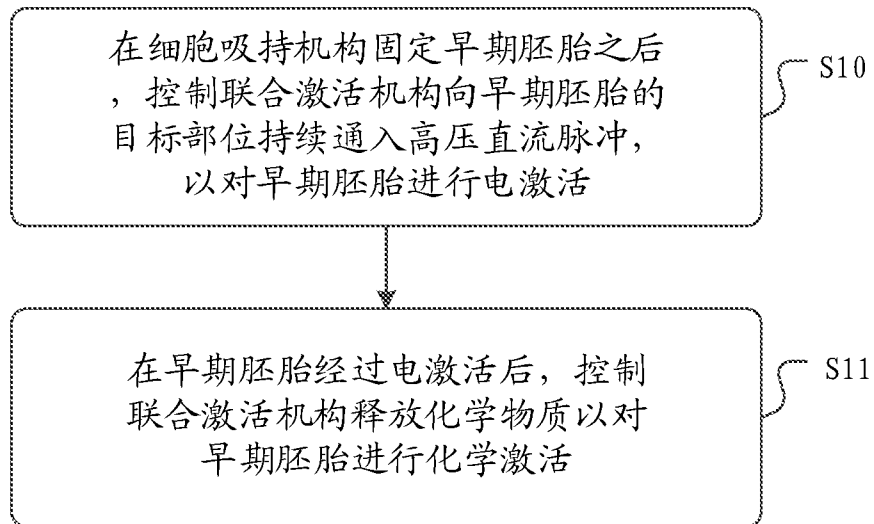


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/073078

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/22(2006.01)i;C12M 1/42(2006.01)i;C12M 1/24(2006.01)i;C12M 3/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; WPABSC; CNTXT; CNKI; 百度学术, BAIDU SCHOLAR; 激活, 刺激, 胚胎, 细胞, 针, 液体金属, 液态金属, 镓, 化学物质等; DWPI; WPABS; ENTXT; PUBMED; ISI WEB OF SCIENCE和检索词: activat+, stimulat+, embryo?, cell?, needle?, liquid metal, gallium, chemicals等

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 111849768 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 30 October 2020 (2020-10-30) see claims 1-10, description paragraphs [0044]-[0070], and figures 1-13	1-10
Y	CN 106754348 A (NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY) 31 May 2017 (2017-05-31) see claims 1-10, description paragraphs [0019]-[0029], and figures 1-3	1-10
PX	CN 115353956 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 18 November 2022 (2022-11-18) see claims 1-10	1-10
A	CN 104109629 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 22 October 2014 (2014-10-22) see description, particular embodiments	1-10
A	CN 102119331 A (LIFE TECHNOLOGIES CORP.) 06 July 2011 (2011-07-06) see description, particular embodiments	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 2023

Date of mailing of the international search report

30 April 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/073078

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111849768	A	30 October 2020	None			
CN	106754348	A	31 May 2017	None			
CN	115353956	A	18 November 2022	None			
CN	104109629	A	22 October 2014	None			
CN	102119331	A	06 July 2011	EP	2294414	A2	16 March 2011
				EP	2294414	A4	21 December 2011
				EP	2294414	B1	16 September 2015
				US	2012034622	A1	09 February 2012
				US	9012204	B2	21 April 2015
				WO	2010002540	A2	07 January 2010
				WO	2010002540	A3	25 March 2010

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/073078

A. 主题的分类

C12M 1/22(2006.01)i;C12M 1/42(2006.01)i;C12M 1/24(2006.01)i;C12M 3/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:C12M

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称,和使用的检索词(如使用))

CNABS; WPABSC; CNTXT; CNKI; 百度学术和检索词: 激活, 刺激, 胚胎, 细胞, 针, 液体金属, 液态金属, 镓, 化学物质等; DWPI; WPABS; ENTXT; PUBMED; ISI WEB OF SCIENCE和检索词: activat+, stimulat+, embryo?, cell?, needle?, liquid metal, gallium, chemicals等

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 111849768 A (苏州大学) 2020年10月30日 (2020 - 10 - 30) 参见权利要求1-10, 说明书第 [0044] - [0070] 段, 图1-13	1-10
Y	CN 106754348 A (南京农业大学) 2017年5月31日 (2017 - 05 - 31) 参见权利要求1-10, 说明书第 [0019] - [0029] 段, 图1-3	1-10
PX	CN 115353956 A (苏州大学) 2022年11月18日 (2022 - 11 - 18) 参见权利要求1-10	1-10
A	CN 104109629 A (苏州大学) 2014年10月22日 (2014 - 10 - 22) 参见说明书具体实施方式	1-10
A	CN 102119331 A (生命科技公司) 2011年7月6日 (2011 - 07 - 06) 参见说明书具体实施方式	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2023年4月19日

国际检索报告邮寄日期

2023年4月30日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

穆飞航

电话号码 (+86) 010-62412295

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/073078

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111849768	A	2020年10月30日	无			
CN	106754348	A	2017年5月31日	无			
CN	115353956	A	2022年11月18日	无			
CN	104109629	A	2014年10月22日	无			
CN	102119331	A	2011年7月6日	EP	2294414	A2	2011年3月16日
				EP	2294414	A4	2011年12月21日
				EP	2294414	B1	2015年9月16日
				US	2012034622	A1	2012年2月9日
				US	9012204	B2	2015年4月21日
				WO	2010002540	A2	2010年1月7日
				WO	2010002540	A3	2010年3月25日