

(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
2022 年 1 月 20 日 (20.01.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/011729 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12M 3/00 (2006.01) *C12N 13/00* (2006.01)
C12M 1/42 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2020/103160
- (22) 国际申请日: 2020 年 7 月 21 日 (21.07.2020)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202010673131.1 2020 年 7 月 14 日 (14.07.2020) CN
- (71) 申请人: 苏州大学(SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路
199 号, Jiangsu 215000 (CN)。
- (72) 发明人: 黄海波 (HUANG, Haibo); 中国江苏省
苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215000

(CN)。 马友文(MA, Youwen); 中国江苏省苏州市
工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215000 (CN)。
戴辞海(DAI, Cihai); 中国江苏省苏州市工业
园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215000 (CN)。 朱易
辰(ZHU, Yichen); 中国江苏省苏州市工业园
区仁爱路 199 号, Jiangsu 215000 (CN)。 陈立国
(CHEN, Ligu); 中国江苏省苏州市工业园区
仁爱路 199 号, Jiangsu 215000 (CN)。 刘吉柱
(LIU, Jizhu); 中国江苏省苏州市工业园区仁
爱路 199 号, Jiangsu 215000 (CN)。 王阳俊(WANG,
Yangjun); 中国江苏省苏州市工业园区仁
爱路 199 号, Jiangsu 215000 (CN)。

(74) 代理人: 苏州见山知识产权代理事务所 (特殊
普通合伙) (SUZHOU JIANSAN INTELLECTUAL
PROPERTY); 中国江苏省苏州市工业园

(54) Title: MULTI-EFFICIENCY ACCURATE ELECTRICAL STIMULATION DEVICE AND METHOD FOR EGG CELL

(54) 发明名称: 一种卵细胞多效能精准电刺激装置及方法

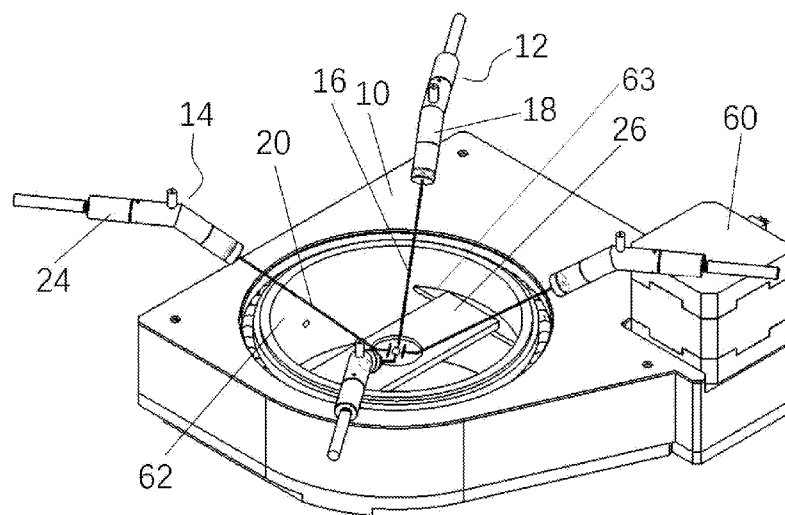


图 1

(57) Abstract: Disclosed in the present invention is a multi-efficiency accurate electrical stimulation device for an egg cell. The multi-efficiency accurate electrical stimulation device comprises: a base; an electrical stimulation mechanism comprising two first electrical stimulation assemblies and two second electrical stimulation assemblies, wherein each first electrical stimulation assembly comprises a liquid metal capillary micro-needle electrode and a first needle holding instrument connected to the liquid metal capillary micro-needle electrode, and each second electrical stimulation assembly comprises a metal parallel plate micro-electrode and a second needle holding instrument connected to the metal parallel plate micro-electrode; a cell pose adjusting chip mounted on the base and configured for adjusting the pose of a cell; and a rotating mechanism mounted on the base, connected to the cell pose adjusting chip and configured for driving the cell pose adjusting chip to rotate. Further disclosed is a multi-efficiency accurate electrical stimulation method for an egg



WO 2022/011729 A1

区东环路 1500 号现代创展大厦 1 幢 1702 室, Jiangsu 215000 (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利 (细则 4.17(ii))
- 发明人资格 (细则 4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。

cell. According to the present invention, accurate electrical stimulation can be carried out on specific parts of an egg cell at different stages during an entire cloning process, multiple effects of targeted electrical stimulation are achieved at all stages of a somatic cell cloning process, and the success rate of the entire somatic cell cloning process is increased.

(57) 摘要: 本发明公开了一种卵细胞多效能精准电刺激装置, 包括: 基座; 电刺激机构, 包括两个第一电刺激组件和两个第二电刺激组件, 每个第一电刺激组件包括液态金属毛细微针电极、与液态金属毛细微针电极相连接的第一持针仪, 每个第二电刺激组件包括金属平行板微电极、与金属平行板微电极相连接的第二持针仪; 细胞位姿调整芯片, 安装在基座上, 用于调整细胞的位姿; 旋转机构, 安装在基座上且与细胞位姿调整芯片相连接, 用于驱动细胞位姿调整芯片旋转。本发明还公开了一种卵细胞多效能精准电刺激方法。本发明能对整个克隆流程中不同阶段的卵细胞特定部位进行精准电刺激, 对体细胞克隆流程各阶段的针对性电刺激实现多重效应, 提升体细胞克隆全流程的成功率。

一种卵细胞多效能精准电刺激装置及方法

技术领域

本发明涉及与克隆相关的生物技术领域，特别是涉及一种面向克隆过程的卵细胞多效能精准电刺激装置及方法。

背景技术

克隆是利用生物技术由无性繁殖产生与原个体有完全相同基因组织后代的过程。自诞生以来，克隆技术在生命科学研究与相关医学技术中一直占据着最重要的位置。卵细胞包含着重要的生物遗传信息，是克隆过程的主要操作对象。然而克隆实验的成功率极低，其主要原因是离体的卵细胞活性会大幅下降，在实验过程中极易死亡，即使重构时未死亡，在后续的培育中也极易发生发育阻滞，这时就需要人工对卵细胞施加刺激，来激活细胞。在众多刺激方法中，电刺激卵细胞由于具有操作方便、参数控制精确、激活率高、生物相容性高、无污染、损伤小等优点成为最佳方案。针对卵细胞的电刺激主要分为电激活和电融合两种。电激活是卵细胞膜在直流脉冲电压激励下细胞膜通透性增加，细胞外 Ca^{2+} 流入细胞使得胞质内 Ca^{2+} 浓度升高，卵细胞被激活。而如果直流脉冲电压继续升高，细胞膜将发生不可逆的穿孔，此时如果两个细胞互相紧贴将会融合成一个细胞，这就是电融合。其基本原理都是由细胞膜的磷酸二酯双分子结构在电脉冲刺激下稳定性发生变化。

传统的卵细胞电刺激装置基本上都是在宏观平行电极板间排列一批卵细胞，通入电刺激信号产生匀强电场，通过精确调整寻找最佳电刺激参数得到较高的电刺激成功率和较低的细胞死亡率。但由于宏观平行板电极的间距较大，施加电刺激所需的电压也较大，极易对细胞造成损伤也不安全；且传统的电刺激仪无法完成对卵细胞特定部位的实施精准电刺激，也无法用一套电

刺激装置完成克隆各阶段卵细胞所需的多种电刺激（电激活、电融合、线粒体膜电位提升等）。

发明内容

针对现有技术不足，本发明的目的在于提供一种面向克隆过程的卵细胞多效能精准电刺激装置及方法。

为了实现上述目的，本发明一实施例提供的技术方案如下：

一种卵母细胞多效能精准电刺激装置，包括：

基座；

电刺激机构，包括两个第一电刺激组件和两个第二电刺激组件，每个所述第一电刺激组件包括液态金属毛细微针电极、与所述液态金属毛细微针电极相连接的第一持针仪，每个所述第二电刺激组件包括金属平行板微电极、与所述金属平行板微电极相连接的第二持针仪；

细胞位姿调整芯片，安装在所述基座上，用于调整细胞的位姿；

旋转机构，安装在所述基座上且与所述细胞位姿调整芯片相连接，用于驱动所述细胞位姿调整芯片旋转。

作为本发明的进一步改进，所述液态金属毛细微针电极采用以下步骤制成：先拉制玻璃管形成毛细微针，接着从毛细微针尾部注入液态金属，然后将液态金属甩向毛细微针尖端，最后修剪毛细微针尖端，从毛细微针尾部引出导线。

作为本发明的进一步改进，所述液态金属毛细微针电极的尖端直径为 $10\mu\text{m}$ 。

作为本发明的进一步改进，所述金属平行板微电极包括杆状电极本体和平行板电极，所述杆状电极本体与所述平行板电极一体成型。

作为本发明的进一步改进，所述杆状电极本体的头部直径为 0.5mm ，所

述平行板电极的尺寸为 $2\text{mm} \times 1\text{mm}$ 。

作为本发明的进一步改进，所述细胞位姿调整芯片包括上基板、下基板以及设于所述上基板与下基板之间的中间层，所述上基板内设置有微孔，所述中间层设置有气室，所述下基板设置有导气柱。

作为本发明的进一步改进，所述微孔的直径为 $15\mu\text{m}$ 。

作为本发明的进一步改进，所述第一持针仪包括第一旋盖、第二旋盖、连接座、第三旋盖和固定杆，所述第一旋盖与所述第二旋盖螺纹连接，所述第二旋盖、第三旋盖均与所述连接座螺纹连接，所述固定杆与所述第三旋盖螺纹连接。

作为本发明的进一步改进，所述旋转机构包括电机、与所述电机相连接的传动齿轮以及与所述传动齿轮相连接的承载座，所述承载座与所述细胞位姿调整芯片相连接。

一种卵细胞多效能精准电刺激方法，使用所述的装置，包括以下步骤：

(1) 卵细胞激活阶段：将卵细胞移动至细胞位姿调整芯片上并固定，控制两个液态金属毛细微针电极呈 $50^\circ \sim 70^\circ$ 夹角紧贴卵细胞透明带，持续通入较高压直流脉冲，然后通过旋转机构使细胞位姿调整芯片旋转，带动固定于细胞位姿调整芯片上的卵细胞水平旋转直至所有的细胞膜都被充分刺激；

(2) 卵细胞去核阶段：对激活后的卵细胞进行去核；

(3) 重构胚电融合阶段：在将核供体注入去核卵细胞构成重构胚后，将重构胚固定在细胞位姿调整芯片上，移动两个液态金属毛细微针电极呈 180° 夹角紧贴重构胚，并使核供体与去核卵细胞的接触面与电场方向垂直，通入高压直流脉冲，使核供体和去核卵细胞发生电融合，形成重组胚胎；

(4) 重组胚胎培养阶段：将电融合后的重组胚胎置于两个金属平行板微电极间，给金属平行板微电极通入低频交流微电流信号。

本发明的有益效果是：

(1) 本发明所提供的液态金属毛细微针电极和金属平行板微电极可以对单个卵细胞以及卵细胞的特定部位如细胞膜、线粒体进行精准电刺激，尽可能的减少对卵细胞其他部位的电损伤，从而提高体细胞克隆过程各阶段成功率和存活率。

(2) 可以完成体细胞克隆各阶段卵细胞所需的电刺激，包括在去核前对卵细胞的细胞膜进行电刺激以激活卵细胞，在重构胚电融合阶段完成对核供体和去核卵细胞的电融合，在重组胚胎发育阶段完成对重组胚胎线粒体膜电位的提升，通过对体细胞克隆流程各阶段的针对性电刺激实现多重效应，从而帮助操作对象突破各个阶段继续发育。

(3) 由于采用了液态金属毛细微针电极和金属平行板微电极，电极间距 d 更小，根据公式 $E = \frac{U}{d}$ ，在施加同样大小电场的刺激时，所需的电压更小，不论对操作者还是操作对象安全性都有提高。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本发明中记载的一些实施例，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。

图 1 为本发明的优选实施例的电刺激装置的结构示意图；

图 2 为本发明的优选实施例的电刺激装置的俯视图；

图 3 为本发明的优选实施例的电刺激装置的局部放大图；

图 4 为本发明的优选实施例的电刺激装置的局部俯视图；

图 5 为本发明的优选实施例的细胞位姿调整芯片的结构示意图；

图 6 为本发明的优选实施例的细胞位姿调整芯片的分解结构示意图；

图 7 为本发明的优选实施例的第一电刺激组件的结构示意图；

图 8 为图 7 中 A 的放大示意图；

图 9 为本发明的优选实施例的第二电刺激组件的结构示意图；

图 10 为图 9 中 B 的放大示意图；

图 11 为本发明的优选实施例的液态金属毛细微针电极的制备流程；

图 12 为本发明的优选实施例的克隆各阶段对细胞施加电刺激的示意图；

图 13 为本发明的优选实施例的体细胞克隆过程中施加电刺激的流程图；

图中：10、基座，12、第一电刺激组件，14、第二电刺激组件，16、液态金属毛细微针电极，18、第一持针仪，20、金属平行板微电极，24、第二持针仪，26、细胞位姿调整芯片，28、尖端，30、杆状电极本体，31、平行板电极，32、头部，33、上基板，34、下基板，35、中间层，36、微孔，38、气室，40、导气柱，42、凹槽，44、第一旋盖，46、第二旋盖，48、连接座，50、第三旋盖，52、固定杆，54、第一环形垫圈，56、第二环形垫圈，58、通道，59、导线，60、电机，62、承载座，63、支撑板，64、卵细胞，66、核供体，68、去核卵细胞，70、重构胚，72、重组胚胎。

具体实施方式

为了使本技术领域的人员更好地理解本发明中的技术方案，下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明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发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，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，都应当属于本发明保护的范围。

如图 1-图 4 所示，一种卵细胞多效能精准电刺激装置，包括：

基座 10；

电刺激机构，包括两个第一电刺激组件 12 和两个第二电刺激组件 14，每个第一电刺激组件 12 包括液态金属毛细微针电极 16、与液态金属毛细微针电

极 16 相连接的第一持针仪 18，每个第二电刺激组件 14 包括金属平行板微电极 20、与金属平行板微电极 20 相连接的第二持针仪 24；

细胞位姿调整芯片 26，安装在基座 10 上，用于调整细胞的位姿；

旋转机构，安装在基座 10 上且与细胞位姿调整芯片 26 相连接，用于驱动细胞位姿调整芯片 26 旋转。

为了更精准的实现对单个细胞以及细胞的特定部位如细胞膜、线粒体进行电刺激，本发明优选液态金属毛细微针电极 16 采用以下工艺制备而成，如图 11 所示，工艺步骤为：

(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，形成毛细微针，毛细微针拉针仪采用生物实验室中常用结构。

(2) 从毛细微针尾部注入液态金属。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，液态金属为镓基液态金属。

(3) 将液态金属甩向毛细微针尖端。作为优选方案，利用离心机产生的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) 修剪毛细微针尖端，从毛细微针玻璃管尾部引出导线，形成液态金属毛细微针电极。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，在液态金属氧化凝固前，从毛细微针玻璃管尾部引出导线以用于连接电源。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，避免影响毛细微针电极的性能。

如图 8 所示，本发明优选液态金属毛细微针电极 16 的尖端 28 直径为 10 μ m。

金属平行板微电极 20 由在通电时不会和细胞培养液发生化学反应的金属制成。本发明实施例中，金属平行板微电极 20 由铂制成，但并不局限于铂，也可以为金、银等。本发明优选金属平行板微电极 20 包括杆状电极本体 30 和平行板电极 31，杆状电极本体 30 与平行板电极 31 一体成型。进一步优选杆状电极本体 30 的头部 32 直径为 0.5mm，平行板电极 31 的大小为 2mm×1mm。

如图 5、图 6 所示，为了便于固定住细胞，本发明优选细胞位姿调整芯片 26 包括上基板 33、下基板 34 以及设于上基板 33 与下基板 34 之间的中间层 35，上基板 33 内设置有微孔 36，中间层 35 设置有气室 38，下基板 34 设置有导气柱 40，微孔 36、气室 38、导气柱 40 依次相连通，微孔 36 用于吸持细胞，气室 38 用于稳定气压，减小波动，导气柱 40 与气泵（图中未示出）相连接，用于产生固定卵细胞的负压。

进一步优选微孔 36 的直径为 15 μ m。进一步优选上基板 33、下基板 34 以及中间层 35 均呈矩形，便于安装。优选上基板 33 的中心设置有凹槽 42，微孔 36 设置在凹槽 42 的底壁上。进一步优选凹槽 42 呈圆形，微孔 6 设置在凹槽 42 的中心底壁上。进一步优选上基板 33、下基板 34 均采用有机玻璃材质制成，中间层 35 采用 PDMS 材质制成。

如图 7、图 8 所示，本发明优选第一持针仪 18 包括第一旋盖 44、第二旋盖 46、连接座 48、第三旋盖 50 和固定杆 52，第一旋盖 44 与第二旋盖 46 螺纹连接，第二旋盖 46、第三旋盖 50 均与连接座 48 螺纹连接，固定杆 52 与第三旋盖 50 螺纹连接。为了提高第一旋盖 44 与第二旋盖 46、第二旋盖 46 与连接座 48 之间连接的稳固性，本发明优选第二旋盖 46 内垫有第一环形垫圈 54，连接座 48 内垫有第二环形垫圈 56。如图 9、图 10 所示，本发明优选第一持针仪 18 与第二持针仪 24 的结构和大小相同。本发明优选第一旋盖 44、第二旋盖 46 和连接座 48 内设置有通道 58，液态金属毛细微针电极 16 部分卡入通

道 58 内，同时通道 58 能够便于液态金属毛细微针电极 16 的导线 59 的引出。

为了便于液态金属毛细微针电极 16 和金属平行板微电极 20 的位置调整，本发明优选每个第一持针仪 18、每个第二持针仪 24 分别固定在对应的四自由度机械臂（图中未示出）上，四自由度机械臂能够实现沿 X、Y、Z 三个方向的平移以及绕 X 方向的旋转，沿 Y 方向指的是沿与尖端 28 或头部 32 平行的方向。

本发明优选旋转机构包括电机 60、与电机 60 相连接的传动齿轮（图中未示出）以及与传动齿轮相连接的承载座 62，细胞位姿调整芯片 26 安装在承载座 62 上。进一步优选承载座 62 安装在基座 10 内，承载座 62 呈圆形，承载座 62 向内延伸有至少一个支撑板 63，细胞位姿调整芯片 26 固定在支撑板 63 上，承载座 62 外周面套设有齿轮（图中未示出），传动齿轮与承载座 62 外周面的齿轮相连接，电机 60 启动，通过传动齿轮带动承载座 62 旋转，从而带动细胞位姿调整芯片 26 旋转。

如图 12 所示，介绍本发明的一种卵细胞多效能精准电刺激方法，使用上述装置，包括以下步骤：

（1）卵细胞激活阶段：将卵细胞 64 移至细胞位姿调整芯片 26 上并固定，如图 12-（a），控制两个液态金属毛细微针电极 16 呈 $50^{\circ} \sim 70^{\circ}$ 夹角紧贴卵细胞 64 透明带，持续通入较高压直流脉冲，然后通过旋转机构使细胞位姿调整芯片 26 旋转，带动固定于细胞位姿调节芯片 26 上的卵细胞 64 水平旋转直至所有的细胞膜都被充分刺激；

（2）卵细胞去核阶段：对激活后的卵细胞 64 进行去核；

（3）重构胚电融合阶段：将核供体 66 注入去核卵细胞 68 构成重构胚 70，如图 12-（b），将重构胚 70 固定在细胞位姿调节芯片 26 上，移动两个液态金属毛细微针电极 16 呈 180° 夹角紧贴重构胚 70，并使核供体 66 与去核卵细胞 68 的接触面与电场方向垂直，图中的箭头方向代表电场方向，通入高压直

流脉冲，使核供体 66 和去核卵细胞 68 发生电融合，形成重组胚胎 72；

(4) 重组胚胎培养阶段：将电融合后的重组胚胎 72 置于两个平行板电极 31 间，如图 12- (c)，给金属平行板微电极 20 通入低频交流微电流信号。

如图 13 所示，为了更进一步的说明本发明的电刺激方法，作为优选方案，包括以下步骤：

(1) 卵细胞激活阶段：将卵细胞 64 移动至细胞位姿调整芯片 26 上并开启负压泵固定卵细胞 64，控制两个液态金属毛细微针电极 16 呈 60° 夹角紧贴卵细胞 64 透明带，两个液态金属毛细微针电极 16 的针尖相距 $8\sim 12\mu\text{m}$ ，实现两液态金属毛细微针电极 16 间电场聚焦于卵细胞 64 细胞膜部位，持续通入较高压直流脉冲，电场强度为 $0.5\sim 1.0\text{kv/cm}$ ，脉宽为 $50\sim 100\mu\text{s}$ ，然后启动电机 60 驱动旋转机构使细胞位姿调整芯片 26 旋转，带动固定于细胞位姿调节芯片 26 中心的卵细胞 64 水平旋转直至所有的细胞膜都被充分刺激，施加电刺激后的卵细胞膜通透性增加，有利于培养液中的 Ca^{2+} 进入卵细胞 64，完成对卵细胞 64 的激活。进一步优选两个液态金属毛细微针电极 16 的针尖相距 $10\mu\text{m}$ 。进一步优选卵细胞 64 为卵巢卵母细胞。

(2) 卵细胞去核阶段：在显微镜的辅助下，采用盲吸法对激活后的卵细胞 64 进行去核。

(3) 重构胚电融合阶段：在将核供体 66 注入去核卵细胞 68 构成重构胚 70 后，将重构胚 70 固定在细胞位姿调节芯片 26 上，移动两个液态金属毛细微针电极 16 呈 180° 夹角紧贴重构胚 70，并使核供体 66 与去核卵细胞 68 的接触面与电场方向垂直，通入高压直流脉冲，电场强度为 $1\sim 2\text{kv/cm}$ ，脉宽为 $50\sim 100\mu\text{s}$ ，使核供体 66 和去核卵细胞 68 发生电融合，形成重组胚胎 72。进一步优选将核供体 66 注入去核卵细胞 68 的卵周隙内。

(4) 重组胚胎培养阶段：将电融合后的重组胚胎 72 置于两个平行板电极 31 间，给金属平行板微电极 20 通入低频交流微电流信号，电压为 $40\sim 50\text{V}$ ，

脉宽为 20~30ms，频率为 30~50Hz，以提升重组胚胎 72 线粒体膜电位，进而提高重组胚胎 72 活性以促进重组胚胎 72 分裂。

对于本领域技术人员而言，显然本发明不限于上述示范性实施例的细节，而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下，能够以其他的具体形式实现本发明。因此，无论从哪一点来看，均应将实施例看作是示范性的，而且是非限制性的，本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定，因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。不应将权利要求中的任何附图标记视为限制所涉及的权利要求。

此外，应当理解，虽然本说明书按照实施方式加以描述，但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案，说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见，本领域技术人员应当将说明书作为一个整体，各实施例中的技术方案也可以经适当组合，形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

权 利 要 求 书

1. 一种卵细胞多效能精准电刺激装置，其特征在于，包括：

基座；

电刺激机构，包括两个第一电刺激组件和两个第二电刺激组件，每个所述第一电刺激组件包括液态金属毛细微针电极、与所述液态金属毛细微针电极相连接的第一持针仪，每个所述第二电刺激组件包括金属平行板微电极、与所述金属平行板微电极相连接的第二持针仪；

细胞位姿调整芯片，安装在所述基座上，用于调整细胞的位姿；

旋转机构，安装在所述基座上且与所述细胞位姿调整芯片相连接，用于驱动所述细胞位姿调整芯片旋转。

2. 根据权利要求 1 所述的一种卵细胞多效能精准电刺激装置，其特征在于，所述液态金属毛细微针电极采用以下步骤制成：先拉制玻璃管形成毛细微针，接着从毛细微针尾部注入液态金属，然后将液态金属甩向毛细微针尖端，最后修剪毛细微针尖端，从毛细微针尾部引出导线。

3. 根据权利要求 2 所述的一种卵细胞多效能精准电刺激装置，其特征在于，所述液态金属毛细微针电极的尖端直径为 $10\mu\text{m}$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的一种卵细胞多效能精准电刺激装置，其特征在于，所述金属平行板微电极包括杆状电极本体和平行板电极，所述杆状电极本体与所述平行板电极一体成型。

5. 根据权利要求 4 所述的一种卵细胞多效能精准电刺激装置，其特征在于，所述杆状电极本体的头部直径为 0.5mm ，所述平行板电极的尺寸为 $2\text{mm} \times 1\text{mm}$ 。

6. 根据权利要求 1 所述的一种卵细胞多效能精准电刺激装置，其特征在于，所述细胞位姿调整芯片包括上基板、下基板以及设于所述上基板与下基板之间的中间层，所述上基板内设置有微孔，所述中间层设置有气室，所述下基板设置有导气柱。

7. 根据权利要求 6 所述的一种卵细胞多效能精准电刺激装置，其特征在于，所述微孔的直径为 $15\mu\text{m}$ 。

8. 根据权利要求 1 所述的一种卵细胞多效能精准电刺激装置，其特征在于，所述第一持针仪包括第一旋盖、第二旋盖、连接座、第三旋盖和固定杆，所述第一旋盖与所述第二旋盖螺纹连接，所述第二旋盖、第三旋盖均与所述连接座螺纹连接，所述固定杆与所述第三旋盖螺纹连接。

9. 根据权利要求 1 所述的一种卵细胞多效能精准电刺激装置，其特征在于，所述旋转机构包括电机、与所述电机相连接的传动齿轮以及与所述传动齿轮相连接的承载座，所述承载座与所述细胞位姿调整芯片相连接。

10. 一种卵细胞多效能精准电刺激方法，其特征在于，使用如权利要求 1-9 中任一项所述的装置，包括以下步骤：

(1) 卵细胞激活阶段：将卵细胞移动至细胞位姿调整芯片上并固定，控制两个液态金属毛细微针电极呈 $50^\circ \sim 70^\circ$ 夹角紧贴卵细胞透明带，持续通入较高压直流脉冲，然后通过旋转机构使细胞位姿调整芯片旋转，带动固定于细胞位姿调整芯片上的卵细胞水平旋转直至所有的细胞膜都被充分刺激；

(2) 卵细胞去核阶段：对激活后的卵细胞进行去核；

(3) 重构胚电融合阶段：在将核供体注入去核卵细胞构成重构胚后，将重构胚固定在细胞位姿调整芯片上，移动两个液态金属毛细微针电极呈 180° 夹角紧贴重构胚，并使核供体与去核卵细胞的接触面与电场方向垂直，通入高压直流脉冲，使核供体和去核卵细胞发生电融合，形成重组胚胎；

(4) 重组胚胎培养阶段：将电融合后的重组胚胎置于两个金属平行板微电极间，给金属平行板微电极通入低频交流微电流信号。

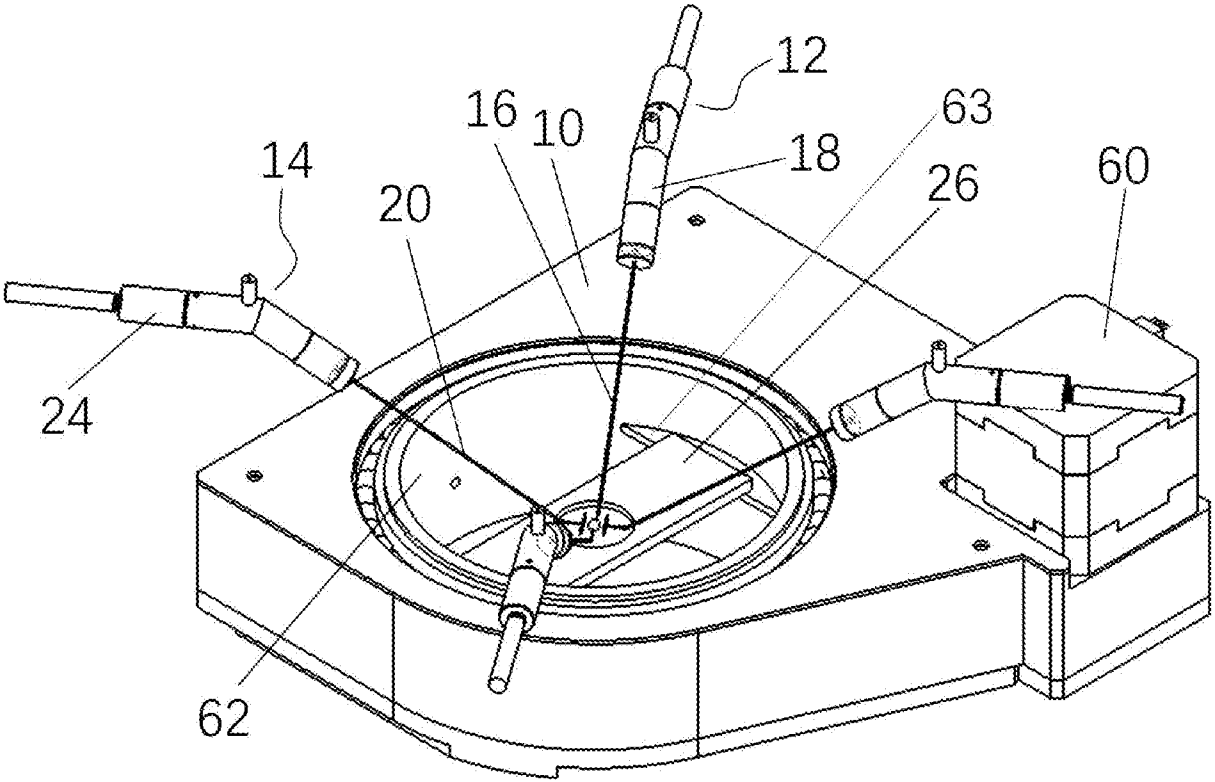


图 1

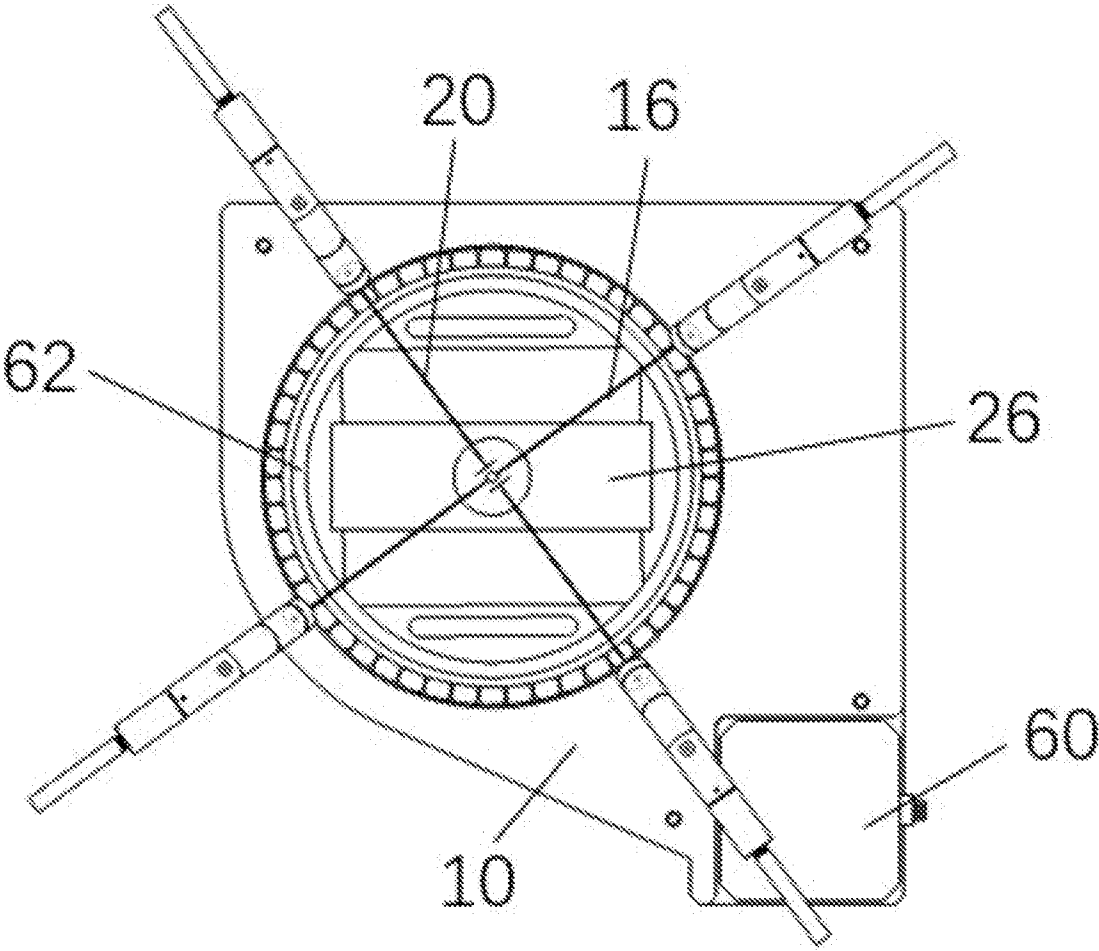


图 2

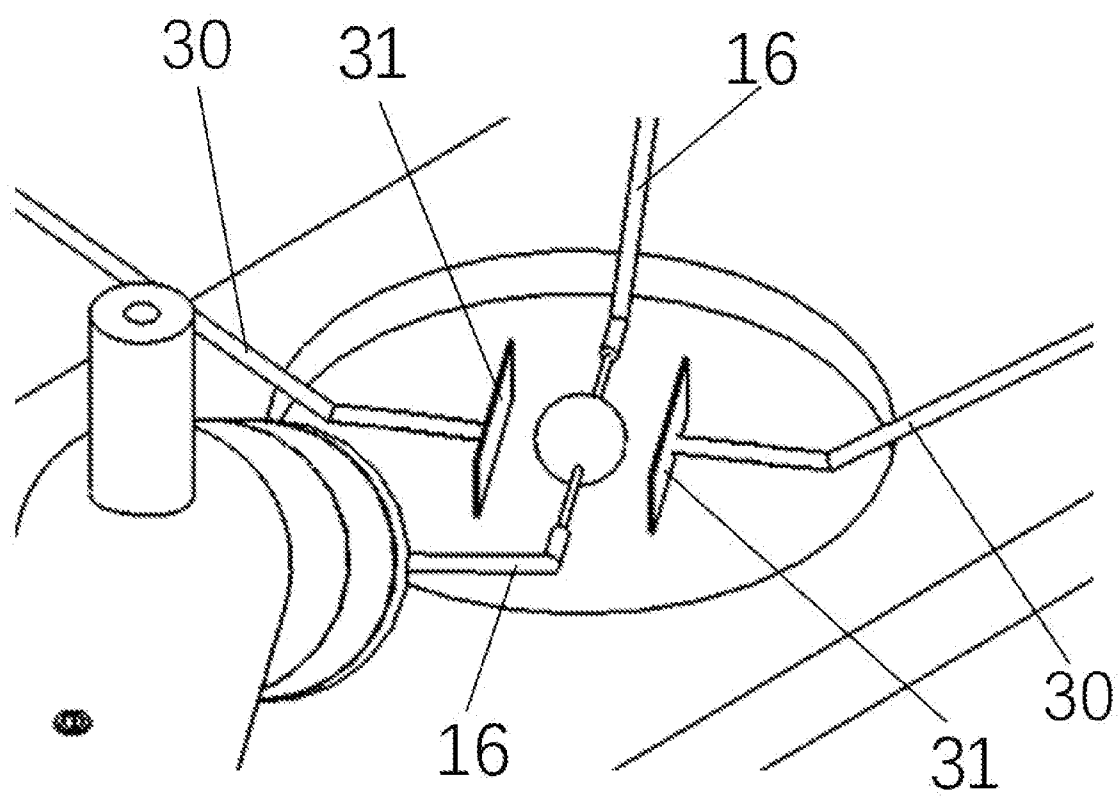


图 3

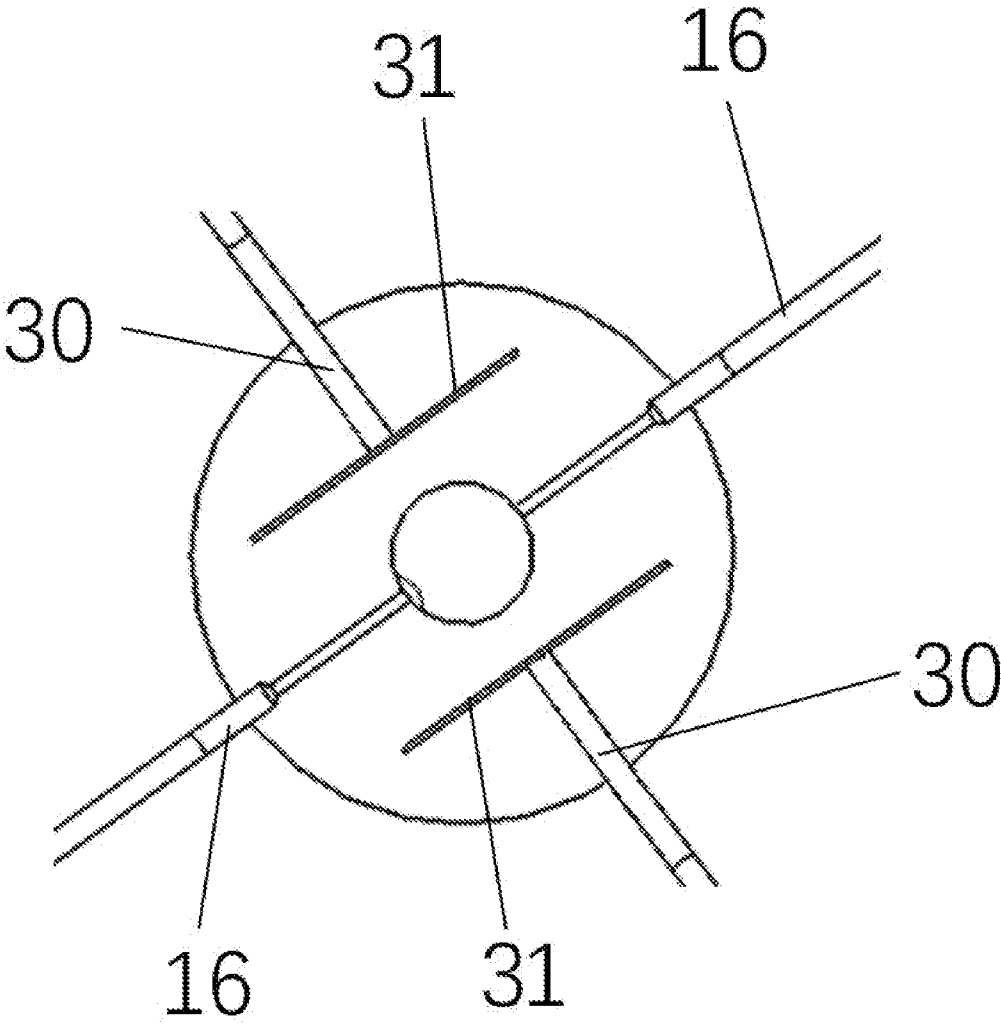


图 4

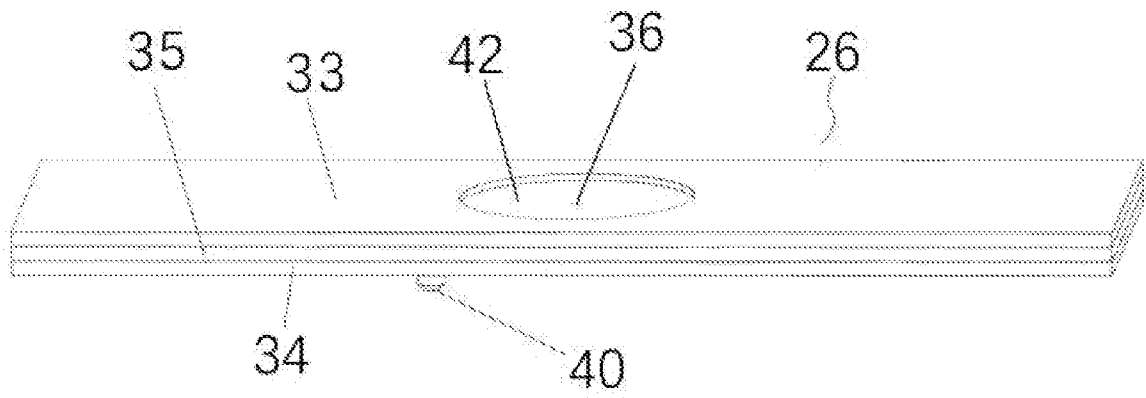


图 5

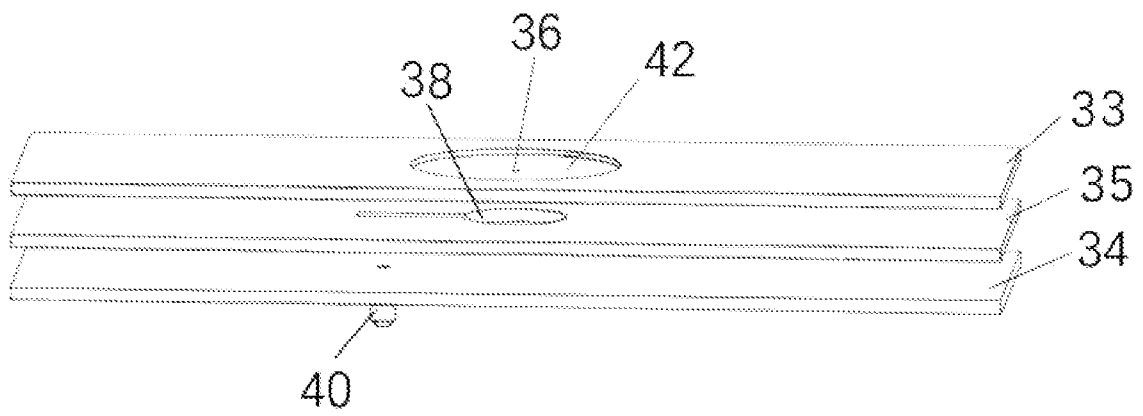


图 6

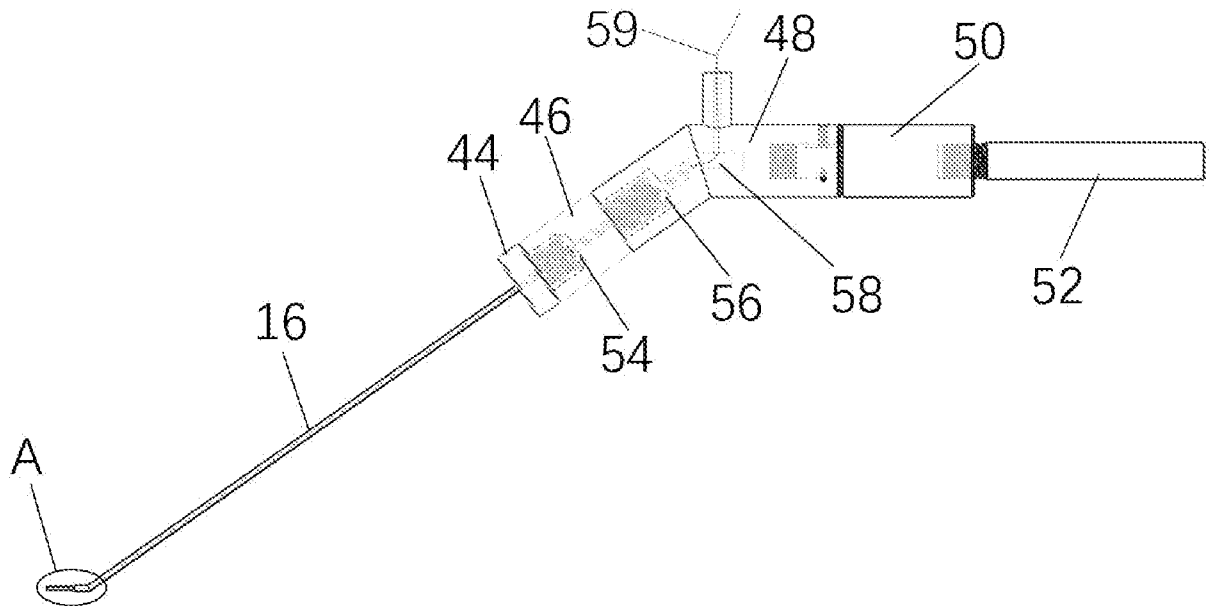


图 7

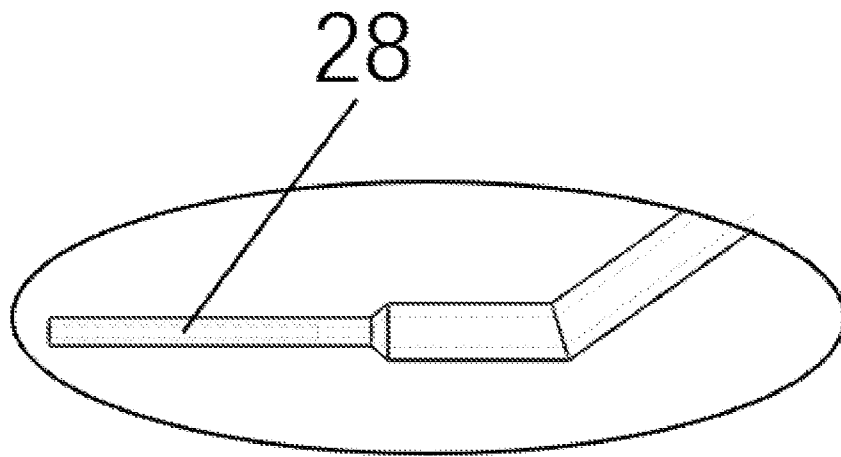


图 8

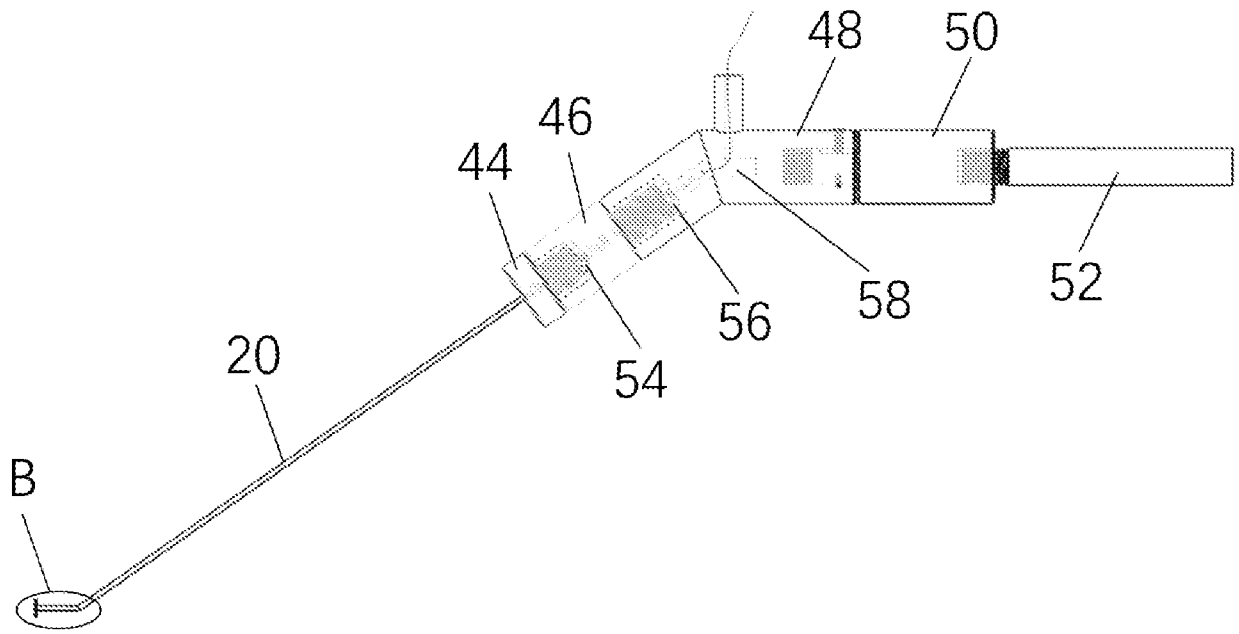


图 9

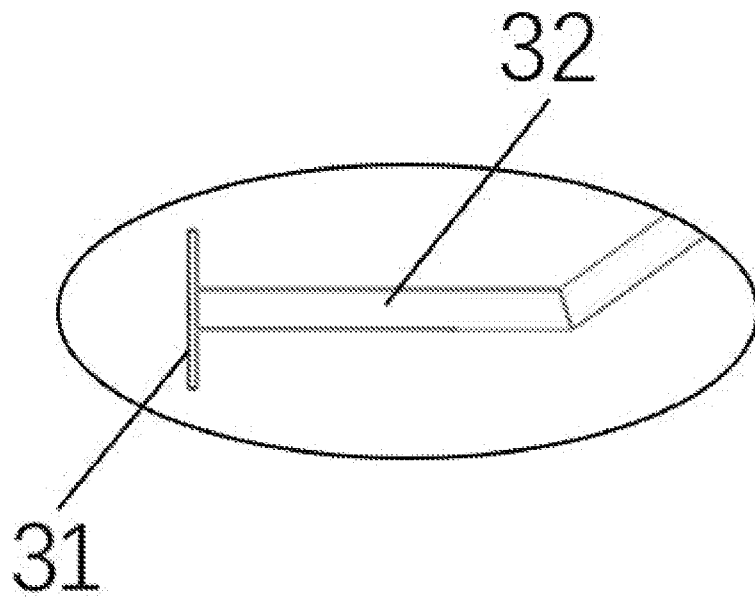
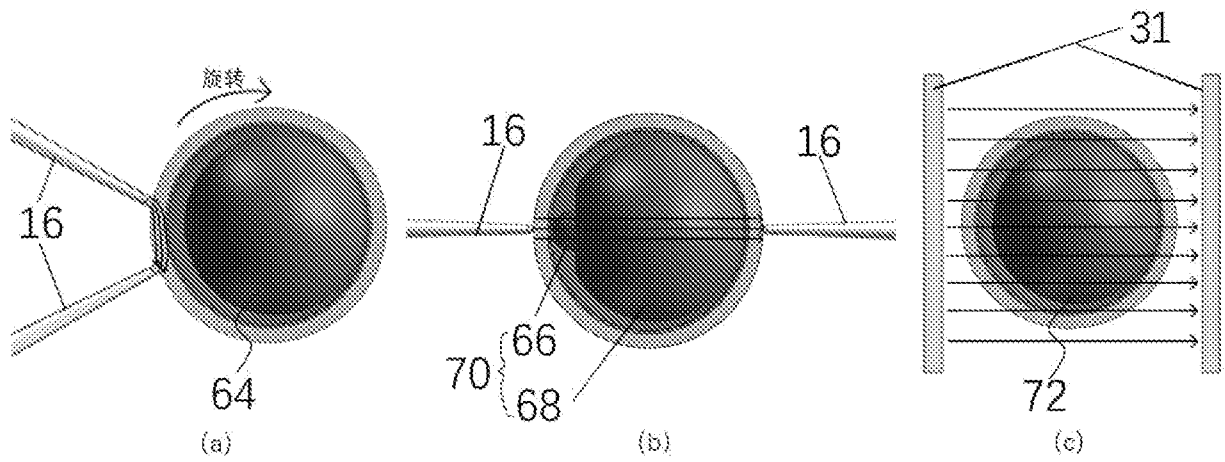
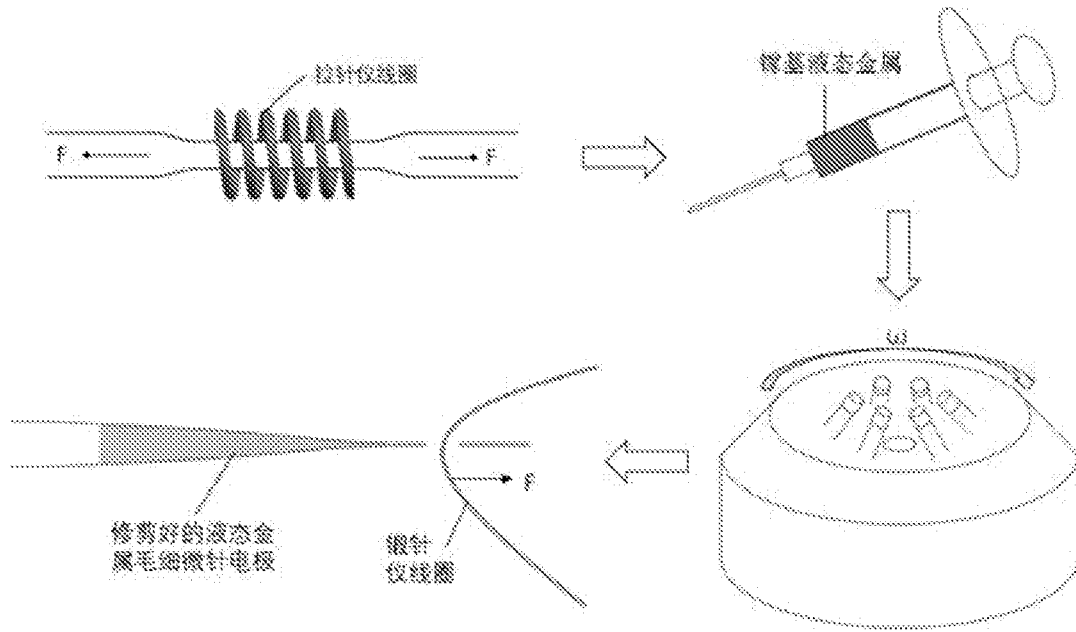


图 10



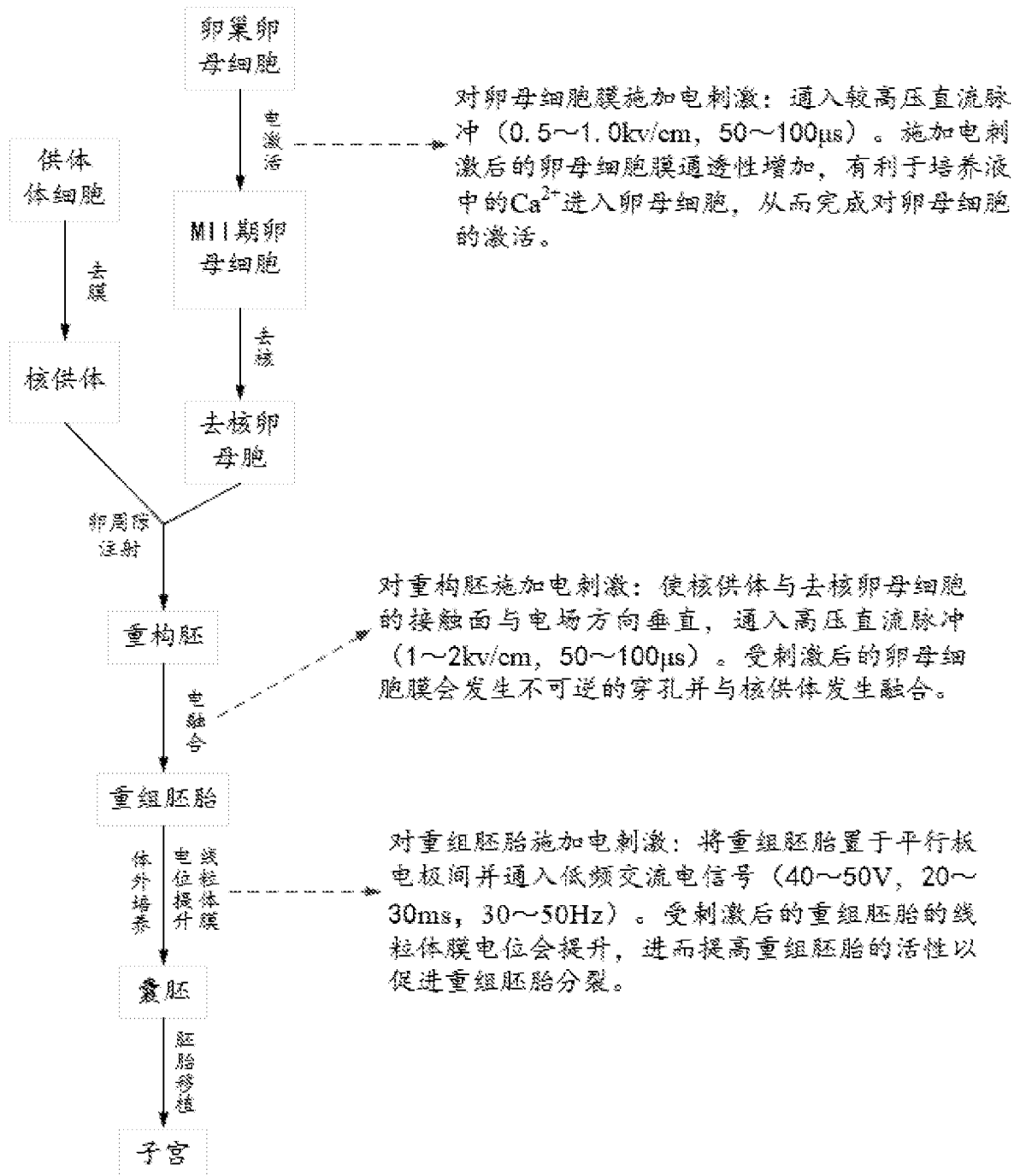


图 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/103160

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 3/00(2006.01)i; C12M 1/42(2006.01)i; C12N 13/00(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)

C12M C12N

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; CNMED; CNKI; CNTXT; 百度学术和检索词: 电刺激, 激活, 去核, 融合, 平行板, 针, 卵细胞, 卵母细胞等; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; PUBMED; ISI WEB OF SCIENCE和检索词: electrostimulation, ectrical stimulus, stimulation, activat+, enucleat+, interfus+, fusion, clinograph, parallel plate?, needle?, oocyte?, egg cell?, germ cell?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 108660072 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 16 October 2018 (2018-10-16) see description, paragraphs [0010]-[0076], figures 1-6	1-10
Y	CN 102766655 A (INSTITUTE OF ANIMAL SCIENCES OF CAAS) 07 November 2012 (2012-11-07) see description, paragraphs [0005] to [0069]	1-10
A	CN 104140927 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 12 November 2014 (2014-11-12) see description, specific embodiments	1-10
A	CN 209778886 U (NORTHWEST INSTITUTE OF PLATEAU BIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 13 December 2019 (2019-12-13) see description, specific embodiments	1-10
A	CN 208532756 U (WENSHI FOOD GROUP CO., LTD.) 22 February 2019 (2019-02-22) see description, specific 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

“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

12 March 2021

Date of mailing of the international search report

08 April 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/103160

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	108660072	A	16 October 2018	None	
CN	102766655	A	07 November 2012	None	
CN	104140927	A	12 November 2014	None	
CN	209778886	U	13 December 2019	None	
CN	208532756	U	22 February 2019	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/103160

A. 主题的分类 C12M 3/00(2006.01)i; C12M 1/42(2006.01)i; C12N 13/00(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) C12M C12N 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; CNMED; CNKI; CNTXT; 百度学术和检索词: 电刺激, 激活, 去核, 融合, 平行板, 针, 卵细胞, 卵母细胞等; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; PUBMED; ISI WEB OF SCIENCE和检索词: electrostimulation, ectrical stimulus, stimulation, activat+, enucleat+, interfus+, fusion, clinograph, parallel plate?, needle?, oocyte?, egg cell?, germ cell?等																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108660072 A (苏州大学) 2018年 10月 16日 (2018 - 10 - 16) 参见说明书第[0010]-[0076]段, 图1-6</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102766655 A (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所) 2012年 11月 7日 (2012 - 11 - 07) 参见说明书第[0005]-[0069]段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104140927 A (苏州大学) 2014年 11月 12日 (2014 - 11 - 12) 参见说明书具体实施方式</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 209778886 U (中国科学院西北高原生物研究所) 2019年 12月 13日 (2019 - 12 - 13) 参见说明书具体实施方式</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 208532756 U (温氏食品集团股份有限公司) 2019年 2月 22日 (2019 - 02 - 22) 参见说明书具体实施方式</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 108660072 A (苏州大学) 2018年 10月 16日 (2018 - 10 - 16) 参见说明书第[0010]-[0076]段, 图1-6	1-10	Y	CN 102766655 A (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所) 2012年 11月 7日 (2012 - 11 - 07) 参见说明书第[0005]-[0069]段	1-10	A	CN 104140927 A (苏州大学) 2014年 11月 12日 (2014 - 11 - 12) 参见说明书具体实施方式	1-10	A	CN 209778886 U (中国科学院西北高原生物研究所) 2019年 12月 13日 (2019 - 12 - 13) 参见说明书具体实施方式	1-10	A	CN 208532756 U (温氏食品集团股份有限公司) 2019年 2月 22日 (2019 - 02 - 22) 参见说明书具体实施方式	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
Y	CN 108660072 A (苏州大学) 2018年 10月 16日 (2018 - 10 - 16) 参见说明书第[0010]-[0076]段, 图1-6	1-10																		
Y	CN 102766655 A (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所) 2012年 11月 7日 (2012 - 11 - 07) 参见说明书第[0005]-[0069]段	1-10																		
A	CN 104140927 A (苏州大学) 2014年 11月 12日 (2014 - 11 - 12) 参见说明书具体实施方式	1-10																		
A	CN 209778886 U (中国科学院西北高原生物研究所) 2019年 12月 13日 (2019 - 12 - 13) 参见说明书具体实施方式	1-10																		
A	CN 208532756 U (温氏食品集团股份有限公司) 2019年 2月 22日 (2019 - 02 - 22) 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 “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 2021年 3月 12日		国际检索报告邮寄日期 2021年 4月 8日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 穆飞航 电话号码 (86-10) 62412295																		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/103160

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	108660072	A	2018年 10月 16日	无	
CN	102766655	A	2012年 11月 7日	无	
CN	104140927	A	2014年 11月 12日	无	
CN	209778886	U	2019年 12月 13日	无	
CN	208532756	U	2019年 2月 22日	无	