

닭 수정란 다른 달걀 껍데기로 옮겨도 부화·배양 기술 특허 등록

- 수정란 77개 중 51개 부화...부화율 약 70%
- 같은 나이대 닭이 낳은 달걀 활용...연구용 달걀 확보 부담 줄여
- 배아 관찰·세포 이식 등 닭 생명공학 연구에 활용 기대

농촌진흥청(청장 이승돈)은 닭 배아 관찰과 세포 이식 등 생명공학 연구에 사용하는 ‘대리난각 배양’ 기술을 개선하고, 관련 기술의 특허 등록을 마쳤다고 밝혔다.

대리난각 배양은 수정란 껍데기를 열어 난황과 난백을 다른 달걀 껍데기로 옮긴 뒤, 병아리가 부화할 때까지 키우는 방법이다. 달걀 껍데기 윗부분을 투명한 랩으로 덮기 때문에 배아가 자라는 모습을 살펴보기 쉽다. 수정란에 세포를 넣거나 일부 세포를 떼어내는 등 다양한 생명공학 기술도 적용할 수 있다.

기존에는 약 60g인 수정란을 옮겨 키우려면 이보다 약 30g 무거운 90g 안팎의 달걀이 필요했다. 일반적인 달걀보다 훨씬 큰 알을 따로 구해야 해 연구에 필요한 달걀을 안정적으로 확보하기 어려웠다.

연구진은 이러한 문제를 해결하기 위해 같은 나이대의 닭 무리에서 생산된 달걀만으로 수정란을 배양하는 방법을 연구했다. 특별히 큰 달걀을 준비하는 대신, 같은 닭 무리에서 나온 달걀 가운데 수정란보다 약 10g 무거운 알을 골라 새로운 껍데기로 활용했다.

그 결과, 옮긴 수정란은 초기 배아 단계부터 부화할 때까지 안정적으로

자랐다. 수정란 77개 가운데 51개가 병아리로 부화해 약 70%의 부화율을 보였다. 특별히 큰 달걀을 구하지 않아도 같은 닭 무리에서 나온 달걀만으로 수정란을 옮겨 키울 수 있음을 확인한 것이다.

이번 기술을 활용하면 수정란과 이를 옮겨 닭을 달걀을 같은 닭 무리에서 확보할 수 있어 연구용 달걀을 준비하는 부담을 줄일 수 있다. 또한, 닭 배아에 세포를 이식하는 생명공학 연구와 유용한 특성을 가진 닭을 개발하는 연구에도 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

이번 연구 결과는 국제학술지 「Scientific Reports」에 게재*됐으며, 관련 기술은 지난 1월 특허 등록**을 마쳤다.

*열종복원 등 보조 번식 기술을 위해 개선된 대리난각 배양 시스템(2024년 5월 게재, IF 4.6)

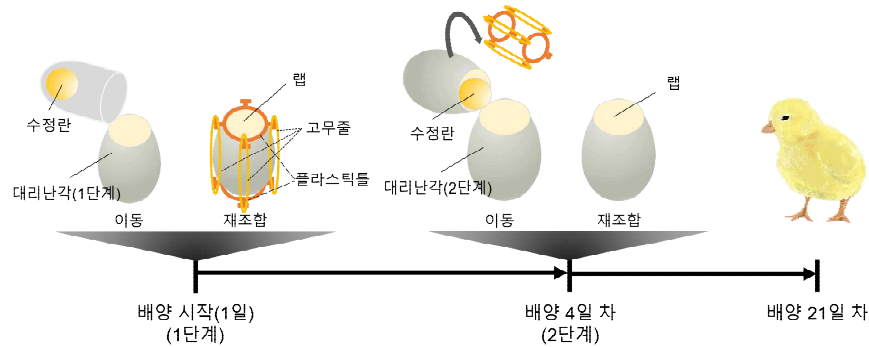
**동일 연령 축군 계란 유래 대리난각 배양 시스템(등록번호: 10-2913055-0000)

농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오유전체과 이경태 과장은 “이번 연구는 특별히 큰 달걀을 따로 구하지 않고도 약 70%의 부화율을 확인했다는 데 의미가 있다.”라며 “앞으로 세포 이식 등 생명공학 연구와 유용한 특성을 가진 닭 개발 연구에 활용하겠다.”라고 밝혔다.

붙임. 닭 수정란 대리난각 배양 기술

담당 부서	국립축산과학원 동물바이오유전체과	책임자	과 장	이경태 (063-238-7250)
		담당자	연구사	양 현 (063-238-7263)
	농촌진흥청에서 연구·개발한 농업의 모든 것  농사로			

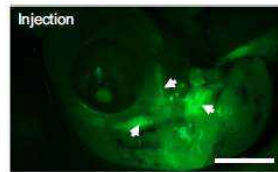
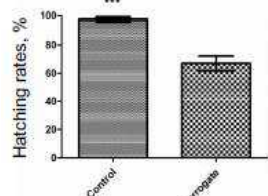
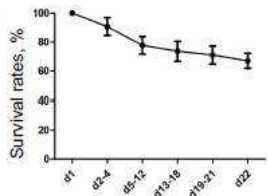
□ 배양 과정



- * 대리난각 배양은 산란된 수정란의 난각을 깨뜨려 난황과 난백을 대리란에 옮겨 배양하는 방법으로 2단계로 이루어짐
- * (1단계) 배양 시작(1일차)부터 4일 차까지의 기간 동안 배양하는 단계로, 대리란 제작 → 수정란의 난황, 난백을 대리란으로 이동 → 랩으로 밀봉 후 플라스틱과 고무줄로 고정 → 4일 차까지 배양함
- * (2단계) 배양 4일 차에 생존 및 정상적으로 발달한 수정란을 병아리 부화까지 배양하는 단계로, 대리란 제작 → 생존한 수정란의 난황, 난백을 대리란으로 이동 → 랩으로 밀봉 → 병아리 부화까지 배양함

◆ 기존의 대리난각 배양 기술은 2단계 배양에서 수정란보다 약 30 g 정도 무거운 달걀 또는 커다란 칠면조알을 대리란으로 사용한 반면, 개선한 기술에서는 같은 나이 대의 한 축군에서 생산된 달걀을 수정란과 대리란으로 사용해 대리난각 배양을 수행하고 병아리가 안정적으로 부화되는 결과를 확인하였음

□ 대리난각 배양 성적 등



대리난각 배양 중 배아 생존율

대리난각 배양 시 병아리 부화율

생명공학기술 적용

□ 게재논문(표지)

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

OPEN Improved surrogate eggshell incubation system for assisted reproductive technologies such as cloning, genome modification, and de-extinction efforts

Hyeon Yang^{1,2}, Bo Ram Lee¹, Seunghoon Lee¹, Sun A. Ock¹, Keon Bong Oh¹, Yong Jin Jo¹, Poongyeon Lee¹, Haesun Lee¹, Jae Yong Han² & Sung June Byun^{1,2}

A germinal disc located on the egg yolk surface drives genetic modification. Windowed and surrogate eggshell incubation methods have been developed, but these exhibit limited abilities to generate transgenic chickens. In the present study, we investigated the frequency of observing the germinal disc according to the preincubation positioning direction and time and found that it depended on those conditions, but only a few chicks (2.8–5.6%) hatched using the windowed method. Then, we attempted to improve surrogate method via one- or two-step procedures. All eggs, including surrogates that were 10 g heavier than the donor eggs, were obtained from a poultry flock of the same age. With the one-step surrogate method, where the donor egg was transferred only once through a 3.5 cm hole on the point end, at the first day of preincubation, into the surrogate egg, the survival rate at day 4 was 30.8%, and the hatching rate was 11.8%. With the two-step surrogate method (transfer was on the 1st and 4th day of incubation), the survival rate at day 4 was improved to 90.7%, and a hatching rate of 70.0% was achieved. Therefore, this method can be effective for *in ovo* artificial incubation.

Germinal disc at Eyal-giladi and Kochav (EGK) stage X appears on the surface of the egg yolk, and eggshells make it physically impossible to directly observe and approach the disc. Thus, many attempts based on *in ovo* embryonic incubation have been conducted to reach the disc and modify the genome in chicken embryos¹.

A windowed eggshell incubation system, which involves artificially making a 1-cm-diameter hole on top of eggshells and then covering it with sealing material, is a simple method². On the other hand, a surrogate eggshell incubation system is a relatively complex method that involves transferring the egg yolk into surrogate eggshells once or twice. In the surrogate method, two types of surrogate eggs (the first chicken and second turkey eggs are approximately 4 g and 40 g heavier than the donor eggs, respectively) are used in System II and III^{3,4}. Based on the windowed and surrogate eggshell incubation systems, assisted reproductive technologies can have potential in facilitating and enhancing via visualizing and enucleating the avian ovum, a crucial step in developing cloning birds, genome-modified chickens, and even in de-extinction efforts^{5,6}.

The hatching rates by the windowed method have been improved by the development of various strategies^{7,8}. However, few studies regarding location of the disc based on imaging methods are available^{9–12}. Moreover, it is still difficult to determine the location of the disc in freshly laid fertile eggs within the 1-cm-diameter hole, which results from uncontrolled movement of egg yolk. Additionally, the surrogate method, which shows impressive hatchability³, is limited by the requirement of a second surrogate egg. In case of using the second surrogate egg obtained from chickens, the surrogate egg which is at least 25–30 g heavier than donor egg was required in System III^{3,4}. These very large eggs must be obtained from other poultry flocks. However, the eggs externally obtained from other flocks are not perfectly free of avian transmissible and transovarian transmitted diseases such as *Salmonella*¹³ and *Mycoplasma*¹⁴.

¹Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Republic of Korea. ²Department of Agricultural Biotechnology and Research Institute of Agriculture and Life Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea. [✉]email: pcs1778@korea.kr