

**И.М. Зырянова**

Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Московская обл., г. Подольск, пос. Дубровицы, Россия

✉ mirsimzyrianova@mail.ruПоступила в редакцию:
30.05.2023Одобрена после рецензирования:
15.08.2023Принята к публикации:
28.08.2023**Irina M. Zyrianova**

Federal Scientific Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Dubrovitsy, Podolsk district, Moscow region, Russia

✉ mirsimzyrianova@mail.ruReceived by the editorial office:
30.05.2023Accepted in revised:
15.08.2023Accepted for publication:
28.08.2023

Выделение геномной ДНК из куриных яичных белков

РЕЗЮМЕ

Яйца домашней птицы содержат высококачественные белки, жиры, витамины и минеральные вещества, что делает их незаменимым продуктом в питании человека. Яичные белки обладают исключительными пенообразующими, эмульгирующими, желеобразующими свойствами, а также свойством быстрого сворачивания при повышении температуры, что делает их особенно популярными для использования в выпечке. Накопленные до настоящего времени знания об яичных белках привели к устойчивому мнению, что в них нет ни клеток, ни ДНК. Однако это исследование демонстрирует возможность экстракции куриной геномной ДНК из белка куриных яиц. Для выделения ДНК использовали внешний жидкий белок куриного яйца и на начальном этапе прежде всего применили белковую деградацию образцов протеиназой трипсин. Количество выделенной ДНК составило от 0.3880 ± 0.0348 до 0.6380 ± 0.0545 мкг/мл образца белка. ПЦР-тест и на основе 18S рибосомальной РНК показал, что ДНК, выделенная из внешнего жидкого белка яиц, содержит геномную ДНК птиц, а клонирование и секвенирование специфического для птиц ПЦР-фрагмента показали, что эта ДНК принадлежит курам (*Gallus gallus*). Кроме того, окрашивание красителем Хекст 33342 показало наличие в образцах клеточных ядер. Таким образом, это исследование демонстрирует, что белки куриных яиц содержат куриную геномную (ядерную) ДНК и клеточные ядра, значит, и клетки.

Ключевые слова: куриные яичные белки, выделение ДНК, ПЦР-тест, 18S рибосомальная РНК, окрашивание клеточных ядер

Для цитирования: Зырянова И.М. Выделение геномной ДНК из куриных яичных белков. *Аграрная наука*. 2023; 374(9): 38–42. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-374-9-38-42>

© Зырянова И.М.

Chicken nuclear DNA in chicken egg whites

ABSTRACT

Poultry eggs contain high-quality proteins, fats, vitamins and minerals, which makes them an indispensable product in human nutrition. Egg whites have exceptional foaming, emulsifying, gelling, and heat setting properties, making them popular for use in baked goods. The knowledge accumulated so far about egg whites has now settled on a stable opinion that there are no cells, and no DNA, in them. However, this study demonstrates the possibility of extracting chicken genomic DNA from the outer thin whites of chicken eggs. For DNA extraction, foremost, protein degradation of the samples by trypsin was used. The amount of isolated DNA ranged from 0.3880 ± 0.0348 to 0.6380 ± 0.0545 µg/ml of the white sample. A PCR test based on 18S ribosomal DNA showed that the DNA isolated from the outer thin white contained avian genomic DNA. Furthermore, cloning and sequencing of the bird-specific PCR fragment showed that this DNA belongs to chickens (*Gallus gallus*). In addition, staining with Hoechst 33342 showed the presence of cell nuclei in the samples. Therefore, this study demonstrates that chicken egg whites contain chicken genomic (nuclear) DNA and cell nuclei (i. e., and cells).

Key words: chicken egg whites, DNA extraction, PCR test, 18S rRNA, cell nuclei staining

For citation: Zyrianova I.M. Chicken nuclear DNA in chicken egg whites. *Agrarian science*. 2023; 374(9): 38–42 (In Russian). <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-374-9-38-42>

© Zyrianova I.M.

Введение/Introduction

Куриные яйца являются популярными в питании человека, так как содержат высококачественные белки, жиры, витамины и минеральные вещества, необходимые для человеческой жизнедеятельности [1, 2]. Основными компонентами яиц являются скорлупа (8–11%), белок (56–63%) и желток (27–32%) [1, 3]. Яичный белок состоит из воды (87,9–89,4%), белков (9,7–10,6%), углеводов (0,4–0,9%), золы (0,5–0,6%) и следов липидов [3]. Основными среди белков являются овальбумин (54–66%), овотрансферрин (12–13%), овомукоид (9,5–11%), лизоцим (2,3–4,5%) и овомуцин (1,5–3,5%) [1]. К настоящему времени с развитием протеомики в яичных белках обнаружено всего 153 молекулы протеинов [4].

Яичные белки обладают быстрой свертываемостью при повышении температуры, а также имеют хорошие пенообразующие, эмульгирующие, гелеобразующие свойства, что сделало их незаменимым ингредиентом в выпечке хлебобулочных изделий [1]. Перечисленные свойства яичных белков интенсивно изучаются [5, 6]. В настоящее время всё большее внимание уделяется применению яичного белка в разработке биоматериалов, особенно медицинских [7].

Несмотря на такой интерес к яичным белкам, ничего не упоминается о попытках выявления ДНК в яичных белках. Более того, сложилось устойчивое мнение, что в яичных белках не может быть найдена ДНК. О яичной скорлупе думали схожим образом, пока не было продемонстрировано, что яичная скорлупа содержит геномную ДНК [8, 9]. Этот факт привел к мысли, что яичные белки также могут содержать геномную ДНК.

Чтобы прояснить это предположение, кратко остановимся на основных этапах формирования яйца.

Формирование яйца происходит в яйцеводе после овуляции ооцита [10, 11]. Во время созревания ооцита происходит накопление в нем желтка, который является содержимым цитоплазмы ооцита. В цитоплазме, как известно, ядерной ДНК быть не может. В желтке также отсутствуют и митохондрии, то есть митохондриальной ДНК нет, поскольку митохондрии располагаются в цитоплазматическом матриксе только вокруг ядра зародышевого диска [10, 12, 13].

Итак, после созревания и овуляции ооцит захватывается воронкой яйцевода, где и происходит оплодотворение [10, 11]. После захвата воронкой ооцит (или оплодотворенная яйцеклетка) дополнительно покрывается оболочкой, наружным перивителлиновым слоем, халазами, белком, перивителлиновым, скорлуповой оболочкой и кальцинированной оболочкой, соответственно, по мере продвижения яйцеклетки по частям яйцевода: воронка яйцевода, магнум, перешеек, матка, влагалище [10, 11, 14].

Как указывалось выше, было обнаружено, что скорлупа яиц содержит ядерную ДНК [8, 9]. Яичная скорлупа накапливается в матке яйцевода железами яичной скорлупы [11]. Синтез же яичных белков происходит в яйцеводе, но в другом его отделе — в магнуме, а именно клетками его трубчатых желез [15, 16]. Это приводит к мысли, что яичные белки накапливаются схожим образом, как и яичная скорлупа, но в другом отделе яйцевода. Подобным образом возможно и накопление ДНК в яичных белках, как это происходит в яичной скорлупе [8, 9]. Таким образом, была выдвинута гипотеза, что яичные белки должны содержать клетки и из яичных белков можно выделить ядерную (геномную) ДНК.

Важность исследования заключается в том, что подтверждение наличия в куриных белках геномной ДНК кур (а значит, и клеток) приведет к более углубленному их изучению, это повлияет на развитие использования яичных белков в 3D-технологиях, разработки биополимеров [7, 17].

Цели исследования — разработка метода выделения ДНК из куриных яичных белков и доказательство наличия в них куриной геномной ДНК.

Материалы и методы исследований / Materials and methods

В работе использовались яйца трех пород кур и одной коммерческой линии (всего 24 яйца). Яйца итальянской куропатчатой, пушкинской и род-айленд пород из «Генетической коллекции редких и исчезающих пород кур» (Санкт-Петербург, Россия) собирали в течение трех дней и хранили при температуре 4–8 °С. Яйца коммерческих несушек I категории (ГОСТ 31654-2012¹) линии Ломанн ЛСЛ-Классик производства ОАО «Птицефабрика «Окская»» (г. Рязань, Россия) покупали в продовольственном магазине в пределах срока годности.

Перед использованием яйца мыли под проточной водой, потом промывали дистиллированной водой и сушили при комнатной температуре. Затем яйца дезинфицировали 70%-ным этанолом, снова высушивали при комнатной температуре и далее разбивали. Содержимое яиц (белок и желток) помещали в чашку Петри. Серологической пипеткой отбирали по 3 мл внешнего жидкого белка в стерильную пробирку, после чего добавляли трипсин (Трипсин 1:250, Sigma, США), до концентрации 0,1 г/мл в растворе Версена («ПанЭко», Россия) в количестве 2 мл. Образцы энергично перемешивали и инкубировали при 37 °С в течение 24 часов. Далее образцы центрифугировали при 9146 g (Digicen 21R, Испания) при комнатной температуре в течение 20 мин. Супернатант удаляли, а осадок растворяли в 0,1 мл фосфатно-солевого буфера pH 7,2–7,6 (PBS) («Эко-Сервис», Россия). Для выделения ДНК использовали набор Extract DNA Blood («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Концентрацию и чистоту ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000 (Thermo Scientific). Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad (<http://www.graphpad.com>).

Для идентификации ДНК птиц и млекопитающих использовали ПЦР-тест на основе 18S рибосомальной РНК (pPHK) [18]. Амплификацию проводили с использованием ДНК-полимеразы Phusion Hot Start II High-Fidelity (Thermo Scientific). Условия амплификации: сначала делали денатурацию при 95 °С в течение 3 мин., затем проводили 40 циклов по схеме: денатурация — при 95 °С в течение 15 сек., отжиг — при 58 °С в течение 15 сек., элонгация — при 72 °С в течение 10 сек. ПЦР-фрагменты анализировали на 1,7%-ном агарозном геле с использованием буфера для электрофореза трис-ацетат-ЭДТА. Агарозный гель окрашивали бромистым этидием и анализировали с помощью системы визуализации UVITEK-Cambridge. В качестве ДНК-маркера использовали DNA Ladder длиной 100 + п.н. («Евроген», Россия).

Специфические для птиц ПЦР-фрагменты длиной 97 п. н. [18] клонировали с использованием набора для клонирования CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo

¹ ГОСТ 31654-2012 Яйца куриные пищевые. Технические условия. М.: Стандартинформ. 2012.

Scientific). Клоны были секвенированы методом Сэнгера («Евроген», Россия). Последовательности анализировали с помощью Gene Runner (версия 6.5.52) и NCBI BLAST. Для сравнения использовали последовательности 18S рибосомальной РНК (рPHK) *Gallus gallus* из GenBank: MK279380.1, MK279379.1, MK279378.1, XR_003078042.1, MG967540.1, KT445934.2, XR_006936397.1, XR_006936393.1, CP_006931663.1, CP_005840274.1, XR_005840272.1, MT889761.1, MT808178.1, HQ873432.1, FM165414.1, DQ018752.1, AF173612.1 и D38360.1.

Для окрашивания клеточных ядер использовали осадок, полученный после обработки трипсином, как описано выше, но растворенный в 0,1 мл PBS с добавлением красителя Хекста 33342 (Hoechst 33342). Далее суспензию инкубировали при комнатной температуре в течение 5–10 мин.

Хекст 33342 был приготовлен в соответствии с протоколом Thermo Scientific. После инкубации 0,02 мл суспензию наносили на предметное стекло и проводили анализ флуоресцентной микроскопии при помощи микроскопа Nikon Eclipse Ti с использованием кубического флуоресцентного фильтра Nikon Dm400 для DAPI (EX 340–380, BA 435–485).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

В яичном белке можно выделить четыре различных слоя (рис. 1): внешний жидкий белок, густой белок (или внешний густой белок), внутренний жидкий белок (не показан на рис. 1) и халаза (или внутренний густой белок). Их пропорции составляют около 23,3%, 57,3%, 16,8% и 2,7% соответственно, что может варьироваться в зависимости от породы и окружающей среды [2].

Рис. 1. Разбитое куриное яйцо в чашке Петри. Фото автора
Fig. 1. A cracked chicken egg in a Petri dish. Author's photo



Таблица 1. Количество выделенной ДНК
Table 1. DNA yields

Породы и линии	Средние значения с 95%-ным доверительным интервалом	
	количество (мкг /мл наружного жидкого белка)	чистота (A260/A280)
Итальянская куропатчатая	0,6380 ± 0,0545	1,4040 ± 0,0232
Пушкинская	0,4500 ± 0,0577	1,5540 ± 0,0786
Род-Айленд	0,4700 ± 0,0577	1,4820 ± 0,0750
Ломанн ЛСЛ-Классик	0,3880 ± 0,0348	1,3920 ± 0,0904

Вязкость жидкого белка значительно меньше, чем густого, из-за меньшего содержания овомуцина — гелеобразного гликопротеина [2]. В связи с этим было решено использовать внешний жидкий белок, так как ожидалось, что его меньшие гелеобразующие свойства будут более выгодными в преодолении вязкости образцов.

Для выделения ДНК из яичного белка в первую очередь необходимо решить проблему деградации протеинов. Использовали сериновую протеиназу трипсин. Концентрацию трипсина увеличивали (постепенно) до полного визуального преодоления вязкости образцов и появления легкого осадка на дне пробирки после центрифугирования.

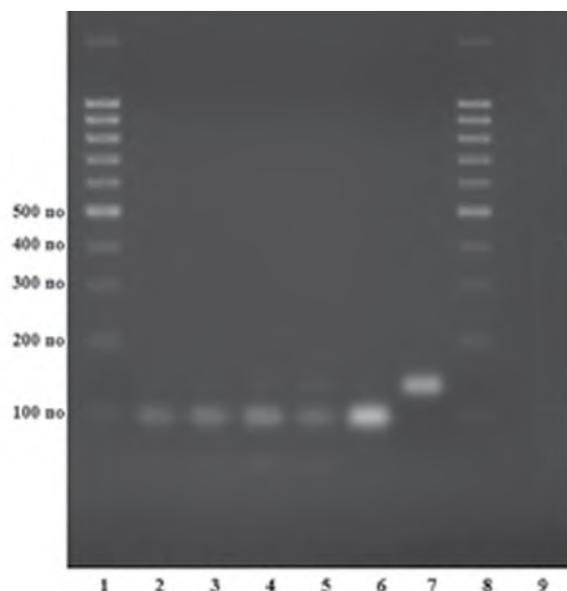
Средние значения количества выделенной ДНК приведены в таблице 1.

Непарный *t*-критерий показал статистически значимую разницу ($p < 0,05$) для итальянских куропатчатых и Ломанн ЛСЛ-Классик образцов, а также для итальянской куропатчатой и пушкинской породы образцов.

Чистота образцов ДНК в большинстве случаев оказалась невысокой (табл. 1), а их различие между собой считается статистически незначимым ($p > 0,05$; непарный *t*-критерий с доверительным интервалом 95%). Однако такой чистоты было достаточно для проведения ПЦР (рис. 2). Чистота выделенной ДНК оказалась не столь высокой, вероятно, по причине неизвестных взаимодействий ДНК с содержимым яичного белка. Также, видимо, можно улучшить метод деградации протеинов яичного белка без потери ДНК. Однако наблюдения показали, что при применении большей концентрации трипсина на этапе деградации протеинов яичного белка количество выделенной из образцов ДНК резко падает или ДНК вообще не выделяется.

Рис. 2. Электрофореграмма агарозного геля (1,7%) после ПЦР-теста на основе гена 18S рPHK разных ДНК образцов. Образцы ДНК из внешнего жидкого белка куриного яйца: 2 — итальянская куропатчатая, 3 — пушкинская, 4 — род-айленд, 5 — Ломанн ЛСЛ-Классик; положительные контрольные образцы ДНК: 6 — куриное бедро, 7 — бычья кровь [17]; 1, 8 — маркеры ДНК длины; 9 — негативный контроль ПЦР

Fig. 2. The agarose gel (1.7%) electrophoregram of PCR fragments after 18S rRNA gene testing of different total DNA samples. DNA samples are from outer thin whites of chicken eggs: 2 — Leghorn Partridge, 3 — Pushkin, 4 — Rhode Island Red, and 5 — Lohmann LSL-Classic egg whites; positive control DNA samples: 6 — chicken leg and 7 — cow blood (Zyrianova and Zaripov, 2022); 1, 8 — DNA marker; 9 — PCR negative control



Проверка образцов выделенной ДНК ПЦР-тестом на основе 18S рРНК [18] показала, что эта ДНК содержит геномную ДНК птиц (рис. 2). Необходимость доказательства, что выделенные образцы тотальной ДНК содержат птичью ДНК, очевидна, так как в контаминированных яйцах могут быть обнаружены внутренние патогены. Это могут быть бактерии, например сальмонеллы, которые считаются чуть ли не основными патогенными агентами внутренней контаминации куриных яиц [19].

Известно, что 16S рРНК является аналогом 18S рРНК прокариот. Ген 16S рРНК успешно применялся для диагностики прокариот с помощью ПЦР-тестов на основе этого гена [20], в том числе для выявления сальмонелл [21]. ПЦР-тесты на основе гена 18S рРНК не могут обнаружить прокариоты.

Таким образом, положительный результат теста, используемый в исследовании, указывает на обнаружение птичьей ДНК, тогда как отрицательный результат указывал бы на отсутствие ДНК птиц и возможность присутствия другой ДНК, включая ДНК сальмонеллы. Кроме того, не предполагается, что внутри куриных яиц может находиться какая-либо ДНК других животных, которую можно обнаружить с помощью ПЦР-тестов на основе гена 18S рРНК (например, крупного рогатого скота, овец и т. д.). Таким образом, положительный результат (присутствие ДНК птиц) использованного ПЦР-теста доказывает, что выделенные в исследовании образцы ДНК содержат птичью ДНК (рис. 2).

Хотя на рисунке 2 можно увидеть дополнительно некоторые незначительные фрагменты (что может являться контаминацией) по сравнению с контрольным образцом ДНК из бедренной части курицы коммерческой тушки [18], эксперимент четко подтверждает присутствие ядерной ДНК кур в выделенных образцах ДНК.

Далее специфические для птиц ПЦР-фрагменты размером 97 п. н. [18] были клонированы и секвенированы (GenBank ON005571). Анализ последовательности показал 98,97%-ную идентичность (с одной заменой С17 → Т17) с 18 последовательностями 18S рРНК гена *Gallus gallus* из GenBank. Все эти данные свидетельствуют о том, что выделенные образцы ДНК содержат геномную ДНК кур.

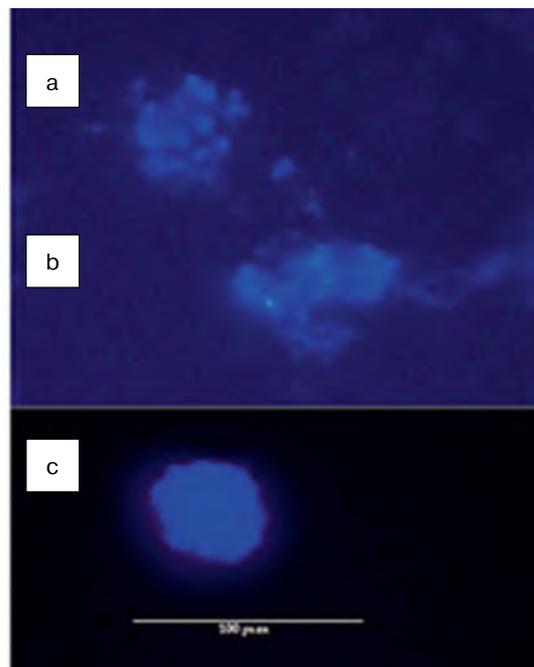
Кроме того, было проведено окрашивание образцов внешних жидких белков яиц красителем Хекст 33342, чтобы увидеть, содержат ли они клеточные ядра. Хекст 33342 широко используется для окрашивания именно ядерной ДНК в клетках и позволяет визуализировать ядра клеток [22]. В результате этого окрашивания в данных образцах были выявлены клеточные ядра (рис. 3). Ядра обнаружены на разных стадиях клеточного цикла: в интерфазе и в стадии митоза (рис. 3а и 3б). Кроме того, в образцах обнаружены некротические ядра (рис. 3с). Стадии ядер определяли по Crowley и др. (2016) [23].

Возможность обнаружения ядер в образцах внешних жидких белков куриных яиц является бесспорным

Рис. 3. Фотографии ядер внешнего жидкого белка после обработки трипсином и окрашивания Хекстом 33342:

а — интерфазное, б — митотическое, в — некротическое

Fig. 3. Images of nuclei of outer thin whites treated with trypsin and stained by Hoechst 33342: a — interphase nucleus, b — mitotic stage nucleus, c — necrotic nucleus



доказательством наличия в них клеток. Обнаруженные в образцах некротические ядра (рис. 3с), скорее всего, образуются из-за обработки образцов трипсином или недостаточной свежести яиц.

До сих пор считалось, что наличие ДНК в птичьих яйцах возможно только в зародышевом диске [24]. Возможность выделения куриной ядерной (геномной) ДНК из куриных яичных белков позволяет по-новому взглянуть на молекулярный состав птичьих яичных белков.

Выводы/Conclusion

Таким образом, была выделена куриная геномная (ядерная) ДНК из внешних жидких белков куриных яиц. Наличие геномной ДНК птиц в выделенных образцах ДНК было подтверждено обнаружением гена 18S рРНК птиц с помощью ПЦР-теста, а секвенирование специфических для птиц ПЦР-фрагментов методом Сэнгера подтвердило, что в выделенных образцах ДНК содержится геномная ДНК кур (*Gallus gallus*). Кроме того, окрашивание образцов внешних жидких белков Хекстом 33342 выявило наличие в них клеточных ядер.

Таким образом, исследование доказывает, что в содержимом белка куриного яйца есть клеточные ядра и ядерная (геномная) ДНК, а значит, и клетки.

Автор несет ответственность за работу и представленные данные.

The author bears responsibility for the work and presented data.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства по науке и высшему образованию Российской Федерации (№ 0445-2021-0005).

FUNDING

This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (No. 0445-2021-0005).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Zhu Y., Vanga S.K., Wang J., Raghavan V. Impact of food processing on the structural and allergenic properties of egg white. *Trends in Food Science & Technology*. 2018; 78: 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.005>

REFERENCES

1. Zhu Y., Vanga S. K., Wang J., Raghavan V. Impact of food processing on the structural and allergenic properties of egg white. *Trends in Food Science & Technology*. 2018; 78: 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.005>

2. Li-Chan E.C.Y., Kim H.-O. Structure and Chemical Compositions of Eggs. Mine Y. (ed.). *Egg Bioscience and Biotechnology*. John Wiley and Sons Inc. 2008; 1–96.
3. Kovacs-Nolan J., Philips M., Mine Yu. Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(22): 8421–8431. <https://doi.org/10.1021/jf050964f>
4. D'Ambrosio C. et al. Exploring the Chicken Egg White Proteome with Combinatorial Peptide Ligand Libraries. *Journal of Proteome Research*. 2008; 7(8): 3461–3474. <https://doi.org/10.1021/pr800193y>
5. Nasabi M., Labbafi M., Mousavi M.E., Madadlou A. Effect of salts and nonionic surfactants on thermal characteristics of egg white proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017; 102: 970–976. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.102>
6. Babaei J., Mohammadian M., Madadlou A. Gelatin as texture modifier and porogen in egg white hydrogel. *Food Chemistry*. 2019; 270: 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.109>
7. Dong X., Zhang Y.-Q. An insight on egg white: From most common functional food to biomaterial application. *Journal of Biomedical Materials Research – Part B: Applied Biomaterials*. 2021; 109(7): 1045–1058. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34768>
8. Strausberger B.M., Ashley M.V. Eggs yield nuclear DNA from egg-laying female cowbirds, their embryos and offspring. *Conservation Genetics*. 2001; 2(4): 385–390. <https://doi.org/10.1023/A:1012526315617>
9. Rikimaru K., Takahashi H.A. A simple and efficient method for extraction of PCR-amplifiable DNA from chicken eggshells. *Animal Science Journal*. 2009; 80(2): 220–223. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2008.00624.x>
10. Okumura H. Avian Egg and Egg Coat. Sasanami T. (ed.). Avian Reproduction. From Behavior to Molecules. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 1001. Singapore: Springer. 2017; 75–90. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3975-1_5
11. Nishio S., Okumura H., Matsuda T. Egg-Coat and *Zona Pellucida* Proteins of Chicken as a Typical Species of Aves. Litscher E.S., Wassarman P.M. (eds.). Extracellular Matrix and Egg Coats. Current Topics in Developmental Biology. Academic Press. 2018; 130: 307–329. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.02.008>
12. Bakst M.R., Howarth B.Jr. The Fine Structure of the Hen's Ovum at Ovulation. *Biology of Reproduction*. 1977; 17(3): 361–369. <https://doi.org/10.1095/biolreprod17.3.361>
13. Perry M.M., Gilbert A.B., Evans A.J. The structure of the germinal disc region of the hen's ovarian follicle during the rapid growth phase. *Journal of Anatomy*. 1978; 127(2): 379–392.
14. Menkhorst E., Selwood L. Vertebrate Extracellular Preovulatory and Postovulatory Egg Coats. *Biology of Reproduction*. 2008; 79(5): 790–797. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.068551>
15. Nys Yu., Guyot N. Egg formation and chemistry. Nys E., Bain M., Van Immerseel F. (eds.). Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products. Woodhead. 2011; 1: 83–132.
16. Muramatsu T., Hiramoto K., Okumura J.-i. Changes in ovalbumin and protein synthesis in vivo in the magnum of laying hens during the egg formation cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Comparative Biochemistry*. 1991; 99(1): 141–146. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90019-a](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90019-a)
17. Balaji P., Murugadas A., Ramkumar A., Thirumurugan R., Shanmugaapriya S., Akbarsha M.A. Characterization of Hen's Egg White To Use It as a Novel Platform To Culture Three-Dimensional Multicellular Tumor Spheroids. *ACS Omega*. 2021; 5(31): 19760–19770. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02508>
18. Zyrianova I.M., Zaripov O.G. 18S ribosomal DNA-based PCR test for avian and mammalian DNA identification in meat products. *Veterinary and Animal Science*. 2022; 15: 100234. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2022.100234>
19. Wales A.D., Davies R.H. A critical review of *Salmonella* Typhimurium infection in laying hens. *Avian Pathology*. 2011; 40(5): 429–436. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.606799>
20. Wellinghausen N. et al. Diagnosis of Bacteremia in Whole-Blood Samples by Use of a Commercial Universal 16S rRNA Gene-Based PCR and Sequence Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; 47(9): 2759–2765. <https://doi.org/10.1128/JCM.00567-09>
21. Trkov M., Avgustin G. An improved 16S rRNA based PCR method for the specific detection of *Salmonella enterica*. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; 80(1): 67–75. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00138-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00138-1)
22. Chazotte B. Labeling Nuclear DNA with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2011; (1). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5557>
23. Crowley L.C., Marfell B.J., Waterhouse N.J. Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016; (9): pdb.prot087205. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087205>
24. Steiner G. et al. Gender determination of fertilized unincubated chicken eggs by infrared spectroscopic imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011; 400(9): 2775–2782. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4941-3>
2. Li-Chan E.C.Y., Kim H.-O. Structure and Chemical Compositions of Eggs. Mine Y. (ed.). *Egg Bioscience and Biotechnology*. John Wiley and Sons Inc. 2008; 1–96.
3. Kovacs-Nolan J., Philips M., Mine Yu. Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(22): 8421–8431. <https://doi.org/10.1021/jf050964f>
4. D'Ambrosio C. et al. Exploring the Chicken Egg White Proteome with Combinatorial Peptide Ligand Libraries. *Journal of Proteome Research*. 2008; 7(8): 3461–3474. <https://doi.org/10.1021/pr800193y>
5. Nasabi M., Labbafi M., Mousavi M.E., Madadlou A. Effect of salts and nonionic surfactants on thermal characteristics of egg white proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017; 102: 970–976. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.102>
6. Babaei J., Mohammadian M., Madadlou A. Gelatin as texture modifier and porogen in egg white hydrogel. *Food Chemistry*. 2019; 270: 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.109>
7. Dong X., Zhang Y.-Q. An insight on egg white: From most common functional food to biomaterial application. *Journal of Biomedical Materials Research – Part B: Applied Biomaterials*. 2021; 109(7): 1045–1058. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34768>
8. Strausberger B.M., Ashley M.V. Eggs yield nuclear DNA from egg-laying female cowbirds, their embryos and offspring. *Conservation Genetics*. 2001; 2(4): 385–390. <https://doi.org/10.1023/A:1012526315617>
9. Rikimaru K., Takahashi H.A. A simple and efficient method for extraction of PCR-amplifiable DNA from chicken eggshells. *Animal Science Journal*. 2009; 80(2): 220–223. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2008.00624.x>
10. Okumura H. Avian Egg and Egg Coat. Sasanami T. (ed.). Avian Reproduction. From Behavior to Molecules. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 1001. Singapore: Springer. 2017; 75–90. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3975-1_5
11. Nishio S., Okumura H., Matsuda T. Egg-Coat and *Zona Pellucida* Proteins of Chicken as a Typical Species of Aves. Litscher E.S., Wassarman P.M. (eds.). Extracellular Matrix and Egg Coats. Current Topics in Developmental Biology. Academic Press. 2018; 130: 307–329. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.02.008>
12. Bakst M.R., Howarth B.Jr. The Fine Structure of the Hen's Ovum at Ovulation. *Biology of Reproduction*. 1977; 17(3): 361–369. <https://doi.org/10.1095/biolreprod17.3.361>
13. Perry M.M., Gilbert A.B., Evans A.J. The structure of the germinal disc region of the hen's ovarian follicle during the rapid growth phase. *Journal of Anatomy*. 1978; 127(2): 379–392.
14. Menkhorst E., Selwood L. Vertebrate Extracellular Preovulatory and Postovulatory Egg Coats. *Biology of Reproduction*. 2008; 79(5): 790–797. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.068551>
15. Nys Yu., Guyot N. Egg formation and chemistry. Nys E., Bain M., Van Immerseel F. (eds.). Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products. Woodhead. 2011; 1: 83–132.
16. Muramatsu T., Hiramoto K., Okumura J.-i. Changes in ovalbumin and protein synthesis in vivo in the magnum of laying hens during the egg formation cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Comparative Biochemistry*. 1991; 99(1): 141–146. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90019-a](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90019-a)
17. Balaji P., Murugadas A., Ramkumar A., Thirumurugan R., Shanmugaapriya S., Akbarsha M.A. Characterization of Hen's Egg White To Use It as a Novel Platform To Culture Three-Dimensional Multicellular Tumor Spheroids. *ACS Omega*. 2021; 5(31): 19760–19770. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02508>
18. Zyrianova I.M., Zaripov O.G. 18S ribosomal DNA-based PCR test for avian and mammalian DNA identification in meat products. *Veterinary and Animal Science*. 2022; 15: 100234. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2022.100234>
19. Wales A.D., Davies R.H. A critical review of *Salmonella* Typhimurium infection in laying hens. *Avian Pathology*. 2011; 40(5): 429–436. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.606799>
20. Wellinghausen N. et al. Diagnosis of Bacteremia in Whole-Blood Samples by Use of a Commercial Universal 16S rRNA Gene-Based PCR and Sequence Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; 47(9): 2759–2765. <https://doi.org/10.1128/JCM.00567-09>
21. Trkov M., Avgustin G. An improved 16S rRNA based PCR method for the specific detection of *Salmonella enterica*. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; 80(1): 67–75. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00138-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00138-1)
22. Chazotte B. Labeling Nuclear DNA with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2011; (1). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5557>
23. Crowley L.C., Marfell B.J., Waterhouse N.J. Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016; (9): pdb.prot087205. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087205>
24. Steiner G. et al. Gender determination of fertilized unincubated chicken eggs by infrared spectroscopic imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011; 400(9): 2775–2782. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4941-3>

ОБ АВТОРЕ

Ирина Михайловна Зырянова,
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
mirsimzyrianova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1871-8750>

Федеральный исследовательский центр животноводства —
ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,
пос. Дубровицы, 60, г. о. Подольск, Московская обл., 142132,
Россия

ABOUT THE AUTHOR

Irina Mikhailovna Zyrianova,
candidate in Biology, Senior Researcher
mirsimzyrianova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1871-8750>

Federal Scientific Center for Animal Husbandry named
after Academy Member L.K. Ernst,
60 Dubrovitsy, Podolsk district, Moscow region, 142132, Russia