

A1/A2 β -Casein Charakterisierung mittels Real-Time-PCR

von Sarah Wassermann

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**A1/A2 β -Casein Charakterisierung
mittels Real-Time-PCR**

von

Sarah Wassermann

aus

Kraftisried

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer

Angefertigt im: Labor- und Dienstleistungszentrum muva kempten GmbH

Mentor: Dr. Maximilian Moravek

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer

Korreferenten: Priv.-Doz. Dr. Ivica Međugorac
Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Tag der Promotion: 08. Februar 2020

„Den Wissenschaftlern geht es wie den Chaoten. Es ist alles da, man muss es nur suchen.“

(Franz Kern)

*Meiner Mutter
und
meinem Vater
gewidmet.*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Allgemeines	3
2.1.1	Milchzusammensetzung	3
2.1.1.1	Caseine	4
2.1.2	Genetische Grundlage der β -Caseine	6
2.1.3	Vorkommen der genetischen Varianten	9
2.1.4	Allergien und Laktoseintoleranz	10
2.1.5	Bioaktive Peptide	10
2.2	A2-Milch	13
2.2.1	Kontroverse Diskussion	13
2.3	Nachweisverfahren	15
2.3.1	Sequenzierung der Milchproteine	15
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	15
2.3.2.1	Allgemeines	15
2.3.2.2	Prinzip	16
2.3.2.3	PCR-Techniken	17
2.3.2.3.1	Konventionelle PCR	17
2.3.2.3.2	Real-Time-PCR	17
2.3.2.4	β -Caseintypisierung mittels PCR	19
2.3.3	Probenmaterial Milch	21
2.3.4	Probenvorbereitung	21
2.3.5	Gelelektrophorese	23
3	Eigene Untersuchungen	25
3.1	Material	25
3.1.1	Chemikalien	25
3.1.2	Milchproben	26
3.1.3	Gen- und Aminosäuresequenzen	26
3.1.4	PCR-Primer und -Sonden	27

3.1.5	Lösungen und Puffer	27
3.1.6	Verbrauchsmaterialien	30
3.1.7	Geräte	31
4	Methodik und Ergebnisse	33
4.1	Probenvorbereitung und DNA-Extraktion	33
4.1.1	Optimierung	33
4.1.2	Protokoll	34
4.2	Messung der DNA-Konzentration und -Reinheit	35
4.2.1	Ergebnisse	35
4.3	PCR-Kontrollen	36
4.4	Primer- und Sondendesign	36
4.5	TaqMan-PCR zur A1- und A2-Typisierung	39
4.5.1	Optimierung des PCR-Reaktionsgemisches	39
4.5.2	Protokoll	41
4.5.3	Validierung der PCR zur A1-/A2-Typisierung	43
4.5.4	Gelelektrophorese zur Validierung der PCR	43
4.5.5	Untersuchungsergebnisse der A1-/A2-Typisierung	44
4.5.5.1	Referenzmaterial und Einzelgemelksproben	46
4.5.5.2	Braunvieh	47
4.5.5.3	Fleckvieh	49
4.5.5.4	Holstein-Friesian	51
4.5.5.5	Ergebnistübersicht der A1-/A2-Typisierung	53
4.5.6	A1-/A2-Typisierung der Tank- und Konsummilch	54
4.6	IEF-Gelelektrophorese des β-CN A1 und A2	55
4.6.1	Optimierung	55
4.6.2	Herstellung der Gele und des Ladepuffers	58
4.6.3	Untersuchungsergebnisse	60
4.7	β-CN B PCR	61
4.7.1	Optimierung	61

4.7.2	Protokoll	62
4.7.3	Untersuchungsergebnisse der β -CN B PCR	64
4.8	Untersuchungsergebnisse der Gelelektrophorese des β-CN B	68
5	Diskussion	70
5.1	Optimierung der Probenvorbereitung und DNA-Extraktion	70
5.2	Etablierung einer TaqMan-PCR zur β-CN A1-/A2-Typisierung	72
5.3	Entwicklung einer Hybridisierungs-PCR zur β-CN B Bestimmung	74
5.4	Entwicklung einer IEF-Gelelektrophorese	75
5.5	Gesamtbeurteilung der etablierten Methoden	76
6	Zusammenfassung	78
7	Summary	80
8	Literaturverzeichnis	81
9	Anhang	96
10	Danksagung	104

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µ	mikro, x 10 ⁻⁶
A	<u>A</u> mpere
A	<u>A</u> dsorption
A. bidest.	<u>Aqua bide</u> stillata, zweifach destilliertes Wasser
A. dest.	<u>Aqua de</u> stillata, einfach destilliertes Wasser
ad	lat. hinzu, aufzufüllen auf
BBQ	<u>Black Berry Quencher</u>
BCM-7	<u>β-Casomorphin-7</u>
BIS	N, N-Methylen- <u>bis</u> -acrylamid
BLE	<u>Bundesamt für Landwirtschaft und Ernährung</u>
BMEL	<u>Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft</u>
CHD	<u>Coronary Heart Disease</u> , koronare Herzerkrankung
CN	<u>Casein</u>
C _p /C _t	<u>Crossing point / Cycle threshold</u> , Schwellenzyklus
DTT	Dithiothreitol
DM-1	Diabetes mellitus Typ 1
DMSO	<u>Dimethylsulfoxid</u>
DNA	<u>Deoxyribonucleic Acid</u> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	<u>Ethylenediamintetraacetat</u>
EFSA	<u>European Food Safety Authority</u>
ESL	<u>Extended Shelf Life</u> , längere Haltbarkeit im Kühlregal
FAM	Carboxyfluorescein
FRET	<u>Förster-Resonanzenenergietransfer</u>
g	<u>Gramm</u>
g	Erdbeschleunigung
Gly	<u>Glycin</u>
HCl	Salzsäure
His	<u>Histidin</u>
IEF	<u>Isoelektrische Fokussierung</u>
Ile	<u>Isoleucin</u>
IPG	<u>Immobilisierter pH-Gradient</u>

l	<u>Liter</u>
LFGB	<u>Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch</u>
LfL	<u>Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft</u>
LG	<u>Laktoglobulin</u>
m	<u>Meter</u>
m	<u>milli, x 10⁻³</u>
M	<u>molar (mol/l)</u>
MgCl ₂	<u>Magnesiumchlorid</u>
MIV	<u>Milchindustrie-Verband</u>
min	<u>Minute</u>
Mio.	<u>Millionen</u>
mRNA	<u>messenger Ribonucleic Acid, Boten Ribonukleinsäure</u>
n	<u>nano, x 10⁻⁹</u>
NK	<u>Negativkontrolle</u>
OD	<u>Optische Dichte</u>
PCR	<u>Polymerase-Kettenreaktion</u>
PER	<u>Ammoniumpersulfat</u>
Phe	<u>Phenylalanin</u>
PBS	<u>Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung</u>
pH	<u>pondus Hydrogenii</u>
Pro	<u>Prolin</u>
qPCR	<u>quantitative PCR</u>
RNA	<u>Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure</u>
RT	<u>Reverse Transkriptase</u>
SDS	<u>Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumlaurylsulfat</u>
s	<u>Sekunde</u>
SNP	<u>Single Nucleotide Polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus</u>
SYBR-Green I	<u>2-{2-[<i>(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino</i>]-1-phenyl-1<i>H</i>-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation</u>
TCE	<u>Trichloressigsäure</u>
TE	<u>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Ethylendiamintetraacetat</u>
TEMED	<u>N, N, N', N'-Tetramethylmethylenediamin</u>
TRIS	<u>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</u>
Tyr	<u>Tyrosin</u>

UHT	<u>Ultra-High Temperature, Ultrahocherhitzung</u>
UV	<u>Ultraviolett</u>
V	<u>Volt</u>
Val	<u>Valin</u>
v/v (%)	Volumenanteil einer Mischungskomponente am Gesamtvolumen (%)
W	<u>Watt</u>
w/v (%)	Massenanteil einer Mischungskomponente am Gesamtvolumen (%)
w/w (%)	Massenanteil einer Mischungskomponente an der Gesamtmasse (%)
WHO MONICA	<u>World Health Organisation MONitoring in cardiovascular surveys</u>
YAK	<u>Yakima Yellow</u>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Ausschnitt der Nukleotidsequenz des β -CN	7
Abbildung 2	β -Caseinvarianten und ihre Aminosäuresequenzen nach NGUYEN et al. (2015)	8
Abbildung 3	Entstehung von BCM-7 nach KAMIŃSKI et al. (2007)	12
Abbildung 4	β -CN mRNA des <i>Bos taurus</i>	38
Abbildung 5	Exemplarische Darstellung der Fluoreszenzentwicklung der PCR zur A1-Typisierung	44
Abbildung 6	Exemplarische Darstellung der Fluoreszenzentwicklung der PCR zur A2-Typisierung	45
Abbildung 7	A1-/A2-Typisierung des Referenzmaterials	46
Abbildung 8	Rassenunabhängige A1-/A2-Typisierung	47
Abbildung 9	A1-/A2-Typisierung des gesamten Braunviehs	48
Abbildung 10	A1-/A2-Typisierung des Braunvieh-Bestandes 1	48
Abbildung 11	A1-/A2-Typisierung des Braunvieh-Bestandes 2	49
Abbildung 12	A1-/A2-Typisierung des gesamten Fleckviehs	50
Abbildung 13	A1-/A2-Typisierung des Fleckvieh-Bestandes 1	50
Abbildung 14	A1-/A2-Typisierung des Fleckvieh-Bestandes 2	51
Abbildung 15	A1-/A2-Typisierung der gesamten Holstein-Friesians	52
Abbildung 16	A1-/A2-Typisierung des Holstein-Friesian x Jersey-Bestandes 1	52
Abbildung 17	A1-/A2-Typisierung des Holstein-Friesian-Bestandes 2	53
Abbildung 18	Ergebnisse der IEF-Gelelektrophorese des β -CN A1 und A2 nach Coomassie-Blau-Färbung	60
Abbildung 19	Exemplarische Darstellung der β -CN B PCR Schmelzkurve	65
Abbildung 20	β -CN B Ergebnisse des Referenzmaterials	66

Abbildung 21	β -CN B Ergebnisse der gesamten Herde	66
Abbildung 22	β -CN B Ergebnisse des Braunviehs	67
Abbildung 23	Ergebnisse der IEF-Gelelektrophorese des β -CN B nach Coomassie-Blau-Färbung	68
Abbildung 24	Zusammensetzung der Ampholyte in der IEF-Gelelektrophorese Variante 1	102
Abbildung 25	Zusammensetzung der Ampholyte in der IEF-Gelelektrophorese Variante 2	102
Abbildung 26	Zusammensetzung der Ampholyte in der IEF-Gelelektrophorese Variante 3	103
Abbildung 27	Zusammensetzung der Ampholyte in der IEF-Gelelektrophorese Variante 4	103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Proteine in der Milch-Caseinfaktion modifiziert nach STENZEL (2016), KAMIŃSKI et al. (2007) und HECK et al. (2009)	5
Tabelle 2	Publizierte PCR-Nachweise des β -CN	20
Tabelle 3	Optimierung des Reaktionsgemisches und des Templates excl. des Mastermix	40
Tabelle 4	Optimierung des Reaktionsvolumens	40
Tabelle 5	Optimierung des gesamten Reaktionsgemisches	41
Tabelle 6	Mastermixzusammensetzung der A1-/A2-Typisierung	42
Tabelle 7	PCR-Programm für die A1-/A2-Typisierung	42
Tabelle 8	Ergebnisse der A1-/A2-Typisierung des Referenzmaterials	43
Tabelle 9	Ergebnisse der A1-/A2-Typisierung	54
Tabelle 10	Optimierung der Ampholyte für die IEF	56
Tabelle 11	IEF-Programm	57
Tabelle 12	Applikatorgröße und Probenmenge für die IEF	59
Tabelle 13	Optimierung des Templates für die β -CN B PCR	62
Tabelle 14	Zusammensetzung des PCR-Mix für die β -CN B PCR	63
Tabelle 15	PCR-Profil der β -CN B PCR	63
Tabelle 16	Schmelzkurve der β -CN B PCR	63
Tabelle 17	Ergebnisse der β -CN B PCR	67
Tabelle 18	Allelfrequenz des β -CN der Rinderrassen der westlichen Länder	96
Tabelle 19	Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit	100

1 Einleitung

Die β -Caseine (CN) stellen eine der Hauptfraktionen des Gesamtproteingehaltes von Milch dar. Bis heute wurden 13 genetische Varianten des β -CN beschrieben, welche aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften gegenüber einer proteolytischen Degradation dem A1- oder dem A2-Typ angehören (KAMIŃSKI et al., 2007).

In der Literatur werden die Begriffe β -CN “Variante“ und “Typ“ inkonsistent verwendet. Daher soll an dieser Stelle bereits eine Definition erfolgen, die die Verwendung der Bezeichnungen in der vorliegenden Arbeit festlegt. Unter der Bezeichnung Variante werden die verschiedenen genetischen Ausprägungen – synonym Allele – verstanden. Der Caseintyp wird durch die Aminosäure an Position 67 bestimmt und beeinflusst die Entstehung bestimmter Abbauprodukte. Die verschiedenen β -CN Varianten/Allele können daher entweder dem A1- oder A2-Typ zugeordnet werden.

Der genetische Urtyp des β -CN des Hausrindes – *Bos taurus* – ist der A2-Typ, aus welchem bei der Milchkuh durch Zucht und Selektion der A1-Typ entstand (BEJA-PEREIRA et al., 2004; CAROLI et al., 2016).

Durch den enzymatischen Verdauungsvorgang entsteht bei Milch vom A1-Typ verhältnismäßig mehr des bioaktiven Peptids Betacasomorphin-7 (BCM-7) als beim A2-Typ, was beim Menschen zu Verdauungsbeschwerden führen kann (KAMIŃSKI et al., 2007). Seit zwanzig Jahren wird ein Zusammenhang zwischen dem Konsum von A1-Milch und dem Entstehen von verschiedenen Krankheiten diskutiert. Einige Studien sind publiziert, detailliertes Wissen fehlt aber, sodass weitere Untersuchungen nötig sind (EFSA, 2009).

Die Kuhmilcherzeugung in Deutschland erfuhr in den letzten Jahren eine stetige Zunahme. Im Jahre 2009 wurden in Deutschland 29,2 Mio. Tonnen und im Jahr 2016 nach damaliger Schätzung 32,6 Mio. Tonnen Kuhmilch produziert. Auch die EU-Kuhmilcherzeugung steigerte sich von 2009 von rund 149 Mio. Tonnen auf rund 164 Mio. Tonnen im Jahr 2016. Weltweit ist die erzeugte Kuhmilchmenge von rund 594 Mio. Tonnen im Jahr 2009 auf rund 682 Mio. Tonnen 2016 angestiegen. Die EU-28 stellte dabei im Jahr 2016 einen Anteil von rund 24 % an der weltweiten Kuhmilcherzeugung (BMEL, 2017). Der Umsatz der deutschen Milchindustrie

betrug im Jahre 2016 rund 23 Mrd. Euro und die 20 größten internationalen milchwirtschaftlichen Unternehmen hatten im selben Jahr einen Gesamtumsatz von 172,1 Mrd. Euro (MIV, 2017; BLE, 2018). Die EU ist mit Abstand der größte Kuhmilcherzeuger weltweit, gefolgt von den USA, Indien und China. Neuseeland liegt als größter Exporteur auf Platz Nummer 7 (LFL, 2017).

Für Landwirte stellt die A2-Milch als derzeitiges Nischenprodukt mit ihrer profitableren Vermarktung einen Anreiz zur Untersuchung des Status (A1- oder A2-Typ) ihres Milchviehbestandes und dessen Umstellen auf A2-Rinder dar (RIESBERG, 2017; REIMINK, 2017). In Deutschland ist die A2-Milch immer häufiger in regionalen Supermarktregalen zu finden und das gesteigerte Kundeninteresse spiegelt sich in zunehmender Präsenz des Themas im Internet und der Presse wider (REIMINK, 2017; LÜTKE HOLZ, 2018; FENEBERG, 2018; REWE, 2018).

Die Bestimmung der Varianten des β -CN erfolgt z. B. mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von Desoxyribonukleinsäure (DNA), gewonnen aus Gewebeproben, Haaren und Milch (EINSPANIER et al., 2001). Milch stellt ein günstiges und leicht zu haltendes Probenmaterial dar.

Basierend auf diesen Überlegungen war das Ziel der vorliegenden Arbeit, eine schnelle und kostengünstige Typisierung von β -CN (A1- oder A2-Typ), von Rindern, anhand von Milchproben, was mittels Real-Time-PCR erreicht wurde. Der Nachweis der Nukleotidsequenz in bestimmten Codons dient dabei als Surrogat-Marker für den Einbau verschiedener Aminosäuren im CN. Über die Aminosäuresequenz kann schließlich die Bestimmung des Caseintyps erfolgen. Eine Allel-spezifische Untersuchung (A1, A2 und B) wurde dann mit einer weiteren Real-Time-PCR realisiert. Auf Proteinebene erfolgte die Detektion der verschiedenen Caseinvarianten mittels Isoelektrischer Fokussierung (IEF)-Gelelektrophorese.

2 Schrifttum

2.1 Allgemeines

2.1.1 Milchzusammensetzung

Kuhmilch stellt für den Menschen durch eine ausgewogene Zusammensetzung aus Wasser, Kohlenhydraten, Proteinen, Fetten, Mineralstoffen, Vitaminen, Amino- und Fettsäuren ernährungsphysiologisch ein bedeutsames Lebensmittel dar. Sie besteht zu 87 % aus **Wasser** und die **Trockenmasse** setzt sich aus Milchfett und fettfreier Trockenmasse zusammen. Die fettfreie Trockenmasse untergliedert sich weiter in Kohlenhydrate, Proteine und Mineralstoffe (STENZEL, 2016).

Der **Milchfettgehalt** von 3,5–6 % wird von endogenen und exogenen Faktoren wie Genetik, Fütterung, individuellem Gesundheitszustand der Milchkuh und ihrem Laktationsstatus beeinflusst. Das Milchfett besteht aus Neutralfett, sowie Fettbegleitstoffen und das Fettsäuremuster spielt für den Geschmack, wie auch die Weiterverarbeitung eine wichtige Rolle. Das Fettsäurespektrum wird neben der Fütterung auch durch die Pansenflora beeinflusst und gliedert sich in kurz-, mittel- und langkettige Fettsäuren. Die Linolsäure ist hierbei als essentielle Fettsäure zu nennen (SMIT, 2003; PALMQUIST et al., 1993).

Von den in der Milch vorhandenen **Kohlenhydraten** macht die Laktose mit rund 4,8 % den größten Anteil aus. Daneben sind Spuren von Glukose und Galaktose zu finden (SMIT, 2003).

Die **Mineralstoffe** der Milch werden aus der „Asche“ analysiert und sind aus Mengenelementen, Spurenelementen und Ultraspurenelementen zusammengesetzt. Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Chlorid und Phosphor bilden die Mengenelemente. Spurenelemente sind Eisen, Fluor, Zink, Selen, Kupfer, Mangan, Chrom, Molybdän, Cobalt und Nickel. Die essentiellen Ultraspurenelemente setzen sich aus Aluminium, Zinn und Silizium zusammen (STENZEL, 2016; FOX et al., 2015).

Die Gesamtmenge der **Milchproteine** gliedert sich in Caseine, Molkenproteine und stickstoffhaltige Verbindungen. Der Gehalt von 2,9–4,4 % wird durch endogene und exogene

Faktoren, wie Genetik und Fütterung, beeinflusst. Ernährungsphysiologisch spielen Aminosäuren als Bausteine der Proteine eine wichtige Rolle für Mensch und Kalb. Die Protein Zusammensetzung hat Einfluss auf die Labfähigkeit der Milch. Milcheiweißerzeugnisse wie Caseinate sind in der Lebensmittelindustrie von Bedeutung (FOX, 2003; SMIT, 2003).

2.1.1.1 Caseine

Einen Anteil von rund 80 % des Milchproteins nehmen Caseine ein. Diese setzen sich aus den Untergruppen α_{s1} - α_{s2} - β - κ -CN und den γ_1 - γ_2 - γ_3 -CN zusammen. Letztere sind Derivate des β -CN und machen zusammen 2,4 % des Gesamtproteins aus (Tabelle 1). Jeder Caseingruppe liegt mehr als ein Allel zugrunde und durch die Kombination dieser Allele entsteht der Haplotyp eines Individuums (HECK et al., 2009). Dieser genetische Polymorphismus beeinflusst Proteingehalt, Caseingehalt, Labgerinnungszeit, Quarkfestigkeit, Käseausbeute, sowie das Aminosäuremuster, welches Auswirkungen auf die chemisch-physikalische Milcheigenschaft hat. Somit spielt diese Vielgestaltigkeit eine sehr wichtige Rolle für die Verarbeitungseigenschaften des Produkts (EINSPANIER et al., 2001). Caseine haben keine Tertiärstruktur, was sie sehr hitzestabil macht (STENZEL, 2016; SMIT, 2003).

Tabelle 1. Proteine in der Milch-Caseinfraktion modifiziert nach STENZEL (2016), KAMIŃSKI et al. (2007) und HECK et al. (2009)

Casein	Allele	Molekulargewicht (Dalton)	Anzahl Aminosäuren	Anteil am Gesamtprotein (%)
α_{s1}	B, C	23 000	199	30,6
α_{s2}	A	25 000	207	8,0
κ	A, B, E	19 000	169	10
β	A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G	24 000	209	28,4
γ_1		20 500	181	
γ_2		11 900	104	2,4
γ_3		11 600	102	

Die Caseine lagern sich in der Milch zu Mizellen zusammen, wobei es verschiedene Theorien über deren Aufbau gibt. Einigkeit darüber herrscht, dass α - und β -CN den Kern bilden, der größte Teil des κ -CN die „haarige“ Oberfläche formiert und seine hydrophilen Teile nach außen in die Serumphase reichen. Struktur erlangt dieses Konstrukt durch Calcium-Phosphat-Brücken, wobei aber keine Starrheit entsteht. Im pH-Bereich von 4,6–4,8 kommt es zur Aggregation und Ausfällung der Caseinmizellen (STENZEL, 2016; FOX et al., 2015).

2.1.2 Genetische Grundlage der β -Caseine

Die genetische Information für das bovine β -CN liegt auf dem Chromosom 6 (NCBI, 2018) und kodiert für 209 Aminosäuren der maturen Caseinvarianten (STENZEL, 2016). Die Variabilität entsteht durch eine einzelne (SNP – Single Nukleotide Polymorphism/Einzelnukleotid-Polymorphismus) oder mehrere Punktmutationen in der Nukleotidsequenz (EINSPANIER et al., 2001).

Eine Differenzierung der β -CN und deren Zuordnung zum A1- bzw. A2-Typ kann neben der Analyse auf Basis der genetischen Information auch entsprechend ihrer biochemischen Eigenschaften erfolgen. Beim Wildtyp A2 des β -CN bedingt das Codon 67 den Einbau der Aminosäure Prolin (Pro), welche beim Mutantentyp A1 durch Histidin (His) substituiert wird. Dadurch können die verschiedenen Caseinallele je nach Aminosäure an dieser Position dem jeweiligen Typ zugeordnet werden. Auf der DNA Ebene wird Cytosin durch Adenin ersetzt: CCT → CAT (Abbildung 1) (MCLACHLAN, 2001; KAMIŃSKI et al., 2007). Es wurden bisher 13 genetische Varianten des β -CN beschrieben. A1, B, C, F und G gehören dem A1-Typ, A2, A3, D, E, H2 und I dem A2-Typ an. Die Substitution bei A4 und die Zugehörigkeit für H1 sind noch ungeklärt. Alle Varianten werden als kodominant angesehen, was bedeutet, dass eine Milchkuh vom A1A2-Typ, sowohl A1, als auch A2 β -CN bildet (GIVENS et al., 2013).

Die Nukleotidaustausche bedingen eine veränderte Aminosäuresequenz und sind für Zuordnung zum A1- oder A2-Typ entscheidend, sowie bestimmt für das Allel B (Abbildung 1). An Position 245 der Nukleotidsequenz befindet sich beim Genotyp A1 die Nukleobase Adenin und bei A2 Cytosin. Beim Genotyp A1 und A2 ist Cytosin an Position 417 zu finden und bei B Guanin. Abbildung 2 zeigt den Austausch von Aminosäuren einiger β -CN Varianten. Die Nummerierung bezieht sich auf das mature Casein nach Abspaltung der Signalsequenz und der Wildtyp β -CN A2 wurde als Referenzsequenz genutzt.

226	ccc	ttc	cct	ggg	ccc	atc	<u>cct</u>	aac	agc	ctc	cca	caa	aac	atc	cct
271	cct	ctt	act	caa	acc	cct	gtg	gtg	gtg	ccg	cct	ttc	ctt	cag	cct
316	gaa	gta	ttg	gga	gtc	tcc	aaa	gtg	aag	ggg	gct	atg	gct	cct	aag
361	cac	aaa	gaa	atg	ccc	ttc	cct	aaa	tat	cca	gtt	gag	ccc	<u>ctt</u>	act
406	gaa	agc	cag	<u>agc</u>	ctg	act	ctc	act	gat	gtt	gaa	aat	ctg	cac	ctt

Abbildung 1. Ausschnitt der Nukleotidsequenz des β -CN

Auf Position 245 befindet sich beim Genotyp A1 Adenin und bei A2 Cytosin. Auf Position 417 ist beim Genotyp A1 und A2 Cytosin und bei B Guanin zu finden. Die verwendete Referenzsequenz stammt aus der GenBank® Datenbank des NIH und trägt die Accession Number M15132.1.

H	Arg	Glu	Leu	Glu	Glu	Ile	Asn	Val	Pro	Gly	Glu	Ile	Val	Glu	Ser	Leu	Ser	Ser	Ser	Glu	20
1																					
Glu	Ser	Ile	Thr	Arg	Ile	Asn	Lys	Lys	Ile	Glu	Lys	Phe	Gln	Ser	Glu	Glu	Gln	Gln	Gln	Variante D	
Variante D																					
Thr	Glu	Asp	Glu	Leu	Gln	Asp	Lys	Ile	His	Pro	Phe	Ala	Gln	Thr	Gln	Ser	Leu	Val	Tyr	40	
Variante E																					
Pro	Phe	Pro	Gly	Pro	Ile	Pro	Asn	Ser	Leu	Pro	Gln	Asn	Ile	Pro	Pro	Leu	Thr	Gln	Tyr	60	
67																					
Variante A1, B, C																					80
Pro	Val	Val	Val	Pro	Pro	Phe	Leu	Gln	Pro	Glu	Val	Met	Gly	Val	Ser	Lys	Val	Lys	Glu	100	
Variante A3																					
Ala	Met	Ala	Pro	Lys	His	Lys	Glu	Met	Pro	Phe	Pro	Lys	Tyr	Pro	Val	Glu	Pro	Phe	Thr	120	
Variante B																					
Glu	Ser	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Thr	Asp	Val	Glu	Asn	Leu	His	Leu	Pro	Leu	Pro	Leu	Leu	140	
Variante F																					
Gln	Ser	Trp	Met	His	Gln	Pro	His	Gln	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Val	Met	Phe	Pro	Pro	Gln	160	
Variante F																					
Ser	Val	Leu	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Lys	Val	Leu	Pro	Val	Pro	Gln	Lys	Ala	Val	Pro	Tyr	180	
Variante A2																					
Pro	Gln	Arg	Asp	Met	Pro	Ile	Gln	Ala	Phe	Leu	Leu	Tyr	Gln	Glu	Pro	Val	Leu	Gly	Pro	200	
Variante A2																					
Val	Arg	Gly	Pro	Phe	Pro	Ile	Ile	Val	209												
OH																					

Abbildung 2. β -Caseinvarianten und ihre Aminosäuresequenzen nach NGUYEN et al. (2015) Für die A1/A2-Typisierung und die Analyse des B Allels relevante Aminosäuresubstitutionen sind hervorgehoben.

Da es zwei Allele des β -Caseingens bei jedem Individuum gibt, kann ein Rind genotypisch homozygote (A1A1-, A2A2-Typ) und heterozygote (A1A2-Typ) Anlagen besitzen (SHARMA et al., 2013; KAMIŃSKI et al., 2007). Hierbei bezieht sich die Bezeichnung A1 bzw. A2 auf die Ausprägung des Caseintyps und nicht allein auf das Allel A1 bzw. A2.

Bei der A1-/A2-Typisierung wird mittels PCR untersucht, ob das Basentriplett an Position 67 die Aminosäuresequenz für die Aminosäure Prolin (A2-Typ) oder Histidin (A1-Typ) kodiert und es wird keine Unterscheidung der zugrunde liegenden Allele vorgenommen. Zur Analyse der Kombination der Allele bedarf es einer anderen Untersuchung, wie einer Allel-spezifischen PCR oder Gelelektrophorese.

2.1.3 Vorkommen der genetischen Varianten

Der bei Rindern beschriebene β -Caseinpolymorphismus ist rassen- und länderabhängig, was auf die Selektion auf Leistung, die Kreuzungen von Rassen und die Zuchtpolitik im Allgemeinen zurückzuführen ist (EFSA, 2009). Milch europäischer Rinderassen besteht aus einem Gemisch aus β -CN A1 und A2 und reinrassige asiatische, sowie afrikanische Rassen geben ausschließlich A2-Milch (PAL et al., 2015). Die Allele A1 und A2 kommen bei Milchrinderrassen am häufigsten vor und waren namensgebend für den A1- bzw. A2-Typ. Das Allel B tritt weniger häufig und die Varianten A3, C, sowie I treten selten auf. A1, A2, A3, B sind bei *Bos taurus* und *Bos indicus*, D bei *Bos indicus* und C, E, F, G, H1, H2 und I bei *Bos taurus* zu finden (KAMIŃSKI et al., 2007; FARRELL JR et al., 2004; CAROLI et al., 2016; CAROLI et al., 2009). Guernsey Rinder zeigen genotypisch eine hohe A2-Häufigkeit (0,96) (VAN EENENNAAM & MEDRANO, 1991), Jersey Rinder haben einen geringen A1-Anteil (0,123) (WINKELMAN & WICKHAM, 1997), bei Holstein-Friesian Rindern ist das Verhältnis von A1 und A2 relativ ausgeglichen (0,402; 0,598) (KAMIŃSKI et al. (2006), Brown Italian – wie auch Brown Swiss – Rinder haben einen relativ höheren A2-Allelanteil als B und A1 (0,69; 0,18; 0,11) (BOETTCHER et al., 2004) und das regionale Fleckvieh zeigt eine A2-Allelfrequenz von 60–80 % (SCHWARZENBACHER; KUCEROVA et al., 2006).

Eine Übersicht von Rinderrassen und deren länderabhängige Allelfrequenz des β -CN ist im Anhang (9) Tabelle 18 aufgeführt (EFSA, 2009).

2.1.4 Allergien und Laktoseintoleranz

Eine Kuhmilch(protein)allergie tritt bei 0,7–1,2 % der Erwachsenen und 0,5–7 % aller Kinder im Alter bis zu 2 Jahren auf. Diese kann, soweit bisher bekannt, durch 25 Eiweiße der Milch ausgelöst werden, aber auch die Verarbeitungstechnologie hat Einfluss auf diese allergene Wirkung. Nachdem Caseine den größten Anteil am Milchprotein haben, sind diese als Hauptallergen anzusehen. Zur Verminderung beziehungsweise Vermeidung von allergischen Reaktionen besteht ein Angebot von proteolysierten und dadurch hydrolysierten, sogenannten hypoallergenen, Produkten (STENZEL, 2016).

Bei Laktoseintoleranz entstehen die klinischen Beschwerden durch Laktosemalabsorption, was durch angeborenen Laktasemangel, Laktosämie, primäre und sekundäre Milchzuckerunverträglichkeit hervorgerufen werden kann (STENZEL, 2016). Ungefähr 20 % der Amerikaner und Nordeuropäer, sowie der Großteil der restlichen Welt, weist eine Laktosemalabsorption auf (TURNBULL et al., 2015).

Das Casein der Milch von Mensch, Ziege und Schaf gehört dem A2-ähnlichen Typ an, denn es trägt an Position 67 der Aminosäurekette Prolin. Viele laktoseintolerante Menschen sind beschwerdefrei nach Konsum von A2-Milch, was eher eine Eiweißunverträglichkeit als eine Laktoseintoleranz ursächlich vermuten lässt (PAL et al., 2015; JIANQIN et al., 2015).

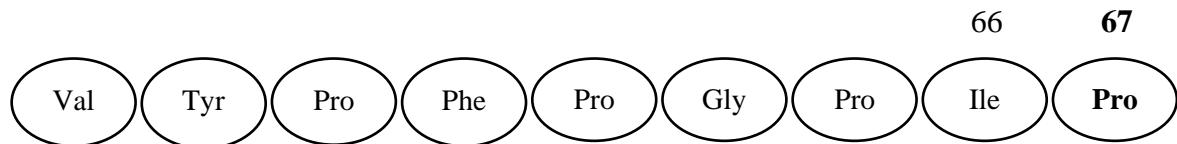
2.1.5 Bioaktive Peptide

Milchproteine enthalten in ihrer primären Struktur Abschnitte, welche biologische und funktionelle Aktivität besitzen, wenn sie durch Proteolyse freigesetzt werden. Diese sogenannten bioaktiven Peptide sind in Lebensmitteln enthalten, werden aber auch vom Körper selbst produziert. Solange sie ein Teil der Gesamtsequenz des Proteins sind, sind sie inaktiv, werden jedoch durch Abbauvorgänge während des Verdauungsprozesses oder der Fermentation freigesetzt und dadurch in ihre aktive Form überführt. Dies geschieht mittels Hydrolyse durch Verdauungsenzyme, durch proteolytische Mikroorganismen oder durch proteolytische Enzyme von Pflanzen. Die aktiven Produkte können positive, wie auch negative Wirkungen auf das Nerven-, Immun-, Verdauungs- und das kardiovaskuläre System haben (KAMIŃSKI et al., 2007; KORHONEN & PIHLANTO, 2006; EFSA, 2009).

Seit Ende der 1990er Jahre wird ein Zusammenhang zwischen dem Konsum von A1-Milch und dem Entstehen von Diabetes Mellitus Typ 1 (DM-1), kardiovaskulären Erkrankungen, Autismus, Schizophrenie und dem plötzlichen Kindstod diskutiert (ELLIOTT et al., 1999; MCLACHLAN, 2001; SUN et al., 1999; SUN & CADE, 1999; SUN et al., 2003). Es wurden einige wenige wissenschaftliche Studien durchgeführt, welche aber teils widersprüchliche Ergebnisse lieferten (KAMIŃSKI et al., 2007).

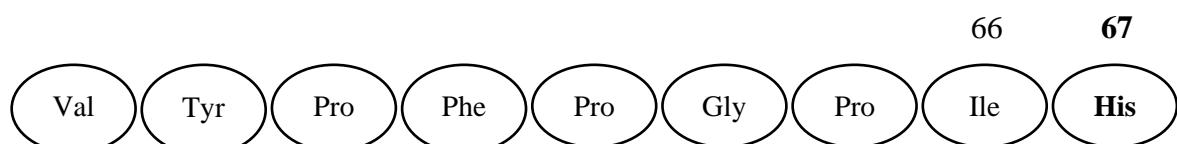
Bei der Digestion von Milch des A1-Typs entsteht im Dünndarm das bioaktive Peptid BCM-7, welches sich von Aminosäure 60 bis 66 erstreckt. Das Peptid bindet an μ -Opioidrezeptoren der Zellen des darmassoziierten Immunsystems, der Epithelzellen im Bereich der Krypten, sowie der enterischen Neuronen, hat dadurch eine morphinartige Wirkung und kann Ursache von Verdauungsbeschwerden sein (PAL et al., 2015; EFSA, 2009). Die enzymatische Hydrolyse erfolgt zwischen Position 66 und 67 (Abbildung 3) (CAROLI et al., 2016; CAROLI et al., 2009; EFSA, 2009). Die Aminosäure Prolin des A2-Typs erschwert die enzymatische Hydrolyse während des Verdauungsvorganges an dieser Stelle und dadurch wird das Entstehen von BCM-7 verringert oder gar vollständig unterdrückt (EFSA, 2009). Bei A1-Milch kann die Bildung von BCM-7 bis zu 4-mal höher sein, als beim A2-Typ (KAMIŃSKI et al., 2007). Grundsätzlich ist die Menge des entstehenden BCM-7 vom Proteingehalt und somit auch von Rasse, individuellem Status, Fütterung, Gesundheitszustand, Laktationsstatus und Standardisierungsprozessen abhängig. Auch das A1-/A2-Verhältnis und die individuelle Darmgesundheit des Konsumenten haben Auswirkungen (PAL et al., 2015; SMIT, 2003). Des Weiteren ist zu beachten, dass nicht nur aus Rohmilch, sondern aus jeglichen caseinhaltigen Milchprodukten, wie auch Joghurt und Käse, BCM-7 freigesetzt werden kann (FITZGERALD & MEISEL, 2003).

β -CN A2-Typ



↑ †
Hydrolyse

β -CN A1-Typ



↑ †
Hydrolyse

BCM-7



↑ † erschwere Hydrolyse

Abbildung 3. Entstehung von BCM-7 nach KAMIŃSKI et al. (2007)

Die Pfeile zeigen die Positionen, an denen die hydrolytische Spaltung erfolgt. Der durchgestrichene Pfeil symbolisiert die erschwerte Hydrolyse bei β -CN des A2-Typs.

2.2 A2-Milch

Unter A2-Milch wird Milch mit einem ausschließlichen Vorkommen des β -CN vom Typ A2 verstanden. Anfang der 1990er Jahre kam das Thema dieser gesünderen „Urmilch“, die ernährungsphysiologisch vorteilhaft sein und bestimmten Krankheiten vorbeugen solle, auf (ELLIOTT et al., 1999; MCLACHLAN, 2001). Im Jahr 2000 wurde in Neuseeland die a2 Milk Company gegründet, drei Jahre später kam die A2-Milch dort auf den Markt und das Unternehmen erreichte im Jahre 2016 einen Börsenwert von einer Milliarde australischer Dollar (RIESBERG, 2017). Inzwischen gibt es A2-Milch in Australien, Großbritannien, den Niederlanden und auch in Deutschland ist dieses Produkt seit dem Jahre 2018 in den Regalen regionaler Supermärkte zu finden (REIMINK, 2017; LÜTKE HOLZ, 2018; FENEBERG, 2018; REWE, 2018).

Landwirte kommen dem Interesse von Kunden und Lebensmittelindustrie immer mehr nach, stellen ihre Betriebe auf reine A2-Milchbetriebe um und können Milch-ab-Hof für einen höheren Preis anbieten (RIESBERG, 2017; REIMINK, 2017).

Zuchtstationen bieten reinerbige A2A2 Bullen an und je nach Zuchtpogramm kann innerhalb von 4–10 Jahren eine komplette Umstellung einer Herde erfolgen (RIESBERG, 2017; WOODFORD, 2007).

2.2.1 Kontroverse Diskussion

Spätestens seit Veröffentlichung des Buches „Devil in the milk“ von Keith Woodford, in welchem ein gesundheitlich nachteiliger Effekt durch den Konsum von Milch mit β -Caseinanteilen vom Typ A1 postuliert wird, gibt es eine kontroverse Diskussion über die ernährungsphysiologische Bedeutung des β -CN (KAMIŃSKI et al., 2007; WOODFORD, 2009).

Im Auftrag der Fronterra Gruppe, einem der weltgrößten Milchkonzern Neuseelands, wurde eine Studie dazu veröffentlicht. Es wurde kein Zusammenhang zwischen Milchkonsum und dem Entstehen bestimmter Krankheiten gesehen, und es wurde Kritik an den verwendeten Daten über die A1-Verteilung in Rinderbeständen geübt, da diese zu begrenzt und möglicherweise unglaublich seien (KAMIŃSKI et al., 2007; TRUSWELL, 2005).

MCLACHLAN (2001) verwendete in seiner Arbeit Daten eines Projekts der World Health Organisation MONitoring in cardiovascular surveys (WHO MONICA), die nur begrenzt einen Zusammenhang zwischen dem Konsum von Milchproteinen und Todesfällen durch koronare Herzerkrankungen (CHD) in 18 verschiedenen Ländern (Australien, Island, Irland, Österreich, Kanada, Dänemark, Finnland, Frankreich, Israel, Japan, Neuseeland, Norwegen, Schottland, Schweden, Schweiz, Großbritannien, USA, (West)Deutschland) zeigten. Die Daten brachten Anstieg und Rückgang der Mortalität durch diese Erkrankung über die Zeit zum Ausdruck. Diese Arbeit sei fehlerhaft, da Käseverzehr nicht berücksichtigt wurde, wobei drei weitere Arbeiten das Vorkommen von BCM-7 in Käse bestätigen (NORRIS et al., 2003; MUEHLENKAMP & WARTHESEN, 1996; JARMOŁOWSKA et al., 1999).

TRUSWELL (2005) beurteilte die Hypothese, dass A1-Milchkonsum zu DM-1 und CHD führt als unglaublich, da die untersuchte Länderzahl zu gering sei. Es schlug prospektive, besser standardisierte und zeitlich ausgedehntere Studien an Individuen vor, da Tiermodelle mit für Diabetes anfälligen Nagetieren unpassend seien (KAMIŃSKI et al., 2007).

Die European Food Safety Authority (EFSA) untersuchte 2009 die Herkunft und Entstehung von BCM-7, verwandten Peptiden und den Polymorphismus des β -CN. Es folgte die Analyse vor und nach dem Verdauungsvorgang und Einflüsse des Umfelds des Menschen. Betrachtet wurde auch die Absorption über die intestinale Schleimhaut, der Abbau, die Aufnahme ins Blut und der Übertritt der Blut-Hirn-Schranke. Es konnte zum damaligen Zeitpunkt kein Zusammenhang zwischen oraler Aufnahme von BCM-7 oder verwandten Peptiden und der Entstehung von Krankheiten erkannt werden. Gleichzeitig wurde aber die Notwendigkeit von weiteren Studien und detaillierteren Daten festgestellt (EFSA, 2009).

Im Allgemeinen darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Milch eines der ältesten Nahrungsmittel weltweit ist und viele Inhaltsstoffe enthält, welche der menschlichen Gesundheit von immensem Nutzen sind. Milchproteine, beziehungsweise ihre Derivate, haben einen hohen nutritiven, sowie biologischen Wert und ihnen werden antikarzinogene, antihypertensive, immunmodulatorische, antimikrobielle, antikariogene, sowie hypocholesterämische Eigenschaften zugeschrieben. Es kommt zu einer Reduktion gesundheitlicher Risiken und Krankheiten wie zum Beispiel Krebs, sowie kardiovaskuläre Erkrankungen wird vorgebeugt (DAVOODI et al., 2016).

2.3 Nachweisverfahren

2.3.1 Sequenzierung der Milchproteine

Die erste Studie zur Nomenklatur von Milchproteinen erschien im Jahre 1956 (JENNESS et al., 1956). In den 1970er Jahren wurde die Primärstruktur analysiert und RIBADEAU et al. (1972), sowie GROSCLAUDE et al. (1972) beschäftigten sich mit den β -Caseinvarianten und -sequenzen.

Die Sequenzen und ihre Nomenklatur wurden im Laufe der Zeit ständig erweitert, überarbeitet und dienen als Grundlage für alle weiteren Analyseverfahren des β -CN (CARLES et al., 1988; DONG & NG-KWAI-HANG, 1998; HAN et al., 2000; VISSER et al., 1995; YAN & WOLD, 1984).

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.3.2.1 Allgemeines

Kerry Mullis amplifizierte im Jahr 1983 erstmals DNA in vitro und erhielt 10 Jahre später dafür den Nobelpreis für Chemie. Das Originalprotokoll der PCR wurde im Jahr 1985 veröffentlicht (SAIKI et al., 1985). Seither entstanden viele Abwandlungen dieses Protokolls und die PCR wird in der Molekularbiologie, der Forensik, der Zellbiologie, der Medizin, der Immunologie und der (Gen)Diagnostik verwendet. Es werden kleinste Mengen DNA aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien gewonnen und vervielfältigt. Die Polymerase-Kettenreaktion erlangt ihren Namen durch die exponentielle Vermehrungsrate der DNA, ist günstig, zweckmäßig, schnell, einfach und kann einen hohen Probendurchsatz bewältigen (MAURER, 2006; MÜLLER & PRANGE, 2016).

2.3.2.2 Prinzip

Die PCR ahmt *in vitro* die Vorgänge nach, die bei der Vervielfältigung von DNA *in vivo* ablaufen. Eine bestimmte Sequenz der DNA, welche von Startermolekülen (Primern) eingerahmt ist, wird amplifiziert. Die enzymatisch wirkende DNA-Polymerase ist ein Protein, welches an den Primern eines Einzelstrangs der Zielsequenz ansetzt und mit den freien im Reaktionsgemisch vorhandenen Nukleotiden einen komplementären Strang bildet. Primer sind spezifische, synthetische Oligonukleotidmoleküle und die Matritze, auch Template genannt, ist die Zielsequenz der DNA. Nukleotide sind Bausteine der DNA und werden von den Nukleobasen (Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin), Zucker und Phosphat gebildet. Durch ein zyklisches Wiederholen der drei unten aufgeführten Reaktionsschritte einer PCR im Rahmen eines definierten Temperaturregimes kommt es zur Vervielfältigung des Templates (MÜLLER & PRANGE, 2016).

Die PCR setzt sich aus **drei Schritten** zusammen:

Bei 95 °C kommt es zur **Denaturierung** der komplementären DNA-Doppelstränge und es entstehen einzelsträngige DNA-Matrizenmoleküle.

Beim **Annealing** wird die Temperatur auf circa 55 °C heruntergesetzt und die Primer binden am 3'- und 5'- Ende der Matrize. Dieser Vorgang wird Hybridisierung genannt und funktioniert nur, wenn die Primer zur Matrizensequenz komplementär sind und sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleobasen ausbilden können. Die Polymerase beginnt freie Nukleotide anzubauen und stärkt somit die Verbindung.

Bei der **Elongation** oder Extension verlängert die DNA-abhängige Polymerase beim erneuten Temperaturanstieg auf 72 °C weiter den Strang mit freien zur Matrize komplementären Desoxynucleosid-Triphosphaten bis sie abfällt.

Ein einziges DNA-Molekül zu Beginn dieser überaus sensitiven Untersuchungsmethode ist theoretisch ausreichend, um bei 30 Zyklen 10^9 Kopien der Matrize herzustellen (MÜLLER & PRANGE, 2016).

2.3.2.3 PCR-Techniken

2.3.2.3.1 Konventionelle PCR

Zum Nachweis einer definierten DNA-Sequenz kann eine qualitative PCR durchgeführt werden und zur Mengenbestimmung des Templates greift man auf die quantitative PCR (qPCR) zurück.

Bei der konventionellen PCR folgt auf die Polymerase-Kettenreaktion die Darstellung der PCR-Produkte durch elektrophoretische Auf trennung, Anfärben mit Ethidiumbromid und Visualisierung mittels UV-Licht (BUSCH, 2010).

2.3.2.3.2 Real-Time-PCR

Eine Real-Time-PCR bietet die Möglichkeit, die Entstehung des Amplikons online und in Echtzeit zu detektieren. Weiterhin ist eine Quantifizierung der PCR-Produkte wesentlich exakter möglich als in einer konventionellen PCR, was durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht wird. Diese können direkt oder an spezielle Sonden gebunden der Reaktion zugesetzt werden (MAURER, 2006).

Die Fluoreszenz kann während der PCR gemessen werden, ist direkt proportional zur Amplikonmenge und bei graphischer Darstellung bildet die x-Achse die Zeit und die y-Achse die Fluoreszenz ab. Der Wert des Cycle threshold (C_t) oder Crossing point (C_p) beschreibt die Zyklenzahl, bei welcher die Hintergrundfluoreszenz überschritten und das Ergebnis als positiv definiert wird. Diese Hintergrundfluoreszenz wird von der Negativkontrolle definiert und als Schwellenwert oder Threshold bezeichnet. Je mehr Template zu Beginn der PCR vorhanden ist, desto geringer ist die Zyklenanzahl, bei der das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz überwindet (MAURER, 2006; MÜLLER & PRANGE, 2016).

Bei **SYBRGreen** handelt es sich um einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert. Diese Eigenschaft ist vergleichbar mit Ethidiumbromid, das in der konventionellen PCR zur Detektion der PCR-Produkte in einem Agarose-Gel eingesetzt wird. In der ungebundenen Form zeigt SYBRGreen nur eine geringe Grundfluoreszenz. Erst durch Einlagerung in den DNA-Doppelstrang erlangt es seine volle Strahlkraft (WITTWER et

al., 2013). Je mehr Amplikon im Laufe der Reaktion gebildet wird, desto stärker nimmt die Fluoreszenz zu. Gemessen wird die Fluoreszenzzunahme am Ende der Elongationsphase eines jeden Zyklus (BUSCH, 2010). Die Detektion des PCR-Produktes erfolgt im Rahmen einer Schmelzkurven-Analyse, die sich an die zyklische Phase der Reaktion anschließt. Das Reaktionsgemisch wird dazu langsam bis auf 95 °C erwärmt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Wird die Schmelztemperatur des Produktes, die von seinem G/C(Guanin/Cytosin)-Gehalt bestimmt wird, erreicht, löst sich der Doppelstrang. Dadurch wird augenblicklich das gebundene SYBR-Green freigesetzt und es kommt zu einem massiven Abfall der Fluoreszenz. Aus diesem Abfall, der innerhalb kurzer Zeit entsteht, wird rechnerisch ein Schmelzpunkt generiert, der spezifisch für das PCR-Produkt ist (KUBISTA et al., 2006).

Im Gegensatz zur SYBR-Green-basierten Real-Time-PCR verwenden sondengestützte Systeme das spezifischere **FRET-Prinzip** (Förster Resonance Energy Transfer) zur Detektion und Quantifizierung des PCR-Produkts. Dieses Prinzip wird sowohl beim Einsatz von Hybridisierungssonden als auch bei der Verwendung von Hydrolysesonden genutzt. Die zusätzlich zu den Primern verwendeten Hybridisierungssonden sind dadurch charakterisiert, dass sie am 3'- bzw. 5'-Ende mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (CAPLIN et al., 1999; JU et al., 1995; BUSCH, 2010; MÜLLER & PRANGE, 2016). Binden die Sonden an das DNA-Template und werden sie durch UV-Licht angeregt, so kommt es zur Energieübertragung zwischen den beiden Farbstoffen. Dies führt zur Entstehung von längerwelligem UV-Licht, welches von der optischen Einheit des Cyclers detektiert werden kann. Die Menge der gebundenen Sonden entspricht der Menge des entstehenden PCR-Produktes und eine Quantifizierung wird somit ermöglicht (MÜLLER & PRANGE, 2016). Da die Sonden am Ende der zyklischen Phase der PCR noch intakt sind, ist anschließend die Charakterisierung des PCR-Produktes über eine Schmelzkurvenanalyse möglich. Durch langsame Erhöhung der Temperatur bei kontinuierlicher Detektion der Fluoreszenz wird die Temperatur ermittelt, bei der die Sonden schlagartig vom Amplikon abschmelzen und die Fluoreszenz somit abfällt. Dieser Fluoreszenzabfall wird anschließend rechnerisch als Schmelzpeak dargestellt. Diese Art der Schmelzkurvenanalytik ermöglicht auch die Detektion von Mutationen im Bereich des Amplikons. Unterscheiden sich Wildtyp und Mutanten durch einen Basenaustausch, so führt dies zu einer Erniedrigung des Schmelzpunktes für die Mutante. Die Sonden sitzen in diesem Fall nicht mehr passgenau und somit wird weniger Energie in Form von Wärme benötigt, um ein Abschmelzen zu provozieren und damit den Fluoreszenzabfall zu bedingen (BUSTIN, 2000).

Dieses System wird in der vorliegenden Arbeit zur Detektion von β -CN B verwendet. Häufig kommt es aber beispielsweise auch in der Krebsdiagnostik zum Einsatz (SCHÖPPER, 2016).

Das FRET-Prinzip wird auch beim Einsatz von Hydrolysesonden wie zum Beispiel beim **TaqMan-System** verwendet (BUSCH, 2010). Allerdings bedingt hier die räumliche Nähe des ersten Fluoreszenzfarbstoffes (Quencher) zum zweiten zunächst eine Unterdrückung der Fluoreszenzemission. Durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, wird die Sonde abgebaut. Der Quencher entfernt sich räumlich vom Fluorophor, das nun seine volle Strahlkraft erlangt (MÜLLER & PRANGE, 2016). Die Hydrolyse der Sonden während der Elongationsphase führt zu einem irreversiblen Abbau der Farbstoffe (WITTWER et al., 2013). Aus diesem Grund kann das System der Hydrolysesonden zur Detektion und Quantifizierung jedoch nicht für eine Schmelzkurvenanalytik genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Hydrolysesonden verwendet, um eine A1-/A2-Typisierung des β -CN durchzuführen.

2.3.2.4 β -Caseintypisierung mittels PCR

Die PCR wird bei der Analyse des β -CN häufig verwendet und es kommen die verschiedensten Methoden sowohl zur Bestimmung des Caseintyps als auch zur Bestimmung der zugrunde liegenden Allele zum Einsatz (Tabelle 2).

Bemerkenswert ist, dass in der verfügbaren Literatur die Begriffe des Caseintyps bzw. der Allelvarianten nicht sauber definiert verwendet werden, sodass es zum Teil schwierig ist, die dort getroffenen Aussagen nachzuvollziehen und zu bewerten.

Tabelle 2. Publizierte PCR-Nachweise des β -CN

PCR-System	Nachweis von β -CN	Referenz
Bidirektionale Allel-spezifische PCR	B	DAMIANI et al. (1992)
Allel-spezifische PCR	A1, A2, A3, A5, B	LINDERSSON et al. (1995)
Reverse-Transkriptase(RT)-PCR, Rapid Amplification of Complementary DNA	komplette Sequenz	KLOTZ et al. (2000)
Real-Time-PCR, Schmelzkurvenanalyse	A1, A2, B	EINSPANIER et al. (2001)
TaqMan-Real-Time-PCR	A1-/A2-Typisierung	MANGA & DVORAK (2010)
Single Strand Confirmation Polymorphism	A1, A2, A3, B, C, I	JANN et al. (2002)
Amplification Refractory Mutation System PCR	B, Nicht-B	RINCON & MEDRANO (2003)
Amplification Created Restriction Site PCR	A1, A2	MCLACHLAN (2003)
Restriktionsfragmentlängen-polymorphismus	A1, A2, A3, B	KUCEROVA et al. (2006);
Restriktionsfragmentlängen-polymorphismus	A1, A2	MISHRA et al. (2009); KAMIŃSKI et al. (2006)
Allel-spezifische PCR	A1, A2	KEATING et al. (2008)
Restriktionsfragmentlängen-polymorphismus	A1, A2, A3, B, F, H1, H2, I	MASSELLA et al. (2017)
hochauflösende Schmelzkurvenanalyse	A1, A2	SHARMA et al. (2013)

2.3.3 Probenmaterial Milch

Die Milch gesunder Kühne enthält weniger als 100.000 Zellen/ml, welche sich aus abgestorbenen Epithelzellen, polymorphkernigen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten zusammensetzen. Bei einer Mastitis kann der Zellgehalt bis über 1.000.000/ml steigen. Somit gilt die Zellzahl als Indikator für die Eutergesundheit und ist ein Qualitätsfaktor für die Weiterverarbeitung der Milch (FEHLINGS & BAUMGARTNER, 2016). Beeinflussende Faktoren für die Zellzahl sind Spezies, Zucht, Milchausbeute, Laktationsstatus, Melktechnik, Stress und individuelle Veranlagung (POKORSKA et al., 2016).

Im Gegensatz zu Blut (4–12 Mio. Leukozyten/ml) (KRAFT, 2005) enthält Milch – vor allem wenn sie von eutergesunden Kühen stammt – nur wenige Zellen. Daher wird bei der DNA-Extraktion häufig mit großen Volumina bis zu 250 ml gearbeitet (PLATH et al., 1997). Erschwerend kommt hinzu, dass Milch verschiedene Inhibitoren enthält, die zum einen die DNA-Extraktion negativ beeinflussen können, zum anderen hemmend auf die PCR wirken. Milch enthält Inhibitoren wie Fett, Proteinase und Ca^{2+} -Ionen, welche die DNA-Ausbeute in Quantität und Qualität erschweren (WILSON, 1997). Der Vorteil ist, dass Milch als Probenmaterial tierfreundlich, in der Alltagsroutine und kostengünstig gewonnen werden kann.

2.3.4 Probenvorbereitung

Die Etablierung einer PCR, die eine hohe Spezifität und Sensitivität aufweist, beginnt bereits bei der Probenaufarbeitung und der DNA-Extraktion. Vor allem wenn nur geringe DNA-Mengen in der zu untersuchenden Matrix erwartet werden können, ist die Vorbereitung von entscheidender Bedeutung. Es kommt besonders darauf an, die DNA in einem kleinen Volumen einzugehen, um eine für die PCR ausreichende Konzentration zu erhalten. Das konkrete Vorgehen kann daher je nach Lebensmittel variieren (MAURER, 2006; MÜLLER & PRANGE, 2016).

Es sind kommerzielle Extraktions-Kits erhältlich, welche aber nicht zwangsläufig für alle Probenmatrices passend sind und individuell optimiert werden müssen (MAURER, 2006). Für die Aufbereitung von Milch wurden bisher folgende Vorgehensweisen beschrieben:

Nach dem möglichst keimfreien Gewinnen der Milch kann diese bei -20 °C eingefroren oder bei baldiger Verarbeitung bei 4 °C gelagert werden.

Vor der Extraktion müssen die **somatischen Zellen** der Milch in einem geringen Volumen eingeengt werden. Die **Aufkonzentrierung** kann mittels Anreicherung, Immunocapture, und Zentrifugation erreicht werden (MAURER, 2006; MÜLLER & PRANGE, 2016). Beim Probenmaterial Milch werden je nach Studie 10–250 ml bei 4–20 °C und 400–7.000 x g für 10–30 min 1–2 x zentrifugiert. Die Fetschicht wird mit einer sterilen Impfschlinge entfernt und der Überstand abgegossen oder mit der Pipette entnommen. Das Zellpellet wird im Gefäß belassen, beziehungsweise in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Anschließend kann es zur Aufbewahrung eingefroren werden (POKORSKA et al., 2016; USMAN et al., 2014; PSIFIDI et al., 2010; PLATH et al., 1997).

Die **Zelllyse** kann mithilfe von Hitze, Chemikalien, Detergenzien, Lösungsmitteln oder Enzymen wie Lysozym durchgeführt werden (MAURER, 2006; MÜLLER & PRANGE, 2016). Zur Gewinnung der DNA aus den somatischen Milchzellen wird ein Lysispuffer (TRIS-HCl, SDS, MgCl₂, NaCl, DMSO, Aceton) und/oder Proteinase K zum Pellet gegeben. Es folgt eine Inkubation bei 42–70 °C für 15 min bis hin zu mehreren Stunden. In diesem Zeitraum lösen sich die DNA-Protein-Aggregate (POKORSKA et al., 2016; PSIFIDI et al., 2010; PLATH et al., 1997).

Die **Trennung der DNA von Proteinen und Inhibitoren** wird mithilfe von Waschpuffern (Guanidin, Ethanol, Isopropanol, Natriumacetat, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Ethylendiamintetraacetat (TE=TRIS/EDTA) und Ethylendiamintetraacetat (EDTA), phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Guanidinium-HCl-Puffer) oder einer Phenol-Chloroform-Extraktion (1:1) durchgeführt. Somit wird das Milchcasein gelöst und durch Schwenken resuspendiert. Anschließend folgen Zentrifugationsschritte bis der Überstand, welcher jeweils abgegossen wird, klar wird. Die Silikagelmembransäulen absorbieren die DNA und sind damit eine weitere Möglichkeit, die DNA von Inhibitoren und Proteinen zu separieren (POKORSKA et al., 2016; PSIFIDI et al., 2010; PLATH et al., 1997; USMAN et al., 2014).

Anschließend wird die DNA mit einem (vorgewärmtten) **Elutionspuffer** (TRIS-HCl) oder destilliertem Wasser behandelt, bis zu 10 min inkubiert, zentrifugiert und somit eluiert. Der

Elutionsschritt kann für eine höhere Ausbeute wiederholt oder mit geringerem Puffervolumen eine höhere Konzentration der gewonnenen DNA erreicht werden. Der DNA-enthaltende Überstand kann bei 4 °C gelagert werden (POKORSKA et al., 2016; USMAN et al., 2014; PSIFIDI et al., 2010; PLATH et al., 1997).

2.3.5 Gelelektrophorese

Neben der Chromatographie, ist die Elektrophorese die am häufigsten verwendete Methode zur Trennung von Nukleinsäuren, Glykanen, Proteinen und Peptiden. Elektrophoretische Trennmethoden werden in die (Zonen)Elektrophorese, Isotachophorese (Gleichgeschwindigkeitselektrophorese) und Isoelektrische Fokussierung unterteilt (WESTERMEIER, 2016).

Bei der Gelelektrophorese wird ein Gel definierter Porengröße und Dicke verwendet und zur Untersuchung von Proteinen werden vorwiegend Agarose- und Polyacrylamidgele benutzt (WESTERMEIER, 2016).

Das Gesamtprotein weist je nach zugrundeliegendem β -Caseinallel eine variierende Sequenz auf und bedingt unterschiedliche elektrophoretische Eigenschaften, über welche sich die β -CN auftrennen lassen. Bis dato sind in der Literatur folgende Protokolle beschrieben:

HECK et al. (2009) und IGGMAN et al. (2003) verwendeten zur Untersuchung von β -CN in Milch eine Kapillar(zonen)elektrophorese und analysierten die Varianten A1, A2 und B. Bei der Kapillargelelektrophorese werden Kapillaren mit Polymeren, zum Beispiel Polyacrylamid, gefüllt. Man erhält einen erhöhten Molekularsiebeffekt und somit eine bessere Trennschärfe als bei der Elektrophorese (GEY, 2015). Die Kapillarzonenelektrophorese optimiert diese Eigenschaften noch weiter (CAMILLERİ, 1997).

Eine weitere Möglichkeit zur Analyse des β -CN ist die Isoelektrische Fokussierung, welche eine hohe Trennleistung durch ihren Bandenschärfungseffekt zeigt (WESTERMEIER, 2016). EINSPANIER et al. (2001) wies mit dieser Methode die β -Caseinvarianten A1, A2, B und C nach, ebenso wie KLOTZ et al. (2000), der eine IEF mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG) mit Milch durchführte. CAROLI et al. (2016) quantifizierte nach einer IEF mit einem System

zur automatischen Bildanalyse und untersuchte die Varianten A1, A2, A3 und B. Bei einer IPG-IEF sind die Ampholyten stabil in das Gel eingebunden. Sie zeigt eine hohe Auflösung und Ladekapazität, eine einheitliche Leitfähigkeit und Pufferkapazität, eine definierte Ionenstärke und einen vollständig beseitigten kathodischen Drift (BJELLQVIST et al., 1982).

Für die Gelelektrophorese kann Probenmaterial, wie Milch und Blut, nach Probenvorbereitung direkt verwendet werden. Der isoelektrische Punkt ist der Bereich auf dem Gel, bei welchem die Nettoladung des Proteins bei einem Wert von 0 liegt und die Wanderung zum Stillstand kommt. Die Proteine werden somit je nach Ladung, sowie Masse aufgetrennt und es entstehen durch Färbung sichtbare Banden (WESTERMEIER, 2016).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Aceton 99,8 % Chemsolute®	Th. Geyer, Renningen
Ammoniumpersulfat (PER)	Serva, Heidelberg
Anoden-/Kathodenflüssigkeit IEF	Serva, Heidelberg
α_s -CN Kuhmilch	Merck, Darmstadt
β -CN Kuhmilch	Merck, Darmstadt
β -Laktoglobulin (β -LG) Kuhmilch	Merck, Darmstadt
N, N-Methylen-bis-acrylamid (BIS) 30 % w/v	Serva, Heidelberg
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Fa. Qiagen, Hilden
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
Eisessig 96 %	Merck, Darmstadt
Ethanol 99,5 %	VWR, Belgien, Leuven
Glycerol	Serva, Heidelberg
Harnstoff/Urea 60,06 M	Merck, Darmstadt
Ionenfänger Serdolit MB-2	Serva, Heidelberg
Kupfersulfatpentahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol 99,8 % Chemsolute®	Th. Geyer, Renningen
phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	AppliChem, Darmstadt
Protease-Inhibitor-Cocktail	Merck, Darmstadt
Repel-Silane	LKB, SWE-Bromma
Serva Blue G	Serva, Heidelberg
Servalyt pH (2-4, 2-9, 4-5, 5-6, 5-8) 40 % w/v	Serva, Heidelberg
TaqMan® Universal Mastermix	Fa. Thermo Fisher Scientific, US-Waltham
Trichloressigsäure (TCE)	Merck, Darmstadt
N, N, N', N'- Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg

Thermo Scientific Absolute qPCR Mix

Fa. Thermo Fisher Scientific,
US-Waltham

3.1.2 Milchproben

Es wurden von insgesamt 488 Milchkühen aus 10 verschiedenen bayerischen Betrieben Einzelgemelksproben à 20 ml zu Beginn der Melkzeit gewonnen. Die Rassen verteilten sich wie folgt: 222 Braunvieh, 96 Fleckvieh, 122 Schwarzbunte Holstein-Friesian, 6 Rotbunte Holstein-Friesian und 42 Schwarzbunte Holstein-Friesian-Jersey-Kreuzungen.

Des Weiteren wurden Tankmilch, Vorzugsmilch, traditionell hergestellte frische Milch, länger haltbare frische Milch (ESL), A2-Wohlfühlmilch und haltbare fettarme Milch (UHT) aus dem Handel untersucht.

Rohmilchproben für die Gelelektrophorese und die Zellpellets für die DNA-Extraktion wurden bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

Als Referenzmaterial dienten 94 Proben des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim, die von zwei verschiedenen akkreditierten Laboren auf ihren β -Caseinallelstatus hin geprüft wurden.

3.1.3 Gen- und Aminosäuresequenzen

Gen	GenBank Accession Number M15132.1 (Hereford, mRNA CDS complete), KC993858.1 (Holstein, mRNA CDS complete), M16645.1 (mRNA CDS complete, Grundlage für Abbildung 4)
Aminosäuren	UNIPROT P02666.2 (UNIPROT, 1989)

3.1.4 PCR-Primer und -Sonden

Primer

Fa. TIB MOLBIOL, Berlin

A1-/A2-Typisierung (MANGA & DVORAK, 2010)

Forward Primer 5'-CTTGCCCCAGACACAGTCTCTAGT-3'

Reverse Primer 5'-GCACCACCACAGGGGTT-3'

β -CN B (EINSPANIER et al., 2001)

Forward Primer 5'-CAGGATAAAATCCACCCCTTT-3'

Reverse Primer 5'-GGGAAACAGGCAGGAC-3'

Sonden

Fa. TIB MOLBIOL, Berlin

A1-/A2- Typisierung: TaqMan (MANGA & DVORAK, 2010)

A2 5'-YAK-TGGACCCATCCCTAACAGCCTCCC-BBQ-3'

A1 5'-FAM-CTGGACCCATCCATAACAGCCTCCCA-BBQ-3'

β -CN B Hybridisierungssonde (EINSPANIER et al., 2001)

5'-LC640-CCTGACTCTCACTGATGTTGAAAATCTGC-PH-3'

5'-TTGAGGCCTTTACTGAAAGCCAG-Fluorescein-3'

3.1.5 Lösungen und Puffer

Gelelektrophorese

Katalysatoren

PER 65 mg

A. dest 125 μ l

Gelstammlösung

Harnstoff 60,06 M	48,05	g
Glycerin 87 % w/w	15	g
Acrylamid + BIS Fertiglösung 30 % w/v	16,2	ml
Aqua bidestillata (A. bidest.)	ad	100 ml
Serdolit		2 g

Gel

Gelstammlösung	9	ml
Ampholyte 40 % w/v	1	ml
TEMED	12	µl
PER	12	µl

Pufferlösung

Glycerin 87 % w/w	11,5	g
Harnstoff 60,06 M	48,06	g
DTT	0,5	g
Aqua destillata (A. dest.)	ad	100 ml

Probenpräparation

Pufferlösung	120	µl
Rohmilch	10	µl
Proteinase-Inhibitor	5	µl

Pufferlösung	1000	µl
Rohmilch Schaf, Ziege	100	µl
Proteinase-Inhibitor	50	µl

Pufferlösung	1000	µl
β-CN	2	mg
Proteinase-Inhibitor	50	µl

Pufferlösung	1000	µl
α_s -CN	1,2	mg
Proteinase-Inhibitor	50	µl
Pufferlösung	1300	µl
β -LG	1,5	mg
Proteinase-Inhibitor	50	µl
Pufferlösung	1000	µl
gefriergetrocknete Neuseeland A2-Milch	8	mg
Proteinase-Inhibitor	50	µl
Pufferlösung	1000	µl
acetongetrocknetes Referenzmaterial	2,5	mg
Proteinase-Inhibitor	50	µl

Coomassie-Blau-Färbung

Eisessig 20 %

Eisessig 96 %	250	ml
A. dest.	ad	1 1

Fixierlösung

TCE	150	g
A.dest	ad	1 1

Entfärbelösung

Methanol 50 %	500	ml
Eisessig 20 %	200	ml
A. dest.	ad	2 1

Färbelösung 1

Coomassie Blau G 250	3	g
Methanol 90 %	1	1

Färbelösung 2

Kupfersulfatpentahydrat	5	g
Eisessig 20 %	1	1

Färbelösung

Färbelösung 1	60	ml
Färbelösung 2	60	ml
Entfärbler	60	ml

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Elektrodenstreifen electrode wicks 300 x 6 x 1 mm	Serva, Heidelberg
Filterpipettenspitzen filter tips Biosphere® 0,5–20, 2–100, 20–300, 100–1000 µl	VWR, Ismaning
Gelträgerfolie Gel Fix for PAG	Serva, Heidelberg
Handschuhe puderfrei Latex Kolibri	IGEFA, Ahrensfelde
Handschuhe puderfrei Vinyl 2000 PF	Meditrade, Kiefersfelden
Impfschlingen 1 µl steril	Sarstedt, Nümbrecht
PCR 8er Streifen Vertiefungen und Kappen tube strip, cap strip	BIOplastics, NL – Landgraaf
Pipettenspitzen Labbsolute® dispenser tips 0,5 ml	Th. Geyer, Renningen
Pippettenspitzen 20, 200, 1000 µl	Brand, Wertheim
Prägerbandstreifen Dymoband	Dymo, POL – Poznan
Probenapplikatoren Sample Application Piece	GE Healthcare, SWE – Uppsala
Reaktionsgefäß Safe Seal 0,5 und 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß Safe Lock 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 12 ml	Kuhnle, Karlsruhe
Röhre 30 ml	Sarstedt, Nümbrecht

Röhre 50 ml Greiner

Röhre 50 ml

Merck, Darmstadt

Eppendorf, Hamburg

3.1.7 Geräte

Elektrophoresekammer	LKB, SWE – Bromma
Multiphor II Electrophoresis Unit	
Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank	Siemens, München
Glasexsikkator	Glaswerk Wertheim, Wertheim
Heizblock, Aluminiumblock	Grant, Cambridge
Kreisschüttler	GFL, Burgwedel
Kühl- und Gefrierkombination	Bosch, Kempten
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlthermostat 2219 Multitemp II thermostatic circulator	LKB, SWE – Bromma
Light Cycler 480 II	Roche, CH - Basel
Magnetrührer RH basic	IKA, Staufen
PCR Platte	BIOplastics, NL – Landgraaf
PCR Platten Zentrifuge Plate Spinner	VWR, Ismaning
Pipette Rainin Lite XL S 0,5–10 µl	Rainin, Mettler Toledo, Gießen
Pipetten Eppendorf 0,5–10, 10–100, 50–200, 100–1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Gummiwalze	Hama, Monheim
Sicherheitswerkbank Holten LaminAir	Thermo Fisher Scientific, US – Waltham
HV Mini PCR vertical flow cabinet	
Sicherheitswerkbank Secuflow	Waldner, Wangen
Spektrophotometer Nanocolor UV/VIS	Macherey-Nagel, Düren
Stepper HandySteps® 10-50 µl	Brand, Wertheim
Stromquelle Electrophoresis	Amersham pharmacia, biotech, GB – Amersham
Power supply EPS 3501 XL	
Vakuumventil	Lenz, Wertheim
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach

Vortex Genie 2	Scientific Industries, US – New York
Vortex VF2	IKA, Staufen
Waage AT 200	Mettler Toledo, Gießen
Waage Monobloc	Mettler Toledo, Gießen
Wasserwaage	Stabila, Annweiler am Trifels
Zentrifuge Mikro 120	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Multifuge 3L	Heraeus, Hanau

4 Methodik und Ergebnisse

4.1 Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

4.1.1 Optimierung

Als Ausgangsbasis für die DNA-Extraktion wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit von Qiagen und das Aufbereitungsprotokoll für Zellkulturen verwendet.

Um der Frage einer für die PCR ausreichende Menge an DNA nachzugehen, wurden Milchmengen von 2 ml, 5 ml und 10 ml aufbereitet und die PCR-Ergebnisse miteinander verglichen. Beim Einsatz von 10 ml Rohmilch wurde der niedrigste C_t-Wert erreicht, welcher sich bei 5 ml um eine Einheit und bei 2 ml um zwei Einheiten erhöhte. Durch den Einsatz einer höheren Milchmenge konnten mehr Zellen und somit deren DNA gewonnen werden.

Es wurde zudem der Einfluss der Lagerungsdauer (12 Stunden, 36 Stunden, 9 Tage) von Rohmilch auf die PCR getestet, wobei sich zeigte, dass eine Lagerung von bis zu neun Tagen keinen negativen Einfluss auf die DNA-Extraktion und die Ergebnisse der PCR hatte.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Konservierungsarten auf den Cycle threshold untersucht. Dabei wurde gekühlte mit eingefrorener Rohmilch, sowie ein eingefrorenes Zellpellet nach einem Zentrifugationsschritt verglichen. Das eingefrorene Pellet hatte die niedrigsten C_t-Werte und liegt dabei zwei bis drei Einheiten unter denen der eingefrorenen und frischen Rohmilch.

Einflüsse durch unterschiedliche Einstellungen bei der Zentrifugation auf die DNA-Ausbeute bei der Extraktion wurden ebenfalls analysiert. Die Milch wurde bei 1.920 x g für 10 min und bei 3.420 x g für 20 min zentrifugiert. Durch eine höhere Zentrifugalbeschleunigung und eine verlängerte Zeit konnten nicht mehr Zellen pelletiert werden und die in der PCR erzielten C_t-Werte verbesserten sich nicht.

Es wurde der Einsatz von Einzelpellets, sowie von Poolproben resultierend aus zwei Einzelpellets und deren Auswirkungen auf den C_t-Wert der PCR gegenübergestellt. Das

Einzelpellet resultierte hierbei aus der Zentrifugation von 10 ml Milch und durch Zusammenführung von zwei Pellets ergab sich eine Poolprobe. Die Poolprobe erzielte eine Senkung des C_t-Wertes von rund einer Einheit.

Zuletzt wurde der Einfluss von Ethanol, welches gekühlt und ungekühlt bei der Extraktion eingesetzt wurde, verglichen und die PCR-Ergebnisse analysiert. Die Lagerung fand hierbei bei Raumtemperatur und im Gefrierschrank bei -20 °C statt. Die Verwendung von gekühltem Ethanol während der Extraktion verringerte den C_t-Wert um rund eine Einheit.

4.1.2 Protokoll

Das folgende Protokoll wurde basierend auf den Versuchen zur Optimierung der Probenvorbereitung, sowie der DNA-Extraktion und der Auswertung dieser Ergebnisse angefertigt. Die Rohmilch wurde bei 1.920 x g 10 min zentrifugiert, die Fettschicht wurde mit einer sterilen Impfschlinge gelöst und mit dem Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde bei -20 °C konserviert und für die Weiterverarbeitung anschließend wieder aufgetaut. Nach Zugabe von 200 µl PBS (9,55 g/l) wurde es resuspendiert und in ein 1,5 ml RNA-, DNA- DNase- und Inhibitor-freies SafeSeal Reaktionsgefäß überführt. Zum Pellet wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl Lysis-Puffer (Buffer AL) hinzugegeben und gevortext. Es folgte eine Inkubation auf dem Heizblock bei 56 °C für 10 min, anschließend wurden 200 µl gekühltes Ethanol 99,8 % hinzugegen und erneut gevortext. Mittels Pipette wurde die Probe in eine DNeasy mini spin column, einer silikabasierten Säule, gegeben und bei ≥ 6.000 x g 1 min zentrifugiert. Das Sammelrörchen mit Durchfluss wurde entfernt, die Säule in einem neuen Sammelrörchen platziert und 500 µl Waschpuffer 1 (Buffer AW1) hinzugegeben. Es wurde abermals bei ≥ 6.000 x g 1 min zentrifugiert, der Durchfluss entfernt und die Säule in ein neues Röhrchen gegeben. Dann wurden 500 µl Waschpuffer 2 (Buffer AW2) beigefügt und bei 20.000 x g 3 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und 100 µl Elutionspuffer (Buffer AE) zentral auf die Säule hinzugefügt. Es folgte ein letzter Zentrifugationsschritt bei ≥ 6.000 x g 1 min, nach welchem die Säule entfernt und das gewonnene Eluat bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert oder für längere Konservierung bei -20 °C eingefroren wurde.

Zeigten sich in der Real-Time-PCR Fluoreszenzsignale, die sich nicht von der Negativkontrolle eindeutig differenzieren ließen, wurden zwei Einzelpellets gepoolt.

4.2 Messung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Eigenschaft der Nukleinsäure, Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) maximal zu adsorbieren, ermöglicht eine Konzentrationsbestimmung mithilfe eines Spektralphotometers. Für die Messung wurde eine Quarzküvette verwendet, welche selbst kein Licht adsorbiert. Doppelsträngige DNA erreicht bei einem Gehalt von 50 µg/ml einen Adsorptionswert, die sogenannte optische Dichte (OD), von 1. Mit der Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm (A_{280}) werden Proteinrückstände ermittelt und der Quotient aus A_{260}/A_{280} gibt die Reinheit der Lösung wieder. Der Reinheitsgrad sollte bei DNA über einem Wert von 1,9 liegen und Werte unter 1,5 sprechen für Verunreinigungen (BUSCH, 2010).

DNA-Konzentration [µg/µl]: $(A_{260} \times V \times U) / 1000$

V: Verdünnungsfaktor (100), U: Umrechnungsfaktor (50 bei doppelsträngiger DNA)

DNA-Qualität: A_{260}/A_{280}

Es wurden 30 Proben aus Einzelpellets und 3 gepoolte Proben nach der Extraktion des Referenzmaterials mit einem Verdünnungsfaktor von 100 auf ihre DNA-Konzentration und -Qualität hin untersucht.

4.2.1 Ergebnisse

Bei der Messung der Adsorption der Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm ergaben sich Werte zwischen 0,002 und 0,028 und für A_{280} lagen diese in einem Intervall von 0,001–0,031. Aus diesen Werten wurde die DNA-Qualität berechnet (A_{260}/A_{280}), welche zwischen 0,9 und 2 lag. Zuletzt wurde der DNA-Gehalt ermittelt, welcher sich im Bereich von 0,01 und 0,14 µg/µl befand.

Die Extrakte aus gepoolten Einzelpellets zeigten nur bei einer Einzelgemelksprobe den doppelten DNA-Gehalt und keine der 3 Proben lag über den durchschnittlichen Werten der Einzelpellets. Die Qualität von 21 Einzelgemelksproben lag unter einem Wert von 1,5 – dies spricht für eine Verunreinigung durch Protein (Anhang (9) Tabelle 19).

4.3 PCR-Kontrollen

Als Negativkontrolle wurde zum Reaktionsgemisch anstelle von Template Wasser hinzugefügt. Dadurch konnte eine Verunreinigung des Reaktionsgemisches mit DNA und daraus folgendes falsch positives Ergebnis ausgeschlossen werden.

Als Positivkontrolle wurde Referenzmaterial des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim verwendet. Diese Milchproben wurden zur Überprüfung der Funktion des Reaktionsgemisches und der PCR eingesetzt.

4.4 Primer- und Sondendesign

Zur A1-/A2-Typisierung wird das **TaqMan-System** mit Hydrolysesonden verwendet. Diese Sonden überlappen den Nukleotidaustausch und weisen je nach Typ das zugehörige Basentriplet in ihrer Sequenz auf (A1: cat, A2: cct). Es werden das Fluorophor FAM für den A1-Typ bzw. YAK für den A2-Typ und BBQ Quencher als Akzeptorfarbstoffe eingesetzt. Die Signalemission kann am Ende jedes Zyklus detektiert werden. Ein positives Signal wird somit beim A1A1-Typ bei der FAM-Detektion (465-510 nm) und beim A2A2-Typ bei der YAK-Detektion (533-580 nm) generiert. Beim A1A2-Typ entsteht bei beiden Kanälen eine Fluoreszenzkurve, welche die Hintergrundfluoreszenz überwindet. Das TaqMan-System schließt keine gesonderte Schmelzkurvenanalytik an die PCR an.

Zur Differenzierung des β -CN B von A1 und A2 wird in dieser Arbeit eine Real-Time-PCR mit Hybridisierungssonden durchgeführt. Es wird der Farbstoff Fluorescein an der Donorsonde und LC Red 640 an der Akzeptorsonde verwendet. Lediglich die Akzeptorsonde erstreckt sich über den Nukleotidaustausch (Allel B: agg, Allel A1, A2: agc). Bei der angefügten Schmelzkurvenanalyse entsteht durch die jeweilige Nukleotidzusammensetzung eine typische

Schmelzkurve mit einem Peak bei rund 57 °C für das β -CN B und bei rund 66 °C für die Allele A1 und A2. Graphisch wird dies mit der Temperatur auf der x-Achse und der Fluoreszenz-differenz auf der y-Achse dargestellt.

Bei der maturen Aminosäuresequenz des bovinen β -CN ist das Signalpeptid abgespalten. Alle in dieser Arbeit verwendeten Aminosäurennummern beziehen sich auf die Sequenz des reifen Proteins. Nachfolgende Abbildung (Abbildung 4) ist eine Übersicht über die Nukleotid- und Aminosäuresequenz des β -CN. Primer und Sonden der A1-/A2-Typisierung und der β -CN B PCR sind an den komplementären Abschnitten abgebildet. Für die PCR wichtige Nukleotidaustausche der verschiedenen Varianten und Aminosäuresubstitutionen, sowie alle weiteren Substitutionen und Mutationen, welche die Schmelzkurvenanalyse des β -CN B beeinflussen können, sind farblich hervorgehoben.

	Signalpeptid																	
	M	K	V	L	I	L	A	C	L	V	A	L	A	L	A	L	A	
1	atg	aag	gtc	ctc	atc	ctt	gcc	tgc	ctg	gtg	gct	ctg	gcc	ctt	gtc			
46	R aga	E gag	L ctg	E gaa	E gaa	L ctc	N aat	V gta	P cct	G ggt	E gag	I att	V gtg	E gaa	S agc			
91	L ctt	S tca	S agc	S agt	E gag	E gaa	S tct	I att	T aca	R cgc	I atc	N aat	K aag	K aaa	I att			
136	E gag	K aag	F ttt	Q cag	S agt	E gag	E gaa	Q cag	Q cag	Q caa	T aca	E gag	D gat	E gaa	L ctc			
181	Q cag	D gat	K aaa	I atc	H cac	P ccc	F ttt	A gcc	Q cag	T aca	Q cag	S tct	L cta	V gtc	Y tat			
	cag	gat	aaa	atc	eac	ccc	c	ttt	gcc	cag	aca	cag	tct	cta	gt		FP A1/A2	
	FP B																	
226	P ccc	F ttc	P cct	G ggg	P ccc	I atc		cct										
				t gt	gga gga	ccc ccc	atc ate	atc ate	ctc ctt	aac aac	agc agc	etc etc	cca cca	Q caa	N aac	I atc	P cct	
271	P cct	L ctt	T act	Q caa	T acc	P cct	V gtg	V gtg	V gtg	P ccg	P cct	F ttc	L ctt	Q cag	P cct			
					a acc	ect	gtg	gtg	gtg	c		RP A1/A2						
316	E gaa	V gta	L ttg	G gga	V gtc	S tcc	K aaa	V gtg	K aag	G ggg	A gct	M atg	A gct	P cct	K aag			
361	H cac	K aaa	E gaa	M atg	P ccc	F ttc	P cct	K aaa	Y tat	P cca	V gtt	E gag	P ccc	L ttt	T act			
							age R										HybSonde-	
406	E gaa	S age	Q cag	S agc	L ctg	T act	L ctc	T act	D gat	V gtt	E gaa	N aat	L ctg	H cac	L ctt			
					c cag	act	ctg	act	gat	gtt	gaa	aat	ctg	c			HybSonde PH B	
451	P cct	L ctg	P cct	L ctg	L ctc	Q cag	S tct	W tgg	M atg	H cac	Q cag	P cct	H cac	Q cag	P cct			
496	L ctt	P cct	P cca	T act	V gtc	M atg	F ttt	P cct	P cct	Q cag	S tcc	V gtg	L ctg	S tcc	L ctt			
541	S tct	Q cag	S tcc	K aaa	V gtc	L ctg	P cct	V gtt	P ccc	Q cag	K aaa	A gca	V gtg	P ccc	Y tat			
586	P ccc	Q cag	R aga	D atg	M atg	P ccc	I att	Q cag	A gcc	F ttt	L ctg	Y tac	Q cag	E gag				
631	P cct	V gta	L ctc	G ggt	P cct	V gtc	R cgg	G gga	P ccc	F ttc	P cct	I att	I att	V gtc	- taa			

Abbildung 4. β -CN mRNA des *Bos taurus*

Die Abbildung stellt eine Übersicht der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des β -CN (GenBank Accession Number M16645.1) dar. Die Aminosäurenummern beziehen sich auf die Sequenz des reifen Proteins. Das Signalpeptid (grün) ist abgespalten. Primer (forward: FP, reverse: RP) und Sonden (HybSonde: Hybridisierungssonde, Fluo: Flourescein) der A1-/A2-Typisierung (A1/A2, gelb) und der β -CN B PCR (B, türkis) sind an den komplementären Abschnitten abgebildet. Für die PCR wichtige Nukleotidaustausche der verschiedenen Varianten und Aminosäuresubstitutionen sind rot markiert. Alle weiteren Substitutionen sind in orange und Mutationen, welche die Schmelzkurvenanalyse des β -CN B beeinflussen können, in lila dargestellt.

4.5 TaqMan-PCR zur A1- und A2-Typisierung

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Primer und Sonden orientierten sich an der Studie von MANGA & DVORAK (2010).

Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 20 µl und als Mastermix wurde der kommerzielle TaqMan® Universal Mastermix von Applied Biosystems® von Thermo Fisher Scientific verwendet. Dieser Mix enthält laut Herstellerangaben die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, AmpErase® Uracil-DNA-Glycosylase, Desoxyribonukleosidtriphosphate mit Deoxyuridinetriphosphat und einen optimierten Puffer. Die Polymerase ist inaktiv und wird durch Hitze aktiviert. Deoxyuridinetriphosphat und Uracil-DNA-Glycosylase beugen „carry-over“-Kontaminationen vor und verringern die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen.

Es wurden TaqMan Reporterfarbstoffe Carboxyfluoreszein (FAM) und Yakima Yellow (YAK) mit BlackBerry Quenchern (BBQ) verwendet. FAM hat ein Absorptionsmaximum bei 458 nm, ein Emissionsmaximum bei 515 nm und YAK liegt im orangefarbenen Bereich (BUSCH, 2010).

4.5.1 Optimierung des PCR-Reaktionsgemisches

Zur Optimierung der PCR wurden verschiedene Primer- und Sondenkonzentrationen getestet. Die Template-DNA wurde 1:5, 1:10, 1:20 und 1:100 verdünnt und die Dauer der Fluoreszenzdetektion wurde variiert.

Zunächst wurde die Template-Menge bei konstanter Primer- und Sondenkonzentration verglichen (Tabelle 3).

Tabelle 3. Optimierung des Reaktionsgemisches und des Templates excl. des Mastermix

Mastermix	10 µl	10 µl
Forward Primer	300 nM	300 nM
Reverse Primer	300 nM	300 nM
FAM-Sonde	200 nM	200 nM
YAK-Sonde	200 nM	200 nM
H₂O	7 µl	3 µl
Template	1 µl	5 µl
gesamt	20 µl	20 µl

Die Verwendung von 5 µl gegenüber 1 µl Template hatte eine Linksverschiebung der C_t-Werte von bis zu 2 Einheiten zur Folge.

Folgend wurde das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes optimiert (Tabelle 4):

Tabelle 4. Optimierung des Reaktionsvolumens

Mastermix	10 µl	15 µl
Forward Primer	300 nM	300 nM
Reverse Primer	300 nM	300 nM
FAM-Sonde	200 nM	200 nM
YAK-Sonde	200 nM	200 nM
H₂O	3 µl	2 µl
Template	5 µl	10 µl
gesamt	20 µl	30 µl

Nach der Erhöhung des Reaktionsvolumens von 20 auf 30 µl zeigten sich keine Unterschiede des Cycle thresholds beim Verwenden von 5 und 10 µl Template.

Nun wurde die Primer- und Sondenmenge verdoppelt (Tabelle 5):

Tabelle 5. Optimierung des gesamten Reaktionsgemisches

Mastermix	10 µl
Forward Primer	600 nM
Reverse Primer	600 nM
FAM-Sonde	400 nM
YAK-Sonde	400 nM
H₂O	1 µl
Template	5 µl
gesamt	20 µl

Die Verdopplung von Primer und Sonden konnte die C_t-Werte nicht verbessern, sondern führte zu einer Erhöhung um eine Einheit.

Die in den Verdünnungsexperimenten erzielten C_t-Werte standen in einem linearen Zusammenhang zu dem jeweiligen Verdünnungsfaktor. Mithilfe einer Erhöhung der Fluoreszenzdetektionsdauer waren die PCR-Graphen deutlich von der Negativkontrolle zu unterscheiden, wobei Einstellungen mit 0,5/0,75/1 und 1,25 s getestet wurden. Es ist zu beachten, dass bei zu langer Detektionsdauer falsch positive Ergebnisse durch Erhöhung der Hintergrundfluoreszenz durch unspezifische Fluoreszenzsignale produziert werden. Bei der Einstellung der Detektionsdauer von FAM für 0,75 s und bei YAK für 1,25 s ließen sich die generierten Fluoreszenzkurven am deutlichsten von der Negativkontrolle differenzieren und es entstanden keine unspezifischen Signale.

4.5.2 Protokoll

Nach der Analyse der Optimierung und deren Versuchsergebnisse wurde nachfolgende Mastermixzusammensetzung (Tabelle 6) verwendet und folgendes Protokoll erstellt:

Tabelle 6. Mastermixzusammensetzung der A1-/A2-Typisierung

Mastermix	10 µl
Forward Primer	300 nM
Reverse Primer	300 nM
FAM-Sonde	200 nM
YAK-Sonde	200 nM
H₂O	3 µl
Template	5 µl
gesamt	20 µl

Primer wurden mit einer Stoffmengenkonzentration von je 300 nM und Sonden mit je 200 nM eingesetzt. Primer, Sonden, Mastermix und Wasser werden gekühlt zusammengegeben und mit 15 µl in der PCR eingesetzt. Das Eluat, die Positivkontrollen (A1A1-, A1A2-, A2A2-Typ) und die Negativkontrolle wurden in Mengen von je 5 µl hinzugegeben.

Mit einem Thermocycler wurde eine Real-Time-PCR mit folgendem Profil (Tabelle 7) durchgeführt:

Tabelle 7. PCR-Programm für die A1-/A2-Typisierung

Temperatur °C	Zeit	Zyklen	Detektion
50	2 min	1	
95	10 min	1	
95	15 s		
60	1 min	40	einmalig am Zyklusende

4.5.3 Validierung der PCR zur A1-/A2-Typisierung

Zur Validierung der PCR zur A1-/A2-Typisierung wurden 94 Milchproben des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim, die von zwei akkreditierten Auftragslaboratorien auf deren A1-/A2-Allelstatus analysiert wurden, verwendet. Die Referenzmaterialproben wurden je nach Genotyp dem A1A1-, A2A2- oder A1A2-Typ zugeordnet und mittels TaqMan-Real-Time-PCR wurden diese Typen überprüft. Dabei konnte eine 100%-ige Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Labore erzielt werden (Tabelle 8).

Tabelle 8. Ergebnisse der A1-/A2-Typisierung des Referenzmaterials

	Proben	A1A1-Typ	A2A2-Typ	A1A2-Typ
diese Arbeit	94	11	34	49
Labor 1	94	11	34	49
Labor 2	94	11	34	49
Übereinstimmung		100 %	100 %	100 %

4.5.4 Gelelektrophorese zur Validierung der PCR

Um die PCR-Ergebnisse des getesteten Referenzmaterials mit einer weiteren Methode zu validieren, wurden 91 der 94 (excl. 3 β-CN B) Rohmilchproben des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim mittels IEF-Gelelektrophorese analysiert. Die Gelelektrophorese ermöglicht die Darstellung der von Allel A1 und A2 kodierten Proteine auf dem Gel. Da in dieser Arbeit bisher eine A1-/A2-Typisierung erfolgte, wurden die 3 β-CN B Proben des Referenzmaterials zunächst zurückgestellt und die Ergebnisse der Gelelektrophorese wurden mit den Ergebnissen der PCR verglichen.

Für die Etablierung der Gelelektrophorese wurde die Studie von CAROLI et al. (2016) zur Orientierung verwendet und weiter optimiert (siehe Punkt 4.6). Die Gelherstellung und die Probenvorbereitung erfolgte anhand der Methodenbeschreibung zur Untersuchung von Kuhmilchkasein des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuchs (§ 64 LFGB L03.52 1 (EG) (1997-09)) (LFGB, 1989).

4.5.5 Untersuchungsergebnisse der A1-/A2-Typisierung

Anschließend an die Validierung wurden die gewonnenen Einzelgemelksproben analysiert und es ergaben sich folgende Ergebnisse:

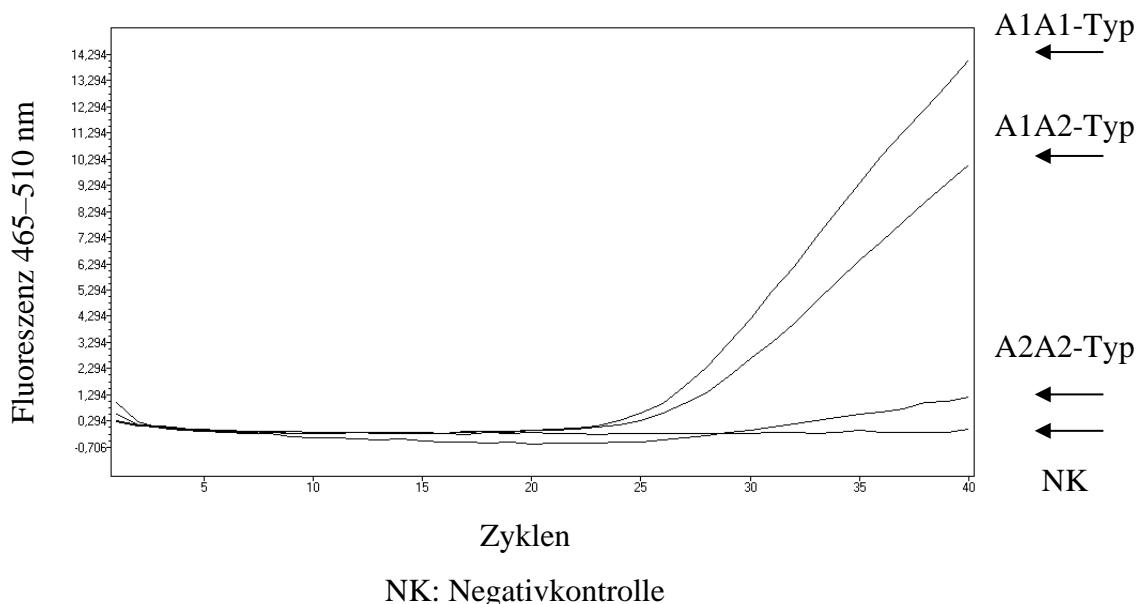


Abbildung 5. Exemplarische Darstellung der Fluoreszenzentwicklung der PCR zur A1-Typisierung

Die Zyklenzahl ist auf der x-Achse und die Fluoreszenzintensität auf der y-Achse abgebildet. Die verwendeten Hydrolysesonden sind mit den Farbstoffen FAM und YAK gelabelt.

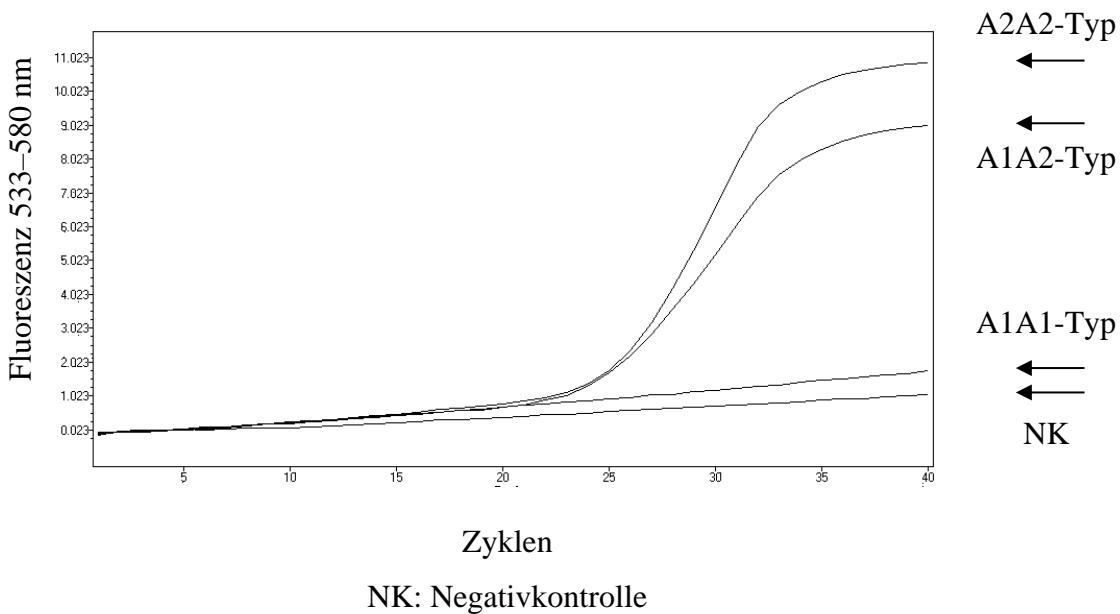


Abbildung 6. Exemplarische Darstellung der Fluoreszenzentwicklung der PCR zur A2-Typisierung

Die Zyklenzahl ist auf der x-Achse und die Fluoreszenzintensität auf der y-Achse abgebildet.
Die verwendeten Hydrolysesonden sind mit den Farbstoffen FAM und YAK gelabelt.

Das Ergebnis der PCR konnte für jede Probe unmittelbar nach Beendigung des Laufes beurteilt werden und die Fluoreszenzintensität positiver Proben hob sich deutlich von der Hintergrundfluoreszenz ab. Bei der A1-Typisierung erschienen die Negativkontrolle und die Probe vom A2-Typ hierbei negativ und formierten die Hintergrundfluoreszenz. Die Proben vom Typ A1 (A1A1-, A1A2-Typ) überwanden die Hintergrundfluoreszenz und es konnte somit ein positives Ergebnis detektiert werden (Abbildung 5). Bei der A2-Typisierung wurde der threshold durch die Negativkontrolle, sowie durch den homozygoten A1-Typ gebildet und der heterozygote A1-Typ und der A2-Typ zeigten positive Ergebnisse (Abbildung 6). Aus dieser Auswertung ergaben sich nachfolgende Ergebnisse, welche jeweils prozentual (Abbildung A) und absolut (Abbildung B), sowie aufgeschlüsselt nach Rassen dargestellt werden.

4.5.5.1 Referenzmaterial und Einzelgemelksproben

Wie unter 4.5.3 beschrieben, wurden Einzelgemelksproben des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim als sogenanntes Referenzmaterial untersucht. Die Herde setzte sich aus 94 Kühen zusammen, welche der Rassen Deutsches Holstein und Fleckvieh abstammten. Dabei gehörten 12 %/11 Tiere dem A1A1-Typ an, 36 %/34 Tiere dem A2A2-Typ und 52 %/49 Tiere dem A1A2-Typ (Abbildung 7).

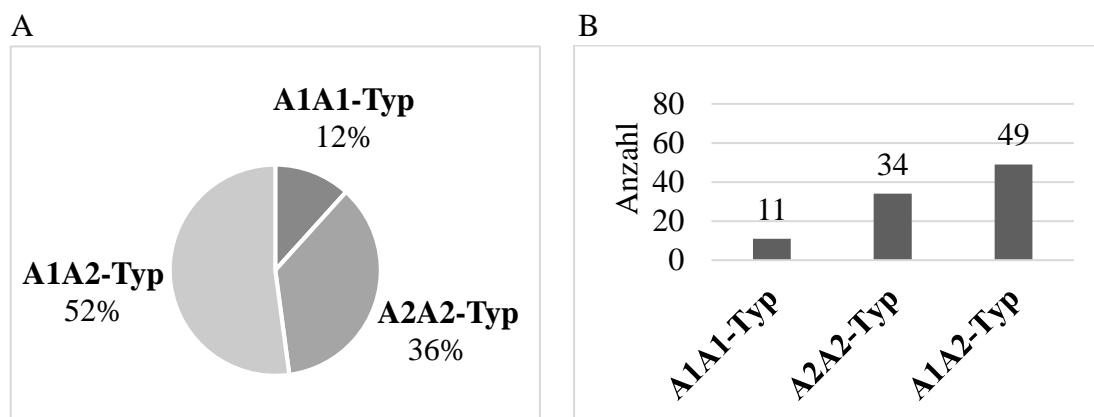


Abbildung 7. A1-/A2-Typisierung des Referenzmaterials

Prozentuale (A) und absolute (B) Verteilung des A1-/A2-Typs im Referenzmaterial.

Es wurden insgesamt 488 Einzelgemelkproben von Milchkühen der Rassen Braunvieh, Fleckvieh, schwarzunte und rotbunte Holstein-Friesian, sowie schwarzunte Holstein-Friesian-Jersey-Kreuzungen untersucht. Die PCR zeigte, dass 7 %/37 Tiere dem A1A1-Typ, 53 %/257 Tiere dem A2A2-Typ und 40 %/194 Tiere dem A1A2-Typ angehörten (Abbildung 8).

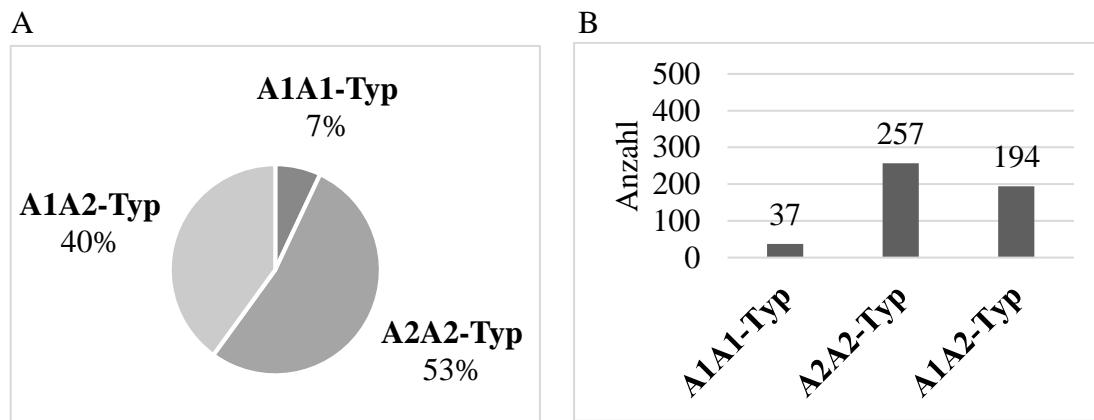


Abbildung 8. Rassenunabhängige A1-/A2-Typisierung

Rassenunabhängige prozentuale (A) und absolute (B) Verteilung des A1-/A2-Typs.

Werden die beiden graphischen Darstellungen des Referenzmaterials (Abbildung 7) und der Einzelgemelke (Abbildung 8) verglichen, ist zu erkennen, dass der A1A1-Typ um rund 5 % weniger, der A2A2-Typ um rund 20 % mehr und der A1A2-Typ um rund 10 % weniger repräsentiert ist. Da das Referenzmaterial sich in der Rassenzusammensetzung von den Einzelgemelksproben unterscheidet, hat dies Auswirkungen auf die Verteilung der Ergebnisse der A1-/A2-Typisierung.

Im Folgenden wird die A1-/A2-Typisierung separat für die verschiedenen Rassen untersucht und zusätzlich wird ein Vergleich einzelner Betriebe mit gleichen Rassen durchgeführt.

4.5.5.2 Braunvieh

Bei der Braunvieh-Rasse wurden insgesamt 222 Tiere beprobt (Abbildung 9). 6 Tiere/3 % waren dabei dem A1A1-Typ, 149/67 % dem A2A2-Typ und 67/30 % dem A1A2-Typ zugehörig.

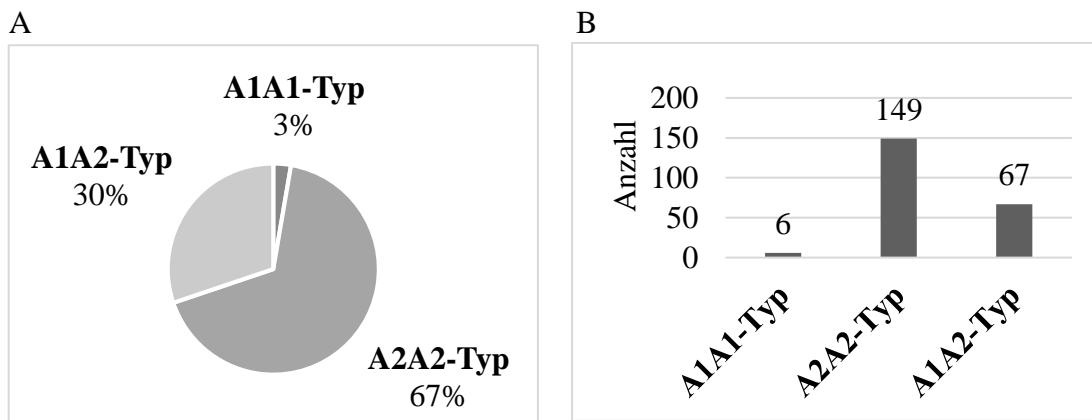


Abbildung 9. A1-/A2-Typisierung des gesamten Braunviehs

Prozentuale (A) und absolute (B) Verteilung des A1-/A2-Typs beim Braunvieh.

Ein Braunvieh-Betrieb mit 135 Braunvieh-Milchkühen erzielte einen A1A1-Typ-Anteil von 1 %/1 Tier, einen A2A2-Typ-Anteil von 69 %/93 Tieren und einen A1A2-Typ-Anteil von 30 %/41 Tieren (Braunvieh-Bestand 1, Abbildung 10). Der A1A1-Typ-Anteil wurde bei diesem Betrieb um 2 % seltener, beim A2A2-Typ um 2 % häufiger gefunden, verglichen mit den gesamten Braunvieh-Proben.

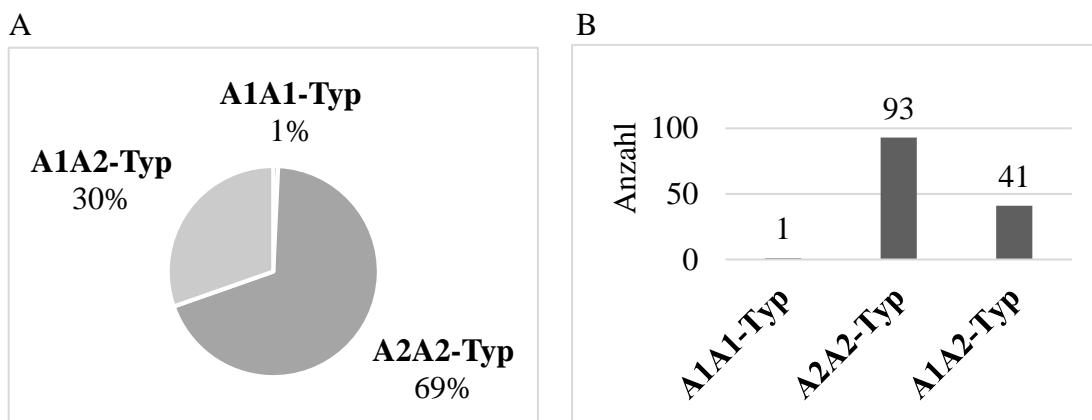


Abbildung 10. A1-/A2-Typisierung des Braunvieh-Bestandes 1

Prozentuale (A) und absolute (B) Verteilung des A1-/A2-Typs beim Braunvieh-Bestand 1.

Ein weiterer Bestand mit 50 Tieren wurde untersucht (Braunvieh-Bestand 2, Abbildung 11). Es ergab sich eine Zugehörigkeit zum A1A1-Typ von 10 %/5 Tieren, zum A2A2-Typ mit 62 %/31 Tieren und zum A1A2-Typ mit 28 %/14 Tieren. Hier wurde im Gegensatz zum

Braunvieh-Bestand 1 der A1A1-Typ um 7 % mehr und der A2A2-Typ um 5 % weniger, sowie der A1A2-Type um 2 % weniger repräsentiert im Bezug auf die gesamten Braunvieh-Proben.

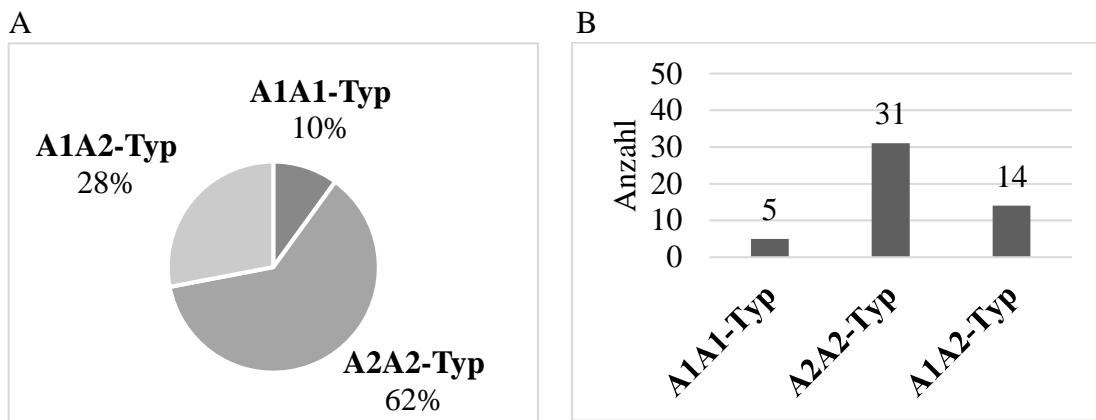


Abbildung 11. A1-/A2-Typisierung des Braunvieh-Bestandes 2

Prozentuale (A) und absolute (B) Verteilung des A1-/A2-Typs des Braunvieh-Bestandes 2.

Zwischen den gesamten Proben der Rasse Braunvieh, dem Braunvieh-Bestand 1 und 2 sind nur geringe Unterschiede bei der A1-/A2-Typisierung zu beobachten. Im Bezug zum Referenzmaterial und den rassenunabhängigen Einzelgemelksproben wurde der A1A2-Typ seltener und der A2A2-Typ häufiger gefunden.

4.5.5.3 Fleckvieh

Beim Fleckvieh wurden insgesamt 96 Tiere untersucht, welche mit 7 Tieren/7 % dem A1A1-Typ, mit 50 Tieren/52 % dem A2A2-Typ und mit 39 Tieren/41 % dem A1A2-Typ angehörten (Abbildung 12).

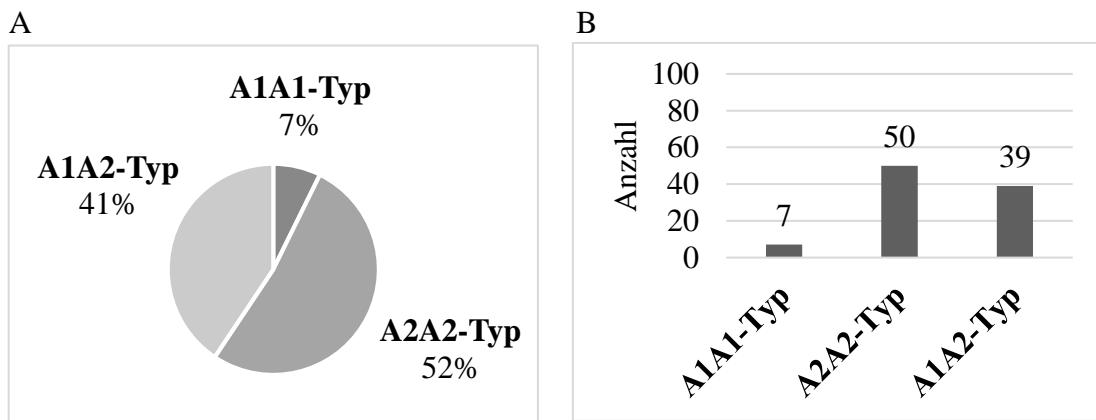


Abbildung 12. A1-/A2-Typisierung des gesamten Fleckviehs

Gesamtverteilung des A1-/A2-Typs in zwei Fleckviehbeständen prozentual (A) und absolut (B) aufgeschlüsselt.

Ein Bestand mit 38 Stück Fleckvieh wurde mittels PCR A1-/A2-typisiert (Fleckvieh-Bestand 1, Abbildung 13). Dem A1A1-Typ zeigten sich 3 Stück/8 %, dem A2A2-Typ 20 Stück/53 % und dem A1A2-Typ 15 Stück/39 % zugehörig. Es zeigte sich damit eine höhere Präsenz des A1A1-, sowie des A2A2-Typs um jeweils 1 % und damit eine geringere Präsenz des A1A2-Typ-Anteils um 2 % im Vergleich mit den gesamten Fleckvieh-Proben.

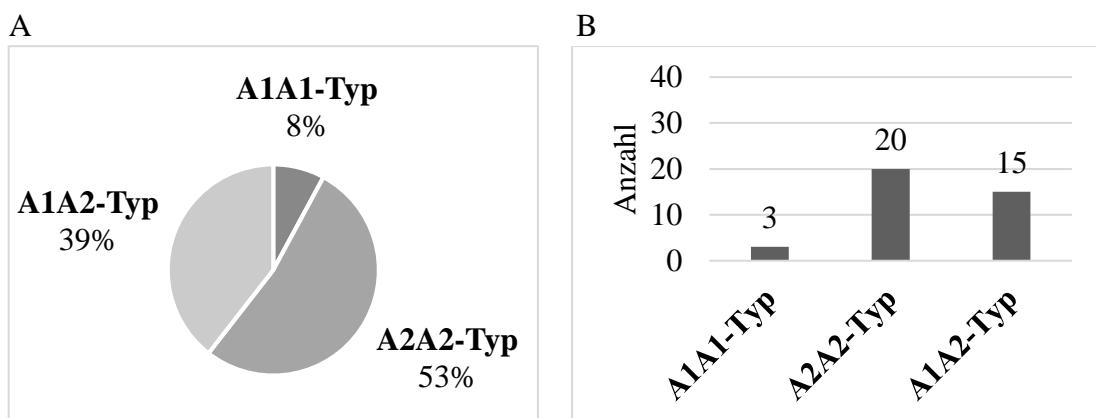


Abbildung 13. A1-/A2-Typisierung des Fleckvieh-Bestandes 1

Prozentuale (A) und absolute (B) Verteilung des A1-/A2-Typs des Fleckviehs des Bestandes 1

Ein weiterer Fleckvieh-Bestand mit 27 Tieren hatte einen A1A1-Typ-Anteil von 2 Tieren/8 %, A2A2-Typ-Anteil von 16 Tieren/59 % und A1A2-Typ-Anteil von 9 Tieren/33 %

(Fleckvieh-Bestand 2, Abbildung 14). Der A1A1-Typ war beim Fleckvieh-Bestand 1 um 1 % mehr, der A2A2-Typ um 7% mehr und der A1A2-Typ um 8 % weniger repräsentiert, verglichen mit allen untersuchten Fleckvieh-Proben.

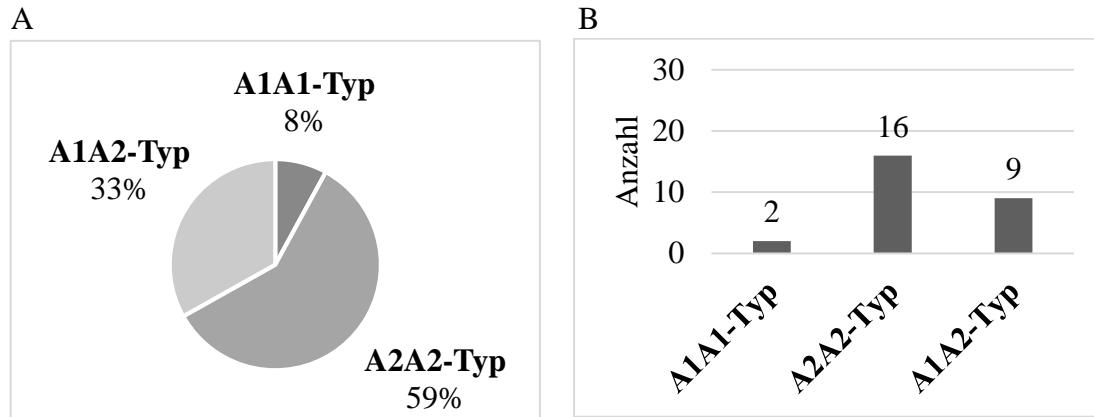


Abbildung 14. A1-/A2-Typisierung des Fleckvieh-Bestandes 2

Prozentuale (A) und absolute (B) Verteilung des A1-/A2-Typs des Fleckvieh-Bestandes 2.

Die Fleckvieh-Bestände zeigen nur geringe Abweichungen untereinander, welche sich in der Differenz von jeweils 6 % beim A1A2- beziehungsweise A2A2-Typ zeigen. Ebenso bestehen keine großen Unterschiede zwischen der gesamten Fleckvieh-Untersuchung und den Ergebnissen der zwei Fleckvieh-Bestände. Betrachtet man die zwei Betriebe und die Einzelgemelksproben im Gesamten, zeigen sich nur geringe Abweichungen. Verglichen mit dem Referenzmaterial ließ sich eine geringfügig geringere Präsenz beim A1A1-Typ erkennen. Der A1A2-Typ wurde um rund 20 % seltener, und der A2A2-Anteil um rund 20 % häufiger gefunden.

4.5.5.4 Holstein-Friesian

Bei der Rasse Holstein-Friesian wurden die Schwarzbunten mit insgesamt 122 Tieren untersucht (Abbildung 15). Bei dieser Rasse waren 17 Tiere/14 % dem A1A1-Typ, 41/34 % dem A2A2-Typ und 64/52 % dem A1A2-Typ zugehörig.

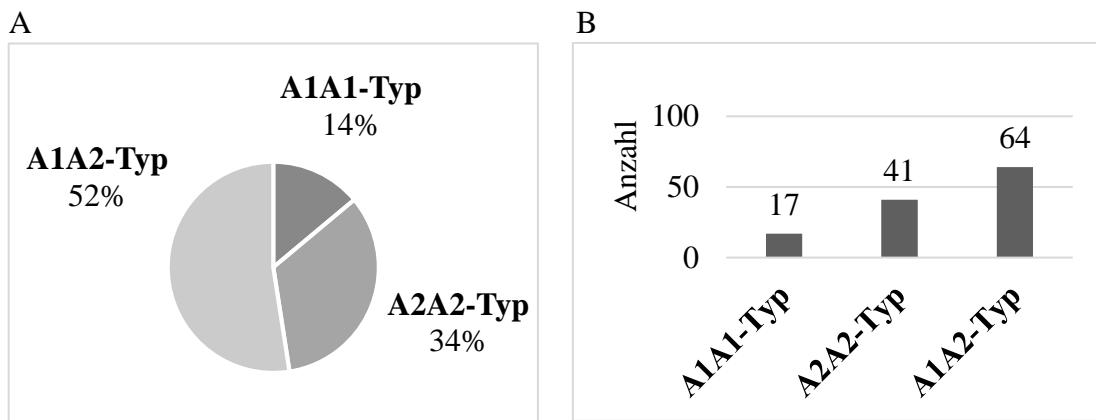


Abbildung 15. A1-/A2-Typisierung der gesamten Holstein-Friesians

Prozentuale (A) und absolute (B) Verteilung des A1-/A2-Typs aller in dieser Arbeit untersuchten Holstein-Friesians.

Eine Herde von 42 Schwarzbunten Holstein-Friesian-Jersey-Kreuzungen (Holstein-Friesian x Jersey Bestand 1, Abbildung 16) wurde beprobt und zeigte folgende Verteilung: A1A1-Typ: 9 %/4 Tiere, A2A2-Typ 36 %/15 Tiere und A1A2-Typ 55 %/23 Tiere. Der A1A1-Typ zeigte im Vergleich zu den gesamten untersuchten Schwarzbunten eine um 5 % geringere, der A1A2-Typ eine um 3 % höhere und der A2A2-Typ eine um 2 % höhere Präsenz.

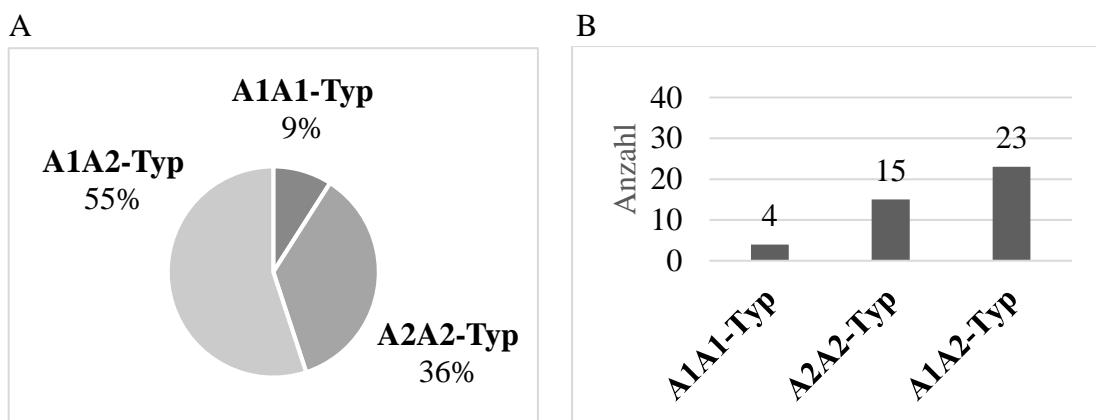


Abbildung 16. A1-/A2-Typisierung des Holstein-Friesian x Jersey-Bestandes 1

Prozentuale (A) und absolute (B) Verteilung des A1-/A2-Typs der Holstein-Friesian x Jersey Kreuzungen.

Zuletzt wurde eine schwarzunte Holstein-Friesian-Herde von 112 Tieren A1-/A2-typisiert (Holstein-Friesian-Bestand 2, Abbildung 17). Hier zeigten sich 14 Tiere/12 % dem A1A1-Typ, 39 Tiere/35 % dem A2A2-Typ und 59 Tiere/53 % dem A1A2-Typ zugehörig. Zu allen untersuchten Schwarzbunten zeigten sich somit nur geringste Abweichungen.

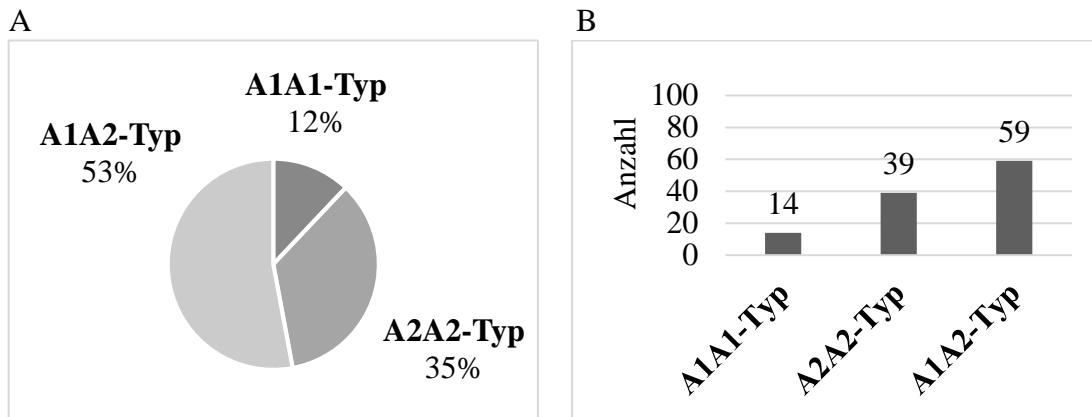


Abbildung 17. A1-/A2-Typisierung des Holstein-Friesian-Bestandes 2

Prozentuale (A) und absolute (B) Verteilung des A1-/A2-Typs der Holstein-Friesians des Bestandes 2.

Alle Schwarzbunten zeigten eine fast identische Verteilung wie das Referenzmaterial. Im Bezug zu den untersuchten Einzelgemelksproben wurde der A1A1- und A1A2-Typ häufiger, der A2A2-Typ weniger repräsentiert. Beim Vergleich aller Schwarzbunten mit den einzelnen Beständen zeigte Bestand 1 mit den Jersey-Kreuzungen Abweichungen in einer geringeren Präsenz des A1A1-Typ-Anteils und einer höheren Präsenz des A1A2- und A2A2-Typ-Anteils.

4.5.5.5 Ergebnisübersicht der A1-/A2-Typisierung

In Tabelle 9 ist eine Übersicht der Ergebnisse der A1-/A2-Typisierung der Einzelgemelksproben aufgeführt.

Tabelle 9. Ergebnisse der A1-/A2-Typisierung

	gesamt	A1A1-Typ	A2A2-Typ	A1A2-Typ
Braunvieh	222 (45,5 %)	6 (2,7 %)	149 (67,1 %)	67 (30,2 %)
Fleckvieh	96 (19,7 %)	7 (7,3 %)	50 (52,1 %)	39 (40,6 %)
Holstein-Friesian Schwarzbunt	122 (25 %)	17 (13,9 %)	41 (33,6 %)	64 (52,5 %)
Hostein-Friesian Rotbunt	6 (1,2 %)	3	2	1
Holstein-Friesian x Jersey	42 (8,6 %)	4 (9,5 %)	15 (35,7 %)	23 (54,8 %)
rassenunabhängig	488 (100 %)	37 (7,6 %)	257 (52,7 %)	194 (39,7 %)

4.5.6 A1-/A2-Typisierung der Tank- und Konsummilch

Neben den Einzelmelksproben wurde untersucht, ob es möglich ist, bei Herdensammelmilch und technologisch bearbeiteter Milch eine erfolgreiche A1-/A2-Typisierung durchzuführen. Bei den zu untersuchenden Produkten aus dem Handel und der Tankmilch ergaben sich bei einer Menge von 10 ml schon auswertbare Ergebnisse. Es wurde Tankmilch, Vorzugsmilch, traditionell hergestellte frische Milch, länger haltbare frische Milch (ESL), A2-Wohlfühlmilch und haltbare fettarme Milch (UHT) untersucht. Die A2-Typ-Signale der PCR zeigten bei 10 ml Probenmenge generierte Amplifikationskurven, welche sich deutlich von der Hintergrundfluoreszenz differenzieren ließen. Die A2-Wohlfühlmilch zeigte nur ein A2-Typ-Signal. Die A1-Typ-Signale waren bei der Tank-, H- und Vorzugsmilch nicht klar von der Negativkontrolle zu unterscheiden und wurden bei diesen Proben mit 20 und 50 ml Probenmenge wiederholt. Bei 20 ml Probeneinsatz waren die A1-Fluoreszenzsignale gegenüber der Hintergrundfluoreszenz deutlicher zu differenzieren, der C_t-Wert konnte aber nicht verringert werden und die Ergebnisse waren somit noch nicht aussagekräftig. Auch die weitere Erhöhung der in die Extraktion eingesetzte Milchmenge auf 50 ml erbrachte nur die Vorverlagerung der C_t-Werte um einen Zyklus. Die Amplifikationskurve war nochmals geringfügig deutlicher vom threshold zu unterscheiden und konnte als aussagekräftiges Ergebnis gewertet werden. Die Eluate von Tank- und Konsummilchproben wurden nach zweimonatiger Gefrierkonservierung auf DNA-Gehalt und -Qualität hin untersucht. Die Qualität der Tank-, Vorzugs-, sowie H-Milch lag unter einem Wert von 1,5 und spricht damit für eine Verunreinigung. Bei 20 und 50 ml Probenmenge zeigte sich eine Erhöhung der DNA-

Konzentration, wobei bei der Tankmilchprobe kein linearer Anstieg zu beobachten war. Bei der ultrahocherhitzten Milch konnte bei 10 und 20 ml Probenmenge mittels Spektralphotometer keine DNA mehr nachgewiesen werden. Bei 50 ml der Milchprobe lag der DNA-Gehalt bei dieser Probe bei 0,01 µg/µl. Die DNA-Konzentrationen des Pellets aus Tankmilch lag bei 0,005 µg/µl und damit zusammen mit dem Pellet und den gepoolten Pellets der UHT-Milch unterhalb der Werte der Einzelgemelksproben. Die restlichen Proben lagen innerhalb dieses Wertebereichs. Es ist somit möglich, aus Mischungen von Einzelgemelken in Form von Tank- oder Konsummilch auswertbare Ergebnisse mittels PCR zu erlangen (A2-Milch, traditionell hergestellte frische Milch, ESL-Milch). Für aussagekräftige A1-Typ-Fluoreszenzsignale sind eventuell höhere Mengen Milch (50 ml) für die Extraktion nötig (Tank-, Vorzugs-, UHT-Milch).

4.6 IEF-Gelelektrophorese des β -CN A1 und A2

4.6.1 Optimierung

Ziel der Methodenoptimierung war es, eine ausreichende Trennschärfe der Caseinbanden zu erreichen, die eine Detektion der verschiedenen Caseine erlaubt. Dazu wurden verschiedene Ampholyte (40 % w/v) und deren Kombination getestet (Tabelle 10). Die Zusammensetzung der Ampholyte verschiedener pH-Bereiche beeinflussen den Abstand der einzelnen Banden im Gel zueinander. Das β -Laktoglobulin (LG) und β -CN liegen sehr nahe beieinander oder überlappen sich sogar. Der isoelektrische Punkt von Caseinen liegt zwischen einem pH-Wert von 4,6 und 4,8 (STENZEL, 2016), weshalb dieser Bereich mithilfe der Zusammensetzung der Ampholyte gespreizt werden soll. Zusätzlich zu den Variationen der Ampholyte wurde die Konzentration des Gels und die Menge der zugesetzten Katalysatoren variiert.

Tabelle 10. Optimierung der Ampholyte für die IEF

Variationen der Zusammensetzung der Ampholyte zur Spreizung des pH-Bereiches um den isoelektrischen Punkt.

Variante 1		Variante 2		Variante 3		Variante 4	
pH	µl	pH	µl	pH	µl	pH	µl
2–9	250	2–4	250	2–9	250	2–4	200
4–5	500	4–5	500	4–5	200	4–5	200
5–8	250	5–8	250	5–6	400	5–6	400
				5–8	250	5–8	200

Bei Variante 3 lag die Ampholytemenge bei 1100 µl und es wurden 8,9 ml Gelstammlösung hinzugefügt. Ein weiteres Gel wurde mit 10,1 ml Gelstamm und Katalysatoren à 13 µl hergestellt.

Im Anhang (9) sind die unterschiedlichen Varianten und Schemata der Zusammensetzung der Ampholyte aufgeführt (Abbildung 24–27). Bei allen vier Varianten konnten die Banden scharf dargestellt und voneinander differenziert werden. Variante 4 zeigte minimal größere Abstände der Banden und es konnten die im Referenzmaterial befindlichen Caseine mit Ausnahme einer geronnenen Probe korrekt dargestellt werden.

Des Weiteren wurden die Einstellungen für die IEF variiert und die erste Programmeinstellung ist in Tabelle 11 gezeigt. Bei Programm 2 wurden 2000 V eingestellt, die Pausen manuell gesteuert und die Spannung wurde nach Erreichen der 2000 V auf 2500 V erhöht. Die Auswahl des Programms ist für die Fokussierung und somit den Bandenschärfungseffekt von Wichtigkeit.

Tabelle 11. IEF-Programm

Einstellungen der Parameter für das automatische IEF-Programm, das für die Untersuchungen verwendet wurde.

	Zeit in min	Spannung in V	Strom in mA	Leistung in W
Vorfokussierung	30	2000	15	3,5
Probenfokussierung	40	2000	15	3,5
Endfokussierung 1	20	2000	15	3,5
Endfokussierung 2	90	2500	5	15

Die unterschiedlichen IEF-Einstellungen zeigten vergleichbare Ergebnisse der Trennschärfe, das automatische Programm war aber wesentlich einfacher durchzuführen. Die Banden waren deutlich und eindeutig auszuwerten.

Eine Fällung des β -LG mit TCE wurde mit drei Proben des Referenzmaterials (Genotyp: A1A1, A2A2, A1A2) des Versuchsgutes durchgeführt, da die Banden von β -LG und β -CN sehr nah beieinander liegen (CAROLI et al., 2016). Dafür wurde der Milch eine 1%-ige Trichloressigsäure(TCE)-Lösung bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 4,6 hinzugefügt. Nach 30 min wurde die Probe für 5 min bei 1500 x g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die gefällten Proben einer Aceton-trocknung unterzogen, um sie länger konservieren zu können. Hierfür wurde zweimalig 20 ml redestilliertes Aceton hinzugefügt, aufgeschlämmt, erneut zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Mit 10 ml redestilliertem Aceton wurde erneut aufgeschlämmt und die Probe filtriert. Der Rückstand im Filter wurde getrocknet und das Pulver in ein Reaktionsgefäß überführt. Es wurde analysiert, ob bei gefällten Proben, eine Auswertung der Banden auf dem Gel durch Elimination der β -LG Bande leichter durchgeführt werden kann als bei unbehandelten Proben. Es zeigte sich, dass die Auswertung nur geringfügig erleichtert wurde und unbehandelte Proben durch eine ausreichende Bandentrennung gut auswertbar waren. Die Fällung mit ihrem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand ist somit als nicht erforderlicher Arbeitsschritt anzusehen.

Je nach Farbintensität der Banden bei der optischen Auswertung wurde das Verhältnis Probe bzw. Referenzmaterial und Protease-Inhibitor zu Puffermenge optimiert. Die optimale Zusammensetzung ist im Kapitel „Lösungen und Puffer“ (3.1.5) aufgeführt.

Als Kontrollen wurden zunächst im Labor vorhandene Referenzproben von Ziegen-(A2), Schaf-(A2), A2-Milch aus Neuseeland, α_s -CN, β -CN und β -LG verwendet, doch es zeigte sich, dass das Referenzmaterial aus Oberschleißheim (Genotyp: A1A1, A2A2, A1A2), β -CN und β -LG als Kontrollen ausreichend sind.

4.6.2 Herstellung der Gele und des Ladepuffers

Die Zusammensetzung von Lösungen und Puffern sind im gleichnamigen Kapitel (3.1.5) zu finden. Nach Analyse der Ergebnisse der Optimierung der IEF-Gelelektrophorese wurde nachfolgendes Protokoll erstellt:

Der Gelstammlösung für das Polyacrylamidgel (5 %, Trengel) wurde ein Ionenfänger hinzugefügt, das Glas mit Alufolie umwickelt, 15 min auf dem Rührer gemischt und somit entionisiert. Die Stammlösung wurde durch einen 0,45 mm Filter in Braunglas überführt und gekühlt aufbewahrt.

Auf je einer Glasscheibe wurde eine Gegenfolie, sowie eine Gelträgerfolie aufgebracht. Der Gelstammlösung wurden die Ampholyte hinzugefügt und im Vakuum auf dem Magnetrührer für 20 min entgast. Die Katalysatoren N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (PER) wurden hinzugegeben, gemischt und sofort mittig auf die Gegenfolie gegossen. Die Gelträgerfolie wurde auf das Gel gelegt und bis zur vollständigen Polymerisation beschwert.

Es wurde ein Protein-Ladepuffer hergestellt, mit welchem Proben, Referenzmaterial und Kontrollen gemischt wurden.

Bei der Probenvorbereitung wurde Rohmilch verwendet, welcher Pufferlösung und Protease-Inhibitor beigefügt wurde. Das Probengemisch und das acetongetrocknete Referenzmaterial konnten zur Konservierung bei -20 °C eingefroren werden.

Als Kontrollen wurden β -LG, β -CN und acetongetrocknetes Referenzmaterial vom Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim eingewogen, mit Pufferlösung, sowie Protease-Inhibitor versetzt und auf das Gel aufgetragen.

Es wurde eine Fixierlösung, Entfärbelösung, sowie Färbelösung 1 und 2 hergestellt. Färbelösung 1, 2 und der Entfärbler wurden für die Coomassie Färbung zu gleichen Anteilen miteinander gemischt.

Für die IEF wurde der Kühlthermostat auf 12°C eingestellt und die Gelträgerfolie wurde auf den Kühlblock aufgebracht. Die Gegenfolie wurde abgezogen und je ein Elektrodenstreifen mit jeweils Anoden- oder Kathodenflüssigkeit getränkt und auf der zugehörigen Längsseite aufgelegt. Mit einer Stromquelle wurde das IEF-Programm (Tabelle 11) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Vorfokussierung, danach wurden die Proben, welche zuvor mit Protease-Inhibitor und Puffer versetzt wurden, bläschenfrei auf die Probenapplikatoren (Tabelle 12) gegeben und auf das Gel aufgelegt. Es folgte die Probenfokussierung, nach welcher die Applikatoren wieder abgenommen wurden und zuletzt folgte die Endfokussierung 1 und 2 bis zum Erreichen von 2500 V.

Tabelle 12. Applikatorgröße und Probenmenge für die IEF

Applikatorgröße	Probenmenge
5 x 5 mm	7 µl
5 x 7 mm	10 µl
5 x 10 mm	15 µl

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde die Gelträgerfolie mit dem Gel abgenommen und in eine Aluschale mit Fixierlösung überführt. Von der Fixierlösung bedeckt, wurde das Gel 15 min vorsichtig geschwenkt, danach die Fixierlösung abgegossen, das Gel mit Entfärbler bedeckt, mehrmals geschwenkt und der Entfärbler ebenfalls abgegossen. Nun wurde die Färbelösung vollständig hinzugegeben, für 40 min geschwenkt und die Lösung danach abgegossen. Es wurde erneut Entfärbler für 5–10 min hinzugegeben und geschwenkt bis der Hintergrund eine hellblaue Farbe erreicht hatte. Der Entfärbler wurde abgegossen, das Gel vorsichtig mit A. dest. gewaschen, anschließend getrocknet und das trockene Gel wurde anhand der mitgeführten Kontrollen ausgewertet.

4.6.3 Untersuchungsergebnisse

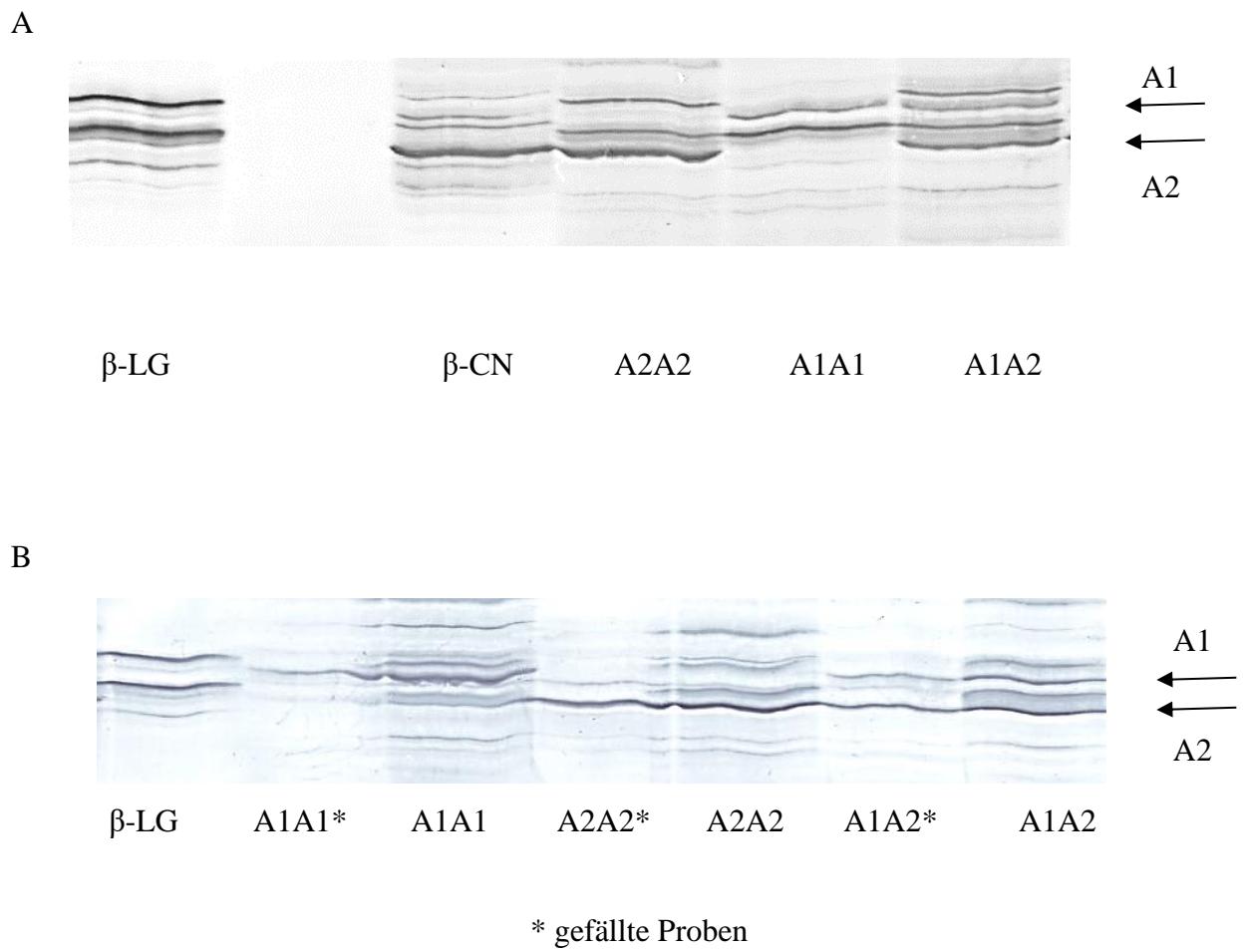


Abbildung 18. Ergebnisse der IEF-Gelelektrophorese des β -CN A1 und A2 nach Coomassie-Blau-Färbung

Die A1-Bande wird von zwei β -LG-Banden eingerahmt und die A2-Bande liegt darunter (A und B). Nach Fällung des β -LG ist die Ergebnisauswertung im Vergleich zu den unbehandelten Proben minimal erleichtert, die Banden der behandelten Proben sind jedoch schwächer (B).

Mittels Gelelektrophorese wurden 91 Proben des Referenzmaterials auf die β -Caseinvarianten A1 und A2 untersucht (Abbildung 18 A und B). Die A1-Bande wird dabei von zwei β -LG-Banden eingerahmt und die A2-Bande kommt darunter zu liegen. Dies zeigt sich auch in Abbildung 18 A, in welcher die A1- und A2-Bande fokussiert dargestellt ist und sich deutlich von den β -LG-Banden abgrenzt. Abbildung 18 B zeigt den Vergleich von gefällten und

unbehandelten Proben und es wird ersichtlich, dass die Auswertung der gefällten Proben nur minimal erleichtert werden konnte. Durch die Fällung erscheint vor allem die A1-Bande jedoch schwächer und die Differenzierung unbehandelter Proben ist trotz der Hintergrundbanden möglich. Aus diesen Gründen ist eine Fällung des β -LG nicht erforderlich. Lediglich eine geronnene Probe des Referenzmaterials ließ sich nicht darstellen und da das Tier sich nicht mehr im Bestand befand, konnte die Probe nicht nachgefordert werden. Eine Probe war vom Genotyp I/I und konnte mit diesem Gel nicht dargestellt werden. Bei drei weiteren Proben vom Genotyp A2I zeigte sich eine Bande bei A2 und die Darstellung der I-Bande war wiederum nicht möglich. Somit konnten 86 von 91 Referenzmaterialproben erfolgreich und in 100%-iger Übereinstimmung mit der PCR dargestellt werden. Die zurückgestellten drei β -CN B Proben werden im Folgenden mittels PCR und Gelektrophorese untersucht.

4.7 β -CN B PCR

Das β -CN B Allel ist nach A1 und A2 die am dritthäufigsten vorkommende β -Caseinvariante ($\leq 45\%$) (KAMIŃSKI et al., 2007). Zur Differenzierung des β -CN B Allels von A1 und A2 ist die Durchführung einer weiteren PCR notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu mit Hybridisierungsproben gearbeitet, die eine Differenzierung mittels Schmelzkurvenanalytik erlauben.

Da das β -CN B dem Typ A1 angehört, wurden im Folgenden Milchkühe des A1A1- und A1A2-Typs untersucht. Hierfür wurden in einem Betrieb mit insgesamt 142 Milchkühen, die 46 diesem Typ zugehörigen Kühe mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse auf deren β -CN B Genstatus hin untersucht (EINSPANIER et al. (2001).

4.7.1 Optimierung

Es wurden Templatemengen von 1 und 4 μ l (Tabelle 13) und eine Fluoreszenzdetektionsdauer von 0,5 s und 1 s getestet.

Tabelle 13. Optimierung des Templates für die β-CN B PCR

Mastermix	5 µl	5 µl
Forward Primer	500 nM	500 nM
Reverse Primer	500 nM	500 nM
RED-Sonde	200 nM	200 nM
FLUOS-Sonde	200 nM	200 nM
H₂O	3,6 µl	0,6 µl
Template	1 µl	4 µl
gesamt	10 µl	10 µl

Der Verlauf der Fluoreszenzkurven war bei einer Template-Menge von 1 µl und einer Detektionsdauer von 1 s deutlicher und eindeutig von der Negativkontrolle zu differenzieren. Es waren 3 Referenzproben von Tieren des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim vorhanden, welche das β-CN B trugen. Zwei Tiere hatten den Genotyp A2B und ihre Proben zeigten eine eindeutig differenzierbare β-CN B Schmelzkurve. Die dritte Probe vom Genotyp A1B grenzte sich nicht klar von der Negativkontrolle ab und von den 46 getesteten Proben zeigten 34 bei der Schmelzkurvenanalyse ein spezifisches Signal für das β-CN B. Bei den restlichen 22 Proben blieb dieses Signal aus und es wurde dagegen eine Schmelzkurve generiert, welche spezifisch für den Genotyp A1A1 oder A1A2 ist.

Aufgrund der oben genannten Ergebnisse wurde folgendes Protokoll erstellt:

4.7.2 Protokoll

Der PCR-Ansatz betrug 10 µl (Tabelle 14) und es wurde der kommerzielle Mastermix Thermo Scientific ABsolute qPCR Mix verwendet. Dieser Mastermix wird mit Hybridisierungssonden verwendet und enthält laut Hersteller alle erforderlichen Komponenten, ausgenommen Template, Primer und Sonden, für eine schnelle, sensitive und reproduzierbare qPCR. An die qPCR (Tabelle 15) wurde eine Schmelzkurvenanalyse (Tabelle 16) zur Unterscheidung der Genotypen angeschlossen und die Mengenzusammensetzung des Reaktionsgemisches aus dem Protokoll wurde optimiert. Die Vorgehensweise bei der PCR-Vorbereitung war entsprechend der A1-/A2-Typisierung.

Tabelle 14. Zusammensetzung des PCR-Mix für die β-CN B PCR

Mastermix	5 µl
Forward Primer	500 nM
Reverse Primer	500 nM
RED-Sonde	200 nM
FLUOS-Sonde	200 nM
H₂O	3,6 µl
Template	1 µl
gesamt	10 µl

Tabelle 15. PCR-Profil der β-CN B PCR

Temperatur °C	Zeit	Zyklen	Detektion
95	15 min	1	
95	5 s		
55	10 s	45	einmalig/Zyklus
72	18 s		

Tabelle 16. Schmelzkurve der β-CN B PCR

Temperatur °C	Zeit
94	10 s
50	1 min
Hochheizen bis 80 °C mit einer Temperatursteigerung von 0,1 °C/s	
bei kontinuierlicher Fluoreszenzdetektion	

4.7.3 Untersuchungsergebnisse der β -CN B PCR

Da in dieser Arbeit keine Genotypisierung des Referenzmaterials und der Einzelgemelksproben durchgeführt wurde, wird das β -CN B in diesem Kapitel als Teil des A1-Types dargestellt. Des Weiteren besitzt die β -CN B PCR zwar die Fähigkeit das Allel B nachzuweisen, eine genaue Charakterisierung des zweiten Allels ist allerdings nicht möglich. Daher wird im Folgenden die Bezeichnung BX gewählt.

Mithilfe der Schmelzkurvenanalyse ließ sich das Allel B des β -CN optisch darstellen (Abbildung 19). Beim kontinuierlichen Temperaturanstieg über die mittlere Schmelztemperatur hinaus zeigte das β -CN B Amplikon einen Schmelzpunkt von rund 57 °C. Die von den Allelen A1 und A2 generierten Amplikons haben ihre Schmelzpunkte bei rund 66 °C. Es zeigte sich somit für jedes Amplifikat aufgrund seiner Nukleotidzusammensetzung ein charakteristischer Schmelzpeak. Wasser wurde hierbei als Negativkontrolle mitgeführt und zeigte keine Fluoreszenzdifferenz.

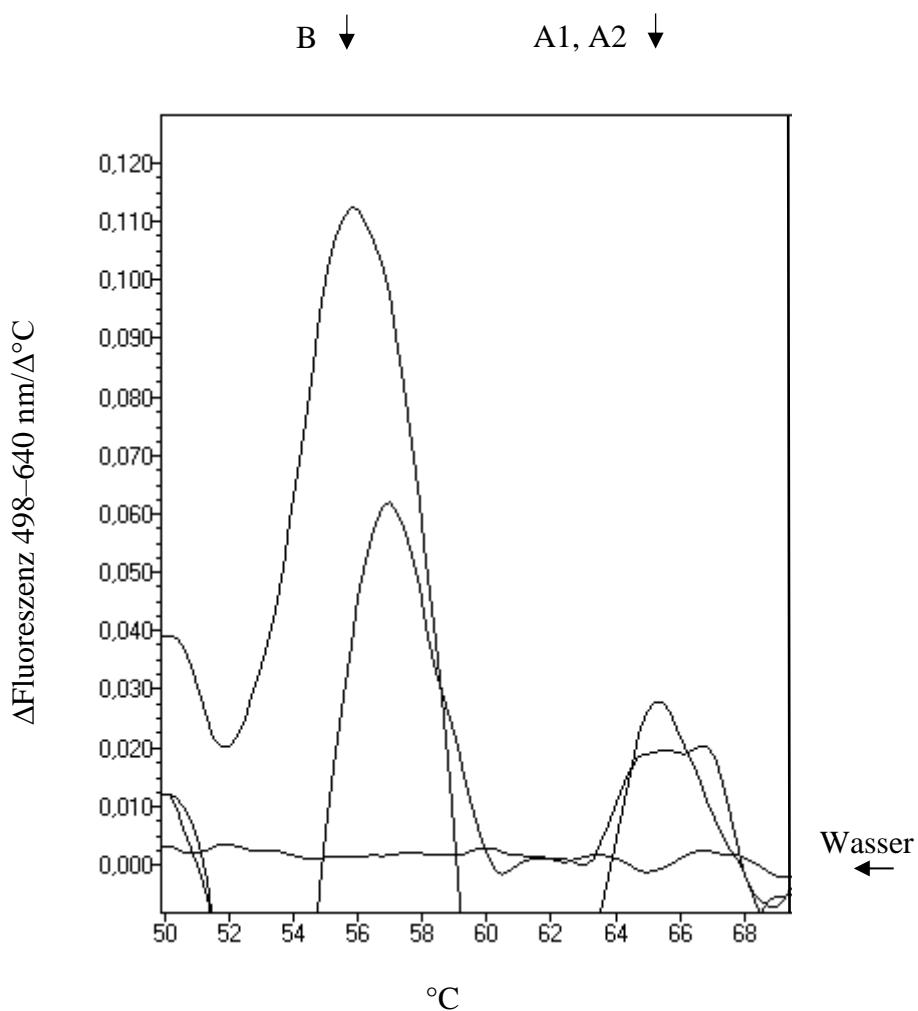


Abbildung 19. Exemplarische Darstellung der β -CN B PCR Schmelzkurve

Die Temperatur ist auf der x-Achse dargestellt. Die y-Achse zeigt die Änderung der Fluoreszenzintensität/ $^{\circ}\text{C}$ Temperaturerhöhung. Durch diese Umrechnung wird es möglich, den für das jeweilige Amplikon typischen Abfall der Fluoreszenzintensität in Form eines Schmelzpeaks darzustellen.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der β -CN B PCR jeweils prozentual (Abbildung A) und absolut (Abbildung B) graphisch dargestellt. Abbildung 20 zeigt die β -CN B Analyse des Referenzmaterials, wobei der A2-Typ 36 % und der A1-Typ 64 % mit beinhaltetem B-Anteil (BX) von 2 % ausmachte. Übertragen auf die Anzahl der Tiere von insgesamt 94 Stück, waren das 60 Tiere vom A1-Typ, 34 Tiere vom A2-Typ und 2 Tiere, welche das β -CN B Allel besaßen.

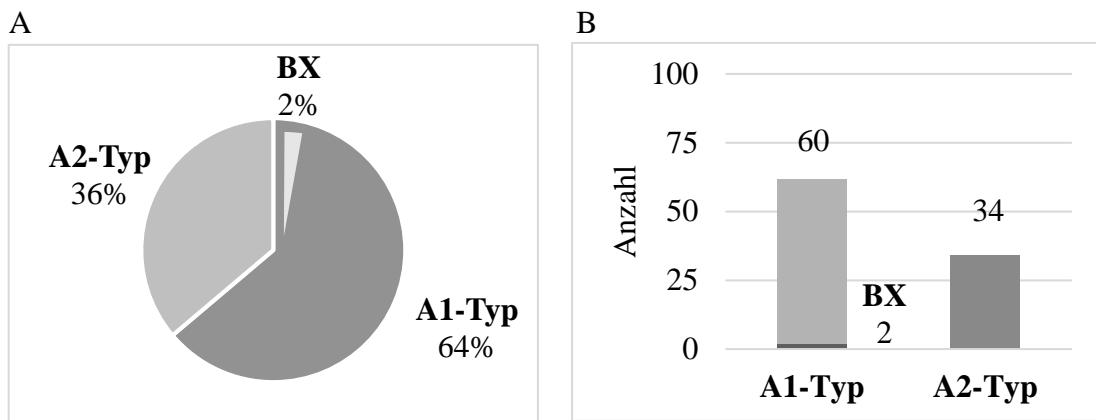


Abbildung 20. β -CN B Ergebnisse des Referenzmaterials
Prozentuale (A) und absolute (B) Verteilung des auf das β -CN B untersuchten Referenzmaterials.

Anschließend wurden aus einem Bestand von 142 Tieren 46 dem A1-Typ zugehörige untersucht. 34 gehörten dem Typ B an und eine Kuh davon war ein Fleckvieh, die restlichen Braunvieh. Der A1-Typ zählte 46 Tiere/32% und der A2-Typ 96 Tiere/68 %. Der B-Anteil lag mit 24 % bei einer rund 20 % höheren Präsenz als beim Referenzmaterial (Abbildung 21).

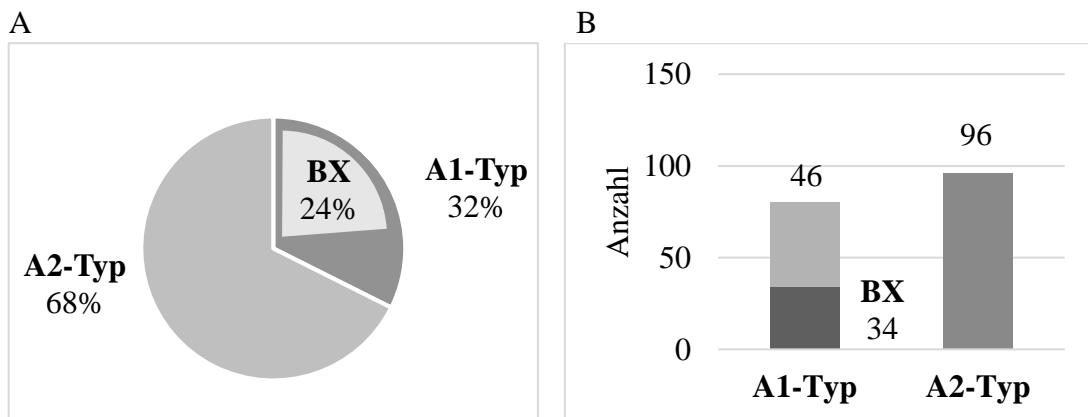


Abbildung 21. β -CN B Ergebnisse der gesamten Herde
Prozentuale (A) und absolute (B) Verteilung der auf das β -CN B untersuchten Herde.

Beim Betrachten der Verteilung des reinen Braunvieh-Bestandes traten keine wesentlichen Unterschiede auf. Der A1-Anteil lag bei 31 %/42 Tieren mit einem B-Anteil von 24 %/33 Tieren und der A2-Anteil bei 69 %/93 Tieren (Abbildung 22).

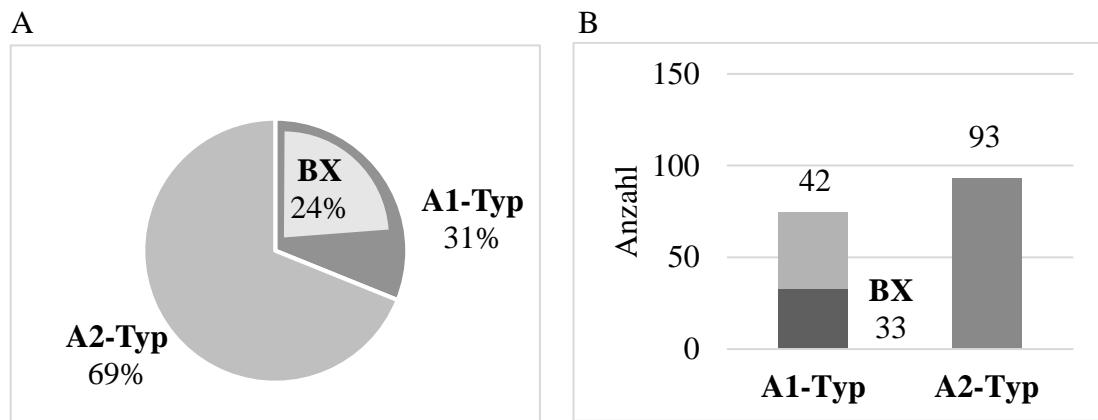


Abbildung 22. β -CN B Ergebnisse des Braunviehs

Prozentuale (A) und absolute (B) Verteilung des auf das β -CN B untersuchten Braunviehs.

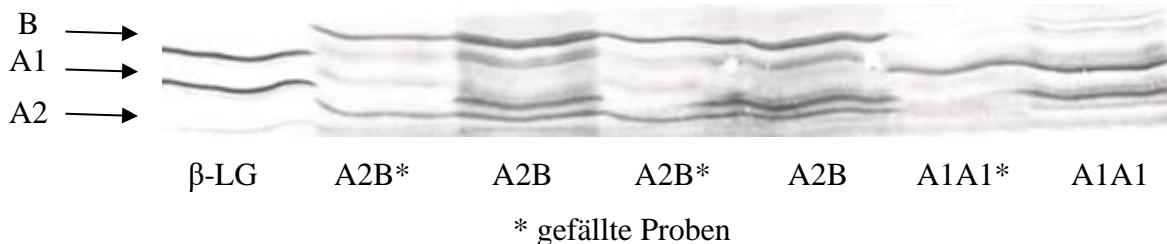
Auffallend war, dass der A1- und A2-Typ-Anteil beim Referenzmaterial und dem untersuchten Bestand prozentual invers vorlag. Der A1-Typ-Anteil beim Referenzmaterial war doppelt so hoch, jedoch deutlich seltener über das B Allel vertreten (Tabelle 17).

Tabelle 17. Ergebnisse der β -CN B PCR

	gesamt	Typ A1	BX
Referenzmaterial	94	60	2
diese Arbeit			
rassenunabhängig	142	46	34
Braunvieh		42	33
Fleckvieh		4	1

4.8 Untersuchungsergebnisse der Gelelektrophorese des β -CN B

A



B

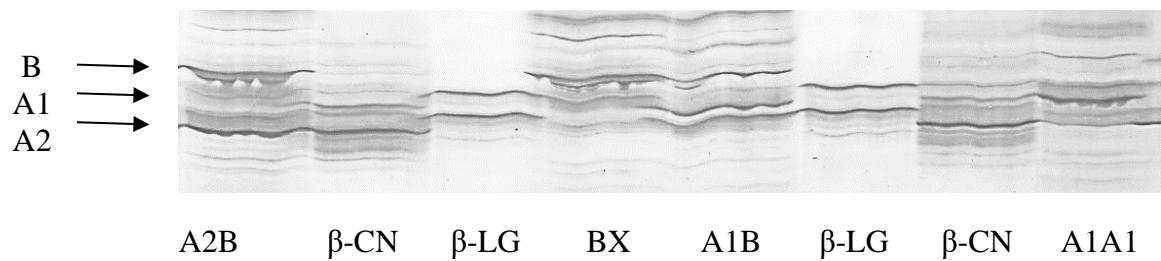


Abbildung 23. Ergebnisse der IEF-Gelelektrophorese des β -CN B nach Coomassie-Blau-Färbung

Unter der B-Bande ist die β -LG-Bande, die A1-Bande, die zweite β -LG-Bande und die A2-Bande in Abbildung A und B zu sehen. Vergleich der unbehandelten Proben und nach Fällung des β -LG (Abbildung A). Die Ergebnisauswertung ist nach der Fällung minimal erleichtert, die Banden der behandelten Proben sind jedoch schwächer.

Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigte sich folgendermaßen: Unterhalb der B-Bande befand sich eine β -LG-Bande, die A1-Bande, die zweite β -LG-Bande und abschließend die A2-Bande (Abbildung 23 A und B). Es wurden zusätzlich gefällte (Abbildung A) und unbehandelte Proben verglichen. Die unbehandelten Proben formierten scharfe Banden und eine Differenzierung war somit garantiert. Da die gefällten Proben schwächere Banden zeigten,

wurde das Fällen wie schon bei der Darstellung des Gesamtproteins der zugrundeliegenden A1- bzw. A2-Allele als nicht notwendiger Arbeitsschritt eingestuft.

Es wurden 34 β -CN B PCR positive Proben, sowie 3 β -CN B positive Referenzmaterialproben untersucht. Die Darstellung mittels Gelelektrophorese gelang bei allen Tieren, bis auf eine B-genotypisierte (A1B) Probe des Referenzmaterials. Bei dieser Probe zeigte weder die PCR eine eindeutig differenzierbare β -CN B-Schmelzkurve noch die IEF-Gelelektrophorese eine eindeutige B-Bande, was den Schluss einer eventuellen nicht korrekten Genotypisierung in vorheriger Untersuchung nahelegt. Das Tier befand sich mittlerweile nicht mehr im Bestand und die Probe konnte somit nicht nochmals untersucht werden. Somit waren die Ergebnisse der β -CN PCR und der IEF-Gelelektrophorese bei 36 Proben zu 100 % übereinstimmend.

Im untersuchten Bestand waren zwei Proben bei der A1/A2-Typisierung als A1A1-Typ, sowie bei der β -CN B PCR positiv für das Allel B getestet worden (BX). Eine Probe zeigte bei der Gelelektrophorese ebenfalls eine Bande bei A1, sowie bei B und hatte somit den Genotyp A1B (Abbildung 23 B). Die zweite Probe bildete auf dem Gel nur eine B-Bande und besaß somit ein B-Allel und ein Allel des A1-Types (Abbildung 23 B). Folgende Genotypen wären somit denkbar: BB, BC, BF oder BG. Die IEF-Gelelektrophorese müsste für die Darstellung dieser Allele (C, F, G) noch weiter optimiert werden.

5 Diskussion

Spätestens seit dem Erscheinen des Buches „Devil in the milk“ von Keith Woodford im Jahre 2009 gibt es zahlreiche kontroverse Veröffentlichungen zum gesundheitlichen Nutzen oder Schaden des Milchkonsums im adulten Alter (KAMIŃSKI et al., 2007; WOODFORD, 2009). Die damit verbundenen Diskussionen in den sozialen Medien und den darin verbreiteten persönlichen Berichten von erhöhter Verträglichkeit von A2-Milch bei Allergien und Laktoseintoleranz im Vergleich zu A1-Milch hat eine erhöhte Nachfrage nach A2-Milch auch in Deutschland zur Folge. Dies lässt die Diskussion aufkommen, ob Laktoseintoleranz oftmals falsch diagnostiziert wird und hier eher eine Eiweißunverträglichkeit vorliegt.

In dieser Arbeit wurde eine PCR – basierend auf Hydrolysesonden – zur Bestimmung des Caseintyps anhand des Triplets an Position 67 etabliert. Mit einer zweiten PCR, die mit Hybridisierungssonden arbeitet, wurde auf die Variante B des β -CN untersucht. Als Quelle für die DNA-Extraktion dienten Milchzellen. Die Methode sollte schnell, kostengünstig, tierfreundlich, sensitiv und in großem Umfang in der Alltagsroutine durchführbar sein. Alle Proben und das Referenzmaterial wurden A1- und A2-typisiert und ein Bestand wurde auf den β -CN B Status analysiert. Laut Literatur sind dies die am häufigsten vorkommenden Varianten bei Rinderrassen des Westens (Tabelle 18, Anhang (9)) und wurden aus diesen Gegebenheiten für die Untersuchung ausgewählt. Die Allele A1 und A2 kommen bei einer Vielzahl von Milchrinderrassen am häufigsten ($\leq 100\%$) vor und B ($\leq 45\%$) steht dabei an dritter Stelle (KAMIŃSKI et al., 2007). Dies zeigte sich auch in einer Arbeit, in welcher Konsummilch auf ihre Caseinanteile analysiert wurde. β -CN A1 machte hierbei 35,2 g/100 g, A2 56,1 g/100 g und B 6,43 g/100 g Gesamtprotein aus (GIVENS et al., 2013). In einer weiteren Arbeit von MASSELLA et al. (2017) wurden Holstein-Friesian und Braunvieh in Norditalien genotypisiert und zeigten folgende Verteilung der Allelfrequenz: A1 0,371; A2 0,546 und B 0,050.

5.1 Optimierung der Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus den somatischen Zellen der Milch stellt eine Herausforderung dar, da die Probenmatrix Milch Substanzen enthält, die zum einen die Gewinnung eines Zellpellets erschweren, zum anderen können sich Inhibitoren negativ auf die PCR auswirken (WILSON, 1997). Des Weiteren schwankt der Zellgehalt in den Einzelgemelksproben (POKORSKA et al.,

2016). Somit ist die Menge der gewonnenen Zellen und damit auch die Menge der extrahierten DNA, die als Template in der PCR dient, sehr unterschiedlich. In dieser Arbeit konnten die eingesetzten Milchvolumina im Vergleich zur Literatur deutlich reduziert werden. Das maximal zur Gewinnung des Zellpellets eingesetzte Volumen betrug ein Fünftel der in der Literatur beschriebenen Menge von 250 ml (PLATH et al., 1997).

Durch die Verwendung des DNeasy® Blood & Tissue Kit von Qiagen mit einem leicht modifizierten Protokoll konnte eine erfolgreiche DNA-Extraktion in einem annehmbaren Zeitrahmen erarbeitet werden, die zudem nicht anfällig gegenüber Kontaminationen war. Dieser säulenbasierten DNA-Extraktion über eine Silikamatrix stehen alternative Aufarbeitungsmethoden wie z. B. eine Phenol-Chloroform-Extraktion gegenüber. Diese zeigt im Vergleich zu den säulenbasierten Kitsystemen keine höhere Ausbeute und keine verbesserte DNA-Qualität (USMAN et al., 2014). Der DNA-Gehalt der untersuchten Proben war für die PCR ausreichend, lag bei der Messung zwischen 0,01–0,14 µg/µl und somit beim Verwenden von 5 µl Template (0,05–0,7 µg) in dem Bereich, welcher in der Literatur beschrieben wurde (MANGA & DVORAK, 2010). Der β-Caseinstatus aller Proben war mit Einzelpellets, mit gepoolten Einzelpellets von Einzelgemelen bis hin zu Pellets resultierend aus 50 ml Milch bei Konsum-/Tankmilch analysierbar. In der Arbeit von MANGA & DVORAK (2010) lag die verwendete DNA-Menge zwischen 0,05–0,1 µg (50–100 ng), das System funktionierte aber in einem Bereich von 6×10^{-1} – 2×10^{-4} µg noch gut. Die Tatsache, dass nach der Extraktion eines eingefrorenen Zellpellets niedrigere Ct-Werte erzielt wurden, kann dadurch erklärt werden, dass es durch die Eiskristallbildung in den Zellen während des Einfriervorgangs und dem anschließenden Wiederauftauen zu einer zusätzlichen mechanischen Schädigung der Zellen kommt (EHRHART, 2009). Der anschließende Verdau durch Proteinase K wird dadurch unterstützt und eine effizientere DNA-Extraktion ermöglicht. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der extrahierten DNA sollte allerdings vermieden werden, da dies zum Auftreten von Strangbrüchen führen kann.

Bei der DNA-Extraktion aus technologisch bearbeiteter Milch ist zu bedenken, dass es durch die verschiedenen Schritte des Herstellungsprozesses zu einer nachteiligen Beeinflussung der extrahierbaren DNA kommen kann. Durch die Filtration, Wärmebehandlung, Zentrifugation und Homogenisierung der Milch kommt es zur Degradierung der DNA, wodurch kürzere Fragmente entstehen, was die PCR-Sensitivität reduzieren kann (GRYSON, 2010). Die Konsummilch

zeigte trotz technologischer Bearbeitungsschritte eine ausreichende DNA-Ausbeute und auch differenzierbare Amplifikationskurven der PCR. Die durchgeführte PCR stellt sich somit als leistungsfähig und sehr robust dar, da sich trotz technologischer Bearbeitung des eingesetzten Probenmaterials Milch und trotz Verunreinigung des Templates durch Proteinreste eindeutig differenzierbare Amplifikationskurven generieren lassen.

Damit wäre das System geeignet, um eine korrekte Kennzeichnung bzw. Auslobung bestimmter Produkte im Handel wie der A2-Milch zu überprüfen. Da vor allem bei der Tank-, Vorzugs- und UHT-Milch die A1-Amplifikationskurven im Vergleich mit den A2-Amplifikationskurven die Hintergrundfluoreszenz bei gleichwertigem Cycle threshold nur in geringerem Maße überwinden, ist eine Optimierung des PCR-Systems für die Untersuchung dieser Produkte empfehlenswert. Der Einsatz einer anderen A1-Sonde oder auch anderer Primer könnten dazu beitragen, A1-Amplifikationskurven bei Tank- und Konsummilch zu generieren, welche sich eindeutiger von der Hintergrundfluoreszenz differenzieren lassen. Eine Optimierung der Zusammensetzung des gesamten Reaktionsgemisches könnte das System darüber hinaus zusätzlich stabilisieren. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Optimierung nicht mehr realisiert werden.

5.2 Etablierung einer TaqMan-PCR zur β -CN A1-/A2-Typisierung

Die TaqMan-PCR, als Real-Time-PCR, hat den Vorteil, dass kein weiterer Schritt wie die Gelelektrophorese nötig ist, sondern das Ergebnis direkt ausgewertet werden kann. Reaktionsgefäße müssen nicht mehr geöffnet werden und Kontaminationen werden somit verhindert. Deoxyuridinetriphosphat und Uracil-DNA-Glycosylase im Mastermix beugen zusätzlich „carry-over“-Kontaminationen vor. Falsch positive Ergebnisse werden darüber hinaus durch das Verwenden von Sonden und Quenchern vermieden (BUSCH, 2007; BUSCH, 2010; MÜLLER & PRANGE, 2016).

Beim Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit Ergebnissen aus der Literatur ist zu beachten, dass die Allelfrequenz (A1, A2, B) oder der Genotyp (A1A1, A2A2, A1A2) nicht dem A1A1-/A1A2-/A2A2-Typ bei der A1-/A2-Typisierung gleichgesetzt werden kann. Bei der A1-/A2-Typisierung wird die Aminosäure an Position 67 (Pro oder His) analysiert und nicht die

Gesamtsequenz amplifiziert. Auffallend ist, dass in der Literatur, wie auch bei MANGA & DVORAK (2010), die Definition nicht eindeutig gehandhabt wird.

Alle untersuchten Proben dieser Arbeit zeigten rassenabhängige Unterschiede in der β -Caseinverteilung zum Referenzmaterial in niedrigerem A1-Typ-Anteil und höherem A2-Typ-Anteil, was sich durch den großen Anteil von Braunvieh erklären lässt. Diese Rasse hat laut Literatur eine A2-Allelfrequenz von 69 % (BOETTCHER et al., 2004).

Bei der Braunvieh-Rasse wurden insgesamt 222 Tiere beprobt, welche bei rund 65 % des A2-Typ-Anteils lagen. Die verglichenen Bestände zeigten eine geringe Abweichung im A2-Typ-Anteil untereinander, was sich mit dem Pedigree und dem Zuchtregime der Betriebsleitung erklären lässt.

Beim Fleckvieh wurden insgesamt 96 Tiere und darüber hinaus zwei Betriebe miteinander verglichen. Laut Literatur war ein A2-Allelanteil von 60–65 % zu erwarten (SCHWARZENBACHER; KUCEROVA et al., 2006). Die untersuchten Bestände zeigten nur geringe Abweichungen untereinander und wiesen einen A2-Typ-Anteil von 55 % auf.

Laut Literatur gibt es bei der Rasse Holstein-Friesian eine A1- zu A2-Allelfrequenz von 69:31 % (KAMIŃSKI et al. 2006). Bei den beprobten Beständen lag der A1- zu A2-Typ-Anteil bei 65:35 %. Auffallend war der geringere A1A1-Typ-Anteil bei den Jersey-Kreuzungen und der höhere A2-Typ-Anteil, wenn auch nur in geringem Maße. Erklären lässt sich das mit der Tatsache, dass das Jersey-Rind laut Literatur einen A2-Allelanteil von bis zu 60 % hat und dies bei der Einkreuzung einen positiven Effekt auf diesen Anteil erzielt (EFSA, 2009).

Durch die gewinnversprechende Vermarktung von A2-Milch besteht ein Anreiz für die Landwirte, ihre Herde durch gezielte Zuchtstrategien auf den A2-Typ umzustellen. Reinerbige A2-Bullen werden bereits angeboten. Allerdings wird vor einer radikalen Selektion auf den A2A2-Typ in der Rinderzucht gewarnt, denn sie würde die Bullenauswahl um zwei Drittel verringern und könnte auch mit negativen Erbeigenschaften korreliert sein (SCHWARZENBACHER; REIMINK, 2017). Ein Negativbeispiel einer radikalen Zuchtausrichtung auf ein Merkmal liefert der Bulle Osborndale Ivanhoe. Er wurde Mitte des 20. Jahrhunderts über die Maßen eingesetzt, da er für seine besonders großrahmige

Nachkommenschaft berühmt war. Zunächst unbemerkt blieb jedoch seine negative Eigenschaft, die bovine Leukozyten-Adhäsionsdefizienz zu vererben (SHUSTER et al., 1992; BUSCH et al., 2004).

Zudem ist zu bedenken, dass A2-Milch und deren Produkte zwar eventuell eine positive gesundheitliche Wirkung haben könnten, die Proteingehalte, sowie die molkereitechnische Verarbeitungsfähigkeit der Milch aber nicht allein über den β -Caseinstatus bestimmt werden. Das Allel A2 korreliert mit einer höheren Milchproduktion und folglich höheren Proteinausbeute ($A2 > A1$), aber auch mit einem geringen κ -Caseingehalt in der Milch, welcher für die Käseherstellung immens wichtig ist ($B > A1 > A2$) (HECK et al., 2009). Die alleinige Zuchtauswahl auf den A2-Typ ohne Berücksichtigen des gesamten Caseinhaplotyps kann daher eher als engstirnig beurteilt werden.

5.3 Entwicklung einer Hybridisierungs-PCR zur β -CN B Bestimmung

Die hier verwendete PCR mit Hybridisierungssonden erlaubt eine Differenzierung des β -CN B-Allels von A1/A2, wobei A1 und A2 hier nicht voneinander unterschieden werden können.

Die Schmelzkurvenanalytik zeigte bei allen 33 Tiere einen recht breiten Verlauf des A1/A2-Peaks. Damit unterscheidet er sich von den von EINSPANIER et al. (2001) publizierten Daten, die in einer exemplarischen Darstellung einen schmalen Schmelzpeak zeigen. Wie viele Proben in dieser Arbeit untersucht wurden, wird nicht erwähnt. Vergleicht man die für das Sondendesign verwendete Referenzsequenz mit weiteren publizierten Sequenzen des β -CN B-Allels, so fällt auf, dass es im Bereich der Sondenbindungsstellen weitere Punktmutationen geben kann. Diese führen nicht zu einem Aminosäureaustausch, können jedoch die Schmelztemperatur der Sonden, damit den Verlauf der Schmelzkurve und somit den Schmelzpeak beeinflussen. Die Schmelzkurvenanalyse wird häufig in der Tumordiagnostik eingesetzt und zeigt hierbei eindeutige Schmelzkurvenpeaks (SCHÖPPER, 2016). Weiterhin fällt auf, dass die Fluoreszenzsignale der Schmelzkurven bei EINSPANIER et al. (2001) höher sind, obwohl mit Red705 ein Farbstoff mit einer geringeren Strahlkraft verwendet wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde Red640 verwendet, welcher intensiver strahlt (TIBMOLBIOL, 2018). Dies legt die Vermutung nahe, dass neben möglichen Nukleotidaustauschen weitere Faktoren eine Rolle für die unterschiedliche Ausprägung der Schmelzkurven spielen können.

In einem Bestand mit 142 Tieren trugen 34 das Allel B und eines davon war Fleckvieh, die restlichen Braunvieh. Es wurde das Referenzmaterial, der Gesamtbestand und die reine Braunviehherde verglichen, wobei der B-Anteil (Genotyp BX) beim Braunvieh bei 24 % lag. In der Literatur wird die B-Allelfrequenz bei Braunvieh mit 18 % beschrieben (BOETTCHER et al., 2004). Das Referenzmaterial eines Bestandes von Fleckvieh und Holstein-Friesian lag bei einer Genotyphäufigkeit (BX) von 1 %. Laut Literatur liegt der B-Allelanteil bei Holstein-Friesian bei 3–6 % (EFSA, 2009). Diese Ergebnisse und Abweichungen der Betriebe untereinander lassen sich wieder mit dem Pedigree und dem Zuchtregime eines Bestandes erklären.

5.4 Entwicklung einer IEF-Gelelektrophorese

Neben der PCR wurde in der vorliegenden Arbeit die IEF-Gelelektrophorese als weitere unabhängige Methode durchgeführt. Diese beruht im Gegensatz zur PCR auf dem direkten Nachweis der Caseine auf der Proteinebene. In einem Analyseschritt können die von Allel A1, A2 und B kodierten Proteine parallel nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu erfasst die PCR die β -CN Varianten auf Basis der genetischen Information. Zur Erhebung des β -CN B Status bedarf es der Durchführung zweier Real-Time-PCR Ansätze und der Bestimmung des A1-/A2-Typs. Vergleicht man die beiden Methoden aus Sicht des Arbeitsaufwandes, so ist die IEF-Gelelektrophorese die zeitintensivere Methode. Dies wird jedoch durch die Möglichkeit einer Erfassung der β -Caseinallele A1, A2 und B in einem Test kompensiert.

Die sehr zeitaufwändige Fällung des β -LG nach CAROLI et al. (2016) eliminierte zwar die Überlappung/Nähe des β -LG und -CN, schwächte jedoch vor allem die Intensität der A1-Bande. Die IEF zeigte ohne Fällung scharfe Banden, welche sich trotz Nähe zum β -LG eindeutig differenzieren ließen und die Fällung der Proben wurde somit als nicht notwendig eingestuft. Es ist hierbei jedoch zu berücksichtigen, dass die Proteinmenge nicht identisch normiert wurde und dies Auswirkungen auf die Bandenintensität hat.

Die verschiedenen Gelzusammensetzungen zeigten alle eine gute Trennschärfe, und die Gelelektrophorese ist somit zwar als eine zeitintensive aber erfolgreiche Methode anzusehen. Es zeigte sich eine 100%-ige Übereinstimmung mit den PCR-Ergebnissen, wobei nur die Allele A1, A2 und B untersucht werden konnten. Da die PCR aber eindeutig differenzierbare

Amplifikationskurven generierte und alle Genotypen den A1-/A2-Typen zuteilen, sowie das Allel B detektieren konnte, diente die IEF bei den Versuchen zwar als Bestätigung, wird im Routineablauf aber nicht benötigt.

5.5 Gesamtbeurteilung der etablierten Methoden

Die Validierung der in dieser Arbeit eingesetzten Methoden anhand des extern charakterisierten Referenzmaterials zeigten eine 100%-ige Übereinstimmung der Ergebnisse. Somit konnte die PCR zur Bestimmung des A1/A2-Typs, sowie die PCR zur Detektion des β -CN B-Allels im Rahmen einer Reihenuntersuchung eingesetzt werden. Darüber hinaus ließ sich eine Typisierung bei Tieren aus verschiedenen Betrieben durchführen. Die erzielten Ergebnisse ermöglichen die Beurteilung des Herdenstatus und erlaubten weiterhin eine rassenspezifische Darstellung des Typs bzw. des B-Allels.

Darüber hinaus erwies sich die PCR zur Typbestimmung bei der Prüfung von Konsummilch als geeignet. Trotz der technologischen Bearbeitung und einer häufig nicht optimalen DNA-Qualität war die PCR robust genug, um eine Zuordnung zum A1- bzw. A2-Typ zu gewährleisten.

Die Darstellung der unterschiedlichen β -CN mittels IEF wurde in dieser Arbeit als zweite unabhängige Methode zur Beurteilung des Herdenstatus eingesetzt. Es wurde eine vollständige Übereinstimmung mit den in der PCR erzielten Ergebnissen gezeigt, sodass von einer Gleichwertigkeit in Bezug auf Ihre Aussagekraft hinsichtlich des β -Caseintyps ausgegangen werden kann. Aufgrund des höheren methodischen Aufwandes der IEF wird die Real-Time-PCR als Methode der Wahl vorgeschlagen. Je nach apparativer Ausstattung des jeweiligen Untersuchungslabors ist die Anwendung der IEF ebenfalls zielführend.

Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass eine komplette DNA-Sequenzierung von Rindern mittels DNA-Chip durchgeführt werden kann. Auf diese Weise können alle bekannten Allele des bovinen β -CN beispielsweise mit dem Bovine50K® Chip der Firma Illumina dargestellt werden. Diese Untersuchung wird seit zwei Jahren routinemäßig angeboten und bei rund 4000 Tieren monatlich durchgeführt. Für Braun- und Fleckvieh ist eine angepasste Version vorhanden. Da das Labor, in welchem die Untersuchungen dieser Arbeit durchgeführt wurden, keine Ausstattung für eine Chip-basierte Analytik verfügt, konnte die Methode nicht angewandt

werden. Des Weiteren kann Milch als Analysematrix in der Chip-Technologie nicht eingesetzt werden. Für das Tier ist die Entnahme von Gewebeproben oder Haarwurzeln immer mit Schmerzen verbunden. Darüber hinaus ist der Landwirt bei der Gewinnung der Ohrstanze bei der vorgeschriebenen Markierung des Kalbes zeitlich gebunden, wenn er dem Tier ein weiteres Mal Schmerzen ersparen will. Vergleicht man die Probenahme für die Chipanalytik mit dem Gewinnen einer Milchprobe für die in dieser Arbeit durchgeführten Analyse des β -CN ist dies für die Milchkuh nicht schmerhaft und für den Landwirt gut und jederzeit in der Alltagsroutine durchzuführen.

6 Zusammenfassung

Der Vorteil des Konsums von Rindermilch des β -CN A2-Typs wird seit mehr als zwanzig Jahren diskutiert. Um den Status eines Einzeltiers zu diagnostizieren, war bisher meist eine Entnahme von Blut, Gewebe oder Haaren am Tier nötig. Milch stellt dagegen ein günstiges, sowie einfach und schmerzfrei zu gewinnendes Probenmaterial dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Aufarbeitung von Milchproben und die DNA-Extraktion aus somatischen Zellen der Milch optimiert. Durch den Einsatz von Hydrolysesonden konnte eine Real-Time-PCR etabliert werden, welche die Differenzierung des A1- vom A2-Typs erlaubt. Der auf Aminosäureposition 67 beruhende Caseintyp wird durch die Allele A1, B, C, F und G (A1-Typ) bzw. A2, A3, D, E, H2 und I (A2-Typ) bestimmt. Der Nachweis des B-Allels wurde ebenfalls mit einer Real-Time-PCR unter Verwendung von Hybridisierungssonden durchgeführt. Hierbei war ein Volumen des Ausgangsmaterials von maximal 50 ml nötig. Als zweite unabhängige Methode zur Darstellung der verschiedenen β -Caseinvarianten kam eine IEF-Gelelektrophorese zum Einsatz. Alle Methoden wurden zunächst anhand von Referenzproben genotypisierter Tiere validiert und zeigten eine 100%-ige Übereinstimmung mit den Ergebnissen des externen Labors.

Im Zuge einer Reihenuntersuchung wurden Einzelgemelksproben verschiedener Betriebe untersucht und unter Berücksichtigung des betriebsspezifischen Zuchtregimes, sowie der Pedigrees konnte ein Verteilungsmuster der β -Caseintypen und des B-Allels erhoben werden. Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Bestimmung des β -CN A1-/A2-Typs in Tank- bzw. Konsummilchproben. Die eingesetzte PCR erlaubte eine Bestimmung selbst dann, wenn die Proben zuvor einer molkereitechnischen Bearbeitung, wie z. B. einer Pasteurisierung, unterzogen worden waren. Dieses Untersuchungsverfahren ist somit für die Authentizitätsprüfung geeignet.

Die Bestimmung des β -Caseintyps auf Einzeltierebene eröffnet die Möglichkeit, gezielt auf den A2A2-Typ zu züchten. Vor dieser einseitig ausgerichteten Selektion wird allerdings gewarnt, da über eine Co-Selektion von unerwünschten Merkmalen bislang wenig bekannt ist. Allerdings kann die hier etablierte Methodik eingesetzt werden, um gezielt Versuchsmaterial von A1- bzw. A2-Milch auszuwählen, welches in den kommenden Jahren sicherlich benötigt wird, um die

ernährungsphysiologisch kontrovers diskutierte Bedeutung des β -Caseintyps detaillierter als bislang zu untersuchen.

7 Summary

The benefit of consuming bovine milk of β -CN type A2 has been discussed for more than twenty years. It has usually been necessary to take blood, tissue or hair samples to diagnose the status of an individual animal. Milk, on the other hand, represents a cheap sample material which is easy to obtain without causing pain to the animal.

In this thesis the processing of milk samples and the extraction of DNA from the somatic milk cells was optimized. A protocol was established that allowed the PCR-based detection of the β -CN A1 or A2 type and the detection of the B allele in a maximum of 50 ml of sample material. A1/A2 typing was carried out in real-time PCR using hydrolysis probes, and hybridization probes were employed to detect the B allele. The second independent method for the depiction of the different β -CN variants was IEF gel electrophoresis. All methods were first validated on the basis of genotyped reference samples and showed a 100 % agreement with the results of the external laboratory.

Individual milk samples from various farms were examined and a breed-specific distribution pattern of the β -CN types could be collected. The distribution was influenced by the farm-specific breeding regime, as well as the pedigrees. Another part of the thesis was the determination of the β -CN A1/A2 type in tank and retail milk samples. The PCR allowed a determination even if the samples had undergone technological processing like for example pasteurization. This examination method is thus suitable for the authenticity check.

The determination of the β -CN type of an individual animal opens up the possibility to specifically breed the A2 type. However, this biased selection is warned against since only little is known about co-selection of undesired features. On the other hand, the methods established here can be used to specifically select A1 or A2 milk samples as experimental material, which will certainly be needed in the next years to analyze the nutritionally controversial significance of the β -CN type in more detail than so far.

8 Literaturverzeichnis

ALEANDRI, R., L. BUTTAZZONI, U. PAGGI, R. DAVOLI, L. NANNI COSTA & V. RUSSO (1997):

Published Effect of bovine milk protein polymorphism at two loci on cheese producing ability.
Milk protein polymorphism, Palmerston North (New Zealand), Feb 1997

Int. Dairy Fed. special issue 414-422

ASCHAFFENBURG, R. (1963):

Inherited casein variants in cow's milk: II. Breed differences in the occurrence of β -casein variants

J. Dairy Res. 30, 251-258

ASCHAFFENBURG, R. (1968):

Section G. Genetics. Genetic variants of milk proteins: their breed distribution

J. Dairy Res. 35, 447-460

BARANYI, M., Z. BÖSZE, J. BUCHBERGER & I. KRAUSE (1993):

Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian Spotted and Hungarian Grey cattle: A possible new genetic variant of β -lactoglobulin

J. Dairy Sci. 76, 630-636

BECH, A.-M. & K. R. KRISTIANSEN (1990):

Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetic variants on milk yield

J. Dairy Res. 57, 53-62

BEJA-PEREIRA, A., G. LUIKART, P. ENGLAND, D. BRADLEY, O. JANN, G. BERTORELLE, A. CHAMBERLAIN, T. NUNES, S. METODIEV & N. FERRAND (2004):

Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes

Nat. Genet. 36, 106

BJELLQVIST, B., K. EK, P. G. RIGHETTI, E. GIANAZZA, A. GÖRG, R. WESTERMEIER & W. POSTEL (1982):

Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications

J. Biochem. Biophys. Methods 6, 317-339

BLE, Bundesanstalt für Ernährung und Landwirtschaft (2018):

Bericht zur Markt- und Versorgungslage mit Milch und Milcherzeugnissen:

<https://www.ble.de/SharedDocs/Downloads/DE/BZL/Daten-Berichte/MilchUndMilcherzeugnisse/JaehrlicheErgebnisse/Deutschland/2018BerichtMilch.pdf>

letzter Zugriff: 16.03.2019, 22-25

BMEL, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2017):

Milchbericht 2017:

<https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/Milchbericht2017.pdf>

letzter Zugriff: 16.03.2019, 7-11

BOETTCHER, P., A. CAROLI, A. STELLA, S. CHESSA, E. BUDELLI, F. CANAVESI, S. GHIROLDI & G. PAGNACCO (2004):

Effects of casein haplotypes on milk production traits in Italian Holstein and Brown Swiss cattle

J. Dairy Sci. 87, 4311-4317

BOVENHUIS, H. & J. VAN ARENDONK (1991):

Estimation of milk protein gene frequencies in crossbred cattle by maximum likelihood

J. Dairy Sci. 74, 2728-2736

BUSCH, U. (2007):

Real-time PCR

J. Verbr. Lebensm. 2, 111-112

BUSCH, U. (Hrsg.) (2010):

Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik: Grundlegende Methoden und Anwendungen

Springer-Verlag, 1. Aufl., 19-46

BUSCH, W., W. METHLING & W. M. AMSELGRUBER (2004):

Tiergesundheits- und Tierkrankheitslehre

Georg Thieme Verlag, 1. Aufl., 47

BUSTIN, S. A. (2000):

Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays

J. Mol. Endocrinol. 25, 169-193

CALDWELL, J., D. WESELI & T. CARTWRIGHT (1971):

Occurrence of α -s₁-and β -Casein Types in Five Breeds of Beef Cattle

J. Anim. Sci. 32, 601-604

CAMILLERI, P. (1997):

Capillary electrophoresis: theory and practice

CRC press, 2. Aufl., Kapitel 4, 136 ff.

CAPLIN, B. E., R. P. RASMUSSEN, P. S. BERNARD & C. T. WITTWER (1999):

LightCycler hybridization probes

Biochemica 1, 5-8

CARLES, C., J.-C. HUET & B. RIBADEAU-DUMAS (1988):

A new strategy for primary structure determination of proteins: Application to bovine β -casein

FEBS Lett. 229, 265-272

CAROLI, A., S. CHESSA & G. ERHARDT (2009):

Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition

J. Dairy Sci. 92, 5335-5352

CAROLI, A. M., S. SAVINO, O. BULGARI & E. MONTI (2016):

Detecting β -casein variation in bovine milk

Molecules 21, 141

CURIK, I., J. HAVRANEK & D. SAMARZIJA (1997):

Published Milk protein polymorphism and genetic structure of Croatian Simmental cattle.
Milk protein polymorphism, Palmerston North (New Zealand), Feb 1997

Int. Dairy J. special issue, 93-99

DAMIANI, G., F. PILLA, P. LEONE & S. CACCIO (1992):

Direct sequencing and bidirectional allele specific polymerase chain reaction of the bovine β -casein B variant

Anim. Genet. 23, 561-566

DAVOODI, S. H., R. SHAHBAZI, S. ESMAEILI, S. SOHRABVANDI, A. MORTAZAVIAN, S. JAZAYERI & A. TASLIMI (2016):

Health-related aspects of milk proteins

Iran. J. Pharm. Res. 15, 573

DONG, C. & K. NG-KWAI-HANG (1998):

Characterization of a non-electrophoretic genetic variant of β -casein by peptide mapping and mass spectrometric analysis

Int. Dairy J. 8, 967-972

EFSA (2009):

European Food Safety Authority

Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides

EFSA J. 7, 231

EHRHART, F. (2009):

Untersuchungen zur Kryokonservierung und Einschlussimmobilisierung therapeutisch relevanter Zellsysteme

Diss. rer. nat., Saarbrücken

EINSPANIER, R., A. KLOTZ, J. BUCHBERGER & I. KRAUSE (2001):

Fast characterisation of selected β -casein and β -lactoglobulin variants using specific single nucleotide polymorphisms derived from milk cell DNA: a novel real-time PCR approach

Eur. Food Res. Technol. 213, 356-360

ELLIOTT, R., D. HARRIS, J. HILL, N. BIBBY & H. WASMUTH (1999):

Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption

Diabetologia 42, 292-296

FARRELL JR, H., R. JIMENEZ-FLORES, G. BLECK, E. BROWN, J. BUTLER, L. CREAMER, C. HICKS, C. HOLLAR, K. NG-KWAI-HANG & H. SWAISGOOD (2004):

Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision

J. Dairy Sci. 87, 1641-1674

FEHLINGS, K. BAUMGARTNER C. (2016):
Eutergesundheit in Märtlbauer und Becker (Hg):
Milchkunde und Milchhygiene
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 60-88

FENEBERG (2018):
Neu bei Feneberg: A2-Milch, die "Ur-Milch":
<https://www.feneberg.de/service/aktuelles/>
letzter Zugriff: 07.03.2019

FITZGERALD, R. & H. MEISEL (2003):
Milk protein hydrolysates and bioactive peptides,
Advanced dairy chemistry—1 Proteins
Springer, 675-698

FOX, P. (2003):
Milk proteins: general and historical aspects,
Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins
Springer, 1-48

FOX, P., T. UNIACKE-LOWE, P. MCSWEENEY & J. O'MAHONY (2015):
Dairy chemistry and biochemistry
Springer, 2. Aufl., 145-297

GEY, M. H. (2015):
Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik,
Applikationen
Springer-Verlag, 3. Aufl., 234-235

GIVENS, I., P. AIKMAN, T. GIBSON & R. BROWN (2013):
Proportions of A1, A2, B and C β -casein protein variants in retail milk in the UK
Food Chem. 139, 549-552

GROSCLAUDE, F., M. MAHE, J. MERCIER & B. RIBADEAU-DUMAS (1972):
Characterization of genetic variants of a S1 and bovine caseins
Eur. J. Biochem. 26, 328-337

GRYSON, N. (2010):

Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review
J. Anal. Bioanal. Chem. 396, 2003-2022

HALLÉN, E., A. WEDHOLM, A. ANDRÉN, A. LUNDÉN & GENETICS (2008):

Effect of β -casein, κ -casein and β -lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants

J. Anim. Breed. 125, 119-129

HAN, S., Y. SHIN & H. BYUN (2000):

Biochemical, molecular and physiological characterization of a new β -casein variant detected in Korean Cattle

Anim. Genet. 31, 49-51

HECK, J., A. SCHENNINK, H. VAN VALENBERG, H. BOVENHUIS, M. VISKER, J. VAN ARENDONK & A. VAN HOOJDONK (2009):

Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk

J. Dairy Sci. 92, 1192-1202

HINES, H., G. HAENLEIN, J. ZIKAKIS & H. DICKEY (1977):

Blood Antigen, Serum Protein, and Milk Protein Gene Frequencies and Genetic Interrelationships in Holstein Cattle

J. Dairy Sci. 60, 1143-1151

IGGMAN, D., B. BIRGISDOTTIR, A. RAMEL, J. HILL & I. THORSDOTTIR (2003):

Differences in cow's milk composition between Iceland and the other Nordic countries and possible connections to public health

Scand. J. Nutr. 47, 194-198

IKONEN, T., O. RUOTTINEN, G. ERHARDT & M. OJALA (1996):

Allele frequencies of the major milk proteins in the Finnish Ayrshire and detection of a new K-casein variant

Anim. Genet. 27, 179-181

JANN, O., G. CERIOTTI, A. CAROLI & G. J. ERHARDT (2002):

A new variant in exon VII of bovine β -casein gene (CSN2) and its distribution among European cattle breeds

J. Anim. Breed. 119, 65-68

JARMOŁOWSKA, B., E. KOSTYRA, S. KRAWCZUK & H. KOSTYRA (1999):
β-Casomorphin-7 isolated from Brie cheese
J. Sci. Food Agric. 79, 1788-1792

JENNESS, R., B. LARSON, T. MCMEEKIN, A. SWANSON, C. WHITNAH & R. M. WHITNEY (1956):

Nomenclature of the proteins of bovine milk: report of the committee on milk protein nomenclature, classification, and methodology of the manufacturing section of ADSA
J. Dairy Sci. 39, 536-541

JIANQIN, S., X. LEIMING, X. LU, G. W. YELLAND, J. NI & A. J. CLARKE (2015):

Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk

Nutr. J. 15, 35

JU, J., C. RUAN, C. W. FULLER, A. N. GLAZER & R. A. MATHIES (1995):

Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis
Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 4347-4351

KAMIŃSKI, S., A. RUŚĆ & A. CIEŚLIŃSKA (2006):

A note on frequency of A1 and A2 variants of bovine beta-casein locus in Polish Holstein bulls
J. Anim. Feed Sci. 15, 195-198

KAMIŃSKI, S., A. CIEŚLIŃSKA & E. KOSTYRA (2007):

Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health
J. Appl. Genet. 48, 189-198

KEATING, A. F., T. J. SMITH, R. P. ROSS & M. CAIRNS (2008):

A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to β-casomorphin
Irish J. Agr. Food Res., 99-104

KIDDY, C., R. PETERSON & F. KOPFLER (1966):

Published Genetic control of variants of beta-casein A
J. Dairy Sci. 49, issue 6, 742

KIM, S. (1994):

Genetic Polymorphism of Milk Proteins and Their Association with Production Traits in Ayrshire, Jersey, Brown Swiss and Canadienne,

McGill University, Brief communications of the XXIV International dairy Congress, Melbourne Gb74, 166

KLOTZ, A., I. KRAUSE, R. EINSPANIER & TECHNOLOGY (2000):

Complete sequence determination of water buffalo (*Bubalus bubalis*) β -casein mRNA transcripts isolated from somatic milk cells

Eur. Food Res. Technol. 211, 1-5

KORHONEN, H. & A. PIHLANTO (2006):

Bioactive peptides: production and functionality

Int. Dairy J. 16, 945-960

KRAFT, W. (2005):

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin

Schattauer Verlag, 6. Aufl., 76-80

KUBISTA, M., J. M. ANDRADE, M. BENGTSSON, A. FOROOTAN, J. JONÁK, K. LIND, R. SINDELKA, R. SJÖBACK, B. SJÖGREEN & L. STRÖMBOM (2006):

The real-time polymerase chain reaction

J. Mol. Aspects Med. 27, 95-125

KUCEROVA, J., A. MATEJICEK, O. JANDUROVÁ, P. SORENSEN, E. NEMCOVA, M. STIPKOVA, T. KOTT, J. BOUSKA & J. FRELICH (2006):

Milk protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh

Czech J. Anim. Sci 51, 241

LFGB, Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (1989):

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Bestimmung der geweblichen Zusammensetzung von Fleisch, Fleischerzeugnissen und Wurstwaren L 06.00. 13

Berlin: Beuth Verlag, Band 1, L 03.52-1(EG)

LFL Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (2017):

Agrarmärkte 2017 - Milch:

https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/iem/dateien/2017_12_20_agrarmaerkte_gesamt_download.pdf

letzter Zugriff: 16.03.2019, 190-221

LIEN, S., J. KANTANEN, I. OLSAKER, L. E. HOLM, E. EYTHORSDOTTIR, K. SANDBERG, B. DALSGARD & S. ADALSTEINSSON (1999):

Comparison of milk protein allele frequencies in Nordic cattle breeds

Anim. Genet. 30, 85-91

LIN, C., A. MCALLISTER, K. NG-KWAI-HANG & J. HAYES (1986):

Effects of Milk Protein Loci on First Lactation Production in Dairy Cattle

J. Dairy Sci. 69, 704-712

LINDERSSON, M., A. LUNDEN & L. ANDERSSON (1995):

Genotyping bovine milk proteins using allele discrimination by primer length and automated DNA sizing technology

Anim. Genet. 26, 67-72

LUNDÉN, A., M. NILSSON & L. JANSON (1997):

Marked effect of β -lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk

J. Dairy Sci. 80, 2996-3005

LÜTKE HOLZ, K. (2018):

Top Agrar: Kaufland verkauft A2-Milch aus der Eifel:

<https://www.topagrar.com/rind/news/kaufland-verkauft-a2-milch-aus-der-eifel-9567250.html>

letzter Zugriff: 27.7.2018

MANGA, I. & J. DVORAK (2010):

TaqMan allelic discrimination assay for A1 and A2 alleles of the bovine CSN2 gene

Czech J. Anim. Sci. 55, 307-312

MASSELLA, E., S. PIVA, F. GIACOMETTI, G. LIUZZO, A. V. ZAMBRINI & A. SERRAINO (2017):

Evaluation of bovine beta casein polymorphism in two dairy farms located in northern Italy

Ital. J. Food Saf.

MAURER, J. (2006):
PCR methods in foods
Springer Science & Business Media, 1. Aufl., 1-68

MCLACHLAN, C. (2001):
 β -casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses
Med. Hypotheses 56, 262-272

MCLACHLAN, C. N. S. (2003):
Milk lacking β -casein A1
U.S. Patent US 6,570,060 B2 (2003)

MCLEAN, D. M., E. B. GRAHAM, R. W. PONZONI & H. A. MCKENZIE (1984):
Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition
J. Dairy Res. 51, 531-546

MISHRA, B., M. MUKESH, B. PRAKASH, M. SODHI, R. KAPILA, A. KISHORE, R. KATARIA, B. JOSHI, V. BHASIN & T. RASOOL (2009):
Status of milk protein, b-casein variants among Indian milch animals
Indian J. Anim. Sci. 79, 722-725

MIV Milchindustrie-Verband (2017):
MIV Geschäftsbericht 2016/17:
https://milchindustrie.de/wp-content/uploads/2017/10/MIV-Geschaeftsbericht_2017.pdf
letzter Zugriff: 10.03.2019, 2-17

MUEHLENKAMP, M. & J. WARTHESEN (1996):
 β -Casomorphins: Analysis in cheese and susceptibility to proteolytic enzymes from Lactococcus lactis ssp. cremoris
J. Dairy Sci. 79, 20-26

MÜLLER, H.-J. & D. R. PRANGE (2016):
PCR-Polymerase-Kettenreaktion
Springer, 2. Aufl., 1-100

MURPHY, R. & W. DOWNEY (1969):

Milk protein polymorphisms in the Kerry breed of cattle

J. Dairy Sci. 52, 1113-1115

NCBI (2018)

Bos taurus Chromosome 6 Beta Caseine Reference Sequence NC_037333.1

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281099>

letzter Zugriff: 27.06.2020

NGUYEN, D. D., S. K. JOHNSON, F. BUSETTI, V. A. SOLAH & NUTRITION (2015):

Formation and degradation of beta-casomorphins in dairy processing

Crit. Rev. Food Sci. 55, 1955-1967

NORRIS, C., C. COKER, M. BOLAND & J. HILL (2003):

Analysis of cheeses for [beta]-casomorphin-7, its precursors and its analogues

Aust. J. Dairy Technol. 58, 201

PAL, S., K. WOODFORD, S. KUKULJAN & S. HO (2015):

Milk intolerance, beta-casein and lactose

Nutrients 7, 7285-7297

PALMQUIST, D., A. D. BEAULIEU & D. BARBANO (1993):

Feed and animal factors influencing milk fat composition

J. Dairy Sci. 76, 1753-1771

PLATH, A., I. KRAUSE & R. EINSPANIER (1997):

Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques

ZLUF A 205, 437-441

POKORSKA, J., D. KUŁAJ, M. DUSZA, J. ŻYCHLIŃSKA-BUCZEK & J. MAKULSKA (2016):

New rapid method of DNA isolation from milk somatic cells

Anim. Biotechnol. 27, 113-117

PSIFIDI, A., C. I. DOVAS & G. BANOS (2010):

A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples

Mol. Cell. Probes 24, 93-98

PUPKOVA, G. (1980):

Milk protein polymorphism and milk production of Estonian Black Pied cows

Bull. All-Union Inst. Res. Agric. Anim. Breed. Gen., 6-9

REIMINK, A. (2017):

A2-die neue Supermilch

Top Agrar, Zucht, 2/2017, 18-21

REWE (2018):

Unsere regionale Wohlfühlmilch von Familie Gerden aus Kall:

http://www.rewe-richrath.de/wir-aus-der-region_wohlfuehlmilch.html

letzter Zugriff: 07.03.2019

RIBADEAU, D. B., G. BRIGNON, F. GROSCLAUDE & J. MERCIER (1972):

Primary structure of bovine beta casein. Complete sequence

Eur. J. Biochem. 25, 505

RIESBERG, M. (2017):

A2 Milch - Trend in Weiß

Bayerisches Landwirtschaftliches Wochenblatt, BLW 25, Märkte und Preise, 76-77

RINCON, G. & J. MEDRANO (2003):

Single nucleotide polymorphism genotyping of bovine milk protein genes using the tetra-primer ARMS-PCR

J. Anim. Breed. Genet. 120, 331-337

SAIKI, R., S. SCHARF, F. FALOONA, K. MULLIS, G. HOORN & N. ARNHEIM (1985):

Polymerase chain reaction

Sci. 230, 1350-1354

SCHÖPPER, I. (2016):

Lymphomdiagnostik beim Hund mittels PARR mit nachfolgender Schmelzkurvenanalyse,
Diss. med. vet., München

SCHWARZENBACHER, E., GÖTZ

Monitoring von Beta Kasein über die Genomische Selektion:

<https://www.lfl.bayern.de/itz/rind/172423/index.php>

letzter Zugriff: 09.03.2019

SHARMA, V., N. SHARMA, B. JAWED, S. C. NAUTIYAL & R. SINGH (2013):

High Resolution Melt Curve Analysis for the detection of A1, A2 β -casein variants in Indian Cows

J. Microbiol. Biotechnol. Res. 3, 144-148

SHUSTER, D. E., M. E. KEHRLI, M. R. ACKERMANN & R. O. GILBERT (1992):

Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle

J. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 9225-9229

SMIT, G. (2003):

Dairy processing: improving quality

Elsevier, 1. Aufl., 1-260

STENZEL, W. R. (2016):

Die Zusammensetzung der Milch in Märlbauer und Becker (Hg):

Milchkunde und Milchhygiene

Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 60-88

SUN, Z. & J. R. CADE (1999):

A peptide found in schizophrenia and autism causes behavioral changes in rats

Autism 3, 85-95

SUN, Z., J. R. CADE, M. J. FREGLY & R. M. PRIVETTE (1999):

β -Casomorphin Induces Fos-Like Immunoreactivity in Discrete Brain Regions Relevant to Schizophrenia and Autism

Autism 3, 67-83

SUN, Z., Z. ZHANG, X. WANG, R. CADE, Z. ELMIR & M. FREGLY (2003):
Relation of β -casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome
Pept. 24, 937-943

TIBMOLBIOL (2018):

Light Cycler Hybridisierungssonden:

<https://www.tib-molbiol.de/cgi-bin/WebObjects/TIB-MOLBIOL.woa/2/wa/showInfoPage?id=6.7.8.9&entity=Linker5&wosid=00HDN1fzXkByNhkMjpZtq0>

letzter Zugriff: 08.04.2019

TRUSWELL, A. (2005):

The A2 milk case: a critical review

Eur. J. Clin. Nutr. 59, 623

TURNBULL, J., H. ADAMS & D. GORARD (2015):

The diagnosis and management of food allergy and food intolerances

Aliment. Pharmacol. Ther. 41, 3-25

UNIPROT (1989):

Casein B Bovin P02666:

<https://www.uniprot.org/uniprot/P02666>

letzter Zugriff: 09.03.2019

USMAN, T., Y. YU, C. LIU, Z. FAN & Y. WANG (2014):

Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk

Genet. Mol. Res. 13, 3319-3328

VAN EENENNAAM, A. L. & J. F. MEDRANO (1991):

Differences in allelic protein expression in the milk of heterozygous κ -casein cows

J. Dairy Sci. 74, 1491-1496

VISSEER, S., C. J. SLANGEN, F. M. LAGERWERF, W. D. VAN DONGEN & J. HAVERKAMP (1995):

Identification of a new genetic variant of bovine β -casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis

J. Chromatogr. A 711, 141-150

WESTERMEIER, R. (2016):

Elektrophorese leicht gemacht: ein Praxisbuch für Anwender

John Wiley & Sons, 2. Aufl., 1-254

WILSON, I. G. (1997):

Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification

Appl. Environ. Microbiol. 63, 3741

WINKELMAN, A. & B. WICKHAM (1997):

Published Associations between milk protein genetic variants and production traits in New Zealand dairy cattle. Milk protein polymorphism, Palmerston North (New Zealand), Feb 1997

Int. Dairy Fed. 38-46

WITTWER, C. T., M. G. HERRMANN, A. A. MOSS & R. RASMUSSEN (2013):

Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification

J. Biotech. 54, 314-320

WOODFORD, K. (2009):

Devil in the Milk: Illness, Health and the Politics of A1 and A2 Milk

Chelsea Green Publishing, 1. Aufl., 1-240

WOODFORD, K. B. (2007):

Published A2 milk, farmer decisions, and risk management. Proceedings of the 16th International Farm Management Congress: Peer reviewed papers

641-648

YAN, S. C. B. & F. WOLD (1984):

Neoglycoproteins: in vitro introduction of glycosyl units at glutamines in. beta.-casein using transglutaminase

Biochem. 23, 3759-3765

9 Anhang

Tabelle 18. Allelfrequenz des β -CN der Rinderrassen der westlichen Länder nach EFSA (2009)

Land	Rasse	Allelfrequenz β -CN				Quelle
		A1	A2	B	andere	
USA	Angus	0,95		0,05		CALDWELL et al. (1971)
USA	Ayrshire	0,72	0,28			KIDDY et al. (1966)
UK	Ayrshire	0,60	0,40			ASCHAFFENBURG (1968)
CAN	Ayrshire	0,60	0,40			KIM (1994)
NZL	Ayrshire	0,432	0,527			WINKELMAN & WICKHAM (1997)
FIN	Ayrshire	0,509	0,490	0,001		IKONEN et al. (1996)
FIN	Ayrshire	0,50	0,50			LIEN et al. (1999)
EST	Black Pied	0,97*		0,03		PUPKOVA (1980)
USA	Braham	0,99*		0,01		CALDWELL et al. (1971)
ITA	Brown Italian	0,11	0,69	0,18	0,02	BOETTCHER et al. (2004)
CAN	Brown Swiss	0,32	0,52	0,16		KIM (1994)

Land	Rasse	Allelfrequenz β -CN				Quelle
		A1	A2	B	andere	
USA	Brown Swiss	0,14	0,66	0,18	0,02	KIDDY et al. (1966)
USA	Brown Swiss	0,18	0,66	0,16		VAN EENENNAAM & MEDRANO (1991)
NLD	Dutch Friesian	0,766	0,147	0,014	0,073	BOVENHUIS & VAN ARENDONK (1991)
FIN	Finncattle	0,274	0,710	0,016		LIEN et al. (1999)
FIN	Finncattle	0,385	0,615			LIEN et al. (1999)
FIN	Finncattle	0,293	0,671	0,037		LIEN et al. (1999)
NZL	Friesian	0,465	0,510			WINKELMAN & WICKHAM (1997)
ITA	Friesian	0,38	0,55	0,07		BOETTCHER et al. (2004)
HUN	Grey	0,23	0,76	0,01		BARANYI et al. (1993)
USA	Guernsey	0,01	0,98	0,02		ASCHAFFENBURG (1963)
USA	Guernsey		0,96		0,04	VAN EENENNAAM & MEDRANO (1991)
USA	Hereford	0,75*		0,25		CALDWELL et al. (1971)

Land	Rasse	Allelfrequenz β -CN				Quelle
		A1	A2	B	andere	
AUS	Holstein	0,63	0,35	0,02		MCLEAN et al. (1984)
ITA	Holstein	0,58	0,40	0,02		ALEANDRI et al. (1997)
USA	Holstein	0,43	0,55	0,02		VAN EENENNAAM & MEDRANO (1991)
UK	Holstein Friesian	0,66	0,24	0,06	0,04	ASCHAFFENBURG (1968)
DEU	Holstein Friesian		0,960	0,040		ASCHAFFENBURG (1968)
CAN	Holstein Friesian	0,54	0,44	0,01	0,01	HINES et al. (1977)
USA	Holstein Friesian	0,42	0,53	0,02	0,03	HINES et al. (1977)
USA	Holstein Friesian	0,624	0,347	0,025	0,004	MCLEAN et al. (1984)
CAN	Holstein Friesian	0,363	0,632	0,001	0,004	LIN et al. (1986)
FIN	Holstein Friesian	0,430	0,523	0,047		LIEN et al. (1999)
POL	Holstein Friesian	0,402	0,598			KAMIŃSKI et al. (2007)
ISL	Icelandic	0,326	0,674			LIEN et al. (1999)
USA	Jersey	0,22	0,49	0,29		KIDDY et al. (1966)

Land	Rasse	Allelfrequenz β-CN				Quelle
		A1	A2	B	andere	
UK	Jersey	0,09	0,63	0,28		ASCHAFFENBURG (1968)
AUS	Jersey	0,07	0,57	0,36		MCLEAN et al. (1984)
DNK	Jersey	0,07	0,58	0,35		BECH & KRISTIANSEN (1990)
USA	Jersey	0,17	0,50	0,33		VAN EENENNAAM & MEDRANO (1991)
NZL	Jersey	0,123	0,591			WINKELMAN & WICKHAM (1997)
IRL	Kerry		1,00*			MURPHY & DOWNEY (1969)
FRA	Normande	0,21	0,32	0,45	0,02	ASCHAFFENBURG (1968)
NOR	Norwegian	0,513	0,487			LIEN et al. (1999)
DNK	Red Danish	0,71	0,23	0,06		BECH & KRISTIANSEN (1990)
USA	Shorthorn	0,49	0,49	0,02		VAN EENENNAAM & MEDRANO (1991)
DNK	Simmental	0,231	0,673	0,082	0,013	BARANYI et al. (1993)
HRV	Simmental	0,190	0,630	0,150		CURIK et al. (1997)

Land	Rasse	Allelfrequenz β -CN				Quelle
		A1	A2	B	andere	
SWE	Swedish Black and White	0,407	0,593			LIEN et al. (1999)
SWE	Swedish Black and White	0,34	0,60	0,06		HALLÉN et al. (2008)
HUN	Spotted	0,21	0,715	0,06	0,015	BARANYI et al. (1993)
SWE	Swedish Red and White	0,460	0,531	0,008		LUNDÉN et al. (1997)
SWE	Swedish Red and White	0,397	0,603			LIEN et al. (1999)
DNK	White Danish	0,55	0,39	0,03	0,03	BECH & KRISTIANSEN (1990)

* nicht zwischen A1, A2 und A3 differenziert

Tabelle 19. Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Einzelpellet			
A260	A280	A260/A280	DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
0,028	0,031	0,9	0,14
0,007	0,006	1,16	0,035
0,006	0,005	1,2	0,03
0,005	0,004	1,25	0,025
0,004	0,003	1,33	0,02
0,005	0,004	1,66	0,025
0,005	0,003	1,66	0,025
0,005	0,004	1,25	0,025

Einzelpellet			
A260	A280	A260/A280	DNA in µg/µl
0,005	0,004	1,25	0,025
0,007	0,005	1,4	0,035
0,007	0,005	1,4	0,035
0,007	0,005	1,4	0,035
0,005	0,004	1,25	0,025
0,004	0,003	1,33	0,02
0,006	0,005	1,2	0,03
0,008	0,005	1,6	0,04
0,006	0,005	1,2	0,03
0,005	0,004	1,25	0,025
0,011	0,006	1,83	0,055
0,005	0,004	1,25	0,025
0,006	0,004	1,5	0,03
0,006	0,003	2	0,03
0,002	0,002	1	0,01
0,004	0,003	1,33	0,02
0,006	0,005	1,2	0,03
0,004	0,002	2	0,02
0,012	0,011	1,09	0,06
0,002	0,001	2	0,01
0,007	0,006	1,16	0,035
0,003	0,002	1,5	0,015

gepoolte Einzelpellets			
A260	A280	A260/A280	DNA in µg/µl
0,009	0,010	0,9	0,045
0,013	0,009	1,44	0,065
0,008	0,005	1,6	0,04

Messwertebereich			
A260	A280	A260/A280	DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
0,002–0,028	0,001–0,031	0,9–2	0,01–0,14

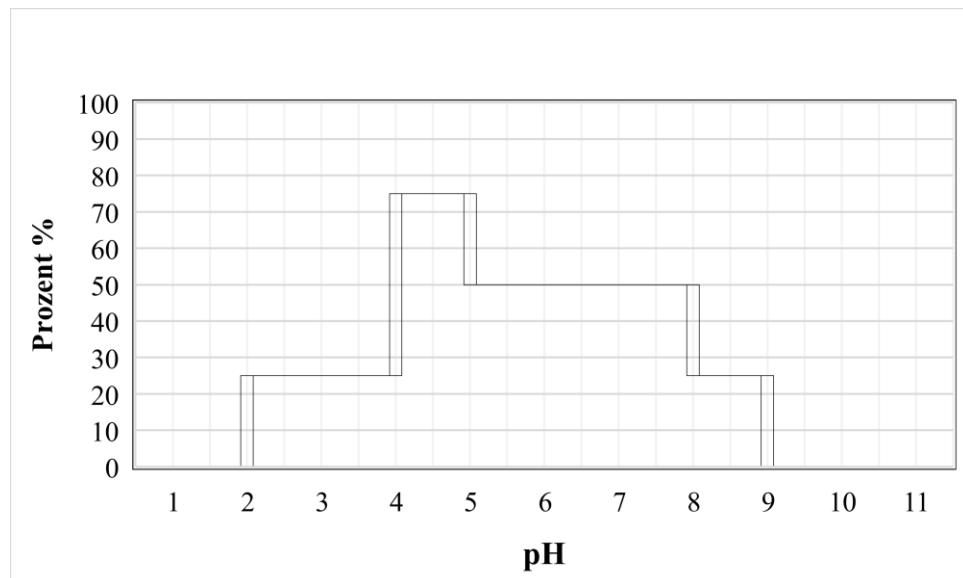


Abbildung 24. Zusammensetzung der Ampholyte in der IEF-Gelelektrophorese Variante 1

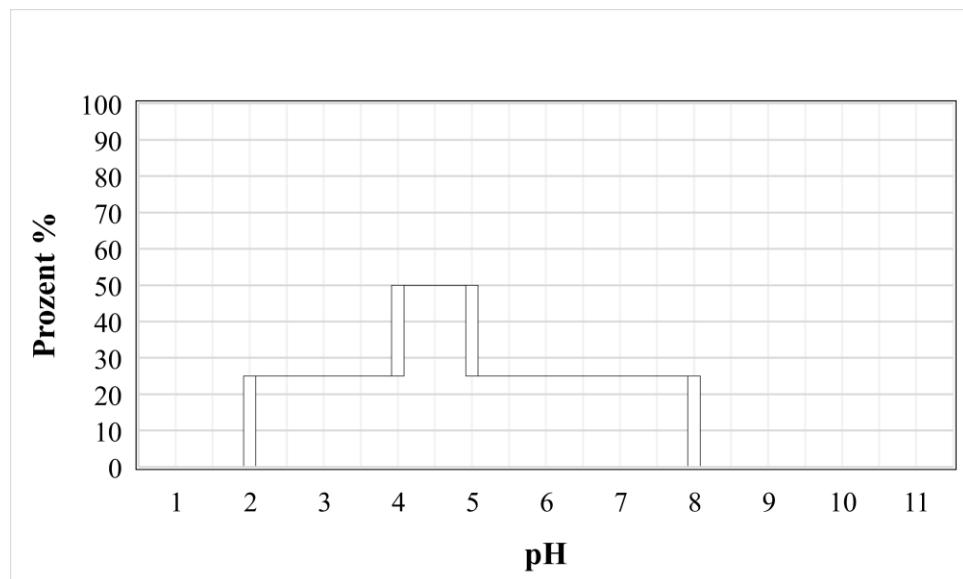


Abbildung 25. Zusammensetzung der Ampholyte in der IEF-Gelelektrophorese Variante 2

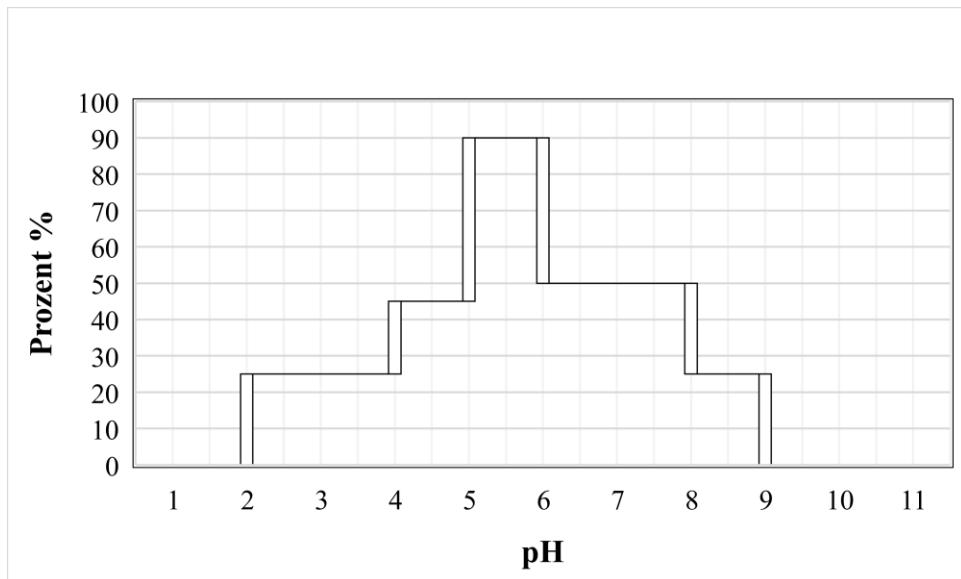


Abbildung 26. Zusammensetzung der Ampholyte in der IEF-Gelelektrophorese Variante 3

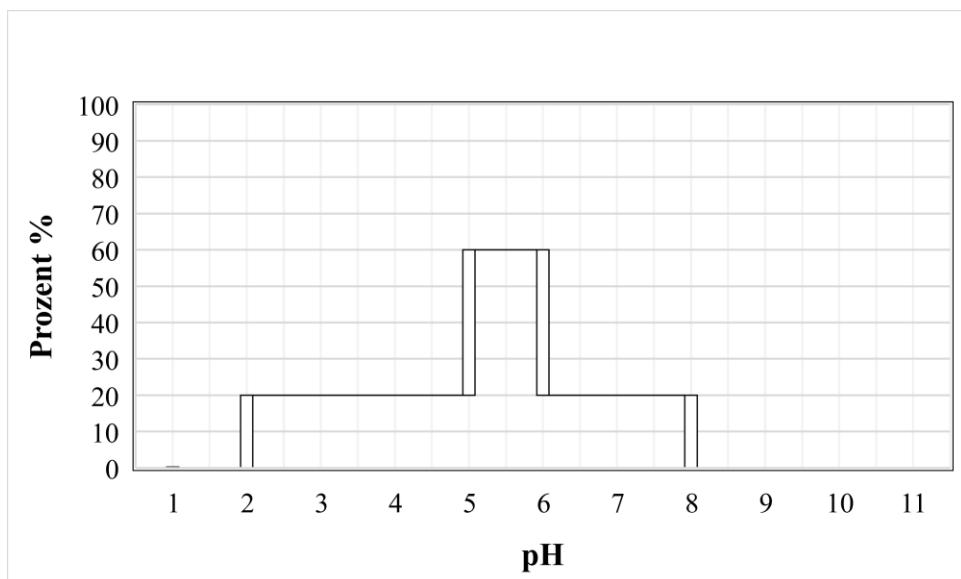


Abbildung 27. Zusammensetzung der Ampholyte in der IEF-Gelelektrophorese Variante 4

10 Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer danke ich für die Überlassung des aktuellen und interessanten Themas, den fachlichen Rat, sowie die freundliche Aufnahme und Starthilfe im Institut.

Frau PD Dr. Andrea Stockmaier-Didier danke ich ganz herzlich für die überaus kompetente und zielgerichtete Unterstützung, sowie die unermessliche Geduld, Hilfsbereitschaft bei sämtlichen Fragen und Bewahrung des Überblicks, ohne welche diese Arbeit nicht ganz so schön gelungen wäre.

Mein Dank gilt **Herrn Dr. Maximilian Moravek**, für die fachliche Unterstützung, die nicht nur fachbezogene Durchsicht meiner Arbeit und das geduldige Beantworten meiner vielen Fragen.

Ich danke **Ricarda Mayer** für die PCR Einführung, das Beantworten meiner Fragen und die ständige Erreichbarkeit.

Ich möchte mich bei der Geschäftsleitung der Firma muva **Frau Dr. med. vet. Monika Knöldseder** für die Ermöglichung meiner Arbeit bedanken.

Der Abteilungsleitung Mikrobiologie **Frau Dr. med. vet. Ursula Hartmann und Frau Dr. med. vet. Christine Bürk** danke ich für die Unterstützung und Bereitstellung von Literatur.

Frau Hanke danke ich für die Unterstützung im Bereich Gelelektrophorese, das Beantworten meiner Fragen, die Geduld und Hilfe bei der Auswertung.

Der Abteilung **IT** danke ich für die technische Unterstützung.

Weiterhin danke ich **allen Mitarbeitern der Firma muva vor allem des Bereich Hygiene** für die Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre.

Ich danke den **Angestellten des Spitalhofes** für die Bereitstellung der Proben und insbesondere **Toni** für die Hilfe bei der Probennahme.

Ich danke dem **Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim** und besonders **Ann-Sophie Kraus** für das Gewinnen und Bereitstellen von Referenzmaterial.

Ich danke allen **Landwirten**, welche mir die Milchproben zur Verfügung gestellt und diese nach meinen Wünschen gewonnen haben.

Meinen Freundinnen **Moni**, **Vreni** und **Kathi** danke ich für die Hilfe bei der Durchsicht meiner Arbeit und die moralische Unterstützung.

Ganz besonders herzlich danke ich meinen **Eltern** und meinem **Freund Martin**, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht so gut gelungen wäre.