
Literatuurstudie: Genetische selectie naar A2A2 dieren

Operationele groep A2A2 melk, niche of markt-
opportunititeit

KAREN GOOSSENS - ILVO

ILVO

Instituut voor Landbouw-,
Visserij- en Voedingsonderzoek



Europees Landbouwfonds
voor Plattelandsontwikkeling:
Europa investeert
in zijn platteland

www.vlaanderen.be/pdpo



Inhoud

1. B-Caseïne, het voornaamste melkeiwit.....	2
2. Varianten van het β -caseïne eiwit en hun functionaliteit.....	2
3. Het voorkomen van de A2A2 β -caseïne variant.....	4
4. Invloed van de A2A2 β -caseïne variant op melkproductie en melksamenstelling	7
5. Genetische selectie naar de A2A2 β -caseïne variant	7
Referenties	0

1. B-Caseïne, het voornaamste melkeiwit

Het melkeiwit in rundermelk bestaat hoofdzakelijk uit 2 types hoogwaardige eiwitten, namelijk **wei-eiwitten en caseïnes**. Er bestaan 2 types twee wei-eiwitten: a-lactalbumine (a-LA) en b-lactoglobuline (b-LG) en **vier types caseïnes**: α 1-caseïne, (CSN1S1), α 2-caseïne (CSN1S2), β -caseïne (CSN2) en κ -caseïne (CSN3) (Eigel et al. 1984; Roginski 2003). Er bestaat ook een γ -caseïne maar dit is een afbraakproduct van het β -caseïne (Ostersen et al. 1997; Miller et al. 1990).

Caseïne maakt ongeveer 80% uit van het totale eiwit in rundermelk (Niki et al.1994; Martien et al. 1994) en wordt beschouwd als een hoogwaardig voedingseiwit dat alle negen essentiële aminozuren bevat. Caseïne is van grote nutritionele waarde voor het kalf. Het verteert langzaam doordat de proteolyse tot individuele aminozuren een traag proces is. Bij een lage pH < 4.5 (bv. door toevoeging van zuur) zal caseïne uitvlokken en neerslaan als wrongel, wat belangrijk is voor de kaasmakerij.

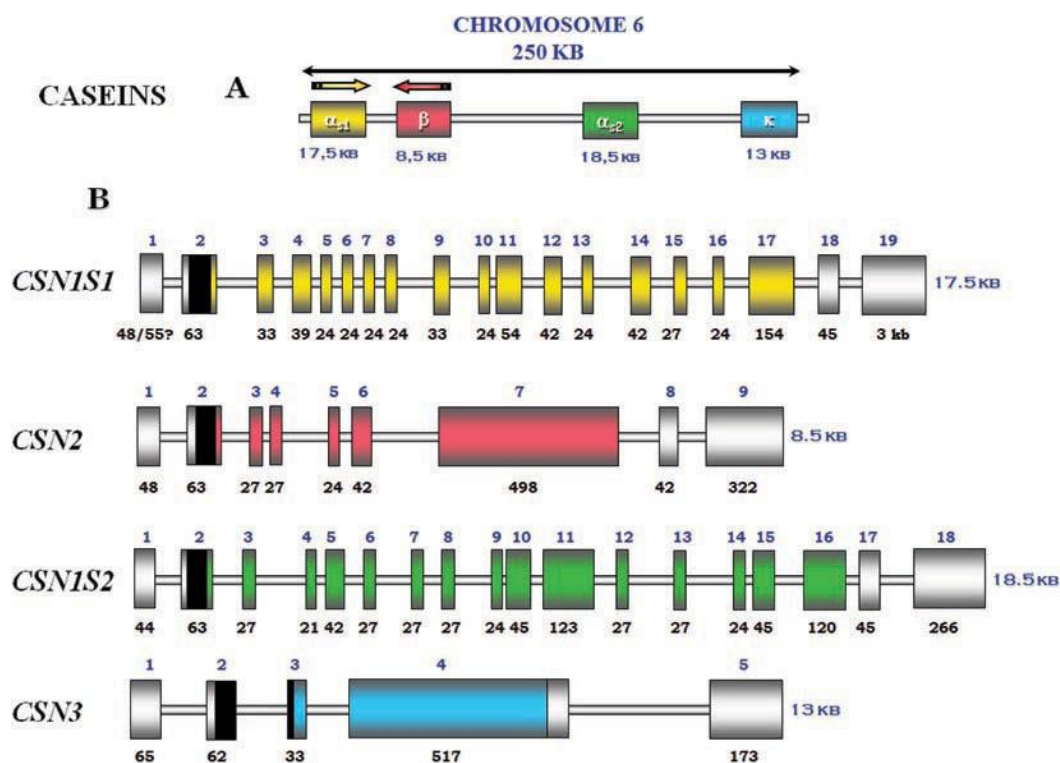
Caseïne komt in de melk voor als micellen. Deze micellen bestaan uit submicellen, die zelf gevormd zijn door een aaneensluiting van verschillende caseïne-eiwitketens. De α - en β -caseïnes bevatten fosfaatgroepen en bevinden zich hoofdzakelijk in het interne deel van de micel. De κ -caseïne-moleculen bevinden zich aan de buitenkant van de micel en bestaan uit een hydrofoob deel dat in de micel steekt en een hydrofiel deel dat naar buiten toe gericht is. Door het hydrofiel deel stoten de micellen elkaar af en blijven ze in oplossing.

Het 209 aminozuren tellende **β -caseïne-eiwit** is het tweede meest voorkomende melkeiwit, het ligt aan de basis van de witte kleur van melk en is goed voor ongeveer 45% van het totale caseïnegehalte of 30% van het totale eiwitgehalte in melk.

2. Varianten van het β -caseïne eiwit en hun functionaliteit

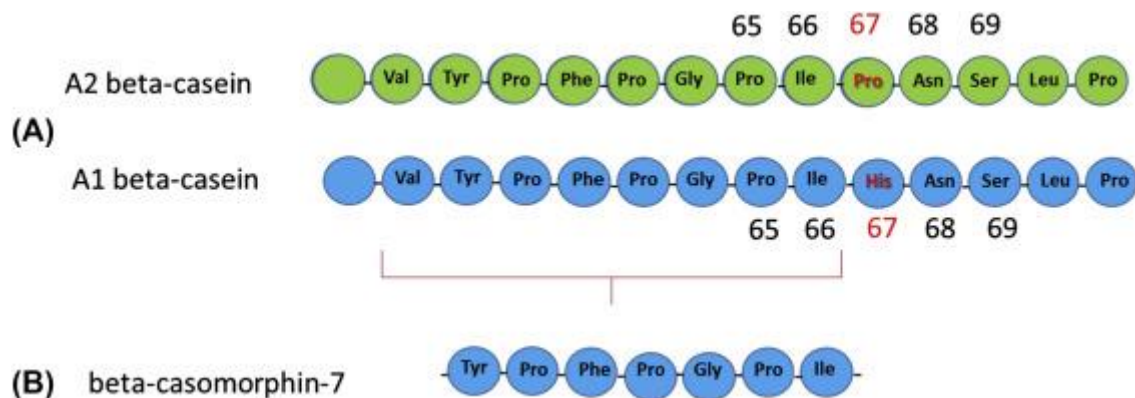
Caseïnes worden gecodeerd door een **multigen familie**, die bij het rund gelegen is op chromosoom 6 (BTA6, Rijnkels 2002, Figuur 1). Van het β -caseïne alleen al bestaan er **12 genetische varianten**: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G (Tabel 1). A2 β -caseïne is de β -caseïnevorm die koeien vermoedelijk origineel produceerden voordat ze voor het eerst gedomesticeerd werden, meer dan 10.000 jaar geleden. In gedomesticeerd melkvee zijn zowel de A2 als A1 varianten meest voorkomend, gevolgd door de B variant. De andere varianten zijn eerder zeldzaam in melkvee rassen (Farrell et al. 2004).

Ten opzichte van de oorspronkelijke variant A2 heeft het A1 β -caseïne een aminozuur verandering op **positie 67** van het eiwit, namelijk een substitutie van **proline** (CCT) naar **histidine** (CAT) (Bonsing et al., 1988). De A1 variant is niet de enige variant die deze specifieke aminozuur substitutie heeft, ook bij varianten B, C, F en G komt een histidine voor, terwijl de andere varianten net als de A2 variant een proline bevatten. Naast de variatie op positie 67 komen in de andere varianten nog bijkomende aminozuur substituties voor t.o.v. variant A2, zoals aangegeven in Tabel 1.



Figuur 1: Caseïne genen gelegen op chromosoom 6 (BTA6) (naar Caroli et al., 2009)

Het polymorfisme dat zorgt voor de vervanging van proline door histidine, leidt tot specifieke veranderingen in de secundaire conformatie van het geproduceerde β -caseïne eiwit. De aanwezigheid van histidine veroorzaakt het vrijkomen van een bioactief peptide genaamd β -casomorphin-7 (BCM-7) tijdens de gastro-intestinale proteolyse van A1 β -caseïne in de dunne darm van de mens, terwijl de aanwezigheid van proline in A2 variant net verhindert dat de polypeptidesequentie splitst op deze kritieke plaats (Figuur 2). Daardoor wordt er bij de A2 variant een ander peptide gevormd, genaamd β -casomorfine-9 (BCM-9) (Kostyra et al., 2004; Ristanic et al., 2020). Door zijn lage moleculaire gewicht passeert BCM-7 de bloed-hersenbarrière en bindt zich aan bepaalde receptoren in het gastro-intestinale systeem en zelfs centrale zenuwstelsel en immuunsysteem. De fysiologische effecten van deze bioactieve peptiden die vrijkomen bij de vertering van de β -caseïne melkeiwitvarianten staan nog zeer ter discussie en het bewijsmateriaal uit studies bij de mens is nog beperkt (Kuellenberg de Gaudry et al., 2021; zie literatuurstudie gezondheidseffecten).



Figuur 2: De aminozuur substitutie van proline naar histidine op positie 67 van het β -caseïne eiwit zorgt voor proteolyse in het bioactief peptide betacasomorphin-7 (BCM-7) met opioïde eigenschappen (naar Rashidinejad et al., 2017).

Tabel 1: Veranderingen in de aminozuur sequentie van de β -caseïne varianten (naar Kaminski et al., 2007)

Beta-casein variants	Change in amino acid sequence														
	18	25	35	36	37	67	72	88	93	106	117	122	137	138	
A2	Ser-P	Arg	Ser-P	Glu	Glu	Pro	Glu	Leu	Gln	His	Gln	Ser	Leu	Pro	
A1						His									
A3										Gln					
B						His						Arg			
C			Ser		Lys	His									
D	Lys														
E				Lys											
F						His								Leu	
G						His						Leu			
H1		Cys						Ile							
H2							Glu		Leu					Glu	
I									Leu						

3. Het voorkomen van de A2A2 β -caseïne variant

Het gen dat codeert voor β -caseïne is zoals boven vermeld gelegen op chromosoom 6 bij het rund (BTA6). Elke koe draagt twee exemplaren van dit gen. Een dier kan **homozygoot of heterozygoot** zijn voor het polymorfisme op positie 67 en dus een genotype **A1/A1, A1/A2, of A2/A2** hebben. Homozygote A1/A1-koeien produceren melk met uitsluitend het A1 β -caseïne en homozygote A2/A2-koeien produceren enkel het A2 β -caseïne. Noch de A1-, noch de A2-kenmerken lijken dominant te zijn, wat betekent dat de melk die door een heterozygote A1/A2 koe wordt geproduceerd waarschijnlijk gelijke verhoudingen A1- en A2 β -caseïne zal bevatten. Voor productie van zuivere A2A2 melk is het dus belangrijk dat gewerkt wordt met homozygote A2A2 dieren. Wanneer gewerkt wordt met 2 homozygote A2A2 dieren zullen alle nakomelingen ook A2A2 homozygoot zijn. Wanneer een homozygoot A2A2 dier gekruisd wordt met een heterozygoot A1A2 dier zal slechts de helft van de nakomelingen 100% A2A2 zijn. Genotypering van de dieren is dus zeer belangrijk wanneer men uitsluitend A2A2 melk wil produceren (Zie figuur 3).



Figuur 3: Overerving van het A2A2 gen (bron: Zoetis)

Algemeen wordt aangenomen dat het A2 β -caseïne het originele β -caseïne eiwit is omdat het aanwezig was voor het ontstaan van de mutatie op positie 67 die het A1- β -caseïne veroorzaakte bij Europese vee (*Bos taurus*), enkele duizenden jaren geleden (Malarmathi et al., 2014). In de populatie waterbuffels bestaat enkel de A2 variant en alle melkproducten van waterbuffels zijn dus A2A2 (de Oliveira et al., 2021). Er zijn nog steeds koeienrassen waarvan het grootste deel van de koeien A2-melk produceert, zoals Guernsey (88-97%), Jersey (49-72%; Woodford, 2007) en Zuid-Europese rassen. Hoewel elke melkveestapel sterk kan verschillen van het gemiddelde, kan toch een algemene karakterisering worden gemaakt van de A1- of A2-genetica van rassen. Bayern Genetik heeft het aandeel A2A2 dieren binnen het Fleckvieh ras in kaart proberen brengen door dieren van een 30-tal veehouders (zo'n 6000 koeien) te testen op de mutatie. Daaruit bleek dat 30 tot 35 procent van de geteste Fleckvieh koeien A2A2 is, met uitschieters rond de 50 procent.

Ook in het Holstein ras wordt algemeen aangenomen dat de A1 variant het meest voorkomend is (31-66%) (Pal, 2015). Uit recente cijfers van CRV blijkt dat het aandeel A2A2-dieren in de Nederlandse Holsteinpopulatie bijna vergelijkbaar is met Fleckvieh. Uit gegevens van alle koeien die via CRV met een merkertest zijn onderzocht – inmiddels ongeveer 100.000 dieren – blijkt dat in de zwartbontpopulatie 41 procent A2A2 is. Bij roodbont is dat aantal iets lager, 37 procent.

Uit een Franse studie (Sanchez et al., 2020) bleek dat de A2-variant van het β -caseïne het meest voorkomend is bij alle onderzochte Franse rassen behalve Tarentaise. Bij de Normandische dieren kwam de I-variant (30,9%) bijna even vaak voor als A2 (39,7%). Deze I-variant is tot nu toe nog maar

weinig bestudeerd en sommige genetische testen maken geen onderscheid tussen de A2 variant en de I-variant die beiden een proline hebben op positie 67 van het β -caseïne gen.

De studie van Kaminski et al. (2007) geeft een overzicht van het voorkomen de β -caseïne varianten B, A1 of A2 binnen verschillende rassen in verschillende landen (Tabel 2). Hieruit blijkt dat A1 en A2 de meest voorkomende varianten zijn en dat de B variant minder vaak voorkomt. De andere varianten werden maar zelden bestudeerd, maar er wordt aangenomen dat deze eerder zeldzaam zijn (Farrell et al., 2004). Deze studie bevestigt dat in de Guernsey en Jersey rassen de A2 variant meest voorkomt, net als bij Brown Swedish en Simmental koeien. Bij Holstein-Friesian komen de A1 en A2 variant ongeveer even vaak voor maar met grote variatie tussen landen en kuddes. Bij andere rassen zoals Ayrshire en Deens rood komt de A1 variant frequenter voor.

Belangrijk hierbij is in het achterhoofd te houden dat het in vele studies slechts om kleine dieraantallen gaat en dus geen algemeen beeld geeft van het voorkomen van de varianten binnen een bepaald ras of land. Daartoe is meer onderzoek nodig. Ook maken vele studies geen onderscheid tussen alle varianten, waardoor het voorkomen van bijvoorbeeld de I-variant onderschat kan zijn.

Tabel 2: Het voorkomen van β -caseïne varianten in verschillende rassen en landen (naar Kaminski et al., 2007).

Breed	Country	No. of animals	Frequency of beta-casein alleles			References
			B	A1	A2	
Guernsey	USA	400		0.010		Swaissgood 1992
	USA	3861	0.010–0.020	0.010–0.060	0.880–0.970	Eenennam et al. 1991
Jersey	Germany	43	0.186	0.093	0.721	Ehrmann et al. 1997
	Denmark	157	0.350	0.070	0.580–0.650	Bech et al. 1990
	New Zealand	1328	–	0.123	0.591	Winkelman and Wickham 1997
Brown Swedish	USA	387	0.290–0.370	0.090–0.220	0.490–0.540	Eenennam et al. 1991
	Germany	232	0.170	0.108	0.705	Ehrmann et al. 1997
	USA	282	0.100–0.180	0.140–0.150	0.660–0.720	Swaissgood 1992
Simmental	USA	259	0.100–0.180	0.140–0.180	0.660–0.720	Eenennam et al. 1991
	Croatia	621	0.150	0.190	0.630	Curik et al. 1997
HF	Germany	229	–	0.343	0.566	Ehrmann et al. 1997
	USA	526	0.010–0.060	0.310–0.660	0.240–0.620	Swaissgood 1992
	USA	6000	0.010–0.040	0.310–0.490	0.490–0.620	Eenennam et al. 1991
	Hungary	768	0.107	0.418	0.470	Baranyi et al. 1997
	Germany	229	0.026	0.472	0.496	Ehrmann et al. 1997
	Poland	143	–	0.402	0.598	Kamiński et al. 2006a
	New Zealand	3761	–	0.465	0.510	Winkelman et al. 1997
Black-and-White	Norway	306	0.010	0.400	0.490	Lien et al. 1993
	Denmark	223	0.030–0.080	0.550	0.390	Bech et al. 1990
Red-and-White	Sweden	394	0.008	0.460	0.531	Lunden et al. 1997
	Germany	179	0.020	0.573	0.366	Ehrmann et al. 1997
Ayrshire	New Zealand	37	–	0.432	0.527	Winkelman and Wickham 1997
	Finland	686	0.001	0.509	0.490	Ikonen 1997
	United Kingdom	29	0–0.003	0.600	0.400	Swaissgood 1992
	USA	45	0	0.720	0.280	Swaissgood 1992
Red	Denmark	169	0.044–0.060	0.710	0.230	Bech et al. 1990

4. Invloed van de A2A2 β -caseïne variant op melkproductie en melksamenstelling

Polymorfismen in melk eiwitten kunnen invloed hebben op de **melkproductie, melksamenstelling** en bepaalde **eigenschappen van de melk**, zoals bijvoorbeeld het maken van kaas. Caseïne varianten zijn interessant omdat zij in verband kunnen worden gebracht met de melkeiwit samenstelling en melkproductiekenmerken. De invloed van caseïne haplotypes op de melkproductie, melksamenstelling en melkverwerking werd in bepaalde studies onderzocht. Het chromosoom 6 van runderen (BTA6) is een regio die vaak onderzocht werd op Quantitative Trait Loci (QTL) met betrekking tot melkproductiekenmerken. Analyses hebben aangetoond dat BTA6 minstens 77 QTL's herbergt, waarvan 48 verantwoordelijk zijn voor melkgift en melkeiwitsamenstelling (Khatkar et al., 2004). De resultaten van Schopen et al. (2009) toonden aan dat 3,5% van de fenotypische variantie voor melkeiwitsamenstelling waarschijnlijk afhangt van het polymorfisme van het beta-caseïne gen. De 4 caseïne genen liggen echter gelinkt in een 250 kb cluster op het BTA6, waardoor individuele effecten van bepaalde allelen of SNP binnen de caseïne cluster nog onbekend zijn of tegenstrijdig kunnen zijn tussen rassen of studies (Nilsen et al., 2009). Ook werd vaak natuurlijk geselecteerd naar bepaalde CN-varianten die de beste overlevingskansen gaven voor kalveren of indirect via fokkerij naar de beste melkproductie eigenschappen.

In een studie met Italiaanse Holstein koeien vonden Comin et al. (2008) dat CSN3 en CSN2 varianten sterk geassocieerd zijn met melkstollingskenmerken, melk- en eiwitopbrengsten. Voor coagulatie tijd en wrongelhardheid, waren de beste CSN2-CSN3 samengestelde genotypes die met ten minste één B-allel op beide loci. In een andere studie werden verschillen in stremming gerapporteerd tussen varianten van het κ -CN aangezien splitsing van het κ -CN in het onoplosbare para- κ -CN en het oplosbare caseino-macropptide (CMP) een cruciale stap is bij het maken van kaas. Dit wordt mogelijk verklaard door natuurlijke en/of kunstmatige selectie naar de 4 CN-genen, die essentieel zijn voor melkproductie en dus zowel voor het overleven van kalveren als voor de fokkerij.

Naast melkproductie en melksamenstelling zal in de toekomst ook screening en selectie naar bepaalde genetische varianten van het β -caseïne gen noodzakelijk zijn met het oog op de **humane consumptie en gezondheid**. Voor een veehouder zal het van groot belang zijn om te weten hoeveel gewicht kan gegeven worden aan de genetische variant van β -caseïne in een plan voor rasverbetering. Om de prestaties van melkkoeien ten opzichte van deze genetische marker te maximaliseren, is het van fundamenteel belang om de invloed van de A1- en A2-varianten van het β -caseïne gen op productie- en voortplantingskenmerken te onderzoeken. Op enkele rapporten na, zijn studies over de associatie tussen β -caseïne polymorfisme en economisch belangrijke productiekenmerken schaars.

5. Genetische selectie naar de A2A2 β -caseïne variant

Om de A2A2 status op een bedrijf na te gaan en te selecteren naar A2A2 dieren bestaan verschillende strategieën.

Ten eerste is de juiste **stierkeuze** van belang. Fokkerij organisaties bieden reeds sperma van A2A2 stieren aan voor verschillende rassen. Door hierop te selecteren als eerste kenmerk kan versneld een A2A2 homozygote kudde bekomen worden. Om een volledige A2A2-melkveestapel te krijgen en te houden, is het nodig om alleen A2A2-stieren te gebruiken. Een combinatie van een A2A2-stier met een A2A2-koe levert altijd een A2A2-nakomeling op. CRV meldt de A2-status nog niet op de stierenkaart,

maar op de website is al wel te vinden welke stieren A2A2 zijn (<https://www.crv4all.be/download/a2a2-stieren/>). Ook andere fokkerijorganisaties vermelden de A2-status bij hun stieren. De vraag is wel of er binnen het aanbod A2A2 stieren al voldoende mogelijkheden zijn om ook andere gewenste kenmerken mee te nemen in de selectie.

Naast de juiste stierkeuze is het ook belangrijk te weten of koeien het juiste genotype hebben om dochters voort te brengen die A2-melk geven. Nakomelingen moeten immers A2A2 homozygoot zijn wanneer men uitsluitend A2A2 melk wil produceren. Om te weten welke vaarzen of koeien A2A2 homozygoot zijn, moeten ook vrouwelijke dieren getest worden. Genetische variatie kan onderzocht worden op het **fenotypische niveau**, waarbij eiwit identificatie technieken gebruikt worden zoals elektroforese, isoelectroforese en chromatografie. Bij elektroforese en isoelectroforese kunnen genetische varianten opgespoord worden doordat aminozuur varianten de elektrische lading of het elektrische punt van een eiwit veranderen. Voor biodiversiteitsstudies is typering op eiwitniveau interessant omdat het een goedkope techniek is die op melk gebeurt en snel een beeld geeft van de fenotypische expressie van de 6 voornaamste melkeiwitten samen (Erhardt en Eggen, 1990).

DNA gebaseerde technieken zoals PCR-RFLP, SNP-chips, sequencering of allel-specifieke PCR bieden de mogelijkheid om polymorfismen op **genotypisch niveau** te identificeren waardoor geen melk nodig is en dus ook mannelijke en niet lacterende vrouwelijke dieren gegenotypeerd kunnen worden. Deze moleculaire analyses kunnen gebeuren op haar, sperma en bloed EDTA, bloed heparine of ear notch weefsel, maar ook op somatische cellen in melk (Chessa et al., 2007).

Er worden reeds verschillende DNA tests commercieel aangeboden, en deze tests verschillen in prijs maar ook in de informatie die ze geven. Er zijn tests beschikbaar die via genotypering testen op caseïne varianten in het genoom. Deze test wordt ondermeer aangeboden door het Nederlandse VHL Genetics, naast andere laboratoria. VHL Genetics biedt een **uitgebreide test** aan die onderscheid maakt tussen meerdere varianten van het β -caseïne (A2/A2 Genotypering: <https://www.vhlgenetics.com/nl-nl/DNA-testen/Catalogus/Details/Rund/R535-Beta-Caseine-Uitgebreid-A2-A2-Genotyping>). Deze test voor β -caseïne detecteert de meeste voorkomende varianten A1, A2, A3, B, C, I en H2. Ook via CRV is het mogelijk op A2 te testen, via de merkertest (<https://www.crv4all.be/service/merkertest/>). De merkertest geeft inzicht in de A2- status, maar daarnaast ook andere informatie. Bij een merkertest is de A2-status altijd inbegrepen. De test op β -caseïne is ook inbegrepen in Clarifide Plus van Zoetis. Clarifide Plus is een genoomtest om melkvee te kunnen rangschikken op basis van productie en vruchtbaarheid, maar ook op gezondheid en duurzaamheid. Zo krijgt de veehouder via een accurate test een goed zicht op welke z'n beste koeien zijn en welke weinig meerwaarde bieden voor het bedrijf, waardoor hij een gefundeerde fokstrategie kan opstellen. Via deze genetische test worden ook de kwaliteiten van de vrouwelijke dieren, inclusief de A2A2 status, meegenomen in de fokkerij doelen wat een gerichte, duurzame jongveeopfok met beperkt aantal dieren mogelijk maakt.

Er bestaat ook een **eenvoudige** β -caseïne test, waarbij alleen getypeerd wordt op de variatie van codon 67 (histidine of proline). Deze test laat toe te onderscheiden welke variant van dit codon de dieren bezitten. Zo heeft het A1 genotype een CAT codon dat codeert voor histidine en het A2 een CCT codon dat codeert voor een proline. Echter ook de A3, D, E H1, H2 en I varianten bevatten een proline. Door enkel naar codon 67 te kijken kan wel aangetoond worden dat een dier zeker niet A1A1 is, maar niet met 100% zekerheid aangetoond worden dat het wel A2A2 is. Daartoe dienen ook andere regio's van het β -caseïne gen in kaart gebracht te worden. Eenvoudige tests worden onder meer aangeboden door VHL Genetics (<https://www.vhlgenetics.com/nl-nl/DNA-testen/Catalogus/Details/Rund/R534-Beta->

[Caseine-Eenvoudig-A1-Free](#)) maar ook via Zoetis Genetics. De prijzen voor DNA testen schommelen tussen de 13,5 en 45 €.

De **melkstroom** die als A2 melk naar de verwerker gaat moet zeker zuiver A2A2 zijn. Alle koeien moeten daarvoor getest A2A2 zijn en melkstromen moeten gescheiden blijven, zowel bij de producent, de ophaler als de verwerker. Momenteel bestaan er geen specifieke richtlijnen waaraan de zuiverheid van A2A2-melk moet voldoen. Verordening nr. 2018/150 van de Raad, "analyse en kwaliteitsbeoordeling van melk en melkproducten die in aanmerking komen voor openbare interventie en steun voor particuliere opslag" beschrijft detectiegrenzen tussen 0,5 en 1%.

Bij verwerkers gebeurt nu al een test naar ontbreken van A1 op niveau van melkstroom. In de toekomst zou een analyse van melk op MPR niveau snel informatie kunnen geven over het type β -caseïne in de melk.

Het Zwitserse bedrijf SwissDeCode heeft een test ontwikkeld, de DNAFoil® A2 Cow Milk – B3 test, die snel onverwerkte melk kan testen op de aanwezigheid van de A1 β -caseïne variant. Via deze testkit kan DNA geëxtraheerd worden uit rauwe melk om vervolgens contaminatie van A2 melk met het A1 allel op te sporen. De test kan ter plekke uitgevoerd worden en duurt ongeveer 1 uur. Daarnaast heeft dit bedrijf ook een test ontwikkeld waarmee veehouders zelf hun koeien kunnen testen op basis van een haarstaal, de DNAFoil® A2 Cow kit.

Daniloski et al., 2022 ontwikkelde een methode om op basis van Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopie onderscheid te maken tussen melkstalen met β CA1 en β CA2 eiwitten, wat potentieel biedt om deze analyse op termijn te incorporeren in bijvoorbeeld de MPR analyse. Elferink et al., 2022 hebben een nieuwe methode ontwikkeld op basis van β -caseïne variant specifieke antilichamen die op een betrouwbare manier onderscheid kan maken tussen β CA2 en β CA1 eiwitten. Naast het aangeven van de β CA2/ β CA1-verhouding in koemelk, is de test ook in staat om vervalsing te detecteren van (duurdere) A2A2-melk van andere diersoorten (bv. geit, schaap, paard, ezel en buffel) met gewone koemelk en werkt zowel op rauwe als gepasteuriseerde melk. De methode is sneller dan de momenteel gebruikte ELISA of DNA gebaseerde testen en vereist geen complexe staalvoorbereidingen waardoor ze potentieel heeft om verder commercieel doorontwikkeld te worden als snelle screeningsmethode voor tankmelk, bijvoorbeeld via een snelle teststrip.

Een overzicht van de commercieel beschikbare testen op fenotypisch en genotypisch niveau wordt gegeven in Tabel 3.

Tabel 3: *Overzicht van de commercieel beschikbare testen naar A1/A2 op fenotypisch en genotypisch niveau*

Aanbieder	Niveau	Matrix	Allel coverage	Analysetijd	Prijs excl. BTW [§]	Link
CRV	Genotype	Oorweefsel, haar	Alle varianten	>1 maand	27,95€*	https://crv4all.be/be/fokken-opmaat_merkertest
CRV	Genotype	Neusswab	A2	<1 week	Op aanvraag	https://crv4all.co.nz/nz/service/stand-alone-a2-testing
VHL Genetics	Genotype	Oorweefsel, haar, bloed, sperma	A1	<2 weken	26,64€	https://www.vhlgenetics.com/nl-nl/DNA-testen/Catalogus/Details/Rund/R534-Beta-Caseine-Eenvoudig-A1-Free
VHL Genetics	Genotype	Oorweefsel, haar, bloed, sperma	Alle varianten	<2 weken	58,62€	https://www.vhlgenetics.com/nl-nl/DNA-testen/Catalogus/Details/Rund/R535-Beta-Caseine-Uitgebreid-A2-A2-Genotyping
Zoetis	Genotype	Oorweefsel	Alle varianten	>1 week	Op aanvraag	https://www2.zoetis.be/nl/clarifideplus
Zoetis	Genotype	Oorweefsel, haar, bloed	A1 en A2	<1 week	13,5€	https://www2.zoetis.be
SwissDeCode	Genotype	Oorweefsel, haar, bloed	A1	<1 week	Op aanvraag	https://swissdecode.com
SwissDeCode	Genotype	Melk	A1	1 uur	Op aanvraag	https://swissdecode.com
Biosensis	Fenotype	Melk	A1	1 dag	Op aanvraag	https://www.biosensis.com/a2-beta-casein-a2-bovine-elisa-assay.html

[§]Prijs per staal, exclusief BTW en transportkosten, prijsaanvraag juni 2022. *Prijs voor de merkertest per staal, exclusief abonnementskost.

Referenties

- Bonsing et al., 1988. Complete nucleotide sequence of the bovine beta-casein gene. *Aust J Biol Sci.* 41(4): 527-537.
- Brantl et al., 1979. Novel opioid peptides derived from casein (b-casomorphins). Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 360: 1211–1216.
- Caroli et al., 2009. Milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. *J Dairy Sci* 92: 5335–5352.
- Chessa et al., 2007. Development of a single nucleotide polymorphism genotyping microarray platform for the identification of bovine milk protein genetic polymorphisms. *J Dairy Sci* 90: 451-464.
- Comin et al., 2008. Effects of Composite β - and κ -Casein Genotypes on Milk Coagulation, Quality, and Yield Traits in Italian Holstein Cows. *Journal of Dairy Science* 91(10): 4022-4027.
- CRV: Stierenaanbod A2A2: <https://www.crv4all.be/download/a2a2-stieren/>
- CRV: Merkertest: <https://www.crv4all.be/service/merkertest/>
- de Oliveira et al., 2021. Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) only have A2A2 genotype for beta-casein. *Trop Anim Health Prod* 53: 145.
- Daniloski et al., 2022. Authentication of β -casein milk phenotypes using FTIT spectroscopy. *International Dairy Journal* 129:105350.
- Eigel WN et al., 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *J Dairy Sci* 67: 1599–1631.
- Elferink et al., 2022. Development of a Microsphere-Based Immunoassay Authenticating A2 Milk and Species Purity in the Milk Production Chain. *Molecules* 27: 3199.
- Elliott et al., 1999. Type I (insulindependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia* 42: 292–296.
- Erhardt and Eggen, 1990. Untersuchungsmöglichkeiten der Milchproteine mittels Protein- und DNS-Analyse und deren Bedeutung bei züchterischen Fragestellungen. *Landwirtschaft Schweiz* 3: 181–186.
- Europese commissie verordening 2018/150 van 30 Januari 2018 'Amending Implementing Regulation (EU) 2016/1240 as Regards Methods for the Analysis and Quality Evaluation of Milk and Milk Products Eligible for Public Intervention and Aid for Private Storage (OJ 2018, p. 26)'. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32018R0150> (geraadpleegd op 29 Maart 2022).
- Farrell et al., 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *J Dairy Sci* 87: 1641–1674.
- Groves, 1969. Some minor components of casein and other phosphoproteins in milk. A review. *J Dairy Sci* 52: 1155–1165.
- Kaminski et al., 2007. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J Appl Genet* 48(3): 189–198
- Khatkar et al., 2004. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genet Sel Evol* 36(2): 163-190.
- Kostyra et al., 2004. Opioid peptides derived from milk proteins. *Pol J Food Nutr Sci* 2004, 13(Suppl 1):25-35.
- Kuellenberg de Gaudry et al., 2021. A1- and A2 beta-casein on health-related outcomes: a scoping review of animal studies. *Eur J Nutr.*

- Malarmathi et al., 2014. Analysis of β -casein gene for A1 and A2 genotype using allele specific PCR in Kangeyam and Holstein-Friesian crossbred cattle in Tamil Nadu. *Indian J Anim Sci* 43: 310-315.
- Martien et al., 1994. Regulation of expression of milk protein genes: a review. *Livest Prod Sci* 38: 61–78.
- Miller et al., 1990. Casein: a milk protein with diverse biologic consequences. *Proc Soc Exp Biol Med* 195(2): 143-159.
- Niki et al., 1994. Physical properties and microstructure of rennet gels from casein micelles of different sizes. *Milchwissenschaft* 49: 325–329.
- Nilsen et al., 2009. Casein haplotypes and their association with milk production traits in Norwegian Red cattle. *Genet Sel Evol*, 41(1): 24.
- Ostersen et al., 1997. Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. *J Dairy Res* 64: 207–219.
- Pal S et al., 2015. Milk intolerance, beta-casein and lactose. *Nutrients* 7(9): 7285-7297.
- Rashidinejad et al., 2017. Chapter 14 - Nutrients in Cheese and Their Effect on Health and Disease. In: *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease*, Academic Press: 177-192.
- Rijnkels, 2002. Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7: 327–345.
- Ristanic et al., 2020. Beta-Casein Gene Polymorphism in Serbian Holstein-Friesian Cows and Its Relationship with Milk Production Traits. *Acta Veterinaria* 70(4).
- Roginski, 2003. *Encyclopedia of dairy sciences*. Academic Press, London.
- Sanchez et al., 2020. Frequencies of milk protein variants and haplotypes estimated from genotypes of more than 1 million bulls and cows of 12 French cattle breeds. *J Dairy Sci* 103(10): 9124-9141.
- Schopen et al., 2009. Genetic parameters for major milk proteins in Dutch Holstein-Friesians. *J Dairy Sci* 92(3): 1182-1191.
- VHLGenetics: R534 Beta caseine eenvoudig: <https://www.vhlgenetics.com/nl-nl/DNA-testen/Catalogus/Details/Rund/R534-Beta-Caseine-Eenvoudig-A1-Free>
- VHLGenetics: R535 Beta Caseine uitgebreid: <https://www.vhlgenetics.com/nl-nl/DNA-testen/Catalogus/Details/Rund/R535-Beta-Caseine-Uitgebreid-A2-A2-Genotyping>
- Woodford, 2007. A2 milk, farmer decisions , and risk management. *IFMA 16 – Theme 3/*
- Zoetis Genetics, Clarifide: Identifying milk proteins in one step with Clarifide: <https://doczz.net/doc/8259993/identifying-milk-proteins-in-one-step-with-clarifide>