



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 38 433 A1** 2004.03.04

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **102 38 433.9**
(22) Anmeldetag: **16.08.2002**
(43) Offenlegungstag: **04.03.2004**

(51) Int Cl.7: **C12Q 1/68**

(71) Anmelder:
Justus-Liebig-Universität Gießen, 35390 Gießen, DE

(72) Erfinder:
Prinzenberg, Eva-Maria, Dr., 35396 Gießen, DE;
Erhardt, Georg, Prof., 35415 Pohlheim, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

US 56 33 076 A
US 48 73 316 A
US 63 95 958 B1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Bestimmung des allelischen Zustandes des 5'-Ende des alpha-S1-Kaseingenes**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen genetischen Marker am 5'-Ende des α S1-Kaseingens (CSN1S1) und des Kaseingen-Komplexes und ein Verfahren zur alters- und laktationsunabhängigen Typisierung von Rindern durch Bestimmung des allelischen Zustands in diesem Bereich sowie die Verwendung dieses Verfahrens zur Auswahl von Organismen mit einem bevorzugten Allel, beispielsweise in der markergestützten Selektion.

```
1      gaatgaatgaactagtta_cgacaactag tacacccaaa atgaacaaaa
49  aatagcttgg tggataaatt aaaatgccac caaaatttat acaataatta tattttcttt
109 ttgcaggaaa aagattagac cacatataat gtaacttatt tcacaaggta aataattata
169 ataaataata tggattaact gagttttaaa aggtgaaata aataatgaat tcttctcatg
229 gtctgtatg ttaataaaaa ttgaaaaatt ttgaagacco cattttgtcc caagaatttc
289 atttacaggt attgaatttt tcaaaggta caaaggaaat ttattgata taataaatgc
349 atgttctcat aataaccata aatctagggt ttgttgggg ttttttttg ttgttaatt
409 tagaacaatg ccattccatt tctgtataa tgagtcaact cttgttgta aactctcctt
469 agaatttctt gggagaggaa ctgaacagaa cattgatttc ctatgtgaga gaattcttag
529 aatttaataa aaactgttgg ttaaaactgaa accacaaat tagcatttta ctactcagta
589 ggtttaataa gcttgaagc aaaagtctgc catcaccttg atcatcaacgagcttctg
649 cctctccca gtcttgggtt caaggtatta tgtatacata taacaaaatt tctatgattt
709 tctctgtct catctttcat tcttactaa tacgcagttg taacttttct atgtgattgc
769 aagtattggt actttcctat gatatactgt tagcttaaaa atataattgc aaatgttgat
829 actatctatc tcagagctat aggtgaaaa ttaataactt ttataagac caaattgac
889 atttttaaac gaaattotta tatactgaaa atgtagatac ataacttcag tatagattta
949 tggtaaaata atttgaatca ttttgtcaa attctgtaaa aagttgtcat acagaataat
1009 ttataatatt ttgttttca tagaataaac atttctggtgaagattttcaagg 1061
```

▼markiert den Beginn des Exon 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft einen genetischen Marker am 5'-Ende des α SI-Kaseingens (CSN1S1) und des Kaseingen-Komplexes und ein Verfahren zur alters- und laktationsunabhängigen Typisierung von Rindern durch Bestimmung des allelischen Zustands in diesem Bereich, sowie die Verwendung dieses Verfahrens zur Auswahl von Organismen mit einem bevorzugten Allel, beispielsweise in der markergestützten Selektion.

Stand der Technik

[0002] Das Vererbungspotential (im Hinblick auf den Milchproteingehalt und andere züchterisch relevante Merkmale) von Zuchttieren wird derzeit mittels der Zuchtwertschätzung anhand von Testpaarungen und Leistungserfassung der Nachkommen abgeschätzt. Der Nachteil dieses konventionellen Verfahrens ist offensichtlich, beim Rind vergehen zwischen der ersten Besamung mit einem Testbullen und dem Einsetzen der Laktation der ersten Töchter ca. 3 Jahre, bis zur Erfassung einer kompletten Laktation der Tochter also ca. 4 Jahre. Erst danach kann der Zuchtwert abgeschätzt werden. Bis dahin entstehen durch die Haltung der Bullen bis zum Vorliegen der ersten geschätzter Zuchtwerte und den Testpaarungen Kosten, die über diesen langen Zeitraum und in der Summe der Tiere erheblich sind. Für die Erfassung der Eigenleistung und Ermittlung eines Zuchtwertes bei Kühen gilt dies analog.

[0003] Daher werden seit einigen Jahren international Anstrengungen unternommen, mit Hilfe der Fortschritte in der Genomanalyse genetische Marker und direkte Gentests für züchterisch relevante Leistungsparameter zu entwickeln. Genomweite Markeranalysen haben dabei mit Hilfe der Kopplungsanalyse die Eingrenzung von Chromosomenbereichen, in denen leistungsbestimmende Genorte liegen – sogenannte QTL-Regionen (QTL = Quantitative Trait Loci) – ermöglicht. Derartige QTL-Studien und daraus resultierende Tests sind unter anderem in der WO 2000 36143 und der WO 2001 57250 A2/A3 beschrieben. Weitere Details der QTL-Analyse beim Nutztier und ein Verfahren, mit dem basierend auf QTL-Studien auch ursächliche Kandidatengene isoliert werden können beschreibt die DE 100 17 675 A1, deren Offenbarungsgehalt hier mit einbezogen wird.

[0004] Beim Rind und anderen zur Milchproduktion gezüchteten Spezies stellen die Milchmenge, Proteingehalte und Fettgehalte die entscheidenden Kriterien dar. Für diese Merkmale sind verschiedene QTL, unter anderem auf dem Chromosom BTA 6 identifiziert worden. Die potentiellen QTL-Regionen für Proteingehalte werden von verschiedenen Arbeitsgruppen relativ einheitlich mit dem Bereich um oder zwischen den Mikrosatellitenmarkern BM143 und TGLA37 und damit rund 20–30 Centimorgan (cM) vom Kaseinlocus entfernt angegeben (Spelman et al. 1996, Genetics 144, 1799–1808; Georges et al. 1995, Genetics 139, 907–920; Kühn et al. 1996, J Anim Breed Genet 133, 355–362; Zhang et al. 1998, Genetics 149, 1959–1973). Nach Nadesalingam et al. (2001, Mammalian Genome 12, 27–31) sind allerdings die Kaseingene aufgrund ihrer Position (40cM entfernt vom QTL) als Kandidat für die beobachteten QTL-Effekte ebenfalls ausgeschlossen.

[0005] Bereits seit Mitte der 80er Jahre wurden auch die genetisch bedingten Milchproteinvarianten des Rindes im Hinblick auf einen Einfluss auf Milchmengen- und Milchqualitätsmerkmale untersucht. Dies erfolgte teils mittels Erfassung der phänotypisch (in der Milch) unterscheidbaren Proteinvarianten (Ng-Kwai-Hang et al., 1984, J Dairy Sci 67, 835–840 und Ng-Kwai-Hang et al., 1986, J Dairy Sci 69, 22–26), später auch mittels molekulargenetischer Verfahren, die die den Proteinvarianten zugrundeliegenden genetischen Mutationen nachwiesen (Sabour et al., 1996, J Dairy Sci 79, 1050–1056). Die bisherigen Untersuchungen zeigen dabei teilweise widersprüchliche Effekte der untersuchten Varianten, die sich zwischen Rassen und regionalen Herkünften nicht immer bestätigen lassen (zusammengefasst bei Prinzenberg, 1998, ISBN 3-922306-68-3, Kap 2.4, S. 14–21). Die Mehrzahl dieser Untersuchungen konzentriert sich auf die Varianten des β -Laktoglobulins, des β und κ -Kaseins, da im α 1-Kasein nur zwei Proteinvarianten in nennenswerter Häufigkeit vorkommen und insbesondere in den bereits stark selektierten Milchrassen wie Holstein Friesian / Deutsche Holstein nahezu ausschliesslich die Proteinvariante α 1-Kasein β zu finden ist (Ng-Kwai-Hang et al., 1990, J Dairy Sci 73, 3414–3420; Erhardt et al., 1993, J Animal Breed Genet 36, 145–152; Lien et al., 1999, Animal Genetics 30, 85–91). In einer neueren Untersuchung an Milchrindern mit unterschiedlichem Holstein Blutanteil (Freyer et al., 1999, J Animal Breed Genet 116, 87–97) wurde α 1-Kasein in den Kopplungsanalysen ebenfalls nicht verwendet, da keine ausreichende Variabilität vorhanden war.

[0006] Zur molekulargenetischen Differenzierung der α 1-Kaseinvarianten B und C sind verschiedene Tests beschrieben (David & Deutch 1992, Animal Genetics 23, 425–429; Schlee & Rottmann 1992, J Anim Breed Genet 109, 316–319). Für die seltenen Allele A, D und F existieren ebenfalls einzelne Gentestverfahren (Prinzenberg 1998, ISBN 3-922306-68-3; Kap 4.1, S 61–71), wie auch für den Nachweis einer quantitativen Variante α 1-Kasein G (Mariani et al 1995, L'industria del Latte 31, 3–13). Schild & Geldermann (1996) zeigten mittels Sequenzierung von rund 1000 Basenpaaren (bp) aus dem 5'-Bereich des α 1-Kaseingens bei verschiedenen Rinderrassen 17 variable Positionen im 5'-flankierenden Bereich des CSN1S1 Gens, von denen 5 aufgrund variabler Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen mit Restrikfragmentlängenpolymorphismen (PCR-RFLP) nachweisbar waren. Nach Ehrmann et al. (1997, J Animal Breed Genet 114, 121–132) sind

die 5'-flankierenden Varianten jeweils mit bestimmten Proteinallelen gekoppelt, so dass von den vorhandenen Proteinvarianten auch auf bestimmte Varianten im 5'-flankierenden Bereich geschlossen werden kann. Einen Gentest zur Unterscheidung von α s1-Kasein B und C bei Deutschen Schwarzbunten, Fleckvieh und Jersey-Kühen, welcher auf einem Fragment aus dem 5'-flankierenden Bereich des α s1-Kaseingens basiert, beschrieben auch Koczan et al. (1993, *Animal Genetics* 24, 74). Für den letztgenannten Test wurde die strikte Kopplung mit den Proteinvarianten α s1-Kasein B und C und damit die Gültigkeit für die Rassen Aberdeen Angus, Anatolisches Schwarzhvieh, Angler, Asturian Valley, Ayrshire, British Frisian, Casta Navarra, Charolais, Chianina, Fighting Bull, Hereford, Jersey, Maremmana, Pezzata Rossa, Piemonteser, Scottish Highland, Türkisches Graues Steppenrind inzwischen jedoch widerlegt (Dann et al., 2001; *Arch. Tierz.*, Dummerstorf 45, 13–21).

[0007] Die Kaseingene sind als eng gekoppelter Genlocus beim Rind und beim Schaf auf Chromosom 6, beim Menschen auf Chromosom 4 und bei der Maus auf Chromosom 5 kartiert. Auch für andere Tierarten (Kaninchen, Schwein, Ziege) ist die Kopplung der Kaseingene nachgewiesen. Aufgrund dieser engen Kopplung, ist die derzeitige Angabe der Lokalisation des α s1-Kaseingens in genetischen Karten beim Rind an die Lokalisation des κ -Kaseingens gebunden. Für beide Gene wird in der aktuellen Genkarte des Rindes die physische Position BTA6q31–33 und die genetische Position 82,6 cM (MARC97) bzw. 103,0 cM (IBRP97) angegeben. Die Rekombinationsrate zwischen α s1-Kasein- und κ -Kaseingen wird damit als Null angenommen.

[0008] Die Nutzung einer Lactalbuminsequenz für die Auswahl von Zuchttieren ist in der EP0555435 offenbart. Für das bovine κ -Kasein existieren ebenfalls zahlreiche Gentests (Denicourt et al., 1990, *Animal Genetics* 21, 215–216; Medrano & Aguilar-Cordova, 1990, *Biotechnology* 8, 144–145; Pinder et al., 1991, *Animal Genetics* 22, 11–20; Schlee & Rottmann, 1992, *J Animal Breed. Genet.* 109, 153–155; Zadworny & Kuhnlein, 1990, *Theor. Appl. Genet.* 80, 631–634), da diesem Protein Einflüsse auf die Verarbeitungseigenschaften und die Käseereignung der Milch zugeschrieben werden (siehe Lodes et al., 1996, *Milchwissenschaft* 51, 368–373 und 543–548).

[0009] Aufgrund der milchdrüsenspezifischen Expression werden die Promotoren der bovinen Milchproteingene und auch des α s1-Kaseingens auch bei der Erstellung von transgenen Tieren und zur Expression in Zellkulturen genutzt. Die DE 38 54 555 T2, deren Offenbarungsgehalt hier mit einbezogen wird, beschreibt die Verwendung des α s1-Kaseinpromotors und des Signalpeptids zur Produktion von rekombinanten Proteinen in der Milch von Säugetieren. Einen Überblick über die Nutzung von Transgenen Tieren zur Produktion von rekombinanten Proteinen und die dazu verwendeten Promotoren gibt auch Rudolph (1999, *Trends in Biotechnology* (TIBTECH) 17, 367–374).

[0010] Einen direkten Gentest für ein Gen aus dem Fettsäurestoffwechsel (DGAT1) beschreiben Winter et al. (2002, *PNAS* 99, 930–9305) und schreiben diesem Gen einen Effekt auf den Milchfettgehalt zu.

[0011] Der Nachteil aller Verfahren, die basierend auf einer Milchprobe die genetischen Varianten phänotypisch (d.h. in Milchproben) differenzieren besteht darin, dass nur laktierende Kühe untersucht werden können. Daher besteht der Bedarf, laktationsunabhängig die Tiere untersuchen zu können. Weiterhin stellen die im codierenden Bereich der Milchproteingene nachgewiesenen Polymorphismen nach derzeitigem Stand der Technik keine zuverlässigen Marker für Milchleistungsmerkmale dar. Die bisherigen QTL-Analysen weisen auf einen ausserhalb der Milchproteingene liegenden QTL hin.

[0012] Für α s1-Kasein ist derzeit kein Marker mit ausreichender Variabilität vorhanden, so dass sich dieses Gen einer näheren Analyse von Effekten auf Milchleistungs- und Inhaltsstoffmerkmale weitgehend entzieht. Alle vorhandenen Testverfahren beruhen auf der molekulargenetischen Differenzierung der auch phänotypisch vorhandenen Variation.

[0013] Die Mikrosatellitenmarker, welche bei QTL-Analysen ermittelt wurden, eignen sich nur bedingt zum Einsatz in der markergestützten Selektion, da die jeweilige Marker-QTL-Kopplung zunächst geklärt werden muss. Es handelt sich bei diesen Mikrosatellitenmarkern jeweils um indirekte Tests, die je nach Dichte der Kopplung zum ursächlichen Genort eine reduzierte Aussagesicherheit haben.

[0014] Der Nachteil des Verfahrens der EP 0555435 besteht darin, dass α -Lactalbumin nur einen geringen (ca. 2–5%) Anteil des gesamten Milcheiweiss ausmacht. Den größten Anteil stellen die Kaseine (α s1-, α s2-, β - und κ -Kasein) mit rund 80% am Gesamteiweiss dar. Daher ist bei Anwendung dieses Selektionsmarkers nur ein geringer züchterischer Fortschritt zu erwarten.

[0015] Der Gentest für DGAT1 von Winter et al. hat den Nachteil, dass aus Sicht der Züchter und der Milcherzeuger der Fettgehalt der Milch nicht das primäre Interesse genießt, sondern hinter dem Proteingehalt zweitrangig ist.

[0016] Der Nachteil des Verfahrens der DE 38 54 555 T2 besteht darin, dass der verwendete Anteil des α s1-Kaseinpromotors nicht näher anhand einer Nukleotidsequenz charakterisiert ist. Es wird ein 9kb Fragment mit den Exons I und II, welches durch die Schnittstellen für KpnI und BamHI flankiert wird, verwendet. Es erfolgt keine Berücksichtigung der genauen Basenfolge oder von möglichen Variationen, die die Effektivität der Expression mit diesem Abschnitt des Promotors beeinflussen können.

[0017] Derzeit gibt es keinen zuverlässigen Marker für Milchproteingehalt und keinen direkten genetischen

Test für einen funktionalen Genabschnitt, um Tiere alters- und laktationsunabhängig auf ihr genetisches Potential hin zu testen.

Aufgabe der Erfindung

[0018] Aufgabe der Erfindung ist es daher einen genetischen Marker und ein Verfahren zur Typisierung auf Milchleistungsmerkmale bereitzustellen, um Tiere alters- und laktationsunabhängig auf Milchleistungsmerkmale anhand ihres genetischen Materials zu untersuchen.

[0019] Die Lösung der Aufgabe erfolgt durch Bereitstellung eines auch in selektierten Milchrassen polymorphen genetischen Markers in der α S1-Kaseingenregion und eines Verfahrens, dass eine alters- und laktationsunabhängige Typisierung der Tiere, die genetische Kartierung des α S1-Kaseingens, die Untersuchung von eng an diesen Genort gekoppelten oder direkt dadurch hervorgerufenen Effekten und eine züchterische Nutzung ermöglicht.

[0020] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um einen genetischen Test für einen funktionalen Genabschnitt, die Aussagesicherheit ist größer als bei gekoppelten Markern und das Test-Ergebnis liegt innerhalb weniger Tage bis hin zu Stunden vor, wodurch die erheblichen Kosten der Testpaarungen reduziert werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren beseitigt somit die beschriebenen Nachteile im Stand der Technik.

[0021] Mit dem erfindungsgemäßen Marker ist auch die Auswahl von besonders vorteilhaften Promotoren zur Erzeugung von Expressionsvektoren und transgenen Tieren möglich.

[0022] In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform besteht die Erfindung aus einem Testkit, der die Oligonukleotide zur Anreicherung eines Teilbereiches der Markersequenz des α S1-Kaseingens, vorzugsweise die Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3'), Primer 2 CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3') und Primer 3 CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3') sowie Referenzproben für eine oder mehrere Sequenzen der Markersequenz des α S1-Kaseingens und dessen Allele enthält.

[0023] Folgende Abbildungen sind der Beschreibung beigelegt:

[0024] **Abb. 1** DNA-Sequenz aus dem 5'-flankierenden Bereich des α S1-Kaseingens, im folgenden als Markersequenz bezeichnet.

[0025] **Abb. 2** Alignment der Nucleisäuresequenzen der allelischen Zustände des α S1-Kaseingens Allel 1, Allel 2, Allel 3, Allel 4 (Unterschiede in potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sind hervorgehoben)

[0026] **Abb. 3** Schematische Darstellung der Wanderungsmuster der Allele 1 bis 4 des Markers CSN1S1 in der SSCP-Analyse

[0027] **Abb. 4** Ergebnis der Varianzanalyse

[0028] Überraschender Weise wurde gefunden, dass der untersuchte Sequenzabschnitt, welcher durch die Oligonukleotide CSN1S1pro1f und CSN1S1pro1r bzw. CSN1S1pro2r begrenzt wird (grauer Kasten in **Abb. 1**) innerhalb der Rasse Deutsch Holstein vier mittels einer Einzelstrang-Konformationspolymorphismen-Analyse detektierbare Allele aufweist und damit ausreichend polymorph ist, um eine genetische Kartierung und Analysen zum Effekt der Allele auf Milchleistungsparameter durchzuführen.

[0029] Es handelt sich dabei um einen 1061 bp großen Abschnitt aus dem 5'-flankierenden Bereich und des Exon 1 (siehe **Abb. 1**), im besonderen um den 654 bp großen Abschnitt, der durch die beiden Oligonukleotide CSN1S1pro1f und CSN1S1pro1r begrenzt wird.

[0030] Die vier Allele wurden kloniert und sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigt bis auf die Länge des poly-T (ab Position 390 der **Abb. 1**) Übereinstimmung von Allel 2 mit der von Koczan et al. (1991, Nucleic Acids Research 19, 5591–56596; Genbank Acc. No. X59856) publizierten Sequenz. Die Allele 1, 3 und 4 unterscheiden sich durch verschiedene Substitutionen und Deletionen von dieser Sequenz. Die variablen Positionen sind im Sequenzalignment (**Abb. 2**) hervorgehoben. In den Allelen 1 und 4 sind jeweils potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen durch Mutationen betroffen. Im Allel 1 fallen demnach zwei potentielle Bindungsstellen (für AP-1 und YY1) weg, wohingegen im Allel 4 eine potentielle ABF1-Bindungsstelle neu entsteht.

[0031] Der gefundene Polymorphismus ist damit in einer vermutlich funktionalen Genregion lokalisiert und somit ein geeigneter Marker für Milchleistungsmerkmale, insbesondere für den Proteingehalt.

[0032] Der Sequenzabschnitt wird mit folgenden erfindungsgemäßen Oligonukleotidsequenzen flankiert, die als Primer für die Amplifikation mittels PCR verwendet werden, wobei die Kombinationen Primer 1 mit Primer 2 und Primer 1 mit Primer 3 möglich sind:

Primer 1: CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')

Primer 2: CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3')

Primer 3: CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3')

[0033] Die Primerbindungsstellen sind in der **Abb. 1** grau unterlegt.

[0034] Es wird ein erfindungsgemäßes Verfahren bereitgestellt, das direkt am Erbmaterial des zu untersuchenden Organismus durchgeführt werden kann. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Markers wird eine ge-

sche Kartierung des α s1-Kaseingens innerhalb der Kopplungskarte ermöglicht und die Ermittlung des allelischen Zustands bei einzelnen Organismen, z.B. Rindern, vorgenommen, die innerhalb weniger Stunden das genetische Potential im Hinblick auf Milchproteingehalt ermittelt.

[0035] Das Verfahren zur Ermittlung des genetischen Potentials im Hinblick auf Milchproteingehalt durch Ermittlung des allelischen Zustands des erfindungsgemäßen Markers besteht im Einzelnen aus:

1. Bereitstellung des genetischen Materials des zu untersuchenden Organismus, eines männlichen oder weiblichen Zuchtrindes oder eines Embryos.

Der Organismus ist dabei definitionsgemäß ein Tier, insbesondere ein Säugetier, im besonderen ein Rind, ein Schaf oder eine Ziege einschließlich Embryonen dieser Spezies.

Der Organismus ist auch ein gentechnisch veränderter Organismus (GVO), welcher den beschriebenen Sequenzabschnitt aus dem α s1-Kaseingen und des 5'-flankierenden Bereich (**Abb. 1**) oder Teile dessen enthält. Das genetische Material ist definitionsgemäß genomische DNS oder RNS von Tieren, aber auch Plasmid-DNS aus Bakterien, von artifiziellen Chromosomen wie BACs und YACs oder für spezielle Anwendungen erstellte Konstrukte aus genetischem Material verschiedener Organismen, z.B. zur Herstellung von Transgenen.

Das Ausgangsmaterial zur Gewinnung von DNS- oder RNS-haltigem Material ist z.B. Blut, Leukozyten, Gewebe einschließlich Biopsiematerial, Milch, Sperma, Haare, einzelne Zellen einschließlich Zellmaterial aus Embryonen, eine Bakterienkultur oder auch isolierte Chromosomen. Weiterhin ist auch bereits zuvor amplifiziertes genetisches Material, welches die Markersequenz (**Abb. 1**) oder Teile daraus enthält, erneut Ausgangsmaterial.

2. Gezielte Isolierung oder Anreicherung des Sequenzabschnitts der **Abb. 1** oder einer Sequenz, die Teilbereiche davon enthält, vorzugsweise den dargestellten Sequenzabschnitt Position 1 bis 654 der **Abb. 1**.

Die Isolierung des genetischen Materials erfolgt nach Standardmethoden, wie sie z.B. im Handbuch „Molecular Cloning“ (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989; Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York) beschrieben sind oder kann mittels kommerziell erhältlicher Kits (z.B. Nucleospin, Machery Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt werden.

Die Anreicherung erfolgt vorzugsweise mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR, Mullis & Falloona, 1987, Methods in Enzymology 155, 335–350), wobei auch fluoreszenzmarkierte, radioaktiv markierte oder chemisch markierte Primer eingesetzt werden können. Bei Verwendung von RNS als genetisches Material wird zweckmäßigerweise eine vorherige reverse Transkription (Myers & Gelfand 1991, Biochemistry 30, 7661–7666) durchgeführt.

Der Sequenzabschnitt wird vorzugsweise mit folgenden erfindungsgemäßen Oligonukleotidsequenzen als Primer für die Amplifikation angereichert, wobei die Kombinationen Primer 1 mit Primer 2 und Primer 1 mit Primer 3 möglich sind:

Primer 1: CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')

Primer 2: CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3')

Primer 3: CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3')

Die Auswahl weiterer Primer, die die Amplifikation einer Teilsequenz der in **Abb. 1** beschriebenen Sequenz ermöglicht, innerhalb derer variable Nukleotidpositionen zur Unterscheidung der Allele 1 bis 4 liegen, ist ausdrücklich möglich.

3. Nachweis des allelischen Zustands im isolierten oder angereicherten Sequenzbereich der **Abb. 1**, vorzugsweise innerhalb der Teilsequenz, die durch CSN1S1pro1f und CSN1S1pro1r begrenzt wird.

Zur Bestimmung des allelischen Zustands stehen eine Reihe von Standard-Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, zur Verfügung, die Sequenzierung nach Sanger et al. 1977, durch Darstellung von Einzelstrang Konformationspolymorphismen (SSCP, Orita et al. 1989, Genomics 5, 874–879), mittels Restriktionsfragment Längenpolymorphismen (RFLP; Botstein et al. 1980, American Journal of Human Genetics 32, 314–331) und PCR-RFLP (Damiani et al. 1990, Animal Genetics 21, 107–114; Medrano & Aguilar-Cordova 1990, Animal Biotechnology 1, 73–77), allelspezifischer PCR (= ARMS, ASPCR, PASA; Newton et al. 1989, Nucleic Acids Research 17, 2503–2516; Sakar et al. 1990, Analytical Biochemistry 186, 64–68; David & Deutch 1992, Animal Genetics 23, 425–429), Oligonukleotid-Ligations-Test (= OLA; Beck et al. 2002, J Clinical Mikrobiol 40, 1413–1419), Temperaturgradienten Gel Elektrophorese (= TGGE, Tee et al. 1992, Animal Genetics 23, 431–435) und analoge, zum Stand der Technik gehörende Verfahren.

Es wird vorgeschlagen, die erfindungsgemäßen Primer mit einer Markierung (Fluoreszenz, Radioaktivität und ähnliches) zu versehen und die Bestimmung des allelischen Zustands am Sequenzierautomaten, durch Autoradiografie oder Chemilumineszenz durchzuführen. Bei Verwendung nicht-markierter Primer erfolgt die Bestimmung des allelischen Zustands durch Darstellung der Fragmente nach Gelelektrophorese durch Färbung der Nukleinsäuren, z.B. mit Ethidiumbromid (Sambrook et al., 1989) oder im Silberfärbeverfahren (Bassam et al 1991, Analytical Biochemistry 196, 80–83).

Weiterhin ist es möglich, verschiedene Hochdurchsatzverfahren zum Mutationsnachweis, darunter die Verwendung von Oligonukleotid-Arrays (Dong et al 2001, Genome Research 11, 1418–1424), das TagMan-Verfahren (Ranade et al 2001, Genome research 11, 1262–1268), Fluoreszenz-Polarisationsverfahren (Chen et

al 1999, Genome Research 9, 492–498), Massenspektrometrische Verfahren (MALI-TOF; Sauer et al. 2002, Nucleic Acids Research 30, e22) einzusetzen. Diese Aufzählung ist beispielhaft und nicht limitierend zu verstehen.

Der allelische Zustand ist dabei als das Vorhandensein einer bestimmten Nukleotidsequenz innerhalb des angereicherten Bereiches zu verstehen. **Abb. 2** zeigt beispielhaft die Nukleinsäuresequenz von vier verschiedenen allelischen Zuständen des erfindungsgemäßen Markers (**Abb. 2**, Allele 1, 2, 3 und 4).

Im Falle der Sequenzierung muss ein Vergleich mit den korrespondierenden Nukleotidsequenzen in **Abb. 2** 1, 2, 3 und 4 erfolgen, um die zu Typ Allel 1 bis Allel 4 analogen Zuordnungen vorzunehmen. Basierend auf den angegebenen Nukleotidsequenzen ist es einer mit dem Stand der Technik vertrauten Person auch möglich, die Fragmentlängen bei einer PCR-RFLP Analyse zu bestimmen oder Oligonukleotide zum Nachweis über allelspezifische PCR zu konzipieren. Auch die Anpassung der weiteren zuvor genannten Techniken zum Mutationsnachweis ist dem Fachmann möglich.

Besonders vorteilhaft ist die Darstellung der allelischen Zustände mittels Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP), da der allelische Zustand direkt anhand des Fragmentmusters abzulesen ist. Das Verfahren ermöglicht zusätzlich zur Detektion der hier beschriebenen 4 Allele auch die Erkennung von weiteren, hier nicht beschriebenen Mutationen. Aus diesem Grund eignet es sich besonders gut auch zur Analyse des homologen Genombereiches bei anderen Tierarten als beim Rind. Um die Dauer der Gelelektrophorese zu reduzieren, ist die Verwendung eines kürzeren Fragmentes beispielsweise die in **Abb. 1** mit Pfeil markierte Sequenz, die durch die erfindungsgemäßen Oligonukleotide festgelegt wird, als der kompletten Sequenz empfehlenswert.

Abb. 4 zeigt eine schematische Darstellung der Allele 1 bis 4 des Markers CSN1S1 in der SSCP-Analyse im 12%igen Acrylamid:Bisacrylamid 49:1 Gel mit 1% Glycerolzusatz. Die Felder 1 bis 4 repräsentieren die vier verschiedenen Auftrennungsmuster der Allele. Die Wanderungsrichtung der Moleküle im elektrischen Feld von Kathode (–) zur Anode (+) ist mit einem Pfeil dargestellt. Die Einzelstränge der Allele zeigen ein typisches, deutlich voneinander verschiedenes Auftrennungsmuster. Da mittels Silberfärbung beide DNS-Einzelstränge dargestellt werden, ist jedes Allele durch zwei Banden charakterisiert.

4. Auswahl von Organismen, die den jeweils vorteilhaften allelischen Zustand des erfindungsgemäßen Markers tragen. Dies kann z.B. der allelische Zustand 1 oder 4 sein, welcher sich von Allel 2 durch die Anzahl der potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren unterscheidet.

Ausführungsbeispiele

1. Verfahren zur Typisierung auf Milchleistungsmerkmale durch Ermittlung des allelischen Zustands des erfindungsgemäßen Markers

[0036] Als Ausgangsmaterial wird Rinderblut verwendet. Die Isolierung des genetischen Materials (genomische DNS) erfolgt nach der Hochsalzmethode von Montgomery & Sise (1990, NZ J Agric Res 33, 437–441).

[0037] Für die Durchführung der Amplifizierung des Markers mittels PCR-Reaktion werden die erfindungsgemäßen Oligonukleotidsequenzen als Primer verwendet:

Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')

Primer 2 CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3')

Die Reaktionsansätze enthalten in 15 µl jeweils 20–100 ng zu testende genomische DNS, 10 pmol jedes Oligonukleotids CSN1S1pro1f und CSN1S1pro1r, 0,5 U Taq-DNA-Polymerase (Peglab Biotechnologie, Erlangen), 50 µM dNTPs in einem Standardpuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂). Das Temperaturprogramm (in einem Thermocycler Modell iCycler der Firma Biorad) wird wie folgt gewählt: 1 min. –93°C (1x), (40 sec –91°C, 40 sec. 57°C, 40 sec –70°C) (30x) und 3 min –70°C (1x). Danach erfolgte die Kühlung auf 4°C.

[0038] Jedem Reaktionsansatz werden anschliessend je 25 µl eines Formamid-Denaturierungspuffers zugegeben (95% Formamid, 0,025 (w/v) Bromphenolblau, 0,025 (w/v) Xylencyanol (FF), 20 mM EDTA), die Mischung für 2 min bei 93°C erhitzt, in Eiswasser abgekühlt und je 4 µl der Mischung auf ein 12%iges 49:1 Acrylamid-Bisacrylamidgel mit 1% Glycerolzusatz geladen. Die Auftrennung erfolgt über 20h bei 420V und 10 °C in einer Vertikalelektrophoresekammer Modell Penguion P9DS (OWL Scientific, Woburn, USA) mit einem 0,8 mm dünnen 16x16cm großen gel. Als Lauf- und Gelpuffer wurde 0,5x TBE verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Silbernitrat nach dem Protokoll von Bassam et al. (1990, Analytical Biochemistry 196, 80–83) gefärbt. Die Entwicklungsreaktion wurde durch Überführen der Gele in eiskalte 0,04M EDTA-Lösung gestoppt.

[0039] Das Wanderungsmuster der Allele 1 bis 4 zeigt schematisch **Abb. 3**. Da mittels Silberfärbung beide (codierender und nicht-codierender DNS-Strang) angefärbt werden, sind jeweils zwei Fragmente pro Allel vorhanden.

2. Darstellung der Variabilität der Markers CSN1S1 bei verschiedenen Rinderrassen

[0040] Aus DNS von 83 Rindern der Rassen Deutsche Schwarzbunte (6 Rinder), Deutsches Rotvieh (4 Rinder), Gelbvieh (7 Rinder), Deutsch Holstein (18 Rinder), Fleckvieh (9 Rinder), Jersey (13 Rinder), Pinzgauer (20 Rinder) und Simbrah (6 Rinder) wird mit den erfindungsgemäßen Oligonukleotiden CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3') und CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3') die in **Abb. 1** dargestellte Nukleinsäuresequenz Position 1 bis 655 mittels PCR amplifiziert. Das weitere Vorgehen erfolgt wie unter Beispiel 1 beschrieben.

[0041] In den untersuchten Rassen tauchen die typischen, wie in **Abb. 3** gezeigten Auftrennungsmuster auf.

3. Darstellung der Variabilität der Markers CSN1S1 innerhalb der Rasse Deutsch Holstein

[0042] Aus Blutproben von 503 Kühen der Rasse Deutsch Holstein wird DNA nach der Methode von Montgomery & Sise (1990, NZ J Agric Res 33, 437–441) isoliert. Die Anreicherung der in **Abb. 2** dargestellten Sequenz erfolgt mit den erfindungsgemäßen Primern, wie oben beschrieben, die Darstellung der vorhandenen Variationen erfolgt mittels SSCP-Technik. Bei den untersuchten Kühen dieser Rasse sind alle ebenfalls vier Allele nachweisbar. Folgende Allelfrequenzen wurden bestimmt:

Allel 1 – 0,031 Allel 2 – 0,739

Allel 3 – 0,194 Allel 4 – 0,036

[0043] Das Allel 2 stellt damit das häufigste Allel in Rasse Deutsch Holstein dar, gefolgt von Allel 3 und den zwei seltenen Allelen 1 und 4.

[0044] Die Genotypen traten in der Häufigkeit 22 > 23 > 24 > 12 > 33 > 34 auf. Die Genotypen 11 und 14 sowie die Kombination dieser zwei seltenen Allele (Genotyp 14) werden nicht gefunden.

4. Genetische Kartierung des Markers CSN1S1

[0045] Mittels des erfindungsgemäßen Verfahren mit dem Marker CSN1S1 werden acht Halbgeschwisterfamilien der Rassen Deutsch Holstein (7) und Fleckvieh (1) typisiert und mit den Ergebnissen von Thomsen et al. 2000 (J Anim Breed Genet 117, 289-306) verglichen, der diese Familien bereits für 10 weitere Marker auf BTA 6 (Mikrosatellitenmarker) typisiert und eine Kopplungskarte erstellt hat. Die Typisierungsdaten für CSN1S1 werden in diesen bestehenden Datensatz integriert. Die Kartierung unter Verwendung der Funktion BUILD des Programmpaketes CRI-MAP (Version 2.4; Green et al. 1990, Documentation of CRI-MAP, Washington School of Medicine, St. Louis, MO, USA) führt zu zwei möglichen Positionen des Markers CSN1S1: zwischen den Markern IL97 und FBN14 oder FBN14 und CSN3. Die weiterhin durchgeführte FLIPS-Analyse führt zur endgültigen Kartierung von CSN1S1 zwischen den Markern FBN14 und CSN3. Die Gesamtlänge der mit den 11 Markern berechneten Kopplungskarte von BTA6 beträgt 161.1 cM. Die Position aller in die Kopplungskarte einbezogenen Marker und die vergleichenden Angaben aus den vorhandenen Genkarten MARC97 und IBRP97 zeigt die folgenden Tabelle 1. Dargestellt sind die Marker zur Erstellung der Kopplungskarte von BTA6, die Anzahl der informativen Meiosen und mit CRI-MAP berechnete Positionen (cM) auf der genetischen Karte (die erfindungsgemäße Karte ist mit „ADR“ bezeichnet) im Vergleich zu den beiden veröffentlichten Genkarten MARC97 und IBRP97. Für die mit n.a. eingetragenen Marker ist keine Kartierung in den jeweiligen Genkarten angegeben.

Marker	Informative	Position (cM)		
		ADR	MARC97	IBRP97
ILSTS93	193	0.0	0.0	16.0
ILSTS90	156	28.5	11.8	0.0
BM1329	141	56.8	35.5	45.0
URB16	228	57.9	n.a.	40.0
DIK82	356	78.5	n.a.	67.0
ILSTS097	78	99.6	67.2	89.0
FBN14	187	104.1	n.a.	n.a.
CSN1S1	280	108.1	(wie CSN3)	(wie CSN3)
CSN3	102	113.5	82.6	103.0
BP7	208	123.6	91.2	n.a.
BMC4203	186	161.1	112.9	n.a.

Tabelle 1

5. Varianzanalyse zur Schätzung von Effekten auf Milchleistungsmerkmale

[0046] Mittels des erfindungsgemäßen Verfahren werden insgesamt 729 Bullen aus 9 Halbgeschwisterfamilien der Rassen Deutsch Holstein und Simmental mit dem Marker CSN1S1 typisiert. Die Verteilung der Genotypen in den 9 Halbgeschwisterfamilien zeigt Tabelle 2.

Familie	n	CSN1S1 Genotyp							
		12	13	14	22	23	24	33	34
1	19	–	–	–	9	10	–	–	–
2	108	48	5	5	37	9	4	–	–
3	106	4	–	3	40	10	37	–	12
4	27	12	3	2	–	10	–	–	–
5	12	–	1	–	5	5	–	1	–
6	27	–	–	–	9	16	1	1	–
7	55	1	–	1	22	4	23		4
8	56	4	2	–	26	17	3	1	3
9	319	10	–	–	250	50	9		–
total	729	79	11	11	398	131	77	3	19

Tabelle 2

[0047] Die Zuchtwerte der Bullen werden zentral durch die Vereinigten Informationssysteme Tierhaltung (VIT) in Verden geschätzt. Insgesamt gehen über 150.000 Töchter und deren Leistungsdaten in die Zuchtwertschätzung ein. Von allen Bullen werden deregressierte Zuchtwerte für die Milchmenge, Protein- und Fettmenge, Proteingehalt (in %) und Fettgehalt (in %) in der Varianzkomponentenschätzung verwendet. Die Deregression der Zuchtwerte erfolgt wie bei Thomsen et al. (2001, J Anim Breed Genet. 118, 357–370) beschrieben.

[0048] Die Varianzkomponentenschätzung wird mit dem Programmpaket SAS durchgeführt. Als einziger fixer Effekt wird zunächst der Marker CSN1S1 im Modell berücksichtigt, da andere Einflussfaktoren (z.B. Betrieb-

seffekte, Melkhäufigkeit) bereits im Rahmen der Zuchtwertschätzung und durch die Deregression (Einfluss der Väter) korrigiert werden. Die Analyse ergibt signifikante Effekte des Markers CSN1S1 auf alle untersuchten Merkmale (deregressierte Zuchtwerte für Proteingehalt (DRG_PP), Milchmenge (DRG_MY1), Fettmenge (DRG_FYI), Proteinmenge (DRG_PY1), Fettgehalt (DRG_FP)). Tabelle 3 zeigt den Effekt von CSN1S1 auf deregressierte Zuchtwerte für Milchleistungsmerkmale mit Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeiten (p) für die Effekte auf die Einzelmerkmale.

Merkmal	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
DRG_PP	< 0.0001
DRG_MY1	0.0011
DRG_FY1	0.0016
DRG_PY1	0.0056
DRG_FP	0.0052

Tabelle 3

[0049] Die höchste Signifikanz wird für den Effekt auf DRG PP berechnet. Da der untersuchte Marker CSN1S1 direkt im regulatorischen Bereich eines Milchproteingens liegt, könnte dies ein Hinweis auf einen direkten Effekt sein. Der Marker CSN1S1 erfüllt die Anforderungen an ein funktionelles Kandidatengen. Die höchsten Zuchtwerte für Milchmenge (DRG_MY1) erzielen im Mittel Bullen mit dem Genotyp 12, wohingegen die höchsten Zuchtwerte für Proteingehalte (DRG_PP) in der Gruppe mit Genotyp 24 gefunden werden. Eine Zusammenstellung der Least square Mittelwerte (LS_means) für die Gruppen mit den Genotypen 12, 22, 23, und 24 zeigt Tabelle 4. Dargestellt sind die LS means sowie Standardfehler für die deregressierten Zuchtwerte für Milchmenge (DRG_MY1) und Proteingehalt (DRG_PP) in Gruppen mit verschiedenen CSN1S1 Genotypen.

CSN1S1 type		LSMEAN $\pm$ se	
	n	DRG_MY1	DRG_PP
12	79	198.232 $\pm$ 15.700	- 0.00022534 $\pm$ 0.00006470
22	398	155.341 $\pm$ 6.995	- 0.00037495 $\pm$ 0.00002921
23	131	138.806 $\pm$ 12.192	- 0.00038405 $\pm$ 0.00005271
24	76	112.364 $\pm$ 16.007	0.00008175 $\pm$ 0.00006650
alle	684	152.353	-0.000307

Tabelle 4

[0050] Zur genaueren Abklärung wird die Varianzanalyse innerhalb einzelner Familien und Gruppen von Familien mit denselben Genotypen erneut durchgeführt. Dabei zeigt sich, dass der Effekt auf die Milchmenge nicht in allen Familien bestätigt werden kann. In Familie 9, in welcher vom Vater ausschliesslich das Allel 2 vererbt wird, ist der einzige verbleibende Effekt in der Nähe der 5% Signifikanzschwelle für DRG_PP zu finden ($p = 0.0610$). Weiterhin wird für alle Genotypgruppen und einzelne Familien ein Vergleich der LS-means für die Merkmale DRG_MY1, DRG_PP, DRG_FP durchgeführt und die Differenz der LS-means für die Genotypen 12, 23 und 24 zum häufigsten Genotyp 22 auf Signifikanz geprüft. Die Ergebnisse sind grafisch dargestellt in **Abb. 5**.

Organization Applicant

 Street : Kerkraderstr. 3
 City : Giessen
 State : Hessen
 Country : Deutschland
 PostalCode : 35394
 PhoneNumber : 0641-94364-12
 FaxNumber : 0641-94364-99
 EmailAddress : patente@transmit.de
 <110> OrganizationName : TransMIT Gesellschaft für Technologietransfer mbH

Application Project

 <120> Title : Verfahren zur Bestimmung des allelischen Zustandes am 5'-Ende des
 alphaS1-Kaseingens
 <130> AppFileReference : An127/Pri
 <140> CurrentAppNumber : DE 102 38 433.9
 <141> CurrentFilingDate : 2002-08-16

Sequence

 <213> OrganismName : Bos spec.
 <400> PreSequenceString :
 gaatgaatga actagttacc 20
 <212> Type : DNA
 <211> Length : 20
 SequenceName : Primer 1
 SequenceDescription :

Feature

 Sequence: Primer 1:
 <221> FeatureKey : Primer1
 <222> LocationFrom : 1
 <222> LocationTo : 20
 Other Information : Länge: 20 Basenpaare

Art: Nukleinsäure

Strangform: einzel

Topologie: linear
 CDSJoin : No

Custom Codon

 Sequence Name : Primer 1

Sequence

 <213> OrganismName : Bos spec.
 <400> PreSequenceString :
 gaagaagcag caagctgg 18
 <212> Type : DNA
 <211> Length : 18
 SequenceName : Primer 2
 SequenceDescription :

Feature

 Sequence: Primer 2:
 <221> FeatureKey : Primer 2
 <222> LocationFrom : 1
 <222> LocationTo : 18
 Other Information : Länge: 18 Basenpaare

Art: Nukleinsäure

Strangform: einzel

Topologie: linear
CDSJoin : No

Custom Codon

Sequence Name : Primer 2

Sequence

<213> OrganismName : Bos spec.
<400> PreSequenceString :
ccttgaaata ttctaccag
<212> Type : DNA
<211> Length : 19
SequenceName : Primer 3
SequenceDescription :

19

Feature

Sequence: Primer 3:
<221> FeatureKey : Primer 3
<222> LocationFrom : 1
<222> LocationTo : 19
Other Information : Länge: 19 Basenpaare

Art: Nukleinsäure

Strangform: einzel

Topologie: linear
CDSJoin : No

Custom Codon

Sequence Name : Primer 3

Sequence

<213> OrganismName : Bos taurus
<400> PreSequenceString :
gaatgaat gaactagtta ccacaactag tacacccaaa atgaacaaaa aatagcttgg tggta-taatt
aaaatgccac caaaatttat acaataatta tattttcttt ttgcaggaaa aagatttagac cacatataat
gtaacttatt tcacaaggta aataattata ataaataata tggattaact gagttt-taaa aggtgaaata
aataatgaat tcttctcatg gtcttgtatg ttaataaaaa ttgaaaaatt ttgaagaccc cattttgtcc
caagaatttc atttacagggt attgaatttt tcaaagggtta caaag-gaaat ttatttgata taataaatgc
atgttctcat aataaccata aatctagggt tttgttgggg ttttttttg tttgttaatt tagaacaatg
ccattccatt tcctgtataa tgagtcactt cttgttgta aactctcctt agaatttctt gggagaggaa
ctgaacagaa cattgatttc ctatgt-gaga gaattcttag aatttaaata aacctgttgg ttaactgaa
accacaaaat tagcatttta ctaatcagta ggtttaaata gcttggagc aaaagtctgc catcacctg
atcatcaacc cagcttgctg cttcttccca gtcttgggtt caaggtatta tgtatacata taacaaaatt
tctat-gattt tcctctgtct catctttcat tcttactaa tacgcagttg taacttttct atgtgattgc
aagtattggt actttcctat gatatactgt tagcttaaaa atatatttgc aaatgttgat actatc-tatc
tcagagctat aggtgaaaaa ttataacttt ttataaagac caaattgatc atttttaaac gaaattctta
tatactgaaa atgtagatac ataacttcag tatagattta tggtaaaaata attt-gaatca tttttgtcaa
attctgtaaa aagttgtcat acagaataat ttataatatt tttgttttca tagaaataac atttcttgta
gaatatttca agg
<212> Type : DNA
<211> Length : 1061
SequenceName : alpha-S1-Kaseingen
SequenceDescription :

Feature

Sequence: alpha-S1-Kaseingen:
<221> FeatureKey : alpha-S1Kaseingen

<222> LocationFrom : 1
 <222> LocationTo : 1061
 Other Information : Beginn Exon 1 bei Position 620
 CDSJoin : No

Journal

Sequence: alpha-S1-Kaseingen:
 <301> Authors : Koczan Dirk, Hobom Gerd, Seyfert Hans-Martin
 <302> Title : Genomic organization of the bovine alpha S1-casein gene
 <303> JournalName : Nucleic acids research
 <304> Volume : 19
 <305> Issue : 20
 <306> PageRange : 5591
 <307> Date : 1991-09-24
 <308> DBAccessionNumber : X59856
 <309> DBEntryDate : 1991-07-18

<313> From : 1
 <313> To : 1061

Database

Sequence: alpha-S1-Kaseingen:
 <308> DBAccessionNumber : EMBL X59856
 <309> DBEntryDate : 1991-07-18
 <313> From : 1
 <313> To : 1061

Custom Codon

Sequence Name : alpha-S1-Kaseingen

Sequence

<213> OrganismName : Bos taurus
 <400> PreSequenceString :
 gaatgaatga actagttacc acaactagta cacccaaaat gaacaaaaaa tagcttggtg 60
 gtataattaa aatgccacca aagttttatac aataattgta ttttcttttt gcaggaaaaa 120
 gattagacca catataatgt aacttatttc acaaggtaaa taattataat aaataaatatg 180
 gattaactga gttttaaaag gtgaaataaa taatgaattc ttctcatggt cttgtatggt 240
 aataaaaatt gaaaaatttt gaagaccca ttttgtccca agaatttcct ttacagggtat 300
 tgaatttttc aaagggtaca aaggaaattt tattgatata ataaatgcat gttctcataa 360
 taaccataaa tctaggggtt tgttgggggt ttttgtttgt taatttagaa caatgccatt 420
 ccatttcctg tataatgagt cgcttctttg ttgtaaactc tccttagaat ttcttgggag 480
 aggaactgaa cagaacattg atttcctatg tgagagaatt cttagaattt aaataaacct 540
 attgggtaaa ctgaaaccac aaaattagca ttttactaat cagtaggttt aaatagcttg 600
 gaagcaaaaag tctgcatca ccttgatcat caaccagct tgctgctttc tt 652

<212> Type : DNA
 <211> Length : 652
 SequenceName : Allel1
 SequenceDescription :

Feature

Sequence: Allel1:

<221> FeatureKey : CSN1S1-Gen, 5`flankierende Region bis Position 616 und Exon 1
 ab Position 617
 <222> LocationFrom : 1
 <222> LocationTo : 652
 Other Information : Mutation/SNP Position 83 (A zu G), Position 98 (A zu G), Position 298 (A zu C), Position 442 (A zu G; Änderung/Verlust einer YY1- und AP1-Bindungsstelle), Position 541 (G zu A);

Deletion TT zwischen Position 389 und 394 verglichen mit Allel2
 CDSJoin : No

Custom Codon

Sequence Name : Allel1

Sequence

<213> OrganismName : Bos taurus
 <400> PreSequenceString :
 gaatgaatga actagttacc acaactagta cacccaaaat gaacaaaaaa tagcttggtg 60
 gtataattaa aatgccacca aaattttatac aataattata ttttcttttt gcaggaaaaa 120
 gattagacca catataatgt aacttatttc acaaggtaaa taattataat aaataaatatg 180
 gattaactga gtttttaaag gtgaaataaa taatgaattc ttctcatggt cttgtatggt 240
 aataaaaatt gaaaaatttt gaagacccca ttttgtccca agaatttcat ttacaggtat 300
 tgaatttttc aaagggttaca aaggaaattt tattgatata ataaatgcat gttctcataa 360
 taaccataaa tctagggttt tgttggggtt tttttgttt gttaatttag aacaatgcca 420
 ttccatttcc tgtataatga gtcacttctt tgttgtaaac tctccttaga atttcttggg 480
 agaggaactg aacagaacat tgatttccta tgtgagagaa ttcttagaat ttaaataaac 540
 ctgttggtta aactgaaacc acaaaattag cattttacta atcagtaggt ttaaataagct 600
 tggaagcaaa agtctgccat caccttgatc atcaaccag cttgctgctt tctt 654

<212> Type : DNA
 <211> Length : 654
 SequenceName : Allel2
 SequenceDescription :

Feature

Sequence: Allel2:
 <221> FeatureKey : CSN1S1-Gen, 5`flankierende Region und Exon 1
 <222> LocationFrom : 1
 <222> LocationTo : 654
 Other Information : Bindungsstelle für Transkriptionsfaktor AP-1 bei Position 438 bis 445

Bindungsstelle für Transkriptionsfaktor YY-1 bei Position 443 bis 448
 CDSJoin : No

Custom Codon

Sequence Name : Allel2

Sequence

<213> OrganismName : Bos taurus
 <400> PreSequenceString :
 gaatgaatga actagttacc acaactagta cacccaaaat gaacaaaaaa tagcttggtg 60

```

gtataattaa aatgccacca aaattttatac aataattata ttttcttttt gcaggaaaaa 120
gattagacca catataatgt aacttatttc acaaggtaaa taattataat aaataatatg 180
gattaactga gttttaaaag gtgaaataaa taatgaattc ttctcatggg cttgtatggt 240
aataaaaatt gaaaaatttt gaagacccca ttttgtccca agaatttcac ttacaggtat 300
tgaatttttc aaagggttaca aaggaaattt tattgatata ataaatgcat gttctcataa 360
taaccataaa tctaggggtt tggtgggggt ttttttgta atttagaaca atgccattcc 420
atttcctgta taatgagtca cttctttggt gtaaactctc cttagaattt cttgggagag 480
gaactgaaca gaacattgat ttcctatgtg agagaattct tagaatttaa ataaacctgt 540
tggttaaaact gaaaccacaa aattagcatt ttactaatca gtaggtttaa atagcttgga 600
agcaaaagtc tgccatcacc ttgatcatca acccagcttg ctgctttctt 650

```

<212> Type : DNA

<211> Length : 650

SequenceName : Allel3

SequenceDescription :

Feature

Sequence: Allel3:

<221> FeatureKey : CSN1S1-Gen, 5`flankierende Region

<222> LocationFrom : 1

<222> LocationTo : 650

Other Information : Bindungsstelle für Transkriptionsfaktor AP-1 bei Position 434 bis 441

Bindungsstelle für Transkriptionsfaktor YY-1 bei Position 439 bis 444

Deletion G und TTT zw. 390 und 396 verglichen mit Allel 2

CDSJoin : No

Custom Codon

Sequence Name : Allel3

Sequence

<213> OrganismName : Bos taurus

<400> PreSequenceString :

```

gaatgaatga actagttacc acaactagta caccctaaat gaacaaaaaa tagcttggtg 60
gtataattaa aatgccacca aaattttatac aataattata ttttcttttt gcaggaaaaa 120
gattagacca catataatgt aacttatttc acaaggtaaa taattataat aaataatatg 180
gattaactga gttttaaaag gtgaaataaa taatgaattc ttctcatggg cttgtatggt 240
aataaaaatt gaaaaatttt gaagacccca ttttgtccca agaatttcac ttacaggtat 300
tgaatttttc aaagggttaca aaggaaattt tattgatata ataaatgcat gttctcataa 360
taaccataaa tctaggggtt tggtgggggt ttttttgta atttagaaca atgccattcc 420
atttcctgta taatgagtca cttctttggt gtaaactctc cttagaattt cttgggagac 480
gaactgaaca gaacattgat ttcctatgtg agagaattct tagaatttaa ataaacctgt 540
tggttaaaact gaaaccacaa aattagcatt ttactaatca gtaggtttaa atagcttgga 600
agcaaaagtc tgccatcacc ttgatcatca acccagcttg ctgctttctt 650

```

<212> Type : DNA
 <211> Length : 650
 SequenceName : Allel14
 SequenceDescription :

Feature

Sequence: Allel14:

<221> FeatureKey : CSN1S1-Gen, 5' flankierende Region

<222> LocationFrom : 1

<222> LocationTo : 650

Other Information : Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren: AP-1 bei Position 434 bis 441, ABF1 bei Position 469 bis 483, YY-1 bei Position 439 bis 444;

Mutation (SNP) in Position 480 (G zu C), damit entsteht eine ABF1-Bindungsstelle;

Deletion G und TTT zwischen Position 390 und 396 verglichen mit Allel 2
 CDSJoin : No

Custom Codon

Sequence Name : Allel14

Patentansprüche

1. Genetischer Marker am 5'-Ende des α S1-Kaseingens **dadurch gekennzeichnet** dass er die Nukleotidsequenz 1–1061, bevorzugt die Nukleotidsequenz 1–655 am 5'-Ende des α S1-Kaseingens beinhaltet.

2. Genetischer Marker gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet dass er durch die Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3') Primer 2 CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3')
 oder durch die
 Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')
 Primer 3 CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3')
 in der PCR-Reaktion amplifiziert wird.

3. Genetischer Marker gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet dass er innerhalb von Milchrassen variabel ist.

4. Genetischer Marker gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet dass er zur Bestimmung des allelischen Zustandes am 5'-Ende des α S1-Kaseingens verwendet wird.

5. Verfahren zur Ermittlung des allelischen Zustands des 5'-Ende des α S1-Kaseingens, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte,
 a) Bereitstellen des Ausgangsmaterials des zu untersuchenden Organismus
 b) Isolierung des genetischen Materials
 c) Gezielte Isolierung oder Anreicherung des Markerabschnittes des 5'-Bereiches α S1-Kaseingens oder einer Sequenz, die Teilbereiche des Markerabschnittes, vorzugsweise den Abschnitt 1 bis 655 der Markersequenz aus dem α S1-Kaseingen enthält
 d) Nachweis des allelischen Zustands im isolierten oder angereicherten Sequenzbereich des Markerabschnittes des α S1-Kaseingens.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch dass das Ausgangsmaterial aus einem Tier, insbesondere einem Säugetier, im besonderen einem Rind, einem Schaf oder einer Ziege einschließlich Zucht-tieren und Embryonen dieser Spezies stammt.

7. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch dass das Ausgangsmaterial Blut, Leukozyten, Gewebe einschließlich Biopsiematerial, Milch, Sperma, Haare, einzelne Zellen einschließlich Zellmaterial aus Embryonen, eine Bakterienkultur oder auch isolierte Chromosomen ist.

8. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch dass das Ausgangsmaterial aus einem gentechnisch veränderten Organismus (GVO)stammt, der den Markerabschnitt des α S1-Kaseingens enthält.

9. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch das das genetische Material genomische DNA oder RNA von Tieren, Plasmid-DNA aus Bakterien, von artifiziellen Chromosomen wie BACs und YACs ist.
10. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch das die Anreicherung des Markerabschnittes des α s1-Kaseingens mittels Polymerase-Kettenreaktion erfolgt.
11. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch das die Anreicherung des Markerabschnittes des α s1-Kaseingens in der Polymerase-Kettenreaktion mit den Oligonukleotiden Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGR ATG AAC TAG TTA CC 3') Primer 2 CSN1S1pro1r (5' GAA GAR GCA GCA AGC TGG 3') Primer 3 CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3') als Primer erfolgt, wobei die Kombination Primer 1 mit Primer 2 und Primer 2 mit Primer 3 gewählt werden.
12. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch das die Bestimmung des allelischen Zustands mittels SSCP, RFLP, OLA, TGGE, ASPCR, PCR-ELISA, Microarray-verfahren oder durch Nukleinsäuresequenzierung erfolgt.
13. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch das einer oder mehrere der allelischen Zustände der Markersequenz des α s1-Kaseingens nachgewiesen werden.
14. Verwendung des Verfahrens gemäß der vorangegangenen Ansprüche zur alters- und laktationsunabhängigen Untersuchung von Tieren auf Milchleistungsmerkmale.
15. Verwendung des Verfahrens gemäß der vorangegangenen Ansprüche zur Auswahl von Organismen, die eine bestimmte allelische Form oder einen bestimmten Genotyp der Markersequenz des α s1-Kaseingens oder eines Teilbereiches derer tragen.
16. Verwendung des Verfahrens gemäß der vorangegangenen Ansprüche in Zuchtprogrammen, insbesondere zur markergestützten Selektion.
17. Verwendung des Verfahrens gemäß der vorangegangenen Ansprüche zur Selektion auf erhöhte Milchproteingehalte.
18. Verwendung eines Markers gemäß Anspruch 1 zur Genomanalyse, insbesondere zur Genkartierung und/oder Kopplungsanalyse.
19. Verwendung eines Markers gemäß Anspruch 1 zur Erzeugung von Expressionsvektoren.
20. Verwendung eines Markers gemäß Anspruch 1 zur Herstellung transgener Tiere.
21. Testkit, enthaltend Oligonukleotide zur Anreicherung eines Teilbereiches der Markersequenz des α s1-Kaseingens, vorzugsweise die Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG ARC TAG TTA CC 3'), Primer 2 CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3') und Primer 3 CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3') sowie Referenzproben für eine oder mehrere Sequenzen der Markersequenz des α s1-Kaseingens und dessen Allele enthält.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Anzahl Abbildungen:4

Abbildung 1

1 gaatgaat gaactagtta ccacaactag tacacccaaa atgaacaaaa
 49 aatagcttgg tggataaatt aaaatgccac caaaatttat acaataatta tattttcttt
 109 ttgcaggaaa aagattagac cacatataat gtaacttatt tcacaaggta aataattata
 169 ataaataata tggattaact gagttttaaa aggtgaaata aataatgaat tcttctcatg
 229 gtcttgtatg ttaataaaaa ttgaaaaatt ttgaagaccc cattttgtcc caagaatttc
 289 atttacaggt attgaatttt tcaaagggtta caaaggaaat tttattgata taataaatgc
 349 atgttctcat aataaccata aatctagggt tttgttgggg ttttttttg tttgtaatt
 409 tagaacaatg ccattccatt tctgtataa tgagtcactt cttgttgta aactctcctt
 469 agaatttctt gggagaggaa ctgaacagaa cattgatttc ctatgtgaga gaattcttag
 529 aatttaaata aacctgttgg ttaaactgaa accacaaaat tagcatttta ctaatcagta
 589 ggtttaaata gcttggaagc aaaagtctgc ▼ catcaccttg atcatcaace cagcttgctg
 649 cttcttccca gtcttgggtt caaggtatta tgtatacata taacaaaatt tctatgattt
 709 tcctctgtct catctttcat tcttcaactaa tacgcagttg taacttttct atgtgattgc
 769 aagtattggt actttcctat gatatactgt tagcttaaaa atatatttgc aatgtttgat
 829 actatctatc tcagagctat aggtgaaaaa ttaataactt ttataaagac caaattgatc
 889 atttttaaac gaaattctta tatactgaaa atgtagatac ataacttcag tatagattta
 949 tggtaaaata atttgaatca ttttgtcaa attctgtaaa aagttgtcat acagaataat
 1009 ttataatatt tttgttttca tagaaataac atttctggta gaatatttca agg 1061

▼markiert den Beginn des Exon 1

Abbildung 2**Sequenzalignment der 4 Allele**

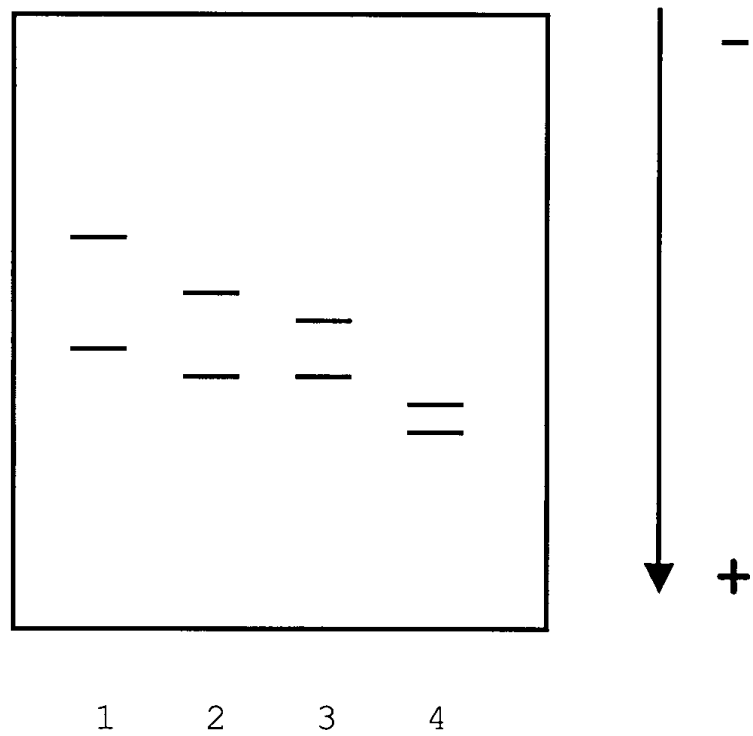
Variationen in Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen durch Kasten markiert

		10	20	30	40	50	
Allel_1	1	GAATGAATGA	ACTAGTTACC	ACAACTAGTA	CACCCAAAAT	GAACAAAAAA	50
Allel_2	1	GAATGAATGA	ACTAGTTACC	ACAACTAGTA	CACCCAAAAT	GAACAAAAAA	50
Allel_3	1	GAATGAATGA	ACTAGTTACC	ACAACTAGTA	CACCCAAAAT	GAACAAAAAA	50
Allel_4	1	GAATGAATGA	ACTAGTTACC	ACAACTAGTA	CACCCAAAAT	GAACAAAAAA	50
		60	70	80	90	100	
Allel_1	51	TAGCTTGGTG	GTATAATTAA	AATGCCACCA	AAGTTTATAC	AATAATTGTA	100
Allel_2	51	TAGCTTGGTG	GTATAATTAA	AATGCCACCA	AAATTTATAC	AATAATTATA	100
Allel_3	51	TAGCTTGGTG	GTATAATTAA	AATGCCACCA	AAATTTATAC	AATAATTATA	100
Allel_4	51	TAGCTTGGTG	GTATAATTAA	AATGCCACCA	AAATTTATAC	AATAATTATA	100
		110	120	130	140	150	
Allel_1	101	TTTTCTTTTT	GCAGGAAAAA	GATTAGACCA	CATATAATGT	AACTTATTTT	150
Allel_2	101	TTTTCTTTTT	GCAGGAAAAA	GATTAGACCA	CATATAATGT	AACTTATTTT	150
Allel_3	101	TTTTCTTTTT	GCAGGAAAAA	GATTAGACCA	CATATAATGT	AACTTATTTT	150
Allel_4	101	TTTTCTTTTT	GCAGGAAAAA	GATTAGACCA	CATATAATGT	AACTTATTTT	150
		160	170	180	190	200	
Allel_1	151	ACAAGGTAAA	TAATTATAAT	AAATAATATG	GATTAAGTGA	GTTTTTAAAG	200
Allel_2	151	ACAAGGTAAA	TAATTATAAT	AAATAATATG	GATTAAGTGA	GTTTTTAAAG	200
Allel_3	151	ACAAGGTAAA	TAATTATAAT	AAATAATATG	GATTAAGTGA	GTTTTTAAAG	200
Allel_4	151	ACAAGGTAAA	TAATTATAAT	AAATAATATG	GATTAAGTGA	GTTTTTAAAG	200
		210	220	230	240	250	
Allel_1	201	GTGAAATAAA	TAATGAATTC	TTCTCATGGT	CTTGTATGTT	AATAAAAAATT	250
Allel_2	201	GTGAAATAAA	TAATGAATTC	TTCTCATGGT	CTTGTATGTT	AATAAAAAATT	250
Allel_3	201	GTGAAATAAA	TAATGAATTC	TTCTCATGGT	CTTGTATGTT	AATAAAAAATT	250
Allel_4	201	GTGAAATAAA	TAATGAATTC	TTCTCATGGT	CTTGTATGTT	AATAAAAAATT	250
		260	270	280	290	300	
Allel_1	251	GAAAAATTTT	GAAGACCCCA	TTTTGTCCCA	AGAATTTCC	TTACAGGTAT	300
Allel_2	251	GAAAAATTTT	GAAGACCCCA	TTTTGTCCCA	AGAATTTTCAT	TTACAGGTAT	300
Allel_3	251	GAAAAATTTT	GAAGACCCCA	TTTTGTCCCA	AGAATTTTCAT	TTACAGGTAT	300
Allel_4	251	GAAAAATTTT	GAAGACCCCA	TTTTGTCCCA	AGAATTTTCAT	TTACAGGTAT	300
		310	320	330	340	350	
Allel_1	301	TGAATTTTTC	AAAGGTTACA	AAGGAAATTT	TATTGATATA	ATAAATGCAT	350
Allel_2	301	TGAATTTTTC	AAAGGTTACA	AAGGAAATTT	TATTGATATA	ATAAATGCAT	350
Allel_3	301	TGAATTTTTC	AAAGGTTACA	AAGGAAATTT	TATTGATATA	ATAAATGCAT	350
Allel_4	301	TGAATTTTTC	AAAGGTTACA	AAGGAAATTT	TATTGATATA	ATAAATGCAT	350
		360	370	380	390	400	
Allel_1	351	GTTCTCATAA	TAACCATAAA	TCTAGGGTTT	TGTTGGGGTT	TTTT--GTTT	400
Allel_2	351	GTTCTCATAA	TAACCATAAA	TCTAGGGTTT	TGTTGGGGTT	TTTTTTGTTT	400
Allel_3	351	GTTCTCATAA	TAACCATAAA	TCTAGGGTTT	TGTTGGGGTT	TTTTTT---	400
Allel_4	351	GTTCTCATAA	TAACCATAAA	TCTAGGGTTT	TGTTGGGGTT	TTTTTT---	400
		410	420	430	440	450	
Allel_1	401	GTTAATTTA	GAACAATGCC	ATTCCATTTT	CTGTATAATG	AGTCGCTTCTT	450
Allel_2	401	GTTAATTTA	GAACAATGCC	ATTCCATTTT	CTGTATAATG	AGTCACTTCTT	450
Allel_3	401	GTTAATTTA	GAACAATGCC	ATTCCATTTT	CTGTATAATG	AGTCACTTCTT	450
Allel_4	401	GTTAATTTA	GAACAATGCC	ATTCCATTTT	CTGTATAATG	AGTCACTTCTT	450
					AP-1	YY-1	
		460	470	480	490	500	
Allel_1	451	TGTTGTAAA	CTCTCCTTAG	AATTTCTTGG	GAGAGGAACT	GAACAGAACAT	500
Allel_2	451	TGTTGTAAA	CTCTCCTTAG	AATTTCTTGG	GAGAGGAACT	GAACAGAACAT	500
Allel_3	451	TGTTGTAAA	CTCTCCTTAG	AATTTCTTGG	GAGAGGAACT	GAACAGAACAT	500
Allel_4	451	TGTTGTAAA	CTCTCCTTAG	AATTTCTTGG	GAGAGGAACT	GAACAGAACAT	500

ABF1

		510	520	530	540	550	
Allel_1	501	TGATTTTCCT	ATGTGAGAGA	ATTCTTAGAA	TTTAAATAAA	CCTATTGGTTA	550
Allel_2	501	TGATTTTCCT	ATGTGAGAGA	ATTCTTAGAA	TTTAAATAAA	CCTGTTGGTTA	550
Allel_3	501	TGATTTTCCT	ATGTGAGAGA	ATTCTTAGAA	TTTAAATAAA	CCTGTTGGTTA	550
Allel_4	501	TGATTTTCCT	ATGTGAGAGA	ATTCTTAGAA	TTTAAATAAA	CCTGTTGGTTA	550
		560	570	580	590	600	
Allel_1	551	AACTGAAAC	CACAAAATTA	GCATTTTACT	AATCAGTAGG	TTTAAATAGCT	600
Allel_2	551	AACTGAAAC	CACAAAATTA	GCATTTTACT	AATCAGTAGG	TTTAAATAGCT	600
Allel_3	551	AACTGAAAC	CACAAAATTA	GCATTTTACT	AATCAGTAGG	TTTAAATAGCT	600
Allel_4	551	AACTGAAAC	CACAAAATTA	GCATTTTACT	AATCAGTAGG	TTTAAATAGCT	600
		610	620	630	640	650	
Allel_1	601	TGGAAGCAA	AAGTCTGCCA	TCACCTTGAT	CATCAACCCA	GCTTGCTGCTT	650
Allel_2	601	TGGAAGCAA	AAGTCTGCCA	TCACCTTGAT	CATCAACCCA	GCTTGCTGCTT	650
Allel_3	601	TGGAAGCAA	AAGTCTGCCA	TCACCTTGAT	CATCAACCCA	GCTTGCTGCTT	650
Allel_4	601	TGGAAGCAA	AAGTCTGCCA	TCACCTTGAT	CATCAACCCA	GCTTGCTGCTT	650
		660	670	680	690	700	
Allel_1	651	TCTT					
Allel_2	651	TCTT					
Allel_3	651	TCTT					
Allel_4	651	TCTT					

Abbildung 3



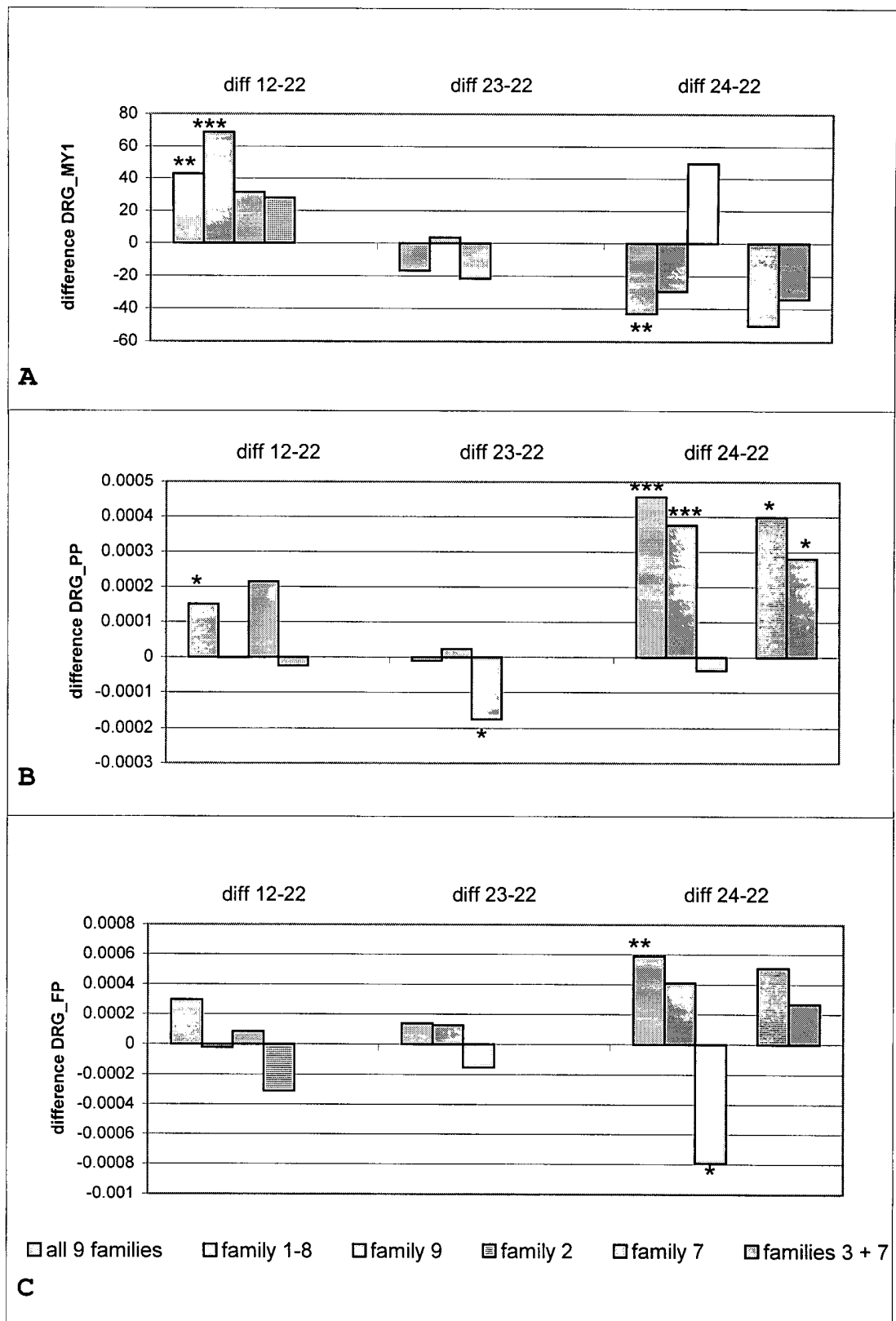


Abbildung 4