

Wageningen UR Livestock Research

Partner in livestock innovations



Rapport 416

Indicatoren om dracht te meten in melk

Februari 2011



LIVESTOCK RESEARCH
WAGENINGEN UR

Colofon

Uitgever

Wageningen UR Livestock Research
Postbus 65, 8200 AB Lelystad
Telefoon 0320 - 238238
Fax 0320 - 238050
E-mail info.livestockresearch@wur.nl
Internet <http://www.livestockresearch.wur.nl>

Redactie

Communication Services

Copyright

© Wageningen UR Livestock Research, onderdeel van Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, 2011

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

Aansprakelijkheid

Wageningen UR Livestock Research aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Wageningen UR Livestock Research en Central Veterinary Institute, beiden onderdeel van Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek vormen samen met het Departement Dierwetenschappen van Wageningen University de Animal Sciences Group van Wageningen UR (University & Research centre).

Losse nummers zijn te verkrijgen via de website.



De certificering volgens ISO 9001 door DNV onderstreept ons kwaliteitsniveau. Op al onze onderzoeksopdrachten zijn de Algemene Voorwaarden van de Animal Sciences Group van toepassing. Deze zijn gedeponereerd bij de Arrondissementsrechtbank Zwolle.

Abstract

In this project the technical possibilities were investigated to use protein profiles in dairy milk as an indicator to improve fertility.

Keywords

Biomarkers, Milk-proteome-wide approach, Protein profiles, Pregnancy test

Referaat

ISSN 1570 - 8616

Auteur(s)

Yvette de Haas
Leo Kruijt
Han Mulder
Mari Smits
Henri Woelders

Titel

Indicatoren om dracht te meten in melk

Rapport 416

Samenvatting

Doel van dit project is om de technische mogelijkheden in kaart te brengen om eiwitprofielen in de melk te gebruiken als indicator voor het verbeteren van vruchtbaarheid van melkvee.

Trefwoorden

Drachteiwitten, biomarkers, melkvee, drachtigheidstest



LIVESTOCK RESEARCH
WAGENINGEN UR

Rapport 416

Indicatoren om dracht te meten in melk

Biomarkers in milk to predict pregnancy in dairy cattle

Yvette de Haas

Leo Kruijt

Han Mulder

Mari Smits

Henri Woelders

Februari 2011

Dit onderzoek is gefinancierd door het Productschap Zuivel

Voorwoord

Voor u ligt het rapport van een kortlopende demonstratieproject dat als doel had om te laten zien dat het mogelijk is om met behulp van genomics technieken vooruitgang te boeken richting innovaties voor de melkveehouderij. In nauwe samenwerking met de primaire sector en de zuivel in een voortraject (Innovaties in de melkveehouderij via toegepaste genomica) zijn kansrijke thema's geïdentificeerd. In dit project richten we de aandacht op één van die kansrijke thema's, namelijk vruchtbaarheid.

Een speciaal woord van dank aan Henk Sulkers en de medewerkers van Nij Bosma Zathe (proefbedrijf van Wageningen UR Livestock Research) voor de verzameling van de melkmonsters. Tevens bedanken we de klankbordgroepleden van het project 'Innovatie in de melkveehouderij en zuivelsector via Toegepaste Genomica' voor de plezierige en constructieve discussies.

Samenvatting

Een proteomics aanpak is uitermate geschikt om naar “alle” eiwitten in een biologisch monster te kijken. Op deze manier kan naar een patroon van melkeiwitten gezocht worden dat mogelijk geassocieerd is met drachtigheid van melkvee. Zulke biomarkers kunnen de basis vormen voor de ontwikkeling van een drachtigheidstest voor de praktijk. Belangrijke onderzoeksvragen die hierbij aan de orde komen zijn o.a.: is zo'n patroon te vinden in melk van drachtige koeien, wat zijn de veranderingen van dit patroon in de tijd, en wat is de variabiliteit van dit patroon tussen individuele dieren? Deze vragen zijn beantwoord in deze pilotstudie.

De resultaten van deze pilotstudie suggereren dat er inderdaad eiwitten zijn waarvan de gehalten in de melk van drachtige koeien anders zijn dan die in de melk van niet-drachtige koeien. Zulke verschillen zijn al op dag 21 na inseminatie zichtbaar. Er is echter een grote spreiding in de concentratie van deze (en andere) melkeiwitten tussen individuele dieren, zowel bij drachtige als niet-drachtige dieren. Op basis van de concentratie van één eiwit in de melk, kon 93% van de drachtige dieren correct geïdentificeerd worden, en maximaal 67% van de niet-drachtige dieren. Hierdoor is het onderscheidend vermogen van de geïdentificeerde eiwitten nog te laag om drachtige en niet-drachtige dieren correct te classificeren. Met de verkregen sensitiviteit en specificiteit kan geen betrouwbare drachtigheidstest worden opgezet.

Om toch tot een drachtigheidstest te komen zal een grotere steekproef dan van 32 dieren genomen moeten worden. Tevens zullen de eiwitprofielen dan op verse melk bepaald moeten worden.

Het project heeft kennis opgeleverd over de aanwezigheid van mogelijke eiwitbiomarkers in melk van drachtige en niet-drachtige koeien die de basis kunnen vormen voor toekomstige drachtigheidstesten waarmee de tussenkalf tijd van de veestapel verkort kan worden. Door de beschikbaarheid van zulke testen zal er minder tijd nodig zijn voor tochtdetectie. De technologische ontwikkelingen in de afgelopen jaren maken het mogelijk om een drachtigheidstest in de markt te gaan zetten, zodra de biomarkers geïdentificeerd en gekarakteriseerd zijn en de specificiteit en sensitiviteit van hun voorspellende waarden hoog genoeg zijn.

Summary

A proteomics approach is very suitable to analyze all proteins in a biological sample. Some proteins or the profile of a set of proteins present in the milk of lactating cows may be related to the pregnancy status of dairy cows. If so, then these protein profiles can be used as predictors in a pregnancy test for dairy cattle that can be performed on a drop of milk. In this regard, important research questions are: is a pregnancy-specific protein profile present in milk samples of pregnant dairy cows, and how varies this profile among animals and throughout time? These questions were addressed in this pilot study.

The results show that the concentrations of some milk proteins differ between pregnant and non-pregnant cows. Those differences can already be detected on day 21 after insemination. However, there is large variation in the concentration of these proteins among cows. Based on the concentration of one single protein, a sensitivity and specificity of maximally 93% and 61%, respectively, was obtained in this experiment. Using combinations of multiple proteins did not improve sensitivity and specificity. This indicates that the discriminating power of the identified proteins is still low, especially for classifying non-pregnant cows. Therefore, the current data are not yet sufficient to develop a reliable pregnancy test.

The project has provided knowledge on the presence of potential protein biomarkers in milk samples of pregnant and non-pregnant dairy cows that might be used as indicators in future pregnancy tests. The rapid technological developments of recent years make it possible to launch a pregnancy test for dairy cows as soon as the sensitivity and specificity of the predictor proteins are reliable. For this an extended experiment is needed with more than 32 dairy cows, and the protein profiles need to be determined in fresh milk rather than in frozen milk. These pregnancy tests will be valuable tools for management because heat detection can be focused on the non-pregnant-tested cows only, which increases the chance that a heat will be detected by the farmer.

Inhoudsopgave

Voorwoord

Samenvatting

Summary

1	Inleiding	1
2	Materiaal en methoden	2
3	Resultaten.....	3
	3.1 Data-analyse met de SELDI-TOF software	3
	3.2 Data analyse met Ridge penalized partial least squares regression (RPLS)	5
4	Conclusies en aanbevelingen.....	6
	4.1 Aanbevelingen	6
5	Literatuur	7
	5.1 Publicaties en kennisproducten uit project.....	7

1 Inleiding

Voor de Nederlandse melkveehouderij is economische en technische efficiëntie belangrijk. Via innovaties op gebieden als voeding, fokkerij, huisvesting en management is Nederland een van de toonaangevende melkveelanden in de wereld. Voor de toekomst is het belangrijk dat de Nederlandse veehouderij blijft innoveren om o.a. de arbeidsdruk te verminderen, de kostprijs te reduceren en het management voor grootschalige melkveehouderij te ondersteunen.

In nauwe samenwerking met de primaire sector en de zuivel in een voortraject (Innovaties in de melkveehouderij via toegepaste genomica) zijn kansrijke thema's geïdentificeerd. In dit project richten we de aandacht op één van die kansrijke thema's, namelijk vruchtbaarheid.

De vruchtbaarheid van koeien is gedurende de laatste decennia afgenomen, zoals blijkt uit de lagere drachtigheidspercentages na inseminatie en de hogere embryonale sterfte (Flint, 2006). Dit wordt toegeschreven aan (a) een antagonisme tussen enerzijds hoge melkproductie (door selectie en voeding) en anderzijds vruchtbaarheid (Ghaffari Laleh et al., 2008), en (b) de verminderde tijd die veehouders beschikbaar hebben voor vruchtbaarheidsmanagement in grote koppels. Een belangrijke stap voorwaarts zou een vroege detectie van dracht na 1e inseminatie zijn. Bij afwezigheid van dracht (na 1e inseminatie) kan dan bij eerstvolgende tocht wederom geïnsemineerd worden. Dit is vooral aantrekkelijk voor grote bedrijven omdat deze vroege detectie minder toezicht op de dieren vraagt. Hiervoor is het nodig dat objectief meetbare (fysiologische) parameters gevonden worden die dracht in een vroeg stadium aantonen. Vroege detectie van drachtige of niet-drachtige dieren zorgt ervoor dat gerichter gekeken kan worden naar de niet-drachtige dieren om tocht te signaleren.

Bij verschillende diersoorten, ook bij runderen, zijn 'pregnancy-associated proteins' in bloed en/of melk gevonden en voorgesteld als merkers voor drachtigheid (Green et al., 2005; Moore and Thatcher, 2006; Ayad et al., 2007; Bella et al., 2007; Ghaffari Laleh et al., 2008). Hierbij is meestal niet specifiek gekeken naar vroege detectie van dracht. Bovendien was de aandacht hierbij tot nu toe altijd gericht op één specifieke component of indicator voor dracht. Dit heeft tot nu toe niet geleid tot het ontwikkelen van testen die daadwerkelijk toegepast worden in de praktijk om dracht aan te tonen.

Een proteomics aanpak is uitermate geschikt om naar "alle" eiwitten in een biologisch monster te kijken (Reddy and Dalmaso, 2003; Poon, 2007). Op deze manier kan naar een patroon van melkeiwitten gezocht worden dat mogelijk geassocieerd is met drachtigheid van melkvee. Zulke biomarkers kunnen de basis vormen voor de ontwikkeling van een drachtigheidstest voor de praktijk. Belangrijke onderzoeksvragen die hierbij aan de orde komen zijn o.a.: is zo'n patroon te vinden in melk van drachtige koeien, wat zijn de veranderingen van dit patroon in de tijd, en wat is de variabiliteit van dit patroon tussen individuele dieren?

Doelstelling van project

Het doel van dit kortlopende demonstratieproject is om te laten zien dat het mogelijk is om met behulp van genomics technieken vooruitgang te boeken richting innovaties voor de melkveehouderij. Technische mogelijkheden voor het gebruik van genomica bij het verbeteren van vruchtbaarheid van melkvee (op grote melkveebedrijven) worden in kaart gebracht. Doel is hierbij om te achterhalen of gesignalen (eiwitprofielen in de melk) geschikt zijn. De onderzoeksresultaten zouden de basis kunnen vormen voor de ontwikkeling van een test voor de vroege detectie van dracht, hetgeen kan leiden tot een verbeterde vruchtbaarheid van melkvee en tot een vereenvoudiging van het management van (grote) koppels melkvee.

2 Materiaal en methoden

In 2007 zijn melkmonsters verzameld van 32 Holstein koeien op proefbedrijf Nij Bosma Zathe van Wageningen UR Livestock Research in Friesland. De melkmonsters waren verzameld op dag 21, 28 en 35 na de inseminatie en in de diepvries (bij -80 °C) opgeslagen. Zes weken na de inseminatie zijn de koeien gediagnosticeerd als drachtig of niet-drachtig door de veearts. 14 koeien bleken drachtig te zijn en 18 niet.

Aanvullende informatie van de koeien was ook bekend, zoals leeftijd bij afkalven, lactatielengte van de huidige lactatie, lactatiestadium bij inseminatie en melkproductie (kg melk, vet en eiwit in 305 dagen van de huidige lactatie).

In 2009 zijn melkmonsters van deze 14 drachtige en 18 niet-drachtige dieren geanalyseerd met een SELDI-TOF massaspectrometer. Deze apparatuur meet "alle" eiwitten die in melk worden gevonden en maakt eiwitprofielen met het doel om te ontdekken of er eiwitten in de melk van drachtige dieren zitten die niet of in andere hoeveelheden in de melk van niet-drachtige dieren aanwezig zijn of andersom. De melkanalyses zijn uitgevoerd na fractionering van de melk in zes verschillende fracties, die elk werden getest met twee verschillende eiwit 'chips', bij 3 verschillende laser intensiteiten. De analyses zijn in duplo uitgevoerd.

De data zijn geanalyseerd met behulp van de SELDI-TOF software. Daarnaast zijn de data met een andere statistische methodiek geanalyseerd om te kijken of een combinatie van eiwitpieken indicatief is voor wel of niet drachtig zijn van een koe. Deze methodiek heet 'Ridge penalized partial least squares regression' (RPLS). De SELDI-TOF software analyseert de bijdrage van meerdere eiwitten stapsgewijs, terwijl RPLS de bijdrage van meerdere eiwitten tegelijkertijd analyseert.

In beide gevallen is gebruik gemaakt van zogenaamde kruisvalidatie om het voorspellend vermogen te bepalen van een eiwit of een combinatie van eiwitten. Bij kruisvalidatie wordt één dier uit de dataset gelaten, waarna de eiwitgegevens van de overige koeien worden geanalyseerd om te kijken welke gehalten van een eiwit of combinatie van eiwitten indicatief zijn voor dracht of niet-dracht. Aan de hand hiervan werden dan de vruchtbaarheidsstatus van de apart gehouden koe voorspeld. Dit werd net zo vaak herhaald totdat iedere koe een keer voorspeld is.

Een goede robuuste test moet bij voorkeur een hoge sensitiviteit en een hoge specificiteit hebben. De sensitiviteit is de kans dat de test een positieve uitslag geeft bij de koeien die drachtig zijn. Het is de verhouding tussen het aantal koeien dat positief scoort en ook daadwerkelijk drachtig is, en het totaal van alle onderzochte drachtige koeien (inclusief het aantal koeien dat negatief scoort en toch drachtig is). De specificiteit is een maat voor de kans het resultaat van de test negatief is bij afwezigheid van de dracht die de test moet opsporen. De specificiteit is de verhouding tussen het aantal terecht negatieve uitslagen (niet drachtig, negatieve uitslag) en het totaal aantal niet-drachtige koeien.

3 Resultaten

Als de groep drachtige koeien met de groep niet-drachtige koeien wordt vergeleken op overige kenmerken, viel op dat niet-drachtige koeien gemiddeld een langere lactatielengte hadden (tabel 1). Dit is ook logisch, aangezien ze niet drachtig waren en dus nog een cyclus moesten doorlopen. De melkproductie was in beide groepen vrijwel gelijk. De drachtige dieren waren iets ouder dan de niet-drachtige dieren, maar de standaardafwijking geeft aan dat er veel variatie is binnen een groep. Er kan geconcludeerd worden dat beide groepen niet significant verschilden wat betreft overige kenmerken.

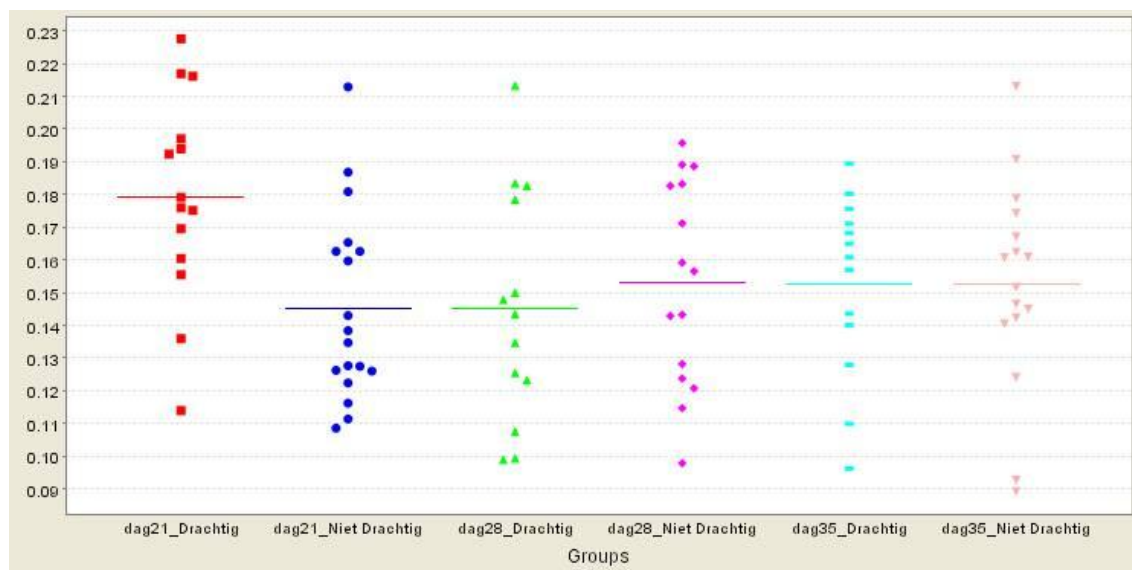
Tabel 1 Kenmerken van de drachtige en niet-drachtige groep koeien

Kenmerk	Niet drachtig	Drachtig	Standaardafwijking	Verskil
Aantal dieren	18	14		
Afkalfleeftijd (jaren)	3.72	4.18	1.45	0.46
Lactatielengte (dagen)	520	395	110	-125
Lactatiestadium bij inseminatie (dagen)	131	117	62	-13
kg melk in 305d	9314	9399	1990	86
kg vet in 305d	405	405	72	0
kg eiwit in 305d	324	320	61	-4

3.1 Data-analyse met de SELDI-TOF software

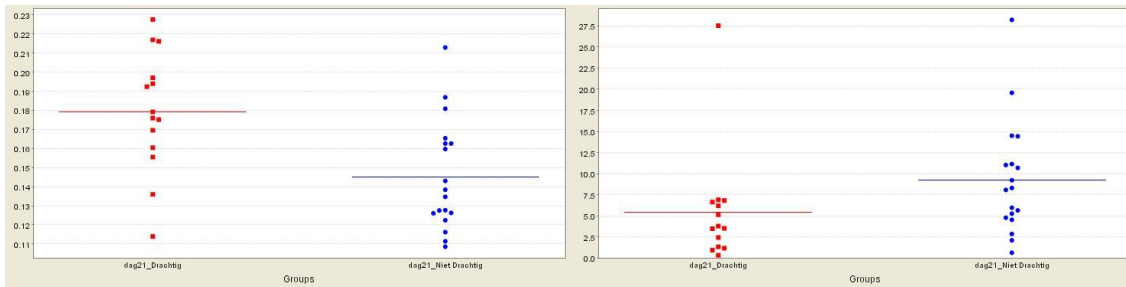
Met de SELDI-TOF analyse werden meer dan 700 eiwitpieken in melk gedetecteerd. Op de verschillende dagen na inseminatie werden melkeiwitten gevonden waarbij in de steekproefpopulatie de eiwitconcentraties verschilden tussen de drachtige en de niet drachtige dieren. Eiwitten die slechts in een bepaalde fase van de vroege dracht belangrijk zijn, zullen mogelijk alleen op één van de onderzochte dagen gevonden worden. Het kan ook zijn dat een eiwit op meerder dagen verschillend aanwezig is bij drachtige en niet-drachtige dieren. Er werden echter weinig/geen eiwitten gevonden die op alle drie de dagen (21, 28, 35) verschillend aanwezig waren bij drachtige en niet-drachtige dieren. In figuur 1 wordt een voorbeeld gegeven van een eiwit dat wel op dag 21 een groot onderscheid te zien gaf, maar niet meer op dag 28 en 35 na inseminatie.

Figuur 1 De concentraties van een specifiek eiwit (Y-as) die in de 14 drachtige en 18 niet-drachtige dieren zijn bepaald, met hun gemiddelde waarde, op dag 21, 28 en 35 na inseminatie (X-as)



Aangezien we geïnteresseerd waren om een mogelijke niet-dracht zo vroeg mogelijk te detecteren, zijn vervolgens alleen de monsters van dag 21 meegenomen in de verdere analyses. Op dag 21 werden 5 eiwitten gevonden waarvan de concentratie eiwit (piekhoogte) significant anders was in de drachtige in vergelijking met de niet-drachtige groep dieren. De concentraties van twee eiwitten zijn weergegeven in de figuren 2a en 2b.

Figuren 2a en 2b De concentraties van twee afzonderlijke eiwitten (Y-as) die in de 14 drachtige en 18 niet-drachtige dieren zijn bepaald, met hun gemiddelde waarde, op dag 21 na inseminatie (X-as).



De analyses lieten zien dat sommige van deze 5 eiwitten een goede indicator zouden kunnen zijn voor dracht (tabel 2). Echter als indicator voor niet-dracht wijzen deze eiwitten afzonderlijk wel in de goede richting, maar zijn ze niet specifiek genoeg (tabel 2). Bij twee van de eiwitten was de sensitiviteit 93%. Dus 93% van de drachtige dieren werd correct als drachtig geïdentificeerd op basis van de concentratie van het desbetreffende eiwit. Echter, de specificiteit van deze twee eiwitten was slechts 55% of 61%. Dus slechts 55% of 61% van de niet-drachtige dieren werd goed geïdentificeerd met het desbetreffende eiwit. Dit houdt in dat wanneer een dier als niet-drachtig wordt geïdentificeerd, de kans nog groot is dat ze wel drachtig is. Je kunt er dus niet van op aan dat je die koe nog een keer moet insemineren.

Tabel 2 Het aantal en percentage drachtige dieren (sensitiviteit) en niet-drachtige dieren (specificiteit) dat correct geïdentificeerd is op basis van de concentratie van vijf afzonderlijke eiwitten

Eiwit	Drachtige dieren (14)			Niet drachtige dieren (18)		
	Test: drachtig	Test: niet drachtig	% correct drachtig	Test: drachtig	Test: niet drachtig	% correct niet drachtig
122814	8	6	57.1	7	11	61.1
21221	8	6	57.1	6	12	66.7
7436	13	1	92.9	8	10	55.6
2606	11	3	78.6	13	5	27.8
12916	13	1	92.9	7	11	61.1

Door twee of meer eiwitten te combineren in één test kan in theorie de betrouwbaarheid (sensitiviteit en specificiteit) van een test verbeterd worden. Tabel 3 toont de sensitiviteit en specificiteit van de tien mogelijke combinaties van twee eiwitten, uit de vijf eiwitten getoond in tabel 2, plus de combinatie van alle vijf eiwitten. In dit geval leverde de combinaties niet een duidelijke winst op. Door eiwit 12916 te combineren met eiwit 21221 werd de specificiteit wel iets beter (66,7%), waardoor niet-dracht iets beter te voorspellen zou zijn, maar werd de sensitiviteit lager (78,6%) dan met 12916 alleen.

Tabel 3 Het aantal en percentage correct geïdentificeerde dieren in de klasse drachtig of niet-drachtig op basis van een combinatie van 2, 5, of 'alle' eiwitten

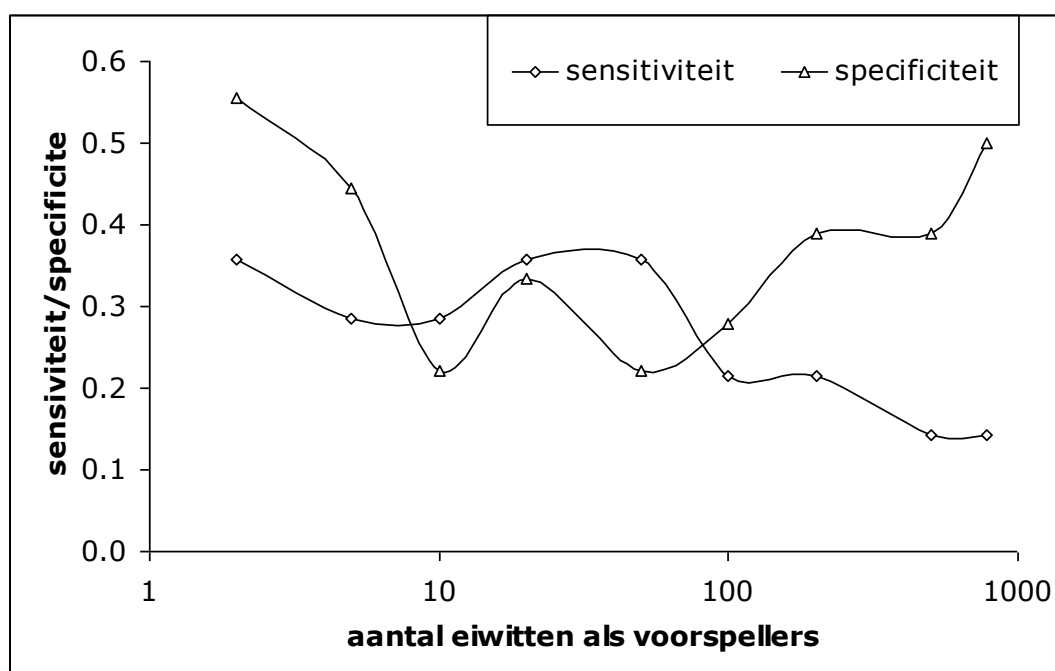
Eiwitten	Drachtige dieren (14)			Niet drachtige dieren (18)		
	Test: drachtig	Test: niet drachtig	% correct drachtig	Test: drachtig	Test: niet drachtig	% correct niet drachtig
12916 + 122814	8	6	57.1	8	10	55.6
12916 + 7436	9	5	64.3	7	11	61.1
122814 + 21221	6	8	42.9	7	11	61.1
122814 + 7436	10	4	71.4	11	7	38.9
122814 + 2606	8	6	57.1	6	12	66.7
21221 + 7436	10	4	71.4	8	10	55.6
21221 + 2606	8	6	57.1	6	12	66.7
21221 + 12916	11	3	78.6	6	12	66.7
7436 + 2606	10	4	71.4	10	8	44.4
2606 + 12916	13	1	92.9	7	11	61.1
Vijf*	9	5	64.3	8	10	55.6
Alle	1	13	7.1	11	7	38.9

* 122814 + 21221 + 7436 + 2606 + 12916

3.2 Data analyse met Ridge penalized partial least squares regression (RPLS)

Deze methode is een andere manier om combinaties van eiwitten te gebruiken in een test. Deze methode leidde echter niet tot een beter testresultaat (figuur 3). Bij hogere aantallen eiwitten is dit negatieve resultaat wel te verklaren door het (negatieve) effect van eiwitten die geen relatie hebben met het drachtkenmerk maar wel in de test worden meegenomen. Dit laatste effect was ook te zien in de analyse met de SELDI-TOF software als alle eiwitten werden gecombineerd. Met de RPLS methode waren ook de scores voor sensitiviteit en specificiteit met een combinatie van twee eiwitten minder goed dan de resultaten die waren verkregen met de SELDI-TOF software.

Figuur 3 De sensitiviteit en specificiteit, zoals bepaald met RPLS, van de voorspelling van drachtig en niet-drachtig (Y-as) op basis van verschillende aantallen melkeiwit voorspellers (X-as) op dag 21 na de inseminatie



4 Conclusies en aanbevelingen

De met de SELDI-TOF software verkregen sensitiviteit (maximaal 93%) en specificiteit (maximaal 67%) geven aan dat het theoretisch mogelijk moet zijn om melkeiwitten te gebruiken om drachtigheid bij melkvee in een vroeg stadium (dag 21) vast te stellen. Op basis van de concentratie van één eiwit in de melk, kon 93% van de drachtige dieren correct geïdentificeerd worden, en maximaal 67% van de niet-drachtige dieren. Je kunt er dus niet van op aan dat je die koe nog een keer moet insemineren.

De resultaten suggereren dat er eiwitten zijn waarvan de eiwitconcentraties in de melk van drachtige koeien anders zijn dan die in de melk van niet-drachtige koeien. Echter, op basis van de huidige resultaten kan nog geen betrouwbare drachtigheidstest ontwikkeld worden omdat de gevonden sensitiviteit (en specificiteit) nog te laag is (zijn). De grote spreiding in de concentratie van melkeiwitten tussen individuele dieren, zowel bij drachtige als niet-drachtige dieren, is hier debet aan.

De technologische ontwikkelingen van de afgelopen jaren maken het mogelijk om een drachtigheidstest, gebaseerd op de concentratie van meerdere eiwitten, in de markt te zetten. Er zijn technologieën voorhanden om de identiteit van markereiwitten eenduidig vast te stellen. Bovendien zijn er goedkope technologieën beschikbaar om de concentraties van meerdere eiwitten in een biologisch monster, zoals melk, tegelijk te meten.

Het project kennis heeft opgeleverd over de aanwezigheid van potentiële eiwitbiomarkers voor drachtigheid in melk van koeien op 21 dagen na inseminatie. Zulke biomarkers kunnen de basis vormen voor toekomstige drachtigheidstesten waarmee de tussenkalftijd van de veestapel verkort kan worden. Door de beschikbaarheid van zulke testen zal er minder tijd nodig zijn voor tochtdetectie.

4.1 Aanbevelingen

Om de voorspellende waarde van (combinaties van) melkeiwitten voor drachtigheid te verbeteren, zal een grotere steekproef dan van 32 dieren genomen moeten worden. Tevens zullen de eiwitprofielen dan niet op ingevroren maar op verse melk bepaald moeten worden, aangezien dat in de praktijk ook zal gebeuren. Hiermee sluiten we een mogelijk verstorend effect van het invriezen en ontdooien op de eiwitprofielen uit. Daarnaast zal de identiteit van de markereiwitten bepaald moeten worden.

5 Literatuur

- Ayad A. et al. Comparison of five radioimmunoassay systems for PAG measurement: Ability to detect early pregnancy in cows. (2007). *Reproduction in Domestic Animals* 42(4): 433-440.
- Bella A. et al. Western analyses of pregnancy-associated glycoprotein family (PAG) in placental extracts of various mammals. (2007). *Theriogenology* 68(7): 1055-1066.
- Flint, A. P. F. Dairy cow fertility: An inherited disease. (2006). *Cattle Practice* 14: 29-32.
- Ghaffari Laleh V et al. Measurement of EPF for detection of cow pregnancy using rosette inhibition test. *Theriogenology*. (2008). 70(1):105-7.
- Green et al. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. (2005). *Theriogenology* 63(5): 1481-1503.
- Moore K and WW Thatcher. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 2006; 89(4): 1254-1266.
- Poon TC. Opportunities and limitations of SELDI-TOF-MS in biomedical research: practical advices. *Expert Rev Proteomics*. 2007, 4(1):51-65.
- Reddy G and Dalmaso EA. SELDI ProteinChip(R) Array Technology: Protein-Based Predictive Medicine and Drug Discovery Applications. *J Biomed Biotechnol*. 2003(4):237-241.

5.1 Publicaties en kennisproducten uit project

Wetenschappelijk artikel 'Biomarkers in milk to predict pregnancy in dairy cattle' door H. Woelders, Y. de Haas, L. Kruijt, H.A. Mulder, H. Sulkers, en M. A. Smits. To be submitted to *Journal of Dairy Science* (2011)



Wageningen UR Livestock Research

Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad T 0320 238238 F 0320 238050

E info.livestockresearch@wur.nl | www.livestockresearch.wur.nl