

分类号:

密 级:

学 号: 20212013027

单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



奶牛胚胎早期死亡相关基因的筛选与功能验证

学 位 申 请 人	蒋佳旭
指 导 教 师	赵宗胜教授
申请学位门类级别	农学硕士
学 科 、 专 业 名 称	畜牧学
研 究 方 向	动物遗传育种与繁殖
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子
2026年6月

分类号：
学 号：20212013027

密 级：
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



奶牛胚胎早期死亡相关基因的筛选与功能验证

学 位 申 请 人	蒋佳旭
指 导 教 师	赵宗胜教授
申请学位门类级别	农学硕士
学 科、专 业 名 称	畜牧学
研 究 方 向	动物遗传育种与繁殖
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子
2026年6月

**Screening and functional validation of genes related to early embryo
death in dairy cows**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Agriculture

By

Jia-xu Jiang

(Animal Genetics, Breeding and Reproductions)

Dissertation Supervisor: Prof. Zong-sheng Zhao

May, 2026

Shihezi, Xinjiang, China

课题来源

兵团重大科技项目

项目名称：乳肉牛融合发展绿色养殖技术集成与示范项目

项目编号：2021AA004

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：蒋佳旭

时间：2026年5月22日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：蒋佳旭

时间：2026年5月22日

导师签名：赵明

时间：2026年5月22日

摘 要

目的：本文主要针对影响因素比较复杂的奶牛胚胎早期死亡问题，在对影响该性状遗传和非遗传因素深入分析的基础上，筛选出多个奶牛胚胎早期死亡相关基因及其 SNPs 并验证，构建奶牛早期胚胎死亡基因组 KASP 检测试剂盒，应用于生产实践，并在 KASP 分型基础上对早期胚胎死亡高风险奶牛和低风险奶牛进行代谢组分析，筛选并验证关键差异代谢物，以期找到降低奶牛早期流产率的方法，提高牛场经济效益。

方法：（1）分析新疆北疆部分地区的 6 个规模化奶牛场与胚胎早期死亡相关的繁殖指标，产后第 50 天开始做同期处理，人工授精后第 30-35 天进行第一次 B 超妊娠诊断（初检），第 60 天进行第二次 B 超妊娠诊断（复检），试验采集了奶牛总存栏约 9631 头（成母牛 5778 头）的 2021-2025 年期间的繁殖相关数据，统计了成母牛不同年度和月度初检受胎率，复检受胎率和流产率，探究影响牛场奶牛胚胎早期死亡率的非遗传因素；（2）在遗传因素方面，通过对前人研究基础上选择了 15 个早期胚胎死亡相关基因，通过 PCR-SSCP 及 DNA 测序方法在 350 头荷斯坦奶牛上进行了基因多态分析，选择多态表现较好的基因进一步分析其与奶牛早期胚胎死亡的相关性，运用 MPVA 分析确定相关性最强的聚合基因型组合，建立快速检测试剂盒并进行相关准确性验证；（3）基于 MPVA 筛选获得多基因聚合基因型，得到奶牛早期胚胎死亡高/低风险基因型组合，从高风险奶牛和低风险奶牛中筛选胚胎早期死亡的关键差异代谢物，并选择这个关键代谢物进行应用性验证。

结果：（1）对新疆石河子周边 6 个规模化奶牛场早期胚胎死亡相关的非遗传因素进行分析，发现所有牧场在 7-9 月份温度较高月份均呈现受胎率降低、流产率升高的规律，不同牛场间奶牛早期胚胎死亡发生率存在显著差异，在不同年份上饲养管理水平较高的奶牛场受胎率逐年提升。（2）通过 PCR-SSCP 与 Sanger 测序技术，发现 6 个多态性表现良好的基因，相关性分析筛选获得 VCAM1-56、PAG1-193、GAPDH-30 这 3 个与奶牛早期胚胎死亡显著相关的基因，针对奶牛早期胚胎死亡这一多基因调控复杂性状，筛选并确定高胚胎死亡风险基因型组合：VCAM1-56(CC)-PAG1-193(GG)-GAPDH-30(AT)，低胚胎死亡风险基因型组合：VCAM1-56(TT)-PAG1-193(GA)-GAPDH-30(AA)，可作为 KASP 试剂盒核心分型标记；（3）通过非靶向代谢组学筛选出与胚胎早期死亡高风险基因型相关的代谢物，包括溶血凝脂类、脂肪酸类及类固醇激素等，其中孕酮为最主要关键代谢物。通过肌肉注射孕酮，发现对低胚胎早期死亡风险聚合基因型奶牛，胚胎早期死亡情况变化不大，但可以明显提高高胚胎早期死亡风险聚合基因型奶牛胚胎存活率。

结论：（1）非遗传因素分析表明，不同牛场间奶牛早期胚胎死亡发生率存在显著差异，在不同

年份上饲养管理水平较高的奶牛场受胎率逐年提升。(2)成功构建奶牛早期胚胎死亡 KASP 快速检测试剂盒,且该试剂盒分型准确性与检测成功率均达 95.00%,为奶牛早期胚胎死亡风险筛查与分子育种提供实用技术支撑。(3)胚胎早期死亡高风险聚合基因型奶牛妊娠前进行孕酮注射处理,可以有效增加早期胚胎存活率,降低胚胎早期死亡风险。

关键词: 荷斯坦牛; 胚胎早期死亡; KASP; 试剂盒; 代谢组

Abstract

Object: This study focuses on early embryonic mortality in dairy cows, a trait influenced by complex factors. Based on an in-depth analysis of both genetic and non-genetic factors affecting this trait, we aimed to screen and validate multiple genes associated with early embryonic mortality in dairy cows and their SNPs, and to develop a KASP-based genomic detection kit for early embryonic mortality for practical application. Furthermore, based on KASP genotyping, metabolomic analysis was performed on dairy cows at high and low risk of early embryonic mortality to screen and validate key differential metabolites, with the goal of identifying methods to reduce early abortion rates in dairy cows and improve the economic efficiency of dairy farms.

Methods: (1) Reproductive indicators associated with early embryonic mortality were analyzed in six large-scale dairy farms located in northern Xinjiang. The postpartum day 50 marks the start of synchronization treatment. Artificial insemination is followed by the first B-mode ultrasound pregnancy diagnosis (initial examination) at 30 – 35 days post-insemination, and the second B-mode ultrasound pregnancy diagnosis (follow-up examination) at 60 days post-insemination. Reproductive data were collected from a total herd of approximately 9,631 cows (including 5,778 adult cows) over the period from 2021 to 2025. The rates of initial pregnancy diagnosis, follow-up pregnancy diagnosis, and abortion in adult cows were calculated across different years and months to investigate non-genetic factors influencing early embryonic mortality in dairy cows. (2) On the genetic front, based on previous research, 15 genes associated with early embryonic mortality were selected. Gene polymorphism analysis was performed in 350 Holstein dairy cows using PCR-SSCP and DNA sequencing. Genes with favorable polymorphism were selected for further analysis of their association with early embryonic mortality in dairy cows. MPVA was used to identify the polygenic genotype combination with the strongest correlation, and a rapid detection kit was subsequently developed, followed by validation of its accuracy. (3) Based on the polygenic genotypes screened by MPVA, high-risk and low-risk genotype combinations for early embryonic mortality in dairy cows were obtained. Key differential metabolites associated with early embryonic death were then identified by comparing high-risk and low-risk cows, and these key metabolites were selected for applicability validation.

Results:(1) An analysis of non-genetic factors associated with early embryonic mortality was conducted in six large-scale dairy farms around Shihezi, Xinjiang. The results showed that all farms exhibited a pattern of decreased conception rates and increased abortion rates during the hotter months from July to September. Significant differences in the incidence of early embryonic mortality were observed among different farms. Furthermore, farms with higher levels of feeding and management showed improved conception rates over the years. (2) Using PCR-SSCP and Sanger sequencing technologies, six genes with favorable polymorphism were identified. Through correlation analysis, three genes VCAM1-56, PAG1-193, and GAPDH-30 were found to be significantly associated with early embryonic mortality in dairy cows. For this complex trait regulated by multiple genes, high-risk and low-risk polygenic genotypes for early embryonic mortality were screened and determined as follows: high-risk genotype combination: VCAM1-56(CC)-PAG1-193(GG)-GAPDH-30(AT);low-risk genotype combination: VCAM1-56(TT)-PAG1-193(GA)-GAPDH-30(AA). These combinations can serve as core genotyping markers for a KASP assay kit. (3) Through non-targeted metabolomics, metabolites associated with the high-risk genotype for early embryonic mortality were screened, including lysophospholipids, fatty acids, and steroid hormones, among which progesterone was identified as the most critical metabolite. Following intramuscular injection of progesterone, it was found that while the incidence of early embryonic mortality remained largely unchanged in dairy cows with the low-risk polygenic genotype, progesterone significantly improved the embryonic survival rate in dairy cows carrying the high-risk polygenic genotype for early embryonic mortality.

Conclusion:(1) Analysis of non-genetic factors indicated that the incidence of early embryonic mortality in dairy cows varied significantly among different farms. Furthermore, farms with higher levels of feeding and management showed improved conception rates over the years. (2) The KASP rapid detection kit for early embryo death of dairy cows was successfully constructed, and the typing accuracy and detection success rate of the kit were 95.00%, which provided practical technical support for early embryo death risk screening and molecular breeding of dairy cows. (3) Progestin injection before pregnancy can effectively increase the survival rate of early embryos and reduce the risk of early embryo death in dairy cows with high risk of early embryo death.

Key words:Holstein cattle; Early embryonic death; KASP; test kit; Metabolic panel

目录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第 1 章 绪论.....	1
1.1 研究目的与意义.....	1
1.2 奶牛早期胚胎死亡.....	2
1.2.1 奶牛早期胚胎死亡及流行情况.....	2
1.2.2 奶牛早期胚胎死亡的影响因素.....	2
1.2.3 奶牛早期胚胎死亡的早期诊断.....	3
1.2.4 奶牛早期胚胎死亡相关功能调控基因.....	4
1.3 MPVA 分析及 KASP 技术在复杂性状中的研究与应用.....	5
1.3.1 MPVA 分析在复杂性状中的研究与应用.....	5
1.3.2 KASP 技术在复杂性状中的研究与应用.....	6
1.4 代谢组学挖掘疾病早期诊断生物标志物.....	6
1.5 研究内容.....	7
1.5.1 规模化奶牛场奶牛早期胚胎死亡流行病学规律与影响因素分析.....	7
1.5.2 奶牛早期胚胎死亡相关候选基因多态性与多基因聚合效应分析.....	7
1.5.3 奶牛早期胚胎死亡 KASP 基因组检测试剂盒的构建与性能验证.....	8
1.5.4 奶牛早期胚胎死亡早期血液代谢物筛选及验证.....	8
1.6 技术路线.....	8
第 2 章 奶牛早期胚胎死亡非遗传因素分析.....	10
2.1 材料与方法.....	10
2.1.1 调查奶牛场的饲养管理基本概况.....	10
2.1.2 调查方法.....	11
2.2 结果与分析.....	12
2.2.1 奶牛怀孕与流产 B 超图像.....	12
2.2.2 各牛场不同年份和月份初检受胎率分析.....	13
2.2.3 各牛场不同年份和月份复检受胎率分析.....	16
2.2.4 各牛场不同年份和月份流产率分析.....	19

2.3 讨论	22
2.3.1 奶牛场奶牛配后初检和复检怀孕率分析	22
2.3.2 奶牛场不同年度和月度的流产率分析	23
2.3.3 奶牛场流产胎儿和症状	23
2.4 小结	24
第 3 章 奶牛早期胚胎死亡遗传分析	25
3.1 材料与方法	25
3.1.1 材料	25
3.1.2 方法	26
3.2 结果	29
3.2.1 PCR 扩增结果	29
3.2.2 基因多态性检测	29
3.2.3 荷斯坦奶牛不同基因 SNP 位点遗传特性分析	30
3.2.4 不同基因及 SNPs 对奶牛早期胚胎死亡关联分析	32
3.3 讨论	32
3.3.1 候选基因单标记多态性与奶牛早期胚胎死亡的关联分析	32
3.3.2 <i>VCAMI</i> 基因	33
3.3.3 <i>PAG1</i> 基因	33
3.3.4 <i>GAPDH</i> 基因	34
3.4 小结	34
第 4 章 早期胚胎死亡基因组检测试剂盒的研发与验证	35
4.1 材料与方法	35
4.1.1 试验材料	35
4.1.2 试验方法	36
4.2 结果	37
4.2.1 多基因聚合分析 (MPVA) 结果及风险等级划分	37
4.2.2 KASP 分型验证结果	39
4.2.3 奶牛早期胚胎死亡 KASP 基因组检测试剂的构建	40
4.2.4 试剂盒分型准确性验证	42
4.2.5 试剂盒临床预测有效性验证	42
4.3 讨论	43

4.3.1 多基因聚合分析对奶牛早期胚胎死亡的调控效应	43
4.3.2 KASP 检测试剂盒的构建	44
4.3.3 试剂盒的准确性与临床应用价值	44
4.4 小结	44
第 5 章 基于代谢组学筛选奶牛早期胚胎死亡的关键差异代谢物	46
5.1 材料与方法	47
5.1.1 主要试剂	47
5.1.2 主要仪器	47
5.1.3 试验动物	47
5.1.4 试验方法	48
5.2 结果	50
5.2.1 代谢物鉴定及分析	50
5.2.2 多元统计分析	51
5.2.3 差异代谢物的筛选	52
5.2.4 差异代谢物相关性分析	53
5.2.5 KEGG 富集分析	54
5.2.6 关键代谢物筛选及分析	55
5.2.7 孕酮对奶牛早期胚胎死亡的应用效果	58
5.3 讨论	59
5.3.1 奶牛胚胎早期死亡风险相关的代谢物分析	59
5.3.2 孕酮对早期胚胎死亡的应用效果	60
5.4 小结	61
第 6 章 全文总结	62
第 7 章 创新点	63
参考文献	64
致谢	71
作者简介	72

第1章 绪论

1.1 研究目的与意义

新疆作为我国优质农产品重要供给基地，奶牛饲养生产规模持续扩大，饲养量稳步增长，产业经济效益显著提升。尽管如此，早期胚胎死亡（Early Embryonic Death, EED）问题仍然存在，并持续成为影响奶牛养殖业提升质量与效益的重要制约因素。胚胎早期死亡是影响奶牛繁殖力的关键因素，而繁殖率直接决定牧场经济效益的高低，造成奶牛场的产奶量降低、产犊量下降、产犊间隔延长、饲养管理成本增加等负面影响^[1]。

近年来，中国荷斯坦奶牛为适应高产的生产环境，身体机能和代谢状态发生了变化，繁殖系统功能受到潜在影响^[2]。当前我国规模化奶牛场的受精率约为90%，但产犊率仅维持在70%~80%，生产中约40%~60%的胚胎会发生丢失或死亡^[3]，奶牛的胚胎期为受孕至妊娠第42d，胎儿期为妊娠第42d至分娩，早期胚胎死亡特指妊娠1个月内的胚胎死亡，又称胚胎吸收或早期胚胎消失，奶牛胚胎死亡率可达38%，临床主要表现为奶牛屡配不孕或返情延迟。然而，早期胚胎死亡的诱因复杂，涵盖营养水平、繁殖疾病、细菌病毒感染、胚胎着床障碍等多个维度，其中营养、疫病等外源因素可通过优化饲养管理、药物防控及疫苗防控等措施缓解，但激素分泌、胚胎着床等内源性因素与基因表达密切相关^[4]。目前，国内外关于奶牛早期胚胎死亡的遗传研究多集中于单基因单位点分析，多基因聚合效应研究不足，缺乏早期胚胎死亡风险分子标记；同时，现有研究尚未将基因组多态性与代谢组学标志物联合分析，早期胚胎死亡的早期筛查技术体系尚未健全。

因此，本研究拟以新疆石河子周边规模化奶牛场荷斯坦奶牛为研究对象，系统开展早期胚胎死亡流行病学调查，明确本地奶牛早期胚胎死亡的发生规律与关键影响因素；筛选早期胚胎死亡相关候选基因，并采用PCR-SSCP开展多态性检测，通过多基因聚合分析和KASP技术确定早期胚胎死亡高风险基因型组合，建立高通量基因分型方法；同时开展代谢组学检测，筛选与早期胚胎死亡抗性/易感基因显著关联的代谢标志物。为奶牛早期胚胎死亡的早期筛查、精准防控与分子标记辅助育种提供理论依据和技术支撑，对降低奶牛早期胚胎死亡率、提升牧场繁殖效率与经济效益具有重要的实践意义。

1.2 奶牛早期胚胎死亡

1.2.1 奶牛早期胚胎死亡及流行情况

影响奶牛繁殖的重要因素之一为奶牛的早期隐性流产。Humblot^[5]根据妊娠失败发生的时间阶段,将其划分为不同类型:将输精后24d内发生的妊娠终止定义为超早期胚胎死亡;发生于输精后24d至42d之间的妊娠失败,则归类为早期胚胎死亡;而若妊娠在50d之后终止,则称为胎儿死亡。从发生时间上来看,配种后17d以内大约80%的奶牛会发生超早期胚胎死亡,配种后17~42d有10%~15%的可能性发生早期胚胎死亡,配种后42d有5%的概率发生胎儿死亡^[6]。对于奶牛场来说,奶牛流产是很严重的现象,所以发现奶牛流产的情况尤其是早期胚胎死亡时期^[7],还可以进行补救来减少损失,但是未发现奶牛早期隐性流产时将会给奶牛场带来严重损失。有研究^[8]显示新西兰奶牛受精率很高,几乎接近90%,但是最终产犊的情况确很少,经统计产犊率不到一半,且整体呈现一定的下降趋势,在不同产奶水平的奶牛群体中,中产奶牛与高产奶牛均存在胚胎发育异常的问题,但关键问题主要集中在早期胚胎发育阶段,其中怀孕前3周胚胎死亡率到达了一个很高的水平。

据调查,全球范围内有20%~40%的奶牛在授精后会发生受精卵无法成功发育的状况,常被认定为繁殖失败,其中70%的繁殖失败均可归因于胚胎早期丢失^[9]。相较而言,我国奶牛胚胎早期死亡状况更为严峻,部分规模化奶牛场高达30%。新疆是我国重要奶牛养殖基地,早期胚胎死亡的发生及缺乏有效综合防控手段的问题普遍存在。据调查,新疆沙湾县某规模化奶牛场2022-2023年早期胚胎死亡的总发生率为28.75%-30.02%,其中68.52%的早期胚胎死亡主要集中在配种后35~45d^[3]。

1.2.2 奶牛早期胚胎死亡的影响因素

影响早期胚胎死亡的因素较为复杂,涉及多个方面,主要包括营养供给状况、生殖系统相关疾病、细菌或病毒的侵染、机体激素水平的波动以及胚胎着床过程等^[10]。对荷斯坦奶牛而言,外部因素影响而造成的奶牛流产可以采取避免。但激素分泌,胚胎着床等内源性因素与相关基因的表达密切联系,其实质在于遗传因素所致的生理性差异^[11]。

造成奶牛早期胚胎死亡的遗传因素主要是基因缺陷。亲本染色体畸变或结构异常,

会导致胚胎因遗传障碍而无法发育^[12]。King 等^[13]研究发现,在奶牛妊娠时期的前 5 d 内,相关致死基因的表达会导致奶牛早期胚胎死亡。赵学文^[14]研究发现奶牛胚胎死亡原因包括遗传、内分泌机能紊乱、病原体微生物等因素,并针对不同因素采取相关措施。一项关于新疆某规模化奶牛场的调查发现,早期胚胎死亡发生也有环境应激、繁殖疾病、营养水平和病原感染的原因。其中冷热环境造成的应激是最主要因素占 29.77%, BVDV 和弓形虫感染等因素占比最低为 1.51%,且引起早期胚胎死亡的原因分类占比在不同年份无显著差异^[3]。新疆夏季高温干燥,防暑降温措施不当易引发热应激,导致奶牛采食量下降、内分泌失调,卵子质量降低,同时子宫内环境紊乱,温度升高,胚胎着床附植和发育受阻,胚胎死亡风险升高^[15]。环境应激、营养水平等外源性因素解释了四季变化、饲料更替等外界环境改变造成的奶牛群体性早期胚胎死亡发生率的变化。然而,生产实践中,同一牧场奶牛的饲养管理水平高度一致,奶牛早期胚胎死亡发生却存在鲜明的个体差异,而这种现象似乎更取决于遗传背景的差异。

1.2.3 奶牛早期胚胎死亡的早期诊断

在基层兽医临床实践中,直肠触诊法作为常规妊娠诊断技术被广泛应用。操作者经直肠路径实施手臂完全插入后,可对母牛生殖系统关键结构(包括卵巢组织、子宫形态及胎盘子叶等)进行触诊评估。通过触觉反馈获取的器官空间定位、体积变化及组织形态学特征,构成妊娠判定的主要诊断依据。一般若卵巢表面形成有弹性的部分突出于卵巢表面的组织,一般为 3~4cm 直径,为妊娠黄体。高树等^[16]统计发现 B 超检查的准确性比应用直肠检查的准确性高,应用直肠检查的准确率只有 50%,而 B 超检查的准确性能达到 80%。虽然直肠检查的准确率不高,但对突出卵巢表面的黄体有一定的准确率,可以作为辅助检查手段之一。

B 型超声又称辉度调制型超声诊断法,利用压电换能器(探头)发射高频超声波(2-20MHz)对组织器官扫查成像。B 型超声是判断奶牛早期妊娠情况最常用的一种方法,其通过直肠探头探查妊娠奶牛的子宫内膜,以及子宫内胚胎的图像来判断奶牛的妊娠情况。用 B 型超声诊断奶牛妊娠情况有一些优势,可以更直观的观察奶牛子宫内的情况,且图像清晰准确,可以让奶牛场繁育人员早发现奶牛妊娠问题,以此避免未发现奶牛早期隐性流产带来的损失,曾义夫等^[17]通过直肠路径对新疆某奶牛场不同发情周期阶段的上百头泌乳奶牛,利用便携式 B 型超声仪及多普勒彩色超声诊断仪对黄体进行扫查,观察并记录具有典型特征黄体声像图,并对图像进行存储,为国内相关试验的黄体评估