

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00486

# SNP 标记对角膜混浊小鼠 突变相关基因的精细定位

蒋荧梅<sup>1</sup>, 刘春<sup>2</sup>, 吴刘成<sup>1</sup>, 邵义祥<sup>1,2</sup>

1. 南通大学实验动物中心, 南通 226001;
2. 南通大学比较医学研究所, 南通 226001

**摘要:** 为深入研究前期工作中以 ENU 诱变技术建立的遗传性角膜混浊突变系小鼠(B6-Co)的遗传机制, 利用 SNP 标记对其突变基因进行精细定位, 将该品系中具有角膜混浊表型的小鼠(B6-CoP)与 DBA/2 小鼠(简称 D2)配种得到 F<sub>1</sub> 代, 再回交 D2 亲本品系得到 F<sub>2</sub> 代, 提取 F<sub>2</sub> 代角膜混浊小鼠鼠尾 DNA。在 MGI 数据库选取小鼠 13 号染色体已定位区间附近 5 个在 C57BL/6(简称 B6)和 D2 两个品系之间有差异的 SNP, 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术及连锁分析方法对 B6-Co 小鼠突变基因进行精细定位。结果表明: B6-Co 小鼠突变基因定位于 13 号染色体上 112 546 283~113 397 654 bp 之间, 因该区间内有 5 个已知基因, 其中 *Map3k1* 基因与小鼠眼睛形态生成和眼睑闭合密切相关, 提示 *Map3k1* 是 B6-Co 小鼠突变的强力候选基因。

**关键词:** SNP; 角膜混浊小鼠; 突变基因; 基因定位

## Fine mapping of mutant gene related corneal opacity mouse with SNPs

JIANG Ying-Mei<sup>1</sup>, LIU Chun<sup>2</sup>, WU Liu-Cheng<sup>1</sup>, SHAO Yi-Xiang<sup>1,2</sup>

1. Laboratory Animals Centre, Nantong University, Nantong 226001, China;
2. Institute of Comparative Medicine, Nantong University, Nantong 226001, China

**Abstract:** To further investigate the genetic mechanism of the mutant mice(B6-Co) with hereditary corneal opacity phenotype obtained by ENU-induced mutagenesis from B6 in previous study, SNP markers were used to map the mutant gene of B6-Co mice. F<sub>2</sub> generation mice were bred by backcrossing (B6-CoP×D2 )F<sub>1</sub> with D2 and the DNA samples of F<sub>2</sub> mutant mice were extracted from the tails. Five SNP sites that showed differences between B6 and D2 strains nearby the located region on chromosome 13 were screened from MGI database. Five SNPs, PCR-RFLP and linkage analyses were carried out to map the mutant gene. The result showed that the mutant gene was located between 112 546 283~113 397 654 bp on chromosome 13. There are five identified genes including *Map3k1* that is associated with eye morphogenesis and eyelid closure of mouse in this region. This suggests that *Map3k1* is the most probable candidate mutant gene of B6-Co mice.

**Keywords:** SNP; corneal opacity mice; mutant gene; gene mapping

角膜混浊是人类常见的一种角膜病, 是我国致盲的主要眼病之一。人类许多角膜混浊的发生与遗传因素有关或存在家族史, 在部分家系表现为常染色体显性遗传, 但其遗传基础尚不明确, 因而研究

角膜混浊的遗传机制具有重要的意义。由于人类遗传性角膜病的研究工作中存在家系收集困难、世代间隔周期长、不可控制等限制因素, 因此, 需要通过模式动物来完成对角膜混浊相关基因的定位及克隆,

收稿日期: 2009-09-29; 修回日期: 2009-12-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30671081)、江苏省自然科学基金项目(编号: BK2007062)和南通大学博士科研启动基金项目(编号: 07B20)资助

作者简介: 蒋荧梅(1982-), 女, 硕士研究生, 专业方向: 疾病动物模型。Tel: 13962751072; E-mail: jym1030@ntu.edu.cn

通讯作者: 邵义祥(1956-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 疾病动物模型。Tel: 0513-85051545; E-mail: shaoyx@ntu.edu.cn

再同源检索得到人类相关基因。邵义祥等<sup>[1]</sup>应用 ENU 诱变技术获得了能世代相传、具有角膜混浊表型的突变系小鼠(C57BL/6-Corneal opacity mouse, B6-Co 小鼠),经遗传学研究证实该品系小鼠为单基因显性遗传。B6-Co 品系小鼠中角膜混浊发生率约占 43.1%且相对稳定,并且发现部分初生小鼠眼睑异常,与角膜混浊存在着某种程度的关联。前期研究结果表明: B6-Cop 小鼠(指具有角膜混浊表型的小鼠)角膜的动态病理变化与人类角膜炎病理变化过程相似<sup>[2]</sup>,是研究人类角膜混浊的良好动物模型。

邵义祥等<sup>[1]</sup>将 B6-Co 小鼠突变基因初步定位于小鼠 13 号染色体上距着丝粒约 65.2 cM 附近。王新蕾<sup>[3]</sup>继续选用 3 个微卫星分子标记将突变基因进一步定位于 13 号染色体上距着丝粒约 64.6 cM 附近,但仍未达到精细定位要求。由于 13 号染色体该区域可用微卫星标记有限,很难通过微卫星标记来进一步精细定位突变基因,因此本研究改用单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)分子标记对突变基因进行精细定位,为下一步找到突变候选基因提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

8~10 周龄的 B6-CoP 小鼠,雌雄各 30 只;成年 DBA/2 小鼠(简称 D2)和 C57BL/6(简称 B6)小鼠各若干只,雌雄皆用,由南通大学实验动物中心提供。小鼠饲养在清洁级屏障动物房内,室内温度控制在 23±2℃,湿度控制在 55±5%,饲料采用 Co<sup>60</sup> 辐照,自由采食和饮水,定期更换笼具、垫料;室内照明采用 14:10 h 明暗交替。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 F<sub>2</sub> 代突变小鼠的繁殖及表型关联分析

将 B6-CoP 小鼠与正常 D2 小鼠配种得到具有突变表型的 F<sub>1</sub>,再将 F<sub>1</sub> 代突变鼠回交 D2 亲本品系得到 F<sub>2</sub>,在离乳时筛选出具有突变表型的个体备用。同时,随机选择 40 窝初生小鼠,对其眼睑进行表型鉴定后分别哺乳(同窝仔鼠中只留取眼睑异常或正常的),离乳时再鉴定成活小鼠的表型,观察角膜混浊与初生小鼠眼睑异常的对应关系。

#### 1.2.2 样本 DNA 的准备

剪取 F<sub>2</sub> 代角膜混浊小鼠尾尖,参照《分子克隆实验指南》<sup>[4]</sup>的方法提取尾尖 DNA 并检测 DNA 纯度。所用试剂购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

#### 1.2.3 定位标记的选择

查询小鼠基因组数据库(<http://www.informatics.jax.org/>, MGI),在小鼠 13 号染色体距着丝粒 64.6 cM 附近寻找合适的 SNP 标记,要求该 SNP 在 B6 和 D2 这两个品系的小鼠间有差异,并且由于 SNP 的不同能够被酶切位点所识别。

#### 1.2.4 SNP 侧翼序列的扩增

在筛选到的 SNP 侧翼序列设计并合成引物,进行 PCR 扩增,引物信息见表 1。PCR 扩增体系为 25 μL: 灭菌去离子水 19.35 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 1.5 μL, dNTP (各 10 mmol/L) 0.5 μL, 上、下游引物(50 μmol/L)各 0.2 μL, 基因组 DNA 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 复性温度(表 1)30 s, 72℃ 延伸 45 s, 36 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 扩增试剂盒、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker 及引物合成均由上海生工生物工程技术服务有限公司提供。

#### 1.2.5 PCR 扩增产物检测及酶切

取 5 μL PCR 扩增产物,用 1%琼脂糖凝胶电泳(100 V, 40 min),EB 染色,凝胶成像系统观察结果并记录。

对 PCR 产物进行限制性内切酶(*Eco*T22 I、*Hae* II、*Rsa* I、*Acc* II)处理,反应体系参照说明书。酶切后产物取 10 μL,经 2%琼脂糖凝胶电泳(100 V, 40 min),EB 染色,凝胶成像系统观察结果并记录。

#### 1.2.6 连锁分析

F<sub>2</sub> 代具有角膜混浊表型小鼠同时具有 B6 和 D2 两个品系 SNP 分子标记的,说明该 SNP 与突变基因连锁,只有 D2 品系 SNP 分子标记的为重组。我们所选择的限制性内切酶识别的都是 D2 品系小鼠的 SNP,所以酶切产物电泳后出现 3 条带为连锁,两条带为重组。连锁分析原理见图 1。

表 1 扩增 SNP 侧翼序列的引物

| SNP 名称     | 引物编号 | 引物序列(5' 3')   | 复性温度(℃) |
|------------|------|---|---------|
| rs29235242 | 860  | F: TCGTAAGCCAAAGTCCTC<br>R: CCTCTAACACTGGTCCCT        | 55      |
| rs29492976 | 254  | F: ACTGACTGTGGGGTCTGCCT<br>R: CCCTCTTAACCTTTGCCTTG    | 58      |
| rs29620530 | 339  | F: GAGTAAACAGAGCCTCAGCCAG<br>R: AGGTGTTCTTCTCTGTGTTCG | 58      |
| rs29778277 | 404  | F: CTAAGACAAGGTTGCCCGAG<br>R: ACCGTGTGGACGCTAAGACT    | 58      |
| rs13466915 | 709  | F: GGGAGGTTAAGGAAGAAGGA<br>R: CGCTGGATGCAAGGGACTGA    | 58      |

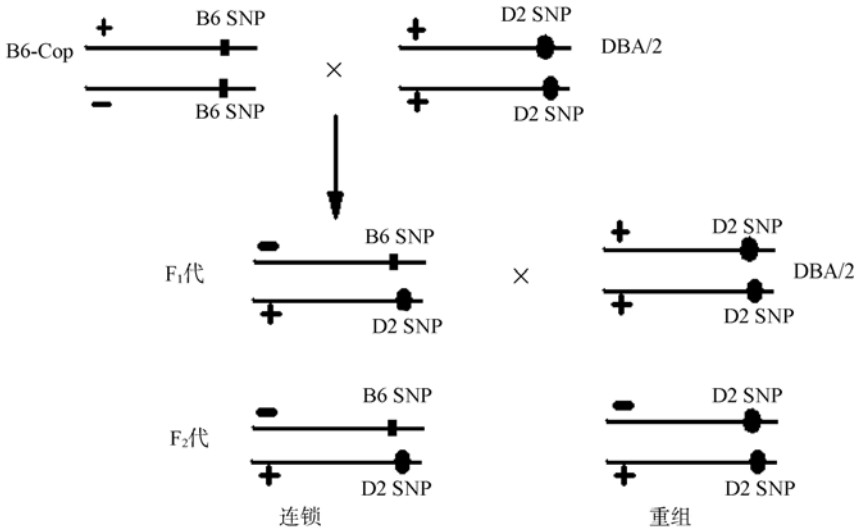


图 1 小鼠连锁分析示意图

## 2 结果与分析

### 2.1 表型关联分析结果

对 40 窝新生小鼠进行统计和观察结果表明: 20 窝小鼠共产仔 126 只, 其中眼睑开裂的 54 只, 仅保留眼睑开裂仔鼠, 离乳时存活 48 只, 全部具角膜混浊表型; 另 20 窝共产仔 129 只, 其中眼睑开裂的 58 只, 眼睑正常的 71 只, 仅保留眼睑正常的小鼠, 离乳时存活 70 只, 均未发现角膜混浊。说明出生时眼睑开裂与角膜混浊存在着对应关系。

### 2.2 分子标记 SNP 的查找筛选结果

经 MGI 数据库检索, 在小鼠 13 号染色体距着丝粒 64.6 cM 附近, 找到 13 个在 B6 和 D2 品系间有差异的 SNP, 再通过 Primer premier 5 软件对这 13 个 SNP 进行限制性内切酶位点筛选, 得到了 5 个合适

的 SNP(表 2), 这 5 个 SNP 位点的碱基在 D2 品系中可被酶切, 而在 B6 品系中则不能被酶切。对这 5 个 SNP 侧翼序列进行扩增并酶切验证, 结果表明这 5 个 SNP 可用于该突变系小鼠突变基因的连锁分析。所选 SNP 侧翼序列的 PCR 扩增产物长度及酶切产物长度结果见表 2。

### 2.3 精细定位结果

提取 350 只 F<sub>2</sub> 代小鼠鼠尾 DNA, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 1.6~1.9 之间, 纯度较高, 无污染。DNA 经 PCR 扩增、限制性内切酶酶切并电泳, 电泳图中观察到两条带的样本记为重组, 3 条带的样本记为连锁。PCR 扩增及酶切结果见图 2。

连锁分析结果见表 3, 分析结果显示 B6-Co 小鼠突变基因位于 13 号染色体上 112 546 283~113 397 654 bp 之间(图 3)。

表 2 SNP 及限制性内切酶筛选结果

| SNP 名称     | PCR 产物长度(bp) | 染色体位置(bp)        | SNP 位点 | B6 | 限制性内切酶           | 酶切位点               | 酶切后长度(bp) |
|------------|--------------|------------------|--------|----|------------------|--------------------|-----------|
| rs29235242 | 568          | Chr13: 108601185 | Y=C/T  | C  | <i>Eco</i> T22 I | ATGCA <sup>T</sup> | 295/273   |
| rs29492976 | 484          | Chr13: 112546283 | R=A/G  | A  | <i>Hae</i> II    | RGCGC <sup>Y</sup> | 267/217   |
| rs29620530 | 532          | Chr13: 113397654 | S= C/G | G  | <i>Hae</i> II    | RGCGC <sup>Y</sup> | 277/255   |
| rs29778277 | 474          | Chr13: 114047280 | R=A/G  | G  | <i>Rsa</i> I     | GT <sup>A</sup> AC | 272/202   |
| rs13466915 | 468          | Chr13: 117095622 | Y=C/T  | T  | <i>Acc</i> II    | CG <sup>A</sup> CG | 290/178   |

注: 表中加粗的碱基为被限制性内切酶识别的 SNP 位点, 均属于 D2 品系。

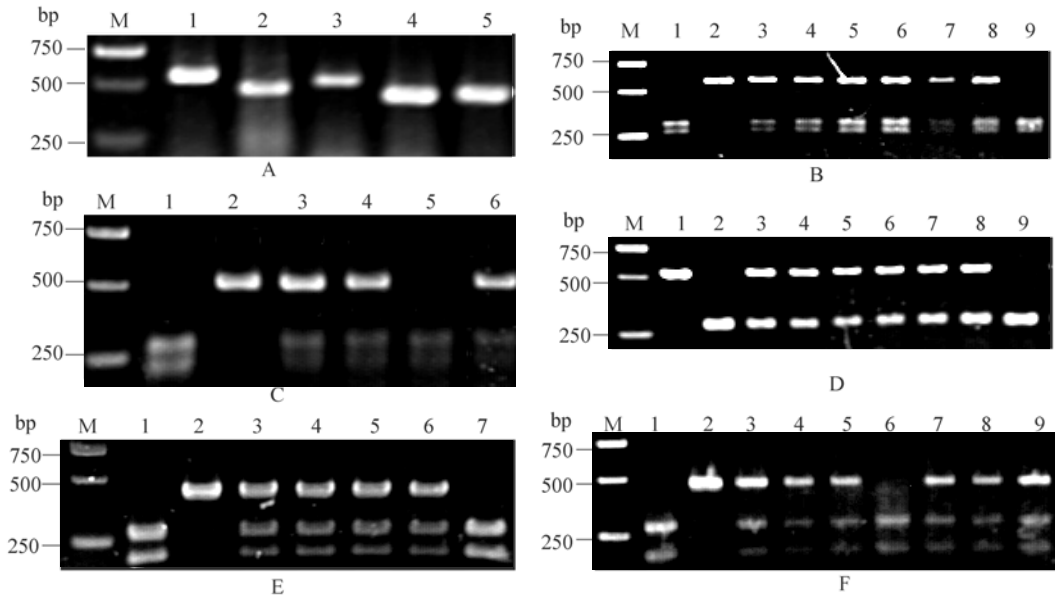


图 2 SNP 侧翼序列 PCR 扩增及酶切结果

A: SNP 侧翼序列 PCR 扩增产物电泳图(M: DNA Marker; 1: rs29235242; 2: rs29492976; 3: rs29620530; 4: rs29778277; 5: rs13466915); B: SNP rs29235242 酶切结果(M: DNAMarker; 1: D2 对照; 2: B6 对照; 3: F<sub>1</sub> 对照; 4~8: 各连锁; 9: 重组); C: SNP rs29492976 酶切结果(M: DNA Marker; 1: D2 对照; 2: B6 对照; 3: F<sub>1</sub> 对照; 4、6: 连锁; 5: 重组); D: SNP rs29620530 酶切结果(M: DNA Marker; 1: B6 对照; 2: D2 对照; 3: F<sub>1</sub> 对照; 4~8: 连锁; 9: 重组。酶切后 295 bp 和 273 bp 比较接近, 所以电泳时两条带几乎重叠。); E: SNP rs29778277 酶切结果(M: DNA Marker; 1: D2 对照; 2: B6 对照; 3: F<sub>1</sub> 对照; 4~6: 连锁; 7: 重组); F: SNP rs13466915 酶切结果(M:DNA Marker; 1: D2 对照; 2: B6 对照; 3: F<sub>1</sub> 对照; 4、5、7~9: 连锁; 6: 重组)。

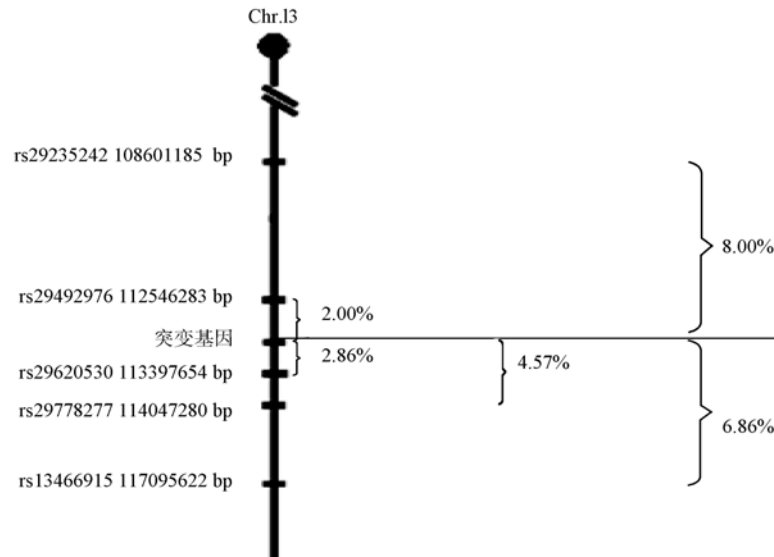


图 3 SNP 分子标记连锁分析示意图

左侧为各 SNP 及其染色体位置, 右侧为各 SNP 重组率。

表 3 SNP 分子标记连锁分析结果

| SNP 名称     | 染色体位置(bp) | 样本数 | 重组数 | 重组率(%) |
|------------|-----------|-----|-----|--------|
| rs29235242 | 108601185 | 350 | 28  | 8.00   |
| rs29492976 | 112546283 | 350 | 7   | 2.00   |
| rs29620530 | 113397654 | 350 | 10  | 2.86   |
| rs29778277 | 114047280 | 350 | 16  | 4.57   |
| rs13466915 | 117095622 | 350 | 25  | 6.86   |

### 3 讨论

#### 3.1 SNP 在基因定位与基因功能研究中的应用

SNP 在人类基因组中广泛存在、数量众多、高度稳定,尤其是处于编码区的 SNP(cSNP)更为稳定。部分位于基因内部的 SNP 可能会直接基因表达,本身也可能就是疾病遗传机制的候选改变位点。SNP 还具有易于进行自动化分析的优势,所以在基因定位、基因功能的研究等许多方面有着广泛的应用。Horikawa 等<sup>[5]</sup>应用 SNPs 作为遗传标记通过基于连锁不平衡的关联分析在墨西哥裔美国人中把 2 型糖尿病定位在 2 号染色体长臂末端,并发现钙离子中性蛋白酶基因(*CAPN10* 基因)的一个 SNP 与 2 型糖尿病有关系;关洪英等<sup>[6]</sup>报道鸡的 *MD*(Malate dehydrogenase, 苹果酸脱氢酶)基因第 235 bp 处的 SNP 与鸡的生长和体组成性状相关;翟光华等<sup>[7]</sup>通过对人载脂蛋白 A5 基因(*APOA5*)-*1131T/C* 多态性研究发现 *CC* 纯合子患糖尿病的风险比 *TT* 纯合子的显著增高;郭晓令等<sup>[8]</sup>对 *SIMI*(Single-minded 1)基因外显子 8 的 780 bp 处 SNP 在不同品种猪的分布研究发现该 SNP 与猪的脂肪沉积密切相关;徐倩等<sup>[9]</sup>对辽宁地区人群粘蛋白 *MUC1* 基因 568 位点 *A/G* 多态的分布特征进行了检测,发现携带 *MUC1AA* 基因型个体胃癌的发病风险提高。

本实验利用 SNP 标记的多态性特点,结合限制性内切酶的应用,进行 SNP 与突变基因的连锁分析,把 B6-Co 小鼠突变基因精细定位于 13 号染色体上 112 546 283~113 397 654 bp 之间,长度 851 372 bp,小于 0.5 cM(1 cM 约 200 万 bp)。既验证了王新蕾<sup>[3]</sup>利用微卫星标记定位的结果,又达到了将突变基因精细定位的要求,为突变基因的进一步克隆验证奠定了基础。

#### 3.2 候选基因 *Map3k1* 的提出

在突变基因定位区间内共有 5 个已知基因,分

别是 *Ankrd55*、*Ddx4*、*Il31ra*、*Il6st*、*Map3k1*。*Ankrd55* 基因产物是锚蛋白重复序列模体(Ankyrin repeat motif)家族成员之一,其功能主要是参与蛋白质之间的相互作用;*Ddx4* 基因编码 DEAD 框蛋白,与胚胎生成、精子发生及细胞生长和分裂有关;*Il31ra* 基因表达产物主要传导活化的淋巴细胞表达的白介素-31(IL-31);*Il6st* 产物又叫糖蛋白 130(gp130),具有细胞因子受体活性,在蛋白质结合中起重要作用。

*Map3k1* 基因的表达产物 MEKK1 蛋白,是 MAPK 信号通路中的一个细胞内信号分子。各种细胞外信号通过 Ras Raf(MEKK) MAPK 途径,磷酸化激活 MAPK,磷酸化的 MAPK 进入细胞核内,参与细胞的生长、发育、增殖及分化等多种生理过程<sup>[10]</sup>。MEKK1 蛋白是有丝分裂原活化蛋白的上游物质,具有激活促进细胞凋亡和使各种转录因子表达以推进分化的作用,小鼠眼睑闭合、果蝇的背向闭合及创口愈合中的细胞行为证明了这一重要的作用<sup>[11, 12]</sup>,同时它也是在细胞迁移时所必须的一个信号,与小鼠眼睛的形态建成、眼睑开合功能的形成有关。Gates<sup>[13]</sup>于 1968 年报道 Lid-gape Gates 小鼠(*lg<sup>Ga</sup>*)出生时眼睑开裂,成年后角膜混浊;Juriloff 等<sup>[14]</sup>于 2004 年确定该品系小鼠突变是 13 号染色体 *Map3k1* 基因第 2~9 号外显子的缺失引起的。Yujiri 等<sup>[15]</sup>报道 *Map3k1<sup>tm1Glj</sup>* 基因敲除小鼠,眼睑闭合功能缺陷,成年后角膜混浊。Xia 等<sup>[16]</sup>报道 *Map3k1<sup>tm1Yxia</sup>* 定向导入突变系小鼠,胚胎 16.5 d 眼睑未能正常闭合,从而出生时眼睑开裂,同时还伴有皮肤、被毛及尾部异常。MAPK 通路相关的一些基因(如 JNK 家族的 *Mapk8*、*Mapk9* 基因、*Jun* 基因、*TGF- $\alpha$*  等)<sup>[15, 17~19]</sup>突变小鼠都包含有出生时眼睑开裂这一表型。本研究结果也表明 B6-Cop 小鼠出生时眼睑开裂,离乳时均表现为角膜混浊,与上述 *Map3k1* 基因突变小鼠的表型相似。B6-Co 小鼠突变基因精细定位结果显示 *Map3k1* 基因就位于定位区间内,提示 *Map3k1* 基因为 B6-Co 小鼠突变的强力候选基因。

B6-Co 角膜混浊小鼠既可以作为遗传性角膜混浊研究的动物模型,也有可能作为 *Map3k1* 基因功能研究的整体动物模型,还可以作为一个良好的模型用于人类角膜病相关药物的筛选、基因药物的研发。因此本研究有助于该突变系小鼠的进一步研究与应用,有利于阐明人类遗传性角膜混浊的发生发

展机制,为临床预防、治疗遗传性角膜病建立新的手段和方法提供理论依据。

### 参考文献(References):

- [1] 邵义祥, 吴宝金, 薛整风, 陈兵, 茅慧华, 赵明, 李厚达. 遗传性角膜基质变性小鼠及其突变基因的定位. 南京师大学报(自然科学版), 2006, 29(2): 99-102.
- [2] 殷小敏. B6-Co 小鼠角膜病变的病因和病理学研究[学位论文]. 南通大学, 2007.
- [3] 王新蕾. 角膜混浊小鼠突变基因的进一步定位及其免疫学功能的初步研究[学位论文]. 南通大学, 2008.
- [4] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, 479-483.
- [5] Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melandner M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet*, 2000, 26(2): 163-175.
- [6] 关洪英, 唐志权, 李辉. 鸡 MD 基因 5'侧翼区多态性与鸡生长和体组成性状的相关研究. 遗传学报, 2006, 33(6): 501-506.
- [7] 翟光华, 闻平, 郭兰芳, 陈璐. II 型糖尿病患者 APOA5-1131T/C 基因多态性与血脂代谢和胰岛素抵抗的关系研究. 遗传, 2007, 29(5): 541-546.
- [8] 郭晓令, 陈哲, 赵晓枫, 徐宁迎. SIM1 基因第 8 外显子的 SNP 对猪背膘厚的影响. 遗传, 2008, 30(6): 7557-7559.
- [9] 徐倩, 孙丽萍, 宫月华, 徐莹, 董楠楠, 袁媛. 粘蛋白 MUC1 568A/G SNP 与辽宁地区人群胃癌遗传易感性的关系. 遗传, 2008, 30(9): 1163-1168.
- [10] Gerits N, Kostenko S, Moens U. *In vivo* functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice. *Transgenic Res*, 2007, 16(3): 281-314.
- [11] Zhang L, Wang W, Hayashi Y, Jester JV, Birk DE, Gao M, Liu CY, Kao WW, Karin M. A role for MEK kinase 1 in TGF- $\beta$ /activin-induced epithelium movement and embryonic eyelid closure. *EMBO J*, 2003, 22(17): 4443-4454.
- [12] Martin P, Parkhurst SM. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development*, 2004, 131(13): 3021-3034.
- [13] Gates A. Ig<Ga>-lid gap-Gates. *Mouse News Lett*, 1968, 39: 37.
- [14] Juriloff DM, Harris MJ, Mah DG. The open-eyelid mutation, lidgap-Gates, is an eight-exon deletion in the mouse *Map3k1* gene. *Genomics*, 2005, 85(1): 139-142.
- [15] Yujiri T, Ware M, Widmann C, Oyer R, Russell D, Chan E, Zaitzu Y, Clarke P, Tyler K, Oka Y, Fanger GR, Henson P, Johnson GL. MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(13): 7272-7277.
- [16] Xia Y, Makris C, Su B, Li E, Yang J, Nemerow GR, Karin M. MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(10): 5243-5248.
- [17] Weston CR, Wong A, Hall JP, Goad ME, Flavell RA, Davis RJ. The c-Jun NH2-terminal kinase is essential for epidermal growth factor expression during epidermal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(39): 14114-14119.
- [18] Li G, Gustafson-Brown C, Hanks SK, Nason K, Arbeit JM, Pogliano K, Wisdom RM, Johnson RS. *c-Jun* is essential for organization of the epidermal leading edge. *Dev Cell*, 2003, 4(6): 865-877.
- [19] Carroll JM, Luetke NC, Lee DC, Watt FM. Role of integrins in mouse eyelid development: studies in normal embryos and embryos in which there is a failure of eyelid fusion. *Mech Dev*, 1998, 78(1-2): 37-45.