

重组人 IL-4 大肠杆菌表达与纯化

Expression and Purification of Recombinant Human Interleukin 4 in *Escherichia coli*

邱 燕^{1**}, 孙九如², 黄阳滨^{2*}, 黄智华², 陈霖杰², 刘 勇², 林跃鑫¹

QIU Yan^{1**}, SUN Jiu-Ru², HUANG Yang-Bin^{2*}, HUANG Zhi-Hua², CHEN Lin-Jie², LIU Yong² and LIN Yue-Xin¹

1 福建师范大学生命科学学院,福州 350007

2 上海新生源生物医药有限公司,上海 201203

1 College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

2 Shanghai Neusummit Biopharma Co., LTD., Shanghai 201203, China

摘 要 根据大肠杆菌密码子偏爱性优化并合成人白细胞介素 4 基因,以 pET30a(+)为载体构建了重组表达质粒 pET30a(+)rhIL-4。将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,诱导表达并超声破菌检测重组蛋白的表达形式。采用 5L 发酵罐培养工程菌,发酵液 OD_{600} 为 0.6 时诱导 3.5 h 收集菌体,检测目的蛋白的表达量。收集的菌体经压榨破菌获得包涵体,通过包涵体变性、层析、透析复性等方法对 rhIL-4 进行纯化。采用人红细胞白血病细胞(TF-1)测定纯化的 rhIL-4 的生物活性。测序表明目的基因已插入载体 pET30a(+)中,重组蛋白以包涵体形式表达,单位体积重组蛋白的表达量达 200mg/L 发酵液,建立了对包涵体形式表达的 rhIL-4 纯化方法,最终得率为 40mg/L 发酵液,纯度大于 98%,回收率为 20% 以上。免疫印迹法检测诱导表达的重组蛋白和纯化的蛋白为 IL-4, N 端氨基酸序列测定结果与理论相符,生物活性检测纯化的蛋白比活性达 2.5×10^6 AU/mg。这为 rhIL-4 进一步产业化研究建立了基础。

关键词 rhIL-4, 大肠杆菌, 发酵, 纯化

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-0962-06

Abstract Human interleukin 4 (IL-4) cDNA was optimized and synthesized according to *E. coli* preferred codon. A recombinant expression plasmid pET-30a(+)rhIL-4 was constructed with the target cDNA inserted between *Nde* I and *Eco*R I sites, which can translate the mature IL-4 protein with an extra methionine residue at N-terminal. The expression vector was transformed into *E. coli* BL21(DE3). The rhIL-4 protein was expressed in the inclusion body. By using the optimized fermentation conditions, the high expression level was achieved with the expression level as high as 35% of total protein obtained. A purification strategy has been designed which includes Q-Sepharose and SP-Sepharose ion-exchange chromatography and dialysis renaturation. The rhIL-4 was purified with the purity more than 98% and the yield of 40 mg per liter fermentation culture achieved. Western blot proved that the purified protein is IL-4. Amino acid sequencing revealed that N-terminal 16 residue sequence is identical to the theoretical sequence. Biological activity assay on TF-1 cells demonstrated that the rhIL-4 is active with an activity of 2.5×10^6 AU/mg. This study promises large scale production of rhIL-4.

Key words rhIL-4, *Escherichia coli*, fermentation, purification

白细胞介素 4 (interleukin 4, IL-4) 是 1982 年 Howard 在 T 细胞培养上清中发现的一种促进 B 细胞增殖的生长因子^[1], 1986 年基因克隆成功^[2]。IL-4 是由 Th2 细胞产生的特征性细胞因子, 主要生物学功能包括协同激活抗 IgM 抗体依赖的 B 细胞、介导 Ia 抗原对休眠 B 细胞的诱导作用、促进 IgE 和 IgG 的产生、刺激 T 细胞系生长或维持它的激活状态等^[2-4]。由于 IL-4 具有广泛的生物学活性, 国外应用 rhIL-4 治疗多种疾病进行了深入的研究, 包括肿瘤^[5-7]、缺氧引起的组织损伤^[8,9]、自身免疫性疾病^[10]等, 成为人们研究的热点之一。研究表明, 糖基对 IL-4 的生物活性似乎没有影响^[11], 大肠杆菌表达的 IL-4 生物活性与哺乳动物细胞的表达产物相当^[12]。大肠杆菌生产重组蛋白具有容易操作、生长迅速和培养基要求简单等优势, 因此重组 IL-4 的表达大多采用大肠杆菌表达系统。国外对 IL-4 在大肠杆菌中的表达和纯化工作报道相对较少, 文献报道的表达量不高, 而且以包涵体形式表达, 必须通过包涵体洗涤、蛋白变性、复性等一系列的步骤来达到纯化目的, 因此最终得率很低^[12-15]。采用何种方式来表达 IL-4 控制表达工艺, 提高纯化后目的产物的得率, 是 rhIL-4 产业化研究的重点。

本研究采用了 pET 系统表达 IL-4, 通过对人 IL-4 基因的优化并选用高效表达载体, 获得了高水平的表达菌株; 通过控制发酵条件, 达到了较高的 rhIL-4 表达率; 在此基础上对包涵体形式表达的 rhIL-4 的纯化方法进行了大量的摸索和研究, 建立了较佳的纯化路线, 得到了高纯度、高得率、高活性的 rhIL-4 蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

表达载体 pET30a(+) 宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 均购自 Novagen 公司; 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶及 λDNA/*EcoR* I + *Hind* III Marker 均购自 MBI 公司; 蛋白质分子量标准购自 PROMEGA 公司; 检测用抗体购自 R&D SYSTEMS 公司; BioFlo 3000 5L 发酵罐购自 NBS 公司; 层析用凝胶及 AKTA prime 蛋白纯化仪均购自 AMERSHAM 公司。

1.2 方法

1.2.1 人 IL-4 核苷酸序列优化与 cDNA 的获得 根据 GenBank (NM-000589) 中人 IL-4 的核苷酸序列进行优化, 按照大肠杆菌密码子偏爱性, 在不改变氨基酸序列的前提下, 人工合成编码人成熟肽 IL-4 基因

序列。IL-4 基因的人工合成由上海生工生物工程技术有限公司完成, 合成基因克隆于 pUC57 载体的多克隆位点, 重组质粒命名为 pUC57/IL-4。

优化的基因序列如下:

```
cac aag tgc gat atc acc ctg cag gag atc atc aaa act ttg aac
agc ctt aca gag cag aag act ctg tgc acc gag ttg acc gta aca
gac atc ttt gct gcc tcc aag aac aca act gag aag gaa acc ttc
tgc aga gct gct act gtg ctt cgg caa ttc tac agc cac cat gag
aag gac act cgc tgc ctg ggt gct act gca cag cag ttg cac aga
cac aag cag ctg atc aga ttc ctg aaa cgg ctt gac aga aac ctt
tgg gga ctg gct ggc ctt aat tcc tgt cct gtg aag gaa gcc aac
cag agt act ttg gaa aac ttc ttg gaa aga cta aag act atc atg
aga gag aaa tat tca aaa tgt agt agc tga taa
```

1.2.2 工程菌的构建: 设计一对 PCR 引物, 在目的基因的 5' 端引入 *Nde* I 位点, 3' 端引入 *EcoR* I 位点, 便于克隆到 pET30a(+) 载体的 *Nde* I 和 *EcoR* I 位点之间。引物序列如下:

Forward primer: 5'-GGAATTCCATATGCAC
AAGTCCGATATCACCCCTGC-3'

Reverse primer: 5'-GCCGAATICTTATCAGCTACT
ACATTTTGAATATTTTC-3'

用 *pfu* 酶对 IL-4 的合成基因进行扩增, PCR 产物经 *Nde* I 和 *EcoR* I 酶切后, 克隆到 pET30a(+) 载体的 *Nde* I 和 *EcoR* I 位点之间, 构建重组质粒 pET30a(+)rhIL-4, 重组质粒进行 DNA 序列测定确认。将构建正确的表达质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 从而获得 rhIL-4 的表达工程菌 BL21(DE3)pET30a(+)rhIL-4。

1.2.3 rhIL-4 的表达及表达形式的确定: 挑选单克隆 BL21(DE3)pET30a(+)rhIL-4 于 LB 培养基(含卡那霉素 30 μg/mL), 37℃ 培养至 *OD*₆₀₀ 约为 0.6 时, 添加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 诱导表达, SDS-PAGE 检测并分析重组蛋白表达量。收集诱导后的菌液离心, 沉淀重悬于破菌缓冲液(20 mmol/L Tris·Cl, 0.15 mol/L NaCl, pH 8.0), 在冰浴下超声破菌, 离心, 收集超声上清和超声沉淀, SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达形式。

1.2.4 rhIL-4 的规模发酵及纯化: 挑取 BL21(DE3)pET30a(+)rhIL-4 单克隆于 LB 培养基(含卡那霉素 30 μg/mL) 中培养 14~16h, 接着按 3% 接种量接种于 LB 培养基(含卡那霉素 30 μg/mL) 培养至 *OD*₆₀₀ 为 1~3, 作为二级种子液。配制改良 M9 发酵培养基 2.96 L (Glucose 1%, Yeast extract 0.5%, K₂HPO₄ 0.5%, KH₂PO₄ 0.35%, (NH₄)₂HPO₄ 0.35%, MgSO₄·7H₂O 0.35%)。

0.025% , CaCl₂ 0.1%) , 倒入清洁过的发酵罐内 , 连罐高压灭菌后 , 冷却至 30 ~ 40℃ , 将制备的二级种子液按 1.5% 接种量接入发酵罐 , 37℃ 培养 , 根据溶氧值不断调整通气流量和搅拌转速 , 控制溶氧 40% 以上。每小时取样测 OD₆₀₀ 值。培养至 OD₆₀₀ 约为 5.0 时 , 在发酵罐中加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L 进行诱导 , 共诱导 3.5h , 诱导后发酵液于 4200r/min , 离心 20min , 收集菌体称重。

将发酵后的菌体按 1:10 重悬于破菌缓冲液 , 在冰浴下高压匀浆破菌 , 离心收集沉淀 , 分别用含 1% Triton X-100 和 4 mol/L 尿素的洗涤缓冲液洗涤沉淀得到包涵体 , 按 1:10 的比例将包涵体在含 6mol/L 盐酸胍变性缓冲液 (20mmol/L PB , 10mmol/L NaCl , 1mmol/L EDTA , 0.1% β-ME , pH7.4) 中溶解 , 离心取上清 ; 将上清先过 G25-Sephadex 分子筛层析换成 8mol/L 尿素变性溶液 , 收集的蛋白峰过 Q-Sepharose Fast Flow 离子交换层析柱 , 收集流穿液。流穿液过 SP-Sepharose Fast Flow 离子交换层析 , 以 0 ~ 1mol/L NaCl 缓冲液梯度洗脱 , 分管收集洗脱蛋白峰 ; SP 洗脱峰用透析方法 , 将目的蛋白在含 1.0mmol/L GSH 和 0.1mmol/L GSSH 复性缓冲液中进行透析 , 逐渐降低尿素的浓度使目的蛋白复性 ; 复性上清重新过 SP-Sepharose Fast Flow 离子交换层析进行浓缩。SDS-PAGE 检测纯化过程重组蛋白的纯度 , Lowry 法检测蛋白含量。

1.2.5 rhIL-4 免疫印迹检测 SDS-PAGE 检测收获的菌体和纯化后蛋白 , 并用鼠抗人 IL-4 单克隆抗体 (R&D 公司) 做免疫印迹法检测 , 酶标羊抗鼠抗体作为二抗 , DAB 显色验证诱导表达的蛋白和纯化后的目的蛋白是否为 IL-4。

1.2.6 N 端氨基酸序列测定 纯化后的样品送上海生化与细胞研究所蛋白质组分析研究分析中心 , 用 Edman 化学降解法进行蛋白质 N 端序列测定。

1.2.7 生物学活性测定 : 根据参考文献 [16] 关于 IL-4 生物学活性检测和参考文献 [17] 重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子生物学活性测定法 , 以人红细胞白血病细胞 (TF-1) 作为检测细胞株 , 通过 MTT 比色法检测纯化的 rhIL-4。活性标准品为本室自制的一批活性参照品标定而成 , 确定参照品的 EC₅₀ (即 50% 最大反应浓度) , 以 EC₅₀ 定义为 1 AU (AU 为活性单位) , 测得该参照品比活性为 1.0 × 10⁷ AU/mg。采用标定好的活性参照品对纯化后的 rhIL-4 进行活性测定 , 得到样品和活性参照品的剂量-反应曲线 ,

从而计算样品的比活性 (AU/mg) 。

2 结果

2.1 表达工程菌的构建和表达

重组质粒 pET30α (+) rhIL-4 经过 *Nde* I / *Eco* R I 双酶切后 , 得到 400bp 左右的片段 , 表明目的基因已插入载体 pET30α (+) 中 (见图 1) 。表达质粒经上海英骏生物技术有限公司测序验证 , 证实序列完全正确。

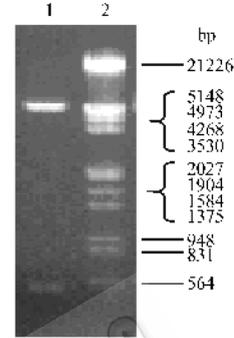


图 1 重组表达质粒 pET30α (+) rhIL-4 的酶切鉴定图

Fig.1 Restriction enzyme digestion analysis of pET30α (+) rhIL-4

1. pET30α (+) rhIL-4 digested with *Nde* I and *Eco* R I ; 2. λDNA / *Eco* R I + *Hind* III marker.

重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) 摇瓶培养诱导表达后的菌体经 SDS-PAGE 检测 , 在 15kD 处有目的条带出现 , 与理论分子量相符 , 表达产物约占菌体总蛋白的 35% , 分析其超声上清和超声沉淀 , 目的蛋白绝大部分在沉淀中 , 表明目的蛋白是以包涵体形式表达 (见图 2) 。

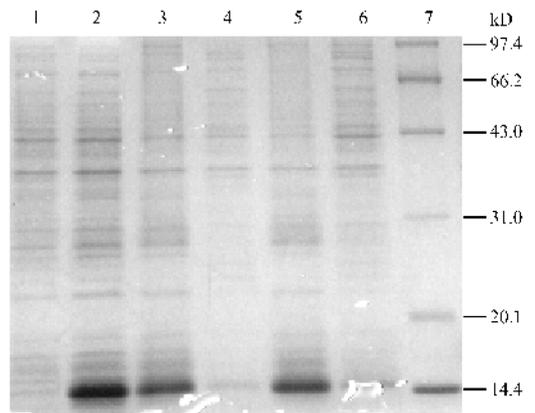


图 2 SDS-PAGE 检测工程菌的表达和表达形式

Fig.2 SDS-PAGE analysis of rhIL-4 expression level and expression type in *E. coli*

1 before IPTG induction ; 2 after IPTG induction ; 3 , 5 : pellet from *E. coli* cell lysate ; 4 , 6 : supernatant from *E. coli* cell lysate ; 7 : MW marker.

2.2 工程菌的发酵培养和 rhIL-4 的纯化

图 3 为工程菌发酵培养过程中的生长曲线和重组蛋白的表达情况。0~3h 为菌体生长时间,3~6.5h 为诱导表达阶段,收罐时菌体湿重为 36.29g,单位体积重组蛋白的表达量达 200mg/L 发酵液,重组蛋白约占菌体总蛋白的 35%。

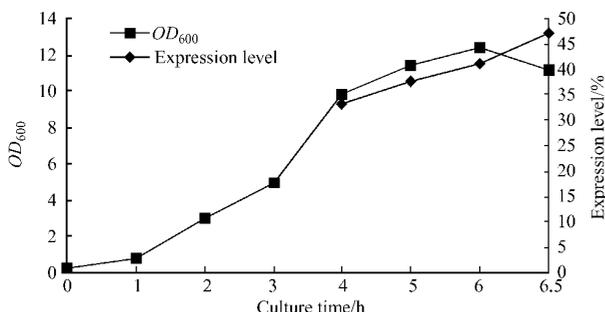


图 3 工程菌发酵培养过程的菌体生长和蛋白表达曲线

Fig.3 Bacteria growth and rhIL-4 expression during fermentation

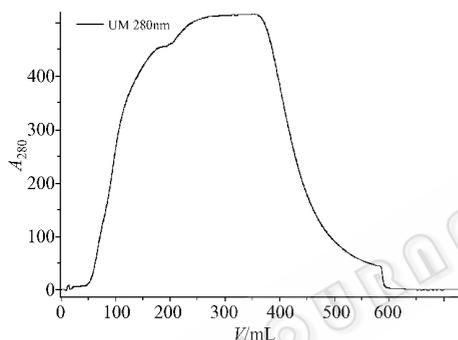


图 4 Q-SepharoseFF 层析图谱

Fig.4 Q-Sepharose chromatography

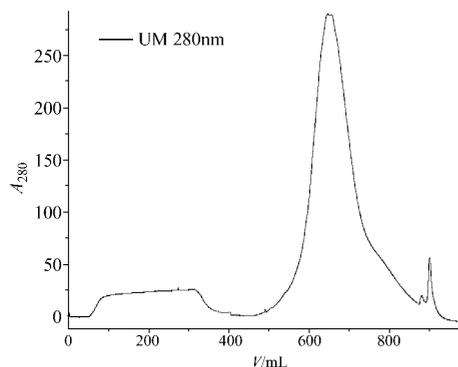


图 5 SP-SepharoseFF 层析图谱

Fig.5 SP-Sepharose chromatography

图 4、5 为 Q-Sepharose FF 和 SP-Sepharose FF 层析图,图 6、7 为包涵体表达 rhIL-4 纯化过程电泳图,显示了各步纯化效果。经 SP-Sepharose FF 进一步纯化 rhIL-4 蛋白纯度可达 98% 以上。表 1 为纯化过程各步纯度和回收率分析。

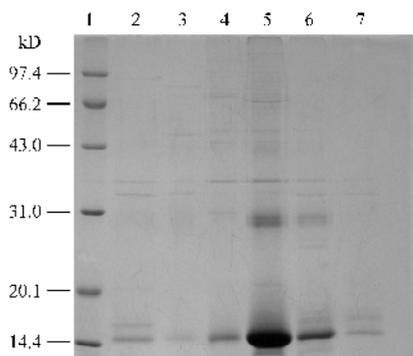


图 6 rhIL-4 经 Q-Sepharose FF 层析纯化电泳图

Fig.6 Purification of rhIL-4

1: MW maker; 2~4: supernatant after inclusion body washing; 5: inclusion body after washing; 6, 7: flow-through from Q-Sepharose chromatography.

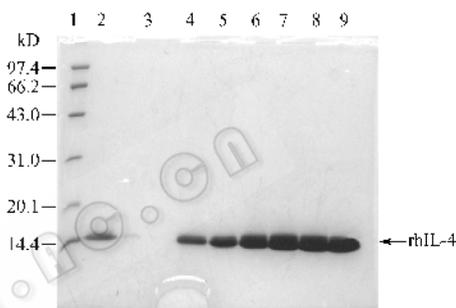


图 7 rhIL-4 经 SP-Sepharose FF 层析纯化过程电泳图

Fig. 7 SP-Sepharose chromatography

1: MW maker; 2: supernatant of dialysis; 3: flow-through from SP-FF chromatography; 4~9: NaCl gradient eluted fractions from SP-Sepharose chromatography.

表 1 rhIL-4 的纯化

Table 1 Purification of recombinant human Interleukin 4

	Total protein/mg	Target protein/mg	Purity/%	Recovery/%
Total protein	1714	600	35	100
After washing	927	510	55	85
Denature supernatant	685	480	70	80
G25	458	390	85	65
Q-Sepharose	266	240	90	40
SP-Sepharose	122	120	98	20

2.3 rhIL-4 免疫印迹检测结果

Western blot 检测显示,分子量 15kD 处的目的蛋白能与鼠抗人 IL-4 抗体结合而被显色,其它菌体蛋白不被显色,证实诱导表达的蛋白和纯化的蛋白为 IL-4(图 8)。

2.4 N 端测序结果

纯化的蛋白测得 N 端氨基酸序列为 NH₂-M-H-K-X-D-I-T-L-Q-E-I-I-K-T-L-N(X 一般情况下为 C),结果与理论序列一致,进一步表明纯化所得到的 15kD 蛋白是 rhIL-4。

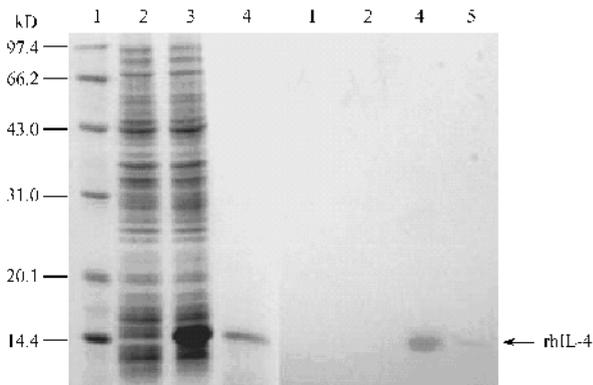


图8 工程菌表达产物和纯化蛋白的 Western-blotting 图谱

Fig.8 SDS-PAGE and Western-blotting result

A :SDS-PAGE ; B :Western blot.

1 :MW marker ; 2 :bacterial lysate before induction 3 :bacterial lysate after induction ; 4 :purified rhIL-4.

2.5 rhIL-4 生物学活性测定

采用 TF-1 细胞测定纯化的 rhIL-4 ,其比活性达 2.5×10^6 AU/mg。

3 讨论

利用大肠杆菌表达人 IL-4 的研究主要集中于 20 世纪 80 年代末和 90 年代初 ,但表达报道的结果不尽人意 ,重组蛋白一般仅占菌体总蛋白的 5% ~ 10%^[12-14] ,研究者们也曾采用过一些方法以提高大肠杆菌 rhIL-4 的表达水平 ,如采用强启动子 tac ,选择 RBS 与起始密码子 ATG 之间最佳距离 ,但表达量的提高并不明显^[14]。黄欣等根据原核翻译起始序列的局部二级结构自由能 ,设计了 AUG 上下游序列 ,并在人 IL-4 基因下游插入部分大肠杆菌 LacZ 序列以提高 mRNA 的稳定性 ,rhIL-4 的表达占菌体总蛋白 30%^[18]。采用酿酒酵母分泌表达人 IL-4 ,表达量仅为 0.6~0.8mg/L 培养液^[19]。本研究则对 rhIL-4 的表达系统进行了优化 :对编码人成熟肽 IL-4 的基因序列 (cDNA) 进行密码子分析 ,根据大肠杆菌的密码子使用频率 ,使用大肠杆菌偏爱的密码子 ,同时对序列进行 RNA 结构的预测 ,全基因合成优化的 IL-4 的基因序列 ;在载体的选择上 ,选用了高效表达载体 pET30a (+) ,该载体的多克隆位点上游具有 T7lac 强启动子 ,经 IPTG 诱导后可以在宿主菌中高效表达外源基因。通过基因的优化和载体的选择使 rhIL-4 的表达量大大地提高 ,这为后续包涵体的纯化奠定了基础。

纯化 rhIL-4 的关键点在于使变性蛋白按正确折叠方式复性为具有生物学活性的分子。在摸索纯化工艺过程中发现 ,采用 6 mol/L 盐酸胍溶解包涵体

后 ,快速稀释复性 ,在复性过程中高达 80% 的 rhIL-4 在沉淀中 ,目的蛋白的损失较大 ;而采用透析复性法 ,逐渐降低变性剂浓度 ,只有少量目的蛋白形成沉淀 ,大部分存在于透析上清中。不同的 pH、氧化还原剂 (GSH 和 GSSH 等) 蛋白保护剂 (蔗糖 ,吐温 80 等) 对 rhIL-4 的正确复性有一定促进作用。其中含 1 mmol/L GSH、0.1 mmol/L GSSH、5% 蔗糖和 0.1% 吐温复性缓冲液效果较好 ,采用该缓冲液 ,90% 以上的目的蛋白可以复性 ,蛋白损失较小 ,而且蛋白的生物活性保持较好。下一步工作将进一步优化纯化条件 ,提高 rhIL-4 的得率。

致谢 感谢上海新生生物医药有限公司对本论文做出建设性贡献的所有员工 ,特别感谢杜碧金、蒋剑、徐晓燕、陈仰权等。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Howard M ,Farrar J ,Hilfiker M *et al.* Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med* , 1982 ,**155** (3) :914 - 923
- [2] Yokota T ,Otsuka T ,Mosmann T *et al.* Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone ,homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1 , that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1986 ,**83** :5894 - 5898
- [3] Rabin EM ,Ohara J ,Paul WE. B-cell stimulatory factor 1 activates resting B cell. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1985 ,**82** (9) :2935 - 2939
- [4] Coffman RL ,Ohara J ,Bond MW *et al.* B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cell. *J Immunol* ,1986 ,**136** (12) :4538 - 4541
- [5] Lundin J ,Kimby E ,Bergmann L *et al.* Interleukin 4 therapy for patients with chronic lymphocytic leukaemia : a phase I/II study. *Br J Haematol* ,2001 ,**112** (1) :155 - 160
- [6] Majhail NS ,Hussein M ,Olencki TE *et al.* Phase I trial of continuous infusion recombinant human interleukin-4 in patients with cancer. *Investigational New Drugs* ,2004 ,**22** :421 - 426
- [7] Werkmeister R ,Fillies T ,Gaertner C *et al.* A clinical phase I/II trial of rhIL-4 applied topically in patients with oral squamous cell carcinomas to assess safety and therapeutic activity. *Oncol Rep* , 2005 ,**12** (3) :449 - 452
- [8] Ozturk H ,Ozturk H ,Buyukbayram H. Protective effects of recombinant human interleukin-4 administration on the hypoxia-reoxygenation-induced gastric and intestinal injury in rat pups. *Fetal Pediatr Pathol* ,2005 ,**24** (6) :347 - 358
- [9] Ozturk H ,Ozturk H ,Buyukbayram H *et al.* The effects of exogenous interleukin-4 on hypoxia-induced lung injury. *Pediatr Surg Int* , 2006 ,**22** (2) :197 - 201
- [10] Ghoreschi K ,Thomas P ,Breit S *et al.* Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune

- [11] Le HV , Ramanathan L , Labdon JE *et al.* Isolation and characterization of multiple variants of recombinant human interleukin 4 expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* , 1988 , **263**(22) :10817 - 10823
- [12] Jayaram B , Devos R , Guisez Y *et al.* Purification of human interleukin-4 produced in *Escherichia coli* . *Gene* ,1989 ,**79**(2) :345 - 354
- [13] Van Kimmenade A ,Bond MW ,Schumacher JH *et al.* Expression , renaturation and purification of recombinant human interleukin 4 from *Escherichia coli* . *Eur J biochemistry* ,1988 ,**173** :109 - 114
- [14] Batchikova NV ,Kulagina MA ,Lutsenko SV *et al.* Expression of a synthetic gene for human interleukin-4 in *E. coli* cells. Preparation of a biologically active protein. *Bioorg Khim* , 1992 ,**18**(5) 660 - 670
- [15] Razeghifard M Reza. On-column refolding of recombinant human interleukin-4 from inclusion bodies. *Protein Expr Purif* , 2004 , **37**(1) :180 - 186
- [16] Wang JZ(王军志). Research Exploitation and Quality Control for Biotechnic Medicamen(生物技术药物研究开发和质量控制) , 1st ed. Beijing Science Press , 2002
- [17] China Pharmacopoeia Committee(国家药典委员会). Chinese Pharmacopoeia(中华人民共和国药典) ,3rd ed. Beijing :Chemical Industry Press , 2005
- [18] Huang X(黄欣) , Zhao ZL(赵忠良) , Cao XT(曹雪涛) *et al.* Optimized expression in *Escherichia coli* of Human interleukin 4. *Chinese Journal of Immunology*(中国免疫学杂志) ,1999 ,**15**(9) : 405 - 407
- [19] Solari R , Quint D , O Bray H *et al.* Purification and characterization of recombinant human interleukin 4. Biological activities , receptor binding and the generation of monoclonal antibodies. *Biochem J* , 1989 ,**262**(3) 897 - 908