

人可溶性白介素-4 受体(sIL-4R)在甲醇酵母中的表达

张 勇 胡 箭 李 元*

(中国医学科学院、中国协和医科大学医药生物技术所 北京 100050)

摘 要 白细胞介素-4(IL-4)作为一种多功能的细胞因子在哮喘等变态性炎症反应中具有关键作用。IL-4 通过结合细胞表面的白介素-4 受体(IL-4R)发挥其生物学效应。sIL-4R 缺少跨膜和胞内结构域,结合 IL-4 后不能产生信号传递来介导 IL-4 的生物学活性,但 sIL-4R 与 IL-4 结合的高度特异性和极高的亲和力使它非常适合作为理想的 IL-4 拮抗剂应用于哮喘等疾病的治疗。采用 RT-PCR 方法以人的单核细胞总 RNA 为模板扩增得到编码 sIL-4R 的基因片段,经测序证实后插入到甲醇酵母分泌表达质粒 pPIC9K 中,得到重组质粒 pPIC9K/sIL-4R,利用限制性内切酶 *Bgl* II 将其线性化后用电穿孔法导入 *Pichia pastoris* GS115。分别用 SDS-PAGE、Western blot 和 Ligand binding blot 对重组菌发酵上清中的 sIL-4R 进行鉴定。结果表明,在分子量约为 30kD 处有 sIL-4R 特异条带出现,并具有结合其配基 IL-4 的生物学活性。

关键词 人可溶性白介素-4 受体, *Pichia pastoris*

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0197-06

IL-4 是一种多功能淋巴因子,具有复杂的生物学活性,包括调节 T 淋巴细胞的生长、繁殖和分化,在调节受抗原刺激的 T 细胞分化过程中起核心作用。在特应性皮炎患者的皮肤、哮喘病人的支气管粘液中聚集有大量抗原特异性的 IL-4 合成细胞,证明在诱导和维持特异反应性疾病的过程中 IL-4 扮演了重要角色^[1,2]。IL-4 诱导 B 淋巴细胞分泌 IgE 的功能在过敏性炎症中具有关键作用,在过敏病人的血清中发现 IL-4 含量上升^[3]。特应性哮喘病人对粉尘、螨虫等抗原的反应显著增强了周边血单核细胞对 IL-4 的分泌^[4]。IL-4 促进 B 淋巴细胞分泌 IgE,并且通过提高 IgE 受体对 IgE 的亲和力而加强 IgE 所介导的免疫反应^[5]。利用小鼠模型的研究发现 IL-4 在体内的同种异体反应中起着重要的作用^[6]。

IL-4 通过细胞表面的特异性受体(IL-4R)来介导它所形成的生物学效应。人 IL-4R 是由两条多肽链形成的异二聚体^[7]。其中一条 IL-4R α 链分子量范围在 130~140 kD,对 IL-4 有很高的亲和力(Kd 为 20~300pM)。由于在 IL-4R 复合物中 IL-4R α 链对 IL-4 的结合起主导作用,所以人们把 IL-4R α 链作为

主要对象进行研究。IL-4R α 链的 cDNA 含有一个编码 825 个氨基酸的开放阅读框架。人 IL-4R α 链胞外结构域有 6 个潜在的 N-连接的糖基化位点,其中 3 个与鼠 IL-4R 中的糖基化位点位置相同,胞外区中还含有 6 个 Cys 残基。IL-4R α 链是造血因子受体超家族中的成员。这些受体超家族中的成员具有共同的细胞外区域的结构模体(motifs)组成了纤连蛋白 III 型结构域^[8]。这些结构域包括保守的配对 Cys 残基和靠近细胞膜区域的 WSXWS 模体,后者被认为是受体结合细胞因子所必需的最佳构象^[9]。IL-4R α 链细胞外区域结构的改变能够导致受体信号传导能力的变化。事实上,从特异个体分离到的人 IL-4R α 链就包含了一个 Ile50Val 的变化,这种变化虽然对结合 IL-4 的能力没有任何影响,却导致了信号传导的加强,提高了 IgE 的合成,从而使个体容易罹患哮喘等过敏等疾病^[10]。

研究人员在小鼠和人的体内相继发现了可溶性 IL-4 受体即 IL-4R α 链的胞外结构域。由于可溶性 IL-4R α 链(sIL-4R)缺少跨膜和胞质内结构域,所以它不能诱导细胞内的活化过程。但 sIL-4R 与 IL-4 结合的高度特异性和极高的亲和力,使它非常适合

作为理想的 IL-4 拮抗剂。因此 sIL-4R 在过敏性疾病如哮喘的治疗领域中有极为广阔的应用前景。近年来各国研究人员对 sIL-4R 进行了大量的研究。国外已经开始应用重组 sIL-4R 蛋白治疗哮喘的临床研究,美国 Immunex 公司推出的 sIL-4R 重组蛋白(商品名为 Nuvance™)进行了临床 I/II 期,研究结果显示了良好的治疗效果^[11]该产品以中国仓鼠卵细胞为宿主进行表达而获得重组 sIL-4R 蛋白。

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒和培养基

P. pastoris GS115(his4⁻ Invitrogen)用于外源蛋白表达。*E. coli* TG1(本实验室保存)用于载体的克隆。*P. pastoris* 整合型分泌表达质粒 pPIC9K(Invitrogen)用于在 GS115 中表达外源蛋白。pGEM[®]-T(Promega)用于目的基因克隆。LB-Amp 培养基(1% 胰化蛋白胨,0.5% 酵母提取物,1% NaCl,pH 7.0,50μg/mL 氨苄青霉素)用于 *E. coli* 的培养。YPD 培养基(1% 酵母提取物,2% 蛋白胨,2% 葡萄糖)用于 *P. pastoris* GS115(his4⁻)的培养。MD 平板[1.34% YNB(Invitrogen),4 × 10⁻⁵% 生物素,2% 葡萄糖,1.5% 琼脂粉]用于 His⁺ 转化子的筛选。MGY 培养基[1.34% YNB(Invitrogen),4 × 10⁻⁵% 生物素,5% 甘油,1% 酵母提取物,2% 蛋白胨]用于酵母生物量的积累。MM 培养基[1.34% YNB(Invitrogen),4 × 10⁻⁵% 生物素,0.5% 甲醇]用于外源蛋白的诱导表达。

1.2 寡核苷酸引物

根据已知的 IL-4R cDNA 序列(GenBank Accession No.: NM_000418)设计编码 IL-4R 基因胞外区片段的 5'和 3'端寡核苷酸引物,在 5'和 3'端引物的 5'末端均引入 *EcoR* I 限制性酶切位点并分别加保护碱基。5'和 3'端引物序列如下。

5'端引物 5'-TACGGAATTCATGAAGGCTCTGCAGGAGC-3'.

3'端引物 5'-TAGAATTCCTAGTCTGCTCGAAGGGCTC-3'.

根据甲醇酵母乙醇氧化酶 I(AOX1)基因两端序列设计的引物

5'AOX1 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'.

3'AOX1 5'-GCAATGGCATTCTGACATCC-3'.

1.3 RT-PCR 扩增和序列测定

使用 Promega 的 SV 总 RNA 提取试剂盒从人的单核细胞(约 1 × 10⁶ 个细胞)中提取总 RNA。提取方法按试剂盒推荐步骤进行。总 RNA 溶于 100μL 不含核酸酶的水中。取 5μL 总 RNA 为模板使用

Advantage[®] One-step RT-PCR 试剂盒(CLONTECH)以美国 MJ Research 公司的 MiniCycle™ PTC-150 型 PCR 仪进行 RT-PCR 扩增。RT-PCR 条件如下 50℃,1h 94℃,5 min;94℃,30s,52℃,1min;3 个循环后,94℃,30s,63℃,30s,65℃,1min;30 个循环后,70℃延伸 10min;4℃保存。获得的 RT-PCR 产物纯化后采用 Promega 的 TA 克隆试剂盒将其克隆至 pGEM[®]-T 载体,构建克隆质粒 pGEM[®]-T/sIL-4R,用 ABI PRISM377 DNA 测序仪测序。

1.4 重组表达质粒的构建

用限制性内切酶 *EcoR* I 将克隆到的 sIL-4R 基因从 pGEM[®]-T/sIL-4R 质粒上切下,同样用 *EcoR* I 酶切质粒 pPIC9K,脱磷,连接,构建重组表达质粒 pPIC9K/sIL-4R。连接产物转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞。挑取阳性克隆,提取质粒进行 PCR 扩增分析,以确定 sIL-4R 基因是否以正确的方向插入。

1.5 转化甲醇酵母及鉴定

将 pPIC9K/sIL-4R 质粒用 *Bgl* II 酶切线性化,并用电穿孔法转化 *P. pastoris* GS115(his4⁻)菌株,以质粒 pPIC9K 为对照。实验方法按照公司提供的标准操作进行(Invitrogen)。先在不含组氨酸的 MD 平板上筛选 His⁺ 转化子。小量培养后提取 His⁺ 转化子基因组 DNA 并以 5' AOX1 和 3' AOX1 引物(Invitrogen)进行 PCR 分析,若 sIL-4R 整合到酵母基因组中并且为 Mut^s 表型,PCR 产物应只有一条约 1.05kb(621bp + 429bp)的 DNA 条带,而载体转化的应只有一条 429bp 的 DNA 条带。

1.6 sIL-4R 在甲醇酵母中的诱导表达

选取 PCR 鉴定正确的克隆菌(GS115/pPIC9K/sIL-4R Mut^s)接种到含 2mL YPG 的试管中,28℃、200r/min 振荡培养过夜。再以 1%(V/V)接种至含有 100mL MGY 培养基的 500mL 三角瓶中。28℃、200r/min 振荡培养约 24h。离心并将菌体重悬于 MM 培养基中,28℃、200r/min 振荡诱导表达 4d,每隔 24h 补加 100% 甲醇至终浓度为 0.5%,取样分析。

1.7 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析

将重组菌发酵液离心除去菌体,上清液以 60% 的 TCA(三氯乙酸)沉淀蛋白质。蛋白样品用 1 × 蛋白质上样缓冲液溶解,12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分析,电泳设备为 BIO-RAD Mini-PROTEAN[®] II Cell。Western 印迹分析使用 BIO-RAD TRANS-BLOT[®] SD SEMI-DRY TRANSFER CELL,按照公司提供的标准程序转膜。以小鼠抗人 IL-4R 的单克隆抗

体(R&D)作为第一抗体,碱性磷酸酶标记的马抗小鼠 IgG(H+L)(中山公司)作为第二抗体,用 NBT/BCIP(AMRESCO)作为底物进行显色。

1.8 配基结合印迹分析

向重组菌表达培养物的发酵上清液加入等体积的 $2\times$ 非还原的蛋白质上样缓冲液,按文献[12]方法进行非还原的 12% SDS-PAGE。电泳后经电转移将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,转移缓冲液为不含甲醇的 Towbin 缓冲液(25mmol/L Tris-HCl, 192mmol/L glycine, pH8.3),方法参照 Western 印迹分析。然后用 $100\mu\text{g/mL}$ IL-4 作为配基,分别加入小鼠抗人 IL-4 单克隆抗体(R&D)作为第一抗体,碱性磷酸酶标记的马抗小鼠 IgG(H+L)(中山公司)作为第二抗体,用 NBT/BCIP(AMRESCO)作为底物进行显色。

2 结 果

2.1 sIL-4R 基因的克隆

RT-PCR 扩增结果见图 1。电泳结果显示有与预期大小一致的 DNA 条带(约 620bp)测序结果与文献报道的 IL-4R 基因序列基本一致,发现第 148 位碱基发生 A→G 的突变,造成第 50 位氨基酸 Ile 突变成 Val,根据文献报道,IL-4R 基因序列具有多种单核苷酸多态性(SNP),其中在 α 链的胞外区表现为 Ile50Val,本实验测序结果同文献报道的 sIL-4R 基因序列中的单核苷酸多态性相一致^[13]。

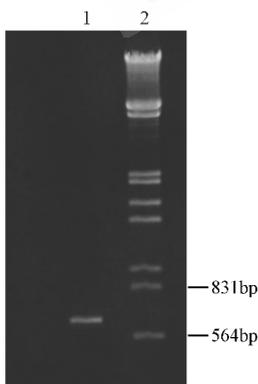


图 1 RT-PCR 产物的电泳分析结果

Fig.1 Analysis of RT-PCR product

1: RT-PCR product; 2: $\lambda\text{DNA}/\text{EcoRI} + \text{HindIII}$

2.2 pPIC9K/sIL-4R 分泌表达质粒的构建及转化甲醇酵母

将 sIL-4R 基因插入 pPIC9K 构建成分泌表达质粒 pPIC9K/sIL-4R(图 2)。质粒 pPIC9K/sIL-4R 用 *EcoRI* 酶切产生与 sIL-4R 基因大小一致的片段,见

图 3 表明 sIL-4R 基因插入到 pPIC9K 中。

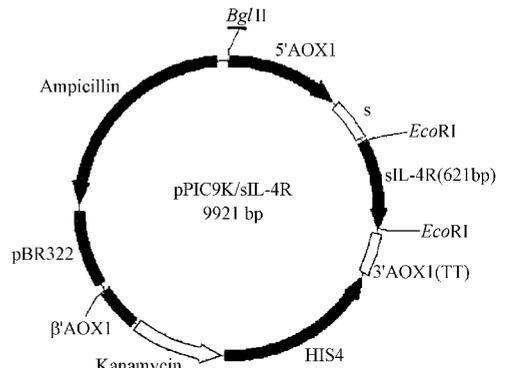


图 2 分泌表达质粒 pPIC9K/sIL-4R 结构示意图

Fig.2 Schematic map of pPIC9K/sIL-4R



图 3 重组质粒酶切分析

Fig.3 Restriction analysis of recombinant plasmid

1: $\lambda\text{DNA}/\text{EcoRI} + \text{HindIII}$; 2: RT-PCR product;

3: pPIC9K/sIL-4R/EcoRI

利用 PCR 方法对 sIL-4R 基因片段在重组质粒中的插入方向进行鉴定。分别以 AOX1 基因 5'端引物与 sIL-4R 基因 3'端引物为一组引物(P1),AOX1 基因 3'端引物与 sIL-4R 基因 5'端引物为一组引物(P2)对重组质粒进行 PCR 扩增反应。如果 sIL-4R 基因片段以正确方向插入的话,P1 PCR 产物应有约 1.05kb(621bp + 429bp)大小的片段,P2 PCR 产物应有约 0.75kb(621bp + 126bp)大小的片段。图 4 的结果显示了 sIL-4R 基因片段插入方向为正向。

将 *Bgl* II 酶切线性化的重组质粒 pPIC9K/sIL-4R 和质粒 pPIC9K 分别转化至甲醇酵母。提取 His⁺ 转化子基因组 DNA 进行 PCR 分析,证明 sIL-4R 基因插入到酵母染色体中。分别将得到的菌株命名为 GS115/pPIC9K/sIL-4R 和 GS115/pPIC9K。

2.3 sIL-4R 的表达

2.3.1 SDS-PAGE: 分别取对照菌株和重组菌株 1ml 发酵上清液,用 60% TCA 沉淀蛋白质并进行

SDS-PAGE 电泳,结果显示重组菌株 GS115/pPIC9K/sIL-4R 发酵上清液在分子量约为 30kD 处有明显的特异条带出现(图 5)。

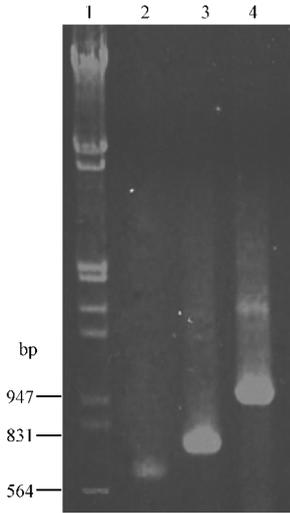


图 4 鉴定 sIL-4R 基因片段的插入方向

Fig.4 Identification of the insert direction for sIL-4R gene fragment

1 :λDNA/*EcoRI* + *HindIII* ; 2 : Purified sIL-4R gene fragment ;
3 : P1 PCR product (0.75kb) ; 4 : P2 PCR product (1.05kb)

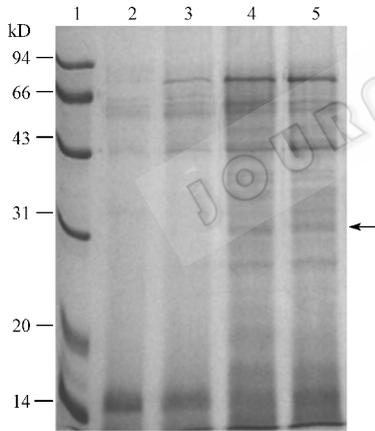


图 5 sIL-4R 的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.5 SDS-PAGE analysis of sIL-4R gene expression

1 : Molecular weight marker ; 2 3 : GS115/pPIC9K ;
4 5 : GS115/pPIC9K/sIL-4R

2.3.2 Western blot :Western 印迹分析中在 30kD 处有一杂交带出现(图 6)表明该特异条带为重组 sIL-4R 蛋白并具有免疫活性。

2.3.3 Ligand binding blo(配体-受体结合试验):为了确定表达的 sIL-4R 是否具有与 IL-4 结合的活性,进行了受体—配基结合印迹分析(图 7)。样品在相应分子量 30kD 处有一明显杂交带。说明表达产物 sIL-4R 具有结合 IL-4 的活性。

实验过程中我们采用 ELISA 方法验证重组 sIL-

4R 蛋白与配基 IL-4 的特异结合能力,实验结果同样证明了重组 sIL-4R 蛋白具有较好的配基结合生物学活性(结果未发表)。

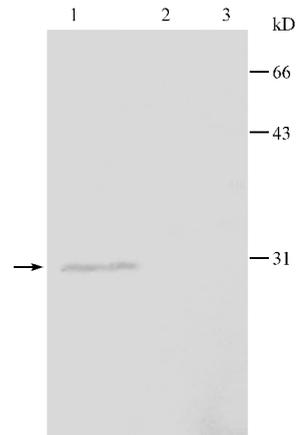


图 6 sIL-4R 的 Western blot 分析结果

Fig.6 Western blot analysis of recombinant sIL-4R protein

1 : GS115/pPIC9K/sIL-4R ; 2 : GS115/pPIC9K ;
3 : Molecular weight marker

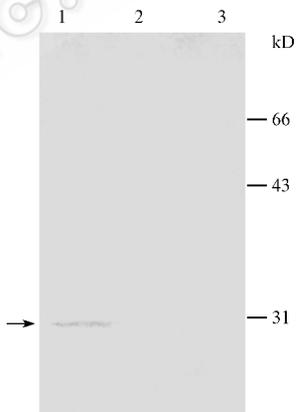


图 7 sIL-4R 的 Ligand binding blot 分析结果

Fig.7 Lignd binding blot of recombinant sIL-4R protein

1 : GS115/pPIC9K/sIL-4R ; 2 : GS115/pPIC9K ;
3 : Molecular weight marker

3 讨 论

近年来有很多文献报道了用 *Pichia pastoris* 甲醇酵母成功表达真核蛋白质的例子^[4]。在原核表达系统中重组蛋白质一般不能正确折叠,而在啤酒酵母中又存在过度糖基化的问题。甲醇酵母具有很强的真核蛋白质修饰功能,其表达的蛋白能够被糖基化,另外 *Pichia pastoris* 甲醇酵母自身的外泌蛋白质很少且易于高密度发酵,因此其在表达和分离纯化异源蛋白质等方面具有很强的优势。本文利用甲醇酵母成功地表达了具有配基结合生物活性的 sIL-4R,目前,仍未见国内外文献报道。

外源蛋白等电点对甲醇酵母诱导表达培养基 pH 的选择具有指导意义,应使诱导培养基的 pH 值远离外源蛋白等电点。本试验最初采用 BMGY/BM-MY 培养基进行诱导表达,由于该培养基中含有磷酸盐缓冲液,pH 为 6.0,而 sIL-4R 蛋白的 pI 值为 5.99,因此未表达重组蛋白。采用 MGY/MM 培养基进行诱导表达,由于其不含磷酸缓冲液,发酵结束后 pH 约为 3.0,检测结果发现有 sIL-4R 蛋白产生。SDS-PAGE 结果表明目的蛋白在总蛋白中所占的比例并不高,凝胶扫描分析显示目的蛋白占蛋白总量的 10% 左右,每升发酵液约含 1mg 重组 sIL-4R 蛋白,要达到应用的目的还需要进一步提高发酵水平。

从 SDS-PAGE 电泳图上可以看出重组 sIL-4R 蛋白分子量约为 30kD。根据 sIL-4R cDNA 序列推导出其理论分子量约为 23.7kD。两者的差别可能是由于人 IL-4R 胞外区域存在 6 个可能糖基化的部位,甲醇酵母中产生的重组人 sIL-4R 蛋白分子量大于理论计算值可能是因糖基化的缘故。

国外利用 sIL-4R 治疗哮喘的临床研究结果显示了良好的治疗效果,并且没有发现重组 sIL-4R 蛋白的副作用,sIL-4R 抗体的出现率小于 3%。表明 sIL-4R 安全并具有良好的耐受性,sIL-4R 在人体内的半衰期较长,因此可减少服药次数,大大方便了病人。最近有研究表明 sIL-4R 还具有预防晚期过敏炎症所引起的咽鼓管机能障碍的作用^[15]。

通过基因工程方法获得的重组 sIL-4R 蛋白可以作为靶位建立新药筛选模型,用来筛选 IL-4R 的拮抗剂,以期获得治疗哮喘等过敏性疾病的药物。

REFERENCES(参考文献)

[1] Sager N, Feldmann A, Schilling G *et al.* House dust mite-specific T cells in the skin of subjects with atopic dermatitis: frequency and lymphokine profile in the allergen patch test. *J Allergy Clin Immunol*, 1992, **89**(4): 801 - 810

[2] Robinson DS, Hamid Q, Ying S *et al.* Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*, 1992, **326**(5): 298 - 304

[3] Daher S, Santos L M, Sole D. Interleukin-4 and soluble CD23 serum levels in asthmatic atopic children. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 1995, **5**(5): 251 - 254

[4] Leonard C, Torney V, Burke C. Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, **17**(3): 368 - 375

[5] Pawankar R, Okuda M, Yssel H *et al.* Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4 and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest*, 1997, **99**(7): 1492 - 1499

[6] Fanslow WC, Clifford KN, Park LS *et al.* Regulation of alloreactivity *in vivo* by IL-4 and the soluble IL-4 receptor. *J Immunol*, 1991, **147**(2): 535 - 540

[7] Duschl A, Sebald W. Transmembrane and intracellular signalling by interleukin-4: receptor dimerization and beyond. *Eur Cytokine Netw*, 1996, **7**(1): 37 - 49

[8] Miyajima A, Kitamura T, Harada N *et al.* Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol*, 1992, **10**: 259 - 331

[9] Livnah O, Stura EA, Johnson DL *et al.* Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science*, 1996, **273**(5274): 464 - 471

[10] Mitsuyasu H, Izuhara K, Mao XQ, Gao PS *et al.* Ile50Val variant of IL-4Ralpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nature Genetics*, 1998, **19**(2): 119 - 120

[11] Larry CB, Harold SN, Miguel JL *et al.* Interleukin-4 Receptor in Moderate Asthma: A Phase I / II Randomized, Placebo-controlled Trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, **160**: 1816 - 1823

[12] Bochkov VN, Tkachuk VA, Philippova MP *et al.* Ligand selectivity of 105kD and 130kD lipoprotein-binding proteins in vascular-smooth-muscle-cell membranes is unique. *Biochem J*. 1996, **317**(Pt 1): 297 - 304

[13] Klaus D, Jurgen B, Johannes F *et al.* Common Polymorphisms in the Coding Part of the IL4-Receptor gene. *Biochemical And Biophysical Research Communications*. 1997, **231**: 696 - 697

[14] Gregg JM, Cereghino JL, Shi J *et al.* Recombinant protein Expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 2000, **16**(1): 23 - 52

[15] Pollock HW, Ebert CS, Dubin MG *et al.* The role of soluble interleukin-4 receptor and interleukin-5 antibody in preventing late-phase allergy-induced eustachian tube dysfunction. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2002, **127**(3): 169 - 176

Expression of the Human Soluble Interleukin 4 Receptor in Methylotrophic Yeast

ZHANG Yong HU Jian LI Yuan*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Science/Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract Interleukin-4 (IL-4) is a pleiotropic cytokine which plays a pivotal role in shaping immune responses. IL-4 mediates important proinflammatory functions in asthma, including the IgE isotype switch. IL-4 exerts its biological effects through binding

Received : 09-18-2003

This work was supported by Grant from National Nature Science Foundation of China (30370038).

* Corresponding author : Tel : 86-10-63153320 ; Fax : 86-10-63017303 ; Email : yuanwli@263.net

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

to its receptor(IL-4R) complex , with the α chain as the high affinity binding subunit. Soluble IL-4R lacks the transmembrane and cytoplasmic domains , so it cannot induce cellular activation. By acting as a decoy to circulating IL-4 and neutralize its activity , its high specificity and affinity make it ideal as an IL-4 antagonist. Some companies have embarked the clinical research for asthma treatment with the sIL-4R and the result revealed well therapeutic effect.

With RNA extracted from human monocyte as the template , The sIL-4R cDNA encoding the extracellular domain of IL-4R α chain was obtained by RT-PCR. Compared with the sIL-4R encoding sequence in GenBank , the nucleotide sequencing analysis indicated that there was a A \rightarrow G mutation at 148bp and the mutation caused Ile \rightarrow Val at 50th amino acid. According to the references , numerous polymorphisms have been identified in the IL-4R gene and the Ile50Val was the only known extracellular variant of human IL-4R. Then the recombinant vector pPIC9K/sIL-4R was constructed , linearized and introduced into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The recombinant sIL-4R was identified by SDS-PAGE , Western blot and Ligand binding blot. The SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the apparent molecular weight of expressed sIL-4R was about 30kD. And the Ligand binding blot analysis indicated the expressed sIL-4R had the biological activity. The sIL-4R , which had the biological activity , was successfully secretorily expressed in the *Pichia pastoris*(GS 115)

Key words human soluble interleukin 4 receptor(sIL-4R) , *Pichia pastoris*