

# 香蕉多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白的分离与纯化

代 易 纪春艳 王振中

华南农业大学植物病理生理学研究室, 广州 510642

**摘要** 多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(PGIP)能够特异性结合并抑制真菌侵染所产生的多聚半乳糖醛酸酶。本试验以健康香蕉幼苗植株为材料,通过硫酸铵沉淀、PM10膜超滤浓缩、亲和层析、离子交换层析以及凝胶层析等步骤,纯化获得一种PGIP,SDS-PAGE确定其分子质量为38.2 ku。该PGIP的活性对温度敏感,对香蕉枯萎病菌4号小种(*Foc4*)PG酶活性的抑制高于对*Aspergillus niger* PG酶活性的抑制,表明其对不同PG酶的抑制具有选择性。

**关键词** 香蕉;多聚半乳糖醛酸酶;抑制蛋白;香蕉枯萎病菌

**中图分类号** S 432.2<sup>+</sup>3; S 668.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)06-0707-05

香蕉枯萎病是一种严重的土传病害,在香蕉的整个生长期均可发生,其病原为古巴尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*。香蕉枯萎病菌从受伤的根茎侵入,通过寄主维管束向假茎上部及叶部分蔓延,堵塞木质部导管,引起维管束腐烂坏死,最终导致香蕉植株枯萎死亡<sup>[1]</sup>。侵染源主要是带菌的吸芽、病株残体和带菌土壤。近年来,由于连年种植,香蕉枯萎病在我国海南、广东等产区大面积爆发,香蕉枯萎病已对我国香蕉产业构成严重威胁。

病原真菌侵染植物遇到的第一道防线是植物的细胞壁,针对细胞壁中的每一种多糖成分,植物病原真菌都有相应的降解酶对其进行降解,如果胶酶、纤维素酶和半纤维素酶等<sup>[2]</sup>。病原降解寄主细胞壁的过程中,这些酶的产生具有一定的顺序,完全降解细胞壁,需要这些酶在时空和功能上的相互配合。果胶酶是病原物突破植物细胞壁过程中一类非常重要的复合酶。根据底物的不同可以分成许多类,其中多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase)是一类参与果胶降解的酶。通常也将内切多聚半乳糖醛酸酶(endo-polygalacturonase, endo-PG)简称为PG,它能够随机地在不同部位水解切开非甲基化的果胶或多聚半乳糖醛酸的 $\alpha$ -1,4-糖苷键而导致细胞壁降解及植物组织浸解软化,是重要的致病因子<sup>[2]</sup>。香蕉枯萎病尖孢镰刀菌分泌的PG酶能够裂解胞间层果

胶,为其他细胞壁降解酶等致病因子的作用提供了条件,从而加速枯萎病病程的扩展。

在植物与病原菌长期相互作用的过程中,植物相应地产生能够抑制病原菌PG酶活性的因子,其中以多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(endo-polygalacturonase-inhibiting protein, PGIP)为主<sup>[3]</sup>。PGIP最早由Albersheim等<sup>[4]</sup>在菜豆下胚轴番茄悬浮培养细胞的提取物中发现,是一类富含亮氨酸重复的细胞壁结合蛋白,能够特异性、非竞争性地结合PG酶,抑制PG酶活性,增强植物抗病性。近十几年来,国内外对PGIP的研究取得了一些成果。1993年,Williamson等<sup>[5]</sup>首次从树莓果实中分离纯化出PGIP,该蛋白分子质量为38.5 ku,能够非竞争性地抑制灰霉属真菌PG酶的活性。Sharrock等<sup>[6]</sup>于1994年在西洋梨中克隆了PGIP的编码基因。目前,国内外对PGIP的分离及其在抗病育种中的应用等研究已取得一定的进展。Abu-Goukh等<sup>[7]</sup>报道梨对灰葡萄孢菌、扩展青霉菌和柑橘小穴壳菌繁殖的抵抗能力随着果实的成熟逐渐减弱,与此同时,梨体内的PGIP含量也相应降低。阮期平等<sup>[8]</sup>分离纯化获得了小麦PGIP,免疫试验表明小麦幼苗中PGIP的含量较高,并且更不易遭受小麦禾谷镰刀菌的侵染。这些研究表明,PGIP可能主要在植物生长幼苗期对病原真菌起防御作用。Bennett等<sup>[9]</sup>

收稿日期: 2011-04-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971888)

代 易, 硕士研究生. 研究方向: 植物病理学. E-mail: daiyi\_123@sina.com

通讯作者: 王振中, 博士, 教授. 研究方向: 植物-病原物互作. E-mail: zzwang@scau.edu.cn

成功将梨的 PGIP 基因转入番茄,并获得高效表达,使番茄对 *Botrytis cinerea* 的抗性明显增加。1997 年,Desiderio 等<sup>[10]</sup>将菜豆 PGIP 基因对番茄、烟草和大豆等进行了转化,其转化番茄对镰刀菌有抗性。将 PGIP 基因转入靶标植物提高植物本身的抗性,为香蕉枯萎病的防治提供了新思路。

PG 是香蕉枯萎病菌侵染香蕉的重要致病因子。笔者对健康香蕉幼苗中的 PGIP 进行了分离与纯化,并分析其生物活性,旨在了解 PGIP 对香蕉枯萎病病原菌 PG 酶活性的抑制作用,为研究 PGIP 诱导香蕉抗枯萎病的作用机制提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

健康组培香蕉苗购于广东省农业科学院苗木中心,种植于 25 °C 温室内,每日 12 h 光照,光照强度 10 000 lx,待生长至株高 10~15 cm 时采样。

尖孢镰刀菌古巴专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder et Hansen 4 号小种(*Foc4*) PG 酶由笔者所在实验室分离保存。

试剂:层析填料 ConA-Sepharose 4B, CM-Sepharose Fast Flow, Sephacryl S-100 High Resolution 购自 Pharmacia 公司; D-(+)-galacturonic acid, 2-氰乙酰胺(2-cyanoacetamide)购自 Sigma 公司; *Aspergillus niger* PG(EC 3.2.1.15)购自 Sigma-Aldrich 公司。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 多聚半乳糖醛酸酶(PG)的制备

以 0.5% 柑橘果胶和 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC)为碳源,培养获得 *Foc4* 培养液 10 L, PM10 膜浓缩至 200 mL,转入透析袋中,用上样缓冲液(0.015 mol/L NaCl, pH 4.5, 0.02 mol/L NaAc)透析 24 h, 0.45 μm 滤膜抽滤后上同样缓冲液平衡过 Sephacryl S-100 柱,流速 2.5 mL/min。收集各峰,将具有活性的部分转入 30 ku 超滤离心管中浓缩,用缓冲液(pH 4.5, 0.02 mol/L NaAc)进行平衡后上 Sepharose SP XL 16/10 阳离子交换层析柱,并用缓冲液(0.075 mol/L NaCl, pH 4.5, 0.02 mol/L NaAc)进行线性洗脱,流速为 4 mL/min。活性峰经 30 ku 超滤离心管超滤浓缩,用缓冲液(pH 4.5, 0.02 mol/L NaAc)除盐后上 CM-Sepharose FF 柱,用缓冲液(0.075 mol/L NaCl, pH 4.5, 0.02 mol/L NaAc)进行线性洗脱,流速为 1 mL/min。再次经 30 ku 超滤离心管超滤浓缩,并

用缓冲液(pH 4.5, 0.02 mol/L NaAc)除盐后进行 PG 酶活力测定和 SDS-PAGE 电泳,获得的纯化 *Foc4* PG 酶置于 -20 °C 冰箱中保存备用。

### 1.3 PG 酶活性的检测

参照 Gross 的方法<sup>[11]</sup>进行测定。25 μL PG 酶(0.5 mg/mL)与 100 μL 多聚半乳糖醛酸(PGA, 0.4% PGA 溶于 pH 5.2 的 0.05 mol/L NaAc 缓冲液中)在 30 °C 下水浴 30 min,加入 1 mL 硼酸缓冲液(pH 9.0, 0.1 mol/L)终止反应并加入 200 μL 1%的 2-cyanoacetamide,沸水浴 10 min 显色,取出冷却至室温后于 280 nm 处测定其吸光值。

PG 酶活力单位定义:在 30 °C 时,0.4%的多聚半乳糖醛酸缓冲液(pH 5.2, 0.05 mol/L NaAc)中,每分钟内能降解底物产生相当于 1 μmol 半乳糖醛酸(即 1 μmol/min)的酶量为 1 个酶单位(U)。

### 1.4 PGIP 的分离与纯化

1)PGIP 的提取及纯化。PGIP 提取及纯化方法参照 Favaron 等<sup>[12]</sup>和 Kemp 等<sup>[3]</sup>的方法并做适当修改。取整株香蕉苗共 1 000 g,洗净后剪碎,置于组织捣碎机中,加入液氮研磨至粉末状。加入 2 000 mL 抽提缓冲液(0.05 mol/L NaAc, pH 5.2, 0.5 mol/L NaCl, 0.001 mol/L EDTA, 0.005 mol/L DTT, 1% PVPP, 0.01% β-巯基乙醇)4 °C 下搅拌 0.5 h,转入离心瓶中,13 000 r/min, 4 °C 离心 30 min,取上清液,PM10 膜超滤浓缩至 200 mL。滤液用硫酸铵沉淀法按 0~90%硫酸铵饱和度进行沉淀,13 000 r/min 离心,沉淀物溶解于 NaAc 缓冲液(pH 5.2, 0.05 mol/L NaAc)中,并用该缓冲液于 4 °C 下透析 24 h。将样品于 8 000 r/min, 4 °C 下离心 30 min,取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤并用 Millipore 超滤离心管(MWCO 10 ku)浓缩,经 ConA buffer(0.2 mol/L NaAc, pH 6.0, 0.002 mol/L NaCl, 0.002 mol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.002 mol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.002 mol/L MnCl<sub>2</sub>)透析,上预先用此缓冲液平衡过的 ConA-Sepharose 4B 柱,用 0.25 mol/L α-methyl -D-manno-pyranoside 以 1 mL/min 的流速进行洗脱。收集活性峰部分,用缓冲液(pH 5.2, 0.5 mol/L NaAc)透析,超滤浓缩后上 1.0 cm×20 cm CM-Sepharose FF 柱,以 2 mL/min 的流速,1 mol/L NaCl 梯度线性洗脱,每管收集 2 mL 活性峰,用缓冲液(pH 5.2, 0.05 mol/L NaAc)透析并浓缩后上同样缓冲液预先平衡过的 Sephacryl S-100 柱,流速 0.5 mL/min,收集活性峰后 10 ku 超滤管

浓缩, 并进行 SDS-PAGE 电泳。

2) PGIP 的活性检测。根据 PGIP 与 PG 共同存在时多聚半乳糖醛酸的还原性醛基末端相对减少的量确定 PGIP 的活性。25  $\mu\text{L}$  PG 酶 (0.5 mg/mL), 75  $\mu\text{L}$  PGIP 和 100  $\mu\text{L}$  多聚半乳糖醛酸 (PGA, 0.4% PGA 溶于 pH 5.2 的 0.05 mol/L NaAc 缓冲液中) 在 30  $^{\circ}\text{C}$  下水浴 30 min, 加入 1 mL 硼酸缓冲液 (pH 9.0, 0.1 mol/L) 终止反应并加入 200  $\mu\text{L}$  1% 的 2-cyanoacetamide, 沸水浴 10 min 显色, 取出冷却至室温后于 280 nm 处测定其吸光值。

PGIP 酶活力单位定义: 在 30  $^{\circ}\text{C}$  下, pH 5.2 时, 使 1 个酶单位的 PG 酶活力下降 50% 的 PGIP 量为 1 个活力单位 (U)。

### 1.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

参照 Laemm 的方法<sup>[14]</sup>, 浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度为 12%, 并采用考马斯亮蓝 G-250 染色法<sup>[15]</sup>。蛋白含量的测定采用改良的 Bradford 方法进行。

### 1.6 温度对 PGIP 活性的影响

1) 温度对 PGIP 活性的影响。将纯化获得的 PGIP 等量地与 PG 酶混匀, 分别在 15、30、45、60、75、90  $^{\circ}\text{C}$  的不同温度梯度下处理 30 min 之后, 立即检测 PGIP 活性。

2) 不同温度下 PGIP 对 2 种 PG 酶活性的抑制。将纯化获得的 PGIP 等量地与 *Aspergillus niger* PG 酶及香蕉枯萎病 4 号小种 (*Foc4*) PG 酶混匀, 分别在 15、30、45  $^{\circ}\text{C}$  的不同温度梯度下处理 30 min, 检测 PGIP 对 2 种 PG 酶活性的抑制。以单位浓度的 PG 被完全水解所需的酶活为标准, 计算 PGIP 的抑制百分比。

## 2 结果与分析

### 2.1 香蕉植株 PGIP 的分离与纯化

香蕉幼苗经研磨、匀浆以及硫酸铵沉淀后获得粗提液, 活性测定表明粗提液能够抑制 PG 酶的活性, 沸水浴后抑制活性丧失, 这表明硫酸铵沉淀中含有 PGIP。将此沉淀物溶解后过 ConA-Sepharose 4B 亲和柱, 将未结合峰 Con-1 (未结合蛋白) 与结合峰 Con-2 (结合蛋白) 的收集液分别进行 PGIP 活性检测。检测结果表明, 与 ConA-Sepharose 4B 亲和柱结合的部分对 PG 酶具有抑制作用 (图 1), 说明 Con-2 峰的收集液中具有 PGIP 的生物活性。

将有抑制活性的收集液继续过 CM-Sepharose

弱阳离子交换柱, 洗脱曲线由 C-1、C-2 和 C-3 峰组成, 对每个峰的收集液分别进行活性检测。活性检测表明, C-2 峰 (此时 NaCl 洗脱浓度约为 42%) 的洗脱液对 PG 具有较强的抑制作用 (图 2)。

将 C-2 峰的洗脱液超滤浓缩后上 Sephacryl S-100 凝胶柱, 洗脱曲线由 S-1、S-2 和 S-3 峰组成, 对每个峰收集液活性检测表明, S-2 峰的收集液对 PG 活性有抑制作用 (图 3), 说明 S-2 峰的收集液能够抑制 PG 酶的活性, 具有 PGIP 的生物活性。

将 S-2 峰的收集液超滤浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色后获得 1 条清晰条带, 分子质量约为 38.2 ku (图 4)。这表明香蕉幼苗组织经过研磨、匀浆、超滤膜超滤、硫酸铵沉淀以及不同的柱层析纯化获得了能够抑制 PG 酶活性的 PGIP。

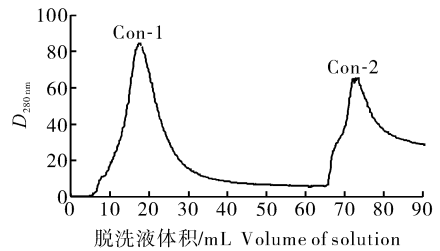
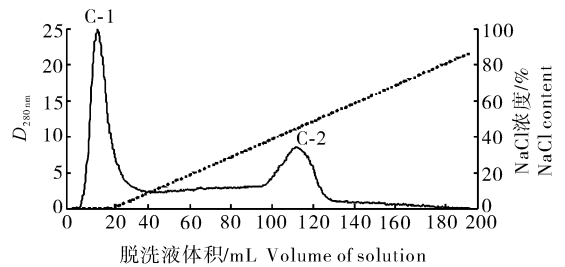


图 1 香蕉 PGIP 的 ConA-Sepharose 4B 层析  
Fig. 1 Chromatography of PGIP in banana by ConA-Sepharose 4B column



虚线为洗脱液的梯度浓度。The density gradient of the NaCl solution is represented by the line of dashes.

图 2 PGIP 的 CM-Sepharose FF 层析图

Fig. 2 Chromatography of PGIP in banana by CM-Sepharose FF column

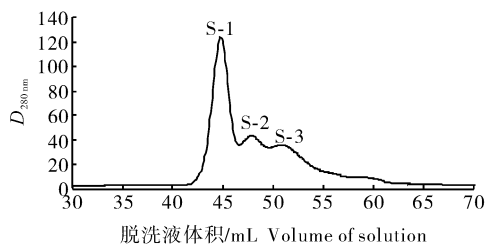
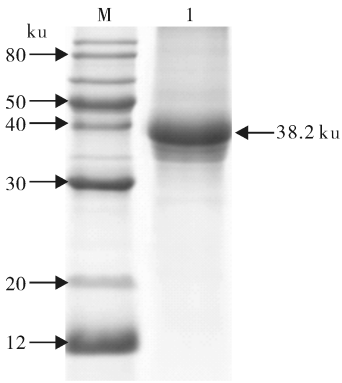


图 3 PGIP 的 Sephacryl S-100 层析图

Fig. 3 Chromatography of PGIP in banana by Sephacryl S-100 column





M:DL 2 000 marker; 1:纯化获得的 PGIP 条带 Get PGIP bands of purification.

图4 PGIP 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE of PGIP in banana

## 2.2 PGIP 对 2 种酶活性的抑制作用

将纯化获得的 PGIP 分别对 *Aspergillus niger* PG 和香蕉 *Foc4* PG 酶在 15、30、45 °C (pH 5.2) 下进行活性抑制测定,结果表明,在 3 个不同温度下,PGIP 对 *Aspergillus niger* PG 酶活性的抑制均比较低,分别为 6.8%、7.2%、5.2%。而对 *Foc4* PG 酶活性的抑制比较高,分别为 76.05%、80.38%、51.50%。结果表明香蕉 PGIP 对不同 PG 酶的活性具有选择性抑制作用。

## 2.3 温度对 PGIP 活性的影响

测定结果表明,在 15~30 °C 条件下,随着温度升高 PGIP 活性略微提高;30 °C 以后,随着温度的升高 PGIP 的活性逐渐下降;在 60~75 °C 条件下,PGIP 的活性抑制比从 41.30% 急剧下降至 4.72%;90 °C 之后,PGIP 活性丧失,表明香蕉 PGIP 对 PG 酶活性的抑制对温度敏感。

## 3 讨论

目前,人们已经在多种植物如苹果、甜橙、青椒、黄瓜、苜蓿和小麦中发现了能够抑制 PG 酶活性的 PGIP,但尚未见到香蕉 PGIP 分离纯化的相关报道。本试验通过硫酸铵沉淀、ConA 刀豆凝集素亲和层析、阳离子层析以及凝胶柱层析的方法,获得分子量为 38.2 ku 的香蕉 PGIP。本试验结果表明,健康香蕉幼苗中存在 PGIP,并能够高效抑制 *Foc4* PG 酶的活性。这可为进一步探讨香蕉体内 PGIP 的存在情况,研究其抑制香蕉枯萎病菌 PG 酶的作用机制提供科学依据。

Kemp 等<sup>[13]</sup>利用纯化获得的小麦 PGIP 对 9 种

不同 PG 酶活性的抑制进行了研究,结果显示,小麦 PGIP 对 *A. niger* I PG 酶、*A. niger* II PG 酶和 *A. niger* Exo-PG 酶活性的抑制较低,均不超过 10%,但对 *Cochliobolus sativus* PG 酶活性的抑制比达到 90%,说明小麦中 PGIP 对 PG 酶活性的抑制可能存在特异性。本试验结果表明,香蕉中 PGIP 对 *FOC4* PG 酶活性的抑制比远远高于对 *A. niger* PG 酶活性的抑制比,说明香蕉中 PGIP 对不同 PG 酶活性的抑制也具有选择性。由于 PGIP 对不同的 PG 酶表现出的抑制活性不同,因此在纯化 PGIP 的过程中,应当选择适当的 PG 酶进行检测,并以其中活性抑制比较高的 PG 酶作为检测标准,从而保证获得真正具有活性的 PGIP。

植物细胞壁果胶类物质水解后的产物能够激活植物的防御反应<sup>[16]</sup>。本试验结果表明,香蕉 PGIP 对 *Foc4* PG 酶活性的抑制能够达到 80%,但香蕉 PGIP 在香蕉抗病进程中的作用,还需进一步研究。Favaron 等<sup>[17]</sup>从韭葱中获得的 PGIP 粗提取液,经离子柱交换层析和等电聚焦电泳分离后,获得多个组分的 PGIP。不同的组分对分别来自核盘菌、葡萄孢和串珠镰孢的 PG 酶活性具有不同程度的抑制,表明一种植物中存在或能够产生多种抑制 PG 酶活性不同的 PGIP。由此推测,香蕉组织中也可能存在分子质量相近,且结构有差异的不同 PGIP,从而对病原物分泌的 PG 酶活性具有不同特异性的抑制作用。

本试验材料选取的是整株香蕉苗,对于香蕉各个器官的 PGIP 含量并未分别进行分离与纯化,香蕉 PGIP 是否具有器官、组织特异性未知。香蕉枯萎病侵染主要是通过根部侵入,病原物分泌的 PG 酶主要侵染根部,故有必要对香蕉各个器官尤其是根部 PGIP 进行深入研究,了解其分布和结构以及对 *Foc4* PG 酶活性的抑制差异。对香蕉不同部位 PGIP 或可能存在不同 PGIP 的研究,将丰富对枯萎菌与香蕉植株之间相互作用及香蕉体内抗病性产生机制的理解。香蕉 PGIP 的分离与纯化,可为其进一步编码基因的克隆以及利用工程菌转化进行香蕉枯萎病防控的研究提供新策略。

## 参 考 文 献

- [1] HWANG S C, CO W H. Cavendish banana cultivars resistant to fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan[J]. Plant Disease, 2004, 88(6): 580-588.

- [2] HADFIELD K A, BENNETT A B. Polygalacturonases; many genes in search of a function[J]. *Plant Physiol*, 1998, 117: 337-343.
- [3] D'OVIDIO R, MATTEI B, ROBERTI S, et al. Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions[J]. *Proteins and Proteomics*, 2004, 1696(2): 237-244.
- [4] ALBERSHEIM P, ANDERSON A J. Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, 68: 1815-1819.
- [5] WILLAMSON B, JOHNSTON D J, RAMANATHAN V, et al. A polygalacturonase-inhibitor from immature raspberry fruit: a possible new approach to grey mould control[J]. *Acta Horticulturae*, 1993, 352: 601-606.
- [6] SHARROCK K R, LABAVITCH J M. Polygalacturonase inhibitor of Bartlett pear fruits: differential effects on botrytis cinerea polygalacturonase hydrolysis of pear cell walls and on ethylene introduction in cell culture[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1994, 45: 305-319.
- [7] ABU-GOUKH A A, STRAND L L, LABAVITCH J M. Development-related changes in decay susceptibility and polygalacturonase inhibitor content of "Bartlett" pear fruit [J]. *Physiological Plant Pathology*, 1983, 23(1): 101-109.
- [8] 阮期平, 周立, 刘勇. 小麦在与水杨酸诱导的应答过程中 PGIP 的积累[J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 4: 313-316.
- [9] BENNETT A, LABAVITCH J M, POWELL A, et al. Plant inhibitors of fungal polygalacturonase and their use to control fungal disease[J]. *Official Gazette of the United States Patent and Trademark Office Patents*, 1996, 1191(5): 3527-3529.
- [10] DESIDERIO A, ARACRI B, LECKIE, et al. Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10: 852-860.
- [11] GROSS K C. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying *Polygalacturonase* using 2-Cyanoacetamide [J]. *HortScience*, 1982, 17(6): 933-934.
- [12] FAVARON F, D'OVIDIO R, PORCEDDU E, et al. Purification and molecular characterization of a soybean polygalacturonase-inhibiting protein [J]. *Planta*, 1994, 195: 80-87.
- [13] KEMP G, BERGMANN C W, CLAY R. Isolation of a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) from wheat [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16: 955-958.
- [14] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [15] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [16] FRY S C, ALDINGTON S, HETHERINGTON P R, et al. Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall [J]. *Plant Physiology*, 1993, 103: 1-5.
- [17] FAVARON F. Gel detection of *Allium porrum* polygalacturonase-inhibiting protein reveals a high number of isoforms [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2001, 58: 239-245.

## Isolation and purification of a polygalacturonase-inhibiting protein from banana

DAI Yi JI Chun-yan WANG Zhen-zhong

*Laboratory of Physiological Plant Pathology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*

**Abstract** Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) is a cell wall binding protein that can specifically inhibit the activity of fungal polygalacturonase. A PGIP was purified from healthy banana seedlings by a series of column chromatography: ConA affinity column, CM-Sepharose ion exchange column and Sephadex S-100 gel filtration column. The 38.2 ku PGIP was shown as a single band, as determined by SDS-PAGE. Its activity is sensitive to different temperatures. The inhibition of the PGIP to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4 (*Foc4*) is higher than its inhibition to *Aspergillus niger* PG, which suggested the banana PGIP activity might specifically inhibit certain PG.

**Key words** banana; polygalacturonase; inhibiting protein; *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4