

牦牛乳中主要过敏原的分离纯化

李海梅¹, 马 莺¹, 崔艳华¹, 汪加琦², 李启明², 何胜华¹

(1. 哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院, 150090 哈尔滨; 2. 新希望乳业有限公司研究开发中心, 610041 成都)

摘要: 为研究牦牛乳蛋白质的过敏性, 用化学方法分离牦牛乳中主要的过敏原蛋白质, 采用快速蛋白纯化系统(FPLC)结合凝胶层析技术对分离出的蛋白质进行纯化. 在牦牛脱脂乳中添加 10% 醋酸至酪蛋白的等电点 pH4.6, 使酪蛋白和乳清蛋白分离. 根据酪蛋白在尿素溶液中的溶解度和对钙的敏感性不同, 对酪蛋白进行粗分级, 得到 α s-酪蛋白和 β -酪蛋白. 应用离子交换色谱和葡聚凝胶 sephadex G100 进一步纯化粗分级得到的酪蛋白, 得到 α s-casein 和 β -酪蛋白. 以柠檬酸钠为整合剂, 在低 pH 并有盐存在的条件下从酸乳清中分离出 β -乳球蛋白, FPLC 纯化后用 RP-HPLC 检测其纯度, 得到 α s-casein 和 β -酪蛋白纯度分别为 87.13% 和 88.58%, β -乳球蛋白的纯度为 80.00%.

关键词: 牦牛乳; 酪蛋白分离; β -乳球蛋白分离; 快速蛋白纯化色谱

中图分类号: TS252 **文献标志码:** A **文章编号:** 0367-6234(2012)04-0080-06

Separation and purification of major allergens in yak milk

LI Hai-mei¹, MA Ying¹, CUI Yan-hua¹, WANG Jia-qi², LI Qi-ming², HE Sheng-hua¹

(1. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China;

2. Research and Development Central of New Hope Dairy Company, 610041 Chengdu, China)

Abstract: The major allergens in yak milk were obtained by chemical methods, and purified by a fast protein liquid chromatography (FPLC) combined gel chromatography in order to analyze allergenicity of protein in yak milk. Casein and whey were isolated after adjusting isoelectric precipitating of skimmed milk to 4.6 by adding 10% acetic acid. Based on differential solubility in urea solutions and differential sensitivity of calcium, α s-casein and β -casein were separated from whole casein. And then, the crude fractions of α s-casein, β -casein were further separated using anion-exchange FPLC and Sephadex G100 column. β -lactoglobulin was separated from acid whey using chelating of citrate sodium at low pH in the presence of salt and purified by FPLC. The results of RP-HPLC showed that the purities of α s-, β -casein, and β -lactoglobulin were 87.13%, 88.58%, and 80.00%, respectively.

Key words: yak milk; casein separation; β -lactoglobulin separation; fast protein liquid chromatography (FPLC)

牛乳中主要的过敏原蛋白为 α s-酪蛋白、 β -酪蛋白和 β -乳球蛋白^[1]. 牦牛乳蛋白质组成与牛乳相似^[2], 哺乳动物又具有交叉免疫原性, 因此, 牦牛乳中的过敏原蛋白质可能与牛乳中的相似. 为了更好地研究牦牛乳的过敏机制, 对牦牛乳中主

要过敏原蛋白质进行分离纯化是非常必要的.

目前能有效分离乳中 α s-酪蛋白、 β -酪蛋白的方法很多, 如反相高效液相色谱 (RP-HPLC)、毛细管电泳、疏水层析等, β -乳球蛋白的分离方法也很多, 如盐析、等电点沉淀、三氯乙酸沉淀、离子交换层析、疏水层析等^[1, 3-5]. 但这些方法都不能分离出足够多的目的蛋白用于过敏原的分析^[6-9], 或成本高、工艺复杂. 蛋白质快速分离纯化系统 (FPLC) 是 20 世纪中期开始应用的一种大量分离蛋白质的技术^[10-12], 它既可以实现对蛋白质的快

收稿日期: 2011-04-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30871953).

作者简介: 李海梅(1974—), 女, 博士研究生, 讲师;

马 莺(1961—), 女, 教授, 博士生导师.

通讯作者: 李海梅, haimeli@hit.edu.cn.

速分离,又可以对蛋白质进行富集.化学分离结合 FPLC 方法能更有效地分离并纯化乳中的蛋白质.因此,本实验应用化学分离结合 FPLC 阴离子交换层析和葡聚糖凝胶 Sephadex G100 层析来分离纯化和富集牦牛乳酪蛋白.

1 实验

1.1 材料与试剂

Cellulose DE-52 (Whatman);N,N'-甲叉双丙烯酰胺 (Merck 公司);乙腈 (色谱纯),上海国大化工有限公司;丙烯酰胺, Sigma 公司;Sephadex G100, Sigma 公司;其他所用试剂均为分析纯.

1.2 仪器与设备

层析柱($\Phi 1.6\text{ cm} \times 15\text{ cm}$),上海锦华层析设备厂;FPLC 蛋白纯化仪,AKTAPrime;垂直板电泳槽(仪),上海六一仪器有限公司;HPLC 色谱仪, Agilent.

1.3 实验方法

1.3.1 样品采集

于2009年5月在四川省麦洼地区采集牦牛乳样品,用灭菌瓶(500 mL/瓶)封装,样品速冻后空运回实验室.从四川到哈尔滨的运输过程中样品一直处于冷冻状态,回实验室后放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,测定时流水解冻.

1.3.2 牦牛乳酪蛋白和乳清蛋白的分离

采用等电点沉淀的方法分离牦牛乳酪蛋白和乳清蛋白.牦牛乳500 mL在 $2\ 500 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下离心30 min,去除上层脂肪后得牦牛脱脂乳.10%醋酸调脱脂乳的pH为4.6,室温静置30 min后,混合液在 $500 \times g$ 条件下离心20 min,得沉淀为酪蛋白,上清液为乳清蛋白.乳清蛋白于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用.酪蛋白用蒸馏水洗3次后再分散到蒸馏水中,并用 0.5 mol/L NaOH调pH7.0,酪蛋白溶解后再用10%醋酸调pH为4.6,重新沉淀酪蛋白.此步骤重复3次后,酪蛋白于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

1.3.3 化学方法分离牦牛乳酪蛋白和乳清蛋白

1) α -酪蛋白和 β -酪蛋白的分离.酪蛋白在不同浓度尿素溶液中的溶解度不同,本实验将全酪蛋白15 g溶于 6.6 mol/L 尿素中,再将溶液稀释到尿素的终浓度为 4.6 mol/L , $4\ 000\text{ r/min}$ 条件下离心15 min,得 α -酪蛋白沉淀.上清液稀释到尿素终浓度为 1.7 mol/L ,并调节pH为4.7, $4\ 000\text{ r/min}$ 离心15 min,得 β -酪蛋白沉淀^[1].

2) 牦牛乳 β -乳球蛋白(β -Lg)的分离.采用盐析的方法制备 β -Lg^[4].在乳清蛋白中加NaC(柠

檬酸钠),并调节NaC浓度为 0.15 mol/L ,用 6 mol/L 柠檬酸调pH3.9, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温45 min后, $5\ 000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下低温离心30 min.得到的上清液用7% NaCl溶液清洗2次,在 $10\ 000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下低温离心20 min.沉淀废弃,上清液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 透析24 h后, $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻干48 h,得 β -Lg.

1.3.4 牦牛乳酪蛋白和乳清蛋白的 FPLC Cellulose DE-52 层析纯化

蛋白质快速纯化系统(FPLC)包括AKTA explorer Air 100、填充20 mL Cellulose DE-52 (Pharmacia)介质的层析柱($\Phi 1.6\text{ cm} \times 15\text{ cm}$),紫外检测波长 $\lambda = 280\text{ nm}$.缓冲液A为pH7.0的咪唑-盐酸缓冲液,含 0.01 mol/L 咪唑、 3.3 mol/L 尿素、 0.2% (体积分数)2-巯基乙醇.缓冲液B为在缓冲液A中加 0.4% (质量分数)的NaCl.洗脱液流速为 80 mL/h ,线性洗脱.样品制备:粗分离得到的酪蛋白和 β -乳球蛋白分别溶于起始缓冲液中, $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后上样,上样量为 0.5 mL .FPLC得到的酪蛋白和乳清蛋白经超纯水透析去盐、去尿素并经聚乙二醇2000浓缩后备用,SDS-PAGE鉴定酪蛋白和 β -乳球蛋白.

1.3.5 凝胶过滤色谱纯化牦牛乳酪蛋白

凝胶过滤层析的填料为Sephadex G100凝胶.用pH8.0的 0.02 mol/L 磷酸盐(含 3.3 mol/L 的尿素)缓冲液平衡柱子($\Phi 1.6\text{ cm} \times 65\text{ cm}$). $500\text{ }\mu\text{L}$ 的样品($300\text{ }\mu\text{L}$ 由FPLC离子交换色谱得到的 α s-酪蛋白加 $200\text{ }\mu\text{L}$ pH8.0的 0.02 mol/L 磷酸盐) $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后上样.洗脱速度为 1 mL/min ,检测器于280 nm波长处紫外检测.得到的目标蛋白经超纯水透析、脱盐,并经聚乙二醇2000浓缩后冻干,用RP-HPLC检验其纯度.

2 结果与讨论

2.1 化学方法分离牦牛乳 α s-酪蛋白、 β -酪蛋白和 β -乳球蛋白

2.1.1 化学方法分离牦牛乳 α s-和 β -酪蛋白

等电点沉淀(pH4.6)是分离乳中酪蛋白和乳清蛋白的传统方法^[1].用10%的醋酸调整脱脂乳的pH4.6,在室温下静置30 min.然后溶液在 $3\ 000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下离心15 min,得到酪蛋白胶束沉淀.酪蛋白胶束主要由 α s1-酪蛋白、 α s2-酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白组成^[14].在酪蛋白胶束中,各酪蛋白间的结合非常紧密,很难分开.而尿素作为一种蛋白质分散剂能够使酪蛋白胶束解聚^[15].将酪蛋白沉淀分散到 6 mol/L 尿素溶液中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下静置1 h.用去离子水稀释溶液,使

尿素的最终浓度为 4.63 mol/L,再将其置于 4 °C 条件下静置 1 h. 然后溶液在 3 000 × g、4 °C 条件下离心 15 min,得到 α-酪蛋白沉淀(主要含有 αs1-酪蛋白、αs2-酪蛋白、κ-酪蛋白和 λ-酪蛋白). 继续用去离子水稀释上清液,使尿素的终浓度为 1.7 mol/L,并调整其 pH 为 4.7,即得到 β-酪蛋白沉淀,将其透析浓缩后,在 -70 °C 条件下保存备用.

在酪蛋白胶束中 αs1-酪蛋白、αs2-酪蛋白、β-酪蛋白是钙敏感性蛋白,而 κ-酪蛋白是钙不敏性蛋白并对维持酪蛋白胶束的稳定性起重要作用^[16-17]. 不同的酪蛋白对钙的敏感性不同,其在钙溶液中的溶解度也不同,将 α-酪蛋白分散到 0.4 mol/L pH7 的 CaCl₂ 溶液中,在 4 °C 下放置过夜得到 αs-酪蛋白沉淀(主要包含 αs1-酪蛋白、αs2-酪蛋白). 得到的 αs-酪蛋白沉淀透析浓缩后 -70 °C 保存备用. 化学分离方法得到的 αs-酪蛋白和 β-酪蛋白仍是混合蛋白,还需要对其进行纯化.

2.1.2 化学方法分离 β-乳球蛋白

将酸乳清作为分离 β-乳球蛋白的原料. 酸乳清经螯合剂柠檬酸钠处理后其 SDS-PAGE 如图 1 所示. 可以看出,样品中主要含有 β-乳球蛋白,但还有少量的 BSA. 乳清中的 Ca²⁺ 对 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白的稳定性起着重要的作用^[18-21]. α-乳白蛋白是钙结合蛋白,每摩尔 α-乳白蛋白中含有 1 mol 的 Ca²⁺, Ca²⁺ 对稳定 α-乳白蛋白的空间结构起着重要的作用^[22-23]. 但是当溶液的 pH 低于 3.9,在有盐存在的条件下会降低钙与 α-乳白蛋白的结合能力,使用钙螯合剂柠檬酸钠很容易使钙螯合,并生成 α-乳白蛋白沉淀,从而使 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白分离^[4]. 从图 1 可以看出,在 pH3.9、柠檬酸钠为螯合剂的条件下 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白得到了很好的分离.

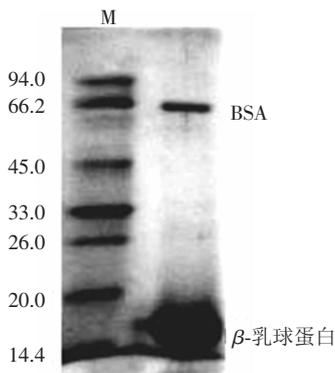


图1 柠檬酸钠螯合剂沉淀酸乳清中的 β-乳球蛋白 SDS-PAGE 电泳图

2.2 牦牛乳 αs-酪蛋白纯化

2.2.1 FPLC 纯化牦牛乳 αs-酪蛋白

在不同的 pH 条件下 αs-酪蛋白和 β-酪蛋白的等电点和所携带的静电荷是不同的^[24],根据该特点可应用离子交换层析的方法分离 αs-酪蛋白和 β-酪蛋白. 采用阴离子交换色谱、Cellulose DE-52 为填料、含有尿素的咪唑盐酸缓冲液在线性条件下进行洗脱、纯化经化学分离得到的 αs-酪蛋白. αs-酪蛋白在快速蛋白纯化系统中被 Cellulose DE-52 介质吸附,经含有 NaCl(0~0.4%) 的洗脱液线性洗脱分两个组分(图 2),洗脱峰 A 和 B. 由于洗脱峰 A 中含有的蛋白质的量较少,没有收集其洗脱峰. SDS-PAGE 检测洗脱峰 B 如图 2 所示,洗脱峰 B 的主要成分为 αs-酪蛋白,并含一部分 β-酪蛋白(图 3). 收集洗脱峰 B,冻干后备用.

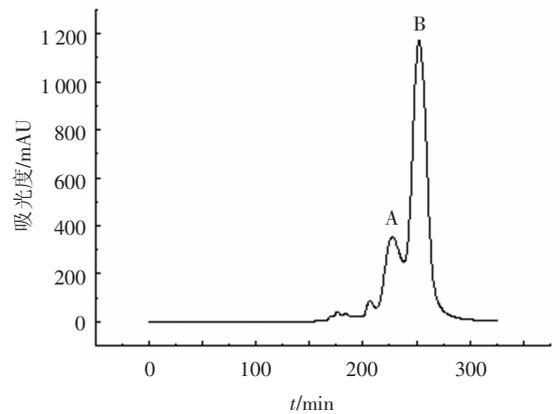


图2 Cellulose DE-52 阴离子交换色谱快速纯化牦牛乳 αs-酪蛋白结果

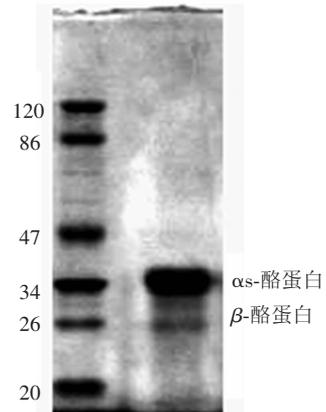


图3 FPLC 纯化得到的 αs-酪蛋白 SDS-PAGE 电泳图

2.2.2 Sephadex G100 纯化牦牛乳 αs-酪蛋白

相对 αs-酪蛋白经 FPLC 系统得到了很好的分离,但其组分中仍含有一部分 β-酪蛋白. 根据酪蛋白之间相对分子质量上的差别,应用葡聚糖凝胶 Sephadex G100 对 αs-酪蛋白进一步纯化. 由上步纯化得到的组分 B 用 Sephadex G100 进一步

纯化,色谱图如图4所示.收集洗脱峰C,并应用RP-HPLC检测,结果如图5所示.根据色谱峰面积比计算 α s-酪蛋白的纯度为87.13%.

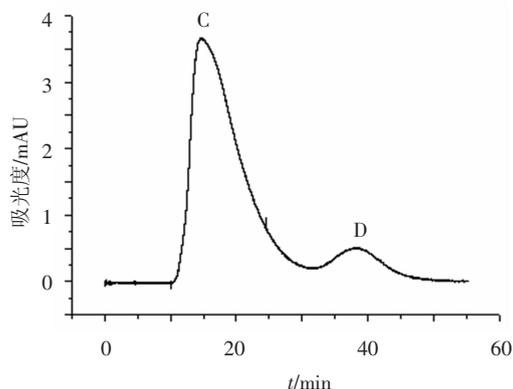


图4 Sephadex G100 纯化 FPLC 得到的 α s-酪蛋白色谱图

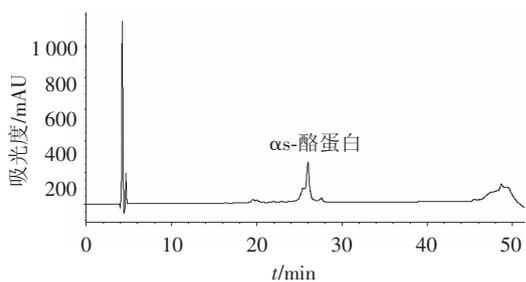


图5 RP-HPLC 分离 α s-酪蛋白结果

2.3 牦牛乳 β -酪蛋白的纯化

2.3.1 FPLC 纯化牦牛乳 β -酪蛋白

采用FPLC对化学分离方法得到的 β -酪蛋白进一步纯化. β -酪蛋白在快速蛋白纯化系统中被Cellulose DE-52 介质吸附并经线性洗脱后分离出来(图6).接收 β -酪蛋白洗脱峰的中间段,并用SDS-PAGE检测,结果如图7所示.洗脱峰B的主要成分为 β -酪蛋白,并含一部分 α s-酪蛋白(图3).收集 β -酪蛋白洗脱峰,冻干后备用.

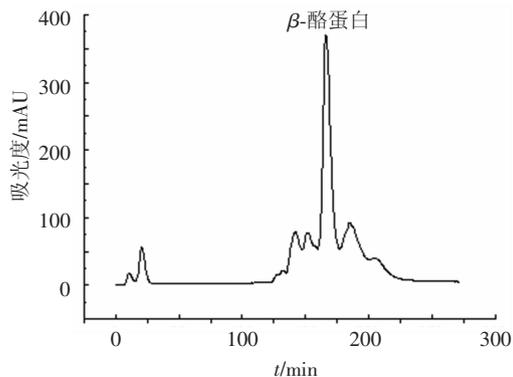


图6 Cellulose DE-52 阴离子交换色谱快速纯化牦牛乳 β -酪蛋白结果

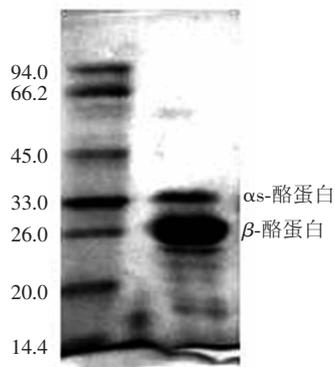


图7 FPLC 得到的 β -酪蛋白 SDS-PAGE 电泳图

2.3.2 Sephadex G100 纯化牦牛乳 β -酪蛋白

由上步纯化得到的 β -酪蛋白用Sephadex G100进一步纯化,色谱图如图8所示.收集 β -酪蛋白洗脱峰,并应用RP-HPLC鉴定,结果如图9所示.根据色谱峰面积比计算 β -酪蛋白的纯度为88.58%.

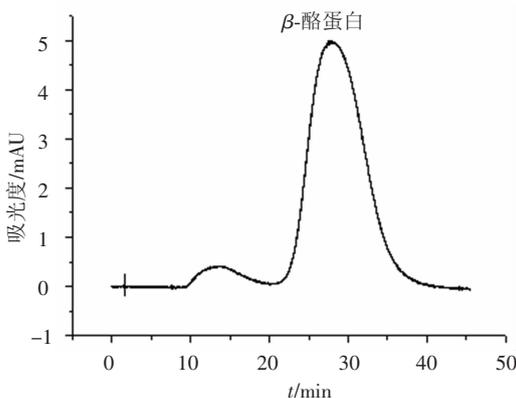


图8 Sephadex G-100 纯化 FPLC 得到的 β -酪蛋白色谱图

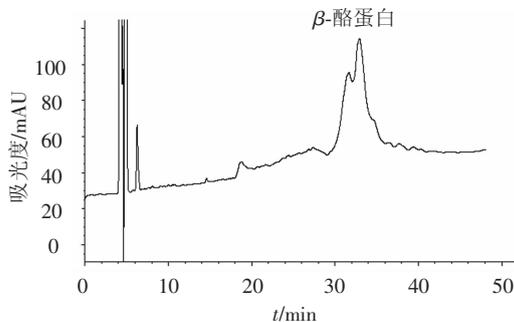


图9 RP-HPLC 分离 β -酪蛋白结果

2.4 FPLC 纯化牦牛乳 β -乳球蛋白

采用FPLC对化学分离方法得到的 β -乳球蛋白进一步纯化. β -乳球蛋白在快速蛋白纯化系统中分出3个峰,其中洗脱峰A为BSA,洗脱峰B和C为 β -乳球蛋白(图10).因为 β -乳球蛋白为二聚体,在FPLC系统中被分成了两个峰.接收 β -乳球蛋白洗脱峰B和C,并用RP-HPLC检测,如

图 11 所示,其纯度为 80.00%。收集 β -乳球蛋白洗脱峰,冻干后备用。

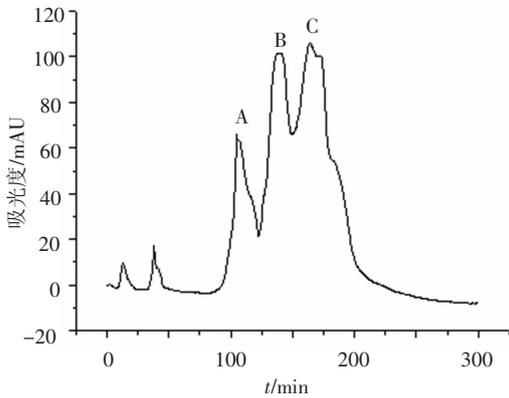


图 10 Cellulose DE-52 阴离子交换色谱快速纯化牦牛乳 β -乳球蛋白结果

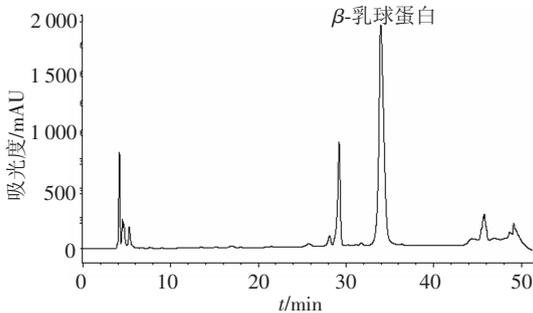


图 11 RP-HPLC 分离 β -乳球蛋白结果

3 结 语

根据酪蛋白对钙的敏感性不同和不同 pH 条件下酪蛋白在不同浓度尿素溶液中的溶解度不同,将酪蛋白粗分级为 α -酪蛋白和 β -酪蛋白。又利用 FPLC 阴离子交换层析技术和 Sephadex G100 凝胶层析技术对粗分级的 α -酪蛋白和 β -酪蛋白进行纯化,得到纯度分别为 87.13% 和 88.58% 的 α -酪蛋白和 β -酪蛋白。以柠檬酸钠为螯合剂,在低 pH3.9 条件下分离出了 β -乳球蛋白,并经 FPLC 纯化后得到纯度为 80.00% 的 β -乳球蛋白。

参考文献:

[1] KAMINOGAVA S, TOSUKA M. Allergenicity of milk proteins[M]. New York: Academic/Plenum, 2003.
 [2] LI Haimei, MA Ying, DONG Aijun, *et al.* Protein composition of yak milk[J]. Dairy Sci Technol, 2010, 90: 111 - 117.
 [3] DIJK van J A P P, SMIT J A M. Size-exclusion chromatography-multiangle laser light scattering analysis of β -lactoglobulin and bovine serum albumin in aqueous solution with added salt[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 867(1/2):105 - 112.

[4] ALOMIRAH H F, ALLI I. Separation and characterization of β -lactoglobulin and α -lactalbumin from whey and whey protein preparations[J]. International Dairy Journal, 2004, 14(5):411 - 419.
 [5] JOSÉ M L, GLORIA I G, CARMEN M R. An improved method for isolation of β -lobulin[J]. International Dairy Journal, 2008, 18(1):55 - 63.
 [6] ANA C A V, NATÉRCIA T, ISABEL M P L V O F. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis: detection of milk adulterations[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 967(2):209 - 218.
 [7] EMILIA B, FABRIZIO F, GIORGIO R, *et al.* New method for separation and determination of denatured caseins by hydrophobic interaction chromatography[J]. Talanta, 2001, 54(2):343 - 349.
 [8] ORTEGA N, ALBILLOS S M, BUSTO M D. Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis[J]. Food Control, 2003, 14(5):307 - 315.
 [9] HAM J S, JEONG S G, LEE S G, *et al.* Irradiation effect on α - and β -caseins of milk and Queso Blanco cheese determined by capillary electrophoresis[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2009, 78(2):158 - 163.
 [10] JOHANN P, PHILIP R A, INGOLF K, *et al.* Gram scale separation of casein proteins from whole casein on a Source 30Q anion-exchange resin column utilizing fast protein liquid chromatography[J]. (FPLC) Protein Expression and Purification, 2008, 60(2):176 - 181.
 [11] HOLLAR C M, LAW A J R, DALGLEISH D G, *et al.* Separation of major casein fractions using cation-exchange fast protein liquid chromatography[J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74(8):2403 - 2409.
 [12] SANOGO T, PAQUET D, AUBERT F, *et al.* Purification of α S1-Casein by fast protein liquid chromatography [J]. Journal of Dairy Science, 1989, 72(9):2242 - 2246.
 [13] DAVID S H. Casein micelle structure: models and muddles [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2006, 11(2/3):148 - 153.
 [14] MORR C V. Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles [J]. Journal of Dairy Science, 1967, 50(11): 1744 - 1751.
 [15] PARRY R M J, CARROLL R J. Location of κ -casein in milk micelles [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1969, 194(1):138 - 150.

- [16] DALGLEISH D G. Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities[J]. *Journal of Dairy Science*, 1998, 81(11):3013-3018.
- [17] BRAMAUD C, AIMAR P, DAUFIN G. Thermal isoelectric precipitation of α -lactalbumin from whey protein concentrate; influence of protein calcium complexation [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 47:121-130.
- [18] EUGENIA L M, SILVIA A, CARLOS M, *et al.* α -Lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates[J]. *Separation and Purification Technology*, 2007, 52(3):446-453.
- [19] JOHAN D, IGNACE H, FRANS V C, *et al.* Comparison of the binding of Na^+ and Ca^{2+} to bovine α -lactalbumin[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1987, 912(2):211-219.
- [20] OWUSU R K. Thermodynamic analysis of the effect of calcium on bovine alpha-lactalbumin conformational stability[J]. *Food Chemistry*, 1992, 44(3):189-194.
- [21] TONYA H, YURI V G, PETER L P. A calorimetric study of the influence of calcium on the stability of bovine α -lactalbumin[J]. *Biophysical Chemistry*, 2000, 84(1):27-34.
- [22] WOJCIECH D, MINORU K, AKIO S, *et al.* Fourier-transform infrared spectroscopy study of the pressure-induced changes in the structure of the bovine α -lactalbumin; the stabilizing role of the calcium ion[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1999, 1433(1/2):45-55.
- [23] CORDESCHI M, PAOLA L D, MARRELLI L, *et al.* Net proton charge of β - and κ -casein in concentrated aqueous electrolyte solutions[J]. *Biophysical Chemistry*, 2003, 103(1):77-88.
- [24] ASIMA C, SOUMEN B. pH-induced structural transitions of caseins[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2007, 87(3):191-199.

(编辑 刘 彤)

(上接第70页)

- [8] ICAGA Y. Fuzzy evaluation of water quality classification [J]. *Ecological Indicators*, 2007(7):710-718.
- [9] 赵剑. 灰色关联分析综合评价法在地表水环境评价中的应用[J]. *水利科技与经济*, 2006, 12(9):607-608.
- [10] WANG Haiyan. Assessment and prediction of overall environmental quality of Zhuzhou City, Hunan Province, China[J]. *Journal of Environmental Management*, 2002(66):329-340.
- [11] SUHEGLA Y, SERMET A A. Assessment of water quality observation stations using cluster analysis and ordinal logistic regression technique [J]. *International Journal of Environment and Pollution*, 2010, 42(4):344-358.
- [12] WANG Jun, ZHAO Baozhong. Water quality analysis and assessment of rivers in Jilin Province of China[J]. *Chinese Geographical Science*, 1994(5):87-96.
- [13] 朱长军, 李文耀, 张普. 人工神经网络在水环境质量评价中的应用[J]. *工业安全与环保*, 2005, 31(2):27-29.
- [14] SCHLEITER I M, BORCHARDT D, DAPPER T, *et al.* Modelling water quality, bioindication and population dynamics in lotic ecosystems using neural networks [J]. *Ecological Modelling*, 1999, 120:271-286.
- [15] 李惠明, 尚广平. 水质现状评价数学模型综合研究 [J]. *中国环境科学*, 1991, 11(5):356-360.
- [16] ARREGHINI S, SERAFINI R. A methodological approach to water quality assessment in an ungauged basin, Buenos Aires, Argentina [J]. *Geo Journal*, 2007, 70:281-288.
- [17] KORFALI S I. Assessment of domestic water quality: case study, Beirut, Lebanon [J]. *Environ Monit Assess*, 2007, 135:241-251.
- [18] HAYNES D, BRODIE J, WATERHOUSE J, *et al.* Assessment of the water quality and ecosystem health of the Great Barrier Reef (Australia): conceptual models [J]. *Environmental Management*, 2007, 40:993-1003.
- [19] JAJI M O, BAMGBOSE O, ODUKOYA O O, *et al.* Water quality assessment of Ogun River, South West Nigeria [J]. *Environ Monit Assess*, 2007, 133:473-482.
- [20] 钟霞, 钟怀军. 多指标综合评价方法及应用 [J]. *内蒙古大学学报*, 2004, 36(4):107-111.

(编辑 刘 彤)