

## DNA 测序技术的进展和挑战 \*

蔡晓静 朱 煌<sup>△</sup> 孔繁琪 冯婕妤 赵立全 牛宗镇

(上海交通大学医学院附属新华医院眼科 上海 200092)

**摘要:** 基因是人类的遗传信息的载体,其遗传和表达影响人类的繁衍及各种生命活动;个体基因组 DNA 序列突变往往会导致疾病的发生,获取个体的基因组 DNA 序列将有助于疾病的诊断。DNA 测序技术潜在的医学应用前景使其近几年有了飞速的发展。本文将介绍各代 DNA 测序技术已经取得的进展,目前尚待克服的挑战及可能的解决办法,并着重分析最新的单分子测序技术的发展潜能及临床应用前景。

**关键词:** 单分子;纳米孔;外切酶;DNA 测序

**中图分类号:** Q-3 Q75 Q78 R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2013)20-3981-04

## The Developments and Challenges of DNA Sequencing Technologies\*

CAI Xiao-jing, ZHU Huang<sup>△</sup>, KONG Fan-qi, FENG Jie-yu, ZHAO Li-quan, NIU Zong-zhen

(Department of Ophthalmology, Xinhua Hospital of Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200092, China)

**ABSTRACT:** Gene is the carrier of genetic information, whose replication and expression influences human's heredity and various life events, while the mutation of individual's genomic DNA is inclined to diseases. Therefore, it is useful to obtain individual's genomic DNA for diagnosis of diseases, and the potential medical applications of DNA sequencing technologies makes them develop more and more quickly. This paper will introduce the achievements and challenges of every generation of DNA sequencing technologies, discuss the possible solutions to the challenges, and stress on analysis of the potentials of the latest single-molecular DNA sequencing technologies and their clinical applications.

**Key words:** Single-molecular; Nanopore; Exonuclease; DNA sequencing

**Chinese Library Classification(CLC):** Q-3, Q75, Q78, R-33 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2013)20-3981-04

## 前言

自 Sanger DNA 测序技术问世以来<sup>[1]</sup>,DNA 测序技术日新月异,成为生命科学领域最基本的技术之一。然而,Sanger DNA 测序技术成本较高,成为限制其推广应用的主要因素之一。伴随二代 DNA 测序技术的出现,人的基因组测序成本已从 30 亿美元(人类基因组计划成本<sup>[2,3]</sup>)降至 1 百万美元<sup>[4-6]</sup>,且在一直降低,使得个体基因组测序成为可能。而个体基因组序列的公布将为个性化医疗提供宝贵的资源<sup>[7-12]</sup>。

尽管如此,二代 DNA 测序技术成本仍然较高,要完成大规模的个人基因组测序,还需要进一步降低成本、提高速度<sup>[13,14]</sup>。为了降低 DNA 测序成本,NHGR 在 2004 年就启动了 \$ 1000 Genome 项目,即在 10 年内把一个人的基因组的测序成本降至个人医疗可承受的范围,即 1 千美元左右。X Prize 基金会年在 2006 也宣布了奖金高达 1 千万美元的 "Archon X Prize",授予第一个在 10 天内测出 100 个人的基因组,准确率大于 99.999%,覆盖率大于 98%的个人或团体(<http://genomics.xprize.org/genomics/archon-x-prize-for-genomics>)。这些举措极大地促进了各种 DNA 测序技术的发展,尤其是具有低成本潜能的单分子 DNA 测序技术。

众所周知,临床上大多数疾病与基因相关,因此基因诊断和基因治疗在临床应用上有广阔前景。比如,近视眼即使一种基因相关疾病,近视眼病因不明,但是已确定的是环境因素和遗传因素共同作用所致,遗传因素在近视病因中占很大的比例,因此个体化基因检查与治疗将是近视治疗的明智之选,而快速低廉的基因检测技术是该愿望成功的关键。因此加快基因测序技术的发展势在必行,\$ 1000 Genome 和 X Prize 的实现将为全人类健康带来光明的前景。

## 1 Sanger DNA 测序技术

Sanger 在 1977 年发明了链终止 DNA 测序技术(以下简称 Sanger 技术),并因此于 1980 年获得了诺贝尔化学奖。Sanger 技术的读长(read length)长、稳定性好、可靠性高,Sanger 技术的精度标准(99.99%)被称为测序技术的 "金标准",其测出的碱基数序列已经超过 1 千亿<sup>[15]</sup>。人类基因组的图谱就是用 Sanger 测序技术测出的,并为后续的 DNA 再测序技术提供了一个参考模板。

1985 年 Sanger 技术的成本约为 10 美元/碱基。后续通过荧光标记 dNTP,使检测过程实现了自动化,凝胶电泳改用毛细管阵列电泳,降低了试剂消耗且提高了化学反应效率,如今的

\* 基金项目:上海市卫生局中医药基金(2009S023)

作者简介:蔡晓静(1986-),女,硕士研究生,主要研究方向:眼视光学与白内障方向

<sup>△</sup>通讯作者:朱煌 E-mail: xlrzhuang@163.com

(收稿日期:2013-03-23 接受日期:2013-04-17)

Sanger 技术的成本已经降至 \$0.01/base pair (bp)。ABI 公司的 Sanger DNA 测序仪能并行检测 384 个样品的序列, 读长为 1000bp, 速度为 24 bp/s<sup>[16]</sup>。著名生物学家 Venter 的基因组序列就是用 Sanger 测序技术测得的, 成本约 7 千万美元<sup>[6]</sup>。然而, Sanger 技术仍存在成本高、速度慢、通量小、操作复杂、克隆偏差等缺点。

## 2 二代 DNA 测序技术

现在主要有三种商业化的二代 DNA 测序(Next-generation Sequencing, NGS)技术, 即 454、Solexa 和 SOLiD。相对于 Sanger 测试技术, NGS 的优势有: ① 成本低, 把成本从 0.01 美元/碱基降低至 \$0.0001/bp; ② 高度并行化, 可同时检测几十万个到几千万个 DNA 分子序列; ③ 通量高且速度快, 机器运行一次产生的数据量达几 Gb (giga base), 运行一次机器只需花 3-6 天时间<sup>[10,17]</sup>。

尽管如此, 各种 NGS 技术原理不尽相同, 在选用时应该注意以下几点:

1) 454: 读长较长(可达 400bp), 但通量较小, 比较适合用来测量较长的 DNA 片段或全新测序 (de novo sequencing), 例如: 可用它测序个人基因组 -- 已经测序出 Watson 的基因组 (7.4 的覆盖率)<sup>[18]</sup>和 Neanderthal 的 DNA 序列<sup>[19]</sup>。

2) Solexa: 读长较短(35-50 bp), 但通量大, 机器运行一次就可产生 1.5 Gb, 用 pair-ended 库测序数据量可达 3Gb。Solexa 多数情况下用于测序小片段的核苷酸序列, 如 ChIP-seq、mRNA-seq 等等, 其深度测序也可用于人的基因组序列, 但其覆盖率一般比较高(>30 倍)<sup>[20,21]</sup>。

3) SOLiD: 性能参数与 Solexa 接近, 但通量略高, 机器运行一次可产生 3~6 Gb 的数据, 但需花 6~10 天 (而 Solexa 运行一次花 3 天)。

NGS 需要消耗昂贵的带荧光标记的试剂, 其测序成本仍然比较高 (\$1000 Genome 要求的 60~1000 倍)。并且, 读长较短是 NGS 一个共有的技术瓶颈, 其主要原因有: ① 测序的合成会有不同步, 造成正或负的碱基错位。② 酶与改造过的核苷酸之间的兼容性不好, 造成酶有时无法加成核苷酸。③ 酶的合成连续性不够好, 酶容易从模板上掉下来。④ 模板链 3' 端的容易变质使得模板链变短<sup>[16,22]</sup>。

## 3 单分子测序技术

第一台商业化单分子 DNA 测序平台是 Helicos 公司的 true single molecular sequencing (SMS) 测序仪 (tSMS)<sup>[23]</sup>。虽然 tSMS 的测序成本并没有明显降低, 但是社会各界仍寄希望于 SMS 能够解决 NGS 中出现的问题, 如合成不同步、读长短、等问题, 能够在微型化、低成本等方面有比较大的作为<sup>[10]</sup>。

SMS 更加侧重于直接检测不加修饰 DNA 分子的物理性质<sup>[24]</sup>, 例如: 通过检测单链 DNA 通过纳米孔引起的电流变化来识别碱基的方法<sup>[16]</sup>。下文将详细介绍各种 SMS 技术的原理、潜力、挑战及其可能的解决方案。

### 3.1 单分子合成测序技术

3.1.1 True single molecule sequencing, tSMS, Helicos tSMS 原理与 NGS 类似, 但前者建库过程简单、模板无需 PCR 扩增。tSMS

最大的优势是: 在单分子水平上检测合成测序过程中所发的荧光, 不存在合成不同步的问题。tSMS 的一条 DNA 测序模板会被测两次, 减小了碱基错配率。它的读长约 25 个碱基, 准确率约 99.9%, 通量 1.1 Gb/天。尽管相对于 NGS 技术, tSMS 有一定的优势, 但优势并不明显, 它仍然存在读长短、成本高等问题<sup>[25]</sup>。

3.1.2 Single-molecule real time sequencing, SMRT, Pacific Biosciences SMRT 最大的特点是测序芯片采用了零模波导 (zero-mode waveguide, ZMW) 结构, 即直径为 10-50 nm、深约 100 nm 的纳米孔。每个 ZMW 是一个单独的测序反应体系 (含引物、带荧光标记 dNTP 等), 底部嵌了一个含 DNA 模板链的 DNA 聚合酶分子。激光在 ZMW 内的呈指数衰减且只有 ZMW 底部一小块区域 (10-21 Liter) 的 dNTP 能被激光激发, 并且发生反应的 dNTP 在该区域内停留时间为毫秒级, 而不发生反应的停留时间是微秒级。检测器只能检测到参与反应 dNTP 的荧光, 从而大大降低了荧光背景噪声。

SMRT 采用了磷酸标记的 dNTP, 当模板链加成一个 dNTP 后, 荧光基团随着磷酸一起扩散到溶液中而不影响下一次反应, 使得反应可以连续进行从而加快测序速度。Pacific 公司已经用人工合成的 DNA 模板做了 SMRT 原理验证实验, 15 倍覆盖率的准确率为 99.3%<sup>[23]</sup>。SMRT 技术具有巨大的潜能, 理论上可达到 10 碱基/秒的速度且具有读长长的潜力 (>1500 碱基)<sup>[26]</sup>。Pacific Biosciences 公司已经推出了基于 SMRT 的商业测序仪器 (PacBio RS)<sup>[10]</sup>。

3.1.3 Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET, VisiGen Biotech VisiGen 公司正在研发基于荧光共振能量转移 (FRET) 的 DNA 测序技术, 其测序过程如下: 将标记了荧光供体基团的 DNA 聚合酶分子固定在载玻片上; 再加含模板、引物、四种 dNTP (其磷酸上标记特异的荧光受体基团) 测序缓冲液, 测序延伸反应开始, 带荧光受体基团的 dNTP 靠近含荧光供体基团的聚合酶, 使后者释放能量激光前者发出特异的荧光 (即 FRET 信号) 从而识别相应的碱基序列。当 dNTP 被加成后, 荧光基团随磷酸离开, 保证下一个 dNTP 能继续被加成。VisiGen 声称测序一旦开始, 检测过程就如同看电影一般 ([http://visigenbio.com/technology\\_movie\\_streaming.html](http://visigenbio.com/technology_movie_streaming.html))。VisiGen 计划它的仪器 2009 上市, 并预计其速度可达 1 百万碱基/秒, 即可在一小时内完成一个人的基因组测序<sup>[10]</sup>。

### 3.2 纳米孔测序技术

与 NGS、tSMS、SMRT、FRET 等技术相比, 纳米孔测序不需修饰 DNA 或 dNTP、不需要酶和荧光基团、不需荧光检测系统等, 具有直接测序和更低成本的潜能, 是单分子测序领域的热点之一。纳米孔测序原理比较简单: 在一块膜内嵌入一个直径约为 1.5 nm 的纳米孔, 在纳米孔两端加上一定的电压, 在电场力的作用下, 单链 DNA 分子会通过这个孔并引起电流变化, 电流的特征用来标识碱基序列。

尽管有实验表明有些纳米孔系统可以检视出单碱基加成引起的特征电流变化<sup>[27,28]</sup>, 目前纳米孔 DNA 测序领域主要有两大障碍。第一, DNA 链通过纳米孔的速度太快 (约 1 个碱基/微秒), 超出了现有检测器的检测范围<sup>[29]</sup>。第二, 纳米孔的厚度

太厚导致单链 DNA 通过纳米孔时各碱基引起的电流差异特征性不明显(纳米孔中所有的核苷酸对纵向电流的变化均有贡献)<sup>[30]</sup>。因此,由单链 DNA 分子引起纳米孔纵向电流变化并不能确定碱基的序列。除此之外,DNA 分子构象变化、DNA 分子的随机运动和 DNA 与孔的非特异性作用亦给纳米孔测序带来了很大的挑战。为克服上述困难,很多团队都在尝试不同的新方法,下面介绍几种纳米孔测序可能的解决方法。

**3.2.1 固体纳米孔测序技术** 纳米孔的检测精度与纳米孔的厚度相关,纳米孔的厚度最好与单碱基的尺寸相当。单层石墨烯(graphene)膜的厚度不到 1 nm (0.6 nm),远比 - 溶血素(-hemolysin)纳米孔(10nm)和氮化硅纳米孔(约 30 nm)的厚度小<sup>[31]</sup>。Golovchenko 小组发现单层石墨烯纳米孔可以检测出双链 DNA 分子,但其过孔速率仍然比较快(10ns/base),无法识别出单个碱基<sup>[32]</sup>。

为了增加 DNA 分子单碱基在纳米孔中停留的时间,LingVital 公司(<http://www.lingvital.com/>)正在研发一种设计聚合物辅助纳米孔测序技术(Design Polymer-assisted nanopore sequencing)。它能把原来的 DNA 模板分子放大,即每个碱基用两种带标记的 12-mer 核苷酸(即设计聚合物)取代(四种组合对应四种 NTP,相当于二进制编码)。当改造过的 DNA 分子通过直径小于 2 纳米的纳米孔时,设计聚合物与模板链分开并发出荧光,用检测器检测所发荧光即可确定 DNA 分子的序列<sup>[33]</sup>。

**3.2.2 蛋白纳米孔测序技术** Akesson 小组发现 phi29 DNA 聚合酶在合成测序时,可以用来减慢单链 DNA 通过 - 溶血素纳米孔的速度(2.4~40bp/s)。尽管如此,单链 DNA 通过 - 溶血素纳米孔引起的电流无法精确地识别出相应的碱基序列,错误率达 10~20%<sup>[34]</sup>。Gundlach 小组在采用 phi29 DNA 聚合酶的同时采用了厚度更小的蛋白纳米孔(MspA)来检测单链 DNA 通过纳米孔的电流变化<sup>[35]</sup>。MspA 的纳米孔厚度与单个碱基的尺寸相当,在合适的速率下四种碱基的过孔电流应该有明显的区别,但实际情况远比预期结果复杂<sup>[36]</sup>。

Bayley 等人在溶血素(hemolysin)纳米孔内嵌入了一个氨基-环糊精,其尺寸与单碱基相当,减少了纳米孔的有效厚度,提高了碱基检测的特异性。再通过修改该蛋白纳米孔内部的带电性,有效降低了 DNA 碱基序列通过纳米孔的速度。用内嵌环糊精的改造过蛋白纳米孔可以检测到单个核苷酸的电流变化,能识别 A、T、C、G 及甲基化的核苷酸,识别四种核苷酸的平均准确度达 99.8%。

Bayley 的蛋白纳米孔测序法不需荧光标记、没有昂贵的荧光检测系统(如共聚焦荧光显微镜),具有成本更低的潜能,甚至比 SMRT 成本更低。该方法的关键是如何保证酶切后的所有碱基都单个依次地通过纳米孔并且通过后不再返回。其次,外切酶的连续性要好,在高盐浓度下要仍能保持活性<sup>[30,37]</sup>。最后,增强膜的稳定性、实现纳米孔并行化也是外切酶纳米孔测序法有待解决的问题。

#### 4 小结与展望

DNA 测序技术日新月异,伴随其成本的降低,DNA 测序技术的应用将更加广泛。临床上大多数疾病最终发现与基因相关,多个致病基因位点已被确定,对人群进行基因筛查将有助

于发现更多致病基因位点,同时也将有助于更多疾病病因的确立,基因治疗是靶向纠正突变基因,从根本上对疾病进行治疗,将是未来疾病治疗的方向,而这些目标的实现都依赖于基因测序技术的改进。近视是眼科发病率最高的疾病,中国是近视发病率第二的国家,近视的防治是困扰眼科界的一大难题。已知近视是环境因素和基因因素共同作用所致疾病,已发现的与近视相关的基因有 20 多个,新的相关基因在不断发现中。无疑,基因诊断将更加有助于提早发现近视患者,从而利用基因治疗手段纠正致病基因,结合有效地改善患者环境因素,将从根本上阻止近视的发生,这对近视的防治将是巨大进展。总之实现 \$ 1000 Genome 和 X Prize 将为临床带来巨大利益。

不论是 NGS 技术还是 SMS 技术,都存在这样或那样的不足,要实现 X Prize 的目标,它们还需要不断地改进、优化整个测序系统,甚变换新的测序思路。但随着化学合成、显微镜、电子计算机等技术的提高,实现 \$ 1000 Genome 和 X Prize 的目标只是时间问题。NHGRI 的启动 \$1000 Genome 最终目标不是发展技术本身,而是通过发展新的 DNA 测序技术来提高人的健康水平<sup>[6]</sup>。因此,如何利用 DNA 测序技术为临床疾病的治疗服务,是一个迫切需要解决的问题。

#### 参考文献(References)

- [1] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(12): 5463-5467
- [2] Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome[J]. *Nature*, 2001, 409(6822): 860-921
- [3] Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome[J]. *Science*, 2001, 291(5507): 1304
- [4] Margulies M, Egholm M, Attiya S, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 376-380
- [5] Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome[J]. *Science*, 2005, 309(5741): 1728-1732
- [6] Chi, KR. The year of sequencing[J]. *Nat Methods*, 2008, 5(1): 11-14
- [7] Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing[J]. *Nature*, 2008, 452(7189): 872-876
- [8] Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry[J]. *Nature*, 2008, 456(7218): 53-59
- [9] Wang J, Wang W, Li R, et al. The diploid genome sequence of an Asian individual[J]. *Nature*, 2008, 456(7218): 60-65
- [10] Gupta PK. Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research[J]. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(11): 602-611
- [11] Kaiser J. DNA sequencing. A plan to capture human diversity in 1000 genomes[J]. *Science*, 2008, 319(5862): 395
- [12] Church GM. The personal genome project [J]. *Mol Syst Biol*, 2005, 1: 2005.0030
- [13] Coombs A. The sequencing shakeup[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(10): 1109-1112
- [14] Kahvejian A, Quackenbush J, Thompson JF. What would you do if you could sequence everything? [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26 (10):



- 1125-1133
- [15] Shendure J, Mitra RD, Varma C, et al. Advanced sequencing technologies: methods and goals[J]. *Nat Rev Genet*,2004,5(5):335-344
- [16] Pettersson E, Lundberg J, Ahmadian A. Generations of sequencing technologies[J]. *Genomics*,2009,93(2):105-111
- [17] Graveley BR. Molecular biology: power sequencing[J]. *Nature*, 2008, 453(7199):1197-1198
- [18] Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing [J]. *Nature*,2008, 452(7189):872-876
- [19] Noonan JP, Coop G, Kudaravalli S, et al. Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA[J]. *Science*,2006,314(5802):1113-1118
- [20] Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry[J]. *Nature*,2008,456(7218):53-59
- [21] Wang J, Wang W, Li R, et al. The diploid genome sequence of an Asian individual[J]. *Nature*,2008,456(7218):60-65
- [22] Harris TD, Buzby PR, Babcock H, et al. Single-molecule DNA sequencing of a viral genome[J]. *Science*,2008,320(5872):106-109
- [23] Eid J, Fehr A, Gray J, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules[J]. *Science*,2009,323(5910):133-138
- [24] Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing[J]. *Nat Biotechnol*, 2008,26(10):1135-1145
- [25] Guo J, Xu N, Li Z, et al. Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2008,105 (27):9145-9150
- [26] Levene MJ, Korlach J, Turner SW, et al. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations [J]. *Science*,2003,299 (5607):682-686
- [27] Ashkenasy N, Sánchez-quesada J, Bayley H, et al. Recognizing a single base in an individual DNA strand: a step toward DNA sequencing in nanopores [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*,2005,44(9): 1401-1404
- [28] Cockroft, SL, Chu J, Amorin M, et al. A single-molecule nanopore device detects DNA polymerase activity with single-nucleotide resolution[J]. *J Am Chem Soc*,2008,130(3):818-820
- [29] Bayley H. Sequencing single molecules of DNA[J]. *Curr Opin Chem Biol*,2006,10(6):628-637
- [30] Branton D, Deamer DW, Marziali A, et al. The potential and challenges of nanopore sequencing[J]. *Nat Biotechnol*,2008,26(10):1146-1153
- [31] Bayley H. Nanotechnology: holes with an edge [J]. *Nature*,2010,467 (7312):164-165
- [32] Garaj S, Hubbard W, Reina A, et al. Graphene as a subnanometre trans-electrode membrane[J]. *Nature*,2010,467(7312):190-193
- [33] Soni GV, Meller M. Progress toward ultrafast DNA sequencing using solid-state nanopores[J]. *Clin Chem*,2007,53(11):1996-2001
- [34] Cherf GM, Lieberman KR, Rashid H, et al. Automated forward and reverse ratcheting of DNA in a nanopore at 5-A precision [J]. *Nat Biotechnol*,2012,30(4):344-348
- [35] Manrao EA, Derrington IM, Laszlo AH, et al. Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase[J]. *Nat Biotechnol*,2012,30(4):349-353
- [36] Schneider GF, Dekker C. DNA sequencing with nanopores [J]. *Nat Biotechnol*,2012,30(4):326-328
- [37] Astier Y, Braha O, Bayley H. Toward single molecule DNA sequencing: direct identification of ribonucleoside and deoxyribonucleoside 5'-monophosphates by using an engineered protein nanopore equipped with a molecular adapter[J]. *J Am Chem Soc*,2006,128(5):1705-1710
- [38] Foquet M, Samiec KT, Kong X, et al. Improved fabrication of zero-mode waveguides for single-molecule detection[J]. *J Appl Phys*, 2008,103(3):034301-034301-9

(上接第 3973 页)

- [17] Spirito P, pelliccia A, Proschan MA. Morphology of the athlete's heart assessed by echocardiography in 947 elite athletes representing 27 sports[J]. *Am J Cardiol*,1994,74:802-806
- [18] Zemva A, Rogel P. Gender differences in athlete's heart: association with 24-h blood pressure. A study of pairs in sport dancing [J]. *International Journal of Cardiology*,2001,77:49-54
- [19] 黄建华,王健. 运动与心率变异研究进展[J]. *浙江体育科学*,2008, (2):118-122
- Huang Jian-hua, Wang Jian. Study on the Sports and HRV [J]. *Zhejiang Sport Science*,2008,(2):118-122
- [20] 田开新,草军,黄岚,等. 有氧、无氧耐力训练对自主神经调节功能的影响及意义[J]. *生物医学工程学杂志*,2006,5:1020-1023
- Tian Kai-xin, Qin Jun, Huang Lan, et al. The Effect of Aerobic and Anaerobic Endurance Training on the Regulating Function of Autonomic Nervous System and Its Significance [J]. *Journal of Biomedical Engineering*,2006,5:1020-1023
- [21] Spirito P, Pelliccia A, Proschan MA. Morphology of the athlete's heart assessed by echocardiography in 947 elite athletes representing 27 sports[J]. *Am J Cardiol*,1994,74:802-806
- [22] Pelliccia A, Maron BJ, Culasso F, et al. Athlete's heart in women [J]. *J Am Med Assoc*,1996,276:211-215
- [23] Renza Perini, Stefania Milesi, Nadine M. Fisher, et al. Heart rate variability during dynamic exercise in elderly males and females[J]. *Eur J Appl Physiol*,2000,82(1-2):8-15
- [24] Tapanainen J M, Thomson PEB. Fractal analysis of heart rate variability and mortality after all acute myocardial infarction[J]. *The American Journal of Cardiology*,2002,15,90(4):347-352