

## 正常成人にみられた $\gamma$ -鎖グロビン遺伝子の配列異常

川崎医療短期大学 臨床検査科

土 井 和 子

川崎医科大学 生化学教室

原 野 昭 雄

(昭和62年2月19日受理)

### Abnormal Arrangement of the $\gamma$ -Globin Gene Found in a Normal Adult

Kazuko Doi

Department of Medical Technology, Kawasaki College  
of Allied Health Professions

Teruo Harano

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

(Accepted on February 19, 1987)

DNA を制限酵素, Xmn I や Bgl II で消化後,  $\gamma$  IVS II probe と hybridization を行ったとき正常人にみられる DNA バンドのほか大きなバンドを伴っている成人に遭遇した。末梢血液の血液学的, また化学的検査では異常は認められず, 全ヘモグロビン中の Hb F (%) や Hb A<sub>2</sub> (%) もまた正常範囲内であった。異常な DNA バンドは酵素分析によって調べられ, G $\gamma$ -A $\gamma$ G $\gamma$ -A $\gamma$  または G $\gamma$ -G $\gamma$ -A $\gamma$  型の三連鎖構造の存在によるものであった。この三連鎖構造を含む  $\beta$ -鎖様遺伝子群のハプロタイプ,  $\epsilon$ -遺伝子の 5' Hinc II 部位, G $\gamma$ -遺伝子の 5' Xmn I 部位, G $\gamma$  と A $\gamma$ -遺伝子内の Hind III 部位,  $\psi\beta_{1-}$  遺伝子内と 3' Hinc II 部位,  $\beta$ -遺伝子内の Ava II 部位と  $\beta$ -遺伝子の 3' Bam HI 部位が調べられ, +---(-)-----+ と決定した (カッコ内の-の記号は三連鎖構造遺伝子の第二遺伝子の Hind III ポリモフィズムの不在を示す)。このハプロタイプから日本人によくみられる同種のハプロタイプ, +-----+ をもった染色体間の不均等交差によって  $\gamma$ -鎖異常配列をもった染色体が生成したものと考えられた。

A woman possessing an abnormally large size fragment together with a normal size fragment when her DNA was digested with the restriction endonucleases Xmn I and Bgl II and was hybridized with a  $\gamma$ IVS II probe was discovered. Hematological and chemical laboratory examinations of the peripheral blood showed no abnormalities. The contents of Hb F and Hb A<sub>2</sub> in the total hemoglobin were within the normal range. This abnormally large size fragment was considered to be associated with the triplicated  $\gamma$ -globin gene arrangement, G $\gamma$ -A $\gamma$ G $\gamma$ -A $\gamma$  or G $\gamma$ -G $\gamma$ -A $\gamma$  by the enzymatic analysis. A family study showed that

her mother had the same abnormal gene arrangement. The haplotype of the  $\beta$ -like gene cluster including  $\gamma$ -globin gene triplication, Hinc II 5' to the  $\epsilon$ -gene, Xmn I 5' to the  $G\gamma$ -gene, Hind III within the  $G\gamma$ - and  $A\gamma$ -genes, Hinc II within and 3' to the  $\psi\beta_1$ -genes, Ava II within the  $\beta$ -gene and Bam HI 3' to the  $\beta$ -gene, was decided as +--(-)-----+ (the minus sign in the parentheses means the absence of Hind III polymorphism within the second  $\gamma$ -globin gene in the triplicated  $\gamma$ -globin gene arrangement). This newly produced  $\beta$ -like globin gene cluster might be derived by crossing over between two chromosomes having the same haplotype, +-----+, which is more common in Japanese.

Key Words ① Human  $\gamma$ -globin gene ②  $\gamma$ -Globin gene triplication  
③ Unequal crossover ④  $\beta$ -Like gene haplotype

## はじめに

ヘモグロビン(Hb)は $\alpha$ -鎖様グロビンと $\beta$ -鎖様グロビンの四量体である。このうち $\beta$ -鎖様グロビン遺伝子は第11番染色体短腕上に5'- $\epsilon$ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\psi\beta_1$ - $\delta$ - $\beta$ -3'のように配列している。 $G\gamma$ -と $A\gamma$ -鎖グロビンは $\gamma$ 136番アミノ酸の種類(GlyかAla)によって区別され、それらを産生する遺伝子の塩基配列は非常に類似している。<sup>1)</sup>通常、これら遺伝子は $-G\gamma$ - $A\gamma$ -型の配列として存在しているが、 $-G\gamma$ - $G\gamma$ -や $-A\gamma$ - $A\gamma$ -型の配列となっている場合がある。<sup>2),3)</sup>また、 $G\gamma$ -と $A\gamma$ -遺伝子間でのcross-overの結果、1個の $\gamma$ -鎖遺伝子を脱離し単鎖構造( $-G\gamma$ - $A\gamma$ -hybrid geneの形成)をもつものや、<sup>4)~6)</sup>cross-overを起こす位置の違いにより $-G\gamma$ - $A\gamma$ - $G\gamma$ - $A\gamma$ -型や $-G\gamma$ - $G\gamma$ - $A\gamma$ -型の三連鎖構造を形成したものの、<sup>7)~10)</sup>さらに $-G\gamma$ - $A\gamma$ - $G\gamma$ - $A\gamma$ -型で示される四連鎖構造<sup>11)~14)</sup>が発見されている。このような $\gamma$ -鎖遺伝子配列異常は新生児のHb組成(Hb A:Hb F比)やHb Fを構成する $\gamma$ -鎖グロビン組成( $G\gamma$ : $A\gamma$ 比)に影響を与えるものである。<sup>4),15)</sup>日本人新生児の中に $\gamma$ -鎖遺伝子配列異常のあるものは約7%にのぼり、<sup>15)</sup>成人の中にも多くみられると予想される。DNAの解析中、 $\gamma$ -鎖遺伝子配列異常をもつ成人に遭遇し、DNAの酵素的解析のほか、Hb分析、Hb合成、家族調査等を行ったので、その結果について報告する。

## 材料と方法

- 1) 末梢血液：ヘパリンまたはEDTA-2Kを抗凝固剤に用いて採血した。
- 2) 血球計数測定および化学検査：通常用いられている自動分析計により行った。
- 3) 溶血液の調製：末梢血を0.9%食塩水で洗浄後、水- $CCl_4$ を加え攪拌、遠心し調製した。
- 4) 微量Hb成分の測定：Hb A<sub>2</sub>含量はセルロースアセテート膜電気泳動法を応用し、<sup>16)</sup>Hb F含量はアルカリ変性法を適用し行った。<sup>17)</sup>
- 5) Hb不安定性テスト：Carrellらのイソプロパノール沈殿法で行った。<sup>18)</sup>
- 6) Hbの等電点分画：carrier ampholyteとしてAmpholine(LKB Produkt AB)およびPharmalyte(Pharmacia Chemicals Co.)を用い、polyacrylamide gel板(架橋比2.7%、重合度5%)(pH範囲：6~9および6.5~7.5)を調製した。20%エチレンジアミンと0.02Mリン酸溶液を陰極と陽極の電極液とし、溶血液を陰極側に塗布し、300V(一定)、16時間通電を行った。
- 7) Hb合成・分析：洗浄赤血球を超遠心し、上層部(reticulocyte-rich, ~0.2 ml)を<sup>3</sup>H-Leu(100  $\mu$ Ci)を含むアミノ酸培地に移し、37°C、2時間インクベートした。生理食塩水で十分洗浄後、溶血液を調製した。<sup>19)</sup>溶血液を塩酸-アセトン処理しグロビンを得、CM-52

セルロースカラムクロマトグラフィー〔カラム：10×150 mm，溶出液：8 M尿素-Na<sup>+</sup>リン酸緩衝液 (pH 6.8, Na<sup>+</sup> 勾配 5 mM→35 mM)〕にかけ分画した。各分画の OD<sub>280</sub> を測定したのち、液体シンチレーションカウンターで <sup>3</sup>H-Leu の取り込み量を求めた。

8) DNA の調製：末梢血を生理食塩水で洗浄し、血球上層部 (buffy coat) を集め、Poncz ら<sup>20)</sup> の方法により DNA を調製した。少量の TE 溶液 (10 mM-Tris-1 mM EDTA, pH 7.4) に溶かし DNA 溶液とした。

9) DNA の制限酵素による消化：約 5 μg DNA に約 15 単位の制限酵素を加え至適条件下で反応させた後、0.8% アガロース/TEA 緩衝液 (pH 8.3) 上で電気泳動し、DNA 断片を分離、ニトロセルロースに Southern blot した。<sup>21)</sup> ここで用いた制限酵素は Hinc II, Hind III, Xmn I, Pst I, Bgl II, Bcl I, Sph I, Eco RI, Ava II, Bam HI および Xba I であり、Toyobo Ltd. Co., Nippon Gene Ltd. Co. お

よび New England Biolabs Inc. から購入したものである。

10) Hybridization: 適当な probe DNA を Nick translation 法により α-<sup>32</sup>P-dCTP (Amersham Co.) でラベルしたのち、先に得たニトロセルロース膜と 42°C, 約 20 時間 hybridization 反応を行わせ、<sup>21)</sup> 十分洗浄したのち、X線フィルムを用いて 1 夜オートラジオグラフィを行った。ここで用いた probe は、ε-probe, γ IVS II probe, ψβ<sub>1</sub>-probe, β IVS II probe および α-probe である。

### 結果と考察

発端者および両親の健康状態は良好であり、彼らの血液検査および血清の化学的検査で異常は認められなかった。Hb 中の微量成分である Hb A<sub>2</sub> (3.2~3.4%) や Hb F (0.8~1.3%) は正常範囲内にあり、溶血液の等電点分画では異常バンドは観察されず、また不安定性試験も陰性を示した。

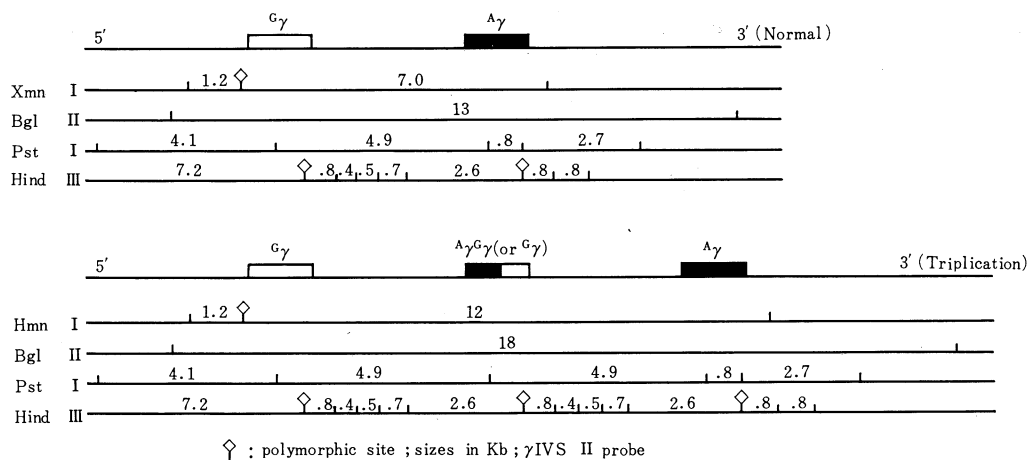


Fig. 1. The expected sizes of fragments in the two cases (normal and triplicated γ-globin gene arrangements) with different restriction endonucleases.

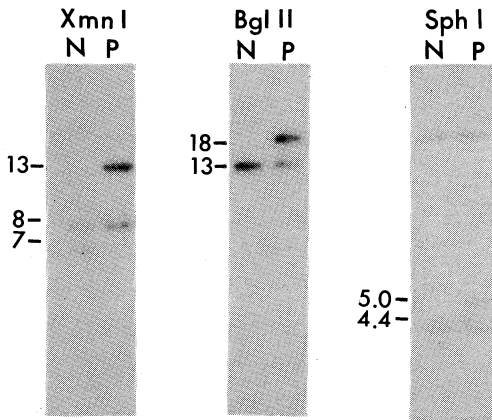
Table 1. Sizes (in Kb) of fragments in enzymatic digests.

	γ IVS II						
	Eco RI	Xba I	Pst I	Bgl II	Bcl I	Sph I	Xmn I / Pst I
Control	7.2; 2.7	5.0 ; 3.7	5.0 ; 4.0; 0.8	13	18	4.4	5.0 ; 2.0; 0.8
Prop.	7.2; 2.7*	5.0*; 3.7	5.0*; 4.0; 0.8	18; 13	23; 18	5.0; 4.4	5.0*; 2.0; 0.8

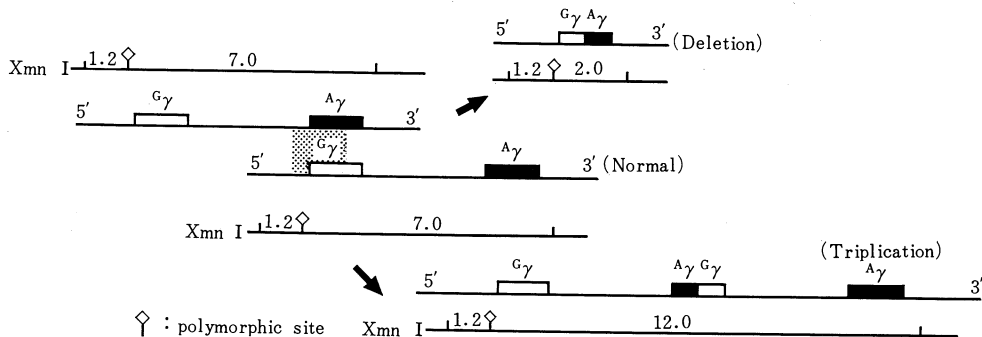
Fragments marked with an asterisk have increased intensity.

$\gamma$ -鎖遺伝子配列異常は **Figure 1** や **Table 1** に示すような制限酵素で消化後、 $\gamma$  IVS II probe との hybridization によって観察することができる。すなわち、制限酵素 Xmn I, Bgl II や Bcl I の消化物では正常人に見られるバンド以外に新しいバンドが出現する。発端者の場合では Xmn I- $\gamma$  IVS II で正常コントロールにはみられない 13 Kb のバンドが現れた。また、Bgl II- $\gamma$  IVS II で通常 13Kb にバンドが観察されるのに対し 18Kb のバンドが現れた (**Fig. 2**)。Bcl I- $\gamma$  IVS II では 23 Kb に

異常バンドが現れ、いずれの場合も約 5Kb の増大が観察された。しかしながら、Pst I, Hind III, Eco RI や Xba I では異常バンドは観察されなかった。同一染色体上に存在する  $G\gamma$  と  $A\gamma$ -鎖遺伝子は高い相同性を有しており、<sup>1)</sup> 細胞分裂の際、両遺伝子間で不均等交差を起しやすいと考えられ、この結果、1個の遺伝子が脱落した単鎖構造 (- $G\gamma A\gamma$ -または- $A\gamma$ -) や1個余分に遺伝子の入り込んだ三連鎖構造 (- $G\gamma-A\gamma G\gamma-A\gamma$ -または- $G\gamma-G\gamma-A\gamma$ -) が生ずると考えられる (**Fig. 3**)。これら異常配列の検出には Xmn I, Bgl II や Bcl I 酵素による消化後、 $\gamma$ -probe との hybridization によって行われ、単鎖構造の場合は正常の場合より約 5Kb 短いバンドが観察され、一方、三連鎖構造の場合は約 5Kb 大きいバンドが観察される。さらに、この発端者の DNA は Sph I で消化し、 $\gamma$  IVS II probe での hybridization の結果、正常コントロールでは 4.4Kb バンドのみが観察されたのに対し、新しく 5.0 Kb にバンドが現れ  $G\gamma-G\gamma$  配列の存在が考えられた。この三連鎖構造の第2の遺伝子は  $G\gamma$ -鎖遺伝子に相当するものである。<sup>7)</sup> また、Xmn I-Pst I 二重消化と  $\gamma$  IVS II probe との hybridization では正常コントロールと同様の結果が得られた。これらの結果は母親からの DNA でも同様に得られた。このことから、 $G\gamma$  と  $A\gamma$ -鎖遺伝



**Fig. 2.** DNA fragment (size in Kb) obtained after digestion with restriction endonucleases and hybridization with the  $\gamma$  IVS II probe.  
N: normal control. P: proband.



**Fig. 3.** Schematic presentation of crossing over events leading to the deletion and triplication of the  $\gamma$ -globin gene, and DNA fragment (in Kb) in the digestion with Xmn I and hybridization with the  $\gamma$  IVS II probe.  $G\gamma A\gamma$  and  $A\gamma G\gamma$  mean the newly produced  $\gamma$ -globin genes. The region marked with screen tone shows to be high homology between the  $A\gamma$ - and  $G\gamma$ -globin gene regions.

人間の不均等交差は  $G\gamma$ -鎖遺伝子の 5' 端にある Xmn I 切断部位またはそのポリモフィズム部位と  $\gamma$ IVS II 部間で起こり三連鎖構造中の第 2 の遺伝子が導入され  $G\gamma$ -鎖グロビンを産生する遺伝子となっていることを示唆する<sup>9)</sup> (Fig. 3). このような異常配列の保因者の産生する Hb F を構成する  $\gamma$ -グロビンの  $G\gamma:A\gamma$  比は変動することが予想されるが、本保因者の Hb 中の Hb F 含量は低く、Hb F 中の  $\gamma$ -鎖組成を調べることはできなかった。

$\gamma$ -鎖遺伝子の三連鎖構造をもつ  $\beta$ -鎖様グロビン遺伝子群のハプロタイプを知ることは大変

興味あるところである。今回、家族 (3 名) の  $\beta$ -鎖様遺伝子群の 8 か所のポリモフィック部位のハプロタイプを決定することができた (Table 2). この中で父親はホモ接合体でありそのハプロタイプは +-----+ であった。このタイプは +-----+ と同様日本人には最もよく出現するものである。<sup>9)</sup> また、母親にみられる ----- のタイプは非常に珍しいものである。発端者の保有する 1 つのハプロタイプは父親から由来し、他方は母親に由来する三連鎖構造を含む +--(-)-----+ タイプを保持していた。このハプロタイプ

は日本人の中で最もよく見られる型によく類似しており、同一のハプロタイプ +-----+ 間の不均等交差の結果生成したものと予想される。

その他、 $\beta$ -鎖様遺伝子群内における特別な異常は発見されず、この家族内には  $\gamma$ -鎖遺伝子の三連鎖構造が存在するのみのものであった (特にデータは示さない)。

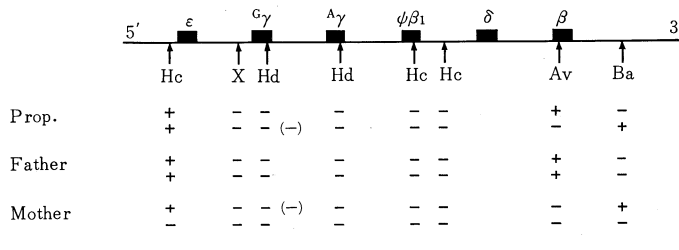
さらに、 $\alpha$ -鎖グロビン遺伝子の配列についても調べた。

Table 3 に示すように、発端者の場合正常コントロールと全く同一のオートラジオグラムが得られ、 $\alpha$ -鎖遺伝子には配列異常は観察されなかった。また、両親についても全く同様の結果が得られている。

Hb F に関連した  $\gamma$ -鎖遺伝子の配列異常は Hb F の産生には大いに関連があるものと考え

**Table 2.** Sizes (in Kb) of fragments in enzymatic digests of DNA from the members of the family, and the haplotypes of eight (or nine) polymorphic sites of each chromosome.

Enzymes/Probe	Prop.	Father	Mother
Hinc II/ $\epsilon$ -Probe	3.7	3.7	3.7; 8.0
Xmn I/ $\gamma$ IVS II	8.0; 13	8.0	8.0; 13
Hind III/ $\gamma$ IVS II	3.5; 8.0	3.5; 8.0	3.5; 8.0
Hinc II/ $\beta_1$ -Probe	7.6	7.6	7.6
Ava II/ $\beta$ IVS II	2.0; 2.2	2.0	2.2
Bam HI/ $\beta$ IVS II	9.0; 22	22	9.0; 22



Hc=Hinc II; X=Xmn I; Hd=Hind III; Av=Ava II; Ba=Bam HI

(-): indicates the absence of the Hind III polymorphism of the second  $\gamma$ -globin gene in the  $\gamma$ -globin gene triplication.

**Table 3.** Sizes (in Kb) of fragments in enzymatic digests.

	$\alpha$ -Probe				
	Eco RI	Hind III	Xba I	Pst I	Bgl II
Control	23	16; 4.5; 3.7	16	1.5	12.5; 7.5
Prop.	23	16; 4.5; 3.7	16	1.5	12.5; 7.5

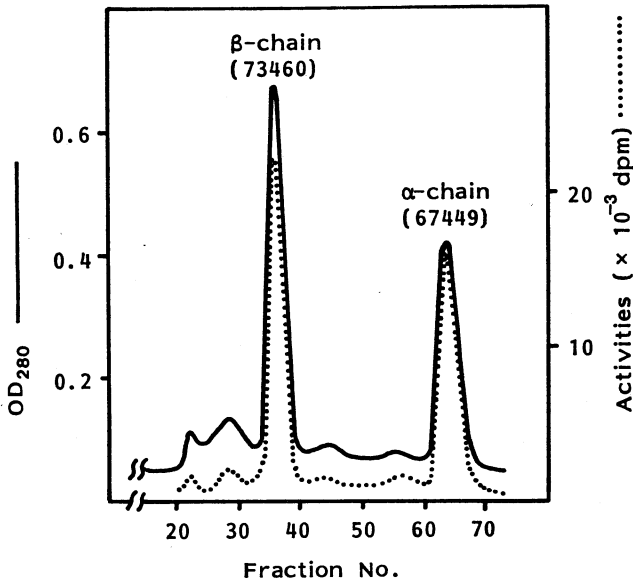


Fig. 4. Separation of globin chains obtained from the biosynthesized hemoglobin on CM-52 column chromatography and the radioactivities incorporated into each chain. The number in the parentheses indicate the total radioactivities (dpm) incorporated into the relevant chains.

られ、単鎖構造を保有する新生児においては  $\gamma$ -サラセミア様の症状を呈することが報告されている。<sup>4)</sup> しかし、三連鎖構造を有する場合には逆に過生産を呈するかもしれないが、このような構造内での第2、第3遺伝子の発現能はやや低下する傾向にあるようである。<sup>10), 22)</sup> このため、このような遺伝子構造は病態との関連も少なく、三連鎖：単鎖 = 4 : 1 の出現頻度で観測される。<sup>9)</sup> 成人では  $\gamma$ -鎖グロビンの産生は低下（成人では Hb F の含量は 1% 以下）し、その代わりに  $\beta$ -鎖や  $\delta$ -鎖グロビンが産生され、 $\beta$ -鎖が Hb の主流となり Hb 中の 95% 以上が Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ) で占められる。これら  $\gamma$ -鎖遺伝

子配列異常が  $\beta$ （あるいは  $\delta$ ）鎖の合成に影響を及ぼすならば、成人中の Hb A を構成する  $\beta$  :  $\alpha$  合成比に不均衡が生ずるはずである。しかしながら、発端者の末梢血液中網状赤血球による Hb 合成では  $\beta/\alpha = 1.09$ （正常範囲：0.9~1.2）と均衡していた（Fig. 4）。 $G\gamma$ -と  $A\gamma$ -鎖遺伝子の活性も胎児期においては通常 7 : 3 であり、成人期ではその比は 4 : 6 に変動するとともにその活性は低下し、 $\delta$ -や  $\beta$ -鎖遺伝子が活性となることから、 $\beta$ -鎖様遺伝子群の各遺伝子はそれぞれ個別に活性が制御されているのかもしれない。

ここにみられたような相同性の高い遺伝子間では高い頻度で不均等交差を起しやすいたることを示しているようである。このためさらに三連鎖構造をもった遺伝子と正常配列をもった遺伝子との間で不均等交差が

起これば四連鎖構造の形成となる。この遺伝子構造も各地で発見されており、<sup>11)~14)</sup> 最近では  $\beta$ -サラセミア因子と関連している大変興味ある例も報告されている。<sup>23)</sup>

## 謝 辞

本研究を行う機会を与えて下さった川崎医療短期大学臨床検査科主任、上田 智教授に深謝致します。DNA の解析と有益な討論をして下さいました原野恵子博士（川崎医科大学学生化学教室）および Hb 分析、Hb 合成・分析をして下さいました今井直美研究補助員（川崎医科大学検査診断学）に感謝致します。

なお、本研究は昭和61年度川崎医科大学プロジェクト研究費（61-103）の一部を使用して行われた。

## 文 献

- 1) Shen, S.-H., Slightom, J. L. and Smithies, O.: A history of the human fetal globin gene duplication. *Cell* 26 : 191-203, 1981
- 2) Huisman, T. H. J. and Altay, C.: The chemical heterogeneity of the fetal hemoglobin of black newborn babies and adults; a reevaluation. *Blood* 58 : 491-500, 1981
- 3) Powers, P. A., Altay, C., Huisman, T. H. J. and Smithies, O.: Two novel arrangements of the human fetal globin genes:  $G\gamma$ - $G\gamma$  and  $A\gamma$ - $A\gamma$ . *Nucleic Acids Res.* 12 : 7023-7034, 1984

- 4) Sukumaran, P. K., Nakatsuji, T., Gardiner, M. B., Reese, A. L., Gilman, J. G. and Huisman, T. H. J.: Gamma thalassemia resulting from the deletion of a  $\gamma$ -globin gene. *Nucleic Acids Res.* 11 : 4635—4643, 1983
- 5) Zeng, Y.-T., Huang, S.-Z., Nakatsuji, T. and Huisman, T. H. J.:  $-\alpha\gamma-\Delta\gamma$ -Thalassemia and  $\gamma$ -chain variants in Chinese newborn babies. *Am. J. Hematol.* 18 : 235—242, 1985
- 6) Nakatsuji, T., Ohba, Y. and Huisman, T. H. J.: Hb F-Yamaguchi ( $\gamma$ 75Thr,  $\gamma$ 80Asn,  $\gamma$ 136Ala) is associated with  $\alpha\gamma$  thalassemia. *Am. J. Hematol.* 16 : 189—192, 1984
- 7) Harano, T., Huisman, T. H. J., Zeng, Y.-T., and Huang, S.-Z.: Two arrangements of the human fetal globin genes may be responsible for high  $\alpha\gamma$  values in Chinese newborns:  $-\alpha\gamma-\alpha\gamma-\delta-\beta$  and  $-\alpha\gamma-\Delta\gamma\alpha\gamma-\Delta\gamma-\delta-\beta$ . *Am. J. Hematol.* 19 : 349—353, 1985
- 8) Trent, R. J., Bowden, D. K., Old, J. M., Wainscoat, J. S., Clegg, J. B. and Weatherall, D. J.: A novel rearrangement of the human  $\beta$ -like globin gene cluster. *Nucleic Acids Res.* 9 : 6723—6733, 1981
- 9) Shimizu, K., Harano, T., Harano, K., Miwa, S., Amenomori, Y., Ohba, Y., Kutlar, F. and Huisman, T. H. J.: Abnormal arrangements in the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -globin gene clusters in a relatively large group of Japanese newborns. *Am. J. hum. Genet.* 38 : 45—58, 1986
- 10) Efremov, G. D., Filipce, V., Gjorfovski, I., Juricic, D., Stojanovski, N., Harano, T., Nakatsuji, T., Kutlar, A., Kutlar, F., Bakioglu, I. and Huisman, T. H. J.:  $\alpha\gamma\Delta\gamma$  ( $\delta\beta$ )<sup>o</sup>-Thalassaemia and a new form of  $\gamma$  globin gene triplication identified in the Yugoslavian population. *Brit. J. Haematol.* 63 : 17—28, 1986
- 11) Harano, K., Harano, T., Kutlar, F. and Huisman, T. H. J.:  $\gamma$ -Globin gene triplication and quadruplication in Japanese newborns. *FEBS Lett.* 190 : 45—49, 1985
- 12) Hill, A. V. S., Bowden, D. K., Weatherall, D. J. and Clegg, J. B.: Chromosomes with one, two, three, and four fetal globin genes: Molecular and hematologic analysis. *Blood* 67 : 1611—1618, 1986
- 13) Trent, R. J., Mickleston, K. N. P., Wilkinson, T., Yakas, J., Dixon, M. W., Hill, P. J. and Kronenberg, H.: Globin genes in Polynesians have rearrangements including a recently described  $\gamma\gamma\gamma\gamma$ /. *Am. J. hum. Genet.* 39 : 350—360, 1986
- 14) Shimasaki, S. and Iuchi, I.: Diversity of human  $\gamma$ -globin gene loci including a quadruplicated arrangement. *Blood* 67 : 784—788, 1986
- 15) 原野昭雄, 原野恵子, 上田 智, 浮田昌彦, 和田芳直, 林 昭, 大庭雄三, 宮地隆興, Huisman, T. H. J.: ヒト  $\gamma$  鎖グロビン遺伝子の配列異常の出現頻度と遺伝子発現. 第31回日本人類遺伝学会抄録集, 東京, 1986, p. 121
- 16) Ueda, S., Shibata, S., Ohba, Y. and Miyaji, T.: Routine Hb A<sub>2</sub> estimation by cellulose acetate membrane electrophoresis of hemolysate. *Kawasaki med. J.* 1 : 113—120, 1975
- 17) Betke, K., Marti, H. R. and Schlicht, I.: Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. *Nature* 184 : 1877—1878, 1959
- 18) Carrell, R. W. and Kay, R.: A simple method for detection of unstable haemoglobins. *Brit. J. Haematol.* 23 : 615—619, 1972
- 19) Harano, T., Ueda, S., Harano, K. and Shibata, S.: Improved method for quantitation of biosynthesized human globin chains in reticulocytes by use of urea cellulose acetate membrane electrophoresis. *Proc. Jap. Acad.* 56B : 230—234, 1980
- 20) Poncz, M., Solowiejczyk, D., Harpel, B., Mory, Y., Schwartz, E. and Surrey, S.: Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood: Analysis of  $\beta$ -like globin genes. *Hemoglobin* 6 : 27—36, 1982

- 21) Maniatis, T., Fritsch E. F. and Sambrook, J.: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982
- 22) Thein, S. L., Hill, F. G. H. and Weatherall, D. J.: Haematological phenotype of the triplicated  $\gamma$ -globin gene arrangement. Brit. J. Haematol. 57: 349—351, 1984
- 23) Yang, K. G., Liu, J. Z., Kutlar, F., Kutlar, A., Gurgey, A. and Huisman, T. H. J.:  $\beta^0$ -Thalassemia in association with a  $\gamma$ -globin gene quadruplication. Blood 68: 1394—1397, 1986