

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-125376

(P2008-125376A)

(43) 公開日 平成20年6月5日(2008.6.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
	C 1 2 Q 1/04	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2006-311193 (P2006-311193)	(71) 出願人	591190955
(22) 出願日	平成18年11月17日 (2006.11.17)		北海道
			北海道札幌市中央区北3条西6丁目1番地
		(74) 代理人	100096699
			弁理士 鹿嶋 英實
		(72) 発明者	甲田 洋子
			北海道上川郡新得町字新得西5線39番地
			北海道立畜産試験場内
		(72) 発明者	澤井 健
			北海道上川郡新得町字新得西5線39番地
			北海道立畜産試験場内
		最終頁に続く	

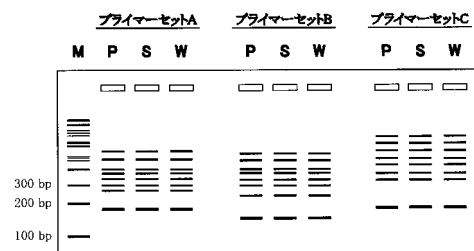
(54) 【発明の名称】 黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA検出のためのLAMP用プライマーおよびこれを用いたエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌の遺伝子検出法

(57) 【要約】

【課題】生産現場での検査および食品検査において、LAMP法を用いて、エンテロトキシンAを産生するエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌を迅速かつ高感度に検出する。

【解決手段】黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA配列SEAに特異的な遺伝子と選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドからなるLAMP用プライマー、該プライマーを用いた増幅法、SEA遺伝子の増幅を検出することによるエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌の検出法を提供する。

【選択図】図4



M : サイズスタンダード
P : SEA プラスミド
S : S.aureus ATCC13565
W : 野外株

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌検出のためのLAMP法に用いるエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌検出用プライマーであって、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンAの特異的な塩基配列から選ばれた以下の塩基配列（配列番号 2 ～ 21）あるいはそれと相補的な塩基配列の中、

- （1）配列番号 2 の塩基配列に相補的な配列、塩基数 0 から 50 の任意の塩基配列及び配列番号 3 の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、
- （2）配列番号 5 の塩基配列、塩基数 0 から 50 の任意の塩基配列及び配列番号 6 の塩基配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチド、
- （3）配列番号 10 の塩基配列に相補的な配列、塩基数 0 から 50 の任意の塩基配列及び配列番号 11 の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、
- （4）配列番号 13 の塩基配列、塩基数 0 から 50 の任意の塩基配列及び配列番号 14 の塩基配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチド、
- （5）配列番号 16 の塩基配列に相補的な配列、塩基数 0 から 50 の任意の塩基配列及び配列番号 17 の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、
- （6）配列番号 19 の塩基配列、塩基数 0 から 50 の任意の塩基配列及び配列番号 20 の塩基配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドからなるプライマーセット。

TTCAAGCAAGACGTTATTTACAGGA	配列番号 2
CAGTACCTTTGGAAACGG	配列番号 3
GCCGATCAATTTATGGCTAG	配列番号 4
CTGATGTTTTTGATGGGAAGGTT	配列番号 5
AGAACCTTCGGTTAATTACG	配列番号 6
GCTCAAGGACAGTATTCAA	配列番号 7
ACGAATAAGAAAAATGTAAGTGT	配列番号 8
CAGAGGGGATTAATCGTGT	配列番号 9
ATTTGCGAAAAAGTCTGAATTGC	配列番号 10
CCACTTGTAATGGTAGCG	配列番号 11
TTGCCCTAACGTTGACAA	配列番号 12
GGAACAGCTTTAGGCAATCTTAAA	配列番号 13
ACTGAAAATAAGAGAGTCACG	配列番号 14
GCATACTATATTGTTTAAAGGCT	配列番号 15
AAAATACAGTACCTTTGGAAACGG	配列番号 16
AAGAGAAAAAAGTGCCGAT	配列番号 17
CATGATAATAATCGATTGACCG	配列番号 18
CTTCAAGCAAGACGTTATTTACAGG	配列番号 19
TGATGGGAAGGTTTCAGAG	配列番号 20
ATCGTGTTTCATACTTCTACAG	配列番号 21

【請求項 2】

請求項 1 のプライマーセットを用いることを特徴とする、LAMP法による黄色ブドウ球菌エンテロトキシンAに特異的なエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌検出塩基配列の核酸の増幅法。

【請求項 3】

請求項 2 の黄色ブドウ球菌エンテロトキシンAに特異的なエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌検出塩基配列の核酸の増幅を検出することを特徴とする、エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA配列SEA上の特異的塩基配列に基づいて設計された新規プライマーと該プライマーを用いたLAMP法によるエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌の遺伝子検出法に関する。

【背景技術】

【0002】

黄色ブドウ球菌による食中毒は、代表的な毒素型食中毒で、黄色ブドウ球菌が食品中で増殖するときに産生するエンテロトキシン（腸管毒）を食品とともに摂取することによって起こる。ブドウ球菌エンテロトキシンは熱に強く100 30分間の加熱でも失活しない。

また、胃酸やトリプシンなどの消化酵素によっても分解されない。したがって、食品中で菌が増殖しエンテロトキシンが産生されると、調理で菌が死滅しても毒素の分解は困難であり、嘔吐、腹痛、下痢等の中毒を発症させる。

エンテロトキシンには抗原性の異なる型があり、抗原型が確認された順にSEA（エンテロトキシンA）、SEB（エンテロトキシンB）、SEC（エンテロトキシンC）、～とアルファベット順に命名されている。

食中毒の事例には、SEA単独あるいはSEAを含むいくつかのエンテロトキシンの複合型によるものが多いことが明らかにされている（以下の文献参照）。

【0003】

【非特許文献1】食品衛生研究 31巻、第3号、37-45、1981年発行

【0004】

また、黄色ブドウ球菌は、人を取りまく環境や各種動物に広く分布しており、健康人の鼻腔、咽頭（のど）、腸管、皮膚（手指）、毛髪などに常在している。黄色ブドウ球菌による食中毒は、この菌が常在菌であり、手指を介して食品を汚染することから、気温の低い冬季でも発生するのが特徴である。

黄色ブドウ球菌は、腸炎ビブリオ菌、サルモネラ属菌とともに、三大食中毒菌とよばれており、2000年夏に発生した低脂肪乳などによる大規模な食中毒事件のように、衛生管理を怠ると思わぬ被害を招くことになり、黄色ブドウ球菌は依然として食品衛生上重要な原因菌と考えられている。

【0005】

従来、食品は、培養法による微生物検査が行われている。黄色ブドウ球菌についても、培養によって検査されているが、検出までに24時間～2日間の時間を要することや種々の培地を使用する。また、黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンの検出は、酵素免疫法のELISA法が行われている。これらの検査法は時間と多くの労力を必要とすることから、簡易で迅速な微生物検査法が開発されてきている。特に、迅速性、検出感度に優れている遺伝子増幅法による検査法が注目されてきている。

【0006】

現在、報告されている遺伝子増幅法にPCR法がある。PCR法は、相補的な2本鎖の核酸を1本鎖の核酸に変性し、次に、1本鎖核酸にプライマーを相補的に結合させ、耐熱性DNAポリメラーゼ（合成酵素）により結合したプライマーからDNAを伸長させて、増幅したい遺伝子配列の特定領域を2倍に増幅する。この一連の工程を繰り返し行うことにより遺伝子配列の特定領域を指数関数的に増幅することができる。

しかし、PCR法は各段階で反応温度が異なるため、反応の段階に応じて温度を制御する必要があり、また、増幅産物（PCR産物）をアガロース電気泳動にかけて、細菌を検出しなければならない。

このような従来例としては、例えば以下の特許文献に開示のものがある。

【0007】

【特許文献1】特開平6-303976号公報

【0008】

すなわち、PCR法を用いた細菌の検出法は、反応を行うために特別な大型機器を必要と

10

20

30

40

50

し、最終判定にはPCR産物を確認するために電気泳動の特殊な方法や、紫外線照射装置などが必要となる。また、このPCR法による検査は、開始から判定まで4～5時間を要し、生産現場や食品工場で用いるためには更に簡便で迅速な方法が求められている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

最近、PCR法に替わる遺伝子増幅法として、ループ媒介等温増幅法（Loop-mediated isothermal AMPlification：LAMP法）が開発された。LAMP法は鋳型となるヌクレオチドに自身の3'末端をアニールさせて相補鎖合成の起点とするとともに、このとき形成されるループにアニールするプライマーを組み合わせることにより、等温での相補鎖合成反応が可能となっている。

10

またLAMP法では、プライマーの3'末端が常に試料に由来する領域に対してアニールするために、塩基配列の相補的結合によるチェック機構が繰り返し機能し、その結果、特異性の高い遺伝子増幅反応が可能となっている。

このような従来例としては、例えば以下の特許文献に開示のものがある。

【0010】

【特許文献2】国際公開W O 0 0 / 2 8 0 8 2

【0011】

LAMP法は、2本鎖DNA、6つの領域を認識する4つのプライマーを用いる遺伝子増幅技術であり、耐熱性DNAポリメラーゼではなく、鎖置換型DNAポリメラーゼを用い、65℃付近の一定温度で、増幅から検出までを1ステップで行うことができる。増幅効率が高く、また、極めて高い特異性をもつため、目的とするDNA配列は、増幅産物を電気泳動することなく濁度あるいは蛍光だけで判定することができる。そのため、LAMP法は、反応を行うために特別な大型機器を必要とせず、反応時間も短く簡便であり、迅速な結果が得られると考えられる。

20

【0012】

本発明は、生産現場での検査および食品検査において、LAMP法により、エンテロトキシンAを産生するエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌を簡便、迅速かつ高感度に検出することができるプライマー、およびそれを用いたエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌の検出法を提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、上記問題を解決するため鋭意研究を行なった結果、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA配列SEAに特異的な塩基配列と選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを作製し、このオリゴヌクレオチドをプライマーとしてLAMP法により黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA配列SEAに特異的な配列を増幅することにより、エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌を検出できることを見出し、本発明を完成した。

【0014】

すなわち本発明は、エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌検出のための核酸増幅法に用いる、エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌検出用プライマーであって、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA配列SEA（配列番号1）またはその相補鎖上から選択される標的領域の塩基配列を増幅し、

40

（1）第1領域として、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA配列SEA上の特異的な塩基配列にアニールしてプライマーとして機能する塩基配列、および

（2）第2領域として、第1領域の3'側の塩基配列に相補的であり、第1領域の5'側に位置する塩基配列

を含むことを特徴とする、新規プライマーを提供する。

【0015】

また本発明は、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA配列SEAに特異的な黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA遺伝子検出の塩基配列を増幅できる、LAMP法用プライマーセットの好適

50

な例として、以下の A、B、C の 3 組のプライマーセットを提供する。

< プライマーセット A >

インナープライマー F :

5' - TCCTGTAAATAACGTCTTGCTTGAACAGTACCTTTGGAAACGG - 3' (配列番号 2 2)

インナープライマー R :

5' - CTGATGTTTTTGATGGGAAGGTTCGTAATTAACCGAAGGTTCT - 3' (配列番号 2 3)

アウタープライマー F :

5' - GCCGATCAATTTATGGCTAG - 3' (配列番号 4)

アウタープライマー R :

5' - TTGAATACTGTCCTTGAGC - 3' (配列番号 2 4)

ループプライマー F :

5' - ACAGTTACATTTTTCTTATTCGT - 3' (配列番号 2 5)

ループプライマー R :

5' - CAGAGGGGATTAATCGTGT - 3' (配列番号 9)

< プライマーセット B >

インナープライマー F :

5' - GCAATTCAGACTTTTTTCGCAAAATCCACTTGTAATGGTAGCG - 3' (配列番号 2 6)

インナープライマー R :

5' - GGAACAGCTTTAGGCAATCTTAAACGTGACTCTCTTTATTTTCAGT - 3' (配列番号 2 7)

アウタープライマー F :

5' - TTGCCCTAACGTTGACAA - 3' (配列番号 1 2)

アウタープライマー R :

5' - AGCCTTTAAACAATATAGTATGC - 3' (配列番号 2 8)

< プライマーセット C >

インナープライマー F :

5' - CCGTTTCCAAAGGTACTGTATTTTAAGAGAAAAAAGTGCCGAT - 3' (配列番号 2 9)

インナープライマー R :

5' - CTTCAAGCAAGACGTTATTTACAGGCTCTGAACCTTCCCATCA - 3' (配列番号 3 0)

アウタープライマー F :

5' - CATGATAATAATCGATTGACCG - 3' (配列番号 1 8)

アウタープライマー R :

10

20

30

40

50

5' - CTGTAGAAAGTATGAAACACGAT - 3' (配列番号 31)

【0016】

さらに本発明は、核酸増幅法がLAMP法である前記プライマー、および該プライマーを用いたLAMP法による黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA配列SEA上の特異的塩基配列の増幅法を提供する。

さらにまた、本発明は前記増幅法を利用して、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA配列SEA上の特異的塩基配列を検出することを特徴とするエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌の検出法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0017】

以下、本発明について詳細に説明する。

核酸増幅法によるエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌の遺伝子検出用の試料としては、食品検査材料、たとえば乳牛から搾乳された生乳およびチーズ等の畜産物など、また食品材料やふき取り検体を使用する。LAMP法の試料としては、この生乳やチーズ等から、熱、蛋白質分解酵素、界面活性剤、アルカリ等を用いた処理法により抽出された核酸が使用される。

【0018】

本発明において標的配列とは、増幅すべきポリヌクレオチドの塩基配列を意味する。一般にポリヌクレオチドの塩基配列は、5'側から3'側に向けてセンス鎖の塩基配列を記載する。本発明において、連続的に新たな標的塩基配列が合成されることを増幅と呼ぶ。更に本発明において、相補鎖合成の起点を与えることは、鋳型となるポリヌクレオチドに対して、相補鎖合成に必要なプライマーとして機能するポリヌクレオチドの3'末端をハイブリダイズさせることを言う。また本発明において、3'末端、あるいは5'末端とは、単にいずれかの末端の1塩基のみならず、末端の1塩基を含み、かつ末端に位置する領域を意味する。本発明において、プライマーセットとは同時に用いられるプライマーの組み合わせをいう。

20

【0019】

LAMP法は、プライマーとして少なくとも4種類のオリゴヌクレオチドを用いる核酸増幅法で、2種類はインナープライマー (Inner Primer)、残りの2種類はアウタープライマー (Outer Primer) である。LAMP法は、これら4種類のプライマー、鎖置換型DNAポリメラーゼ、及び基質を用い、熱変性を必要とせずに、終始等温で速やかに特異性の高い遺伝子増幅反応が進行することを特徴とする。

30

【0020】

LAMP法においては、インナープライマーとアウタープライマーに加え、ループプライマー (Loop Primer) がある。これを用いると核酸合成の起点を増やすことになり、反応時間の短縮と検出感度の上昇ができる。

【実施例】

【0021】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

40

【0022】

実施例 1

1. プライマーの合成

プライマーはSEAの塩基配列 (配列番号 1) に基づいてその塩基配列を設定し、DNA合成を専門に取り扱う機関に委託して、当該機関所有のDNA合成機で、ホスホアミダイド法により化学合成した。合成したプライマーは、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーでさらに精製した。

こうして、プライマーセットA、B、Cを合成した。これらの各セットは図1, 2, 3に示される。すなわち、図1はプライマーセットA、図2はプライマーセットB、図3はプラ

50

イマーセットCをそれぞれ示している。

【 0 0 2 3 】

2 . LAMP法で使用する試料および試薬の調整

1) 試料の調整 (核酸抽出法)

エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌株を培養して、形成されたコロニーを掻き取り、Insta GeneMatrix (BioRad社)で抽出した溶液を試料とした。

【 0 0 2 4 】

2) 対照試料

陰性対照として滅菌水を使用した。また陽性対照の鋳型DNAとしてエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌株から抽出したDNA (ゲノムDNA) あるいはSEAの遺伝子をクローニングしたプラスミドDNA (クローニングベクター) を試料とした。

10

【 0 0 2 5 】

3 . LAMP法に用いる試薬組成及び濃度

上述の試料及びプライマーセットA、B、Cを用いて下記の表 1 に示す組成のLAMP反応液を調整し、プログラム可能な温度調整機 (LA-200、テラメックス社製) を用いてLAMP反応を行った。LAMP反応は栄研化学社製のLoopampDNA増幅試薬キットを用いた。

【 0 0 2 6 】

【 表 1 】

LAMP 反応液

20

2 × Reaction Mix (栄研化学社製)	12.5 μl
Bst DNA ポリメラーゼ (栄研化学社製)	1 μl
滅菌蒸留水	5.5 μl
プライマー	
FIP (40 pmol)	1 μl
BIP (40 pmol)	1 μl
F3 (20 pmol)	1 μl
B3 (20 pmol)	1 μl
試料	2 μl
合計	25 μl

30

40

【 0 0 2 7 】

LAMP反応条件は、60 ~ 65 (61 が特に好ましい。) で1時間保持して反応させ、その後、80 で2分間の酵素変性処理を行った。

反応終了後の各試料10 μlについて、3 % アガロースゲルによる電気泳動により増幅産物を確認した。

【 0 0 2 8 】

4 . 結果

図 4 に示すように、SEAのプラスミドDNA、エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌標準株および黄色ブドウ球菌野外株 (エンテロトキシンA産生) から抽出したDNAは同様のラダーバンドが検出された。陰性対照においては、DNAの増幅は見られなかった。これらのこと

50

から本発明のプライマーセットを用いることにより、エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌のSEA遺伝子の増幅が可能であった。

【 0 0 2 9 】

実施例 2

プライマーの特異性

下記の表 2 にLAMP法によるエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌及び他の細菌を試料としたLAMP反応結果を示す。LAMP反応条件は実施例 1 と同様に行った。

【 0 0 3 0 】

【表 2】

エンテロトキシン A 産生黄色ブドウ球菌及び他の細菌についての LAMP 反応結果

10

菌種 (保有毒素遺伝子)	検出結果	菌種 (保有毒素遺伝子)	検出結果
<i>S.aureus</i> (<i>sea</i>)	+	<i>S.aureus</i> (<i>sec,sed,seg,sei,sej,tst-1</i>)	—
<i>S.aureus</i> (<i>sea,sed,sej</i>)	+	<i>S.aureus</i> (se negative)	—
<i>S.aureus</i> (<i>seb</i>)	—	<i>S.dublin</i>	—
<i>S.aureus</i> (<i>sec,tst-1</i>)	—	<i>S.enteritidis</i>	—
<i>S.aureus</i> (<i>sed,sej</i>)	—	<i>S.hyicus</i>	—
<i>S.aureus</i> (<i>seg,sei</i>)	—	<i>E.coli</i>	—
<i>S.aureus</i> (<i>seh</i>)	—	<i>S.typhimurium</i>	—

20

(+: 増幅 —: 増幅しない)

【 0 0 3 1 】

SEA遺伝子を保有するエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌においてDNAの増幅がみられ、SEA遺伝子を保有しない黄色ブドウ球菌及びその他の細菌の菌株においてはDNAの増幅は見られなかった。これらのことから、本発明のプライマーセットを用いることにより、エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌を特異的に検出することが可能であった。

30

【 0 0 3 2 】

実施例 3

ループプライマーを用いた検出系

プライマーセットAについてループプライマー (配列番号 2 5 及び 9) を設計した。エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌から抽出したDNAを試料として、配列番号 2 2、2 3、4 および 2 4 に示したプライマー及び配列番号 2 5 および 9 に示したプライマーを用いて表 3 に示す組成のLAMP反応液を調整し、プログラム可能な温度調整機 (LA-200、テラメックス社製) を用いてLAMP反応を行った。LAMP反応は栄研化学社製のLoopampDNA増幅試薬キットを用いた。

40

【 0 0 3 3 】

【表 3】

ループプライマーを用いた検出系における LAMP 反応液

2 × Reaction Mix (栄研化学社製)	12.5 μ l	
Bst DNA ポリメラーゼ (栄研化学社製)	1 μ l	
滅菌蒸留水	3.5 μ l	10
プライマー		
FIP (40 pmol)	1 μ l	
BIP (40 pmol)	1 μ l	
F3 (20 pmol)	1 μ l	
B3 (20 pmol)	1 μ l	
LF (5 pmol)	1 μ l	20
LB (5 pmol)	1 μ l	
試料	2 μ l	
合計	25 μ l	

【0034】

LAMP反応条件は、60 ～ 65 (61 が特に好ましい。) で1時間保持して反応させ、その後、80 で2分間の酵素変性処理を行った。

30

【0035】

図5にプライマーセットAについてループプライマーの有無による増幅時間の違いを示すグラフを掲載する。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】プライマーセットAを示す図である。

【図2】プライマーセットBを示す図である。

【図3】プライマーセットCを示す図である。

【図4】DNA検出結果を説明する図である。

【図5】プライマーの有無による増幅時間の違いを示す図である。

40

【 図 1 】

Staphylococcus aureus enterotoxin A 配列 (プライマーセット A)

```

1      atgaaaaaaa cagcatttac attacttita ttcattgccc taacgttgac aacaagtcca
61     cttgtaaatg gtagcgagaa aagcgaagaa ataaatgaaa aagatttgcg aaaaaagtct
121    gaattgcagg gaacagcttt aggcaatctt aaacaaatct attattacaa tgaaaaagct
181    aaaactgaaa ataaagagag tcacgatcaa tttttacagc atactatatt gttaaaggc
241    ttttttacag atcattogtg gtataacgat ttattagtag attttgattc aaaggatatt
301    gttgataaat ataaagggaa aaaagtagac ttgtatggtg cttattatgg ttatcaatgt
361    gcgggtggtg caccacaaca aacagcttgt atgtatggtg gtgtaacgtt acatgataat
      F3 (Seq 4)
421    aatcgattga cgaagagaa aaaagtgcg atcaatttat ggctagacgg taaacaaaat
      F2 (Seq 3)      LF (Seq 8)
481    acagtacott tggaaacggt taaaacgaat aagaaaaatg taactgttca ggagttggat
      F1 (Seq 2)      B1 (Seq 5)
541    cttcaagcaa gacgttattt acaggaaaaa tataatttat ataactotga tgtttttgat
      LB (Seq 9)      B2 (Seq 6)
601    gggaaggttc agaggggatt aatcgtgttt catacttota cagaaccttc ggtaattac
      B3 (Seq 7)
661    gatttatttg gtgtcaagg acagtattca aatacactat taagaatata tagagataat
721    aaaacgatta actotgaaaa catgcatatt gatatatatt tatatacaag ttaa

```

【 図 2 】

Staphylococcus aureus enterotoxin A 配列 (プライマーセット B)

```

      F3 (Seq 12)
1      atgaaaaaaa cagcatttac attacttita ttcattgccc taacgttgac aacaagtcca
      F2 (Seq 11)      F1 (Seq 10)
61     cttgtaaatg gtagcgagaa aagcgaagaa ataaatgaaa aagatttgcg aaaaaagtct
      B1 (Seq 13)
121    gaattgcagg gaacagcttt aggcaatctt aaacaaatct attattacaa tgaaaaagct
      B2 (Seq 14)      B3 (Seq 15)
181    aaaactgaaa ataaagagag tcacgatcaa tttttacagc atactatatt gttaaaggc
241    ttttttacag atcattogtg gtataacgat ttattagtag attttgattc aaaggatatt
301    gttgataaat ataaagggaa aaaagtagac ttgtatggtg cttattatgg ttatcaatgt
361    gcgggtggtg caccacaaca aacagcttgt atgtatggtg gtgtaacgtt acatgataat
421    aatcgattga cgaagagaa aaaagtgcg atcaatttat ggctagacgg taaacaaaat
481    acagtacott tggaaacggt taaaacgaat aagaaaaatg taactgttca ggagttggat
541    cttcaagcaa gacgttattt acaggaaaaa tataatttat ataactotga tgtttttgat
601    gggaaggttc agaggggatt aatcgtgttt catacttota cagaaccttc ggtaattac
661    gatttatttg gtgtcaagg acagtattca aatacactat taagaatata tagagataat
721    aaaacgatta actotgaaaa catgcatatt gatatatatt tatatacaag ttaa

```

【 図 3 】

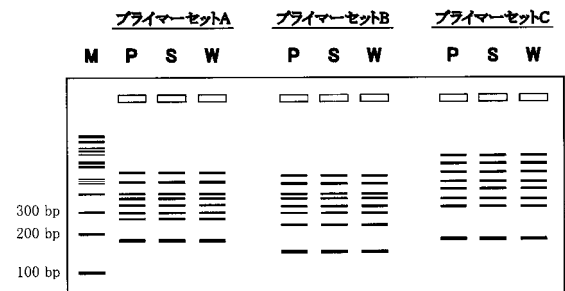
Staphylococcus aureus enterotoxin A 配列 (プライマーセット C)

```

1      atgaaaaaaa cagcatttac attacttita ttcattgccc taacgttgac aacaagtcca
61     ttgtaaatg gtagcgagaa aagcgaagaa ataaatgaaa aagatttgcg aaaaaagtct
121    attgcagg gaacagcttt aggcaatctt aaacaaatct attattacaa tgaaaaagct
181    aaaactgaaa ataaagagag tcacgatcaa tttttacagc atactatatt gttaaaggc
241    ttttttacag atcattogtg gtataacgat ttattagtag attttgattc aaaggatatt
301    gttgataaat ataaagggaa aaaagtagac ttgtatggtg cttattatgg ttatcaatgt
361    gcgggtggtg caccacaaca aacagcttgt atgtatggtg gtgtaacgtt acatgataat
      F3 (Seq 18)      F2 (Seq 17)
421    aatcgattga cgaagagaa aaaagtgcg atcaatttat ggctagacgg taaacaaaat
      F1 (Seq 16)
481    acagtacott tggaaacggt taaaacgaat aagaaaaatg taactgttca ggagttggat
      B1 (Seq 19)
541    cttcaagcaa gacgttattt acaggaaaaa tataatttat ataactotga tgtttttgat
      B2 (Seq 20)      B3 (Seq 21)
601    gggaaggttc agaggggatt aatcgtgttt catacttota cagaaccttc ggtaattac
661    gatttatttg gtgtcaagg acagtattca aatacactat taagaatata tagagataat
721    aaaacgatta actotgaaaa catgcatatt gatatatatt tatatacaag ttaa

```

【 図 4 】



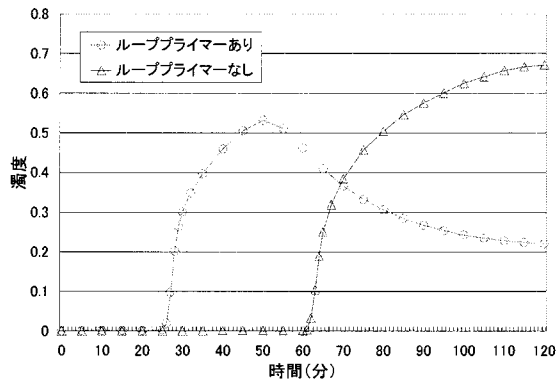
M : サイズスタンダード

P : SEA プラスミド

S : S.aureus ATCC13565

W : 野外株

【図 5】



【配列表】

2008125376000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 繪野澤 真樹

北海道上川郡新得町字新得西 5 線 3 9 番地

北海道立畜産試験場内

(72)発明者 尾上 貞雄

北海道上川郡新得町字新得西 5 線 3 9 番地

北海道立畜産試験場内

(72)発明者 陰山 聡一

北海道夕張郡長沼町東 6 線北 1 5 号

北海道立中央農業試験場内

F ターム(参考) 4B024 AA13 CA02 HA14

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ06 QQ15 QQ43 QR08 QR32 QR56 QR62

QS25 QS34 QX02