

Bericht über die Kamerunexkursion 2012 mit Workshop

Medical Entomology Workshop: PCR Praktikum

Albert Eisenbarth

Im Rahmen des 6-tägigen Workshops in Medizinischer Entomologie an der Universität Ngaoundere wurde jeweils am Nachmittag ein 3- bis 4-stündiger praktischer Einführungskurs in molekularen Techniken, einschließlich der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese, gegeben. Dieses Praktikum fand täglich vom 27. Februar bis 3. März in den Räumlichkeiten des Feldlabors der Universität Tübingen „Programme Onchocercoses“ statt. Dabei wurden die Teilnehmer in sechs Gruppen aufgeteilt mit jeweils fünf bis acht Kameruner Studenten und einem Studenten der Universität Tübingen, die so im Rotationsverfahren an allen Kursen teilnehmen konnten.

Das Praktikum hatte mit einer einstündigen Einführung im Rahmen der morgendlichen Vorlesungen begonnen. Erläutert wurde die Theorie der gezeigten Methoden, für die auch Protokolle verteilt wurden (siehe Anlage). An den Nachmittagen wurden in der jeweiligen kleinen Gruppe die Funktion der für die PCR benötigten Materialien und Reagentien erklärt, Thermocycler, Pipetten, DNA-Polymerase, Nukleotide, Primer, Puffer und Ladepuffer. Ebenso die Technik der Agarose Gelelektrophorese zur Auftrennung und Begutachtung der Amplificate unter UV-Licht.

Anhand der Programmierung des Thermocyclers wurde dessen Funktionsprinzip erläutert, das sich in die drei Phasen Denaturierung, Primerbindung und Synthese gliedern lässt. Des Weiteren wurde die Wichtigkeit sterilen Arbeitens und die Notwendigkeit von positiven und negativen Kontrollen betont. Im ersten praktischen Schritt haben die Studenten selbstständig den Mastermix für sieben DNA Proben plus einer Negativkontrolle berechnet.

Anschließend konnten die Studenten, die zum Teil nur geringe oder gar keine Vorkenntnissen besaßen, die unterschiedlichen Arbeitsschritte der PCR und Gelelektrophorese weitgehend selbstständig durchführen; Das Pipettieren des Mastermix, die Zugabe der DNA Proben unter der Sterilbank, die Benutzung des Thermocyclers, das Mischen, Erhitzen und Gießen des Agarosegels, das Laden der PCR Produkte in das Gel und das Scannen und Fotografieren des Gels unter UV Licht.

Dieser Versuch diente auch zur Veranschaulichung unserer aktuellen epidemiologischen Feldarbeiten, im Rahmen derer die DNA-Isolate von Filarien-Larvenstadien mittels PCR analysiert werden. Diese Larven stammen aus Überträgermücken der Onchozerkose, die in zwei Regionen Kameruns gefangen und routinemäßig in unserem Labor seziiert werden. Zur Trennung der morphologisch schwer unterscheidbaren Filarienarten aus dem Mensch bzw. Tieren (Rind und Warzenschwein) verwenden wir molekulare Marker aus ribosomaler RNA, die auch für Vergleichsstudien mit weiteren Nematodenarten herangezogen werden können. Für den Zweck dieses Kurses wurde die Primersequenz der 16S Untereinheit ribosomaler RNA eingesetzt.

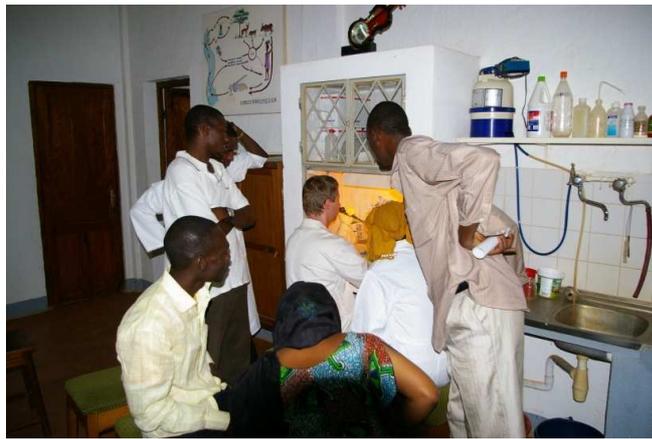
Das Thema dieses molekularbiologischen Experiments bezieht sich auf meine aktuellen Arbeiten im Rahmen meiner Dissertation, bei denen es um die Frage geht, wie viele der am Menschen anfliegenden Überträgermücken die Larven von *O. volvulus* (dem Erreger der

Flußblindheit) sind bzw. vom Rind stammen (*O. ochengi*), und somit für den Menschen ungefährlich sind.

Das Praktikum wurde sowohl in Englisch als auch Französisch abgehalten, da ein Großteil der Kameruner Kommilitonen frankophon ist und nur ein rudimentäres Englisch beherrscht.

Die Rückmeldung der über 40 teilnehmenden Studenten aus Deutschland und Kamerun war durchweg positiv. Die Meisten der Kameruner Studenten hatten noch nie molekularbiologisch gearbeitet und wiesen auch in der Theorie erhebliche Defizite auf. Die ausführliche Erklärung der unterschiedlichen Schritte und deren praktische Durchführung führten nicht selten zu Begeisterung und Freude an der Arbeit.

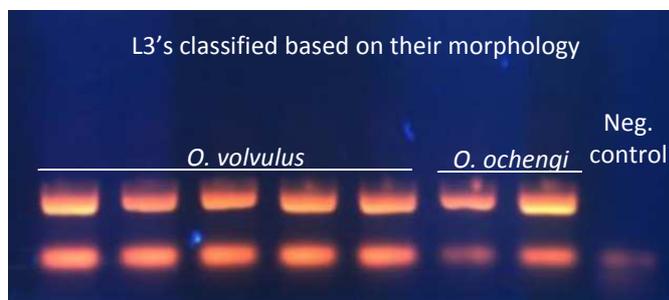
Darüber hinaus plant die Universität Ngaoundere den neuen Studiengang „Molekulare Biologie“. In diesem Kontext lieferte der Workshop einen Einblick in diese für die aktuelle Forschung so wichtige Methode. Universell einsetzbar, bietet die PCR auch ein hervorragendes diagnostisches Instrument für die Human- und Veterinärmedizin.



Die Studenten versammeln sich um die Sterilbank.



Molekularlabor des Programme Onchocercoses



Scan eines Agarose-Gels mit aufgetragenen PCR-Produkten der Dritten Larven (L3) unterschiedlicher *Onchocerca* Arten aus wildgefangenen Kriebelmücken. Das Amplifikat wird in Tübingen analysiert (sequenziert), um die oft unsichere morphologische Klassifizierung zu überprüfen.



Vorbereiten der Gelelektrophorese im Molekularlabor