**Protocol I: Speeksel afname**

**Doel:** Het doel van dit protocol is gestandaardiseerd verzamelen, bewerken en bewaren van speeksel voor onderzoek naar lpha-amylase en protease activiteit.

**Principe:**    
Dit protocol is zo opgezet om speeksel te verzamelen en verwerken waar zowel alpha-amylase activiteit als protease activiteit gemeten kan worden. Speeksel bevat veel componenten waaronde slijm, bacteriën en enzymen. Deze samenstelling kan snel veranderen en is gevoelig voor de gebruikte methoden.   
In dit protocol wordt passief ongestimuleerd drooling gebruikt, deze methode heeft het minst invloed op de eiwitconcentraties.Centrifugatie hoeft voor en nadelen, deze twee condities worden beide meegenomen: unclarified (UNC) waarbij het speeksel matrix intact blijft en clarified (CLAR) waarbij cel debris, voedselresten en bacterien verwijdert worden.  
Daarnaast wordt de proteaseremmer (REM) conditie met een brede protease remmer cocktail gebruikt als controle voor de proteolytische afbraak in de tussen tijd van behandeling (in UNC en CLAR).  
Alle monsters worden zo snel mogelijk ingevroren bij -80 °C, zodat enzym(activiteit) en andere componeten stabiel blijven voor verdere analysen.

**Veiligheid**

Proteaseremmer cocktail?

**Materialen**

* Steriel glazen buis of steriele PP buis
* 18 epjes 1.5 mL voor aliquots (PP)
* Ijs
* PBS pH 7.0
* Centrifuge (10 min.3000 × g, 4 °C gekoeld)
* Pipetten en steriele tips (filtertips)
* Protease remmercocktail

**Methode**

**Aandachtspunten:**

* Werk snel
* Werk koud en eventueel te ontdooien materiaal laten ontdooien op ijs
* Werk steriel
* Zie bijlage I voor checklist speeksel donor

***Speekselverzameling****Ongestimuleerde passive drooling  
Zie bijlage I voor de checklist speeksel monster afname*

1. Zet ijs klaar en laat remmercocktail alvast ontdooien op ijs.
2. Label alle buizen vooraf (donorID\_datum\_tijd\_aliquottype) en laat ze op temperatuur komen op ijs.  
   **LET OP:** Label op de buis, niet op de dop
3. Neem 16 epjes en label ze volgens tabel 1, laat deze ook in een bak ijs op temperatuur komen  
   *Epje is klein, hou de naam kort en met tape een bakje labelen met datum en tijd, donorID is bijv A en in docuemntatie benodigde informatie per donor*  
     
   *Tabel 1. Verdeling en label epjes*

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Aliquot** | Native\_UNC | P-Native\_CLAR | S- Native\_CLAR | Rem\_UNC | P-Rem\_CLAR | S-Rem\_CLAR |
| **Naam** | DonorID\_NU | Donor\_ID\_PNC | Donor\_ID\_SNC | Donor\_ID\_RU | Donor\_ID\_PRC | Donor\_ID\_SRC |
| **Aantal** | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

1. Donor zit ontspannen, hoofd licht naar voren om speeksel te verzalen.  
   **LET OP:** Hou de timer erbij voor de start tijd
2. Donor laat speeksel “vallen” in steriele 15 mL buis totdat ongeveer XmL is verzameld.  
   **LET OP:** Vermijd schuim, NIET spugen maar laat zwaartekracht het werk doen & niet “denken” aan voedsel
3. Plaats buis direct op ijs noteer start-/eindtijd.

***Aliquots maken****Pipeteer langzaam en voorzichtig, speeksel is visceus.*

1. Meng zacht door kantelen  
   **LET OP:** geen vortex
2. Voeg X µL remmercocktail toe aan een epje voor native\_REM aliquots zoals aangegeven in tabel 2.  
   **LET OP:** Meng de remmercocktail voordat je overpipetteerd
3. Voeg native speeksel toe aan de aliquots zoals aangegeven in tabel 2.  
   **LET OP:** Meng de rem aliquots nog goed door op en neer te pipetteren

*Tabel 2. Aliquot soort verdeling epjes*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Hoeveelheid** | **Soort sample** | **Proteaseremmer cocktail** | **Native speeksel** |
| **3** | **Native\_UNC** (native speeksel unclarified ongecentrifugeerd) | 0 µL | µL |
| **3** | **P-Native\_CLAR** (native speeskel clarified gecentrifugeerd) | 0 µL | µL |
| **3** | **Rem\_UNC** (direct proteaseremmer cocktail toegevoegd) | µL | µL |
| **3** | **P-Rem\_CLAR** (direct proteaseremmer cocktail toegevoegd clarified gecentrifugeerd) | µL | µL |

***Centrifugatie (voor native\_CLAR en rem\_CLAR)***

1. Centrifugeer epje bij **4 °C, 10 min, 3000 × g**.  
   **LET OP:** Visceus materiaal, langzaam pipeteren (als dit diet gaat eventueel pipet punt groter knippen)  
   *Bij klontjes proberenvoorzichtig op en neer te pipeteren en anders kort vortexen (1-2 sec)*
2. Pipetteer supernatant (geen pellet) van P-Native/Rem\_CLAR samples naar een S-Native/Rem\_CLAR.   
   **LET OP:** Noteer goed wat in welk epje aanwezig is en noteer de tijden.
3. Resuspendeer de pellet in de P-Native/Rem\_CLAR epjes in X µL PBS pH 7.0, meng met de pipetpunt voorzichtig en tik de pellet los.

***Opslag***

1. Plaats alle aliquots zo snel mogelijk in -80 °C vriezer.  
   **LET OP:** Noteer goed wat waar staat en gooi overbodig maeriaal weg om verwarring te voorkomen.

**Bijlage I – Checklist speeksel monster afname**

* Geen eten, kauwgom of roken minstens 60 minuten voor afname.
* Geen tandenpoetsen of mondspoelen minstens 30 minuten voor afname.
* Eventueel: spoel kort met water (10 s) en wacht 10 min.
* Bij voorkeur ochtendafname.
* Eventuele medicatie, gezondheidsproblemen en staat van mondhygiëne noteren.