**Protocol III: FRET assay**

**Doel:** Het doel van dit protocol is het kwantitatief meten van protease activiteit in speeksel met behulp van een FRET assay.

**Principe:** Een FRET substraat bestaat uit een fluorofore donor en acceptor. FRET substraat geeft geen signaal wanner dit intact is, maar wanneer er sprake is van proteolytische activiteit en er dus een knip plaatsvind, wordt fluorescentie zichtbaar. Dit is te meten als RFU/min en is dus in dit protocol de maat voor protease activiteit.

**Materialen**

* FRET-peptide substraat stockoplossing
* Zwarte 96 well plate
* Fluorescent microplate reader (ex 485 nm / em 530 nm)
* DMSO
* Speeksel aliquots
* Stop reagens
* Trypsine (pos controle)
* Aluminiumfolie

**Methode**

1. Los het FRET-peptide substraat op in 100% DMSO tot een concentratie van 800 μM.  
   Eindconcentratie van het peptide in de assay: 16 μM.
2. Voeg 50 μL van elk speeksel sample toe aan een well van een zwarte 96-well plaat.
3. Voeg 1 μL van elk FRET-peptidesubstraat toe aan de corresponderende welletjes.
4. Pipetteer samples volgens de 96 well plate lay out in figuur 1.
5. Meet de fluorescentie elke 2 minuten met een microplaatlezer die op 37 ℃ is ingesteld.

***Analyse***

1. Bereken de protease-activiteit als fluorescentie per minuut (F/min).
2. Definieer positieve protease-activiteit als F/min > 5.
3. Maak een heatmap van de proteolytische activiteit voor elk peptidesubstraat.