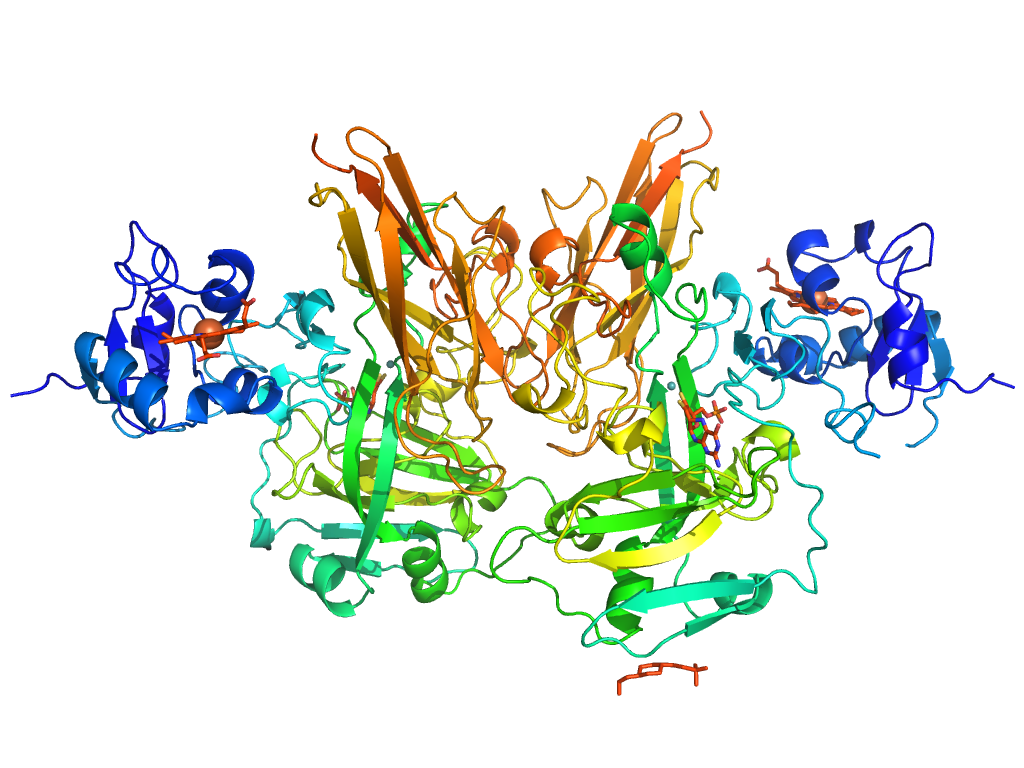


**De invloed van protease activiteit op de activiteit van alfa-amylase in humaan speeksel**



**Auteurs:** Evelyanne Kelly – 1794405

Oumaima Anbari – 1754870

**Cursus:** Projecticum Biomolecular Research – Projectvoorstel definitieve versie

**Cursuscode:** TLSC-PRBMR5V-24

**Opdrachtgever:** Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam

**Opleiding:** Life Sciences – Hogeschool Utrecht

**Projecttutor:** René van der Ploeg

**Groep:** VL5B04

**Datum:** 29 oktober 2025

**Plaats:** Utrecht

# **Abstract**

Speeksel is een complexe biologische vloeistof die wordt onderzocht als een niet-invasieve bron van biomarkers voor systemische aandoeningen, waaronder het metabool syndroom. Een belangrijk speekselenzymen is alfa-amylase, dat betrokken is bij de afbraak van koolhydraten en wordt beschouwd als een potentiële biomarker voor metabole en fysiologische processen. Het is echter onbekend of proteasen in speeksel alfa-amylase afbreken en daarmee de enzymactiviteit verminderen. Hierdoor is het onzeker of alfa-amylase in speeksel betrouwbaar kan worden gebruikt als biomarker voor metabole aandoeningen, en is er behoefte aan een reproduceerbare assay-lijn. Dit gebrek aan kennis maakt de meting van alfa-amylase activiteit minder betrouwbaar voor zowel diagnostische toepassingen als wetenschappelijk onderzoek.   
In dit onderzoek wordt de invloed van proteaseactiviteit op de alfa-amylase activiteit in humaan speeksel onderzocht met als doel het ontwikkelen van een reproduceerbare assay-lijn om de relatie tussen protease- en alfa-amylase activiteit betrouwbaar te kunnen meten en interpreteren. Ongestimuleerd passief speeksel van gezonde proefpersonen wordt verzameld en voorbereid volgens een gestandaardiseerde werkwijze. De totale eiwitconcentratie wordt bepaald met de BCA-assay. Vervolgens wordt de algehele proteaseactiviteit gemeten met een FRET-assay en de alfa-amylase activiteit met de CNPG3-assay. Daarnaast wordt met behulp van een SDS-Page en Coomassie-kleuring onderzocht of proteolytische afbraak van alfa-amylase optreedt.  
Door de resultaten van deze assays te combineren, kan inzicht worden verkregen over de relatie tussen proteaseactiviteit en alfa-amylase activiteit in speeksel. De verworven kennis kan bijdragen aan de ontwikkeling van een reproduceerbare assay-lijn voor de analyse van alfa-amylase als niet-invasieve biomarker voor metabole en fysiologische processen.

# **Afkortingenlijst**

|  |  |
| --- | --- |
|  | |
| ACTA | Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam |
| BCA | Bicinchoninezuur |
| BMI | Body Mass Index |
| CNPG3 | 2-Chloro-4-nitrophenyl-α-D-maltotrioside |
| FRET | Fluorescence Resonance Energy Transfer |
| MMP | Matrix Metalloproteïnase |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl fluoride |
| SDS-PAGE | Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis |
| TSI | Trypsine Soybean Inhibitor |

Inhoudsopgave

[Inleiding 2](#_Toc212670764)

[Vraagstelling 6](#_Toc212670765)

[**Onderzoeksvraag:** 6](#_Toc212670766)

[**Deelvragen:** 6](#_Toc212670767)

[**Principe** 6](#_Toc212670768)

[**Hypothese** 8](#_Toc212670769)

[**Voorspelling** 8](#_Toc212670770)

[Werkplan 9](#_Toc212670771)

[**1.** **Modelsysteem** 9](#_Toc212670772)

[**2.** **Interventie** 9](#_Toc212670773)

[**3.** **Uitlezing en apparatuur** 10](#_Toc212670774)

[**4.** **Protocollen** 10](#_Toc212670775)

[**5.** **Experimentiele ontwerp** 10](#_Toc212670776)

[**6.** **Plannen** 11](#_Toc212670777)

[**7.** **Materiaal en apparatuur** 15](#_Toc212670778)

[**Flowchart** 15](#_Toc212670779)

[Referenties 16](#_Toc212670780)

[Bijlagen 19](#_Toc212670781)

[**Materialenlijst** 19](#_Toc212670782)

[**Protocol: Speeksel afname** 20](#_Toc212670783)

[**Protocol: BCA-assay** 23](#_Toc212670784)

[**Protocol: CNPG3-assay** 27](#_Toc212670785)

[**Protocol: FRET-assay** 31](#_Toc212670786)

[**Protocol: SDS-PAGE** 34](#_Toc212670787)

# **Inleiding**

Metaboolsyndroom is een wereldwijd groeiend gezondheidsprobleem dat wordt gekenmerkt door een combinatie van metabole risico factoren, waaronder abdominale obesitas, insuline resistentie,dyslipidemie en hypertensie (Pigeot & Ahrens, 2025). In een meta-analyse op basis van gegevens van meer dan 28 miljoen individuen rapporteerden Noubiap et al. (2022) een prevalentie van 12.5% tot 31.4. Ook bleek dat metabool syndroom zich niet meer beperkt tot volwassenen, maar ook voorkomt in kinderen en adolescenten.   
De aanwezigheid van metabool syndroom verdubbelt het risico op het ontwikkelen van cardiovasculaire aandoeningen, waaronder myocardinfarct, hartfalen, beroerte en coronaire hartziekten. Tevens verhoogt het de kans op mortaliteit door cardiovasculaire oorzaken (de Simone et al., 2007). Daarnaast wordt het syndroom sterk geassocieerdmet de ontwikkeling van diabetes mellitus type 2, wat op zijn beurt het risico op complicaties zoals slaapapneu, pulmonale hypertensie en osteoartritis verder vergroot (de Simone et al., 2007).

De huidige diagnostiek van metabool syndroom is grotendeels afhankelijk van invasieve bloedonderzoeken en klinische parameters zoals glucose, insuline en lipiden waarden. Hoewel deze methoden klinisch betrouwbaar zijn, brengen ze beperkingen met zich mee: zo zijn ze kostbaar, tijdsintensief, en is getraind personeel vereist.

Vanuit het Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam (ACTA) wordt onderzoek verricht naar orale gezondheid, infecties en regeneratieve processen met als doel de algehele mondgezondheid te optimaliseren.In samenwerking met de Hogeschool Utrecht wordt onderzocht hoe speekselenzymen een rol spelen bij zowel mondgezondheid als systemische aandoeningen. Deze samenwerking sluit aan bij de bredere zoektocht naar betrouwbare, niet-invasieve biomarkers die inzicht kunnen geven in metabole en fysiologische processen.

Een systematic review van Habobe et al. (2025) heeft het over de potentie van speeksel als een non-invasieve methode om metabool syndroom vroegtijdig te diagnostiseren. Speeksel is eenvoudiger en pijnloos te verzamelen, vereist geen gespecialiseerd personeel en is daardoor kosteneffectiever en patiëntvriendelijker.

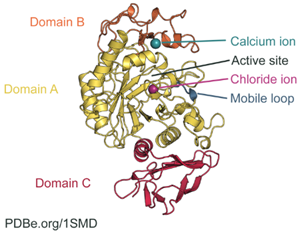
Speekselenzymen spelen een essentiële rol bij het behouden van de mondgezondheid en in de eerste fases van de spijsvertering. Deze enzymen bieden bescherming aan de tandoppervlakte en slijmvlies om tegen elkaar te hechten, neutraliseren van zuren, antimicrobiële activiteit en herstellen van weefsel.   
Speeksel wordt geproduceerd in de speekselklieren en worden gereguleerd door zowel het sympathische als het parasympathische zenuwstelsel, die stimuleren de speekselklier secretie. De speekselklieren bestaat uit acinaire cellen, die onderverdeeld worden in sereuze en mucineuze cellen. De sereuze acinaire cellen produceren glycoproteïnen en alfa-amylase enzym. De mucineuze acinaire cellen produceren slijmachtige mucine eiwitten met sterke suikerresidu die de mond beschermt en bevochtigd. Enzymen die in speeksel voorkomen zijn lipase, amylase, lysozym en protease. Lipase zorgen voor het afbreken van vetten, amylase voor het afbreken van koolhydraten, protease voor het afbreken van eiwitten en lysozym bevat polynucletidasen voor het afbreken van DNA en RNA (Alhajj & Babos, 2023).

Speeksel bevat een breed scala een potentiële biomarkers, waaronder ionen, eiwitten, hormonen, vetzuren en vitaminen. Deze kunnen mogelijk de metabole status van een individu weerspiegelen en als diagnostisch materiaal dienen (Habobe et al., 2025).  
Speeksel wordt al langer als diagnostisch materiaal gebruikt, bijvoorbeeld bij het meten van het hormoon cortisol voor psychologische stress (Ali & Nater, 2020), geneesmiddelen detectie, het opsporen van bacteriën of virussen en bij humaan immunodeficiëntie virus (HIV)-screening. Daarnaast kan speekselproductie beïnvloed worden door verschillende ziektes, medicaties of behandelingen. Dit kan gevolgen hebben voor de enzymactiviteit, minder bescherming voor de mondholte en het verstoren van bepaalde functies van de spijsvertering wat mate van activiteit ook als marker ka dienen. Zonder een natuurlijke antimicrobiële afweer vergroot de kans op bacteriële en schimmelinfecties (Alhajj & Babos, 2023).

Eén van de meest onderzochte enzymatische biomarkers in speeksel is alfa-amylase. Dit enzym behoren tot de familie van glycosidehydrolasen, die de alfa-1,4-glycosidische binding in zetmeel hydrolyseren. Hierdoor worden koolhydraten moleculen afgebroken in kleinere suikermoleculen.   
Er bestaat drie klassen amylase: alfa-, beta-, en gamma-amylase.

* Alfa-amylase komen voor bij mensen, dieren, planten en micro-organismen.
* Bèta-amylase komen voor in planten en micro-organismen.
* Gamma-amylase komen voor in dieren en planten.

Bij de mens komt alfa-amylase alleen voor en speelt een essentiële rol bij de spijsvertering, omdat in de mond begint het afbreken van zetmeel en bij de kolonisatie van bacteriën in de mond door de vorming van tandplak.   
Alfa-amylase 3D structuur bestaat uit drie domein: A, B en C domein. Het enzym bevat ook een calciumion (Ca2+) en een chloride ion (Cl-).   
Het calciumion bevindt zich in domein B en is gebonden aan asparagine (Asn), arginine (Arg), histidine (His) aminozuren samen met 3 watermoleculen. Het chloride ion bevindt zich in domein A en is gebonden aan Asn en Arg aminozuren samen met één watermolecuul. Vervolgens in domein A zit ook een mobiele loop die is een glycinerijk gebied, die zorgt ervoor dat het substraat goed kan binden aan het actieve side van het enzym. Het actieve side bevindt zich ook in domein A en is essentieel voor de enzymactiviteit (*zie figuur 1*) (Akinfemiwa et al., 2023).



**Figuur 1:** Weergave van 3D structuur van humaan alfa-amylase in speeksel die bestaat uit domein A (geel), domein B (oranje), domein C (rood), calcium-ion (groen), chloride-ion (roze), mobiele loop (blauw) en actieve site (zwart). [*https://www.ebi.ac.uk/pdbe/articles/wonders-salivary-amylase*](https://www.ebi.ac.uk/pdbe/articles/wonders-salivary-amylase)

Alfa-amylase is één van de meest overvloedige eiwitten in speeksel en vormt ongeveer 10-20% van de totale speekseleiwitten (Arhakis et al., 2013). De concentratie en activiteit van alfa-amylase in het speeksel blijkt sterk te correleren met metabole processen, zoals glucosemetabolisme en ontstekings. Deze spelen ook een rol in het metabool syndroom (Erta et al., 2025).

In hoeverre de concentratie en activiteit van alfa-amylase in verband staat met metabool syndroom is echter nog geen hard bewijs voor. In een studie van Al-Akl et al. (2020) werd aangetoond dat mannen met een lage plasmaconcentratie van alfa-amylase significant hogere markers van adipositat vertoonden, zoals body mass index (BMI), vetmassa, visceraal vet en middelomtrek vergeleken met mannen met een hoger alfa-amylase concentratie. Deze bevindingen ondersteunt het idee dat een verminderde alfa-amylase activiteit mogelijk samenhangt met metabole dysfunctie. In een andere studie van Viljakainen et al. (2015) is een ander verband te zien, mogelijk afhankelijk van populatieverschillen (leeftijd, etniciteit, obesita-geschiedenis).

Erta et al. (2025) en Schipper et al. (2009) benadrukken het belang voor de reproduceerdbaarheid, het standaardiseren en het valideren van methoden om speeksel alfa-amylase te gebruiken als metabolische biomarker. Variatie in studies kunnen worden verklaard door de verschillen in verzamelmethode, opslagconditie en verwerking van het speeksel evenals biologische factoren waaronder dieet en stress.

Daarnaast is de samenstelling van speeksel complex. Het bevat naast alfa-amylase ook verschillende enzymen, waaronder proteasen.   
Proteasen kunnen worden onderverdeeld in vier hoofdklassen: serine-, cysteïne-, asparaat- en metalloproteasen (Turk et al., 2012). In speeksel komen voornamelijk serine-, cathepsines en metalloproteasen voor, waaronder kallikreïnes en MMP's (Denny et al., 2008). Deze proteasen, zoals matrix metalloproteinasen (MMP) kunnen mogelijk ook op zichzelf een indicator zijn voor metabole dysfunctie en als biomarker dienen (Habobe et al., 2025).

Naast endogene proteasen, die worden uitgescheiden door speekselklieren of afkomstig zijn van epitheelcellen, bevat speeksel ook exogene proteasen die voornamelijk worden geproduceerd door de orale microbiota. Thomadaki et al. (2011) rapporteerden dat de proteolytische activiteit in ongecentrifugeerd speeksel ongeveer 7.5 keer hoger was dan in het supernatant, wat erop wijst dat een groot deel van de proteaseactiviteit in speeksel afkomstig is van celgebonden en bacteriële enzymen.   
  
Deze gecombineerde proteolytische activiteit vormt een technische uitdaging bij het gebruik van alfa-amylase als biomarker, omdat proteasen dit enzym kunnen afbreken of inactiveren. Hierdoor kan de gemeten alfa-amylaseactiviteit lager uitvallen dan de werkelijke waarde, wat de betrouwbaarheid van de metingen vermindert. Om die reden is het belangrijk te begrijpen in welke mate proteasen invloed hebben op de stabiliteit en activiteit van alfa-amylase in speeksel.

Hoewel de aanwezigheid en functies van alfa-amylase en proteasen in speeksel zijn beschreven, is er nog weinig bekend over de interactie tussen deze enzymen. Het is onduidelijk in welke mate endogene proteasen bijdragen aan de afbraak of inactivatie van alfa-amylase in speekselmonsters en hoe dit de betrouwbaarheid van de speekselmetingen beïnvloedt.  
Daarnaast ontbreken er gestandaardiseerde methoden om deze interactie kwantitatief te beoordelen. De meeste bestaande studies richten zich op de totale enzymactiviteit, maar niet op de dynamiek van afbraak of stabiliteit van alfa-amytlase onder invloed van proteolytische activiteit.

Om dit beter te begrijpen, wordt in dit onderzoek gekeken naar de proteaseactiviteit in speeksel en de invoed hiervan op de alfa-amylase activiteit. Dit gebeurt met behulp van een fluorescence resonance energy transfer (FRET)-assay en 2-chloro-4-nitrophenyl-α-D-maltotrioside (CNPG3)-assay.

De resultaten van dit onderzoek kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van betrouwbaardere analyses voor speeksel biomarkers en beter begrip van hoe enzymatische afbraak de diagnostische waarde van deze biomarkers beïnvloedt in bijvoorbeeld, maar niet beperkt tot, metabool syndroom.

In dit onderzoek zal ongestimuleerd passief speeksel verzameld worden en bereid worden voor de totale ewitconcentratie bepaling met behulp van de bicinchoninezuur (BCA)-assay. Hierna kan de proteaseactiviteit in de monsters bepaald worden met de FRET-assay: een methode die algehele proteolytische afbraak in speeksel kwantificeert. Tegelijkertijd wordt de alfa-amylase activiteit bepaald met de CNPG3-assay, waar met behulp van een substraat de enzymactiviteit gemeten kan worden.   
Door deze assays te combineren kan zowel de proteolytische activiteit en alfa-amyalse activiteit in speekselmonsters worden bepaald, waardoor inzicht verkregen wordt over de mogelijke invloed van proteasen op alfa-amylase in het speeksel.

Om de resultaten van deze assay-lijn verder te onderbouwen, zal aanvullend een SDS-PAGE uitgevoerd worden, gevolgd door een Coomassie-kleuring. Hiermee kan verandering in eiwitprofiel in de speekselmonsters gevisualiseerd worden en kan worden beoordeeld of alfa-amylase afgebroken wordt onder invloed van proteasen.

# **Vraagstelling**

**Onderzoeksvraag:** Wat is de invloed van protease activiteit op de enzymactiviteit van alfa-amylase in humaan speeksel?

## **Deelvragen:**

* Heeft het protease invloed op de enzymactiviteit van alfa-amylase in humaan speeksel bij meerdere tijdspunten of momenten?
* Heeft verschillende protease concentratie invloed op de enzymactiviteit van alfa-amylase in humaan speeksel?
* Heeft protease invloed op de enzymactiviteit van alfa-amylase in een:
* Gecentrifugeerde vs ongecentrifugeerde speekselmonster?
* Voorkomt een proteaseremmer dat alfa-amylase in speeksel wordt afgebroken:
* Proteaseremmer vs geen proteaseremmer?

## **Principe**

Om de onderzoeksvraag en deelvragen te kunnen beantwoorden worden verschillende technieken gebruikt die hun eigen bijdrage toevoegen met hun unieke principes:

* BCA-principe; totale eiwitconcentratie bepaling voor normalisatie
* CNPG3 principe; kwantitatieve meting van alfa-amylase activiteit in het speeksel
* FRET principe; kwantitatieve meting van algehele proteolytische activiteit in het speeksel
* SDS-PAGE principe; aanvullende informatie over de eventuele afbraak van alfa-amylase

Voor het meten van alfa-amylase en protease activiteit in speeksel moet eerst speeksel verzameld worden van gezonde proefpersonen op een gestandaardiseerde werkwijze.

In dit project is gekozen voor ongestimuleerde passieve drooling methode, omdat gestimuleerde speeksel methoden zoals kauwen op parafilm de samenstelling van het speekselproteoom verandert. Gestimuleerd speeksel heeft een lagere totale eiwit-concentratie per volume-eenheid, doordat de verhoogde flowrate leidt tot verdunning van eiwitten (Engelen et al., 2007; Fabian et al., 2015). Tegelijkertijd is bekend dat specifieke enzymen, zoals alfa-amylase, juist een verhoogde concentratie vertonen bij gestimuleerde methoden (Al Habobe et al., 2024). Echter is er niet veel bekend over de proteasen en richt dit onderzoek zich op de natuurlijke variatie van speeksel in rusttoestand. Er moet rekening mee gehouden worden dat het denken aan voedsel toch wel gestimuleerd speeksel is, omdat dit de samenstelling van het proteoom in het speeksel beïnvloed (Marques, et al., 2025).  
Het speeksel zal worden verzameld in steriel puur polypropyleen (PP). Uit eerder onderzoek blijkt dat glas het meest geschikt is voor het minimaliseren van verlies van enzymactiviteit. Vanwege beperkte beschikbaarheid van steriel glas is gekozen voor PP, waarbij het verlies van enzymactiviteit relatief klein bleek te zijn (Skoluda et al., 2020).  
Speekselonsters worden vervolgens 2 maal gesonificeerd voor 5 seconden. Sonificatie is een methode waarbij geluidstrillingen worden gebruikt om onder andere aggregaten en celresten te verbreken. Dit resulteert in een homogener mengsel, waardoor het viskeuze speeksel betrouwbaarder kan worden geanalyseerd (Vitorino et al., 2012; Soto-Sierra et al., 2018).

Er is besloten om zowel gecentrifugeerde als ongecentrifugeerd speekselmonsters te verzamelen. Centrifugatie heeft als voordeel dat celdebris en voedselresten verwijdert kunnen worden wat ruist veroorzaakt in de uitlezing. Echter is bekend dat alfa-amylase aan bacteriën en andere eiwitten bindt, waardoor het gedeeltelijk beschermd wordt tegen proteolytische afbraak. Deze complexen worden ook verwijderd bij het centrifugeren wat de alfa-amylase concentratie verlaagt (Marshall & Williams, 1987). De centrifugatie wordt uitgevoerd voor invriezing, omdat alfa-amylase precipiteert en anders ook in grotere hoeveelheden verwijderd wordt van het monster (Schipper et al., 2009).  
Verder worden alle speekselmonsters zo snel mogelijk bewaard bij -80 ℃, aangezien dit de samenstelling van het speeksel het best behoudt (Kim, et al., 2024). Er wordt geen proteaseremmer cocktail toegevoegd, omdat de op te zetten assay-lijn is bedoeld om de proteolytische activiteit te bestuderen. Voor de monster voorbereiding voor de vervolg assays wordt PBS als diluent gebruikt, aangezien dit een stabieler enzymactiviteit buffer in vergelijking met gedemineraliseerd water (Skoluda et al., 2020).

De totale eiwitconcentratie van de speekselmonsters wordt bepaald met de BCA-assay. Hierbij reduceren eiwitten in een alkalisch milieu van Cu2+ naar Cu1+ dat vervolgens gedetecteerd kan worden met het BCA-reagens. Twee BCA-moleculen binden één koper-ion, wat resulteert in een paarse kleur met een sterke absorptie bij 562 nm. De totale eiwitconcentratie van de speekselmonsters kan gebruikt worden om de hoeveelheid materiaal voor vervolgexperimenten te berekenen en variatie tussen monsters te normaliseren.

De activiteit van alfa-amylase wordt gemeten met de CNPG3-assay. Alfa-amylase hydrolyseert 2-chloor-p-nitrofenyl-α-D-maltotrioside (CNPG3) tot 2-chloor-nitrofenol en 2-chloor-p-nitrofenyl-α-D-maltoside (CNPG2), maltotriose (G3) en glucose (G). De vorming van 2-chloor-nitrofenol veroorzaakt een toename in absorptie bij 405 nm, die evenredig is met de alfa-amylase activiteit in de speekselmonsters. Door de voorgaande normalisatie stap kan de enzymactiviteit vergeleken worden tussen verschillende monsters.

Voor de bepaling van protease activiteit wordt een FRET-assay gebruikt. Hierbij wordt een fluorescerend gelabeld peptide substraat, genaamd PEK-054 ([FITC]-NleKKKKVLPIQLNAATDK-[KDbc]). Dit is een peptide van 20 aminozuren met een fluorescerende donor (FITC) aan de N-terminus en een quencher (KDbc) aan de C-terminus. Wanneer de proteasen in het speeksel de peptide op één van de vele knipplaatsen hydrolyseren, wordt de donor van de quencher gescheiden. Hierdoor neemt de fluorescentie toe en is deze kinetisch te meten. Het substraat biedt een brede detectie van proteasen en is daarmee geschikt om de algehele proteolytische capaciteit van ongecentrifugeerd en gecentrifugeerd speeksel te meten (Didilescu et al., 2022; Kaman et al., 2013).

Daarnaast wordt het eiwitprofiel bestudeerd met SDS-PAGE, waarbij de eiwitten worden gescheiden op basis van hun molecuulgrootte. Deze methode geeft aanvullende informatie ten opzichte van de enzymactiviteit bepaling, omdat hiermee de structurele integriteit van alfa-amylase kan worden onderzocht. De CNPG3-assay geeft alleen inzicht in het functionele vermogen van alfa-amylase door de enzymactiviteit te bepalen. Met SDS-PAGE kan worden vastgesteld of alfa-amylase daadwerkelijk door proteasen is afgebroken. Dit is zichtbaar als fragmenten of het verdwijnen van het band op de verwachte molecuulmassa. De combinatie van zowel SDS-PAGE als CNPG3 maakt onderscheid mogelijks tussen verschil van enzymactiviteit en daadwerkelijke proteolytische afbraak.

Door de combinatie van gestandaardiseerde speekselverzameling, normalisatie via BCA en specifieke enzymatische assays (CNPG3 voor alfa-amylase en FRET voor proteasen) kunnen de enzymactiviteiten betrouwbaar worden onderzocht en vergeleken tussen verschillende proefpersonen.   
Door speeksel te incuberen, kan het effect van endogene en exogene proteasen bepaald worden.   
Daarnaast dient trypsine als positieve controle om de afbraak van alfa-amylase te bevestigen en als referentie voor proteolytische fragmentatie in de SDS-PAGE. Trypsine is een serineprotease geproduceerd door de alvleesklier met circa 50 knipplaatsen op alfa-amylase en kan daardoor gebruikt worden om afbraak hiervan te meten (Expasy PeptideCutter-tool [ExPASy], z.d.).  
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) wordt gebruikt als negatieve controle, omdat het een irreversibele serineproteaseremmer is. Hiermee kan worden gecontroleerd of de eventuele veranderingen in enzymactiviteit daadwerkelijk het gevolg is van proteolytische activiteit.

## **Hypothese**

Salivaire proteasen verlagen de alfa-amylase activiteit in humaan speeksel als gevolg van proteolytische afbraak van het enzym.

## **Voorspelling**

Wanneer humaan speeksel wordt geïncubeerd bij 37 °C, zal de algehele proteolytische activiteit in het speeksel toenemen. Hierdoor wordt verwacht dat in de FRET-assay een stijging in fluorescentie optreedt, die evenredig is met de aanwezige proteaseactiviteit in het speeksel. Verder wordt de alfa-amylase activiteit gemeten met de CNPG3-assay, de activiteit zal lager zijn in de speekselmonsters die zijn geïncubeerd bij 37 °C, als gevolg van proteolytische afbraak.  
  
In de negatieve controle met PMSF, waarin een groot deel van de serineproteasen in het speeksel irreversibel worden geremd, wordt verwacht dat de fluorescentietoename in de FRET-assay lager is en dat de gemeten alfa-amylase activiteit in de CNPG3-assay hoger blijft ten opzichte van onbehandelde monsters.  
De positieve controle met trypsine zal naar verwachting de sterkste afname in alfa-amylase activiteit vertonen. In de SDS-PAGE wordt verwacht dat de trypsine-behandelde monsters een lichtere band vertonen rond 55 kDa (intact alfa-amylase), en meerdere kleinere fragmenten ontstaan (overeenkomstig met de ~50 knipplaatsen) ten opzichte van onbehandelde monsters, wat verwijst op proteolytische afbraak door trypsine.

# **Werkplan**

Onderzoek of proteolytische activiteit invloed heeft op alfa-amylase activiteit in humaan speeksel.

## **Modelsysteem**

Het modelsysteem dat in dit onderzoek wordt gebruikt, bestaat uit humane speekselmonsters die zijn verzameld van gezonde proefpersonen. Speeksel is een complex biologisch mengsel dat van nature verschillende enzymen bevat. De verzamelde speekselmonsters zullen heel divers zijn, omdat ze verschillende enzymen bevatten, zoals alfa-amylase en proteasen.

## **Interventie**

Het doel van dit onderzoek is om te bepalen of proteasen de enzymactiviteit van alfa-amylase beïnvloeden in humaan speeksel. Daarnaast wordt gezuiverd alfa-amylase gebruikt als referentie- enzym en trypsine protease om de invloed van proteaseactiviteit te onderzoeken op de alfa-amylase activiteit in speeksel monsters.

Het trypsine protease komt van nature niet voor in speeksel, maar wordt exogeen toegevoegd om het effect van protease activiteit te op alfa-amylase te onderzoeken.

Het speekselmonster dat gebruikt worden zijn:

* Gecentrifugeerd speeksel (3000 x g 10 minuten, bij 4 °C)
* Ongecentrifugeerd speeksel
* Gezuiverd alfa-amylase
* Het speekselmonsters worden geïncubeerd met en zonder trypsine in verschillende concentraties en daarnaast ook met en zonder proteaseremmer (PMSF).

De variabelen in dit experiment zijn:

* Eiwit concentraties in speekselmonsters wordt bepaald bij BCA-assay.
* Proteaseremmer: trypsine soybean inhibitor (TSI).
* Controles
* Experimentiele conditie: Geïncubeerd speeksel.
* Positieve controle:
* Speeksel + trypsine = bevestiging dat proteasen alfa-amylase activiteit verlaagd.
* Speeksel + trypsine + trypsine soybean inhibitor = bevestiging dat de gemeten activiteit daadwerkelijk van trypsine is.
* Negatieve controle:
* Ongeïncubeerd speeksel alleen = nulmeting voor alfa-amylase activiteit.
* Speeksel + PMSF = controleert of endogene proteasen in speeksel invloed hebben op de alfa-amylase activiteit.
* Speeksel + buffer = controleert of de buffer geen invloed heeft op de enzymactiviteit.
* Speeksel + trypsine soybean inhibitor = controle of de proteaseremmer geen invloed heeft op de gemeten enzymactiviteit
* Speeksel + heat inactivated trypsine = controle voor niet enzymatische effect van toevoeging.
* Heat inactivated speeksel + heat inactivated trypsine = controle of er niets anders in speeksel aanwezig is wat effect heeft op de assay substraat en de assays werken.
* Trypsine alleen = controle of trypsine zelf het CNPG3 substraat afbreek.
* Buffer + reagentia = blanco controle.
* Replicaten: De assays worden op meerdere dagen uitgevoerd om de betrouwbaarheid van de resultaten te vergroten. Alle metingen worden in triplo uitgevoerd om de reproduceerbaarheid van de metingen statistisch te bevestigen.

## **Uitlezing en apparatuur**

De totale eiwitconcentratie in het speekselmonsters wordt bepaald met behulp van de BCA-assay om de alfa-amylase activiteit te normaliseren op basis van het totale eiwit. De alfa-amylase activiteit wordt gemeten met behulp van de CNPG3-assay, door afbraak van het substraat treedt een kleurverandering op die spectrofotometrisch bepaald wordt bij een golflengte van 405nm op een plate reader. De proteolytische activiteit wordt bepaald met behulp van de FRET-assay op een fluorescentie plate reader.

Meting:

* Totale eiwitconcentratie voor normalisatie
* Alfa-amylase activiteit
* Trypsine protease activiteit

Apparatuur:

* Sonificator (1 cyclus; 100% amplitude)
* Centrifuge (4 °C)
* Spectrofotometrische plate reader (BCA: 562 nm; CNPG3: 405 nm)
* Fluorescentie plate reader (exitatie 485 nm / emissie 530 nm)
* Gel-elektroforese

Monsters voorbereiding:

* Speekselmonsters worden verzameld in steriele PP buizen en bewaard bij -80 ℃.
* De speekselmonsters worden kort gesonificeerd (2x voor 5 seconden op ijs) om aggregaten en slijmresten los van elkaar te krijgen, zodat er een homogene oplossing ontstaat.
* Een deel van de speekselmonsters worden gecentrifugeerd bij 3000 x g voor 10 minuten bij 4 ℃; het supernatant wordt bewaard bij –80 ℃.
* Monsters worden verdund in 2.5x, 5x en 10x om binnen de detection limits te vallen van de assays.
* Monsters worden genormaliseerd op basis van de totale eiwitconcentratie en geïncubeerd bij 37 ℃.

## **Protocollen**

De protocollen die gebruikt worden voor de uitvoering zijn:

* Speekselverzameling assay.
* BCA-assay: om de totale eiwitconcentratie te bepalen in speekselmonsters voor normalisatie van de enzymactiviteit.
* CNPG3-assay: om de alfa-amylase activiteit te meten in speekselmonsters.
* FRET-assay: om de proteolytische activiteit te meten in speekselmonsters.
* Proteaseremmer-assay: om te bepalen als trypsine soybean inhibitor effectief is.
* SDS-PAGE: om te bevestigen als alfa-amylase daadwerkelijk wordt afgebroken door trypsine.

## **Experimentiele ontwerp**

Het experiment is opgezet om kwantitatieve data te verzamelen.

* Concentraties: verschillende concentraties trypsine en proteaseremmers
* Tijden: de duur van de metingen zal in de pilot worden geoptimaliseerd. Op basis van de literatuur wordt tussen 0 en 15 – 60 minuten onderzocht. Om te bepalen binnen welke tijd de absorptie (CNPG3) of fluorescentie (FRET) het meest lineair en reproduceerbaar is.
* Controles: specifieke negatieve en positieve controles worden meegenomen bij de verschillende assays.

De speekselmonsters worden verzameld in steriele PP buizen.

De BCA, CNPG3 en FRET-assay worden uitgevoerd in een 96-wells plaat.

De SDS-PAGE wordt uitgevoerd op polyacrylamide gel in een gel-elektroforese bak.

Data-analyse

Het experiment levert kwantitatieve data op en worden statistisch geanalyseerd met behulp van statistische toetsing zoals gemiddelde, standaarddeviatie, T-toetsen, en uitschieters worden geanalyseerd.

De verkregen data uit de BCA, CNPG3 en FRET assay worden gecorrigeerd met de bijbehorende blanco's (bijvoorbeeld PBS). Voor iedere monsterconditie worden de technische replicatie weergegeven als gemiddelde +/- standaarddeviatie. Outliers worden geïdentificeerd en verwijderd met de interkwartielafstand (IQR) methode bij datasets in vijfvoud of meer. Bij kleinere datasets wordt de Dixon Q-test gebruikt en wordt maximaal 1 datapunt verwijdert.

Voor de analyse van de BCA wordt de lineaire regressie (R²) beoordeeld, deze moet groter zijn dan 0.99. CNPG3 en FRET resultaten worden dan genormaliseerd op basis van totale eiwitconcentratie.

Het verschil tussen ongecentrifugeerd en gecentrifugeerd speeksel wordt bepaald met een ongepaarde student's t-test. Verschillen tussen donors worden bepaald met een ongepaarde ANOVA. Hiervoor moet eerst worden beoordeeld of de data normaal is verdeeld, dit kan met de Shapiro-Wilk test. Echter is dit niet mogelijk op kleine datasets.

Voor de correlatie tussen protease en alfa-amylase activiteit wordt de Spearman correlatie test toegepast, omdat de dataset te klein is voor een Pearson-correlatie.   
SDS-PAGE gegevens worden beschrijvend geanalyseerd, veranderingen in bandintensiteit kunnen eventueel kwantitatief beoordeeld worden in ImageJ.

De reproduceerbaarheid van het assay wordt aangegeven met de Coëfficiënt of Variation (CV%). Statistische significante verschillen worden aangenomen bij een p-waarde < 0.05.

## **Plannen**

Het experiment verloopt in twee fases: een pilotfase en een hoofdfase. Tijdens de pilot fase worden pilot-experiment uitgevoerd om de alfa-amylase en trypsine protease concentraties en incubatietijden te optimaliseren. Daarnaast worden de BCA-, CNPG3- en FRET-assays gevalideerd. Tijdens de hoofdfase worden alle experiment die in de pilotfase was uitgevoerd opnieuw gedaan met de optimale concentraties en incubatietijden die bepaald was bij de pilotfase. In de hoofdfase is er ook ruimte om het assay te reproduceren als het optimaliseren is gelukt (*zie tabel 1 en 2*).

**Tabel 1:** Planning pilotfase – periode A.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Datum: | Protocollen  /  experimenten: | Doel: | Condities: | Resultaat: |
| 14 oktober 2025 | Speeksel verzamelen + BCA-assay. | Speeksel verzamelen en uitvoering van de BCA-assay om de totale eiwitconcentratie in elke speekselmonster te bepalen. | - Supernatant en  Onverdunde speekselmonsters  - Gecentrifugeerd en Ongecentrifugeerd  - BCA-monsters onverdund  - In triplo  - Bij 562 nm | BCA ijklijn.  Bepaal welke verdunning van speeksel het meest geschikt is voor verdere assays. |
| 15 oktober 2025 | Alfa-amylase CNPG3-assay met speekselmonster + gezuiverd alfa-amylase als controle. | Uitvoeren met gezuiverd alfa-amylase standaarden om het assay te valideren en testen op speekselmonsters. | - Speekselmonsters 0x – 200x verdund.  - Gezuiverd alfa-amylase 125 – 1000 U/mL.  - Tijd: 20 minuten.  - In triplo  - Bij 405 nm | Bepaal welke concentratie en verdunning range het meest geschikt is. |
| 28 oktober 2025 | Speeksel verzamelen + BCA-assay. | Herhaling van speeksel verzamelen en BCA-assay om de totale eiwitconcentratie in elke speekselmonster te bepalen. | - Speekselmonsters 5x, 10x en 20x verdund.  - BCA-monsters onverdund.  - In duplo  - Bij 562 nm | BCA ijklijn.  Bepaal welke de optimale verdunning is voor het FRET-assay. |
| 29 oktober 2025 | FRET-assay met speekselmonsters. | Uitvoeren met het verzamelde speeksel om de proteolytische activiteit te meten. | -Speekselmonsters | Bepaal of het FRET-assay specifiek genoeg is. |
| 4 november 2025 | FRET-assay met speekselmonster optimaliseren en automatiseren met ClarioStar. | Proteolytische activiteit meten in geoptimaliseerde instellingen en automatische mbv ClarioStar. | -Optimaliseerde instellingen voor ClarioStar plate reader.  - Meting herhaling | Bepaal welke aanpassingen moeten worden gedaan voor vervolg FRET-assays. |
| 6 november 2025 | SDS-PAGE | Om te kijken als alfa-amylase inderdaad wordt afgebroken door trypsine. | Verschillende trypsine- en PMSF-concentratie testen. | Controle proteolytische afbraak op eiwit niveau. |

**Tabel 2:** Planning hoofdfase experimentiele uitvoering – periode B.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Week 1 | | | | |
| Datum: | **Protocollen**  **/**  **experimenten:** | **Doel:** | **Condities:** | **Resultaat:** |
| 10 november 2025 | Speeksel verzamelen + buffer/reagens maken. | Voorbereiding voor hele hoofdfase uitvoering. | -Speekselmonster in aliquots bij -80C invriezen.  - Buffers en reagens klaarmaken. | Voorbereiding. |
| 11 november 2025 | BCA-assay | Totale eiwitconcentratie in elke speekselmonster bepalen. | -Supernatant en  Onverdunde speekselmonsters  - Gecentrifugeerd en Ongecentrifugeerd  - BCA-monsters onverdund  - In triplo  - Bij 562 nm | BCA-ijklijn.  Bepaal welke verdunning van speeksel het meest geschikt is voor verdere assays. |
| Week 2 | | | | |
| 17 november 2025 | SDS-PAGE | Om te kijken als alfa-amylase inderdaad wordt afgebroken door trypsine. | Verschillende trypsine concentratie testen. | Controle proteolytische afbraak op eiwit niveau. |
| 19 november 2025 | SDS-PAGE optimaliseren/herhalen. | Om te kijken als alfa-amylase inderdaad wordt afgebroken door trypsine. | Verschillende trypsine concentratie testen. | Controle proteolytische afbraak op eiwit niveau.  Reproduceerbaarheid bevestigen. |
| Week 3 | | | | |
| 24 november 2025 | Alfa-amylase CNPG3-assay met speekselmonsters. | Uitvoeren met gezuiverd alfa-amylase standaarden om het assay te valideren. | - Speekselmonsters 0x – 200x verdund.  - Gezuiverd alfa-amylase 125 – 1000 U/mL.  - Tijd: 20 minuten.  - In triplo  - Bij 405 nm | Bepaal welke range het beste is.  Als er weinig activiteit wordt gemeten zal er moeten spiken door extra gezuiverd alfa-amylase toe te voegen aan de speekselmonsters. |
| 26 november 2025 | Alfa-amylase CNPG3-assay met speekselmonsters optimaliseren. | Uitvoeren met het verzamelde speeksel om te kijken als het goed te meten is met het assay. | - Verschillende speekselmonsters concentratie.  - In triplo | Alfa amylase activiteit bepalen van elke speekselmonsters. |
| Week 4 | | | | |
| 1 december 2025 | FRET-assay met speekselmonsters. | Uitvoeren met trypsine protease om te kijken als het assay gevoelig genoeg is voor trypsine en om te valideren. | -Verschillende trypsine concentratie.  - Controles.  - Tijd? | Bepaal als FRET specifiek genoeg is voor trypsine en als het gekozen concentratie trypsine effectief is. |
| 3 december 2025 | FRET-assay met speekselmonster optimaliseren en automatiseren met ClarioStar. | Activiteit meten van trypsine + gezuiverd alfa-amylase testen om te kijken als trypsine direct invloed heeft op alfa-amylase. | -Gezuiverd alfa-amylase + verschillende concentratie trypsine testen.  - Tijd? | Bepaal hoe snel trypsine alfa-amylase afbreekt en welke concentratie trypsine het meest effect laat zien. |
| Week 5 | | | | |
| 8 december 2025 | FRET- + CNPG3-assay in speekselmonsters. | FRET is om de trypsine protease activiteit te meten.  CNPG3 is om de alfa-amylase activiteit te meten geïncubeerd met trypsine. | Speeksel monsters incuberen met verschillende trypsine concentratie. | Vergelijk of het effect hetzelfde is bij gezuiverd alfa-amylase vs speeksel monsters.  Biologische effect gemeten van trypsine in speekselmonsters. |
| 10 december 2025 | Proteaseremmer (trypsine + soybean inhibitor) met speeksel monsters. | Om te kijken of de trypsine remmer alfa amylase beschermt tegen afbraak. | FRET- + CNPG3-assay | Heeft een proteaseremmer invloed op de activiteit. |
| Week 6 | | | | |
| 15 december 2025 | Uitloop/herhaling van experimenten die niet zijn gelukt of is het experiment reproduceerbaar. | *Nvt* | *Nvt* | *Nvt* |
| 18 december 2025 | Uitloop/herhaling van experimenten die niet zijn gelukt of is het experiment reproduceerbaar.  Data-analyse. | *Nvt* | *Nvt* | *Nvt* |

## **Materiaal en apparatuur**

Alle chemicaliën en materialen worden in een aanvraagformulier vermeld en gestuurd naar de laboratorium assistent (*zie bijlage: Materialenlijst*).

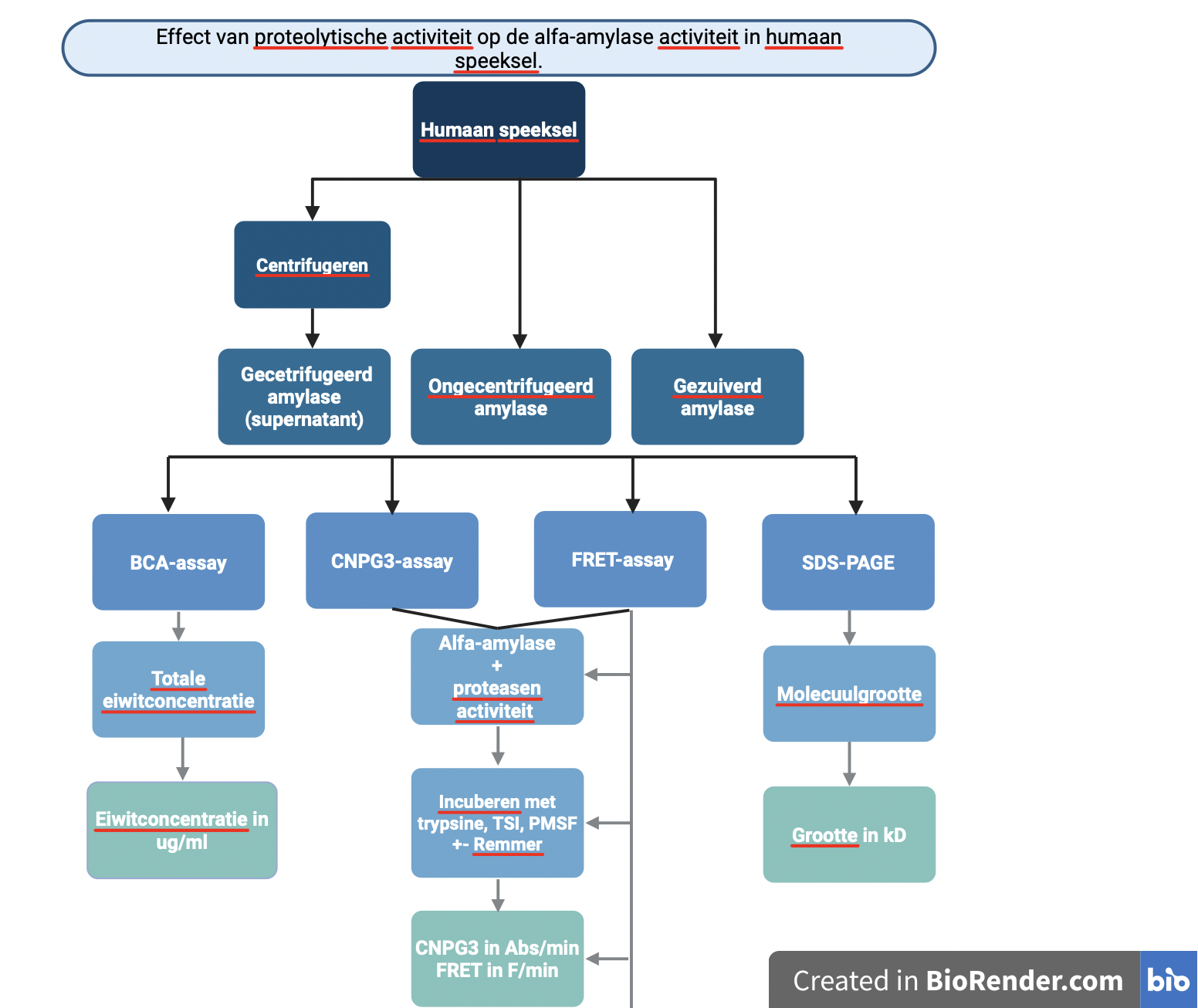
Materialen:

* Verzamelde speekselmonsters
* BCA-kit
* CNPG3-kit + substraat voor alfa-amylase activiteit
* Trypsine
* Trypsine soybean inhibitor
* PMSF
* FRET + pek054 substraat voor protease activiteit

Apparatuur:

* Vriezer (-80 °C)
* Centrifuge (4 °C)
* Incubator/Waterbad (37 °C)
* Sonificator (1 cyclus; 100% amplitude)
* Spectrofotometrische plate reader (BCA: 562 nm; CNPG3: 405 nm)
* Fluorescentie plate reader (exitatie 485 nm / emissie 530 nm)
* Gel-elektroforese (SDS-PAGE)

## **Flowchart**



**Figuur 2:** Schematische weergave van de experimentele opzet van “Het effect van proteolytische activiteit op de alfa-amylase activiteit in humaan speeksel”.

Humaan speeksel wordt op drie manieren verwerkt: gecentrifugeerd, ongecentrifugeerd en gezuiverd. De speekselmonsters worden geïncubeerd met trypsine (een specifieke serineprotease), trypsine soybean inhibitor (TSI; een specifieke proteaseremmer van trypsine) en PMSF (een serineprotease remmer met een breed werkingsspectrum).

De enzymactiviteit en eiwitconcentratie worden bepaald met behulp van verschillende assays: BCA-, CNPG3-, FRET-assays en SDS-PAGE.

# **Referenties**

Akinfemiwa, O., Zubair, M., & Muniraj, T. (2023, November 12). Amylase. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557738/>

Al-Akl, N., Thompson, R. I., & Arredouani, A. (2020). High plasma salivary α-amylase, but not high AMY1 copy number, associated with low obesity rate in Qatari adults: cross-sectional study. Scientific reports, 10(1), 17918. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74864-6>

Al Habobe, H., Haverkort, E. B., Nazmi, K., Van Splunter, A. P., Pieters, R. H. H., & Bikker, F. J. (2024). The impact of saliva collection methods on measured salivary biomarker levels. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 552, 117628. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117628>

Alhajj, M., & Babos, M. (2023, July 24). Physiology, salivation. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542251/>

Ali, N., & Nater, U. M. (2020). Salivary Alpha-Amylase as a Biomarker of Stress in Behavioral Medicine. International journal of behavioral medicine, 27(3), 337–342. <https://doi.org/10.1007/s12529-019-09843-x>

Arhakis, A., Karagiannis, V., & Kalfas, S. (2013). Salivary alpha-amylase activity and salivary flow rate in young adults. The open dentistry journal, 7, 7–15. <https://doi.org/10.2174/1874210601307010007>

De Simone, G., Devereux, R. B., Chinali, M., Best, L. G., Lee, E. T., Galloway, J. M., Resnick, H. E., & Strong Heart Study Investigators (2007). Prognostic impact of metabolic syndrome by different definitions in a population with high prevalence of obesity and diabetes: the Strong Heart Study. Diabetes care, 30(7), 1851–1856. <https://doi.org/10.2337/dc06-2152>

Denny, P., Hagen, F. K., Hardt, M., Liao, L., Yan, W., Arellanno, M., Bassilian, S., Bedi, G. S., Boontheung, P., Cociorva, D., Delahunty, C. M., Denny, T., Dunsmore, J., Faull, K. F., Gilligan, J., Gonzalez-Begne, M., Halgand, F., Hall, S. C., Han, X., Henson, B., … Fisher, S. J. (2008). The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. Journal of proteome research, 7(5), 1994–2006. <https://doi.org/10.1021/pr700764j>

Didilescu, A. C., Lazu, A., Vlădan, C., Scheau, C., Dan Popa, L., Șurlin, P., Kaman, W. E., & Brand, H. S. (2022). Salivary Assessments in Post-Liver Transplantation Patients. Journal of clinical medicine, 11(11), 3152. <https://doi.org/10.3390/jcm11113152>

Engelen, L., van den Keybus, P. A., de Wijk, R. A., Veerman, E. C., Amerongen, A. V., Bosman, F., Prinz, J. F., & van der Bilt, A. (2007). The effect of saliva composition on texture perception of semi-solids. Archives of oral biology, 52(6), 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.11.007>

ExPASy. (z.d.). PeptideCutter [Web tool]. Swiss Institute of Bioinformatics. Geraadpleegd 29 oktober 2025, van <https://web.expasy.org/peptide_cutter/>

Erta G, Gersone G, Jurka A, Tretjakovs P. Salivary α-Amylase as a Metabolic Biomarker: Analytical Tools, Challenges, and Clinical Perspectives. Int J Mol Sci. 2025 Jul 30;26(15):7365. doi: 10.3390/ijms26157365. PMID: 40806495; PMCID: PMC12347534.

Fábián, T. K., Beck, A., Fejérdy, P., Hermann, P., & Fábián, G. (2015). Molecular mechanisms of taste recognition: considerations about the role of saliva. International journal of molecular sciences, 16(3), 5945–5974. <https://doi.org/10.3390/ijms16035945>

Habobe, H. A., Pieters, R. H. H., & Bikker, F. J. (2025). Investigating the Salivary Biomarker Profile in Obesity: A Systematic Review. *Current obesity reports*, *14*(1), 25. <https://doi.org/10.1007/s13679-025-00618-y>

Kaman, W. E., Voskamp-Visser, I., de Jongh, D. M., Endtz, H. P., van Belkum, A., Hays, J. P., & Bikker, F. J. (2013). Evaluation of a D-amino-acid-containing fluorescence resonance energy transfer peptide library for profiling prokaryotic proteases. Analytical biochemistry, 441(1), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.06.015>

Kim, H. J., Park, D. H., Han, S. H., & Kim, S. Y. (2024). Optimal storage time and temperature of human oral samples to minimize microbiome changes: A scoping review. The Japanese dental science review, 60, 220–231. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2024.05.001>

Marques E, Simões C, Pérez-Jiménez M, E Silva FC, Lamy E. Start looking at saliva: Food Res Int. 2025 May;209:116301. doi: 10.1016/j.foodres.2025.116301. Epub 2025 Mar 20. PMID: 40253202.

Marshall, T., & Williams, K. M. (1987). Electrophoresis indicates protein loss on centrifugation of whole saliva. Clinical chemistry, 33(7), 1263–1264.

Noubiap, J. J., Nansseu, J. R., Lontchi-Yimagou, E., Nkeck, J. R., Nyaga, U. F., Ngouo, A. T., Tounouga, D. N., Tianyi, F. L., Foka, A. J., Ndoadoumgue, A. L., & Bigna, J. J. (2022). Geographic distribution of metabolic syndrome and its components in the general adult population: A meta-analysis of global data from 28 million individuals. Diabetes research and clinical practice, 188, 109924. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2022.109924>

Pigeot, I., & Ahrens, W. (2025). Epidemiology of metabolic syndrome. Pflugers Archiv : European journal of physiology, 477(5), 669–680. <https://doi.org/10.1007/s00424-024-03051-7>

Protein Data Bank in Europe [PDBe]. (2022, 10 maart). *The wonders of salivary amylase.* ebi.ac.uk. Geraadpleegd op 12 oktober, 2025, van <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/articles/wonders-salivary-amylase>

Schipper, R. G., Silletti, E., & Vingerhoeds, M. H. (2007). Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. Archives of oral biology, 52(12), 1114–1135. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.06.009>

Skoluda, N., Dhrami, I., & Nater, U. M. (2020). Factors contributing to stability and instability in alpha-amylase activity in diluted saliva samples over time. Psychoneuroendocrinology, 121, 104847. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104847>

Soto-Sierra, L., Stoykova, P., & Nikolov, Z. L. (2018). Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. Algal research, 36, 175-192.

Turk, B., Turk, D., & Turk, V. (2012). Protease signalling: the cutting edge. The EMBO journal, 31(7), 1630–1643. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.42>

Vitorino, R., Guedes, S., Manadas, B., Ferreira, R., & Amado, F. (2012). Toward a standardized saliva proteome analysis methodology. Journal of proteomics, 75(17), 5140–5165. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.045>

# **Bijlagen**

## **Materialenlijst**

|  |
| --- |
| Chemicaliën en overige materialen: |
| Alfa-amylase |
| BCA (bicinchononic acid) |
| BSA-standaard 1 mg/mL |
| Calciumacetaat |
| CNPG-substraat (10 mM) |
| Coomassie stain 1x BioSafe methanol vrij |
| DMSO (dimethylsulfoxide) |
| Eiwit marker (Precision plus protein dual color) |
| FRET substraat PEK-054 (800 uM) |
| Kaliumthiocyanaat |
| Kopersulfaat 4% |
| Laemmli 3x |
| MES buffer |
| Natriumchloride |
| PBS 1x sterile (pH 7.0) |
| PMSF |
| SDS 10% |
| SDS-PAGE ready gel, Tris-HCl, 10%, 15 wells |
| TCA-buffer (50%) |
| Tris-glycine (TG) 10x |
| Trypsine |
| Trypsine soybean inhibitor |

## **Protocol: Speeksel afname**

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

**Hypothese:** Door op een gestandaardiseerde wijze speeksel te verzamelen wordt vastgesteld wat de invloed is van trypsine protease op alfa-amylase in speeksel.

**Principe:** Dit protocol is zo opgezet om speeksel te verzamelen en verwerken waar zowel alfa-amylase activiteit als protease activiteit gemeten kan worden. Speeksel bevat veel componenten waaronder slijm, bacteriën en enzymen. Deze samenstelling kan snel veranderen en is gevoelig voor de gebruikte methoden.   
In dit protocol wordt gebruikt gemaakt van passieve ongestimuleerd drooling-methode, deze methode heeft het minst invloed op de eiwitconcentraties. Centrifugatie heeft voor- en nadelen, deze twee condities worden beide meegenomen: unclarified (UNC) waarbij het speeksel matrix intact blijft en clarified (CLAR) waarbij celresten, voedselresten en bacteriën verwijderd worden. Alle monsters worden zo snel mogelijk ingevroren bij -80°C, om de enzym(activiteit) en andere componenten stabiel blijven voor verdere analyse.

**Materiaal & Methode**

*De speeksel afname wordt uitgevoerd met behulp van wetenschappelijke bronnen (zie referenties).*

**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)
* Vriezer -80°C

**Methode**

**Aandachtspunten:**

* Werk snel
* Werk koud en eventueel te ontdooien materiaal laten ontdooien op ijs
* Werk steriel
* 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.*

**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\_aliquottype) en laat ze op temperatuur komen op ijs.  
    **LET OP:** Label op de buis, niet op de dop
3. Neem aliquots en label ze volgens tabel 1, laat deze ook in een bak ijs op temperatuur komen  
    *Aliquot 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 bijhouden*  
      
   *Tabel 1. Verdeling en label epjes*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Aliquot** | Native\_UNC | Pellet-Native\_CLAR | Supernatant-Native\_CLAR |
| **Naam** | DonorID\_NU | Donor\_ID\_PNC | Donor\_ID\_SNC |
| **Aantal** | X | X | X |

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 minimaal X mL 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.
4. Sonificeer het speeksel tweemaal voor 5 seconden, houdt koud

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

1. Meng zacht door kantelen  
    **LET OP:** geen vortex
2. Voeg native speeksel toe aan de aliquots zoals aangegeven in tabel 2.

*Tabel 2. Aliquot soort verdeling epjes*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Hoeveelheid** | **Soort sample** | **Native speeksel** |
| **3** | **Native\_UNC** (native speeksel unclarified ongecentrifugeerd) | X µL |
| **3** | **Pellet-Native\_CLAR** (native speeskel clarified gecentrifugeerd) | X + 50 µL |

*Iets meer volume in de PNC aliquots om voor het supernatant te compenseren voor*  *de*  
 *verloren pellet.*

***Centrifugatie (voor native\_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 proberen voorzichtig op en neer te pipeteren en anders kort vortexen (1-2 sec)*
2. Pipetteer supernatant (geen pellet) van P-Native samples naar S-Native aliquot.   
   **LET OP:** Noteer de tijden m.b.v. een timer.
3. ***Indien pellet wordt getest:*** *Resuspendeer de pellet in de P-Native aliquots in 50 µL PBS pH 7.0, meng met de pipetpunt voorzichtig en tik de pellet los.*

***Opslag***

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.

**Veiligheid:** De veiligheid worden toegepast volgens de veiligheidsregels van de laboratoria van het ILC zoals beschreven is op Canvas. (*zie:*[*https://canvas.hu.nl/courses/49813/discussion\_topics/310136*](https://canvas.hu.nl/courses/49813/discussion_topics/310136)*)*

## **Protocol: BCA-assay**

**Doel:** Het doel van dit protocol is om de totale eiwitconcentratie van de speekselmonsters te bepalen met behulp van de Bicinchoninezuur (BCA) methode.

**Subdoel:** Een subdoel binnenin dit protocol is te achterhalen wat het verschil in totale eiwitconcentratie is in de CLAR- vs UNC-samples (gecentrifugeerd vs ongecentrifugeerd) en om te achterhalen of dit overeenkomt met de hoeveelheid eiwit in de pellet.

**Hypothese:** De verwachting is dat na centrifugatie de totale eiwitconcentratie in de supernatant is verlaagd en dit verlies zou overeenkomen met de hoeveelheid eiwit concentratie die in de pellet zit.

**Principe:** Eiwitten reduceren alkalisch Cu2+ tot Cu1+ door eiwit in een alkalisch medium met een gevoelige en selectieve detectie van Cu1+ met behulp van een reagens die BCA bevat.

De paarskleuring wordt gevormd door 2 BCA moleculen met één koper-ion en vertonen een sterke absorptie bij 562 nm die overeenkomt met een eiwitconcentratie over een werkt breed van 20 – 200 µg/mL. Met de totale eiwitconcentraties kan voor de vervolg experimenten berekent worden hoeveel materiaal nodig is. Verder kan de totale eiwitconcentratie gebruikt worden om verschillen tussen donor te normaliseren.

**Materiaal & Methode**

De BCA-assay wordt uitgevoerd met behulp van onderstaande bronnen.

*SigmaAldrich:* [*https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-quantitation/protein-determination-by-the-bicinchoninic-acid-bca-method?srsltid=AfmBOorjgel4g2TPyZc3wTjgxtXBdL0EyqNxrIpazMMBVOgYwONSVUFp*](https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-quantitation/protein-determination-by-the-bicinchoninic-acid-bca-method?srsltid=AfmBOorjgel4g2TPyZc3wTjgxtXBdL0EyqNxrIpazMMBVOgYwONSVUFp)

*ThermoFischer:*[*https://documents.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0011430Pierce\_BCA\_Protein\_Asy\_UG.pdf*](https://documents.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0011430Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf)

*Canvas pagina van PRBMR5V-24:* [*https://canvas.hu.nl/courses/49813/modules*](https://canvas.hu.nl/courses/49813/modules)

**Materialen**

* BCA- buffer oplossing = reagens A
* Cu2+ sulfaatoplossing (4%) = reagens B
* BSA-eiwit standaardoplossing; 1000 µg/mL
* PBS pH 7.0
* Speeksel aliquots monsters
* Spectrofotometer
* Reageerbuis + reageerbuis rek
* 8 Eppendorf epjes + epjeshouder
* Pipetten en steriele filtertips
* 96 wells plaat met vlakke bodem
* ClarioStar spectrofotometrische platereader; 562 nm

**Methode**

*Reageerbuis methode: 0.1 mL van eiwitmonster à verhouding monster : reagens (1:20)*  
*Microtiterplalat methode: 10-25 µL eiwitmonster à verhouding monster : reagens (1:8)*  
*Verdunningsschema voor de BCA standaard = 1000 µg/mL.*

1. Laat de speeksel aliquots alvast ontdooien in een bak met ijs.
2. Zet 8 epjes klaar voor de verdunningsreeks van de BSA-stock oplossing, pipeteer volgens tabel 1 een seriële verdunningsreeks.

**LET OP:** Meng goed door op en neer te pipetteren voordat je een deel van het volume overzet.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| *Concentratie BSA (* *µg/mL)* | *1000* | *800* | *600* | *400* | *200* | *100* | *50* |
| *Stockoplossing BSA 1000 µg/mL* | *500* |  |  |  |  |  |  |
| *Vorige verdunning* |  | *320* | *300* | *200* | *150* | *150* | *150* |
| *PBS* | *0* | *80* | *100* | *100* | *150* | *150* | *150* |
| *Tussenvolume* | *500* | *400* | *400* | *300* | *300* | *300* | *300* |
| *Eindvolume* | *180* | *100* | *200* | *150* | *150* | *150* | *300* |

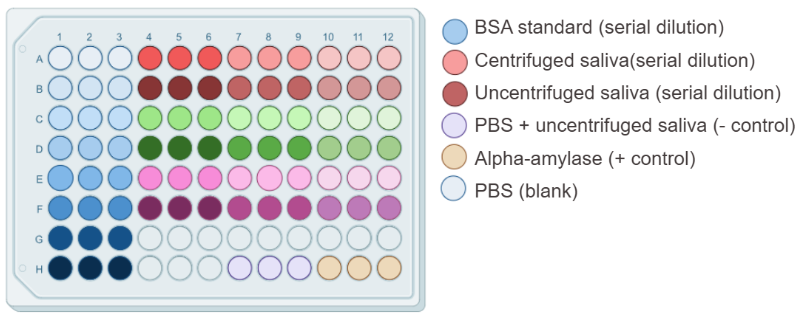
***Tabel 1:*** *Pipetteerschema van BCA-standaarden.*

1. Maak 50:1 het werkreagens (WR). Door 450 µL CuSO4 in 22.5 m BCA-oplossing te mengen.
2. 96-wells plaat verhouding van monster : WR is 1:8.

Dus pipetteer 25 µL sample of standaard per well.

1. Pipetteer 25 µL van de BSA standaard reeks elke well volgens de 96 wells plaat indeling (*zie figuur 1*).

**LET OP:** Ontdooid materiaal eerst goed mengen door voorzichtig op en neer te pipetteren.  
**LET OP:** Voorkom luchtbelvorming met reverse pipetting techniek (druk door tot 2e stop, inpipetteren, uitpipetteren tot 1e stop).

**Figuur 1:** Indeling van de 96-wells plaat voor de BCA-assay.

1. Verdun het speeksel serieel volgens tabel 2.  
   **LET OP**: Ontdooid materiaal eerst goed mengen door voorzicghtig op en neer te pipetteren.  
     
   **Tabel 2:** Pipetteerschema van *seriële* verdunning van speekselmonsters.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Speeksel verdunning | 5x | 10x | 20x |
| Speekselmonsters | 200 |  |  |
| Vorige verdunning |  | 500 | 500 |
| PBS in µL | 800 | 500 | 500 |
| Volume in µL | 1000 | 1000 | 1000 |
| Eind volume in µL | 500 | 500 | 1000 |

1. Pipetteer 25 µL van de samples in elke well volgens de 96 wells plaat indeling (zie figuur 1).   
   **LET OP:** Voorkom luchtbelvorming met reverse pipetting techniek (druk door tot 2e stop, inpipetteren, uitpipetteren tot 1e stop).
2. Pipetteer 200 µL werkreagens toe aan elke wel en meng door op en neer te pipeteren, gebruik multichannel pipet.  
   **LET OP:** Voorkom luchtbelvorming met reverse pipetting techniek (druk door tot 2e stop, inpipetteren, uitpipetteren tot 1e stop).
3. Incubeer voor 30 minuten bij 37 °C in de ClarioStar.
4. Breng de plaat op kamertemperatuur voor 2 – 5 minuten buiten de ClarioStar en zet de temperatuur instelling uit.
5. Stel de spectrofotometer bij een absorptie van 562 nm.
6. Meet de 96-wells plaat in de reader en sla de ruwe data op.

**Data-analyse: interactief R script**  
Sla de ruwe data op als csv file met enkel de Wells en Abs. Run het [R script](https://github.com/oumaimaanbari/speeksel_BMR) en controleer de ijklijn en absorpties. Kies de verdunning die het mooist binnen de ijklijn valt, maar controleer de spreiding. Als laats kan gekozen worden om de eiwitconcentratie op te slaan in het donor bestand. Noteer indien nodig het bijbehorende gegenereerde donor nummer voor vervolg experimenten. 1 Well plaat kan gebruikt om 3 donors te testen, zie lay-out (figuur 1).

1. Trek de gemiddelde meting van de blanco af van alle andere monsters.
2. Maakt in excel een standaardcurve door de gemiddelde blanco gecorrigeerd voor elke BCA standaard uit te zetten tegen de concentratie in µg/mL.
3. Gebruikt de standaardcurve om de eiwitconcentratie te bepalen in elke onbekende monster.
4. Vergelijk de triplo condities met elkaar voor spreiding.

**Veiligheid:**

* BCA-reagens B

A close-up of a sign

Description automatically generated

H318 - Veroorzaakt ernstig oogletsel  
H400 - Zeer giftig voor in het water levende organismen  
H411 - Giftig voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen

P280 - Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming dragen  
P273 - Voorkom lozing in het milieu

P305 + P351 + P338 - BIJ CONTACT MET DE OGEN: voorzichtig afspoelen met water gedurende eenaantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen  
P391 - Gelekte/gemorste stof opruimen  
P310 - Onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM of een arts raadplegen

P501 - Inhoud/verpakking afvoeren naar een erkende afvalverwerkingsinstallatie

***Contact***

* Inademing: Frisse lucht inhaleren
* Huid: Overvloedig water wassen
* **Ogen**: voorzichtig afspoelen met water gedurende eenaantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen
* Inslikken: Bij onwel gevoel, arts raadplegen en antigifcentrum

***Afvalverwerking:*** Hoort bij anorganisch basisch afval (koperhoudend afval). Wordt gemixt met reagent A en andere samples, afvalvat blijft hetzelfde en resten in ziekenhuisafvalvat. **NIET** door de riolering.

***Maatregelen:*** Reagens B met handschoenen.

## **Protocol: CNPG3-assay**

**Doel:** Het doel van dit protocol is om de alfa-amylase activiteit in de speeksel monsters te bepalen met behulp van spectrofotometische bepaling op basis van het CNPG3 substraat.

De absorptie wordt gemeten bij 405 nm in () en omgerekend naar Units/liter voor de enzymactiviteit.

**Hypothese:** De verwachting is dat in humaan speeksel wordt alfa-amylase afgebroken door proteasen die aanwezig zijn in het speeksel, waardoor de enzymactiviteit verlaagd wordt.

**Principe:** Alfa-amylase hydrolyseert 2-chloor-p-nitrofenyl-a-D-maltotrioside (CNPG3) om 2-chloor-nitrofenol vrij te maken en vormt 2-chloor-pnitrofenyl-a-D-maltoside (CNPG2), maltotriose (G3) en glucose (G) (*zie figuur 1*). De absorptie van de toenemende snelheid wordt gemeten bij 405 nm en is evenredig met de hoeveelheid alfa-amylase activiteit in het monster.

A black text with a black arrow pointing to the center

Description automatically generated

***Figuur 1:*** Reactievergelijking van de hydrolyse van CNPG3 substraat door alfa-amylase.

**Materiaal & Methode**

De CNPG3-assay wordt uitgevoerd met behulp van onderstaande bronnen.

*Biolabo:* [*https://www.biolabo.fr/pdfs/noticesE/biochimieE/AT-99523.pdf*](https://www.biolabo.fr/pdfs/noticesE/biochimieE/AT-99523.pdf)

*PointeScientific:*[*https://www.corelabsupplies.com/assets/pdf/package%20inserts/Open%20Channel/A7564%20Amylase.pdf*](https://www.corelabsupplies.com/assets/pdf/package%20inserts/Open%20Channel/A7564%20Amylase.pdf)

**Materialen**

* CNPG3-kit
* R1 buffer oplossing:
* Calciumacetaat 6 mmol/L
* MES buffer 100 mol/L (pH 6.0)
* R2 substraat oplossing:
* CNPG3 2.25 mmol/L
* Caliumthiocyanaat 900 mmol/L
* NaCl 350 mmol/L
* PBS buffer
* Gezuiverd alfa-amylase
* Trypsine protease
* Speeksel monsters
* Pipetten
* Reageerbuis + reageerbuis rek
* Timer
* Warmteblok bij 37°C
* Spectrofotometer; 405 nm
* Speekselmonsters
* Experimentiele conditie: Speeksel
* Positieve controle:   
  Gezuiverd alfa-amylase   
  Speeksel + trypsine
* Negatieve controle:
* Ongeïncubeerd speeksel alleen
* Speeksel + PMSF
* Speeksel + trypsine + trypsine soybean inhibitor
* Buffer + reagentia

**Methode**

**Voorbereiding van het reagens**

1. Bereid R1 buffer en R2 substraat.  
   **LET OP:** Gebruik eventueel aluminiumfolie om het R2 reagent te bedekken.  
     
   *R1:   
   NaCl 350 mmol/l   
   Calcium acetate 6.0 mmol/l   
   Potassium thiocyanate 900 mmol/l   
     
   R2:   
   2-chloro-4-nitrophenyl-α–Dmaltotrioside (CNPG3 ) 2.25 mmol/l* ***(licht gevoelig)*** *Buffer MES pH = 6 at 25 °C 100 mmol/l*
2. Meng R1 buffer en R2 substraat samen.
3. Wacht tot het substraat is volledig opgelost.
4. Zet op ijs voor gebruikt.

**Voorbereiding van speekselmonsters**

1. Speeksel monster totale eiwitconcentratie is bekend. Verdun dit zodat de totale eiwitconcentratie in de well gelijk is aan *X µg/mL*.
2. Meng door op en neer te pipeteren (niet schudden).

**Activiteit meten**

1. Verwarm *X mL* CNPG3 reagens bij 37 °C voor 5 minuten.
2. Pipetteer 4 µL speekselmonster en controles toe.
3. Pipetteer in elke well 196 µL CNPG3 reagens toe, gebruik de multi-channel.  
   *Bij toevoeging van het verwarmde reagens zal het speeksel ook meteen op temperatuur komen (de verhouding is immers klein).*
4. Start de kinetische CNPG3 assay in de ClarioStar bij 37 °C om de minuut.
5. Herhaal de meting om de 1 minuut weer gedurende 20 minuten voor een betrouwbare kinetiek meting in ()
6. Vermenigvuldig het antwoord met 3178 om in Units/Liter (U/L) om te zetten.

*Formule: U/L = Abs./min x 3178*

**Data-analyse:**  
*Ook voor de CNPG3 kan eventueel een automatische data-analyse worden opgezet.*

De Abs./min wordt berekenen met behulp van onderstaande formule en alle metingen worden gecorrigeerd door de blanco af te trekken.

Abs./min = absorptieverschil per minuut

TV = totale assay volume in mL

SV = sample volume in mL

MMA = millimolaire absorptie van 2-chloro-p-nitrofenolA white background with black text

Description automatically generated

LP = licht golflengte (1 cm)

Omrekenen van Units/mL naar Units/liter = vermenigvuldigen met 1000

Formule voor het berekenen van -amylase in sample:

**Veiligheid:** De veiligheid worden toegepast volgens de veiligheidsregels van de laboratoria van het ILC zoals beschreven is op Canvas. (*zie:*[*https://canvas.hu.nl/courses/49813/discussion\_topics/310136*](https://canvas.hu.nl/courses/49813/discussion_topics/310136)*)*

**Veiligheid:**

* Potassium thiosyanate



H302 + H312 + H332 Schadelijk bij inslikken, bij contact met de huid en bij inademing.   
H318 Veroorzaakt ernstig oogletsel.   
H412 Schadelijk voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen.   
  
P273 Voorkom lozing in het milieu.   
P280 Draag beschermende handschoenen/ beschermende kleding/ oogbescherming/ gelaatsbescherming.   
P301 + P312 NA **INSLIKKEN**: bij onwel voelen een ANTIGIFCENTRUM/ arts raadplegen.   
P302 + P352 + P312 BIJ CONTACT MET DE **HUID**: met veel water wassen. Bij onwel voelen een ANTIGIFCENTRUM/ arts raadplegen.   
P304 + P340 + P312 NA **INADEMING**: de persoon in de frisse lucht brengen en ervoor zorgen dat deze gemakkelijk kan ademen. Bij onwel voelen een ANTIGIFCENTRUM/ arts raadplegen.   
P305 + P351 + P338 BIJ CONTACT MET DE **OGEN**: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen.   
  
Additionele gevareninformatie (EU) EUH032 Vormt **zeer giftig gas in contact met zuren**.

***Afvalverwerking:*** Hoort bij anorganisch basisch afval. Wordt gemixt met CNPG3 reagens.

***Maatregelen:*** Hanteren met handschoenen

* Trypsine



H315 Veroorzaakt huidirritatie.

H319 Veroorzaakt ernstige oogirritatie.

H334 Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken.

H335 Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken.

P261 Inademing van stof vermijden.

P264 Na het werken met dit product de huid grondig wassen.

P271 Alleen buiten of in een goed geventileerde ruimte gebruiken.

P280 Draag beschermende handschoenen/ oogbescherming/ gelaatsbescherming.

P302 + P352 BIJ CONTACT MET DE **HUID**: met veel water wassen.

P305 + P351 + P338 BIJ CONTACT MET DE **OGEN**: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen.

***Afvalverwerking:*** Hoort bij organisch halogeenarm afval.

***Maatregelen:*** Hanteren met handschoenen en in zuurkast

* Trypsin soybean inhibitor



H317 Kan een allergische huidreactie veroorzaken.

H334 Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken.

P261 Inademing van stof vermijden.

P272 Verontreinigde werkkleding mag de werkruimte niet verlaten.

P280 Draag beschermende handschoenen.

P284 Adembescherming dragen.

P302 + P352 BIJ CONTACT MET DE **HUID**: met veel water wassen.

P333 + P313 Bij huidirritatie of uitslag: een arts raadplegen.

***Afvalverwerking:*** Hoort bij organisch halogeenarm afval.

***Maatregelen:*** Hanteren met handschoenen en in zuurkast.

* PMSF



H301 Giftig bij inslikken.

H314 Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel.

P260 Stof niet inademen.

P280 Draag beschermende handschoenen/ beschermende kleding/ oogbescherming/ gelaatsbescherming/ gehoorbescherming.

P301 + P310 + P330 NA **INSLIKKEN**: Onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM/ arts raadplegen. De mond spoelen.

P303 + P361 + P353 BIJ CONTACT MET DE **HUID** (of het haar): verontreinigde kleding onmiddellijk uittrekken. Huid met water afspoelen.

P304 + P340 + P310 NA **INADEMING**: de persoon in de frisse lucht brengen en ervoor zorgen dat deze gemakkelijk kan ademen. Onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM/ arts raadplegen.

P305 + P351 + P338 + P310 BIJ CONTACT MET DE **OGEN**: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen. Onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM/ arts raadplegen.

***Afvalverwerking:*** Hoort bij anorganisch basisch afval. **NIET** mengen met zuren.

***Maatregelen:*** Hanteren met handschoenen en in zuurkast.

## **Protocol: FRET-assay**

**Doel:** Het doel van dit protocol is om de proteolytische activiteit in humaan speeksel te meten met behulp van een FRET peptide substraat.

**Hypothese:** De verwachting is dat hoe hoger de gemeten proteolytische activiteit, hoe sterker trypsine protease alfa-amylase afbreekt in speekselmonsters.

**Principe:** Bij FRET wordt PEK-054 fluorescerend gelabeld peptide substraat gebruikt. Dit is een peptide van 20 aminozuren met een fluorescerende donor (FITC) aan de N-terminus en een quencher (KDbc) aan de C-terminus. In speeksel wordt de peptide op één van de vele knipplaatsen gehydrolyseerd, de donor van de quencher wordt gescheiden. Hierdoor neemt de fluorescentie toe en is deze kinetisch te meten. Het substraat biedt een brede detectie van proteasen en is daarmee geschikt om de algehele proteolytische capaciteit van ongecentrifugeerd en gecentrifugeerd speeksel te meten.

**Materiaal & Methode**

De FRET-assay wordt uitgevoerd met behulp van wetenschappelijke bronnen (zie referenties).

**Materialen**

* FRET-peptide substraat stockoplossing
* Zwarte 96 well plate
* Fluorescent microplate reader (ex 485 nm / em 530 nm)
* DMSO 100%
* Experimentiele conditie:   
  Speekselmonsters
* Positieve controle:   
  Trypsine 10000 BAEE units per mg  
  Speeksel + trypsine
* Negatieve controle:  
  Speeksel + PMSF

Speeksel + trypsine + trypsine soybean inhibitor

Buffer + reagentia

* Aluminiumfolie

**Methode**

1. Leg een bak met ijs klaar voor de speekselaliquots en het FRET substraat, laat deze ontdooien op ijs.
2. Los 1 mg trypsine op in 1 mL 1 mM HCl, dit is 10000 BAEE units.
3. Maak in 1 epje de verdunning van *X U/mL*.
4. Los het FRET-peptide substraat op in 100% DMSO tot een concentratie van 416 μM.  
   Eindconcentratie van het peptide in de assay: 16 μM.  
   **LET OP:** Houdt donker met aluminiumfolie en koud.  
   **LET OP:** Gevroren materiaal eerst goed mengen doorvoorzichtig op en neer te pipetteren.
5. Voeg van elk speeksel sample 50 µL toe wat gelijk staat aan een concentratie van *X µg/mL* per well van een zwarte 96-well plaat.
6. Voeg 2 μL van elk FRET-peptidesubstraat toe aan de corresponderende welletjes, gebruik de multichannel.  
   **LET OP:** Houdt het substraat en de plaat zo veel mogelijk donker met aluminiumfolie
7. Meet de fluorescentie elke 2 minuten met de ClarioStar microplaatlezer die op 37 ℃ is ingesteld.

**Data-analyse**  
*Ook voor de FRET kan eventueel een automatische data-analyse worden opgezet.*

Bereken de protease-activiteit als fluorescentie per minuut (F/min).

Definieer positieve protease-activiteit als F/min > 5.

**Veiligheid:** De veiligheid worden toegepast volgens de veiligheidsregels van de laboratoria van het ILC zoals beschreven is op Canvas. (*zie:*[*https://canvas.hu.nl/courses/49813/discussion\_topics/310136*](https://canvas.hu.nl/courses/49813/discussion_topics/310136)*)*

* Trypsine



H315 Veroorzaakt huidirritatie.

H319 Veroorzaakt ernstige oogirritatie.

H334 Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken.

H335 Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken.

P261 Inademing van stof vermijden.

P264 Na het werken met dit product de huid grondig wassen.

P271 Alleen buiten of in een goed geventileerde ruimte gebruiken.

P280 Draag beschermende handschoenen/ oogbescherming/ gelaatsbescherming.

P302 + P352 BIJ CONTACT MET DE **HUID**: met veel water wassen.

P305 + P351 + P338 BIJ CONTACT MET DE **OGEN**: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen.

***Afvalverwerking:*** Hoort bij organisch halogeenarm afval.

***Maatregelen:*** Hanteren met handschoenen en in zuurkast

* Trypsin soybean inhibitor



H317 Kan een allergische huidreactie veroorzaken.

H334 Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken.

P261 Inademing van stof vermijden.

P272 Verontreinigde werkkleding mag de werkruimte niet verlaten.

P280 Draag beschermende handschoenen.

P284 Adembescherming dragen.

P302 + P352 BIJ CONTACT MET DE **HUID**: met veel water wassen.

P333 + P313 Bij huidirritatie of uitslag: een arts raadplegen.

***Afvalverwerking:*** Hoort bij organisch halogeenarm afval.

***Maatregelen:*** Hanteren met handschoenen en in zuurkast.

* PMSF



H301 Giftig bij inslikken.

H314 Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel.

P260 Stof niet inademen.

P280 Draag beschermende handschoenen/ beschermende kleding/ oogbescherming/ gelaatsbescherming/ gehoorbescherming.

P301 + P310 + P330 NA **INSLIKKEN**: Onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM/ arts raadplegen. De mond spoelen.

P303 + P361 + P353 BIJ CONTACT MET DE **HUID** (of het haar): verontreinigde kleding onmiddellijk uittrekken. Huid met water afspoelen.

P304 + P340 + P310 NA **INADEMING**: de persoon in de frisse lucht brengen en ervoor zorgen dat deze gemakkelijk kan ademen. Onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM/ arts raadplegen.

P305 + P351 + P338 + P310 BIJ CONTACT MET DE **OGEN**: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen. Onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM/ arts raadplegen.

***Afvalverwerking:*** Hoort bij anorganisch basisch afval. **NIET** mengen met zuren.

***Maatregelen:*** Hanteren met handschoenen en in zuurkast.

## **Protocol: SDS-PAGE**

**Doel:** Het doel van dit protocol is om te bevestigen of trypsine protease daadwerkelijk alfa-amylase afbreekt in speekselmonsters met behulp van SDS-PAGE gel-elektroforese.

**Hypothese:** De verwachting is dat trypsine alfa-amylase afbreek, waardoor de bandjes worden verzwakt en zijn zichtbaar als kleinere fragmenten. Alfa-amylase heeft een molecuulmassa van 55 kDa en trypsine heeft een molecuulmassa van 23 kDa.

**Principe:** Bij SDS-PAGE worden eiwitten geëlectroforeerd door een polyacrylamide (PAA) gel die verticaal tussen twee glasplaten zit. De eiwitten worden eerst gedenatureerd m.b.v. een reducerend agens (meestal beta-mercaptoethanol of DTT) en homogeen negatief geladen m.b.v. sodium dodecyl sulfate (SDS). Hierdoor wordt het loopgedrag van de eiwitten tijdens de electroforese alleen bepaald door de lengte van de eiwitten en niet door de vorm of de lading (afhankelijk van hoeveel positief of negatief geladen aminozuren een eiwit bezit, heeft het eiwit van zichzelf meer of minder positieve- dan wel negatieve lading).

**Materiaal & Methode**

De SDS-PAGE wordt uitgevoerd met behulp van onderstaande bronnen.

*Canvas pagina van PRBMR5V-24:* [*https://canvas.hu.nl/courses/49813/modules*](https://canvas.hu.nl/courses/49813/modules)

**Materialen**

* Speekselmonsters
* Controle monsters: gezuiverd alfa-amylase
* Kant en klare polyacrylamide gel (12%, 10 wells).
* Tris/glycine (TG) 10X (0,25 M Tris; 1,92 M glycine)
* Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) stock, 10%
* Laemmli sample buffer 3 X conc. (-20°C):
* Tris/HCl pH 6,8; 0,188 M
* SDS 6%
* Glycerol 30%
* Beta-mercaptoethanol 15mM
* Broomfenolblauw 0.03%
* Eiwit marker
* Biorad Bio-Safe Coomassie G-250 Stain
* Gel-elektroforese
* Shaker

**Methode**

*Draag gedurende de hele procedure handschoenen. Ongepolymeriseerd acrylamide is neurotoxisch.*

1. Pipeteer vanuit de eiwitfracties 20 µL over in een nieuw 1,5 mL reactievaatje en voeg hieraan 10 µL 3X Laemmli buffer toe.

1. Verhit de monsters gedurende 10 minuten bij 100°C in een thermoblok.

1. Prepareer 1 liter electroforesebuffer: 25 mM Tris; 192 mM glycine; 0,01 % SDS, vanuit de 10X TG-buffer door deze te verdunnen met demiwater. Voeg zelf SDS toe uit 10% stock.

1. Verwijder de groene strip aan de onderkant van de gel. De gel zit tussen een laag- en een hoog plastic plaatje. Klem de gel in de houder, zodat het lage plaatje aan de binnenkant zit. Zorg dat het groene rubber goed aansluit. Je kunt 2 gelen in een houder doen, of één gel en aan de andere kant een plastic schot. Zo ontstaat een “bakje” waarin buffer kan worden gedaan. Test even of het bakje niet lekt.

1. Hang de houder in de grote elektroforesebak en vul het binnenste compartiment (het bakje) volledig met buffer. Verwijder vervolgens de kam uit de slotjes.

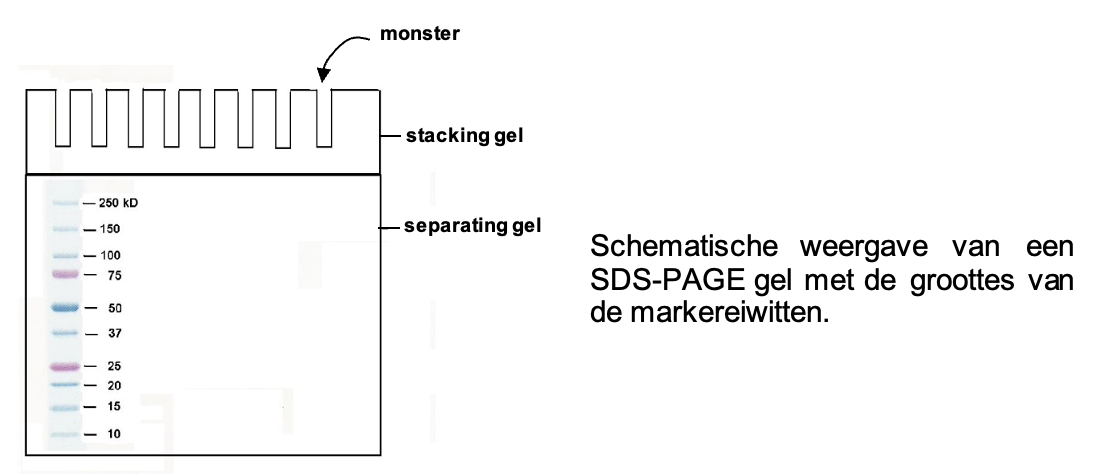
1. Pipetteer m.b.v. de elektroforese pipetpuntjes 20 µL per monster op de gel. Van de marker en het controlemonster wordt 10 µL opgebracht.

1. Vul nu ook het buitenste compartiment (de electroforese bak) met buffer op de aangegeven hoogte.

1. Electroforeer de monsters ongeveer 45 – 60 minuten bij 150 V (tot het broomfenolblauw bij de onderkant van de gel is).

1. Maak de gel vrij door met de speciale tool de plastic plaatjes van elkaar te breken. Bij de pijltjes op het plastic is de tool tussen de plaatjes te zetten.

1. Spoel de gel drie keer met demiwater en plaats de deze in een (wit) bakje.
2. Incubeer de gel voor 60 min in Bio-Safe Coomassie G-250 Stain in een shaker op 50 RPM.
3. Spoel de gel opnieuw drie keer met demiwater en ontkleur de gel in demiwater voor 30-45 minuten in een shaker op 50 RPM. Verwissel het demiwater elke 15 minuten.



**Figuur 1:** Schematische weergave van een SDS-PAGE gel met de groottes van de eiwitmarker.

**Veiligheid:** Acrylamide en bisacrylamide zijn in ongepolymeriseerde toestand onder andere neurotoxisch. Een gepolymeriseerde gel bevat nog steeds ongepolymeriseerde componenten en moet daarom met handschoenen gehanteerd worden. SDS is irriterend bij contact met de huid en ogen.

* **Acrylamide/bisacrylamide**:: H301-312-315-317-319-332-340-350-361-372 P 201-280-301+310-305+351+338-308+313.
* **SDS**: H228-302-311-315-318-335 P 210-261-280-305+351+388-312.
* **Beta-mercaptoethanol:** H301+331-310-315-317-318-373-410 P 261-273-280-301-310+302+350-305+351+338.