

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

**IDENTIFIKACE PROTEINŮ Z KERAMICKÉ
MATRIX ARCHEOLOGICKÝCH NÁLEZŮ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Kristýna Slaná

Přírodovědná studia

Vedoucí práce: Mgr. Jaroslav Pavelka, PhD.

Plzeň 2018

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Plzni dne

.....

Kristýna Slaná

Tato práce by nevznikla bez trpělivosti, času, cenných informací a podnětných připomínek Mgr. Jaroslava Pavelky, PhD, kterému tímto děkuji.

Dále děkuji své rodině za podporu po celou dobu studia.

ABSTRAKT

V této bakalářské práci je pomocí imunologické metody ELISA testováno, zda se na určitých archeologických nálezích z hradiště Kněží Hora nachází zbytky po potravinách v podobě proteinů. Sledovanými proteiny mléčné proteiny kasein a β -lactoglobulin, pšeničný protein gliadin a proteiny hovězího a vepřového masa. Speciální ELISA sadou určenou na vařené bílkoviny je pak experimentem ověřeno, zda jsou proteiny nacházející se na lokalitě archaické, nebo pochází z pozdější kontaminace okolní půdy.

ABSTRACT

In this bachelor thesis, using the ELISA immunological method, it is detected whether there is a protein residue in some of the archaeological finds from Kněží Hora. The monitored proteins are milk proteins casein and β -lactoglobulin, wheat protein gliadin and bovine and pork proteins. A special ELISA kit for cooked protein is then verified by the experiments if the proteins found in the site are archaic or derived from later contamination of the surrounding soil.

Obsah

1	ÚVOD.....	1
1.1	Cíl práce.....	1
2	DENATUROVANÉ HISTORICKÉ PROTEINY	1
2.1	Proteiny.....	2
2.2	Proteiny v archeologii.....	2
2.3	Degradace proteinů v čase	4
2.3.1	Denaturace	4
2.3.2	Deaminace	5
2.3.3	Hydrolýza peptidových vazeb	5
2.3.4	Maillardova reakce	5
2.4	Testované proteiny.....	6
2.4.1	Kasein.....	6
2.4.2	Beta-laktoglobulin	6
2.4.3	Gliadin.....	7
3	POUŽITÁ METODA.....	8
3.1	Historie.....	8
3.2	Princip.....	11
3.3	Složky testovací sady ELISA	12
3.3.1	Mikrotitrační destička.....	12
3.3.2	Antigen	12
3.3.3	Protilátka.....	13
3.3.4	BSA (hovězí sérový albumin)	15
3.3.5	Avidin-biotin komplex	16
3.3.6	Křenuv peroxidáza.....	16
3.4	Typy.....	17
3.4.1	Přímá ELISA	17

3.4.2	Nepřímá ELISA.....	18
3.4.3	Sendvičová ELISA	19
3.4.4	Kompetitivní ELISA	20
3.5	Využití ELISA testu.....	21
4	ARCHEOLOGICKÝ KONTEXT.....	22
5	PŘÍPRAVA MATERIÁLU.....	24
6	POSTUP PŘI DETEKCI PROTEINŮ	25
6.1	Potup při detekci proteinů vepřového masa.....	25
6.2	Postup při detekci β -lactoglobulinu	26
6.3	Postup při detekci kaseinu	27
6.4	Postup při detekci gliadinu	28
7	VÝSLEDKY.....	30
8	DISKUZE.....	32
9	ZÁVĚR.....	35
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37
10.1	Elektronické zdroje	42
10.2	Seznam obrázků	44
10.3	Seznam tabulek	44

1 ÚVOD

V současnosti probíhá v archeologických výzkumech velký zájem o studium organických reziduí, zejména se jedná o porézní keramické nádoby a nástroje, kde jsou častokrát zachovány proteiny a lipidy z potravin středověkého stáří (Craig a kol. 2000, Copley a kol. 2005, Pavelka a Vařeka 2008, Roffet-Salque 2015, Čiperová 2015, Pavelka a kol. 2016). Cílem těchto výzkumů je osvětlit, které zdroje potravy byly využívány různými populacemi a jaké životní strategie převažovaly v různých podmínkách (Oudemans and Boon 1991).

1.1 Cíl práce

Cílem mé práce je aplikace imunologické metody ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) na detekci denaturovaných proteinů, které představují zbytky po potravinách nasáklých do porézní keramiky z archeologických nálezů. Tato metodika by měla přinést nová publikovatelná data pro potřeby archeologických prací a pozdějších výzkumů a rozšířit povědomí o stravování vymřelých populací na konkrétní archeologické lokalitě.

2 DENATUROVANÉ HISTORICKÉ PROTEINY

Kromě kostí nebo fosilizovaných kostí, u kterých již bylo dříve prokázáno, že obsahují fragmenty bílkovin ve vzorcích, které jsou i středověkého stáří, se v poslední době staly cílovým materiálem pro výzkum archeologických proteinů keramické nástroje a nádoby. Keramické artefakty, kromě toho, že se běžně využívají v archeologických souvislostech, byly často používány jako nástroje na vaření, což znamená, že s velkou pravděpodobností obsahují zbytky prehistorické stravy. Díky jejich porézní struktuře jsou ideálními předměty pro absorpci a uchování organických zbytků (Craig a Collins 2000).

Analýza organických zbytků v organických materiálech může být rozdělena zhruba do čtyř kategorií, které jsou založeny na studovaných sloučeninách. Těmito sloučeninami jsou: proteiny, lipidy, alkaloidy a DNA. Ačkoli studie založené na archeologických reziduích je možné dohledat až do roku 1960 (i pro fosilní proteiny dinosaurů), s prvními významnými publikacemi přišel až Svante Pääbo, který v roce 1985 popsal lidskou genetickou evoluci pomocí DNA získané z egyptské mumie. Po jeho objevu je zaznamenán vysoký nárůst zájmu o rezidua a následné publikace. Nicméně studie založené

na starověkých residuích nejsou bezproblémově, o čemž svědčí množství článků, které se týkají interpretace výsledků a použitelnosti velmi starých vzorků (Baker 2010).

2.1 Proteiny

Proteiny neboli bílkoviny jsou makromolekulární látky, které vznikají spojením 100 a více (typický protein jich obsahuje 200 až 300) molekul různých aminokyselin za pomoci peptidické vazby. Obsahují atomy uhlíku (50 – 55 %), vodíku (6 – 7 %), kyslíku (20 – 23 %), dusíku (12 – 17 %) a dalších prvků. Struktura proteinů vychází z uspořádání aminokyselin v řetězci a je důležitá pro funkčnost bílkoviny. Primární struktura je definována přesným pořadím aminokyselin v řetězci. Sekundární struktura je dána prostorovým uspořádáním aminokyselin v řetězci a stabilizací vodíkových můstků, existují dvě základní sekundární struktury: α -helix (pravotočivá šroubovice) a β -skládaný list. Terciární strukturu charakterizují další intramolekulární vazebné interakce, jako jsou disulfidické můstky, iontové vazby a van der Waalovy síly. Kvarterní struktura vzniká u proteinů, které se skládají ze dvou a více polypeptidových řetězců, tato struktura se vyskytuje například u hemoglobinu [1].

Proteiny jsou důležitou a nezbytnou složkou výživy živočichů. Potraviny, které obsahují bílkoviny jsou především mléko, maso, vejce, ale též luštěniny (Doubrava a kol. 1984).

2.2 Proteiny v archeologii

Výzkum proteinů byl zprvu kritizován, jelikož proteiny nebyly považovány za dobře zachovatelné v archeologických souvislostech. Proteinové zbytky jsou v časovém úseku podrobeny řadě transformací včetně hydrolýzy peptidových vazeb, deaminace, denaturace a napadení mikroorganismy. Hlavní problémy studia archeologických proteinových zbytků souvisí s extrakcí bílkovin, která brání komplexní souhře všech sil včetně hydrofobních interakcí, vodíkových vazeb, iontových a Van der Waalových sil. Tyto síly vážou protein na keramiku a způsobují to, že je extrakce velmi obtížná (Baker 2010). Jak však prokázala Čiperová (2015) pro identifikaci proteinů pomocí ELISA stačí analyzovat keramiku i s původními proteiny jako jemnou suspenzi.

Archeologická keramika je však vzhledem ke svému relativně mladému věku ideálním kandidátem na konzervaci bílkovin, navíc navzdory výše zmíněným modifikacím, ke kterým dochází při vystavení teplu, se předpokládá, že vaření zvyšuje

přežití proteinů v čase tím, že inhibuje mikroorganismy, které by jinak konzumovaly zbytky bílkovin (Barnard a kol. 2007). Toto tvrzení však nebylo v archeologických materiálech dostatečně popsáno, což potvrzuje potřebu dalších laboratorních kontrol.

V archeologii se proteiny v poslední době ukazují jako velmi slibné materiály, jelikož práce s nimi je jednodušší než s archaickou DNA. Jejich struktura je odvozena od genetického kódu a díky tomu poskytují lepší a přesnější výsledky než například lipidy, tato skutečnost je významná zejména pro taxonomii. Přestože jsou proteiny omezenější a DNA může obsahovat celkovou informaci o původním organismu je jejich informační hodnota velmi vysoká. Proteiny však nacházejí v archeologii obdobné využití jako DNA jelikož se nachází ve větším množství na nástrojích a na nádobách (Gerlach a kol. 1995).

V současné době se ELISA, která je využita v této práci, používá zejména ve výzkumu a medicíně k detekci virových a bakteriálních onemocnění. Pro bližší duhovou specifikaci, pro určení pohlaví a podobně je již nevyužitelná, pro tento druh testů je v dnešní době využívána metoda PCR (Polymerase Chain Reaction)¹ neboť práce s DNA je rychlejší a levnější. Tyto testy je však možné aplikovat pouze na recentní biologický materiál. Pracovat s archaickou DNA je komplikované, jelikož vlivem času hydrolyzuje, oxiduje, rozpadá se a je snadno kontaminována (Hofreiter a kol. 2001). Nové sekvenční metody využívají kratší úseky DNA, které jsou pro analýzu zachované archaické DNA vhodnější (Keller a kol. 2012). Aby se však mohlo s DNA pracovat, musí se nějaká zachovat. Zde se prokázalo, že proteiny jsou pro archeologický výzkum výhodnější, právě proto že se delším časovým úseku lépe zachovávají například v kostech (Collins a kol. 2002), ve fosíliích (Schwiezter a kol. 2009), v keramice (Craig a kol. 2005), na kamenných nástrojích (Kooyman a kol., 2001), v sedimentech (Belluomini a kol. 1986) nebo v malířské barvě (Tokarski a kol. 2006, Kucková a kol. 2007, Fremout a kol. 2009). Sekvenovat proteiny je také možné, ale využití protilátek se prokázalo jako velice účinná metoda. Další vhodnou metodou v archeologii je Western blot, který je založený na využití specifických protilátek. Tímto způsobem byly popsány archaické bílkoviny imunitního systému a kolagenní bílkoviny (Schmit a Schultz 2004).

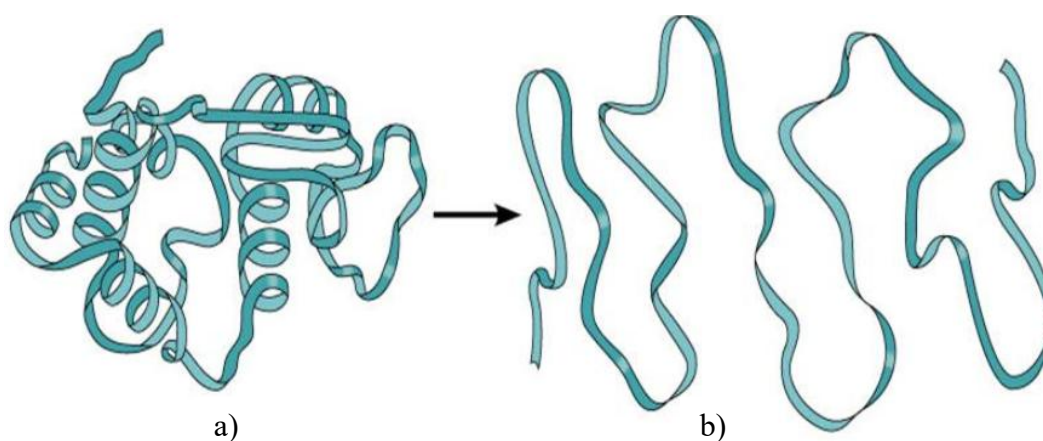
¹ PCR neboli polymerázová řetězová reakce je technika využívaná v molekulární biologii, jejíž principem je opakovaná řízená denaturace dvouřetězcové DNA a následná denaturace osamocených řetězců se se specifickými oligonukleotidy, které slouží následně jako primery pro syntézu nového řetězce DNA. Cílem PCR je namnožit určitý úsek DNA. Metodu PCR vymyslel Kary Mullis v roce 1983, čímž způsobil převrat v molekulární biologii, za svůj objev získal Nobelovu cenu [2].

2.3 Degradace proteinů v čase

Proteiny v průběhu času podléhají přirozeným procesům degradace jako jsou denaturace, deaminace, hydrolýza peptidových vazeb, Maillardova reakce nebo také napadení a rozklad mikroorganismy. Ty jsou zapříčiněny mimo jiné i podmínkami, ve kterých se proteiny nachází. Pokud jsou proteiny ve větší koncentraci na jednom místě, nebo se vyskytují s jinými látkami (škroby, sacharidy), je velice pravděpodobné, že přežijí velmi dlouhé časové úseky. Je zde i velká šance, že se tímto způsobem ubrání napadení mikroorganismy (Baker 2010).

2.3.1 Denaturace

Denaturací se rozumí ireverzibilní (nevratné) změny v biologických (ztráta enzymového a hormonálního účinku), chemických a fyzikálních (ztráta rozpustnosti původní přírodní bílkoviny) vlastností bílkovin. Denaturačně působí, kromě vysokých teplot (70 až 100°C) například chemické látky jako jsou minerální a organické kyseliny nebo zásady a organická rozpouštědla (aceton, alkohol), které uvolňují iontové vazby, které podmiňují terciární strukturu bílkovin. Mimo jiné jsou bílkoviny citlivé k fyzikálním faktorům, kterými jsou například ultrafialové paprsky nebo rentgenové záření. Vlivem těchto uvedených faktorů bílkoviny ztrácejí hydrofilní vlastnosti a stávají se hydrofobními. Převedení původní bílkoviny do denaturovaného stavu provází změny vyšších struktur (Obr. 1), pouze primární struktura zůstává zachovaná (Doubrava a kol 1984).



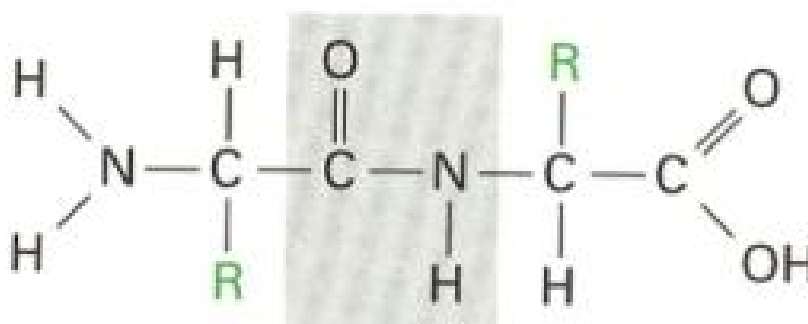
Obr. 1. Denaturace proteinů, a) původní protein, b) denaturovaný protein (Hodeček 2016)

2.3.2 Deaminace

Deaminace je proces, při kterém je odebrána aminová (-NH₂) skupina z molekuly aminokyseliny.

2.3.3 Hydrolýza peptidových vazeb

Peptidová vazba (nebo také peptidická vazba) je kovalentní chemická vazba spojující dva po sobě následující aminokyselinové monomery v peptidovém nebo bílkovinném řetězci (Obr. 2). Peptidová vazba může být degradována hydrolýzou, neboli přidáním molekuly vody. V přítomnosti vody se peptidová vazba rozpadne a uvolní se energie. Tento proces je extrémně pomalý: poločas rozpadu je při 25°C mezi 350 a 600 lety na jednu vazbu (Valenta 2009).



Obr. 2 Peptidová vazba (Valenta 2009)

2.3.4 Maillardova reakce

Maillardova reakce je neenzymatická reakce mezi redukujícími sacharidy nebo produkty jejich degradace a aminokyselinami a bílkovinami v potravinách. Během , která probíhá při teplotách 140°C až 165°C, této reakce vznikají velmi důležité sensoricky aktivní sloučeniny. Díky této reakci mají potraviny po tepelné úpravě charakteristické nahnědlé zbarvení (Marxová 2011).

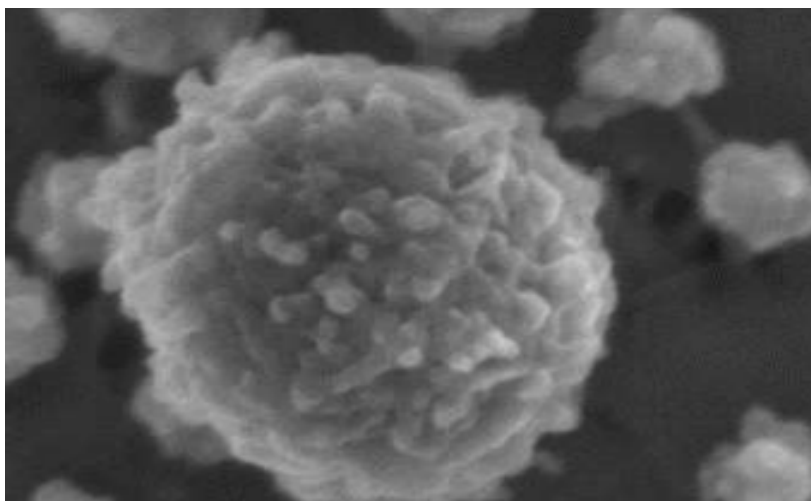
2.4 Testované proteiny

V této práci je nezbytné stanovit konkrétní proteiny, které se mohou uchovat v archeologické keramice, a kterými se výzkum v této práci zabývá.

2.4.1 Kasein

Kasein je hlavním mléčným proteinem tvoří asi 80 % všech mléčných bílkovin, zbývající část je tvořena různými syrovátkovými proteiny. Je důležitým zdrojem aminokyselin, vápníku a fosfátů a díky tomu je velmi důležitý pro rozvoj a růst mláďat. Svým chováním, které je dané jeho unikátní strukturou, se kasein liší od ostatních proteinů.

Kasein je složen s několika podobných proteinů, které tvoří multimolekulární zrnitou strukturu, nazývanou kaseinová micela (Obr. 3). Tato struktura kaseinu v mléce je důležitou součástí trávení mléka v žaludku a ve střevě, jelikož micely vytvoří určitou formu gelu a díky tomu je tráven pomaleji než jiné mléčné proteiny. Elektronová mikroskopie ukázala, že velikosti kaseinových micel jsou v rozmezí od 50 do 300 nm (Cockburn 2001).

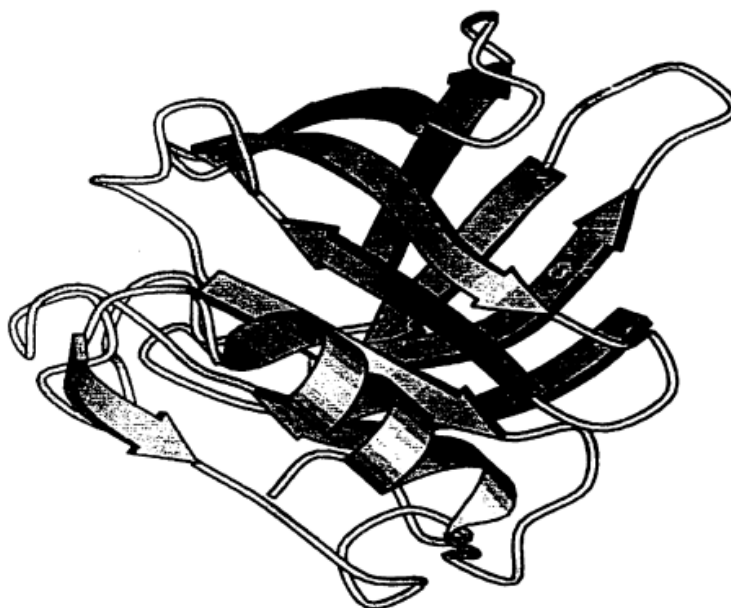


Obr. 3 Kaseinová micela (Dalgleish a kol 2004)

2.4.2 Beta-laktoglobulin

Beta-laktoglobulin je nejhojnějším syrovátkovým proteinem, tvoří 7-12 % celkového množství mléčných bílkovin. Vyskytuje se zejména v kravském a v ovčím mléce nikoli však v mléce lidském. Jedná se o globulární protein s primární strukturou 162 aminokyselinových zbytků (Čiperová 2015). Kompletní aminokyselinovou sekvenci a

disulfidové křížové vazby popsal Whitney a kol. (1976). V této práci byl použit ELISA test určený speciálně pro detekci beta- laktoglobulinu obsaženého v kravském mléce.

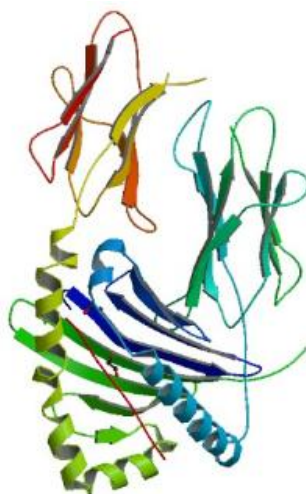


Obr. 4 Stavba beta-laktoglobulinu (Swaisgood, 1996)

2.4.3 Gliadin

Gliadin je monomerní protein, který se skládá z polypeptidu s jedním řetězcem a tvoří 30 – 40 % celkového obsahu moučných bílkovin. Gliadiny jsou polymorfní směsí rozpustné v 70% alkoholu (Anderson a Greene 1997). Vazby, které se v gliadinu tvoří, jsou cystein disulfidové můstky, které vedou k jejich méně nebo naopak více globulárnímu charakteru (Shewry a kol. 2003). Gliadiny jsou rozdělovány do čtyř skupin: α , β , γ a ω na základě molekulární pohyblivosti při nízkém pH.

Gliadin je hlavní protein v potravinách obsahujících lepek jako je ječmen, žito, pšenice a další, oves místo gliadinu obsahuje glutin. V této práci byl využit ELISA test, který je určený speciálně k detekci gliadinu v obsaženého v obilí [3].



Obr. 5 Stavba gliadinu ([21])

3 POUŽITÁ METODA

K získání podkladů č výsledků do této práce byla použita imunochemická metoda² ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), která je známá také pod názvem EIA (Enzyme Immunoassay). EIA i ELISA jsou biochemické testovací metody určené k detekci a kvantifikaci peptidů, proteinů, protilátek a hormonů. V testu ELISA je antigen imobilizován na pevném povrchu (mikrotitrační destička) a poté je komplexován s protilátkou, která je spojena s enzymem. V komerčních ELISA soupravách je obvykle na povrch v jamkách destičky imobilizována protilátka, která reaguje s antigenem testovacího vzorku. Detekce se provádí vyhodnocením konjugované enzymové aktivity inkubací se substrátem. Základem celého testu je vysoce specifická interakce mezi protilátkou a antigenem.

3.1 Historie

První publikované systémy EIA a ELISA se lišily v návrhu testu, ale obě techniky jsou založeny na stejném principu imunotestu s využitím enzymu. Dva výzkumné týmy nezávisle na sobě a současně vyvinuly tuto myšlenku a provedly nezbytné experimenty, aby prokázaly proveditelnost testu (Lequin 2005).

Technika ELISA byla koncipována a vyvinuta Petrem Perlmannem , hlavním vynálezcem, a Evou Engvallovou na Stockholmské univerzitě ve Švédsku. EIA byla

² Imunochemické metody jsou metody využívající interakce mezi specifickými *in vitro* protilátkami a antigeny (Kaš a kol. 2006).

vyvinuta ve výzkumných laboratořích NV Organon v Nizozemsku Antonem Schuursem a Bauke van Weemenem. Obě techniky vycházejí z metody RIA (Radio Immuno Assay), která se používala před objevem ELISA/EIA (Lequin 2005).

RIA byla poprvé popsána v roce 1960 Solomonem Bersonem a Rosalyn Yalow v New Yorku a byla primárně využívána pro měření insulinu v plazmě. Za tento objev byla v roce 1977 Rosalyn Yalow oceněna Nobelovou cenou v oboru medicína a psychologie [4].

RIA je starší imunologická metoda, která funguje na podobném principu jako ELISA, s rozdílem, že namísto enzymu se používá radioaktivní izotop. V tehdejší době byl převážně využíván jód-131 (poločas rozpadu 8,02 dní, beta a gama záření), jelikož neexistovaly jiné alternativy. S používáním radioaktivního jódu však souvisela řada problémů související s radioaktivním odpadem a hlavně s bezpečností pracovníků, kteří s metodou RIA pracovali. Později přišel na trh méně škodlivý jód-125, který vyzařuje slabé gama záření a s tím se značně snížilo riziko zdravotních problémů (Lequin 2005).

Na počátku 70. let 20. století byl v Basileji pořádán sjezd ERIAC (European RadioImmunoAssay Club), kde byla zpochybněna myšlenka využití enzymu namísto radioaktivní látky. Nikdo nevěřil tomu, že je možné aby tak velká molekula, jako je enzym, byla schopná navázat antigen nebo protilátku bez toho aby zabránil specifickým reakcím mezi nimi. Všechny pochybnosti byly však vyvráceny velmi dobře naplánovanými experimenty (Lequin 2005).

Na konci 60. let 20. století byly výzkumným týmem (S. Avrameas, G.B. Pierce) z Paříže úspěšně navázány enzymy (např. alkalická fosfatáza, glukózo-oxidáza) na protilátky a antigeny. Avrameas popsal navázání enzymů pomocí glutaraldehydu (Avrameas a Uriel 1966). Cílem jejich práce bylo za pomoci enzymově značeného antigenu nebo protilátky detekovat přítomnost antigenu nebo protilátky ve vzorku imunofluorescencí. Jejich experimenty byly úspěšné a technika, kterou vyvinuly, byla dále využívána v histopatologii a histochemii (Engvall 1977).

První publikace o výsledcích metody ELISA vydali Perlmann a Engvallová v roce 1971. Tyto výsledky popisovaly měření množství IgG (imunoglobulin G) v králičím séru s použitím alkalické fosfatázy (Engvall a Perlmann 1971). Ve stejném roce byla publikována i práce využívající EIA, její autoři (van Weemen a Schuurs) přišli na to, že

metodou EIA lze určit koncentraci gonadotropinu v moči. Jako enzym byla použita avidin-peroxidáza (van Weemen a Schuurs 1971).

Na konci 60. a počátkem 70. let byla většina RIA testů vyvinuta „po domácku,, jednotlivými vědci a výzkumníky. Ti však nedokázali udržet krok s velkými firmami, jako jsou BoehringerMannheim (Německo), Abbott (USA), Organon Teknika (Nizozemsko), kteří zahájili komerční prodej testovacích souprav ELISA/EIA. Docházelo ke zdokonalení techniky, laboratoře byly lépe vybaveny, což vedlo k automatizaci pipetového zařízení, k pipetám s více kanálky, čtečkám mikrotitračních destiček apod. (Lequin 2005).

Převratný objev metod ELISA a EIA vedl k vývoji celých sérií testovacích sad a k různým variantám testu od nejjednodušších (imunoenzymové měření) po složitější sendvičové testy (Bosh a kol. 1975).

Na počátku 70. let 20. století se pro screening krve nebo pro testování virových onemocnění používal buď poloautomatický test RIA, nebo neradioaktivní ale poněkud těžký hemaglutinační test. V roce 1976 společnost Organon Teknika (Nizozemsko) vyvinula a uvedla na trh vysoce úspěšný systém EIA pro antigen hepatitidy B, který byl vybaven mikrotitrační destičkou s 96 jamkami. (Wolters a kol. 1976). Tento test se stal prvním komerčně dostupným EIA. Krátce poté přišly na trh další testy například pro detekci protilátek proti zarděnkám a toxoplazmózy. V roce 1980 byl na trh uveden test na detekci protilátek viru HIV (van der Waart a kol 1978).



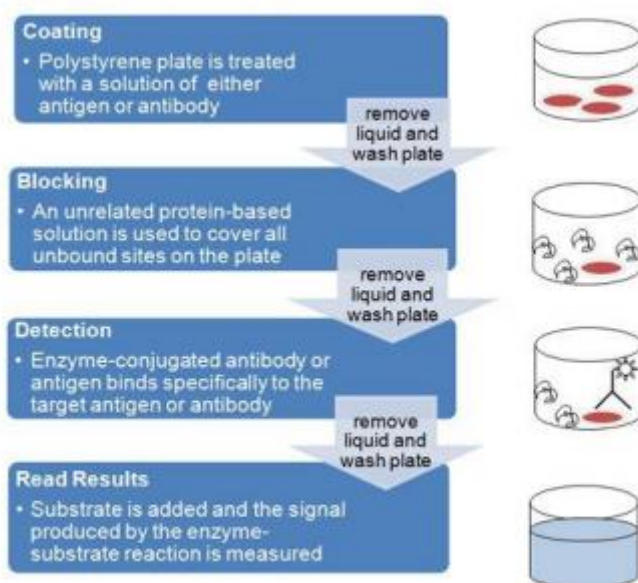
Obr. 6. Promoční foto prvního EIA testu pro testování hepatitidy B, Organon Teknika (Lequin 2005)

3.2 Princip

ELISA se obvykle provádí v krystalových polystyrenových mikrotitračních destičkách, které mají 96 jamek. Na dně každé jamky je pasivně navázána protilátka nebo antigen. Proteiny jsou ve většině případů na povrch destičky navázány za pomoci hydrofobním interakcím mezi nepolární strukturou proteinu a plastovou destičkou.

Testování může být provedeno ve dvou hlavních variantách: buď je používána k detekci přítomnosti antigenů, které jsou identifikovány protilátkou, nebo se využívá k testování protilátek, které rozpoznají antigen (viz obr. 2).

Značení protilátek je provedeno za pomoci enzymu, který je schopen katalyzovat obarvení nebo změnu barvy substrátu. Většinou se jako enzym používá alkalická fosfatáza, která reaguje s para-nitrofenyl fosfátem nebo křenová peroxidáza, která reaguje s tetramethylbenzudunem (TMB). Při těchto reakcích dochází k obarvení substrátu, díky čemuž je ELISA test snadno vyhodnocen již vizuálně.



Obr. 7. obecný princip metody ELISA ([7])

3.3 Složky testovací sady ELISA

3.3.1 Mikrotitrační destička

Mikrotitrační destička je deska, která obsahuje různý počet jamek (96 a více). V našem výzkumu jsme použili destičku s 96 jamkami.

Jako výrobní materiál na destičky je použit standardní krystalický polystyren díky jeho dobré adsorpci biologických sloučenin a pohlcuje jen malé množství optického záření, je odolný vůči mnoha chemikáliím a v neposlední řadě je jeho výroba nenáročná. Barva destičky se pro testy volí podle značkovací látky buď černá, nebo bílá. Povrch destičky musí být dokonale hladký a neporušený žádnou vadou. Bývá také často chemicky nebo fyzikálně upraven, pro další zlepšení jeho vlastností. Jednotlivé jamky mohou mít různý tvar: jamky s plochým dnem mají nejlepší optické vlastnosti, jamky s dnem do V jsou vhodné při testech, kdy se využívá centrifugace nebo koncentrace vzorků a jamky s dnem do U se snadno proplachují (Cvrček 2012).

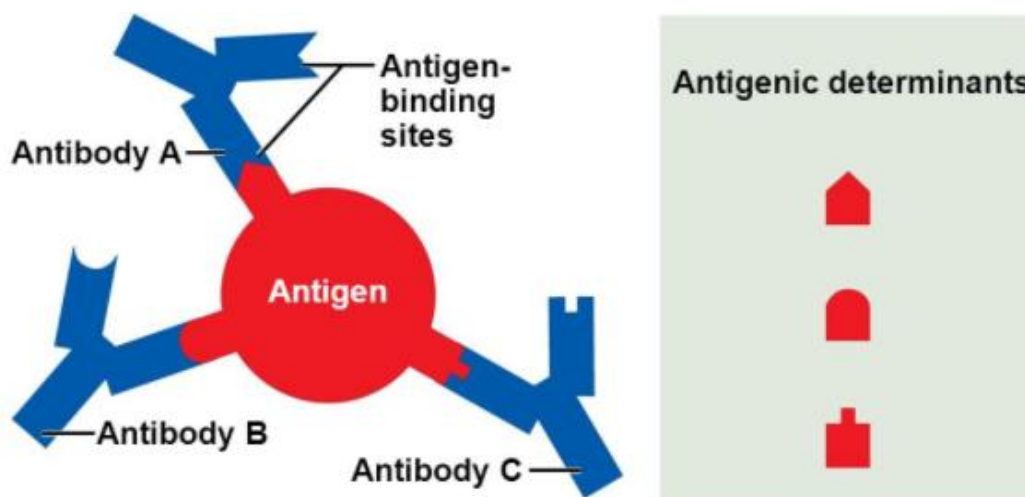


Obr. 8. Mikrotitrační destička (Cvrček 2012)

3.3.2 Antigen

Antigen je makromolekulární látka umělého nebo přírodního původu, která není tělu vlastní. V organismech stimuluje tvorbu protilátek nebo specifickou imunitní reakci, která se přirozeně snaží antigen zničit nebo neutralizovat (Obr. 9).

Antigenem mohou být například viry, bakterie, alergeny (pyly a prachové částice), toxiny, ale i krvinky dárce při transfúzích (Cvrček 2012). Všechny tyto látky jsou schopny vázat se na specifické protilátky. Oblast antigenu, která reaguje s protilátkou, se nazývá epitop.

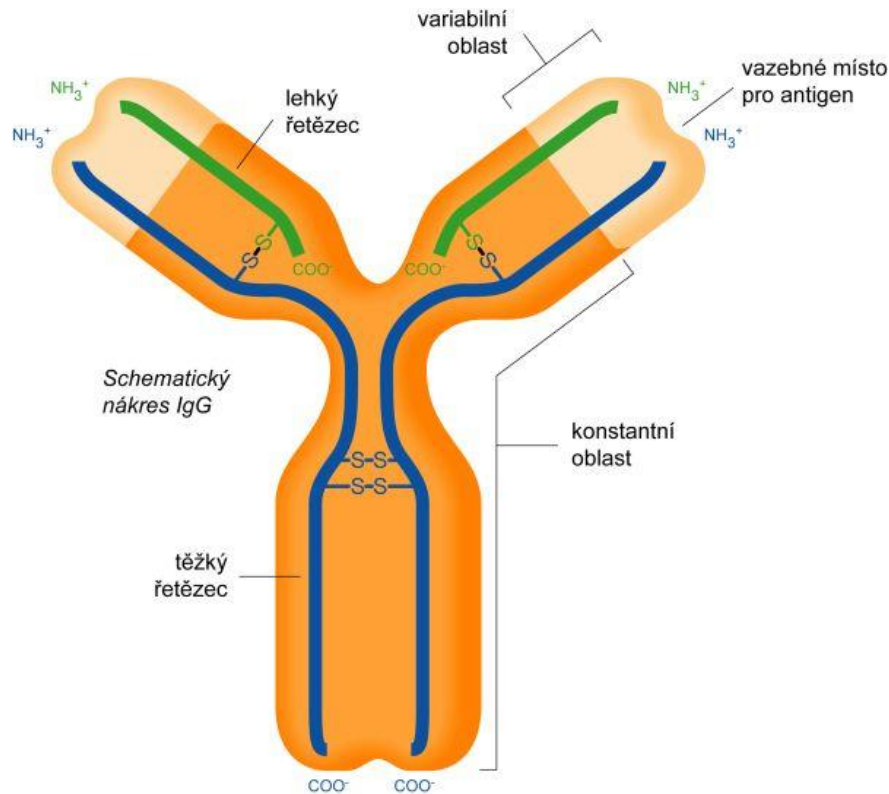


Obr. 9. Antigen s navázanou protilátkou (Cvrček 2012)

3.3.3 Protilátka

Protilátky, také známé jako imunoglobuliny, jsou heterogenní skupinou sérových bílkovin. Patří mezi γ -globuliny a částečně mezi α a β globuliny. Z chemického hlediska se jedná o glykoproteiny, které jsou z 82-96 % polypeptidy a ze 4-18 % sacharidy (Voráčková 2010). Organismus tyto látky přirozeně produkuje v reakci na invazivní cizí částice (antigeny), jako jsou například viry a mikroorganismy. Jsou produkovány B lymfocyty a hrají důležitou roli v imunitním systému, jelikož brání organismus před infekcí a nemocemi (Milstein a Köhler 1975).

Molekula imunoglobulinu má tvar písmene Y (monomer), složeného ze čtyř polypeptidových řetězců, a to ze dvou krátkých (lehkých řetězců) a dvou dlouhých (těžkých řetězců), které jsou spojeny disulfidovými můstky. Označení lehké a těžké řetězce vychází z jejich relativní molekulové hmotnosti. Oba řetězce jsou tvořeny konstantní a variabilní částí. Horní část neboli Fab (fragment antigen-binding) region je složen z variabilní a konstantní části obou typů řetězců, narozdíl od spodní části tzv. Fc (fragment crystallizable) regionu, který je složen z konstantních částí dvou těžkých řetězců. Konce každého těžkého řetězce se spojí s jedním lehkým řetězcem, tímto spojením vzniknou dvě domény schopné vázat antigen (Milstein a Köhler 1975).



Obr. 10. Struktura imunoglobulinu IgG (Cvrček 2012)

3.3.3.1 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátka je imunoglobulin, který je produkován jedním klonem aktivovaných B lymfocytů poté, co se setká s konkrétním antigenním epitopem a díky tomu jsou zcela homogenní a mají jednoznačně definovanou specifitu. V organismu se protilátek tohoto typu vyskytuje jen nepatrné množství, výjimkou jsou patologické stavy, kdy mohou naopak převládat. Tato situace nastává v případě nádoru z plazmatických buněk (plazmocytomu/myelomu), kdy se nádorově změněný plazmocytom nekontrolovatelně dělí, ale je stále schopen produkovat protilátky, které mají jednu, obvykle neznámou, specifitu (Hořejší a Bartůňková 2009).

Takzvanou technikou *in vitro*³ je možné získat monoklonální protilátky izolací klonů B lymfocytů, které produkují požadované protilátky, a jejich pěstováním v buněčné kultuře. Poprvé se to podařilo biologům Césarovi Milsteinovi a Georgi Köhlerovi v roce

³ *In vitro* (angl. in glass) „ve zkumavce“, je technologie, kdy se v laboratořích pracuje s částmi organismů, které byly izolovány z jejich obvyklého biologického prostředí (Hořejší a Bartůňková 2009).

1975, kteří pomocí technologie buněčných hybridomů⁴ umožnili výrobu monoklonálních protilátek, což znamenalo převratný objev v biologii.

Hybridomové monoklonální protilátky jsou velice významným nástrojem v biologickém výzkumu, v klinické praxi jako diagnostika a terapeutika a v biotechnologii, kde mají velký komerční význam (Hořejší a Bartůňková 2009). Díky jejich vysoké specifitě a homogenitě se staly vhodným prostředkem pro přesnou diagnostiku (hepatitida, rakovina, AIDS, chřipka a jiné). Dnes je k dostání již více než 100 druhů monoklonálních protilátek produkovaných *in vitro*, které se využívají pro rutinní testy, jako je PCR nebo právě ELISA. Tyto testy umožňují přesnou identifikaci proteinů, sacharidů a nukleových kyselin (Saleem a Kamal 2008).

3.3.3.2 Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky jsou produkovány během imunitní odpovědi, kdy je aktivován velký počet B lymfocytů, které umí rozpoznat několik různých antigenních determinantů. Výsledkem této imunitní odpovědi je tvorba heterogenních imunoglobulinů více tříd a podtříd, které jsou schopny mířit proti různým druhům epitopů, mají různou schopnost se vázat a jsou tvořeny velkým množstvím B lymfocytů (Stites a Terr 2004).

Heterogenita tohoto typu protilátek způsobuje velkou komplikaci při některých imunochemických testech. Ta spočívá ve výskytu nízkoafinních protilátek a v přítomnosti zkřížené reaktivity protilátek se špatnými epitopy. Výroba polyklonálních protilátek probíhá nejčastěji imunizací zvířat lidskými lymfocyty (Sites a Terr 2004).

3.3.4 BSA (hovězí sérový albumin)

Albumin patří mezi nejdéle známé a nejvíce prozkoumané proteiny. Je hlavním důležitým rozpustným proteinem krevní plasmy všech savců a v těle zastává velké množství funkcí (transport mastných kyselin, vitamínů, léčiv) (Hynková 2010).

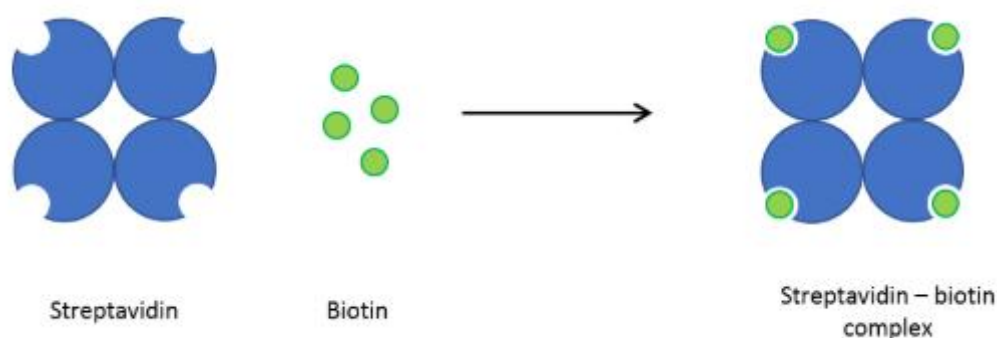
Hovězí sérový albumin je albumin separovaný z krve hovězího dobytka. Díky svým vlastnostem je hojně využíván v biochemických analýzách. V ELISA testu je použit jako blokovací pufr, který zablokuje volná místa na destičce (Cvrček 2012).

⁴ Hybridom je buňka, která vzniká umělým spojením rychle se množící nádorové buňky s buňkou, která tvoří protilátku proti určitému antigenu (Hořejší a Bartůňková 2009).

3.3.5 Avidin-biotin komplex

Avidin je jednoduchý glykoprotein, jehož specifickou vlastností je vysoká afinita k nízkomolekulárnímu biotinu, což je ve vodě rozpustný vitamin B7. Ten může být konjugován několika různými biomolekulami, včetně protilátek a zároveň může být připojen ve velkém množství k jedné molekule bílkoviny. Biotinylovaný protein se tak může vázat na více než jednu molekulu avidinu. Nicméně má avidin dvě velké nevýhody, pokud je využívám v imunotestech: má vysoký izoelektrický bod (10) a je tedy nabitý kladným nábojem při neutrálním pH, proto se může vázat na záporně nabitě struktury, jako je například jádro. Druhá nevýhoda spočívá v tom že avidin jakožto glykoprotein reaguje s molekulami (např.: lektin) přes uhlovodíkovou skupinu. Tyto dva problémy jsou řešeny nahrazením avidinu za streptavidin, což je protein izolovaný z bakterie *Streptomyces avidinii*. Streptavidin má stejně jako avidin čtyři vysoce afinitní vazebná místa pro biotin. Izoelektrický bod streptavidinu je blízko neutrálnímu pH a není glykoproteinem, a proto se neváže na molekuly lektinu. Tyto fyzikální vlastnosti činí ze streptavidinu velice žádoucí protein pro použití v imunochemických testech.[5]

Streptavidin se za vhodných koncentrací smíchá s biotinylovanou peroxidázou, v pokojové teplotě se nechá 30 minut inkubovat, aby vznikl komplex. Tento komplex je pak připojen k biotinylované protilátce. Stechiometrická kontrola zajišťuje, že některá vazebná místa zůstanou volná. To umožňuje, aby se vytvořený komplex vázal a poskytoval velmi vysoký signál v místě vazby antigenu.[6]



Obr. 11. Avidin-biotin komplex ([6])

3.3.6 Křenová peroxidáza

V imunochemických metodách se často využívá značení protilátek. To se dělá nejčastěji pomocí enzymů, biotinu, radioizotopu nebo koloidní částice. Převážně se značí sekundární protilátky a v metodě ELISA se používá pro značení protilátky enzym (křenová

peroxidáza nebo alkalická fosfatáza). Díky označení enzymem v této metodě dojde k enzym – substrátové reakci, jejíž výsledkem je přeměna bezbarvých chromogenů na barevné látky (Cvrček 2012).

Křenová peroxidáza je enzym, který je získán z kořene křenu selského (*Cochlearia armoracia*). Obsahuje hematin, který vytvoří komplex s peroxidem vodíku, který se poté rozloží ve vodě za vzniku kyslíku. Tento enzym je nejčastěji využívaným markerem v imunochemických metodách, lze jím označit protilátky (primární i sekundární) nebo streptavidin (Cvrček 2012).

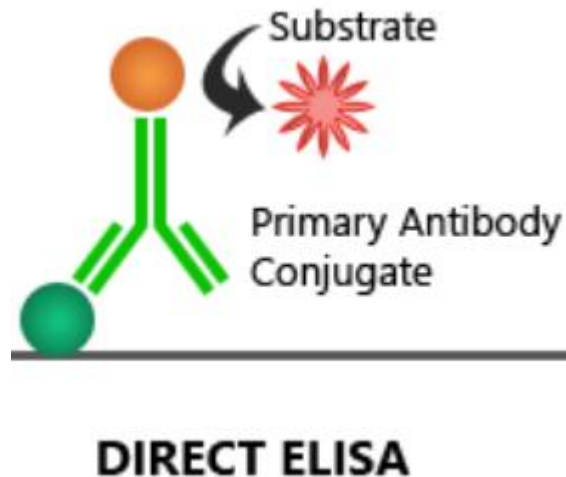
3.4 Typy

ELISu lze aplikovat několika různými postupy, které se od sebe liší počtem a značením přidaných protilátek. Mezi základní metody patří přímá, nepřímá, sendvičová a kompetitivní ELISA.

3.4.1 Přímá ELISA

Přímá ELISA je považována za nejjednodušší variantu testu. Spočívá v tom, že antigen je přímo adsorbován v jamce plastové destičky a za pomoci nadbytku jiného proteinu (BSA) dojde k zablokování ostatních vazebných míst. Poté se přidá označená primární protilátka a tím je antigen detekován. Komplex enzymu a protilátky je navázán na antigen a po přidání substrátu se zbarví vzorek v jamce [7].

V porovnání s ostatními variantami testu je přímá ELISA nejrychlejší metodou, protože je použita pouze jedna protilátka a je prováděna v méně krocích. Tento typ je běžně využíván v imunohistologii k obarvení histologických preparátů tkání a buněk [8].



Obr. 12. Přímá ELISA ([7])

Výhody

- Rychlost testu díky použití jen jedné protilátky a provedení méně kroků než u ostatních typů,
- Eliminování křížových reakcí (angl. crossreaction) [9].

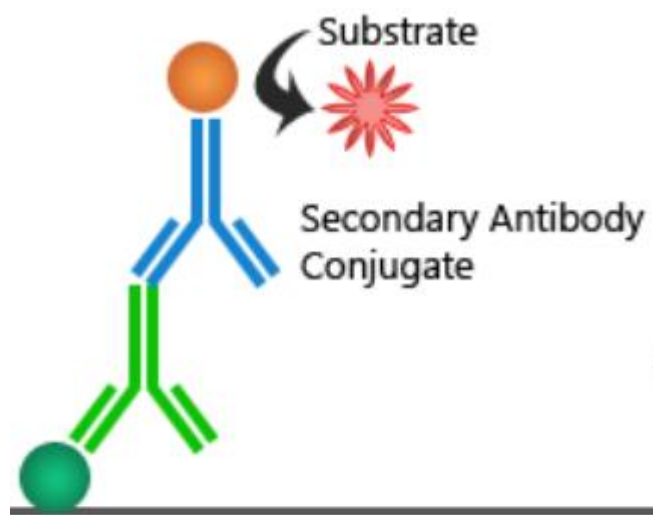
Nevýhody

- Imunoreaktivita primární protilátky může být negativně ovlivněna enzymy,
- Označení primárních protilátek pro každou specifickou ELISu je časově náročné a velmi nákladné [10].

3.4.2 Nepřímá ELISA

Nepřímá ELISA je dvoufázový test, kdy jsou antigeny detekovány ve dvou vrstvách. Nejprve se přidá neznačená protilátka, která je specifická pro antigen. Tyto protilátky mají funkci cíle pro sekundární protilátky. Sekundární protilátky jsou enzymově značené a váží se na protilátky primární [11].

Tento typ je využíván v diagnostice, a když se testuje velké množství vzorků [12].



INDIRECT ELISA

Obr. 13. Nepřímá ELISA ([7])

Výhody

- Velká škála značených sekundárních protilátek je komerčně dostupná,
- Je zachována maximální imunoreaktivita primární protilátky, protože není označená,
- Citlivost testu se zvyšuje, protože každá primární protilátka obsahuje několik epitopů, které mohou být vázány značenou sekundární protilátkou umožňující zesílení signálu [13].

Nevýhody

- Po přidání sekundární protilátky může dojít ke křížové reakci, což vede k nespecifickému signálu,
- V postupu je nutná další inkubační doba [14].

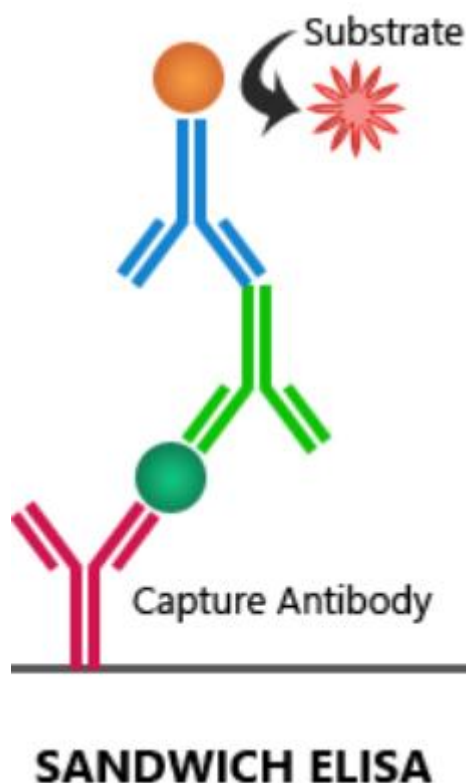
3.4.3 Sendvičová ELISA

Tato metoda je méně obvyklá varianta testu, ale je vysoce účinná při detekci antigenu ve vzorku. Na této metodě je také založena většina komerčních ELISA kitů [15]

Sendvičová ELISA kvantifikuje antigeny mezi dvěma vrstvami protilátek – detekční a zachycovací (odtud název sendvičová ELISA). Měřený antigen musí obsahovat alespoň dva antigenní epitopy schopné vázat se na protilátku [16]

Výhody

- Vysoká specifita: antigen je specificky zachycen a detekován,
- metoda je vhodná pro složité nebo nečisté vzorky (před měřením antigeny nevyžadují čištění),
- flexibilita a citlivost (lze použít jak přímé tak nepřímé metody detekce) [17].



Obr. 14. Sendvičová ELISA ([7])

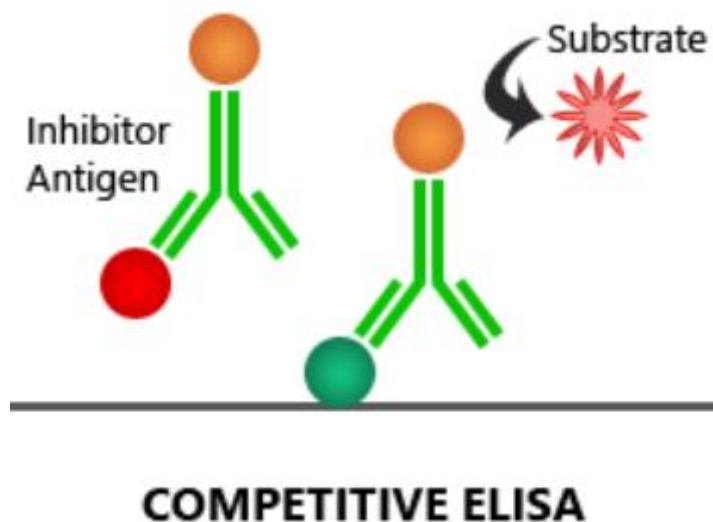
3.4.4 Kompetitivní ELISA

Klíčovým procesem v kompetitivní ELISe je konkurenceschopnost reakce mezi antigenem vzorku a antigenem vázaným v jamce mikrotitrační destičky s primární protilátkou [18].

Primární protilátka se nejprve inkubuje s antigenem vzorku a výsledný komplex protilátka-antigen se přidává do jamek, které byly potaženy stejným antigenem. Po inkubační době je veškerá nenavázaná protilátka vymyta. Čím více je antigenu ve vzorku tím více primární protilátky bude navázáno [19].

Výhody

- Vysoká citlivost na kompozitní rozdíly v komplexních směsích antigenů [20].



Obr. 15.. Kompetitivní ELISA (17)

3.5 Využití ELISA testu

- Screening dárců krve na virové infekce
 - HIV
 - Hepatitida C
 - Hepatitida B
- Hormonální hladiny
 - HCG (Human chorionic gonadotropin/choriový gonadotropin) – test těhotenství
 - LH (Luteinizing hormone/luteinizační hormon) – určení ovulace
 - TSH (Thyroid-stimulating hormone/thyreotropní hormon) – funkce štítné žlázy
 - HGH (Human growth hormone/lidský růstový hormon) – u sportovců doping
- Detekce infekcí
 - Sexuálně přenosné (HIV, syfilis, chlamydie)
 - Hepatitida B,C

- *Toxoplasma gondi*
- Detekce alergenů v jídle a prachu
- Stanovení revmatoidního faktoru, autoprotilátek u autoimunitních onemocnění
- Detekce drog
 - Opiáty
 - Kokain
 - Δ -9-tetrahydrocannabinol

4 ARCHEOLOGICKÝ KONTEXT

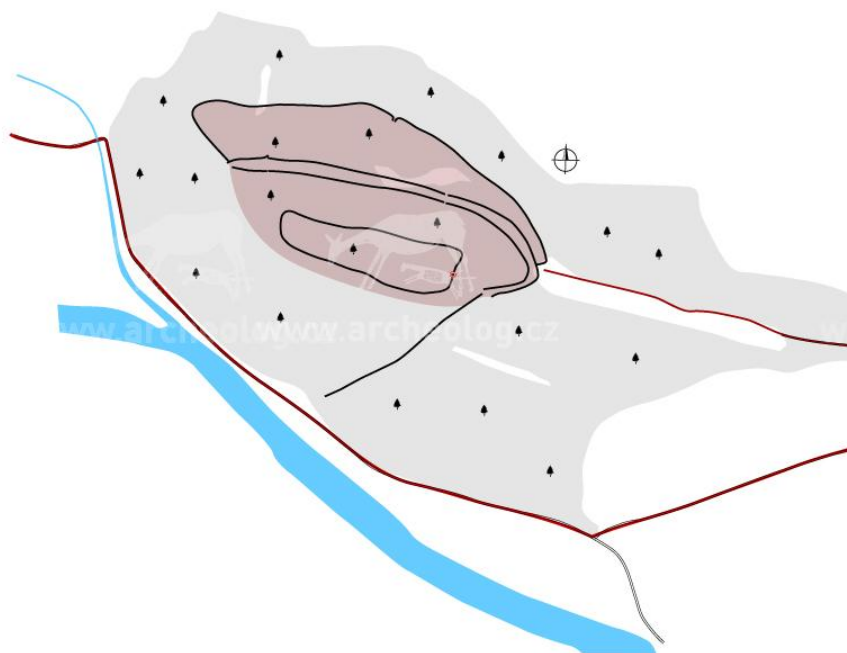
Archeologické nálezy keramických nádob a z nich získané vzorky, které jsou použité v této práci, pochází z archeologického naleziště Kněží Hora.

Kněží hora u Katovic se nachází 7 kilometrů severozápadně od města Strakonice a 1,5 kilometrů od obce Katovice na výrazném kopci s převýšením 70 metrů nad tokem řeky Otavy. Nejvyšší bod hradiště dosahuje výšky 493 metrů nad mořem. Toto středověké hradiště je jedním z nejlépe zachovaných lokalit tohoto typu na území Čech. Opevněná plocha má rozlohu 8 ha a její součástí je akropole s minimálně dvěma předhradími. Složitě opevnění, které je také velice dobře dochované má tvar elipsy s rozměry 380 x 220 metrů. Vzhledem k výhodné poloze nad řekou a složitému členění se dá říct, že hradiště bylo ve své době centrálním místem (Menšík 2016).

Kněží hora fungovala jako shromažďovací místo, ale převážně měla funkci obrannou. K výhodnému umístění hradiště přispěla i poloha u vodního toku, který znamenal důležitou obchodní cestu (Menšík 2016).

Momentálně vegetaci kopce tvoří teplomilná acidofilní doubrava, kde převládá dub zimní, borovice lesní a smrk ztepilý. Bylinné patro tvoří pokryv pouze 5 %. Z geologického hlediska je kopec tvořen biotitickou a sillimanit-biotitickou pararulou se zastoupením kvarcitu a erlanu. Na jihozápadě je na tyto horniny vázán grafit, který zde byl v první třetině 20. století těžen. Půdní pokryv je zde tvořen kyselou kambizemí a na svazích rankerem. Co se týká nerostného bohatství, v okolí hradiště se nachází druhotná ložiska zlata v náplavách vodních toků vyskytujících se v těsné blízkosti (Menšík 2016).

Kněží hora byla významným centrem středního Pootaví. Na území hradiště byly nalezeny stopy po dřívějším osídlení, konkrétně po kultuře mohylové z mladší doby halštatské a po kultuře slovanské (Čtverák a kol. 2003). Při výzkumech, které zde probíhaly, byly objeveny více než 7500 let staré štípané kameny, které dokazují osídlení hradiště lovci a sběrači ve střední době kamenné. Mezi další nálezy patří i zlomky z keramických nádob z období mladšího pravěku. Nejintenzivněji byla Kněží hora osídlena v období raného středověku, kdy toto území poprvé osídlili Slované (Menšík 2016).



Obr. 16. Schéma hradiště Kněží hora (Čtverák a kol 2003)

5 PŘÍPRAVA MATERIÁLU

Keramický materiál byl odebrán z kulturní vrstvy půdy z hloubky 20 – 30 cm pod současnou úrovní terénu. Tato vrstva spadá stejně jako analyzované keramické nálezy do období raného středověku, konkrétně pak do 9. století až první poloviny 10. století. Recentní kontaminace je málo pravděpodobná, nalezená keramika byla ihned po objevení odebrána a nepřišla do styku s recentní půdou na hradišti.

Samotný odkryv byl proveden pomocí několika sond na vrcholové části hradiště (na akropoli). V současné době je kopec porostlý smíšeným lesním porostem, kde převažuje buk a dub. Podle mapových podkladů z druhé poloviny 18. – 19. století a poloviny 20. století se zalesnění kopce téměř nezměnilo. Z jižní strany, kde je převýšení okolo 70 metrů, kopec obtéká řeka Otava, ze všech ostatních stran se pod kopcem nachází pole, která jsou od sond vzdálena okolo 300 metrů.

Vnitřní povrch vybraných vzorků ranně středověké keramiky byl pomocí smirkového papíru odstraněn do hloubky asi 0,5 mm. Poté bylo z tohoto místa (vyčištěného od povrchových nečistot skalpelem nabráno malé množství keramické hmoty. Tyto vzorky byly následně rozpuštěny ve fyziologickém roztoku a vortexovány po dobu 5 minut v Eppendorfových zkumavkách, aby byl pevný materiál oddělen a usazen na dně zkumavky. Zde nebyla použita žádná speciální metoda extrakce proteinů adsorbovaných na keramickou hmotu, protože tento krok by mohl poškodit proteinové struktury důležité pro naši metodu detekce (Baker 2010). Po tomto kroku byly 1,5 ml plastické zkumavky (eppendorf) 3 minuty ponechány stát v klidu aby byl zbylý keramický materiál usazen na dně. Z horní části zkumavky byl nepipetován vzniklý roztok o objemu 100 μ l, který byl použit pro následnou analýzu.

Vzorky půdy byly odebrány z vykopané kulturní vrstvy půdy v Katovicích z hloubky 20 – 30 cm, další kontrolní vzorek byl odebrán v prostoru pro prasata, který byl opuštěn po dobu pěti let (z hloubky asi 5 cm). Příprava vzorků půdy probíhala ve stejných krocích, jako byly popsány výše pro vzorky keramiky.

Před druhým cyklem imunologické analýzy byly vzorky vařeny při teplotě 97°C po dobu 15 minut za pomoci termostatu. 1,5 ml zkumavky musely být při vaření v termostatu otevřeny, aby nedošlo k poškození expanzí plynů. Tento krok byl proveden, aby byly proteiny přítomné ve vzorcích tepelně denaturovány, protože souprava ELISA použitá v této práci je specificky zaměřena na proteiny v této formě.

6 POSTUP PŘI DETEKCI PROTEINŮ

6.1 Potup při detekci proteinů vepřového masa

Identifikace proteinů pocházejících z masa domácích zvířat byla prováděna pomocí ELISA souprav pro identifikaci vepřového masa, které dodává společnost Neogen. [4] Tento test je určen speciálně pro detekci vařených bílkovin. Protilátky obsažené v testu mají silnou interakci s proteiny denaturovanými tepelnou úpravou.

1. V prvním kroku je potřeba nachystat si potřebný počet testovacích jamek (mikrotitrační destička) a vzorky, které budeme testovat.
2. Poté si připravíme promývací roztok (wash).
3. Na pipetě nastavíme 140 μl a napipetujeme dané množství promývacího roztoku do vzorků.
4. Z takto připravených vzorků nepipetujeme do 100 μl do jamek. Dále dáme do jedné jamky pozitivní a do jedné negativní kontrolu. V tomto kroku je důležité používat pro každý vzorek novou pipetovací špičku, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci.
5. Po tomto kroku následuje jedna hodina inkubace při pokojové teplotě.
6. Obsah jamek odstraníme a 4 krát promyjeme promývacím roztokem, aby byly z jamek odstraněny všechny zbytky roztoku s antigeny. Tento krok probíhal tak, že byl do jamek nepipetován promývací roztok, který byl následně prudkým pohybem vylit a poté byl ještě vyklepán do papírové utěrky, aby byl z jamek důkladně odstraněn. Mezi každým promytím je potřeba vyměnit papírovou utěrku aby nedošlo ke kontaminaci.
7. Dále je nutno přidat sekundární protilátku, které se podle instrukcí výrobce přidává o objemu 50 μl , po 15 minutách inkubace je opět vymyta promývacím roztokem obdobným způsobem, jako v předchozím kroku.
8. V posledním kroku testu je do každého vzorku přidáno 100 μl TMB substrátu.

9. Následuje opět inkubace, která trvá 45 minut ve tmě.
10. V závěrečném kroku je přidána některá slabá kyselina, označená jako „stop solution,,“, která zastaví všechny probíhající reakce a s TMB vytvoří při pozitivní reakci jasně žluté zbarvení, jehož intenzita se měří na spektrometru ELISA reader VERSAmaxTM (Molecular Devices) při 450 nm a v porovnání s pozitivní a negativní kontrolní reakcí se určí množství antigenu v testovacím vzorku.

6.2 Postup při detekci β -lactoglobulinu

Při identifikaci β -lactoglobulinu je potřeba vycházet z pozitivní a negativní kontroly a podle nich vyhodnocovat, zda je reakce pozitivní či negativní.

1. V prvním kroku si nachystáme mikrotitrační destičku s potřebným počtem jamek a vzorky, které budeme testovat.
2. Poté si připravíme promývací roztok (wash).
3. Na pipetě nastavíme 100 μ l a napipetujeme extrakční roztok (negativní kontrola)
4. V tomto kroku je nutné hned přidat do každé jamky 50 μ l BLG biotinu s navázanou sekundární protilátkou.
5. Poté následuje inkubace při pokojové teplotě 60 minut.
6. V tomto kroku je obsah jamek 5x promyt promývacím roztokem , který jsme si předem připravili.
7. Poté je do každé jamky přidáno 50 μ l avidin peroxidázy.
8. Zde následuje opět inkubace, která trvá 15 minut v pokojové teplotě.
9. Po inkubaci je obsah jamek promyt promývacím roztokem obdobně jako v bodu 6

10. Po promytí jsme do každé jamky přidali 100 μ l TMB substrátu
11. Poté následuje opět inkubace, tentokrát ve tmě po dobu 45 minut při pokojové teplotě.
12. V posledním kroku je do každé jamky přidáno 50 μ l stop solution, který zastaví reakci. Destičku lehce protřepeme aby bylo zabráněno dalšímu vývoji. Následuje opět inkubace, která podle pokynů výrobce trvá 10 minut, nám se ale osvědčilo tuto dobu protáhnout. Barva vzorků se mění z modré na žlutou .
13. Následuje měření na ELISA readru VERSAmaxTM (Molecular Devices). Jednotlivé hodnoty jsou díky speciálnímu softwaru zaznamenány do excelové tabulky. Jelikož se v tomto případě jednalo o kompetitivní ELISu, zbarvení se projevilo u negativních reakcí.

6.3 Postup při detekci kaseinu

1. V prvním kroku je nutné, stejně jako v předchozích testech, nejprve připravit potřebný počet jamek a vzorky, které budeme testovat, vzorky keramiky byly nadrceny pouze v destilované vodě.
2. Poté je potřeba připravit promývací roztok, pro který byla zvolena nejmenší možná koncentrace z nabízených možností.
3. Do prvních dvou jamek nejprve nepipetujeme 100 μ l pozitivní a negativní kontroly a do ostatních nepipetujeme testované vzorky.
4. Následuje inkubace po dobu 30 minut při pokojové teplotě.
5. Jamky promyjeme promývacím roztokem, v tomto kroku jsme promývání opakovali 3x.

6. Poté je nutné hned naředit protilátku (konjugát) s puftrem, jelikož naředěná je nestabilní. 100 μ l tohoto připraveného roztoku konjugátu enzymu nepipetujeme do jamek a necháme inkubovat po dobu 30 minut při pokojové teplotě.
7. Promyjeme 3x promývacím roztokem.
8. Do každé jamky přidáme 50 μ l chromogenu a 50 μ l substrátu, které způsobí specifické zbarvení reakce. Tyto roztoky je nutno po přidání jemně protřepat.
9. Poté následuje poslední inkubace v pokojové teplotě po dobu 30 minut.
10. V posledním kroku se přidá stop solution který zastaví reakci.
11. Následuje měření na ELISA readru VERSAmaxTM (Molecular Devices). Jednotlivé hodnoty jsou díky speciálnímu softwaru zaznamenány do excelové tabulky.

6.4 Postup při detekci gliadinu

Před samotnou laboratorní procedurou je nejprve nutné připravit vzorek, který je v tomto případě složitější než v předchozích případech, jelikož gliadin je nutné ze substrátu vymýt etanolem.

1. Nejprve si připravíme 55 % extrakční roztok etanolu.
2. Do čisté zkumavky dáme 1g namletého vzorku keramiky a přidáme extrakční přísadu.
3. V dalším kroku přidáme do zkumavky 10ml 55 % etanolu, těsně uzavřeme víčko na zkumavce a důkladně protřepeme.
4. Vzorek umístíme na 10 minut do třepačky pro důkladnou extrakci.

5. Poté každý vzorek zředíme v poměru 1:50 tak, že odebereme 100 µl horní vrstvy extraktu, přeneseme do zkumavky, ve které je již připraveno 4,9 ml ředícího roztoku.
6. Pro důkladné promíchání vortexujeme po dobu 5 s.

ELISA test:

1. Nejprve je nutné připravit potřebný počet jamek a vzorky, které budeme testovat se vzorky v roztoku a nepipetovat 100 µl vzorků a kontrol do jamek s protilátkami.
2. Poté následuje míchání po dobu 20 s a následná inkubace, která trvá 10 minut při pokojové teplotě (dobu inkubace je možno zvýšit na 30 minut).
3. Vzorky promyjeme promývacím roztokem pětkrát.
4. V dalším kroku přidáme 100 µl sekundární protilátky a 20s promícháme. Poté opět následuje 10 minut inkubace (tuto dobu je možné zvýšit na 30 minut) při pokojové teplotě.
5. Vzorky pětkrát promyjeme obdobně jako v kroku 3.
6. V tomto kroku přidáme 100 µl TMB, 20s promícháme a dáme na 10 inkubovat při pokojové teplotě.
7. Na rozdíl od doporučení výrobce se osvědčila jako stop solution 50 µl H₂SO₄.
8. Následuje měření na ELISA readru VERSAmaxTM (Molecular Devices). Jednotlivé hodnoty jsou díky speciálnímu softwaru zaznamenány do excelové tabulky.

7 VÝSLEDKY

Tab. 1 Výsledky imunologických analýz

Vzorek keramiky z vnitřku nádoby	GLIADIN (obilí)	KASEIN	betaLACTO-GLOBULIN (kravské mléko)	Nevařené vepřové maso	Vařené vepřové maso
K1	0	++	0	0	++
K1R	0	++		0+	+
K2	0+	++	0	+	++
K2R	0	++		0	+
K3	0	++	0	+	+
K3R	0	++		0	+
K4	+	++	0	0	+
K4R	0	++		0	0+
K5	0	++	0	0	+
K5R	0	++		0+	+
K6	0+	++	0	0	+
K6R		++		0	+
K7	0	+	0	0	0+
K7R		0+		0	0+
K8	0	0	0	+	+
K8R	0	++		0+	+
Trus prasete v hlíně 5 let starý				0+	+++

Legenda:

- 0** negativní výsledek
- 0+** slabá detekovatelnost
- +** slabší pozitivní reakce
- ++** pozitivní reakce
- +++** extra silně pozitivní reakce
- K** keramické vzorky
- R** kontrolní keramika odebraná z rubu nádoby ke každému vzorku
- Prázdná buňka** nebyla provedena žádná analýza

Použité testy byly v minulosti několikrát aplikovány a ve většině případech se osvědčily (Pavelka a Vařeka 2008, John a Pavelka 2010, Pavelka a Orna 2011).

Dle instrukcí výrobce testu může velmi slabá reakce znamenat, že byla analýza nesprávně provedena. Hlavním důvodem je, že byl vzorek nedostatečně promyt a v důsledku tohoto byl kontaminován, což způsobilo zbarvení reakce.

V tabulce je znázorněno osm testovaných vzorků keramiky (K1 – K8), z nichž ke každému byl testován kontrolní vzorek půdy (K1R – K8R). Kontrolní vzorky byly odebrány z bezprostřední blízkosti každého z příslušných vzorků. Pro interpretaci výsledků je velice důležité porovnat reakci vzorku před a po tepelné úpravě.

Co se týče gliadinu byly výsledky u většiny vzorků negativní (0) včetně kontrolních vzorků. Pouze u vzorků K2, K4 a K6 byly výsledky rozdílné. U K2 a K6 se objevila slabá detekovatelnost a u vzorku K4 byla reakce slabě pozitivní (Tab.1)

U mléčného proteinu kaseinu, který se vyskytuje v kozím mléce, byly výsledky ve velké míře pozitivní. Pouze vzorky K7 a K8 reagovaly odlišně než ostatní a to slabší reakcí a u vzorku K8 byla reakce negativní avšak u kontrolního vzorku byla reakce pozitivní.

Beta laktoglobulin, protein kravského mléka, měl u všech vzorků negativní reakci. Z finančních důvodů zde nebyla testována kontrolní hlína, avšak v tomto případě se zdá testování kontrolní půdy zbytečné.

U testovací soupravy na vepřové maso byly velmi rozdílné výsledky, pokud se jednalo o vařené a nevařené vzorky. Vzorky K1, K4, K5, K6 a K7 reagovaly odlišně, když byly testovány ve vařené a v nevařené variantě. Žádné nebo velmi slabé výsledky byly v případě, že vzorky nebylo uvařené a slabší nebo normální pozitivní výsledky vykazovaly vzorky po tepelné denaturaci.

8 DISKUZE

Asi největší a nejvýznamnější součástí středověké stravy byly obiloviny, které byly připravované řadou způsobů především k pečení chleba a k přípravě různých obilných kaší. Kaše byly velmi oblíbeným pokrmem, vařily se buď z pšeničné nebo žitné mouky a to jak na slaný tak na sladký způsob. Obiloviny patřily na stůl bohatých i chudších obyvatel. Další nedílnou složkou středověkého jídelníčku bylo proso, z kterého byly vařeny polévky, kaše, ale také s ním byla krmena domácí zvířata. Maso se ve středověku připravovalo ve vodě v hrnci a nebo se peklo na ohni, v některých případech ho lidé i udili. Velkou součástí bylo maso na jídelníčku především vyšších vrstev. Co se týče přípravy, byly zpracovány téměř všechny části zvířete. Chov domácích zvířat poskytoval lidem také mléko, které bylo využito na výrobu mnoha mléčných výrobků nebo na přímou konzumaci. Mimo maso a mléko patřilo do potravy také ovoce a zelenina (Jílková 2015).

Proso, jako další významnou potravinovou složku středověku, stejně jako luštěniny a ovoce, není zatím možno testovat, protože komerční ELISA kity jsou zaměřené především na nejrůznější alergeny. Tyto sady mají výhodu, že se jedná o dobře vyzkoušené a certifikované protilátky a při správném výběru zaměřeném na denaturované proteiny, lze mnohdy s úspěchem detekovat historické bílkoviny. Bohužel, ani za těchto předpokladů, není vždy možné všechny takto vybrané komerční sady s úspěchem aplikovat na archeologická organická rezidua (viz Pavelka a kol. 2016). Možnosti dostupných souprav (kitů) a jejich schopnost zachytit historické proteinové antigeny je nutno testovat, aby mohlo být definováno jejich širší využití. Protože se jedná o komerční sady, jsou testy dostupné a opakovatelné. V případě ovoce a zeleniny je však nutno se spoléhat pouze na výsledky hmotnostní spektroskopie, která je v současnosti užívanější metodou, i když v poslední době je mnohdy její citlivost stále nižší, než je tomu u detekce pomocí protilátek (viz Pavelka a kol. 2016). Samozřejmě identifikace historických reziduí pomocí hmotnostní spektrometrie, ať už se jedná o proteiny, nebo o lipidy, přináší spolehlivá data pro pochopení skladby potravin v minulosti, ale větší objem informací přináší analýzy, kdy na stejnou sadu vzorků jsou naráz využity všechny uváděné metody. Tato práce by měla přinést další metodiky a aplikace na poli využití ELISA kitů pro potřeby archeologie.

Jako první byl testován obilní antigen gliadin. Výskyt gliadinu na archeologických nádobách není nijak překvapivý, jelikož je známo, že ve středověku se konzumovalo velké množství obilných kaší. Proto bylo očekáváno vyšší zastoupení pozitivních výsledků,

avšak pouze jedna pozitivní a dvě slabě detekované pozitivní reakce z osmi testovaných vzorků keramiky je nápadně málo.

Sled výsledků u gliadinu může znamenat, že obilí přicházelo s keramickými nádobami méně do styku a bylo skladováno nebo připravováno jiným způsobem. Dalším důvodem proč je výskyt gliadinu na nádobách zastoupen méně může být fakt, že Kněžská hora byla hradištěm, která fungovala jako shromažďovací místo, nebo kde se stahovali lidé spíše v době krize a neprobíhala zde normální kuchyňská produkce, tedy nedocházelo k běžné přípravě a konzumaci obilných kaší, ale jinde připravovaného chleba, který není na nalezené keramice detekovatelný. Avšak konkrétní závěry jsou předčasné. Test na gliadin v porézní keramice byl dosud prováděn dosti omezeně, je proto nutné získat další a rozsáhlejší výsledky z jiných lokalit.

V případě detekce gliadinu je namístě zdůraznit jeho velkou výhodu, a to že se rozpouští etanolem a ne vodou jako tomu je v případě jiných proteinů. Díky tomu není roznášen na nežádoucí místa a obilniny je možné detekovat bez rizika kontaminace.

Na základě výsledků, které máme k dispozici u obou mléčných proteinů, je možné spekulovat, že v hradišti v Katovicích bylo více využíváno kozí mléko než mléko kravské. Je pravděpodobné, že obyvatelé tohoto hradiště nechovali krávy vůbec anebo byla tato zvířata ukryta v lese, aby nedošlo k jejich odcizení. Chov koz je daleko snadnější, jelikož nemají velké nároky na ustájení a je snazší je uživit. U kaseinu však nejsme zatím schopni rozlišit, zda se jedná o archaický zbytek bílkoviny, nebo jde o pozdější kontaminaci, která nemá se středověkou stravou nic společného. Vysoké pozitivní reakce u keramiky i u kontrolní půdy svědčí pro kontaminaci a neprůkaznost výsledků. Avšak negativní reakce u vzorku K8 a naopak silně pozitivní reakce u kontrolní okolní zeminy K8R může naznačovat, že kontaminace půdy nemusí zpravidla vždy reálně nasáknout do archeologické keramiky. Stejně tak nepřítomnost beta laktoglobulinu v keramice nasvědčuje tomu, že keramika není zasažena kontaminací z okolní půdy kravským mlékem. Tento problém s interpretací může rozhodnout o použití protilátek, které spolehlivě detekují archaické proteiny z kozího mléka (viz Pavelka a Vařeka 2008, Číperová 2015). Tento ELISA kit, určen k detekci proteinu kozího mléka, byl na trhu, avšak v současné době již není k dispozici a je nutné za něj najít odpovídající náhradu. Pak by bylo jasnější, zda se v keramice nalézají proteiny kozího mléka, které by svědčily pro středověkou stravu. Avšak vysoký výskyt kaseinu v půdě naznačuje s velkou

pravděpodobností kontaminaci zemědělským hnojením, jelikož se v poslední době kasein přidává do organických hnojiv (Suaréz a kol 2004). Na tomto místě se také nabízí spekulace, zdali nedošlo v historické době k vyhlazení zkaženého mléka na nějaké místo, které sloužilo jako odpad, kam se vyhazovala i rozbitá keramika. Toto by pomohly potvrdit další testy na kasein v různých vzdálenějších archeologických sond na téže lokalitě, případně podobné testy na keramice a půdě na dalších lokalitách.

Testované vzorky prokázaly jednoznačně přítomnost proteinů vepřového masa v keramice a zároveň kontaminaci v půdě. Zde nastává otázka, zda tyto nezpracované bílkoviny představují původní obsah, nebo by měly být považovány spíše za kontaminaci, která chronologicky nesouvisí s analyzovanou keramikou. V první řadě je třeba zodpovědět otázku, zda vepřové bílkoviny v keramických vzorcích byly vařené či nevařené. Protože test zaměřený na tepelně zpracované vzorky by neměl být úspěšný na nevařené proteiny. Proto byly testované ty samé vzorky na přítomnost prasečích proteinů dvakrát a to jednou nevařené a podruhé vařené.

Testy půdy, která bezprostředně obklopuje testované vzorky, poskytly v tomto ohledu důležité informace. Ve všech osmi případech vykazovaly vzorky půdy (K1R – K8R) buď žádné, nebo velmi slabé reakce protilátek na prasečí antigeny v substrátu vzorku. Avšak po tepelné denaturaci vykazovaly nízké pozitivní, ale dobře rozpoznatelné reakce. Pouze vzorek K4R reagoval po uvaření velmi slabě (viz. Tab. 1). Předpokládáme, že toto chování vzorků je způsobeno přítomností slizničních/epitelových buněk prasat žijících v zalesněné oblasti v okolí Kněžích Hory, které se společně s trusem dostávají do půdy. Výskyt těchto divokých zvířat je nejpravděpodobnějším vysvětlením, proč se tyto syrové proteiny vyskytují v půdním sloupci. Jako další kontaminační zdroj je možno považovat zemědělské hnojení. Tento faktor je třeba vzít více v úvahu právě s ohledem na další vzorky, zejména na silnou přítomnost kaseinu v půdě. Nelze očekávat, že se kasein do půdy dostal přirozeným způsobem, např. z místní fauny. A pokud pomineme lokální kontaminace vyhazovaným organickým materiálem, jeví se jako pravděpodobný zdroj kontaminace zemědělské hnojení. Hnojení trusem hospodářských zvířat v minulosti i v současnosti představuje velký problém pro výzkumy organických zbytků. Proteiny se mohou šířit vodou i prachem na širokých plochách a během času zasáhnout půdu i tam, kde k hnojení přímo nedošlo a tak kontaminovat i archeologickou keramiku uloženou pod povrchem. Je možno předpokládat, že tyto proteiny jsou většinou relativně mladého stáří a díky tomu mohly přežít v půdě v detekovatelné koncentraci. Pokud ano, je možné je

považovat za moderní kontaminující archeologické vrstvy, což přispívá k výskytu bílkovin v porézní archeologické keramice. Pokud by tato skutečnost nebyla důkladně zvážena, byly by výsledky archeologických analýz nesprávně interpretovány. Podobné podmínky ovlivňující obsah bílkovin v archeologickém půdním archivu, jsou poměrně běžné a v budoucím výzkumu si zaslouží odpovídající pozornost. Je možné například testovat vzorky z různé hloubky a zjišťovat zda některé typy půd překrývající nálezy jsou schopné kontaminaci zadržet. Stejně tak je žádoucí provádět vlastní testy v terénu na kopiích archeologické keramiky.

Jako příklad řešení interpretačních nejasností je provedený experiment, kdy byla testována půda z nedávného prasečího výběhu, který se nepoužíval posledních 5 let. Zde je samozřejmé, že je půda intenzivně kontaminována prasečím trusem. Neuvařený vzorek vykazoval velmi slabou reakci na detekční limit testu ELISA. Avšak po tepelné denuraci tohoto vzorku byla pozorovaná reakce na protilátky velmi silná. Tento experiment s velkou pravděpodobností vysvětluje, co se stalo na archeologické lokalitě v Katovicích, kde lesní půda reaguje s imunologickou soupravou stejným způsobem, i když méně silným. To může jednoduše naznačovat nižší koncentraci prasečích proteinů v lesní půdě kvůli větší ploše rozptýlení zvířat a větší hloubce, ze které byly odebrány vzorky archeologických sedimentů, případně omezenější kontaminaci prachem či spodní vodou hnojivy ze zemědělství. Nálezy v archeologických sondách byly uskutečněny na kopci a zemědělské pole je v současnosti vzdálené přibližně 300 metrů.

Celkově předložená práce řeší některé problémy s kontaminacemi archeologické keramiky, zejména v případě prasečího hnoje. Jinde prokazuje zanedbatelné riziko kontaminací, a to v případě obilnin, respektive testovaného gliadinu. Naopak u mléčných proteinů nastoluje dosud nevyřešené otázky a nastiňuje výzkum do budoucnosti

9 ZÁVĚR

Mnoho studií prokázalo potenciál konzervace proteinů v celé škále různých historických pozůstatků a nálezů jako například v kostech, ve fosíliích, v malířské barvě, v sedimentech a tak dále. Jiní, například Craig a Collins (2002) se pokoušeli lépe porozumět potenciálu konzervace bílkovin testováním experimentálně vyrobených komplexů protein-keramika. Ačkoli jsou tyto studie cenné, jsou založeny na nereálných modelech. Například příprava testovaných vzorků zahrnovala převážně purifikované

proteiny než skutečné potraviny (Barbard a kol. 2007). V reálném prostředí je pravděpodobné, že uchování proteinů bude z části zprostředkováno i přítomností jiných sloučenin (lipidy nebo alkaloidy), které by mohly zvýšit pravděpodobnost konzervace inhibicí růstu mikroorganismů nebo vytvořením vodotěsné bariéry. Jiné studie (Solazzo a kol. 2008, Tokarski a kol 2006) podporují názor, že v uchování bílkovin hraje roli prostředí, kterému jsou vystaveny, avšak přesné limity těchto podmínek nebyly důkladně prozkoumány (Baker 2010).

Pro potřeby této práce byla použita dříve již osvědčená metoda ELISA, která na základě reakce antigenu s protilátkou dokáže detekovat proteiny na archeologické keramice. Tato metoda se ukázala vzhledem ke své jednoduchosti a nenáročnosti jako velmi výhodná. Na rozdíl od hmotnostní spektrometrie⁵ je identifikace bílkovin pomocí protilátek citlivější. Tímto způsobem bylo prokázáno, že se na archeologických nálezech z hradiště Kněží Hora nachází mléčné proteiny (převážně kasein), gliadin a proteiny vepřového masa.

Dále byl navržen metodologický přístup založený na identifikačním souboru vařených živočišných druhů, který ukazuje schopnost rozlišit syrové (biologicky aktivní) a vařené živočišné bílkoviny. Toto zjištění nabízí nový způsob rychlé identifikace živočišných proteinů pocházejících z vybraných druhů (v tomto případě to byla prasata) a rozlišení mezi vařenými a syrovými proteiny tohoto druhu. Tato schopnost má hluboký dopad na správnost výkladu mezi vařenými živočišnými proteiny, které nejspíše představují zbytky potravin adsorbovaných v porézní keramice a syrové tepelně neupravenými proteiny.

⁵ Hmotnostní spektrometrie je analytická technologie, která ionizuje chemické sloučeniny a třídí ionty na základě jejich poměru hmotností k náboji. Jinými slovy měří hmotnost uvnitř vzorku (Broskevičková 2014)

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Avrameas, S.; Uriel, J.: *Methode de marquage d'antigenes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion.*, 1966. C. r. Sdanc. Acad. Sci., Paris 262, 2543.

Barker, A.: *Archaeological proteomics: method development and analysis of protein-ceramic binding*, 2010. Disertační práce. University of North Texas. Department of Geography.

Barnard, H.; Shoemaker, L.; Craig, O.E.; Rider, M.; Parr, R.E.; Sutton, M.Q.; Yohe, R.M.: *Theory and Practice of Archaeological Residue Analysis. Archaeopress. Introduction to the analysis of protein residues in archaeological ceramics*, 2007. Oxford, 216-228.

Belluomini, G.; Brancaj, M.; Calderoni, G.; Schnitzer, M.: *Distribution and geochemical significance of amino acids and amino sugars in a clay suite of the Pliocene – Pleistocene age from central Italy*, 1986. Org. Geochem. 9, 127–133.

Broskevičková, L.: *Využití hmotnostní spektrometrie pro identifikaci a kvantifikaci proteinových biomarkerů*, 2014. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. Katedra buněčné biologie a genetiky.

Collins, M. J.; Nielson-Marsh, C. M.; Hiller, J.; Smith, C.I.; Roberts, J.P.; Prigodich, R.V.; Weiss, T.J.; Csapó, J.; Millard, A.R.; Turner-Walker, G.: *The survival of organic matter in bone*, 2002.. Archaeometry 44, 383-394.

Copley, M. S.; Berstan, R.; Dudd, S. N.; Aillaud, S.; Mukherjee, A. J.; Straker, V.; Payne, S.; Evershed, R. P.: *Processing of milk product in pottery vessels through British prehistory*, 2005. Antiquity 79, 895-908.

Craig, O.E.; Collins, M.J.: *An improved method for the immunological detection of mineral bound protein using hydrofluoric acid and direct capture*, 2000. Journal of Immunological Methods 236, 89-97.

Craig, O.; Mulville, J.; Pearson, M. P.; Sokol, R.; Gelsthrpe, K.; Staceyll, R.; Collins, M.: *Detecting milk proteins in ancient pots*, 2000. Nature 408, 312.

Craig, O. E.; Taylor, G.; Mulville, J.; Collins, M.J.; Pearson, M.P.: *The identification of prehistoric dairying activities in the western isles of Scotland: an integrated biomolecular approach*, 2005. *Journal of Archaeological Science* 32, 91-103.

Cvrček, P.: *Aplikace imunochemické metody ELISA v analytice životního prostředí*, 2012. Univerzita T. Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Ústav inženýrství polymerů.

Kohler, G.; Milstein, C.: *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*, 1975. *Nature* 256. 495 – 497.

Číperová, M.: *Detekce potravin na archeologické keramice*, 2015. Bakalářská práce. Západočeská univerzita. Fakulta filozofická. Katedra archeologie.

Čtverák, V.; Lutovský, M.; Slabina, M.; Smejtek, L.: *Encyklopedie hradišť v Čechách*. Praha. 2003. Marxová, Ž.: *Maillardova reakce*, 2011. Univerzita T. Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.

Dalgleish, D. S.; Spangnolo, P. A.; Goff, H. D., *A possible structure of casein micelle based on high-resolution field-emission scanning elektron microscopy*. *International Dairy Journal*, 14 (12), 1025 – 1031

Doubrava, J.; , Košťiř, J.V.; Pospíšil, J.: *Základy biochemie*. Praha: SPN, 1984.

Engvall, E.; Perlmann, P.: *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), 1971*. Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871–4.

Engvall E. Quantitative enzyme immunoassay (ELISA) in microbiology. *Med Biol* 1977;55:193–200.

Fremout, W.; Sanyova, J.; Saverwyns, S.; Vandenabeele, P.; Moens, L.: *Identification of protein binders in works of art by high-performance liquid chromatography-diode array detector analysis of their tryptic digests*, 2009. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 1991-1999.

Gerlach, S. C.; Newman, M.; Knell, E. J.; Hall E.S. Jr.: *Blood protein residues on lithic artifacts from two archaeological sites in the de long mountains, northwestern Alaska*, 1995. *Arctic* 49, 1-10.

Hodeček, R.: *Používané metody pro stanovení termolabilních bílkovin v procesu výroby vína a jejich srovnání*, 2016. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně. Zahradnická fakulta v Lednici.

Hořejší, V.; Bartůňková, J.: *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.

Hofreiter, M.; Jaenicke, V.; Serre, D.; von Haeseler, A.; Pääbo, S.: *DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA*, 2001. *Nucleic Acid Research* 29, 4793 - 4799.

Hynková, A.: *Vazba organických barviv na proteiny*, 2010. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra biochemie.

Jílková, M.: *Výživa ve středověké Evropě a stabilní izotopy*, 2015. Univerzita Karlova v Praze. Fakulta přírodovědecká.

Keller, A.; Graefen, A.; Ball, M.; Matzas, M.; Boisguerin, V.; Maixner, F.; Leidinger, P.; Backes, C.; Khairat, R.; Forster, M.; Stade, B.; Franke, A.; Mayer, J.; Spangler, J.; McLaughlin, S.; Shah, M.; Lee, C.; Harkins, T.T.; Sartori, A.; Moreno-Estrada, A.; Henn, B.; Sikora, M.; Semino, O.; Chiaroni, J.; Rootsi, S.; Myres, N.M.; Cabrera, V.M.; Underhill, P.A.; Bustamante, C.D.; Vigl, E.E.; Samadelli, M.; Cipollini, G.; Haas, J.; Katus, H.; O'Connor, B.D.; Carlson, M.R.; Meder, B.; Blin, N.; Meese, E.; Pusch, C.M.; Zink, A.: *New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing*, 2012. *Nat Commun.* 28, 698.

Kooyman, B.; Newman, M.E.; Cluney, C.; Lobb, M.; Tolman, S.; McNeil, P.; Harris, L.V.: *Identification of horse exploitation by clovis hunters based on protein analysis*, 2001. *American Antiquity* 66, 686-691.

Kuckova, S.; Hynek, R.; Kodicek, M.: *Identification of proteinaceous binders used in artworks by MALDI-TOF mass spectrometry*, 2007 *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388, 201-206.

Lequin, R. M.: *Enzyme Immunoassay (EIA)/ Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, 2005. *Clinical Chemistry* 51/12, 2415-2418.

Mensík, P.; Král, V.: *Cyklus kořeny XXXVII - Archeologický výzkum hradiště „Kněží hora,, u Katovic v roce 2017*, 2017. Katovický zpravodaj podzim 2017, 7

Oudemans, T.F.M.; Boon, J.J.: *Molecular archaeology: analysis of charred (food) remains. from prehistoric pottery by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry*, 1991 Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 20, 197-227.

Pavelka, J.; Vařeka, P.: *Příspěvek k poznání stravy ve vrcholném a pozdním středověku: první výsledky analýzy potravinových zbytků na keramice z archeologických výzkumů*, 2008. Kuděj 10/2, 98-109. ISSN: 1211-8109

Pavelka, J.; Vařeka, P.: *Příspěvek k poznání stravy ve vrcholném a pozdním středověku : první výsledky analýzy potravinových zbytků na keramice z archeologických výzkumů*, 2008. Kuděj 10, č. 2, 98-109. ISSN: 1211-8109

Pavelka, J.; Šmejda, L.; Hynek, R.; Hrdličková, Kučková, Š.: *Immunological detection of denatured proteins as a method for rapid identification of food residues on archaeological pottery.*, 2016. Journal of Archaeological Science 73/6, 25-35. ISSN: 0305-4403

Pavelka, J.; Orna, J.: *Výsledky potravinových zbytků na pozdně středověké keramice v Plzni*, 2011. Acta FF ZČU. 3, 85-98

Salque. M.: *Tracing pottery use and the emergence of secondary product exploitation through lipid residue analysis at Late Neolithic Tell Sabi Abyad*, 2015. Journal of Archaeological Science 64, 54-66.

Schmidt-Schultz, T.H.; Schultz, M.: *Bone protects proteins over thousands of years: Extraction, analysis, and interpretation of extracellular matrix proteins in archeological skeletal remains*, 2004. American Journal of Physical Anthropology 123, 30-39.

Schweitzer, M. H.; Zheng, W.; Organ, C. L. ; Avci, R.; Suo, Z.; Freimark, L. M.; Lebleu, V. S.; Duncan, M. B.; Heiden, M. G. V.; Neveu, J. M.; Lane, W. S.; Cottrell, J. S.; Horner, J. R.; Cantley, L. C.; Kalluri, R.; Asara, J. M.: *Biomolecular characterization and protein sequences of the cam-panian hadrosaur B. canadensis*, 2009. Science 324, 626-631.

Shewry, P.R.; Halford, N.G.; Tatham, A.S.; Popineau, Y.; Lafiandra, D.; Belton, P.S.: *The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties*, 2003. Advances in Food and Nutrition research.

- Suárez, P.,C; Seoane; S., López Mosquera; E., Solla-Gullon, F; Merino, A.: *Dairy industry sewage sludge as a fertilizer for an acid soil: a laborator experiment with Lolium mstiflorum L.*, 2004. Spanish Journal of Agricultural Research 2(3), 419-427.
- Tokarski, C.; Martin, E; Rolando, C.; Cren-Olive, C.: *Identifcation of proteins in renaissance paintings by proteomics*, 2006. Analytical Chemistry 78, 1494-1502.
- Valenta, T.: *Enzymatická hydrolyza sacharidů a proteinů*, 2009. Univerzita T. Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Ústav potravinářského inženýrství.
- van Weemen, B.K.,; Schuurs, A.H.W.M.: *Immunoassay using antigenenzyme conjugates*, 1971 FEBS Letts 1971;15:232–6.
- van der Waart M.; Snelting, A.; Cichy, J.; Wolters, G.; Schuurs: *Enzyme-immunoassay in diagnosis of hepatitis with emphasis on the detection of “e” antigen (HbeAg)*. J Med Virol 1978;3:43–9.
- Voráčková, K.: *Diagnostické využití monoklonálních protilátek v medicíně a kriminalistice*, 2010. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Přírodovědecká fakulta.
- Whitney, R.M.; Brunner, J.R; Ebner, K.E.: *Nomenclature of the proteins of cow's' milk*, 1976. Journal of Dairy Science, 59, 795.
- Wolters, G.; Kuijpers, L.P.C.; Kacaki, J.; Schuurs, A.H.W.M.: *Enzymeimmunoassay for HbsAg*. 1976.

10.1 Elektronické zdroje

- [1] *Wikiskripta*, 2017 [online]. LF UK. [cit. 25.4.2018]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/B%C3%ADlkoviny_\(1._LF_UK,_NT\)](https://www.wikiskripta.eu/w/B%C3%ADlkoviny_(1._LF_UK,_NT))
- [2] *Wikiskripta*, 2017 [online]. LF UK. [cit. 30.5.2018]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce
- [3] *Metabolis Healing*, 2011 [online]. [cit. 25.5.2018]. Dostupné z: <https://metabolichealing.com/wheat-gluten-gliadin-3-possible-inflammatory-offenders/>
- [4] *Nobel Prize*, 2013 [online.] [cit. 8.3. 2018]. Dostupné z: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/themes/medicine/lindsten-ringertz-rev/index.html
- [5] *Expedeon*, 2017 [online]. [cit. 6.6.2018]. Dostupné z: <https://www.expedeon.com/guides/antibody-labeling-guides/biotin-streptavidin-interaction/>
- [6] *Expedeon*, 2017 [online]. [cit. 6.6.2018]. Dostupné z: <https://www.expedeon.com/guides/antibody-labeling-guides/biotin-streptavidin-interaction>
- [7] *The ELISA Handbook*, 2017 [online]. Boster Biological Technology. [cit. 1.2.2018]. Dostupné z: http://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf
- [8] *The ELISA Handbook*, 2017 [online]. Boster Biological Technology. [cit. 1.2.2018]. Dostupné z: http://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf
- [9] *The ELISA Handbook*, 2017 [online]. Boster Biological Technology. [cit. 1.2.2018]. Dostupné z: http://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf
- [10] *The ELISA Handbook*, 2017 [online]. Boster Biological Technology. [cit. 1.2.2018]. Dostupné z: http://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf
- [11] *The ELISA Handbook*, 2017 [online]. Boster Biological Technology. [cit. 1.2.2018]. Dostupné z: http://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf
- [12] *The ELISA Handbook*, 2017 [online]. Boster Biological Technology. [cit. 1.2.2018]. Dostupné z: http://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf

- [13] *The ELISA Handbook*, 2017 [online]. Boster Biological Technology. [cit. 1.2.2018].
Dostupné z: http://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf
- [14] *The ELISA Handbook*, 2017 [online]. Boster Biological Technology. [cit. 1.2.2018].
Dostupné z: http://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf
- [15] *The ELISA Handbook*, 2017 [online]. Boster Biological Technology. [cit. 1.2.2018].
Dostupné z: http://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf
- [16] *The ELISA Handbook*, 2017 [online]. Boster Biological Technology. [cit. 1.2.2018].
Dostupné z: http://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf
- [17] *The ELISA Handbook*, 2017 [online]. Boster Biological Technology. [cit. 1.2.2018].
Dostupné z: http://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf
- [18] *The ELISA Handbook*, 2017 [online]. Boster Biological Technology. [cit. 1.2.2018].
Dostupné z: http://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf
- [19] *The ELISA Handbook*, 2017 [online]. Boster Biological Technology. [cit. 1.2.2018].
Dostupné z: http://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf
- [20] *The ELISA Handbook*, 2017 [online]. Boster Biological Technology. [cit. 1.2.2018].
Dostupné z: http://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf
- [21] *Biological Macromolecular Structures Enabling Breakthroughs in Research and Education*, 2004 [online]. Protein Data Bank. [cit. 3.6.2018] . Dostupné z:
<http://www.rcsb.org/structure/1S9V>

10.2 Seznam obrázků

Obr. 1 Denaturace proteinů, a) původní protein, b) denaturovaný protein	4
Obr. 2 Peptidová vazba.....	5
Obr. 3 Kaseinová micela	6
Obr. 4 Stavba beta-laktoglobulinu (Swaisgood, 1996)	7
Obr. 5 Stavba gliadinu	8
Obr. 6. Promoční foto prvního EIA testu pro testování hepatitidy B, Organon Technika....	10
Obr. 7. Obecný princip metody ELISA	11
Obr. 8. Mikrotitrační destička.....	12
Obr. 9. Antigen s navázanou protilátkou	13
Obr. 10. Struktura imunoglobulinu IgG	14
Obr. 11. Avidin-biotin komplex	16
Obr. 12. Přímá ELISA	18
Obr. 13. Nepřímá ELISA.....	19
Obr. 14. Sendvičová ELISA	20
Obr. 15.. Kompetitivní ELISA	21
Obr. 16. Schéma hradiště Kněží hora.....	23

10.3 Seznam tabulek

Tab. 1 Výsledky imunologických analýz	30
---	----