

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

**STUDIUM POTRAVNÍCH REZIDUÍ Z RŮZNÝCH NALEZIŠŤ
PŘEVÁŽNĚ HALŠTATSKÝCH A Z DOBY BRONZOVÉ**

Alena Fišerová

Přírodovědná studia, obor Biologie se zaměřením na vzdělávání

Vedoucí práce: Mgr. Jaroslav Pavelka, Ph.D.

Plzeň, 2019

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

V Plzni, 30. dubna 2019

.....
vlastnoruční podpis

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Jaroslavu Pavelkovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost a cenné rady při zpracování mé kvalifikační práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za neochvějnou podporu, kterou mi stále poskytují.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Alena FIŠEROVÁ**
Osobní číslo: **P16B0356P**
Studijní program: **B1001 Přírodovědná studia**
Studijní obor: **Biologie se zaměřením na vzdělávání**
Název tématu: **Studium potravních reziduí z různých nalezišť převážně halštatských a z doby bronzové**
Zadávací katedra: **Centrum biologie, geověd a envigogiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracování současné naší i zahraniční literatury.
2. Praxe v laboratoři.
3. Zvládnutí molekulárně biologických technik, přednostně ELISA test.
4. Návaznost na předchozí analýzy na pracovišti.
5. Zpracování a izolace biologických vzorků z porézní keramiky a povrchů bronzových nádob.
6. Sepsání odborné kvalifikační práce dle požadovaných kritérií.

Rozsah grafických prací:

Rozsah kvalifikační práce: **30-50 normostran**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Čiperová, M.; Pavelka, J.; Šmejda, L. Detekce stop mléka v porézní keramice z neolitu jihozápadních Čech a otázka trávení laktózy u evropských populací v minulosti. Acta Fakulty filozofické Západočeské univerzity v Plzni, 2015, roč.7. č.2, s.193-211, ISSN 1802-0364.

Evershed RP, Payne S, Sherratt AG, Copley MS, Coolidge J, Urem-Kotsu D, Kotsakis K, Ozdoğan M, Ozdoğan AE, Nieuwenhuys O, Akkermans PM, Bailey D, Andeescu RR, Campbell S, Farid S, Hodder I, Yalman N, Ozbaşaran M, Biçakci E, Garfinkel Y, Levy T, Burton MM. 2008 Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. Nature.25;455(7212):528-31.

COPLEY, S. Mark, BERSTAN, Robert, DUDD, N. Stephanie et al. (2005a): Processing of milk products in pottery vessels through British prehistory. Antiquity 79, s. 895908.

COPLEY, S. Mark, BERSTAN, Robert, MUKHERJEE, J. Anna et al. (2005b): Dairying in antiquity. III. Evidence from absorbed lipid residues dating to the British Neolithic. Journal of Archaeological Science 32, s. 523546.

CRAIG, E. Oliver, CHAPMAN, John, FIGLER, András et. al. (2003): 'Milk Jugs' and other Myths of the Copper Age of Central Europe. European Journal of Archaeology 6, s. 251265.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Jaroslav Pavelka, Ph.D.


Centrum biologie, geověd a envigogiky

Datum zadání bakalářské práce:

14. června 2018

Termín odevzdání bakalářské práce:

30. června 2019


RNDr. Miroslav Randa, Ph.D.
děkan




Prof. RNDr. Michal Mergl, CSc.
vedoucí střediska

V Plzni dne 24. září 2018

OBSAH

1	ÚVOD.....	3
2	DEGRADACE PROTEINŮ	4
2.1	DENATURACE PROTEINŮ	4
2.2	DETEKCE ORGANICKÝCH ZBYTKŮ	4
2.2.1	Hmotnostní spektrometrie.....	4
2.2.2	Testování protilátek.....	4
2.3	DEGRADACE PROTEINŮ A LIPIDŮ.....	5
3	PŮSOBNÍ IONTŮ MĚDI NA PROTEINY	7
3.1	MĚĎĚNÉ IONTY	7
3.2	PROTEINY.....	7
4	MATERIÁL A METODY.....	9
4.1	TESTOVANÉ NÁDOBY	9
4.2	TESTOVACÍ METODY	9
4.2.1	Hmotnostní spektrometrie.....	9
4.2.2	Antigen - protilátka.....	11
4.2.3	ELISA test	12
4.2.4	LFIA	12
4.3	DETEKCE PROTEINŮ.....	13
4.3.1	Sendvičová ELISA	13
4.3.2	Kompetitivní ELISA.....	15
4.3.3	Reveal [®] 3-D test.....	16
4.3.4	ELISA testy	16
4.3.5	Vyhodnocení reakcí.....	21
4.4	DALŠÍ MOŽNÉ METODY TESTOVÁNÍ	22
5	VÝSLEDKY.....	26
5.1	LOKALITA ROVNÁ.....	26
5.1.1	Situla	26
5.1.2	Mísa	26
5.1.3	Kotel.....	26
5.1.4	Cista	26
5.2	LOKALITA STEBNO, TÁLÍN, TURSO A KRALICE	28
5.2.1	Stebno	28
5.2.2	Tálín	28
5.2.3	Turso	29
5.2.4	Kralice	31
6	DISKUZE.....	32
6.1	ZÍSKÁVÁNÍ VZORKŮ Z NÁDOB	32
6.2	ROZKLAD PROTEINŮ	32
6.3	PROTEINY VEPŘOVÉHO MASA.....	32
6.4	TUKY, VOSKY, PRYSKYŘICE	33
6.5	VÝZNAM NÁLEZŮ	33
6.6	KONTAMINACE.....	34
6.7	LIPIDY	34
6.8	METODIKA	35
7	ZÁVĚR	36
8	RESUMÉ.....	37

SEZNAM LITERATURY 39
SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A DIAGRAMŮ..... I

1 Úvod

Cílem této práce je ověření stupně zachovalosti zbytků potravin v bronzových nádobách z halštatských nalezišť a z doby bronzové. Nálezy byly testovány na přítomnost různých druhů potravin, zejména obilí, mléka, hovězího, vepřového a ovčího masa a také na přítomnosti vajíček. Práce by měla dokázat, jaké je působení měděných iontů na uchovávané zbytky potravin – zda se uchovávají lépe či hůře, než v dosud studované keramice. Rovněž by měla práce zjistit, co všechno se v minulosti ve studovaných bronzových nádobách uchovávalo a jaký byl jejich hlavní účel. Současně byly testovány zbytky nalezené na dalších bronzových předmětech (náramky, jehlice, dýka apod.).

Nalezené nádoby jsou jedním z důležitých zdrojů, které nám mohou pomoci osvětlit ekonomické a spotřební poměry na dané lokalitě v minulosti. Ať už z pohledu potravin – co vše lidé na daném území konzumovali, tak také z pohledu materiálního – co vše měli k dispozici a z čeho vyráběli nádoby a věci pro každodenní použití. Samozřejmě z analýz můžeme také zjistit, jaká zvířata byla v té době na dané lokalitě chována či konzumována – zbytky masa a jiných živočišných produktů byly ukládány do nádob, které byly podrobeny testům. Další informace, zejména z archeologického pohledu, jsou zjištění, jaké potraviny byly uchovávány v jakých nádobách a jak moc byly dané zbytky potravin chráněny proti degradaci či denaturaci v dlouhém časovém období, což je hlavním cílem mé práce.

Díky nálezům keramických nádob víme, jak působil keramický povrch nádob a potraviny a jak dobře či špatně je uchovával. Tato studie by měla zjistit, jak působil bronz na uchovávané potraviny, v jaké formě se dochovaly zbytky potravin a měla by také přinést srovnání, zda byly potraviny lépe chráněné v keramických či bronzových nádobách.

2 DEGRADACE PROTEINŮ

2.1 DENATURACE PROTEINŮ

Hlavním problémem uchovávaných potravin je denaturace proteinů. Jedná se o změnu terciální struktury (Pavelka a Orna 2011), kde jsou dlouhé řetězce aminokyselin stočeny do prostorových struktur, tzv. „klubíček“ a tyto struktury jsou posléze narušovány a rozbíjeny. Na uchovávané potraviny působí tři druhy denaturace – fyzikální, chemická a biologická. Za fyzikální považujeme vliv zvýšených teplot při přípravě pokrmů či jejich ohřívání. Chemická denaturace vzniká během uchovávání působením různých chemických sloučenin v zemině. Tyto sloučeniny mohou mít minerální i biologický původ (Barnard et al. 2007). V poslední době zjišťujeme vliv produktů chemického průmyslu či zemědělství – hnojiva. Biologická denaturace vzniká za působení půdních bakterií či jiných mikroorganismů (Barnard et al. 2007).

K degradaci proteinů v zemině dochází většinou díky mikroorganismům, ale podílí se na ní i mezofauna jako žížaly a larvy hmyzu (Loll a Bollag 1983). Pokud se jedná o proteiny nasáklé v keramice, jsou však do značné míry chráněny před biologickými a jinými vlivy (Craig a Collins 2000; Eerkens 2005; Baker 2010), avšak není příliš zdokumentováno, jak se může při ochraně uplatnit existence oxidů mědi, pokud jsou organické zbytky nalepené na bronzovém artefaktu.

2.2 DETEKCE ORGANICKÝCH ZBYTKŮ

2.2.1 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

V současnosti se organické zbytky, zejména lipidy a proteiny, v archeologii detekují hlavně pomocí hmotnostní spektrometrie označované zkratkou MS (z anglického *Mass spectrometry*).

2.2.2 TESTOVÁNÍ PROTILÁTEK

Jako vhodné se však ukázalo použít testy na alergenů, které jsou velmi přesné a zachytí i malou kontaminaci (Pavelka et al. 2016). Řada dřívějších pokusů s použitím testů protilátek na archeologickém materiálu nepřinesla konzistentní výsledky a následně byla vnímána spíše kriticky. Zejména byly problematické nespecifické reakce (cross-reakce). Problém nespecifických reakcí byl zmíněn v publikaci Child a Pollard (1992), také byly tyto nespecifické reakce experimentálně studovány

Collinsem et al. (1992). Dongoske et al. (2000) uvádějí varování, že degradace proteinů může mít za následek vazbu antigenu, která odpovídá za nespecifické reakce testů ELISA. Brandt et al. (2002) správně varují před použitím mnohých protilátek na historické proteiny. Je možno souhlasit, že je zcela nevhodné aplikovat na historické silně degradované proteiny protilátky připravené proti proteinům nativním, jak se to v minulosti mnohdy stávalo. Avšak nelze souhlasit s určitou skepsí a zavržením celé metodiky. Proto je v případě použití protilátek na historické proteiny nutné použít takové, které jsou schopné specificky detekovat degradované proteiny a ne reagovat nespecificky s jinými. Zároveň takové, které by byly dostupné všem uživatelům a výsledky by byly srovnatelné, nejlépe nějaké komerčně dostupné. Takové komerční protilátky existují a jsou kvalitně testovány, aby byly schopné identifikovat i stopy odlišných tkání v různě zpracovaných potravinách (Björklund et al. 2001). Jako vhodné se prokázaly některé sady k detekci tepelně upravených proteinů v potravinách, které jsou připraveny proti tepelně denaturovaným proteinům (Pavelka a Vařeka 2008; Pavelka a Orna 2011; Čiperová et al. 2015; Pavelka et al. 2016).

2.3 DEGRADACE PROTEINŮ A LIPIDŮ

Tato práce se zaměřuje především na historické proteiny, avšak byly pro srovnání provedeny i některé analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie na lipidy, vzhledem k větší popularitě těchto analýz při zkoumání archeologických zbytků potravin. Lipidy jsou relativně výhodnější, dobře se zachovávají v keramice, kde jsou chráněny před okolními fyzikálními vlivy, které je jinak narušují (Evershed 1993; Evershed et al. 1999). Metoda umožní do určité míry rozlišit lipidy nejdůležitějších domácích zvířat, na jedné straně převýkavce jako jsou ovce a dobytek, na druhé straně tuk zvířat jako jsou prasata (Mottram et al. 1999). Nicméně citlivějšího určení tato metoda schopná není. Na organické zbytky nacházející se na bronzu pravděpodobně ještě aplikována nebyla.

Proteiny mají lepší taxonomickou specifitu než lipidy. Jejich chemická struktura přesně odráží genetický kód, který byl potřebný k jejich vzniku (Barnard et al. 2007), proto je můžeme určit daleko přesněji v porovnání s lipidy.

U potravin uchovávaných v nádobách se dá předpokládat fyzikální denaturace a pokusím se zjistit, jak moc dochází k denaturaci biologické či chemické. Z prací Pavelka a Vařeka (2008), Pavelka a Orna (2011) a Craig a Collins (2000), které se

zabývaly keramickými nálezy, víme, v jaké míře podléhaly potraviny degradaci při uchovávání. Zbývá otázka, zda jsou potraviny v bronzových nádobách chráněny proti denaturaci lépe či nikoliv.

Proteiny byly zkoumány také z kamenných nástrojů či dobových maleb (Kooyman et al. 2001; Tokarski et al. 2006; Barnard et al. 2007; Solazzo et al. 2008), ale nejlepší se ukázala být neglazurovaná keramika. Tento typ keramiky byl často používán k vaření, z čehož je patrné, že na ní budou zbytky jídla, které se v té době a oblasti konzumovalo. Podle těchto zbytků můžeme také určit, jaká zvířata se v té době chovala, jejich rozšíření a využití. Je pochopitelně žádoucí porovnat výsledky s osteologickými závěry archeozoologů. Pomůže nám to tedy nahlédnout do života lidí dané doby a zjistit, čím se živili a jaké byly jejich ekonomicko-kulturní vztahy ke krajině (chov dobytka, pěstování plodin apod.).

Nejlépe zachované zbytky proteinů nacházíme v příškvarcích. Dojde ke konzervaci díky zuhelnatělé vrstvě dané potraviny, a proto se k uvařenému zbytku nemohou dostat mikroorganismy, které by jej dále rozkládaly. Zároveň nemůže docházet ani k chemické či fyzické degradaci, nebo jen v malé míře. Tyto útvary se však nacházejí hlavně na keramických nádobách (Pavelka a Vařeka 2008).

3 PŮSOBENÍ IONTŮ MĚDI NA PROTEINY

3.1 MĚDĚNÉ IONTY

Měděné ionty jsou součástí mnoha biologických pochodů v buňce – buněčné dýchání, antioxidantní ochrana, neurotransmiterní syntézy, konekce tkání, formování pigmentu a také jsou součástí Golgiho aparátu (Palm-Espling 2012). Nevázané měděné ionty jsou však toxické, protože katalyzují volné radikály a ruší Fe-S vazby (Palm-Espling 2012). Buňka proto musí kontrolovat obsah měděných iontů a případné nadbytky odstranit (Palm-Espling 2012).

V práci testuji hypotézu, že oxidy mědi mohou být toxické pro okolní bakterie a rostliny, což znamená, že by mohly chránit proteiny před výraznější biologickou degradací.

3.2 PROTEINY

Proteiny jsou jedny z nejsložitějších a funkčně velmi důmyslných dosud známých molekul (Alberts et al. 2005). Každý protein se skládá z dlouhého řetězce aminokyselin, kterých je více druhů, přesně tedy 21 a každá aminokyselina má jiné chemické vlastnosti, velikost, tvar a náboj (Alberts et al. 2005). Jednotlivé aminokyseliny jsou propojeny kovalentní vazbou a jejich uspořádání v proteinu je vždy jedinečné a tedy každý protein má určenou strukturu podle jejich uspořádání (Alberts et al. 2005). Pro větší stabilitu řetězce je potřeba využít mnoho slabých vazeb, jako například vodíkové můstky, iontové vazby či van der Waalovy síly (Alberts et al. 2005), které však podléhají rozrušení výrazně snadněji a díky tomu dochází následně velmi jednoduše k degradaci celé struktury proteinu. Proteiny mají různé stupně organizovanosti. Primární strukturou se rozumí sekvenace proteinů, sekundární struktura se pak chápe jako α -šroubovice a skládané listy β , trojrozměrná konformace tvořená řetězcem polypeptidů je terciální struktura a pokud se v proteinu nachází více polypeptidových řetězců, jedná se o strukturu kvartérní (Alberts et al. 2005).

Proteiny vytvářené imunitním systémem se nazývají protilátky (či imunoglobuliny) a mají za úkol chránit tělo před cizími mikroorganismy (Alberts et al. 2005). Ochrana probíhá tak, že se protilátka naváže velmi pevně na cílovou molekulu, kterou buď hned zlikviduje, nebo ji jen označí jako nežádoucí a takto označená

molekula je následně zničena (Alberts et al. 2005). Tento princip zachytávání molekul byl použit při testování proteinů z nálezů a celá metodika testování je na tomto principu založena.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 TESTOVANÉ NÁDOBY

Pro detekci byly použity zbytky potravin, které byly uskladněné v bronzových nádobách. Nejedná se však o příškvarky jako v práci Pavelka a Vařeka (2008), ale spíše o vysušené zbytky.

Nádoby pocházejí z různých lokalit: Rovná u Strakonice, kde byly testovány nálezy z knížecí mohyly z doby halštatské, dále Stebno – zde byla nalezena nádoba etruského původu. V Tálínu byly nalezeny nádoby z mladší doby bronzové. V Tursku se nejedná o nádoby, ale o náramky, veslovitou jehlici, dýku s pochvou a kruhové zdobené terče.

Různé proteiny se chovají jinak, proto jsem jednotlivé nálezy otestovala různými způsoby a bylo využito více metod pro identifikaci co nejširšího možného množství proteinů, zejména šlo o metody založené na principu antigen-protilátka (Pavelka a Vařeka 2008; Šálková et al. 2015; Čiperová et al. 2015; Pavelka et al. 2016). Ale také byla využita hmotnostní spektrometrie stejně jako v mnoha podobných studiích, např. Cramp et al. (2014).

4.2 TESTOVACÍ METODY

4.2.1 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Analýzy lipidů a pryskyřic byly provedeny v laboratoři separačních metod a hmotnostní spektrometrie, která se nachází na katedře analytické chemie, jenž patří pod Přírodovědeckou fakultu Univerzity Palackého v Olomouci. Jednou z hlavních oblastí jejich výzkumného zájmu jsou také analýzy archeologických materiálů, díky čemuž nám zde bylo analyzováno 16 vzorků. Díky vřelému přístupu vedení laboratoře bylo těchto 16 vzorků identifikováno a výsledky těchto analýz jsou uvedeny dále (viz Výsledky).

Analýza lipidů vhodná pro studium historických lipidů pomocí hmotnostní spektrometrie byla možná až po zavedení ionizace vzorků rychlým atomovým bombardováním (Berber et al. 1981) a díky vývoji elektrosprejové ionizace (ESI) (Fen et al. 1989). Tyto desorpční a sprejové ionizační techniky překvapivě propůjčují ionizovanému lipidu velmi málo energie, a tak jsou protonované molekulové ionty obvykle pozorované jako kationty (Murphy a Gaskell 2011).

Samotná hmotnostní spektrometrie je v zásadě separační technikou podobně jako chromatografické či elektromigrační techniky. Liší se v prostředí, kde dochází k separaci (Friedecký a Lemr 2012). Princip hmotnostní spektrometrie spočívá v interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Vlastní provedení se liší podle typu analýz, která je vyžadována, protože každé provedení má své výhody a nevýhody. Všechny hmotnostní spektrometry musí mít několik základních částí – iontový zdroj, analyzátor a detektor částic (Friedecký a Lemr 2012). Iontový zdroj je místo, ve kterém se vytváří ionty, kde se „vyrábí“ ionty v plynné fázi a v některých případech se hned po vytvoření rozpadají (fragmentují). Z analytů, které se dostávají do iontového zdroje, se hned po vytvoření rozpadají (fragmentují). Z analytů, které se dostávají do iontového zdroje s nějakou maticí, vznikají kladně či záporně nabitě ionty molekulární (M^+ , M^-), aduktové ($[M+Hg]^+$, $[M-G]^+$, $[M+CH_5]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$ apod.) a v určitých případech, pokud se jedná o méně stabilní látky, mohou vznikat i fragmenty ionizovaných molekul. Iontové zdroje se obvykle rozdělují na „tvrdé“ a „měkké“ (Friedecký a Lemr 2012). Typický představitel skupiny zdrojů s „tvrdou“ ionizací je elektronová ionizace (EI, Electron Ionisation), tato ionizace využívá předávání energie letících elektronů molekulám analytu. Tam se často využívá návaznost na plynovou chromatografii, ta je pak ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) (Friedecký a Lemr 2012). Při tomto způsobu provedení vznikají rozsáhlá fragmentační spektra, která slouží k identifikaci analyzované sloučeniny (Friedecký a Lemr 2012). Avšak látky, které jsou takto analyzovány, musí být možno převést na těkavé. To samozřejmě vždy možné není, a tak je nutné použít „měkké“ ionizační techniky, zde se v první řadě ionizuje reakční plyn, např. methan, a potom molekuly analytu, kterým je předáváno méně energie, a tak se neuskutečňují tak rozsáhlé fragmentace jako u EI (elektronové ionizace). Ale jsou i jiné ionizační techniky. Pro analýzy lipidů je vhodná technika, kdy se využívá vysokého napětí a vzniká elektrosprej (ESI). Jindy se používá UV záření (APPI) či elektrické výboje (APCI), nebo se využívá laseru (Friedecký a Lemr 2012). Z našeho hlediska důležitý elektrosprej umožňuje ionizaci od středně polárních molekul až po ionty. Vlastní ionizace se uskutečňuje aplikací silného elektrického pole na elektrodu (napětí 2-5 kV) za atmosférického tlaku. Na hrotu elektrody/kapiláry vznikají nabitě kapičky, do kterých se dostává roztok, například něco mobilního, co nese analyty. Aby vznikl aerosol, používá se proudící

zamlžující plyn. Mobilní složka se odpařuje pomocí plynu o vyšší teplotě. Vzniká Coulombické odpuzování, které postupně překonává povrchové napětí a nabitá kapička vybuchne. Po takovém zmenšení kapičky jsou z povrchu uvolňovány ionty do plynné fáze. Vzniká elektrosprej, který je poměrně vhodný k analýzám, ale pokud vznikají ionty z jiných látek ve vyšších koncentracích, např. soli, dochází k potlačení vzniku iontů z analytu. Jestliže dochází k tomuto případu, je nutné takové látky od analytu nějakým způsobem separovat. Existuje však ještě jeden problém mobilní fáze, který celou analýzu poněkud komplikuje. To se řeší řadou dalších technik, je však nutné, aby se do vakuové části přístroje (či analyzátoru) nedostaly nežádoucí kontaminace – to je velmi důležité, protože ve skutečnosti se do analyzátoru dostane jen 1 až 3 % vzniklých iontů (Friedecký a Lemr 2012).

U lipidů jsou pozorovány deprotonované molekulární anionty a aduované anionty, pokud molekula přednostně tvoří negativní ionty. Současně s tím se objevily nástroje, které dodávají energii k rozbití kovalentních vazeb v iontech, jedná se o techniky, jako je kolizní aktivace a kolizní indukovaná disociace (CID) a přenos produktových iontů pomocí účinných kolizních buněk (rádiové, kmitočtová pouze kvadrupolová pole) (Murphy a Gaskell 2011). Následně je nutné znovu analyzovat vzniklé ionty druhým hmotnostním spektrometrem (MS/MS). Takto vznikl hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupolem, je velmi vhodný pro analýzu lipidů (Murphy a Gaskell 2011).

4.2.2 ANTIGEN - PROTILÁTKA

Metody fungující na současné proteiny nemusí fungovat na proteiny degradované dlouhým časovým obdobím. U reakce protilátka – antigen musí být protilátky pro každý protein získané předem. Testování pomocí reakce substrátu a protilátky se využívá při testování alergenů, takže zachytí i nepatrné kontaminace testované látky (Pavelka a Vařeka 2008). Bohužel může nastat problém – protilátky vyvinuté na současné nativní antigeny nemusí fungovat na historické proteiny z archeologických nálezů. Po delším testování se podařilo najít takové protilátky, které reagují správně s proteiny dnešními i s proteiny z archeologických nálezů, viz Pavelka a Vařeka (2008). Byly použity jen ty testy, u kterých byla účinnost na archeologické vzorky potvrzena, bylo zjištěno, že např. testy pod značkou ELISA-Tek jsou na historické proteiny zcela nevhodné (Pavelka et al. 2016).

4.2.3 ELISA TEST

Hlavní použitou metodou je ELISA test, kdy jsou specifické protilátky přichyceny na dně jamek mikrotitrační destičky. Pozitivní reakce se projevuje žlutým zbarvením, stejně tak pozitivní kontrola. Negativní kontrola se nezbarvuje vůbec nebo jen velmi mírně. Vyhodnocování probíhá vizuálně či spektrofotometricky.

Spektrofotometrie měří část absorpčního spektra v určitém úseku vlnových délek, kdy vzorkem prochází monochromatické světlo (Pavelka a Orna 2011).

Pro testování vzorků na různé druhy masa jsme zvolili testovací sady BioKits – Cooked Species Identification Test Kit od firmy Neogen Corporation®. Pro testování mléka (kasein a β -laktoglobulin) a obilí (gliadin) byly zvoleny taktéž osvědčené testy od firmy Neogen Corporation® (viz Pavelka et al. 2016). Pro identifikaci kozího mléka (kozí IgG) byl využit kit od firmy R-Biopharm AG.

4.2.4 LFIA

Pro vzorky vyschlých potravin (lokalita Rovná) byly využity také o něco méně citlivé testy na bázi lateral flow (LFIA) – pro gluten, kasein a ovomucoid (Neogen Corporation®). Jedná se o jednoduché nástroje, sloužící pro detekci přítomnosti analytu ve vzorku, přičemž není nutné mít jakékoliv přístrojové vybavení. Princip tohoto testu je založen na kombinaci chromatografie a imunoafinitních reakcí, což jsou reakce protilátky produkované daným organismem a antigenu (tedy analytu). Testy jsou určeny pro laickou veřejnost (použití jako těhotenský test) a také pro odborníky, kteří je mohou používat jako rychlý test sloužící k orientaci (medicína, potravinářství, ochrana životního prostředí a podobné obory). Nejdůležitější částí je membrána, na které se zobrazuje výsledek v podobě barevných linií, které se nazývají testovací a kontrolní. Principem je nanesení vzorku na podložku, ze které vzorek vzlíná vzhůru do konjugační zóny, ve které se nachází biomolekula, kterou je velmi často protilátka, jenž je imobilizována na barevné nanočástici^[1]. Konjugát je kapalinou ze vzorku odnášen na membránu, kde se naváže na testovací a kontrolní linii. Vzorek, který by protekl, je zachycen podložkou pro to určenou. Všechny tyto části jsou nalepeny na plastové podložce. Rozlišujeme dva typy uspořádání. První z nich je uspořádání přímé, jenž se používá pro detekci analytů s větší molekulovou hmotností, které ve struktuře obsahují více antigenních míst, tedy alespoň dvě. Při tomto uspořádání se jeví pozitivní výsledek

jako linie TL a KL, v případě negativního výsledku se zobrazí pouze linie KL. Druhým způsobem uspořádání je uspořádání kompetitivní. To slouží k detekci analytů, které jsou schopné navázat se pouze s jedním antigenem. Pokud vyjde pozitivní výsledek, zobrazí se pouze KL linie, u negativního se zobrazí linie obě, tedy TL i KL^[1].

4.3 DETEKCE PROTEINŮ

4.3.1 SENDVIČOVÁ ELISA

Pro detekci hovězího, vepřového a ovčího masa byla na vzorcích ze všech lokalit použita přímá sendvičová ELISA Neogen Corporation® Biokits for Species Identification, která je zaměřena na tepelně upravené proteiny. Princip je stejný pro testy na vepřové, hovězí, drůbeží a ovčí proteiny, předpokládá, že vzorky pochází zejména z masa, ale fungují i na mnohé jiné druhově specifické proteiny:

1. Nejprve se připraví extrakční a promývací roztoky a samozřejmě vhodný počet plastických jamek určených pro testování.

2. Do testovacích jamek se napipetuje automatickou pipetou 100 µl extraktu vzorku či pozitivní kontroly. Pro každý vzorek je vhodné použít novou špičku, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků.

3. Vzorky je třeba opatrně protřepat v ruce, přikryjí se a nechají se inkubovat 45 minut při pokojové teplotě. Při tomto typu testu je možno vzorky odpipetovat zpět do platikových zkumavek (eppendorf) a použít je pro jiné ELISA testy.

4. Jamky v mikrotitrační destičce je třeba promýt promývacím roztokem, alespoň 3x.

5. Do testovacích jamek se vzorky se přidá 50 µl Biotinu.

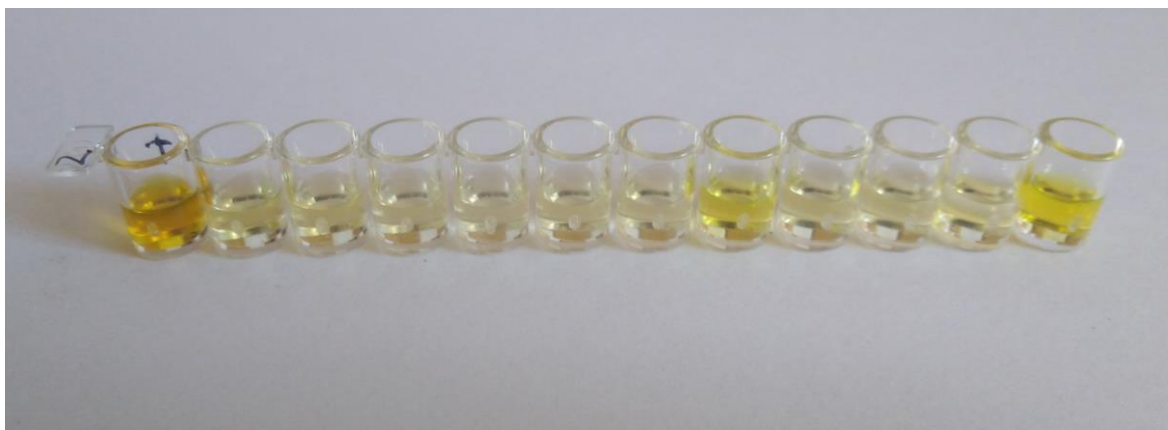
6. Roztok v mikrotitrační destičce je třeba opatrně protřepat v ruce, přikryjí se a nechají se inkubovat 45 minut při pokojové teplotě.

7. Jamky v mikrotitrační destičce je třeba promýt promývacím roztokem, alespoň 3x.

8. Do všech testovacích jamek se přidá 50 µl konjugát avidin peroxidázy.

9. Destičku je třeba opatrně protřepat v ruce, jamky se zakryjí a nechají se inkubovat 15 minut při pokojové teplotě.

10. Vzorky je třeba promýt promývacím roztokem, alespoň 5x.
11. Do každé testovací jamky se přidá 100 μ l TMB substrátu.
12. Destičku je třeba opatrně protřepat v ruce, jamky se zakryjí a nechají se inkubovat 45 minut při pokojové teplotě.
13. Do všech testovacích jamek se přidá 50 μ l Stop solution (v tomto případě se jedná o roztok kyseliny fosforečné).
14. Destičku je třeba opatrně protřepat v ruce (zhruba 10 sekund), čímž dojde k zastavení reakce a ke změně barvy – z modré na žlutou (viz obr. 1).
15. Získaná data jsou stanovena spektrofotometricky. Měření bylo prováděno na ELISA readeru VERSAmax™ (Molecular Devices) při 450 nm.



Obr. 1. Jamky vyjmuté z mikrotitrační destičky, barevně jsou odlišené pozitivní reakce.

Z použitých testů na různé druhy masa, respektive proteinů příslušných zvířecích druhů, se podařilo odhalit možnosti protilátek, rozlišit vzorky, které představují původní maso jako potravinu a kontaminace z hnoje či hnojiv (Slaná 2018). Závisí na tepelné úpravě, proto byl tento test prováděn dvakrát – poprvé s nevařenými a podruhé s těmi samými, ale vařenými vzorky.

Bohužel tento způsob je z nabízených protilátek od firmy Neogen Corporation® Biokits for Species Identification možno provádět pouze s kitem na proteiny od prasat (*Sus scrofa* a *Sus scrofa domestica*) a jak bylo pokusně zjištěno, nelze stejné rozlišení aplikovat pomocí protilátek na hovězí nebo ovčí maso, přestože se jedná o produkt stejného výrobce. Protilátky jsou zřejmě připraveny na odlišné typy proteinů.

4.3.2 KOMPETITIVNÍ ELISA

Pro detekci β -lactoglobulinu byla ve všech případech použita kompetitivní ELISA (Neogen Corporation®).

1. Příprava zředěných extraktů vzorků a kitu.
2. Do testovacích jamek se přidá 100 μ l pracovního roztoku (nulový standard), BLG standardy (A-E), kontroly a vzorky. Je nutné měnit špičky, aby nedošlo ke cross-kontaminaci.
3. Je nutné ihned přidat 50 μ l BLG biotin do všech testovacích jamek, což je pro kompetitivní test ELISA základní a dochází k soutěži o protilátky mezi kontrolními antigeny a antigeny vzorku. Díky tomu, že se ke vzorkům přidá ihned specifický biotin, je nelze recyklovat na další testy.
4. Testovací jamky se umístí na třepačku a nechají se třepat 60 minut při pokojové teplotě.
5. Tekutina z testovacích jamek se odpipetuje a poté se jamky promyjí promývacím roztokem, alespoň 5x.
6. Přidá se 50 μ l Avidin peroxidase conjugate do všech testovacích jamek.
7. Testovací destička se umístí na třepačku a nechá se třepat 15 minut při pokojové teplotě.
8. Tekutina z testovacích jamek se odpipetuje a poté se jamky promyjí promývacím roztokem, alespoň 5x.
9. Přidá se 100 μ l TMB substrátu do všech testovacích jamek.
10. Testovací jamky se protřepou jemně rukou na rovném povrchu, nechají se 45 minut v klidu a při pokojové teplotě.
11. Do všech testovacích jamek se přidá 50 μ l Stop solution (což je v našem případě roztok kyseliny fosforečné), jemně se promíchají rukou na rovném povrchu, aby došlo k zastavení reakce a dojde ke změně barvy z modré na žlutou.
12. Získaná data jsou následně měřena. Měření bylo prováděno na ELISA readeru VERSAmax™ (Molecular Devices) při 450 nm.

4.3.3 REVEAL® 3-D TEST

Pro detekci vajíček, obilí a mléka na lokalitě Rovná byl použit Reveal® 3-D test od firmy Neogen Corporation®, provedený metodou Rinse Sampling, která byla mírně modifikována. Detekce je založená na imunochromatografické technice podélného toku reagensů proužkem porézní membrány (angl. Lateral Flow Immunoassay; zkr. *LFIA*). Antigen ze vzorku reaguje se značeným konjugátem imobilizovaným na membráně. Pokud dojde k vazbě, projevuje se výsledek barevnými pruhy (viz obr. 2).

1. Místo komerční plastové zkumavky z kitu je vhodnější použít plastovou zkumavku (eppendorf) pro 1,5 ml, kde se napipetuje jen 150-200 µl extrakčního pufru a přidá se několik mikrogramů vzorku, protože vzorku odebraného z keramiky, v tomto případě z povrchu bronzu, je k dispozici obvykle velmi omezené množství – na rozdíl od normálně testovaných potravin.

2. Po třepání na třepačce vortex se 150 µl pufru se vzorkem napipetuje do startovací jamky u testovací plastové schránky.

3. Platový obal s membránou umístíme do vhodné polohy a necháme reakci proběhnout, po 5 minutách až hodině vyhodnotíme výsledek (viz obr. 2)



Obr. 2. Test Reveal® 3-D pro vaječný protein ovomukoid.

Další metodou testování je Swab Sampling, který je vhodný pro suché i mokré vzorky. Tento druh testování však nebyl použit.

4.3.4 ELISA TESTY

U zbylých vzorků byly použity ELISA testy. Pro kasein byly použity 2 typy testů, v případě vzorků z lokality Rovná se jednalo o Reveal® 3-D test, v případě ostatních šlo

o citlivější ELISA test typ VERATOX od firmy Neogen Corporation®. Podobně také pro přítomnost obilí byly použity dva testy, v případě lokality Rovná se jednalo o Reveal® 3-D test pro gluten, v ostatních vzorcích šlo o citlivější ELISA test na gliadin (podobně jako u kaseinu se jednalo o typ VERATOX od firmy Neogen Corporation®).

Kasein

1. Do testovacích jamek se vloží 150 µl vzorků a kontrol (samostatně).
2. 100 µl ochlazených vzorků včetně pozitivní kontroly se napipetuje do jamek s protilátkami a následuje 40 minut inkubace, oproti doporučovaným 10 minutám.
3. Vyleje se obsah testovacích jamek.
4. Dojde k promytí 5x po sobě.
5. Obsah testovacích jamek se vyklepe na savé utěrky tak, aby v jamkách nezůstala žádná tekutina.
6. Do jamek s protilátkami se přidá 100 µl konjugátu, který se připraví ze dvou jednotlivých roztoků kitu, protože konjugát musí být připraven vždy čerstvý. Použije se k tomu 12ti kanálková automatická pipeta, 10 minut inkubace.
7. Opakování kroků 3, 4 a 5.
8. Do jamek se přidá 100 µl substrátu, použije se k tomu 12ti kanálková automatická pipeta, 10 minut inkubace.
9. Přidá se 100 µl Red stop do jamek s protilátkami, použije se k tomu 12ti kanálková automatická pipeta, 10 minut inkubace – dojde k zastavení reakce a zobrazení výsledků. Místo doporučovaného stop roztoku, který je součástí kitu, se zvláště kvůli měření na ELISA readeru osvědčila jako stop roztok kyselina fosforečná z kitu pro proteiny masa.

Gliadin

Pro detekci gliadinu byla použita testovací sada od firmy Veratox®.

Extrakce netepelně zpracovaných vzorků orbitálním shakerem či rotátorem:

1. Příprava 55% ethanolového extrakčního roztoku kombinací 55 dílů ethanolu a 45 dílů destilované vody. Příprava zředěného roztoku z extraktu vzorku.

2. Do 1,5 ml plastové zkumavky (ependorf) se přidá asi 0,5 mg nejmenno rozmělněného vzorku.

3. Podle výrobce by se měla přidat jedna lžička extrakčního aditiva do plastové zkumavky, ale ani toto aditivum se příliš neosvědčilo a je lepší ho vynechat úplně.

4. Přidá se 10 ml (9 ml pro tekuté vzorky) 55% ethanolu, plastová zkumavka se uzavře a poté se s ní třepe na vortexu po dobu 20 sekund, čímž se zajistí kompletní promíchání.

5. Vzorek se extrahuje pomocí třesení (150 rpm) v orbitálním shakeru či rotátoru a to tak, že se nádoba položí na podložku na ploché straně nástroje a připevní se pomocí gumičky či lepicí pásky. Rotuje se (třese se) po dobu 15 minut při pokojové teplotě.

6. Nádoba se vyjme z přístroje a umístí se do stojanu zhruba na 10 minut, čímž dojde k usazení materiálu a umožní to odběr čistého vzorku.

7. Každý vzorek se naředí v poměru 1:40 vyjmutím 100 μ l z vrchní vrstvy extraktu a přemístěním do zkumavky obsahující 1,5 ml PBS.

8. Pro promíchání se nádoba umístí na 5 sekund na vortex nebo se několikrát otočí v ruce.

9. Naředěné vzorky se musí otestovat během dvou až tří hodin od extrakce.

Procedura testování:

Všechny kity a reaktanty se před zahřátím nechají zahřát na pokojovou teplotu (18-30°C).

1. Pro každý vzorek se vyjme jedna červeně označená mísící jamka a dalších 5 jamek se vyjme pro kontroly, vloží se do držáku.

2. Vyjme se stejný počet jamek s protilátkami. Jamky s protilátkami, které nebudou okamžitě použity, se vrátí zpět do sterilního obalu, který se uzavře, a tím jsou protilátky chráněny. Jeden konec proužku se označí číslem 1 a tento proužek je vložen do držáku jamek – označeným koncem do leva.

3. Před použitím jsou reaktanty promíchány krouživým pohybem lahve.
4. 150 μ l kontrol a vzorků se přenesou do červeně označených jamek. Pro každý přenos se použije vždy nová pipetovací špička.
5. 12ti kanálovou pipetou je přeneseno 100 μ l kontrol a vzorků do jamek s protilátkami. Vzorky se promíchají po dobu 20 sekund posouváním držáku jamek dopředu a dozadu po plochém povrchu.
6. Jamky se nechají inkubovat po dobu 10 minut za pokojové teploty. Červeně označené přenosové jamky se uklidí.
7. Obsah jamek se vyprázdní do dřezu. Každá jamka se naplní promývacím roztokem, který se vyleje. K promývání dojde 5x, poté se jamky vyklepou na papírovém ubrousku, čímž dojde k odstranění promývacího roztoku.
8. Konjugát z modře označené lahve se nalije do čisté reagent boat.
9. 12ti kanálovou pipetou s novými špičkami se přenesou 100 μ l konjugátu do všech jamek a dojde k promíchání vzorků posouváním držáku jamek dopředu a dozadu na plochém povrchu po dobu 20 sekund.
10. Vzorky se inkubují po dobu 10 minut při pokojové teplotě.
11. Všechny jamky jsou vymyty stejně jako v kroku 7.
12. Potřebný objem roztoku substrátu ze zeleně označené lahve je nalit do čisté reagent boat.
13. 12ti kanálovou pipetou s novými špičkami se přenesou 100 μ l substrátu do každé jamky a dojde k promíchání po dobu 20 sekund. Špičky z pipety se neodstraňují.
14. Vzorky se inkubují po dobu 10 minut při pokojové teplotě.
15. Potřebný objem stop solution z červeně označené lahve je nalit do čisté reagent boat.
16. 12ti kanálovou pipetou se stejnými špičkami je přeneseno 100 μ l červeného stop solution do každé jamky a dojde k promíchání po dobu 20 sekund.
17. Spodní část jamek se očistí, poté se jamky vloží do čtečky s 650 nm filtrem.

18. Výsledky se interpretují za použití čtečky Neogen 4700 nebo jiné ekvivalentní čtečky. Při použití jiné čtečky se výsledky vypočítají za použití Neogen Veratox software pro Windows.

Kozí IgG

Všechny pracovní nástroje musí být po každém použití očištěny, aby se zabránilo kontaminaci. Alergen providedet buffer je dodán jako desetinásobný koncentrát. Před ředěním buffer koncentrátu se musí rozpustit všechny krystalky ve vodní lázni o teplotě 37°C a musí dojít k promíchání. Následně se zahřátý buffer koncentrát ředí v poměru 1:10 s destilovanou vodou (takto naředěný buffer je stabilní zhruba po dobu 12 týdnů).

Malé množství vzorku se nadrtí a následně se rozmíchá ve 200 µl destilované vody a 3 minuty se nechá třepat na vortexu, poté se nechají usadit hrubé části.

Na jednu jamku je použito 100 µl roztoku.

Testovací postup:

Všechny reagenty musí mít před použitím pokojovou teplotu (20-25°C). Konjugát, tedy lahvička s červeným víčkem, je dodáván jako koncentrát. Jelikož má ředěný konjugát omezenou stabilitu, mělo by být vždy připraveno jen množství, které je k testování třeba. Před pipetováním se koncentrát konjugátu opatrně protřepe. Koncentrát konjugátu se ředí v poměru 1:11 s konjugát bufferem.

Mycí buffer je dodáván jako desetinásobný koncentrát. Před jeho ředěním je nutné rozpustit jakékoliv krystaly ve vodní lázni o teplotě 37°C, koncentrát je nutné dobře promíchat. Ředění probíhá v poměru 1:10 s destilovanou vodou. Ředěný buffer je stabilní při pokojové teplotě zhruba po dobu 4 týdnů.

Je nutné dodržovat mycí proceduru. Nesmí dojít k vyschnutí jamek mezi jednotlivými kroky. Nesmí se používat více než 24 jamek najednou.

1. Dostatečné množství jamek je vloženo do držáku (pro všechny standardy i vzorky). Pozice standardů a vzorků jsou zaznamenány.

2. 100 μ l každého standardu a připraveného vzorku je přidáno do separátních jamek vždy po dvojici. Dojde k inkubaci po dobu 10 minut při pokojové teplotě (20-25°C).

3. Tekutina je vylita z jamek, poté se s jamkami klepne do sterilní papírové utěrky a tím dojde ke kompletnímu odstranění tekutin z jamek. Všechny jamky jsou naplněny 250 μ l mycího bufferu, který je posléze vylit. Tento proces se opakuje 3x.

4. 100 μ l ředěného konjugátu je přidáno do každé jamky. Dojde k jemnému promíchání a to tak, že se jamkami zatřese ručně. Inkubace po dobu 10 minut při pokojové teplotě.

5. Opakování kroku 3.

6. 100 μ l červeného substrátu/chromogenu je přidáno do každé jamky. Dojde k jemnému promíchání a to tak, že se jamkami zatřese ručně. Inkubace po dobu 10 minut ve tmě při pokojové teplotě (20-25°C). Do každé jamky se následně přidá 100 μ l stop solution. Dojde k mírnému promíchání a to tak, že se jamkami zatřese ručně. Nyní se změří absorbance při 450 nm. K přečtení musí dojít do 10 minut od přidání stop solution.

4.3.5 VYHODNOCENÍ REAKCÍ

Pozitivní kontrola by měla být zbarvena žlutě, kdežto negativní kontrola by neměla být zbarvena vůbec. Jako pozitivní hodnotíme výsledky, které jsou viditelně zbarveny podobně jako pozitivní kontrola anebo jsou zbarveny ještě intenzivněji. Méně zbarvené, než pozitivní kontrola, avšak zcela odlišné od negativní kontroly, byly hodnoceny jako slabě pozitivní. Jako negativní hodnotíme výsledky, které jsou světlejší nežli pozitivní kontrola a výsledky, které nejsou zbarveny vůbec. V zásadě by měly být chápány jako pozitivní všechny reakce zbarvené výrazně intenzivněji než negativní kontrola. Ovšem optické stanovení je nespolehlivé, a proto byly výsledky vždy porovnány spektrofotometricky na přístroji ELISA reader VERSAmax™ (Molecular Devices) při 450 nm.

4.4 DALŠÍ MOŽNÉ METODY TESTOVÁNÍ

Níže jsou uvedeny další možné metody testování nálezů na zbytky proteinů, které však nebyly v této práci použity, ale představují možnost dalšího testování či navazujícího výzkumu.

Gliadin

Za použití testovací sady Veratox®.

Extrakce netepelně zpracovaných vzorků pomocí shakeru a vodní lázně:

1. Příprava 40% ethanolového extrakčního roztoku kombinováním 4 dílů ethanolu a 6 dílů destilované vody. Příprava zředěného roztoku z extraktu vzorku.
2. Do 125 ml čisté extrakční lahve se přidají 2 g najemno rozmělněného vzorku či 2 ml tekutého vzorku.
3. Přidá se jedna lžička extrakčního aditiva.
4. Přidá se 20 ml (18 ml pro tekuté vzorky) 40% ethanolu, nádoba se pevně uzavře a poté se s ní aktivně třepe rukou po dobu 20 sekund, čímž se zajistí kompletní promíchání.
5. Vzorek se extrahuje pomocí třesení (150 rpm) v orbitálním shakeru a to tak, že se nádoba položí na podložku na ploché straně nástroje a připevní se pomocí gumičky či lepicí pásky. Třeše se po dobu 15 minut při pokojové teplotě. (Shakerovou vodní lázeň lze také použít, avšak nesmí se zahřívát). Nádoba se vyjme z shakeru či koupele.
6. Lahev se umístí se do stojanu zhruba na 10 minut, čímž dojde k usazení materiálu a umožní to odběr čistého vzorku.
7. Každý vzorek se naředí v poměru 1:40, buď vyjmutím 100 µl z vrchní vrstvy extraktu a přemístěním do zkumavky obsahující 3,9 ml PBS, nebo smícháním 0,5 ml extraktu s 19,5 ml PBS v testovací nádobce.
8. Pro promíchání se nádoba umístí na 5 sekund na vortex nebo se několikrát otočí v ruce.

9. Nařaděné vzorky se musí otestovat během dvou až tří hodin od extrakce.

Extrakce tepelně zpracovaných komodit:

Tepelně zpracované komodity vyžadují extrakční koktailový roztok (Neogen item 8483), který renaturalizuje zahřátý gliadin a umožňuje přesnou detekci jakéhokoliv gliadinu ve vzorku. Aby se gliadin extrahoval z tepelně zpracovaných vzorků:

1. Připraví se 55% ethanolový extrakční roztok kombinací 55 dílů ethanolu a 45 dílů destilované vody.
2. Připraví se PBS. Extrakce s extrakčním koktailovým roztokem by měla být provedena v digestoři.
3. Do 50 ml zkumavky se naváží 0,25 g vzorku.
4. Přidá se 2,5 ml extrakčního koktailového roztoku (ředící faktor 1:10).
5. Nádoba se uzavře a umístí na vortex po dobu 10 sekund, čímž dojde k homogenizaci koktailu a vzorku.
6. Inkubuje se 40 minut při 50°C (vodní lázeň či trouba).
7. Vzorky se vyjmou a nechají se vychladnout 5-10 minut.
8. Přidá se 1 lžička speciálního extrakčního aditiva.
9. Přidá se 7,5 ml 55% ethanolu a zkumavka se umístí na vortex po dobu 10-20 sekund (finální koncentrace ethanolu bude 41% a rozředění vzorku je v tomto bodě 1:40).
10. Vzorek se třese na rotátoru (150 rpm) po 1 hodinu při pokojové teplotě (zkumavka je umístěna na boční straně).
11. V případě nutnosti se vzorky vloží do centrifugy na 5 minut při 2500 rpm.
12. Vzorek se rozředí v poměru 1:10 pomocí PBS (200 µl vzorku do 1,8 ml PBS).
13. Vzorky jsou připraveny (konečné rozředění v poměru 1:400).

Kozí IgG

Pro přípravu alergen extraction buffer obsahujícího aditivum 1 se odměří 1,35 g aditiva 1 ve skleněné nádobě a přidá se 15 ml 1M NaOH. Dojde k míchání, dokud se aditivum 1 nerozpustí. Následně se nalije 700 ml naředěného alergen extraction buffer do odměrného válce. Přidá se 15 ml roztoku aditiva 1 za neustálého míchání, eventuální pozůstatky roztoku aditiva 1 se přenesou do odměrného válce a to tak, že dojde k oplachu bufferem. Roztok aditiva 1 se upraví s alergen extraction buffer na pH 9 použitím 1 M HCl a doplní se na objem 750 ml ředěným alergen extraction buffer. 750 ml A-AEP buffer je dostatečné pro 45 vzorků. Tento buffer může být používán zhruba po dobu 3 týdnů. Neuchovávat v chladu. Je nutné použít čistou lahev – částičky prachu mohou zahájit krystalizaci. Při přítomnosti krystalů je buffer nepoužitelný.

Extractor 2 je dodáván jako dvojnásobný koncentrát a musí být rozředěn v poměru 1:2 s destilovanou vodou. 60 ml ředěného extractoru 2 je dostatečné pro 15 vzorků a může být použit po tři měsíce, použití i uchovávání při pokojové teplotě.

Extrakce vzorků:

Je nutné mít homogenní vzorek o hmotnosti 5-50 g.

A. Pevné vzorky:

1. 1 g vzorku vložíme do zkumavky a přidáme 4 ml extractoru 2. Dojde k aktivnímu promíchání. Uzavřená zkumavka je vložena po dobu 10 minut do horké vodní lázně (100°C).

2. Vzorek se nechá chladit po krátkou dobu.

3. Do vařeného vzorku se přidá 16 ml zahřátého A-AEP (60°C).

B. Tekuté vzorky:

1. 1 ml vzorku se smíchá se 4 ml extractoru 2. Dojde k aktivnímu promíchání. Uzavřená zkumavka je vložena po dobu 10 minut do horké vodní lázně (100°C).

2. Vzorek se nechá chladit po krátkou dobu.

3. Do vařeného vzorku se přidá 15 ml zahřátého A-AEP (60°C).

C. Další příprava tekutých i pevných vzorků:

1. Aktivní promíchání pomocí shakeru.
2. Extrakce ve vodní lázni po dobu 10 minut a při 60°C.
3. Vzorek se ochladí a centrifuguje 10 minut při 2500 G. Poté se vzorek filtruje.
4. Supernatant bez částic či filtrát se naředí v poměru 1:5 s ředěným alergen extraction bufferem bez aditiva 1.
5. Na jednu jamku je použito 100 µl roztoku.

5 VÝSLEDKY

5.1 LOKALITA ROVNÁ

Nádoby z oblasti Rovná byly testovány na gluten – zjištění stop po obilí, kasein – zjištění stop po mléce a dále byly vzorky testovány, zda obsahují zbytky po kravském a kozím mléce. Rovněž se zjišťovala pomocí různých protilátek přítomnost mléka kravského, byla prováděna také detekce stop po mase hovězím, vepřovém, drůbežím, ovčím a také byl sledován ovomukoid, který signalizuje přítomnost vajíček. Z této lokality se jednalo o situlu, což je bronzová nádoba ve tvaru vědra, dále o bronzovou mísu a kotel, u kterého jsem testovala bílou vrstvu na povrchu a také vnitřní vrstvu. Poslední testovanou nádobou z této oblasti byla cista (viz tab. 1).

5.1.1 SITULA

U situly (z latinského výrazu pro kbelík nebo vědro) se prokázala přítomnost kaseinu – sloužila tedy pravděpodobně k uchovávání kozího mléka, dále pak drůbežního masa a ovomukoidu – uchovávání vajíček.

5.1.2 MÍSA

V bronzové míse byl nalezen gluten, což značí uchovávání obilí, dále pak vepřové maso a ovomukoid, tedy uchovávání vajec.

5.1.3 KOTEL

V bílé vrstvě na kotli (zřejmě se jednalo o vysušené zbytky potravin) byl detekován gluten – tedy uchovávání obilí, kasein – uchovávání kozího mléka a ovomukoid – uchovávání vajíček. Ve vnitřní vrstvě byl detekován gluten a kasein, stejně jako v bílé vrstvě, navíc se zde prokázala také přítomnost vepřového a drůbežního masa, naopak nebyly nalezeny žádné stopy po uchovávání vajec.

5.1.4 CISTA

Z cisty (válcovitá nádoba sloužící jako vědro, původně dřevěná s kováním, poté bronzová) byly odebrány dva vzorky, na kterých vyšly více méně stejné výsledky. Bylo zde detekováno obilí, kozí mléko, vepřové a drůbeží maso.

Celkově nebyly nalezeny stopy po ovčím a hovězím mase a také po kravském mléce. Je tedy možné, že se v této lokalitě nechovaly ovce či krávy anebo se jejich produkty uchovávaly jinak než v bronzových nádobách.

Tab. 1. Výsledky z lokality Rovná.

Lokalita: Rovná	Gluten		kasein		kasein pozitivní		kasein negativní		hovězí	vepřové	dřůbeží	ovčí	ovomukoid	GC/MS (MetPrep) analýza tuky, vosky, pryskyřice	
	obilí	0	mléko	+	skot LG	0	kozy IgG	++							
SITULA	0	+	mléko	+	skot LG	0	kozy IgG	++	0	0	++	0	vejce	++	0
MÍŠA W	+	0		0					0	++	0	0	+		0
KOTEL BÍLÁ VRSTVA	++	0		0					0	0	0	0	++		0
KOTEL	++	+		+					0	++	++	0	0		0
CISTA 1	+	0		0					0	++	++	0	0		0
CISTA 2	++	0		0					0	++	++	0	0		0

vysvětlivky:

- 0 negativní výsledek
- ++ pozitivní výsledek
- + níže pozitivní výsledek
- 0+ Výsledek na hranici detekovatelnosti (není vyloučena pouze nespecifická reakce)

5.2 LOKALITA STEBNO, TÁLÍN, TURSKO A KRALICE

5.2.1 STEBNO

Ze Stebna byla otestována nádoba etruského původu a také hlína. Na nádobě byl detekován kasein, což ukazuje na přítomnost mléka, dále byla prokázána přítomnost nevařeného i vařeného vepřového masa a masa hovězího (viz tab. 2). Avšak je poněkud alarmující, že z kontrolní hlíny bylo také detekováno mléko, vařené i nevařené vepřové maso a také maso hovězí. Řada pozitivních výsledků v kontrolní hlíně napovídá na značnou kontaminaci i původní nádoby, kde zřejmě pozitivní výsledky nepředstavují zbytky po původních potravinách, ale buď se jednalo o místo obětiny, které se dostávaly i na okolní hlínu, nebo byla mísa v odpadní jámě se zbytky tepelně zpracovaných potravin. Zřejmě se v tomto případě nejedná o kontaminace ze současných hnojiv, jak tomu napovídá stejná reakce u vařeného i nevařeného vepřového masa, jak je popsáno podrobněji níže (viz Slaná 2018).

5.2.2 TÁLÍN

Z Tálínu jsem získala tři vzorky z bronzových nádob (viz obr. 3). U prvního se ukázala jako slabě pozitivní přítomnost obilí a kravského mléka, dále maso hovězí. Silně pozitivní výsledky pro vařené i nevařené vepřové maso napovídají, že kontaminace z hnoje prasat je nepravděpodobná a muselo se jednat o zbytky po tepelně upraveném mase. U druhého vzorku bylo opět slabě pozitivní obilí a silně pozitivní vepřové maso nekontaminované hnojem i maso hovězí. U posledního vzorku – krusty – vyšly výsledky zcela totožně (viz tab. 2).



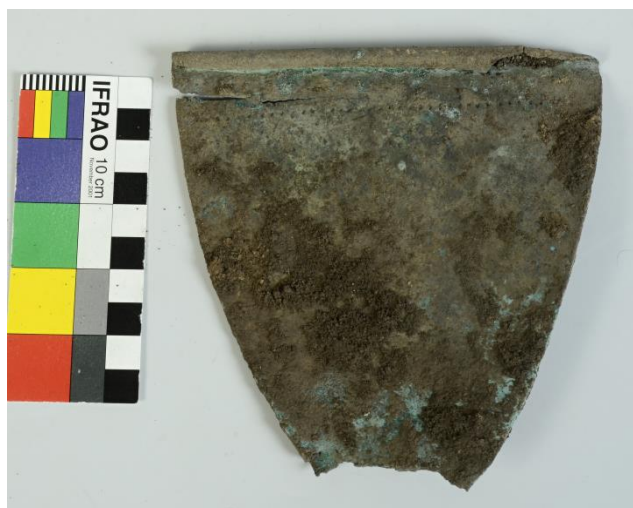
Obr. 3. Bronzová nádoba, Tálín.

5.2.3 TURSKO

Z Turska jsem získala celkem 5 vzorků ze starší doby bronzové. První vzorek „Tursko 32+33“ není však z bronzové nádoby, ale z bronzového náramku (viz obr. 4). Na náramku byla zjištěna přítomnost obilí, mléka, nekontaminovaného tepelně upraveného vepřového masa a také hovězího masa. Další vzorek s číslem 84 také nepochází z bronzové nádoby, nýbrž z bronzové veslovité jehlice (viz obr. 5). Zde byla detekována přítomnost nekontaminovaného vařeného vepřového masa a masa hovězího. Následující vzorek je z předmětu s číslem 92, kdy se jedná o dýku s pochvou (viz obr. 6). Zde byly nalezeny stopy po přítomnosti mléka a opět nekontaminovaného vepřového masa a masa hovězího. Další vzorek s číslem 81 je z kruhového plechového terče (viz obr. 7), kde bylo slabě pozitivní obilí a silně pozitivní nekontaminované vepřové maso a opět také hovězí maso. Poslední vzorek z Turska s číslem 82 je také z plechového terče. Zde bylo slabě pozitivní obilí a mléko a opět nekontaminované vepřové maso a také maso hovězí (viz tab. 2).



Obr. 4. Bronzový náramek, Tursko.



Obr. 7. Veslovitá jehlice, Tursko.



Obr. 6. Dýka s pochvou, Tursko.



Obr. 5. Kruhový plechový terč, Tursko.

5.2.4 KRALICE

Poslední testovanou nádobou byla bronzová nádoba z Kralic. Zde se pravděpodobně jedná o částečnou kontaminaci prasečím nebo zemědělským hnojivem obsahujícím prasečí trus, protože test s nevařeným vzorkem byl slabě pozitivní, což je v obdobných případech negativní, nebo pozitivní na hranici detekovatelnosti (Slaná 2018). V tomto jediném vzorku se podařilo prokázat také cholesterol a mastné kyseliny (viz tab. 2).

Celkově se tedy skoro nevyskytovalo kravské mléko a také tuky, vosky či pryskyřice. Silně pozitivní však vycházelo vždy maso vepřové a také maso hovězí.

Tab. 2. Výsledky z lokalit Stebno, Tálín, Tursko, Kralice.

		GLIADIN OBILÍ	CASEIN	β LACTO KRÁVA	PORK MASO NEVAŘ	PORK MASO VAŘ	SHEET MASO	BEEF MASO	GC/MS (MetPrep) analýza tuky, vosky, pryskyřice
									0
bronz. nádoba	Stebno Etruskové	“++”	“++”	0	“++”	“++”	0	“++”	0
	Hlína Stebno		“++”	0	“++”	“++”		“++”	0
bronz. nádoba	Tálín pod mísou	“0+”	“+”	“0+”	“+++”	“+++”		“+++”	0
bronz. nádoba	Tálín TN2	“0+”	0	0	“++”	“++”		“++”	0
bronz. nádoba	Tálín krusta	“0+”	0	0	“++”	“++”		“++”	0
bronz. nádoba	Tursko 32+33	“++”	“+”	0	“++”	“++”		“++”	0
bronz. nádoba	Tursko 84	0	0	0	“++”	“++”		“++”	0
bronz. nádoba	Tursko 92	0	“+”	0	“++”	“++”		“++”	0
bronz. nádoba	Tursko 81	“0+”	0	0	“++”	“++”		“++”	0
bronz. nádoba	Tursko 82	“0+”	“0+”	0	“+”	“+”		“++”	0
bronz. nádoba	Kralice	0			“+”	“++”		“++”	cholesterol, mastné kys

vysvětlivky:

- 0 negativní výsledek
- ++ pozitivní výsledek
- + níže pozitivní výsledek
- 0+ výsledek na hranici detekovatelnosti (není vyloučena pouze nespecifická reakce)

6 DISKUZE

6.1 ZÍSKÁVÁNÍ VZORKŮ Z NÁDOB

Ze špatně umytých nebo nevyumytých bronzových nádob můžeme získat vhodné vzorky potravin, kdežto z pravděpodobně dobře umytých nádob se nám vhodné vzorky získat nepodařilo. U keramických nádob se proteiny či lipidy mohou vsáknout, jelikož je keramika porézní. Z těchto pórů lze pak velmi snadno získat vhodné vzorky na testování. U bronzových nádob však porézní struktura chybí, proto je získávání potravních vzorků složitější a záleží na tom, kolik zbytků se dochovalo přímo na povrchu nádoby a tedy jak dobře či špatně byla nádoba umyta.

6.2 ROZKLAD PROTEINŮ

U proteinů nastává problém – dochází k degradaci pomocí hydrolýzy peptidů, deaminaci, denaturaci a také k rozkladu mikroorganismy (Barnard et al. 2007). Při hydrolýze peptidů dochází k rozkladu na jednodušší peptidy nebo až na aminokyseliny, které mohou dále podléhat deaminaci. Denaturace se týká hlavně bílkovin, u kterých dojde k rozrušení terciální struktury a tím k degradaci celé bílkoviny. Působení mikroorganismů má na rozklad proteinů značný vliv, ale díky uchovávání v bronzových nádobách a tedy díky působení iontů mědi se zdá být jejich vliv daleko menší. Měděné ionty působí toxicky pro mikroorganismy i rostliny vyskytující se v okolí, díky čemuž se tyto organismy nepodílejí v takové míře na degradaci proteinů uchovávaných v nádobách. Proteiny, které byly tepelně upravené, odolávají lépe působení mikroorganismů (Barnard et al. 2007). Přidáme-li k tomu ještě ochranné působení iontů mědi, můžeme říci, že působení mikroorganismů na potraviny uchovávané v bronzových nádobách se velmi značně sníží a dokumentovat tyto závěry na konkrétních historických proteinech bylo jedním z cílů této práce.

6.3 PROTEINY VEPŘOVÉHO MASA

Z analýzy vepřového masa vyplývá, že se u většiny z nich s největší pravděpodobností nejedná o recentní kontaminace, alespoň podle odlišení nedenaturovaných proteinů hnoje a původního vařeného masa – viz Slaná 2018. V této práci bylo prokázáno, že tento kit obtížně rozeznává tepelně nedenaturované proteiny z prasat, což mohou být v nálezech často zbytky trusu zvířat, protože ve střevech se

uvolňují buňky ze sliznic. Trus se vyskytuje v současných zemědělských hnojivech, ale samozřejmě také nelze vyloučit, že se může jednat o historickou kontaminaci. Avšak proteiny z masa, které byly už v historické době denaturovány vařením, jsou detekovány zpravidla velmi dobře. Pokud se u vzorků po vaření v laboratoři prudce zdvihne podíl reagujících proteinů, je to důkaz, že se jedná o proteiny původně nevařené a tudíž zřejmě z trusu, případně z tepelně nezpracovaných tkání (Slaná 2018). V případě zmíněné bronzové nádoby z Kralic se zřejmě nejedná o původní proteiny, i když zde není výsledek jednoznačný. Reakce nevařeného vzorku je oproti jiným podobným vzorkům (Slaná 2018) přece jen silná. Zřejmě se jedná o směs historických vařených proteinů a pozdějších kontaminací.

6.4 TUKY, VOSKY, PRYSKYŘICE

Dále zde nebyla ani v jednom vzorku detekována přítomnost tuků, vosků ani pryskyřic. U tuků je vysvětlení logické – podléhají rozkladu či zpracování mikroorganismy daleko snadněji než proteiny, v bronzových nádobách se nemají kam vsakovat jako u keramiky (viz výše), proto se často nedochovávají. U vosků a pryskyřic je pravděpodobné, že v nádobách na potraviny přechovávány nebyly a zde se spíše nabízí teorie uchovávání v nádobách dřevěných, které se však nedochovaly.

6.5 VÝZNAM NÁLEZŮ

Přítomnost proteinů z živočišných výrobků na bronzových nádobách, které sloužily k uchovávání či zpracovávání potravin, není nijak překvapivá. Co však považuji za zajímavé je přítomnost proteinů na bronzových náramcích a na veslovité jehlici (přítomnost proteinů na dýce není až tak překvapivá a velmi snadno vysvětlitelná). Protože se jednalo o depot, jsou známy zejména dvě hlavní interpretace: depot byl uložen s úmyslem pozdějšího vyzvednutí – reverzibilní deposita, nebo byl depot uložen s úmyslem uložení trvalého – deposita ireverzibilní. Toto vysvětlení je spojováno s kultovní aktivitou, například dary bohům (Salaš 2005; Smrž a Blažek 2002). Předpokládané výsledky mé práce jednoznačně podporují druhé vysvětlení a zdá se pravděpodobné, že depoty (tzv. bronzové poklady) byly zřejmě rituálními dary bohům snad podzemním, případně obět nějakým mrtvým, protože obsahovaly také kromě bronzových předmětů i jídlo a možná i nějaké další předměty podléhající zkáze, např. dřevěné. Tato informace je podstatná pro objasnění jedné dlouhodobé otázky

v archeologii. Zde se tedy ukazuje, jak mohou být biologické analýzy přínosné v tomto případě pro archeologii, ale v podobných studiích zaměřených na nedávné události také například pro některé forenzní analýzy. Další myšlenkou může být, že se jednalo o jakési obětní místo, na kterém docházelo k obětování zvířat bohům. Souvisejícím nálezem k této teorii může být otestovaná dýka s pochvou, která by teorii obětního místa dávala větší smysl. Samozřejmě nemůžeme zcela vyloučit ani prozaičtější vysvětlení. Vzhledem k neužívání příborů mohlo dojít ke kontaminaci i z rukou ušpiněných od jídla, ačkoliv v tom případě by se však spíš očekávalo větší zastoupení tuků, nežli proteinů, avšak tuky nebyly nalezeny vůbec. Nicméně vzhledem k předpokládané menší časové stabilitě lipidů na bronzových předmětech nemůžeme tuto možnost zcela vyloučit. Díky těmto zjištěním ohledně depotu má předkládaná studie větší dopad, než jen očekávaný důkaz možnosti či nemožnosti detekovat proteiny v prostředí oxidů mědi z bronzových artefaktů.

6.6 KONTAMINACE

V případě nalezení vzorků z odpadních jam je nutné otestovat hlínu přímo u nálezu a také hlínu v okolí a to ze stejné hloubky, jako je nález samotný. Vhodné je také zkontrolovat vzdálenější sondy, protože kontrolní hlína z okolí etruské mísy má stejné zastoupení potravních proteinů jako vzorky přímo z nálezu.

U hovězího masa existuje velké riziko současných kontaminací a to ze zemědělských hnojiv. Pro důvěryhodnost výsledků by bylo vhodné vzorky doplnit analýzami vzdálenější zeminy, která by nebyla z odpadní jámy, a která by se nacházela ve stejné hloubce jako všechny nálezy. Tyto kontrolní vzorky bude pro plánované publikování v odborném tisku nutné získat.

6.7 LIPIDY

Z hmotnostní spektrometrie mám k dispozici analýzu lipidů. Bohužel po porovnání výsledků zjišťuji, že pro bronzové nádoby je tato metoda méně vhodná než u keramiky. Je diskutabilní, zda je to z důvodu jiného způsobu ošetřování nádob v minulosti, nebo v technice hmotnostní spektrometrie samotné, či vlivem oxidů mědi. Jako nejpravděpodobnější se mi jeví, že lipidy poměrně snadno vsakují do neglazované porézní keramiky, kde se dlouhodobě uchovávají, což u bronzových nádob není možné.

6.8 METODIKA

Z hlediska metodiky mohu říci, že proteiny lze detekovat na bronzových nádobách stejně tak dobře, jako na keramice. Z popsaných výsledků usuzuji, že se v daných lokalitách choval skot a vepřič a jejich využití bylo hlavně pro maso a samotné bronzové nádoby sloužily podobně jako keramické.

7 ZÁVĚR

Výsledkem této práce je potvrzení teorie o uchovávání potravin, kdy se zdá, že potraviny uchovávané v bronzových nádobách podléhají degradaci v čase uchovávání méně, než potraviny uchovávané v nádobách keramických. Tímto se prokázal hlavní cíl této práce, tedy že oxidy mědi v bronzových nádobách napomáhají lepšímu uchovávání potravin. Z hlediska metodiky mohu říci, že proteiny lze detekovat na bronzových nádobách stejně tak dobře, jako na keramice.

Příspěvek k debatě o podstatě bronzových depotů je možno považovat za úspěch předkládané práce. Přítomnost zbytků potravin na ozdobných předmětech napovídá o rituálních či votivních důvodech ukládání bronzových depotů do země.

8 RESUMÉ

In this thesis was done never before tested analysis of proteins from bronze vessels and their surroundings. The results of this research should solve the question of copper ions, which are unseparable part of bronze – do copper ions act positively during food preservation or do they cause faster spoilage? Because this methodology is abundantly used on ceramic findings, we have enough data for comparison. From the point of view of methodology is necessary to say, that proteins, lipids and some other substances are on bronze vessels detectable as good as on ceramic vessels. Problem occurs with lipids – in ceramic vessels can lipids get absorbed thanks to the porous texture and therefore are better protected against external influences, which help their decomposition. In bronze vessels lipids cannot seep in, mainly thanks to absence of porous texture and because of this are lipids not protected so well as in ceramics. Naturally it would be appropriate to conduct another researches focusing primarily on lipids, not proteins, and help clarify this question. But this is not the main objective of this thesis, and there is therefore possibility of further research. Another result of this thesis is help for clarification of use of vessels and items made of bronze. From analysis of vessels is clear, that they were used for preservation and cooking of foodstuff of all kind. For findings such as bronze bracelet, paddle-shaped needle or dagger with sheath is explanation complicated and still not entirely clear. There are two theories: according to the first one was depot saved with assumption, that it will be dug out again, thus underground placement was used just as cache, the second one says, that these were burial grounds and things, which were found there, were meant to be used by dead in afterlife, possibly that they were meant as gifts for gods on sacrificial places. This would perfectly explain presence of pig and cow proteins on items such as bracelet or paddle-shaped needle. This theory is also supported by the finding of dagger with sheath, on which were proteins also detected and that has even logical explanation – the dagger was used to sacrifice animals to gods. This probably explains also presence of proteins on decorative bronze findings and it is another step to solving of this longtime question. Another benefit is establishment of the fact, that biological analysis of historical findings can be beneficial for archaeology, and of course

also for similarly focused studies on recent events and last but not least also for forensic analysis.

SEZNAM LITERATURY

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. a Walter, P. 2005. *Essential cell biology*. Espero, 740 s. Ústí nad Labem. ISBN 80-902906-2-0.
- Barber, M., Bordoli, R. S., Sedgwick, R. D. a Tyler, A. N. 1981. Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spektrometry. *Nature* 293, 270-275.
- Barker, A. L. 2010. *Archaeological proteomics: method development and analysis of protein-ceramic binding*. MS, Diplomová práce, University of North Texas, 86 s. Denton.
- Barnard, H., Schoemaker, L., Craig, O. E., Rider, M., Parr, R. E., Sutton, M. Q. a Yohe II, R. M. 2007. Kapitola 17: Introduction to the analysis of protein residues in archaeological ceramics. V: BARNARD, H. a EERKENS, J. W. (Ed.), *Theory and practise of archaeological residue analysis*. Archaeopress, 216-228 s. Oxford.
- Björklund, E., Pallaroni, L., von Holst, CH. a Unglaub, W. 2001. Method of determination of appropriate heat treatment of animal meal by immunoassay developed for detection of cooked beef: Interlaboratory study. *Journal of AOAC* 84(6), 1835-1839. Dostupné z: [http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/J.AOAC%201999-2003/J.AOAC2001/v84n6\(nov-dec\)/v84n6p1839.pdf](http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/J.AOAC%201999-2003/J.AOAC2001/v84n6(nov-dec)/v84n6p1839.pdf)
- Brandt, E., Wiechmann, I. a Grupe, G. 2002. How reliable are immunological tools for the detection of ancient proteins in fossil bones? *International Journal of Osteoarchaeology* 12(5), 307-316. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/oa.624>
- Collins, M. J., Westbroek, P., Muyzer, G. a de Leeuw, J. W. 1992. Experimental evidence for condensation reactions between sugars and proteins in carbonate skeletons. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56(4), 1539-1544. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(92\)90223-6](https://doi.org/10.1016/0016-7037(92)90223-6)
- Craig, O. E. a Collins, M. J. 2000. An improved method for the immunological detection of mineral bound protein using hydrofluoric acid and direct capture. *Journal of Immunological Methods* 236(1-2), 89-97. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00242-2)
- Cramp, L. J. E., Jones, J., Sheridan, A., Smyth, J., Whelton, H., Mulville, J., Sharples, N. a Evershed, R. P. 2014. Immediate replacement of fishing with dairying by the earliest farmers of the northeast Atlantic archipelagos. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281, 1-8. DOI: 10.1098/rspb.2013.2372.
- Čiperová, M., Pavelka, J., a Šmejda, L. 2015. Detekce stop mléka v porézní keramice z neolitu jihozápadních Čech a otázka trávení laktózy u evropských populací v minulosti. *Acta Fakulty filozofické Západočeské univerzity v Plzni* 7(2), 193-211. ISSN 2336-6346.

- Dongoske, K. E., Martin, D. L. a Ferguson, T. J. 2000. Critique of the Claim of Cannibalism at Cowboy Wash. *American Antiquity* 65(1), 179-190. DOI: 10.2307/2694813
- Erkens, J. W. 2005. GC-MS analysis and fatty acid ratios of archaeological potsherds from the western Great Basin of North America. *Archaeometry* 47(1), 83-102. DOI: 10.1111/j.1475-4754.2005.00189.
- Evershed, R. P. 1993. Biomolecular archeology and lipids. *World Archaeology* 25(1), 74-93. DOI: 10.1080/00438243.1993.9980229
- Evershed, R. P., Dudd, S. N., Charters, S., Mottram, H., Stott, A. W., Raven, A., van Bergen, P. F. a Bland, H. A. 1999. Lipids as carriers of anthropogenic signals from pre-history. *Philosophical Transaction: Biological Sciences* 354(1379), 19-31. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/56704>
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. a Whitehouse, C. M. 1989. Electrospray ionization for mass spektrometry of large biomolecules. *Science* 246(4926), 64-71.
- Friedecký, D. a Lemr, K. 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Bichem. Metab.* 20(41), 152-157.
- Child, A. M. a Pollard, M. A. 1992. A review of the applications of immunochemistry to archaeological bone. *Journal of Archaeological Science* 19(1), 39-47. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(92\)90005-N](https://doi.org/10.1016/0305-4403(92)90005-N)
- Kooyman, B., Newman, M. E., Cluney, CH., Lobb, M., Tolman, S., McNeil, P. a Hills, L. V. 2001. Identification of horse exploitation by clovis hunters based on protein analysis. *American Antiquity* 66(4), 686-691. DOI: 10.2307/2694181.
- Loll, M. J. a Bollag, J. 1983. Protein Transformation in Soil. *Advances in Agronomy* 36, 351-382. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60358-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60358-2)
- Mottram, H. R., Dudd, S. N., Lawrence, J., Stott, A. W. a Evershed, R. P. 1999. New chromatographic, mass spectrometric and stable isotope approaches to the classification of degraded animal fats preserved in archaeological pottery. *Journal of Chromatography A* 833(2), 209-221. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)01041-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)01041-3)
- Murphy, R. C. a Gaskell, S. J. 2011. New applications of mass spektrometry in lipid analysis. *J Biol Chem* 286(29), 25427-25433. doi: 10.1074/jbc.R111.233478.
- Palm-Espling, M. E., Niemiec, M. S. a Wittung-Stafshede, P. 2012. Role of metal in folding and stability of copper proteins in vitro. *Biochimica at Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research* 1823(9), 1594-1603. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.013>

- Pavelka, J. a Orna, J. 2011. Výsledky analýzy potravinových zbytků na pozdně středověké keramice v Plzni. *Acta Fakulty filozofické Západočeské univerzity v Plzni 3*, 85-98. ISSN 1802-0364.
- Pavelka, J. a Vařeka, P. 2008. Příspěvek v poznání stravy ve vrcholném a pozdním středověku: první výsledky analýzy potravinových zbytků na keramice z archeologických výzkumů. *Kuděj 10(2)*, 98-109. ISSN 1211-8109.
- Pavelka, J., Šmejda, L., Hynek, R. a Hrdličková-Kučková, Š. 2016. Immunological detection of denatured proteins as a method for rapid identification of food residues on archaeological pottery. *Journal of Archaeological Science 73*, 25-35. ISSN 0305-4403
- Salaš, M. 2005. *Bronzové depoty střední až pozdní doby bronzové na Moravě a ve Slezsku*. Svazek 2., Tabulky. Moravské zemské muzeum, 499 s. Brno. ISBN 80-7028-212-6.
- Slaná, K. 2018. *Identifikace proteinů z keramické matrix archeologických nálezů*. MS, Bakalářská práce, depon. in Západočeská univerzita v Plzni, 44 s. Plzeň.
- Smrž, Z. a Blažek, J. 2002. Nález bronzových srpů z hory Kletečná (706 m n. m.) v Českém středohoří. K votivním nálezům z vrcholků kopců a hor. *Archeologické rozhledy 54(4)*, 791-810. ISSN 0323-1267.
- Solazzo, C., Fitzhugh, W. W., Rolando, CH. a Tokarski, C. 2008. Identification of protein remains in archaeological potsherds by proteomics. *Analytical Chemistry 80(12)*, 4590-4597. DOI: 10.1021/ac800515v
- Šálková, T., Bezděk, A., Březinová, H., Farkašová, K., Houfková, P., Chvojka, O., John, J., Koník, P., Kovačiková, L., Michálek, J., Msallamová, Š., Novák, J., Pavelka, J., Šuláková, H., Bešta, T., Myšková, E., Weiter, L. a Zronek, P. 2015. Bioarcheological reconstruction of the funeral rite – case study based on organic material from the Hallstatt Perion tumulus at the site Zahrádka (South Bohemia, Czech Republic). *Památky archeologické 106*, 95-135.
- Tokarski, C., Martin, E., Rolando, CH. a Cren-Olivé, C. 2006. Identification of proteins in renaissance paintings by proteomics. *Analytical Chemistry 78(5)*, 1494-1502. DOI: 10.1021/ac051181w

INTERNETOVÉ ODKAZY

[1] http://tresen.vscht.cz/kot/wp-content/uploads/2013/09/C-P%C5%99%C3%ADprava-diagnostick%C3%A9ho-testu-na-b%C3%A1zi-lateral-flow-immunoassay.pdf?fbclid=IwAR2HTkGffhfvZMqLAZKEopV_qtnRvzWhEo6f8XTy5mtZqx6Os54nI50Pkw

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A DIAGRAMŮ

Obr. 1. Jamky vyjmuté z mikrotitrační destičky, barevně jsou odlišené pozitivní reakce.	14
Obr. 2. Test Reveal ® 3-D pro vaječný protein ovomukoid.....	16
Obr. 3. Bronzová nádoba, Tálín.....	28
Obr. 4. Bronzový náramek, Tursko.	29
Obr. 5. Kruhový plechový terč, Tursko.	30
Obr. 6. Dýka s pochvou, Tursko.	30
Obr. 7. Veslovitá jehlice, Tursko.	30
Tab. 1. Výsledky z lokality Rovná.	27
Tab. 2. Výsledky z lokalit Stebno, Tálín, Tursko, Kralice.	31