



národní  
úložiště  
šedé  
literatury

## **Analýza reziduí z archeologické keramiky pomocí specifických protilátek a hmotnostní spektrometrie**

Pavelka, Jaroslav  
2020

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-442296>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Licence Creative Commons Uveďte původ 4.0

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 21.05.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní [nusl.cz](http://nusl.cz) .

**ANALÝZA REZIDUÍ  
Z ARCHEOLOGICKÉ KERAMIKY  
POMOCÍ SPECIFICKÝCH PROTLÁTEK  
A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE**



**Jaroslav Pavelka**

**Autor:**

Mgr. Jaroslav Pavelka, Ph.D.  
Západočeská univerzita v Plzni

**Konzultant:**

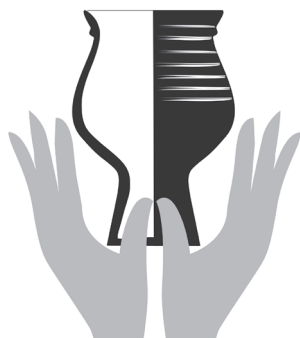
RNDr. Lukáš Kučera, Ph.D.  
Univerzita Palackého v Olomouci

**Oponenti:**

prof. PhDr. Rudolf Krajíc, CSc.  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Mgr. Gabriela Blažková, Ph.D.  
Archeologický ústav AV ČR Praha

Schválená metodika byla vytvořena v rámci projektu NAKI II  
**Vrcholně středověká keramika jako součást movitého kulturního dědictví**  
DG18P02OVV020



**Plzeň 2020**

# Obsah

---

1. Úvod	1
2. Cíl metodiky	1
2.1. Detekce proteinů	2
2.2. Detekce lipidů	2
2.3. Problémy související s kontaminací vzorků	2
3. Způsob odběru vzorků a podmínky jejich ošetření a uchování	3
4. Vlastní popis metodiky využívající specifické protilátky	4-5
5. Metodika analýzy proteinů pomocí ELISA kitů	5
5.1. Výběr vzorků pro analýzu proteinů pomocí specifických protilátek	5-6
5.2. Odběr, způsob uchování a příprava vzorků	6-7
5.3. Laboratorní postup	7-11
5.4. Verifikace	11-13
6. Výsledky metodiky	13-14
7. Srovnání metodik využívající testy na protilátky a hmotnostní spektrometrii	14
8. Použití metodiky v praxi	14
Použitá literatura	15-17
Seznam publikací, které vedly k metodice	17
Fotografická dokumentace keramiky	18-24
Tabulky s výsledky	25-29
Chromatogramy	30-37





## 1. ÚVOD

Keramika má v archeologii prvořadý význam, neboť je důležitým svědectvím artefaktuální minulosti, indikátorem lidských kultur, nositelem informací o technologické, ekonomické a sociální variabilitě společnosti. Zároveň je keramika v archeologii považována za důležitý prostředek pro datování většiny archeologických nálezových situací. Na keramice se v určitých podmínkách mohou dochovat důležité informace zachované v podobě biologických markerů – tzv. **zuhelnatělých organických makrozbytků potravin**, obsahujících (proteiny, lipidy, sacharidy, případně další látky, které se vyskytují v potravinách, například některé druhy kyselin, jako kyselina vinná). Jejich extrakcí a další analýzou je možné určit druh stravy (např. vepřové/hovězí maso, mléčné a obilné produkty) a v některých případech i způsob tepelné úpravy pokrmů. V obecné rovině mohou získané informace přispět kromě poznání funkce keramiky k otázkám stravování, diety, potravinové subsistence nebo interakce člověka s prostředím v minulosti, a to jak na lokální úrovni, tak v širším srovnávacím měřítku (srov. např. *Dunne 2017*).

**Metodický postup je založen na detekci vařených a nevařených proteinů pro určení masitých pokrmů a gliadinu, jenž je součástí glutenu, dokládající přítomnost obilovin a dalších cereálií na středověké keramice pomocí ELISA testů na specifické protilátky využívajících komerční certifikované sady kitů.** Na základě detekce proteinů, lze určit druh masité stravy (vepřové/hovězí) a zda se v potravinách objevovaly mléčné produkty. Pomocí testů na gliadin lze stanovit, zda se v nádobách přechovávaly obilniny či další cereálie. Metodika vycházející z testů na specifické protilátky poskytuje obdobné výsledky jako jiné metody využívající **hmotnostní spektrometrie-plynovou chromatografii** (GC-MS: *Gas chromatography-Mass spectrometry*), respektive může být jejich levnější alternativou. Navržená metodika může mít rozsáhlé využití nejen pro studium archeologické keramiky. V úvahu také přichází využití metodiky pro forenzní vědy.

## 2. CÍL METODIKY

Metodika je zaměřena na detekci denaturovaných proteinů ze středověké keramiky využívající metody **ELISA** (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*). Metoda ELISA patří do skupiny imunologických analýz, ve které je vzorek přiveden do kontaktu s výhodně monoklonálními protilátkami, o nichž je známo, že se vážou na sledovanou molekulu – antigen (např. *Barnard et al. 2017; Barnard – Eerkens 2017, 628*). ELISA využívá v této metodice sady kitů, které jsou primárně určeny pro testování alergenů v potravinách, ale mohou být zároveň úspěšně využity pro detekci protilátek proti termostabilním druhově specifickým proteinům.<sup>1</sup>

V minulosti byly již úspěšně testovány na keramice pomocí hmotnostní spektrometrie analýzy lipidů, které se velmi rozšířily v praxi (*Evershed 1993; Evershed et al. 1999; Copley et al. 2003; Craig et al. 2004; Craig et al. 2011; Salque 2015*), naopak výsledků týkajících se analýz proteinů získaných z keramické matrix bylo publikováno dosud málo (*Evershed – Tuross 1996; Craig – Collins 2002; Barnard et al. 2007*).

Cílem metodiky je ověřit, zda se na středověké keramice pomocí ELISA analýz proteinů dochovaly pozůstatky vařených či nevařených masitých pokrmů (zejména vepřového masa) a obilovin, které mohou přispět k otázkám funkce keramiky, způsobu přípravy a konzumace pokrmů. Dalším cílem metodiky je u některých druhů proteinů s jistotou rozlišit jejich původ a odlišit historické původní proteiny od recentních kontaminací.

<sup>1</sup> ELISA využívá schopnost proteinů vázat enzymy na části imunoglobulinových molekul.

## 2.1. DETEKCE PROTEINŮ

V současnosti lze proteiny v keramice diagnostikovat buď (GC-MS) hmotnostní spektrometrií (Evershed – Tuross 1996; Craig 2005; Barnard et al. 2007), nebo metodikou ELISA na základě detekce specifických protilátek. Výhoda této metodiky spočívá v lepších možnostech zjištění druhového původu proteinů, díky tomu, že jsou přímými produkty DNA rostlinných nebo živočišných druhů, ve kterých byly syntetizovány (Barnard et al. 2007, 216). Hmotnostní spektrometrií lze zpravidla zachytit větší spektrum různých proteinů na základě identifikace biomolekul aminokyselin, avšak pomocí imunologických testů je možné získat lepší specifikaci nalezených bílkovin, např. hmotnostní spektrometrie určí savčí kolagen, ale specifické ELISA protilátky dokumentují, že se jedná například o proteiny prasat (*Sus scrofa*). Zatím touto metodikou nelze určit způsob tepelného zpracování, zda bylo např. maso vařené, pečené či smažené, pouze lze určit, zda bylo tepelně upravené či nikoliv. Pomocí dalších druhů protilátek (pro kasein<sup>2</sup>, gliadin<sup>3</sup>), lze detekovat také přítomnost mléčných produktů a obilovin (např. Pavelka et al. 2016). Jistou nevýhodou analýz proteinů, že na rozdíl od lipidů nebo alkaloidů, podléhají více přeměnám a chemickým rozkladům způsobené denaturací, hydrolýzou, dekarboxylací, deaminací, hnědnutím a racemázou. Náchylnější jsou také na nejrůznější kontaminace (Barnard et al. 2007, 216–217; Barnard – Eerkens 2017, 634).

## 2.2. DETEKCE LIPIDŮ

Současnou a pro historické potravinové zbytky nejvyužívanější metodou je analýza lipidů pomocí hmotnostní spektrometrie. Diagnostické lipidové markery mohou přežít často velmi dlouho díky jejich hydrofobní povaze, tj. snadno se nerozpustí ve vodě. Stabilita těchto biomolekul zvyšuje jejich relativní pravděpodobnost přežití ve srovnání s jinými biomolekulami jako jsou DNA, proteiny nebo sacharidy (Dunne 2017, 1–2). Lipidy se dobře uchovávají v porézní keramice a jejich analýza dává spolehlivé výsledky, je možno rozlišit zda jsou rostlinného nebo živočišného původu, či zda pochází z mléčných produktů. Pomocí lipidů lze identifikovat také různé, tuky, oleje, vosky nebo pryskyřice. Hlavními formami lipidů nacházející se v lidské stravě jsou triacylglyceroly, které jsou vyrobeny z molekul glycerolu spojené třemi řetězci mastných kyselin. Triacylglyceroly tvoří ve stravě 95% lipidů nacházející se ve většině potravin (Dunne 2017, 2). V minulosti, ale i současnosti byla o lipidech v archeologické keramice publikována řada studií a patří k nejčastěji extrahovaným biologickým markerům (např. Copley 2005; Craig 2011; Cramp 2014a; Cramp 2014b; Dunne 2017; Mazurek et al. 2019).

## 2.3. PROBLÉMY SOUVISEJÍCÍ S KONTAMINACÍ VZORKŮ

Problém při interpretaci výsledků analýz může být způsoben kontaminací vzorků keramiky současnou zemědělskou činností. Některá používaná zemědělská organická hnojiva jsou obohacena o mléčné produkty, které mohou způsobit falešně pozitivní reakce, ať už při analýzách hmotnostní spektrometrií, nebo při testech pomocí protilátek. Proteiny z hospodářských zvířat se v podobě hnoje dostávají do půdy a do archeologických nálezů i pod povrchem. Z tohoto důvodu je doporučeno odebrat spolu s keramikou i referenční vzorek okolní zeminy, abychom vyloučili možné zdroje kontaminací. Tyto kontaminace ovlivňují především detekce proteinů. Problematice kontaminace je věnována pozornost při interpretaci výsledků (k problémům možné kontaminace proteinů např. Barnard et al. 2007).

<sup>2</sup> Kasein je přirozenou součástí mléka, kde představuje až 80% mléčných proteinů

<sup>3</sup> Jedná se zejména o omega gliadin jako hlavní obilný protein. Gliadin může indikovat přítomnost obilnin jako je pšenice tvrdá (*Triticum durum Desf.*), pšenice setá (*Triticum aestivum*), žito seté (*Secale cereale*), ječmen obecný (*Hordeum vulgare*), avšak nikoliv oves setý (*Avena sativa*).

### 3. ZPŮSOB ODBĚRU VZORKŮ A PODMÍNKY JEJICH OŠETŘENÍ A UCHOVÁNÍ

V praxi lze metodiku aplikovat na velkou většinu archeologické keramiky. Nejvhodnější je keramika čerstvě získaná při archeologickém terénním výzkumu, dobré výsledky lze získat i z keramiky delší dobu uchované v muzejních sbírkách ve vhodných depozitárních podmínkách.

Pozůstatky potravin se dobře uchovávají zejména v pórovité keramice vypalované přibližně do teploty 950°C, nevhodné jsou analýzy vzorků slinuté keramiky s hladkým leštěným nebo glazovaným povrchem (kameniny, porcelán). Pro testování je vhodné vybrat vzorky ze střepů keramiky pocházející z jasně morfologicky určených částí nádob (např. zlomky okrajů, den), na základě nichž je možné určit typ nádoby a tudíž i její funkci související s tepelnou přípravou pokrmů nebo s přechováváním potravin. Pro analýzy stačí menší vzorek keramiky (přibližně o velikosti 3 cm<sup>2</sup>).

Zbytky pokrmů nejčastěji v podobě zkarbonizovaných usazenin pocházejících z opakovaných procesů vaření jsou získávány oškrabáním z vnějšího povrchu střepu pomocí ostrého nástroje (nože nebo skalpelu). K odběru stačí malé množství vzorku v 1/10 – 1/1000 g. Samotné oškrabání je nutno provádět šetrně, aby se příliš nepoškodila keramika, většinou ale není nutné seškrabat vrstvu příliš do hloubky keramického střepu.

Vhodné k analýzám jsou především střepy keramiky, které neprošly procesem laboratorního čištění a konzervací (mytí a ošetření chemickými přípravky). Opatrné laboratorní mytí pod tekoucí vodou většinou z keramiky proteiny neodstraní, avšak ošetření kyselinou chlorovodíkovou způsobuje sterilitu nádob pro jakékoliv biologické analýzy. Nevhodné je použití také některých druhů disperzních lepidel v případě restaurování keramiky, které mohou způsobit kontaminaci. Vzorky určené pro analýzu je vhodné uchovávat v plastických (tzv. *acid-free*) sáčkách, nebo zabalené do papírového kapesníku či aluminiové fólie. Vzorky by měly být zároveň absolutně suché, neboť hrozí, že pokud se díky vlhku namnoží bakterie, historické proteiny pravděpodobně budou zničeny. Nevhodná je manipulace se vzorky v ruce, neboť mohou být kontaminovány lipidy z kůže nebo kosmetickými přípravky. K práci se vzorky je vhodné pracovat v nitrilových rukavicích (srov. Dunne 2017, 16–17).

Samotná analýza pomocí protilátek je většinou nenáročná a orientační testy je možno provádět i v terénních (polních) podmínkách za dodržení sterility odebraných vzorků. Postačí jednoduché laboratorní vybavení (pipety, plasty a pracovní stůl). K preciznější analýze je potřeba spektrofotometr (ELISA Reader) pro titrační destičky (**obr. 1**) s příslušným vyhodnocovacím softwarem (Bio Tek), který vytváří např. excelové tabulky s právě naměřenými hodnotami a připojuje podmínky měření, zejména hodnoty absorbance.



Obr. 1. Elisa Reader (zdroj: <https://www.ibiotech.cz/>).

#### 4. VLASTNÍ POPIS METODIKY VYUŽÍVAJÍCÍ SPECIFICKÉ PROTILÁTKY

Analýzou organických reziduí se v minulosti zabývala celá řada badatelů, především v zahraničí, kteří používali často jiné metody a přístupy, a to jak u analýz pravěké, antické nebo středověké keramiky (*Oudemans – Boon 1991; Evershed 1993; Evershed et al. 1999; Craig – Collins 2002; Craig et al. 2000; Eerkens 2005; Baker 2010; Pollard et al. 2007*).

Navrhovaná metodika se soustřeďuje zejména na proteiny, neboť podobných výsledků bylo doposud publikováno málo. V zásadě můžeme rozlišit dvě hlavní metody jak detekovat proteiny v archeologické keramice. Nejvyužívanější metodou současnosti je hmotnostní spektrometrie. Například již klasická práce *Oudemans a Boon (1991)* popisovala analýzy zbytků potravin z archeologické keramiky pomocí hmotnostní spektrometrie společně s pyrolýzou – plynovou chromatografií. Pomocí této metody byla nalezena řada organických sloučenin, hlavně mastných kyselin, ale i stopy proteinů a polysacharidů, ovšem bez bližšího druhového určení (*Oudemans – Boon 1991*).

Pro analýzu hmotnostní spektrometrií je nutná izolace, která je možná několika způsoby a pak jsou proteiny štěpeny do menších kusů, v současnosti nejčastěji trypsinem. Takto vzniklé menší peptidy jsou obvykle určeny pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie – hmotnostní spektrometrie. Materiál se v prvním kroku oddělí na základě jejich chemických vlastností pomocí kapalinové chromatografie. Vzorky v roztoku se vedou kapilárními trubicemi se speciálními povlaky, které mají afinitu k některým materiálům. Ty sloučeniny, které mají větší afinitu k určitým materiálům, jsou zachyceny, ostatní se dostávají dál v magnetickém nebo elektrickém poli elektronového násobiče. Po rozdělení jsou analyzovány pomocí vlastní hmotnostní spektrometrie (*Pollard et al. 2007; Barker 2010*). Hmotnostní spektroskopie spočívá v separaci iontů, které jsou produkovány v iontovém poli na základě jejich hmotnosti, poté jsou ionty detekovány. Vzorek je ve vakuu podroben odpařování, vlastní ionizace může být prováděna více způsoby, kupříkladu dopadem elektronového paprsku, tím se vytváří nabitě částice. Ionty se pak dělí v analyzátoru elektromagnetického pole a jsou vyhodnoceny, obvykle kvantitativní metodou. Hmotnostní spektrometr vytváří tři moduly. První je iontový zdroj, který převádí molekuly na ionty, další je hmotnostní analyzátor, který třídí ionty na základě její hmotnosti díky elektromagnetickým polím. Poslední modul je detektor na měření hodnoty indikátoru množství a tím získává data o počtech jednotlivých iontů. Hmotnostní spektrometr slouží k různým účelům, převážně pro detekci a určení neznámých látek, další polem využití je stanovení izotopového složení prvků v molekulách, nebo určení struktury sloučenin (viz *Karasek – Clement 1988; Lee 2012*).

Hmotnostní spektrometrie má uznávané a široké uplatnění, dává reprodukovatelné a kvalitní výsledky a je schopná pokrýt široké spektrum látek. Z archeologického hlediska však může představovat problém nedostatek analyzovaného materiálu, obtížná zpracovatelnost vzorku a s tím může souviset problém s druhově specifickým rozlišením proteinů. V tom jsou dosud lepší jiné metody využívající testy na protilátky (viz *Pavelka – Vařeka 2008; Pavelka a kol. 2011; Šálková a kol. 2015; Pavelka et al. 2016*).

Navrhovaná metodika se týká detekcí pomocí protilátek. Pokud se používal test pomocí protilátek v minulosti na detekci historických proteinů, byl velký problém s tzv. křížovými reakcemi (*cross-reactions*; nespecifické reakce mezi antigenem a protilátkou), při těchto reakcích dochází k navázání protilátky na jiný antigen, než na který byla určena a tím ke vzniku falešně pozitivních výsledků (*Child – Pollard 1992; Brandt et al. 2002*). To bylo u pozměněných historických proteinů poměrně časté. Hlavním problémem těchto testů bylo použití protilátek vyvinutých na současné nedegradované proteiny, a proto měly na historické proteiny malou, nebo diskutabilní schopnost detekce. Při těchto analýzách nebylo bráno příliš v úvahu, že užití ELISA testů může být ovlivněno degradací proteinů, tím je omezena vazba antigenu, a tak mohou vznikat nespecifické výsledky (*Dongoske et al. 2000*).



Hlavní odlišnost navrhované metodiky oproti dříve nahodile zkoušeným protilátkám, je že používá certifikované a prověřené komerční protilátky, primárně vytvořené proti degradovaným proteinům. Proteiny jsou degradované především vysokou teplotou, proto i historické tepelně upravené proteiny mohou být snadno detekovatelné. Na analýzy je možno použít karbonizovaný zbytek potravy („příškvarek“), nebo přímo část porézní keramiky seškrabané z vnitřní stěny nádoby nebo z jejího dna. Stačí i poměrně malé množství, cca 0,2 g, ale větší množství je výhodnější (0,5-0,9 g). Takto vzniklá prášková keramická hmota se zbytky proteinů je následně podrobena přípravě, podle instrukcí kitu. Například je rozpouštěna ve fyziologickém roztoku, PBS (Phosphate Buffered Saline), v případě gliadinu v 55 % alkoholu a podobně. Oproti pokynům výrobce je obvykle nutné značně umenšit extrahované množství, případně zvýšit koncentrace některých roztoků (Čiperová *et al.* 2015; Pavelka *et al.* 2016). V následujících krocích je obvykle možno postupovat podle pokynů výrobce. Oproti jiným metodikám (hmotnostní spektrometrie-plynová chromatografie) je značnou výhodou vyloučení složitých a zatím nejednotných způsobů extrakce proteinů z keramické matrix. Pro imunologické ELISA testy nejsou speciální extrakční techniky potřebné a pouze by se jimi zvyšovalo riziko poškození proteinů, protože jemně nadrcené zbytky keramiky slouží jako jakési nosiče proteinů a nemají na reakci antigen – protilátka nijak zásadní vliv (Čiperová *et al.* 2015).

## 5. METODIKA ANALÝZY PROTEINŮ POMOCÍ ELISA KITŮ

Metodika analýzy proteinů vychází z aplikace kitů pro detekci a identifikaci druhů některých domácích zvířat a je doplněna o identifikaci gliadinu, jako obilného proteinu. Hlavní část tvoří testy pomocí kitů na identifikaci masa prasat (*Sus scrofa*). Soupravy vyrábí a distribuuje společnost Neogen (<https://foodsafety.neogen.com/en/biokits-species-identification>). Tato sada umožňuje detekci proteinů specifických pro různé druhy masa. Tento test využívá mikrotitračních destiček ELISA a protilátek proti termostabilním svalovým proteinům. Jedná se o nekompetitivní typ sendvičového testu, kde se pozitivní reakce zabarví. Tento test je speciálně navržen tak, aby detekoval vařené bílkoviny; používané protilátky silně interagují s proteiny denaturovanými tepelným zpracováním. Proto výrobce dává pokyn, aby tato sada byla používána pouze na vařených vzorcích. Pořízeny byly dvě certifikované sady ELISA kitů COOKED PORK 902012N MEAT DIFFERENTIATION COOKED PORK (48 wells) pro určení vařeného a nevařeného vepřového masa a 002NEO8480 VERATOX FOR GLIADIN (48 wells up to 38 samples) pro detekci obilovin.

### 5.1. VÝBĚR VZORKŮ PRO ANALÝZU PROTEINŮ POMOCÍ SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK

Pro vlastní analýzu a ověření relevantnosti metodiky byly v rámci projektu NAKI II *Vrcholně středověká keramika jako součást movitého kulturního dědictví* (DG18P02OVV020) testovány vzorky středověké keramiky pocházející z archeologických výzkumů z několika typů středověkých lokalit (Brno – středověké královské město), Počátky u Jihlavy (menší poddanské středověké městečko), Žďár nad Sázavou (zaniklá trhová ves) a Rokštejn (středověký hrad). Jedná se vesměs o vzorky keramiky datované do období 13. až 15. století. Vzhledem k testování metodiky na starším a mladším keramickém materiálu byly využity již dříve analyzované vzorky z raně středověkého hradiště v Katovicích datovaného do 9. století. V jednom případě byla analyzována glazovaná keramika – porcelánová miska z 2. poloviny 19. století z Brna, obsahující pozůstatek příškvářeného pokrmu.

K analýze byly vybrány vzorky pocházející z různých typů kontextů (sídlištní, odpadní a požárové vrstvy, výplně odpadních jámek, suterénů a dalších výrobních nebo hospodářských objektů). Vzorky pocházely z nedávno provedených archeologických výzkumů. Testovány byly i vzorky, které byly delší dobu uloženy v depozitárních sbírkách. Celkem bylo analyzováno 26 vzorků vrcholně středověké keramiky a 8 vzorků raně středověké, které nesly stopy zkarbonizovaných usazenin

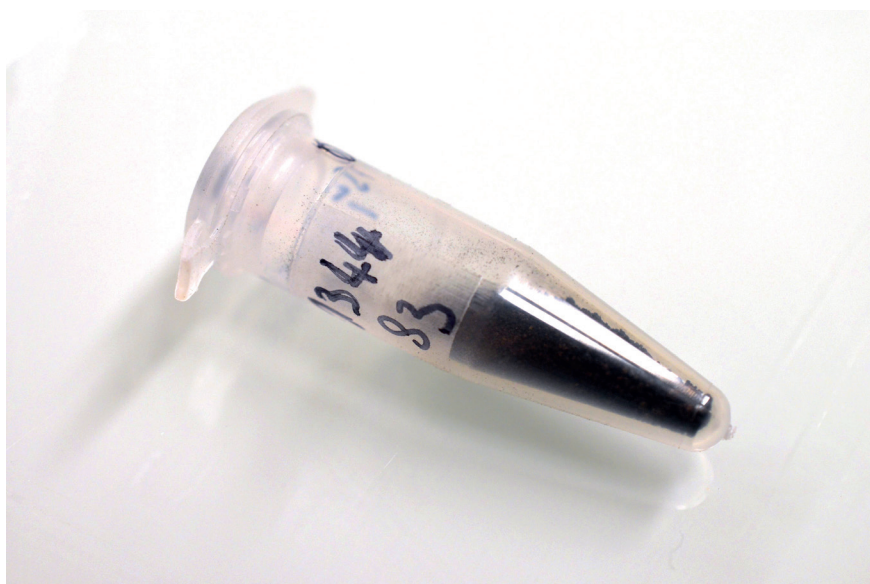
(„příškvarků“) na vnějším povrchu střepů. K analýzám byly vhodně vybrány vzorky střepů, které bylo možné přiřadit k typu nádoby (hrnec, zásobnice), například podle profilace okraje (**obr. 8–14**).

## 5.2. ODBĚR, ZPŮSOB UCHOVÁNÍ A PŘÍPRAVA VZORKŮ

Vzorky byly z keramiky získány seškrabáním zkarbonizovaných usazenin z vnějšího povrchu keramiky pomocí ostrého kovového nástroje – skalpelu (**obr. 2**). Osvědčuje se předtím očistit nejsvrchnější vrstvu keramiky jemným brusným, např. smirkovým papírem (do hloubky cca 0,2-0,5 mm) tak, aby se povrch zbavil případných nečistot. Samotný způsob odběru vzorků je v zásadě neinvazivní, je nutno použít poměrně malé množství keramiky z vnitřního povrchu. Keramickou hmotu není nutno pro ELISA test odstraňovat, test detekuje proteiny i v přítomnosti najemno nadrcené keramické matrix (Číperová *et al.* 2015). Pro potřeby projektu bylo odebráno cca množství 0,3 až 0,5 g ve formě prachovitých částic do plastových uzavíratelných zkumavek (ependorf). Všechny zkumavky byly popsány evidenčním čísly vzorků (**obr. 3**).



Obr. 2. Ukázka odběru vzorku pomocí skalpelu.



Obr. 3. Odebraný vzorek v plastové zkumavce (ependorf) s popisem vzorku.

Odebrané vzorky proteinů je vhodné uchovávat v suchém stavu v chladných podmínkách (například v chladničce). Proteiny vystavené delší dobu působení tepla podléhají zkáze. Experimentálně bylo zjištěno, že vzorky proteinů s velmi silnými signály po delší dobu uložené v teplé místnosti (po sedm let), jenž byly znovu testovány, přinesly zcela negativní výsledky (*Pavelka nepublikováno*). Naproti tomu vzorky z keramiky uchovávané po třicet let v chladné místnosti reagovaly na protilátky velmi dobře. Vzorky by neměly přijít do kontaktu se silnými kyselinami. Odebrané vzorky keramiky uložené v chladničce byly dále analyzovány po cca třech až čtyřech týdnech.

Následně byly vzorky rozpuštěny v 200  $\mu$ l fyziologického roztoku (0,9%; 0,15M) chloridu sodného v destilované vodě a silně třepány (vortex) po dobu 5 minut v plastových zkumavkách eppendorf (**obr. 4**).



Obr. 4. Způsob třepání na vortexu (zdroj: <http://www.keison.co.uk/>).

Není třeba použít žádnou speciální metodu extrakce proteinů absorbovaných na keramickou hmotu, protože takový krok může potenciálně poškodit proteinové struktury důležité pro naši metodu detekce (*Craig – Collins 2002; Barker 2010*). Po tomto kroku jsou plastové zkumavky ponechány v klidu po dobu 3 minut, během kterých se na dně zkumavek usazuje hrubší část keramické frakce. Kapalina z horní části zkumavek je pak použita (objem = 100  $\mu$ l) pro stanovení přítomnosti či nepřítomnosti proteinů (srov. viz *Čiperová et al. 2015*). Vzorek z horní části zkumavky byl odebrán pomocí pipety.

Před druhým cyklem imunologické analýzy byly vzorky vařeny při teplotě 97°C po dobu 15 minut za použití termostatu (uzávěry plastových zkumavek eppendorf jsou otevřeny, aby se zabránilo poškození a ztrátě vzorků při expanzi plynů). Tento krok je prováděn z důvodu, aby se zajistilo, že proteiny přítomné ve vzorcích budou tepelně denaturovány, neboť souprava ELISA použitá v naší studii se zaměřuje specificky na proteiny v této formě.

### 5.3. LABORATORNÍ POSTUP

Identifikace proteinů byla prováděna pomocí ELISA souprav pro detekci vepřového masa (*cooked pork*) a gliadinu. Při testech ELISA jsou specifické protilátky vázány na dno mikrotitračních desítek (**obr. 5**). Protilátky jsou schopny se vázat na specifické proteiny ve vzorku. Tyto reakce jsou viditelné za použití biotinylovaných<sup>4</sup> druhově specifických protilátek a řady promývacích a zbarvovacích kroků.

<sup>4</sup>Biotinylace je proces vazby biotinu (vitamin H) k molekule proteinu pomocí NH<sub>2</sub> skupiny.



### 5.3.1 POSTUP PRO DETEKCI ŽIVOČIŠNÝCH PROTEINŮ

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

1. Nejprve se připraví extrakční a promývací roztoky a 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, přikrýt a nechat inkubovat 45 minut při pokojové teplotě. Při tomto typu testu je možno vzorky napipetovat zpět do plastových zkumavek (ependorf) 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, jamky se vzorky se poté 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 roztoku konjugát avidin peroxidázy.
9. Destičku je třeba opatrně protřepat v ruce a nechat inkubovat 15 minut při pokojové teplotě.
10. Vzorky je třeba promýt promývacím roztokem, alespoň 5x.
11. Do každé testovací jamky se přidá 100 µl TMB substrátu (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin).
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 µl 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 – u pozitivních reakcí z modré na žlutou.
15. Získaná data jsou stanovena spektrofotometricky z intenzity reakcí v jamkách.

### 5.3.2. POSTUP PRO DETEKCI PROTEINU GLIADINU (OBILNINY)

Pro detekci gliadinu byla použita testovací sada od firmy Veratox®. Pro extrakci netepelně zpracovaných vzorků se používá orbitální shaker či rotátor:

1. Nejprve se připraví 55% ethanolového extrakčního roztoku kombinací 55 dílů ethanolu a 45 dílů destilované vody pro přípravu zředěného roztoku z extraktu vzorku.
2. Do 1,5 ml plastové zkumavky (ependorf) se přidá asi 0,5 mg nejmenno rozmělněného vzorku a 375µl PBS (Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr<sup>5</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O a destilovaná H<sub>2</sub>O).
3. Podle výrobce by se měla přidat jedna lžička extrakčního aditiva do plastové zkumavky, ale toto aditivum se příliš neosvědčilo a je lepší ho vynechat úplně.

<sup>5</sup> Pufr je konjugovaný pár kyseliny anebo zásady, který je schopen udržovat v jistém rozmezí stabilní pH po přidání kyseliny či zásady do systému.

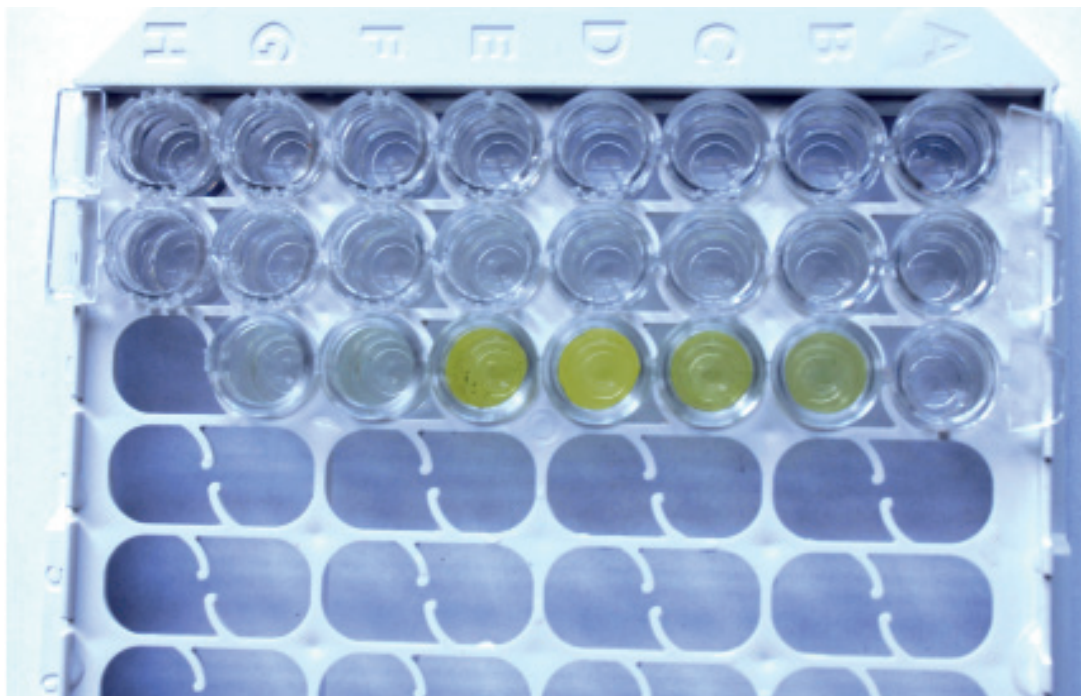
4. Přidá se 1125 $\mu$ l 55% ethanolu, plastová zkumavka se uzavře a poté se s ní třepe na vortexu po dobu 20 sekund, čímž se zajistí kompletní promíchání.
5. Vzorek se extrahuje pomocí třesení (150 rpm) a to tak, že se např. vzorek z nádoby v plastické zkumavce položí na podložku na třepačku vortex a připevní se pomocí gumičky či lepicí pásky. Rotuje se (třepe se) po dobu 1 hodiny, nebo přes noc 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  $\mu$ l z vrchní vrstvy extraktu a přemístěním do zkumavky obsahující 1,5 ml PBS.
8. Pro promíchání se vzorek v plastické zkumavce 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.

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

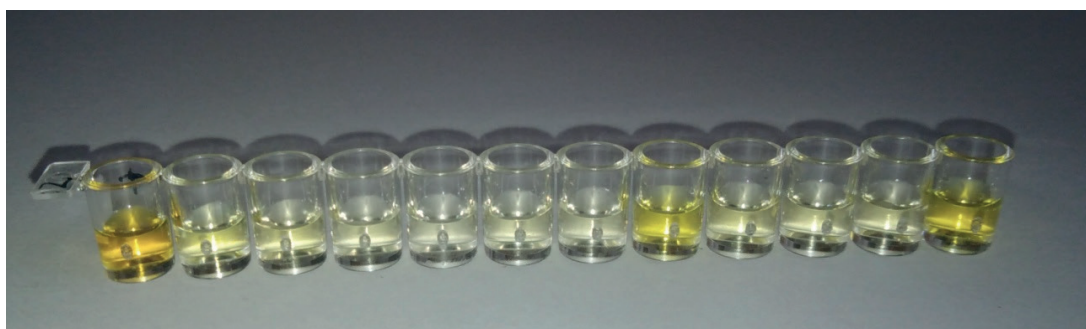
1. Pro každý vzorek se vyjme jedna červeně označená mísící jamka a dalších 5 jamek se vyjme pro kontroly, vloží se do držáku.
2. Vyjme se stejný počet jamek s protilátkami. Jamky s protilátkami, které nebudou okamžitě použity, se vrátí zpět do sterilního obalu, který se uzavře a vrátí se do chladu, a tím jsou protilátky chráněny.
3. Před použitím jsou reaktanty promíchány krouživým pohybem.
4. 150  $\mu$ l kontrol a vzorků se přenesou do červeně označených jamek. Pro každý přenos se použije vždy nová pipetovací špička.
5. Je napipetováno 100  $\mu$ l kontrol a vzorků do jamek s protilátkami. Vzorky se promíchají po dobu 20 sekund posouváním držáku jamek dopředu a dozadu po plochem 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 plastické zkumavce se nalije do čisté reagenční nádoby.
9. 12ti kanálovou pipetou s novými špičkami se přenesou 100  $\mu$ l konjugátu do všech jamek a dojde k promíchání vzorků posouváním držáku jamek dopředu a dozadu na plochem 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 plastické zkumavky je nalit do čisté reagenční nádoby.
13. 12ti kanálovou pipetou s novými špičkami se přenesou 100  $\mu$ 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 reagenční nádoby.

16. 12ti kanalovou pipetou se stejnými špičkami je přeneseno 100  $\mu$ l stop solution do každé jamky a dojde k promíchání po dobu 20 sekund. Stop solution z kitu se neosvědčil kvůli měření na spektrofotometru, proto je lepší použít roztok kyseliny fosforečné.
17. Spodní část jamek se očistí, poté se jamky vloží do spektrofotometru s vhodným filtrem (450 nm). Následně se naměřené data vyhodnotí.

Pozitivní reakce jsou detekovány žlutou barvou podobnou současně generované pozitivní kontrole, která se liší od bezbarvé negativní kontroly (**obr. 6**).



*Obr. 5. Mikrotitrační destička před měřením absorbance.*



*Obr. 6. Pozitivní a negativní reakce v mikrotitračních jamkách.*

Protože postup není primárně určen na kvantitativní rozlišení (jen kvalitativní), bylo pouze stanoveno, zda reakce byla silná, slabá nebo negativní. Způsob hodnocení vychází ze systému hodnocení u výrobce (Neogen corporation), zde je +++++ označeno jako silně pozitivní, + jako slabé pozitivní, – jako negativní a NT jako netestováno. Tento systém byl mírně zjednodušen, protože u archeologických proteinů není tak vysoká škála reakcí podle intenzity. Pro následnou spektrofotometrickou detekci výsledků byl použit spektrofotometr ELISA reader VERSAmax™ (Molecular Devices) a měření bylo prováděno při 450 nm (**obr. 7**). Výsledná číselná data jsou v jednotkách ppm a v tabulce převedená na hodnoty výsledků reakce (**tab. 1**).



*Obr. 7. Přístroj na měření absorbance výsledných reakcí na mikrotitračních destičkách ELISA reader VERSAmax™ (Molecular Devices).*

## 5.4. VERIFIKACE

Z důvodu ověření metodiky využívající ELISA kity byly provedeny dva typy ověřovacích experimentů za účelem ověření spolehlivosti imunologické soupravy vybrané pro naši studii. Vzhledem k problematickým výsledkům použití protilátek na historické proteiny v nedávné minulosti (srov. např. *Barnard – Eerkens 2017, 634*, s další literaturou) byla provedena u některých vzorků nezávislá verifikace pomocí **GC/MS (MetPrep) (plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie)** a **MALDI (matricí asistovaná LASERová desorpce)**<sup>6</sup>, která umožňuje analýzu proteinů spojenými peptidovými vazbami. Sekvence peptidů umožňuje identifikaci aminokyselin, základních stavebních složek proteinů. Tuto verifikaci provedl RNDr. Lukáš Kučera, Ph.D. z Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Přestože je zřejmé, že použití protilátek vytvořených proti současným nativním proteinům na denaturované historické proteiny, jak bylo někdy dříve zkoušeno, není nejšťastnějším řešením, je současná verifikace nutná. Druhým důvodem je všeobecná akceptovatelnost metodiky hmotnostní spektrometrie, takže potvrzení imunologických dat tímto způsobem výrazně zvyšuje i důvěryhodnost navrhované metodiky.

### 5.4.1. NANOLC-ESI-Q-TOF HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE PROTEINŮ

Vzorky keramiky a půdy byly analyzovány stejnou metodou. Přibližně 100 mg každého (nevařeného) vzorku bylo umístěno do 150-200 ul roztoku trypsinu (Promega) v koncentraci 10 ug / ml v 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a inkubováno při pokojové teplotě po dobu dvou hodin. Roztok obsahující

<sup>6</sup> k metodě MALDI např. *Barnard et al. 2017, 221*.



uvolněné peptidy byl odsolený použitím ZipTips naplněného reverzní fází (C18) a odpařen do sucha. Následně byly vzorky rozpuštěny ve směsi voda: acetonitril: kyselina mravenčí (97: 3: 0,1%), a poté byly nanášeny na kolonu Acclaim PepMap<sup>7</sup> 100 C18, (100  $\mu\text{m}$  x 2 cm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$ , Dionex, Germany) mobilní fáze průtoku A (0,1% kyselina mravenčí ve vodě) 5  $\mu\text{l}$  / min po dobu 5 min. Peptidy byly eluovány z trapové kolony na analytickou kolonu<sup>8</sup> Acclaim PepMap RSLC C18 (75  $\mu\text{m}$  x 250 mm, velikost částic 2  $\mu\text{m}$ ) mobilní fází B (0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu) za použití následujícího gradientu: 0 min 3% B, 5 min 3% B, 85 min 50% B, 86 min 90% B, 95 min 90% B, 96 min 3% B, 110 min 3% B. Průtok při separaci gradientu byl nastaven na 0,3  $\mu\text{l}$  / min. Peptidy byly eluovány<sup>9</sup> přímo do zdroje ESI - Captive sprej<sup>10</sup> (Bruker Daltonics, Germany). Měření byla prováděna v režimu pozitivních iontů s výběrem prekurzorových iontů v rozmezí 400-2200 Da; bylo vybráno až deset prekurzorových iontů pro fragmentaci z každého MS spektra. Měření byla prováděna za použití UHPLC<sup>11</sup> Dionex Ultimate3000 RSLC nano (Dionex, Germany) spojeného s hmotnostním spektrometrem ESI-Q-TOF Maxis Impact (Bruker, Germany). Hmotnostní spektra byly získány z původních dat pomocí Data Analysis (Bruker Daltonics, Germany). Proteiny byly identifikovány pomocí softwaru Mascot verze 2.2.04 (Matrix Science, UK) vyhledáním proteinové databáze Uniprot<sup>12</sup> verze 20110-12. Parametry pro vyhledávání<sup>13</sup> v databázi byly stanoveny takto: oxidace methioninu a hydroxylace prolinu jako variabilní modifikace, tolerance 50 ppm v režimu MS a 0,05 Da v režimu MS / MS (**obr. 15-21**).

#### 5.4.2. KONTROLNÍ VZORKY Z PŮDY A EXPERIMENTÁLNÍ OVĚŘENÍ

Jako kontrolní vzorky je velmi vhodné použít zeminu z okolí nálezů. Kde se může, či naopak nemusí prokázat přítomnost trusu zvířat, či zemědělských hnojiv, ze kterých mohou pocházet proteiny kontaminující nalezenou keramiku. Z toho důvodu byl již dříve v případě několika vzorků raně středověké keramiky z Katovic testován i kontrolní vzorek z výběhu, kde několik let po sobě žily volně prasata.

<sup>7</sup> Kolony PepMap RSLC jsou speciálně navrženy pro analýzy s vysokým rozlišením tryptických, přírodních a syntetických peptidů. Tyto kolony jsou vhodné pro plynovou chromatografii spojenou s hmotnostní spektrometrií, nebo samotnou hmotnostní spektrometrií, která se využívá pro identifikaci proteinů, určování biomarkerů a podobně.

<sup>8</sup> Trapové kolony jsou krátké kolony instalované do systému, aby chránily nechtěné analyty před preferencí se vzorky – aby kontaminace nepřekrývaly výsledné píky během gradientové iontové chromatografie. Analytické kolony jsou určeny pro kvalitativní analýzy. Chromatogramy získané z použití analytických kolon poskytují kvalitativní profil nebo přesnou charakteristiku „otisk prstů“ vzorku. Před provedením „preparativní chromatografie“ je dobré získat profil vzorku analytickou chromatografií.

<sup>9</sup> Eluace je proces „vymývání a odkapávání“ jednotlivých složek z kolony.

<sup>10</sup> CaptiveSpray je iontový zdroj s konstrukcí, která dnes umožňuje snadnější měření než se standardním elektrosprejem.

<sup>11</sup> UHPLC (*Ultra-High Pressure Liquid Chromatography*) je analytická metoda, která se často používá v analytické chemii a ve farmaceutickém průmyslu. Účinek je založen na sloupcové chromatografii, která se často používá ke zkoumání směsí. Různé analyty (látky, které mají být zkoumány) jsou separovány a identifikovány na základě jejich polarita a interakce mezi analyty samotnými, stacionární fází a mobilní fází.

<sup>12</sup> Uniprot <https://www.uniprot.org/> je komplexní databáze proteinových sekvencí. Tato volně přístupná databáze obsahuje informace o funkci proteinu. Informace v UniProt sdružují výsledky projektů sekvenujících genomy a informace o biologických funkcích bílkovin.

<sup>13</sup> Internetové stránky UniProt jsou základním přístupem k datům a dokumentaci. Tyto stránky nabízí různé nástroje jako např.: fulltextové vyhledávání, fulltextové vyhledávání pro jednotlivé pole, vyhledávání podobné sekvence, sériové vyhledávání pro více sekvencí současně, mapování identifikátoru v databázi. Web také nabízí stručný úvod pro začátečníky. V levé části webu je po vyhledání možné výsledky filtrovat dle různých parametrů. Výsledky vyhledávání sekvenční podobnosti lze filtrovat podle taxonomie, pro získání rychlého přehledu o taxonomickém rozdělení výsledků. Anotace sekvencí shodných záznamů mohou být transformovány do alignmentu, aby bylo vidět, zda zůstávají zachovány důležité pozice. Web umožňuje si vyhledané struktury dávat do záložek (funkce Basket) a sady výsledků stahovat.

Příprava vzorků půdy proběhla stejnými kroky, které jsou popsány výše pro nově analyzované vzorky vrcholně středověké keramiky. Vzorky by měly nezávisle potvrdit přítomnost nevařeného masa na lokalitě v okolí místa odběru keramických vzorků.

Sada ELISA použitá v této studii je citlivá na detekci proteinů masa, ale také zachycuje vylučované intestinálních mukózní / epiteliální buňky, které jsou přirozenou součástí obsahu stolice (*Rose et al. 2015; Williams et al. 2015*). Pro experimentální analýzu půdy, která byla nepochybně kontaminována prasetem, jsme odebrali vzorek půdy z výběhu, který byl využíván k chovu domácích prasat. Tři prasata byla držena v tomto uzavřeném prostoru postupně, každé po dobu 14 měsíců. Náš vzorek půdy byl získán po uplynutí 5 let od porážky posledního prasete. Tento kontrolní vzorek vykazoval slabou reakci před vařením a extrémně silnou po vaření (**tab. 2**).

## 6. VÝSLEDKY METODIKY

Navrhovaná metodika představuje nový přístup k detekci a rozlišování mezi vařenými a tepelně neupravenými proteiny z archeologických vzorků. Testována byla keramika pocházející z různých středověkých kontextů a nově vybraných lokalit (Brno – středověké město, Počátky u Jihlavy – městečko, Žďár nad Sázavou – trhová ves, Rokštejn – hrad), které rozšiřují dosavadní publikované příklady lokalit z Prahy a Plzně (*Pavelka – Vařeka 2008; Pavelka – Orna 2011*). Nově testován byl také kontrolní vzorek půdy stejné stratigrafické vrstvy obsahující raně středověkou keramiku (**tab. 2; Pavelka et al. 2020**).

Použitím imunologického testu ELISA navrženého k identifikaci vařeného vepřového masa bylo zjištěno, že vařené prasečí bílkoviny byly přítomny ve většině studovaných vzorků. Vzorky vykazovaly nízké pozitivní + nebo vysoce pozitivní výsledek ++. Přítomnost prasečích bílkovin potvrdily nezávisle i výsledky hmotnostní spektrometrie (**tab. 1**). Tento fakt interpretujeme tak, že keramické nádoby (v tomto případě zejména hrnce) sloužily ve středověku k vaření masité stravy, jak dokládají zjištěné živočišné proteiny pocházející z tepelně upravovaného vepřového masa. Vepřové maso bylo v jídelničkách středověkých obyvatel měst, ale i hradů hojně zastoupené, jak dokládají výsledky archeozoologických analýz (srov. *Petříčková 1998; Petříčková 2002; Kyselý 2004*).

U některých vzorků se však přítomnost vepřového masa neprokázala a nádoby zřejmě sloužily k jiným účelům. Na některých vzorcích byla prokázána přítomnost nevařeného vepřového masa, která může dokládat možné skladování (naložení masa). Vepřové maso je obecně velmi vhodné ke konzervaci, než maso ostatních zvířat a někteří badatelé (např. *Albarella 2005, 82*) připouští, že chudší vrstvy obyvatel konzumovali maso téměř výhradně v jeho konzervované (uzené, sušené nebo nasolené podobě).

Nelze však vyloučit ani potenciální kontaminaci z okolního prostředí – půdy, ve kterém byly nálezy keramiky uloženy (některé zlomky pocházely z odpadních vrstev s vysokým rizikem kontaminace)<sup>14</sup>. Prasečí bílkoviny identifikované v půdním substrátu představují pravděpodobně kontaminaci z hnoje, nebo prasečího trusu v okolí nálezů, nelze vyloučit ani kontaminaci ze současných zemědělských hnojiv. V případě testovaného vzorku zeminy z raně středověkého hradiště v Katovicích, kde vycházejí tepelně denaturované proteiny, je otázka, zda jde o historické, nebo nedávné zbytky pokrmů, nebo mohla být půda kontaminována recentním vařeným masem. Tato metodika otevírá novou perspektivu řešení složitosti výzkumu archeologických biomolekul, což naznačuje, že mnohé dříve publikované studie mohou obsahovat směs starých syrových a nových bílkovin, stejně jako původní obsah historických bílkovin (a další typy biomolekul) stejného druhu. Aby nedocházelo k záměně těchto odlišných kategorií v archeologickém výkladu, je třeba věnovat velkou pozornost novým metodám, které mohou pomoci při jejich samostatné identifikaci.

<sup>14</sup> Anaerobní prostředí v odpadních vrstvách může inhibovat mikrobiologické útoky a vést k dekarboxylaci aminokyselin (*Barnard et al. 2007, 218*).

Vedle testů na přítomnost vařených a nevařených proteinů byly využity ELISA testy na detekci gliadinu. Gliadin je hlavní protein v potravinách obsahujících lepek jako je ječmen, žito, pšenice a dalších obilovin, použitý test ale nereaguje na oves. Detekce gliadinu je bezproblémová, neboť se jedná o protein nerozpustný ve vodě, ale v alkoholu. Z toho důvodu je určení poměrně spolehlivé a lze předpokládat, že je středověkého původu. Ve dvou případech se potvrdila přítomnost obilí v zásobnici, které jsou považovány za skladovací nádoby na sypké produkty, například obilí (**tab. 1**). V zásobnicích se obilí pravděpodobně pouze skladovalo, neboť bez vaření je malá pravděpodobnost, aby gliadin pronikl do keramické matrix. V ostatních případech přítomnost gliadinu na keramice (zejména u hrncovitých nádob) může svědčit například o způsobu přípravy pokrmů z obilných kaší.

Pomocí hmotnostní spektrometrie byla již mimo tuto metodiku detekována u některých vzorků přítomnost hlavního mléčného proteinu – kaseinu. Kasein v keramice může znamenat přítomnost vařeného mléka. V několika případech vzorků byla prokázána jak přítomnost vařeného vepřového masa, tak mléčných produktů. Lze tak připustit, že některé keramické nádoby mohly sloužit k vaření různých druhů pokrmů. Jsou dobře odzkoušené i protilátky na historický kasein, ale v tomto projektu nebyly použity (srov. např. *Pavelka – Orna 2011*).

Výsledky metodiky byly nezávisle ověřeny pomocí hmotnostní spektrometrie-plynové chromatografie. Na několika vzorcích z Brna hmotnostní spektrometrie odhalila stopy po mastných kyselinách stearové a palmitové, které se běžně vyskytují v živočišných tucích, což koresponduje s výsledky testu antigen-protilátka na živočišné proteiny pomocí ELISA testů.

## **7. SROVNÁNÍ METODIK VYUŽÍVAJÍCÍ TESTY NA PROTILÁTKY A HMOTNOSTÍ SPEKTROMETRII**

Současné detekce historických proteinů jsou založené na hmotnostní spektrometrii, která je principiálně zcela odlišná. Metoda hmotnostní spektrometrie je nutná jako verifikační a nezbytná součást navrhované metodiky, avšak v současné době zatím mnohdy nedokáže rozlišit, ke kterému druhu zvířat nalezené proteiny patří. Například často nacházené kolageny standardně vychází jako hovězí a ve skutečnosti se jedná o jiného savce. Navrhovaná metoda je v tomto přesnější. Metody ELISA používané v nedávné minulosti na historické proteiny se příliš neosvědčily, protože vytvořené protilátky byly připraveny proti nativním proteinům, nikoliv proti denaturovaným. Historické proteiny jsou hodně změněné v průběhu času, při kterém dochází k řadě chemických změn. Avšak tepelná denaturace u některých vybraných proteinů dává odpovídající strukturu u historických i současných proteinů. Avšak všechny komerční testy nejsou pro historické proteiny vhodné. Pro uváděnou metodiku se osvědčily pouze certifikované soupravy Neogen (dříve Tepnel BioSystems).

Metodika nepředstavuje náhradu, ani konkurenci pro použití hmotností spektrometrie v archeologii. Jde o principiálně zcela odlišné postupy, které se však snaží o určení téhož. Kromě vzájemné verifikace se obě metody mohou doplňovat. Na trhu nejsou vhodné protilátky pro archeologii pro řadu potravin, které lze pomocí hmotnostní spektrometrie zachytit, na druhé straně hmotnostní spektrometrie vždy druhově nerozliší jednotlivé proteiny pocházející nejčastěji z vepřového nebo hovězího masa, nebo z kravského či kozího mléka. Někdy může být i určení pomocí protilátek o něco citlivější, což v případě nepatrných zbytků není zanedbatelná vlastnost, která rozhoduje, zda bude původní protein vůbec detekován.

## **8. POUŽITÍ METODIKY V PRAXI A NÁVRH UŽIVATELŮ**

Metodika je určena pro všechny, kteří se pokouší detekovat staré vařené zbytky potravin z historické keramiky, tedy zejména archeology, bioarcheology a imunology. Detekcí makrozbytků potravin lze lépe pochopit různé funkce keramiky, zároveň je možné poznat způsob přípravy pokrmů, úroveň

stravy, diety a subsistenční strategie tehdejších společností v čase a prostoru. Postup je navržen tak, že jej dokáže zvládnout a aplikovat vědecký pracovník, laboratorní personál nebo student se základním školením. K metodice není potřeba žádné speciální vybavení, než které má většinou ve výbavě standardní laboratorní pracoviště. Výhoda metodiky spočívá mimo jiné v tom, že je možné ji provádět i v polních podmínkách a improvizovaných laboratořích. Na rozdíl od testů pracujících s archaickou DNA existuje jen zanedbatelné riziko kontaminace, neboť cílové proteiny se v lidském organismu nenacházejí. Riziko kontaminace lze prakticky odstranit základní prevencí a odebráním vzorků z vnitřní keramické hmoty a nikoliv jen z povrchu nádob či jejich zlomků. Metodika je navíc zcela nedestruktivní a opakovatelná.

Metodiku lze úspěšně využít i na jiném než archeologickém materiálu, v úvahu přichází použití na recentních biologických vzorcích v rámci forenzních věd.

## POUŽITÁ LITERATURA

- Albarella, U. 2005: Meat Production and Consumption in Town and Country. In: Giles, K. – Dyer, Ch. (Eds.), *Town and Country in the Middle Ages. Contrast, Contact and Interconnections*, 1100–1500. Leeds, 131–149.
- Barker, A. 2010: Archaeological proteomics: method development and analysis of protein-ceramic binding. MS Thesis, University of North Texas, Department of Geography.
- Barnard, H. – Shoemaker L. – Rider, M. – Craig O. E. – Parr, R. E. – Sutton, M. Q. – Yohe, R. M. 2007: Introduction to the Analysis of Protein Residues in Archaeological Ceramics. In: Barnard, H. – Eerkens, J. W. (eds.), *Theory and Practise of Archaeological Residue Analysis*. BAR Series 1650. Oxford, 226–231.
- Barnard, H. – Eerkens, W. J. 2017: Assessing vessel function by organic residue analysis. In: Hunt, W. M. A. (Ed.), *The Oxford Handbook of Archaeological Ceramic Analysis*. Oxford, 625–647.
- Brandt, E. – Wiechmann, I. – Grupe, G. 2002: How reliable are immunological tools for the detection of ancient proteins in fossil bones? *International Journal of Osteoarchaeology* 12, 307–316.
- Child, A. M. – Pollard, A. M. 1992: A review of the applications of immunochemistry to archaeological bone. *Journal of Archaeological Science* 19, 39–47.
- Copley, M. S. – Berstan, R. – Dudd, S. N. – Docherty, G. – Mukherjee, A. J. – Straker, V. – Payne, S. – Evershed, R. P. 2003: Direct chemical evidence for widespread dairying in prehistoric Britain. *PNAS* 100, 1524–1529, doi: 10.1073/pnas.0335955100.
- Copley, S. M. – Berstan, R. – Mukherjee, J. A. et al. 2005: Dairying in antiquity. III. Evidence from absorbed lipid residues dating to the British Neolithic, *Journal of Archaeological Science* 32, 523–546.
- Craig, O. E. – Collins, M. J. 2002: The removal of protein residues from mineral surfaces: Implications for residue analysis of archaeological materials, *Journal of Archaeological Science* 29, 1077–1082.
- Craig, O. E. – Taylor, G. – Mulville, J. – Collins, M. J. – Parker Pearson, M. 2005: The identificati-



on of prehistoric dairying activities in the Western Isles of Scotland: an integrated biomolecular approach, *Journal of Archaeological Science* 32, 91–103.

- Craig, O. E. – Love, G. D. – Isaksson, S. – Taylor, G. – Snape, C. E. 2004: Stable carbon isotopic characterisation of free and bound lipid constituents of archaeological ceramic vessels released by solvent extraction, alkaline hydrolysis and catalytic hydrolysis, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 71, 613–634.
- Craig, O. E. – Steele, V. J. – Fischer, A. – Hartz, S. – Andersen, S. H. – Donohoe, P. – Glykou, A. – Saul, H. – Jones, D. M. – Koch, E. – Heron, C. P. 2011: Ancient lipids reveal continuity in culinary practices across the transition to agriculture in Northern Europe. *PNAS* 108/44, 17910–17915, doi: 10.1073/pnas.1107202108.
- Cramp, L. J. E. – Evershed, R. P. – Lavento, M. – Halinen, P. – Mannermaa, K. – Oinonen, M. – Kettunen, J. – Perola, M. – Onkamo, P. – Heyd, V. 2014a: Neolithic dairy farming at the extreme of agriculture in northern Europe, *P Roy Soc B-Biol Sci* 281, 17910–17915.
- Cramp, L. J. E. – Jones, J. – Sheridan, A. – Smyth, J. – Whelton, H. – Mulville, J. – Sharples, N. – Evershed, R. P. 2014b: Immediate replacement of fishing with dairying by the earliest farmers of the northeast Atlantic archipelagos, *P Roy Soc B-Biol Sci* 281.
- Dongoske, K. E. – Aldenderfer, M. – Doehner, K. eds. 2000: *Working Together: Native Americans and Archaeologists*. Washington, DC: Society for American Archaeology.
- Dunne, J. 2017: *Organic Residue Analysis and Archaeology Guidance for Good Practice*. Historic England.
- Eerkens, J. 2005: GC-MS analysis and fatty acid ratios of archaeological potsherds from the western Great Basin of North America, *Archaeometry* 47, 83–102.
- Evershed, R. P. 1993: Biomolecular archaeology and lipids, *World Archaeology* 25, 74–93.
- Evershed, R. P. – Tuross, N. 1996. Proteinaceous material from potsherds and associated soils, *Journal of Archaeological Science* 23, 429–436.
- Evershed, R. P. – Dudd, S. N. – Charters, S. – Mottram, H. R. – Stott, A.W. – Raven, A. van Bergen, P. F. – Bland, H. A. 1999: Lipids as carriers of anthropogenic signals from pre-history, *Philosophical Transactions of the Royal Society* 354, 19–31.
- Karasek, F. W. – Clement R. E. 1988: *Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Principles and Techniques*. Elsevier Science B.V.
- Kyselý, R. 2004: Zvířecí kosti z výzkumu na hradě Zlenice (15. století), *Castellologica bohemia* 9, 171–176.
- Lee, M. S. 2012: *Mass Spectrometry Handbook*. John Wiley & Sons, Inc.
- Mazurek, J. – Svoboda, M. – Schilling, M. 2019: GC/MS Characterization of Beeswax, Protein, Gum, Resin, and Oil in Romano-Egyptian Paintings, *Heritage* 2, 1960–1985.
- Oudemans, T. F. M. – Boon, J. J. 1991: Molecular archaeology: analysis of charred (food) remains.

from prehistoric pottery by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 20, 197–227.

Petříčková, J. 1998: Osteologické nálezy z Karlštejna, okr. Beroun, *Archeologie ve středních Čechách* 2, 415–424.

Petříčková, J. 2002: Analýza osteologického materiálu. In: Klápště J. a kol., *Archeologie středověkého domu v Mostě* (čp. 226), *Medievalia Archaeologica* 4. Praha – Most, 167–180.

Pollard, M. – Batt, C. – Stern B. – Young, S. M. M. 2007: *Analytical Chemistry in Archaeology*. Cambridge University Press, Cambridge.

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

Šálková, T. – Bezděk, A. – Březinová, H. – Farkašová, K. – Houfková, P. – Chvojka, O. – John, J. – Kmošek, J. – Koník, P. – Kovačiková, L. – Michálek, J. – Msallamová, Š. – Novák, J. – Pavelka, J. – Šuláková, H. – Bešta, T. – Myšková, E. – Weiter, L. – Zronek, P. 2015: Bioarchaeological reconstruction of the funeral rite – case study based on organic material from the Hallstatt Period tumulus at the site Zahradka (South Bohemia, Czech Republic), *Památky archeologické* 106, 95–135.

## **SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ VEDLY K METODICE**

Čiperová, M. – Pavelka, J. – 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, 193–211.

Pavelka, J. – Vařeka, P. 2008: Příspěvek k poznání stravy ve vrcholném a pozdním středověku – A contribution to the recognition of medieval subsistence in the High and Later Middle Ages. The first results of the analysis of food residues on ceramics, *Kuděj* 2008/1-2, 98–109.

Pavelka J. – Orna, J. 2011: Exkurz I: Výsledky analýzy potravinových zbytků na pozdně středověké keramice z Plzně. In: Orna, J. kol.: *Keramická produkce města Plzně v období 14. a 15. století*. Plzeň, 56–66.

Pavelka, J. – Kovačiková, L. – Šmejda, L. 2011: The determination of domesticated animal species from a Neolithic sample using the ELISA test, *Comptes Rendus Palevol* 10, 61–70.

Pavelka, J. – Šmejda, L. – Hynek, R. – Hrdlickova Kuckova, S. 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.

Pavelka, J. – Smejda, L. – Kuckova, S. – Mensik, P. 2020: Challenge to molecular archaeology—Sediments contaminated by allochthonous animal proteins, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 43, 19–20.



A006 4485/5 - vnější povrch



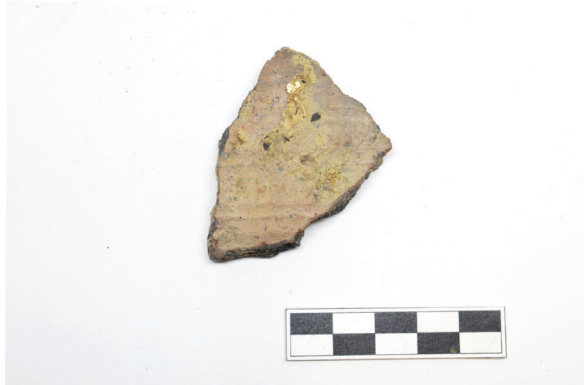
A006 4485/5 - vnitřní povrch



A006 18351/12 - vnější povrch



A006 18351/12 - vnitřní povrch



A006 20111/23 - vnější povrch



A006 20111/23 - vnitřní povrch



A006 13137/8 - vnější povrch



A006 13137/8 - vnitřní povrch

Obr. 8. Vzorky keramiky z Brna.



A006 19357/4 - vnější povrch



A006 19357/4 - vnitřní povrch



A006 10203/9 - vnější povrch



A006 10203/9 - vnitřní povrch



A113 338/8 - vnější povrch



A113 338/8 - vnitřní povrch



A17 1344/83 - vnější povrch



A17 1344/83 - vnitřní povrch

*Obr. 9. Vzorčky keramiky z Brna.*





A006 19357/4 - dno



A006 12300/7



A006 19623/6 - vnější povrch



A006 19623/6 - vnitřní povrch

Obr. 10. Vzorky keramiky z Brna.



70/4 124/26 - vnější povrch



70/4 124/26 - vnitřní povrch



70/4 252/10 - vnější povrch



70/4 252/10 - vnitřní povrch



70/04 215/3 - vnější povrch



70/04 215/3 - vnitřní povrch



70/4 252/236 - vnější povrch



70/4 252/236 - vnitřní povrch

Obr. 11. Vzorky keramiky ze Žďáru nad Sázavou – Staré Město.





70/4 239/7 - vnější povrch



70/4 239/7 - vnitřní povrch



70/4 252/5 - vnější povrch



70/4 252/5 - vnitřní povrch



70/04 195/4 - vnější povrch



70/04 195/4 - vnitřní povrch



70/4 206/254 - vnější povrch



70/4 206/254 - vnitřní povrch

Obr. 12. Vzorčky keramiky ze Žďáru nad Sázavou – Staré Město.



D5280/27 - vnější povrch



D5280/27 - vnitřní povrch



D3019/13 - vnější povrch



D3019/13 - vnitřní povrch



D5017/3 - vnější povrch



D5017/3 - vnitřní povrch



D5016/20 - vnější povrch



D5016/20 - vnitřní povrch

Obr. 13. Vzorky keramiky z hradu Rokštejn.





D3113/1 - vnější povrch



D3113/1 - vnitřní povrch



JiA 112/215-0337 - vnější povrch



JiA 112/215-0337 - vnitřní povrch

*Obr. 14. Vzorčky keramiky z hradu Rokštejn a Počátek u Jihlavy.*

**Tab. 1. Výsledky imunologické analýzy a hmotnostní spektrometrie vzorků keramiky z Brna, Žďáru nad Sázavou, Rokštejna a Počátek u Jihlavy.**

Vzorky keramiky							Testy Pavelka					Verifikace Kučera		Verifikace Kučera
lokalita	kontext	interpretace kontextu	číslo vzorku	typ nádoby	část nádoby	datace	ELISA testy na protilátky					GC/MS (Met-Prep) analýza tuky, vosky, pryskyřice	MALDI	
							gliadin - obiloviny	kasein	"pork" - nevařené maso	"pork" - vařené maso	Interpretace masa			maso
Brno - Janáčkovo kulturní centrum	s. j. 4485/5	planýrka	A006 4485/5	hrnec	P	1. pol. 13. stol.	"0"	"0"	"0"	„0“	negativní	„+“	vysoká variabilita mastných kyselin	triacyl-glyceroly poukazující na rostlinný olej (možná lněný)
Brno - Janáčkovo kulturní centrum	s. j. 18351	odpadní vrstva	A006 18351/12 opadané	hrnec?	S	2. třetina 13. stol.	"0"	"0"	"0+"	"0+"	vařené původní maso - slabý signál	"0"		„0“
Brno - Janáčkovo kulturní centrum	s. j. 18351	odpadní vrstva	A006 18351 seškrabané	hrnec?	S	2. třetina 13. stol.	„+++“	"0"	"0+"	"0+"	vařené původní maso - slabý signál	„0“		silně oxidovaný rostlinný olej (signály TAG)
Brno - Janáčkovo kulturní centrum	s. j. 19323/6	výplň odpadní jímky	A006 19623/6	zásobnice	T	kolem pol. 13. stol.	"+"	"0"	"0"	"0+"	možná slabá kontaminace			„0“
Brno - Janáčkovo kulturní centrum	s. j. 13137/8	vrstva (odpadní?)	A006 13137/8 seškrabané	zásobnice	T	2. pol. 13. stol.	"0"	"0"	"0+"	"0+"	vařené původní maso - slabý signál	„0“		„0“
Brno - Janáčkovo kulturní centrum	s. j. 13137/8	vrstva (odpadní?)	A006 13137/8 opadané	zásobnice	T	2. pol. 13. stol.	"0"	"0"	"0+"	"0+"	vařené původní maso - slabý signál	„0“		„0“
Brno - Janáčkovo kulturní centrum	s. j. 19357/4	výplň výkopu sklípku (?)	A006 19357/4 okraj	hrnec	OHP-SD	1. pol. 14. stol.	"0"	"0"	"0+"	„0+“	vařené původní maso - slabý signál	"+"	deriváty kys. abietové a mastné kyseliny	slabé signály kys. stearové a palmitové
Brno - Janáčkovo kulturní centrum	s. j. 10203/9	výplň výkopu neznámé funkce	A006 10203/9 seškrab	zásobnice	T	2. pol. 13. stol.	"0"	"+"	"0+"	"0+"	vařené původní maso - slabý signál	„0“		„0“
Brno - Janáčkovo kulturní centrum	s. j. 19299 - vzorek ze dna loubku	výplň odpadní jímky	A006 19299	hrnec?	T	2. pol. 13. stol.	„+++“	"0"	„+++“	„+++“	vařené původní maso	"+"	deriváty cholesterolu => živočišný tuk	„0“

Vzorky keramiky							Testy Pavelka ELISA testy na protilátky					Verifikace Kučera GC/MS (Met- Prep) analýza tuky, vosky, pryskyřice		Verifi- kace Kučera MALDI
lokality	kontext	interpretace kontextu	číslo vzorku	typ nádoby	část nádoby	datace	gliadin - obiloviny	kasein	"pork" - nevařené maso	"pork" - vařené maso	Interpretace masa			maso
Brno - Janáčkovo kulturní centrum	s. j. 19357/4	výplň výkopu sklípku (?)	Hlína A006 19357/4	hrnec	OHP-SD	1. pol. 14. stol.	"0"	"0"	"++"	"++"	vařené původní maso	"+"	terpeny, deriváty kys. abietové => dřevo jehličnanů, pryskyřice	silné signály kys. stearové a palmitové
Brno - Janáčkovo kulturní centrum	s. j. 10203/9	výplň výkopu neznámé funkce	A006 10203/9	zásobnice	T	2. pol. 13. stol.	"0"	"0"	"0+"	"++"	kontaminace hnojem, není jasné zda současným či historickým	„0“		„0“
Brno - Janáčkovo kulturní centrum	s. j. 19357/4	výplň výkopu sklípku (?)	A006 19357/4 seškrab	hrnec	OHP-SD	1. pol. 14. století	"0"	"0"	"++"	"++"	vařené původní maso	"+"	terpeny, deriváty kys. abietové => dřevo jehličnanů, pryskyřice	silné signály kys. stearové a palmitové
Brno - Janáčkovo kulturní centrum	s. j. 12300/7	výplň cihelné kanalizační štol	A006 12300/7 porcelán	miska	OTD	2. pol. 19. stol.	"++"	"+"	"++"	"++"	vařené původní maso	"+"	mastné kyseliny, vysoká konc. kys. olejové => látka bohatá na tuky	barnaté ionty mastných kyselin (bárium musí pocházet z hlíny nebo keramiky). Není to moc obvyklé.
Brno - Vídeňská, Medica	s. j. 338/8	výplň destrukce raženého sklípku-destrukce raženého sklípku	A113 338/8	hrnec	OHP	2. pol. 15.-1. pol. 16. stol.	"0"	"+"	"0"	"0+"	možná slabá kontaminace	"+"	mastné kyseliny => slabé signály	triacylglyceroly poukazující na živočišný tuk
Brno - Vojtova	s. j. 1344/83	výplň suterénu	A17 1344/83 odsypané	zásobnice	T	2. pol. 11.-1. pol. 12. stol.	"0"	"0"	"0"	"0+"	možná kontaminace	"0"		„0“

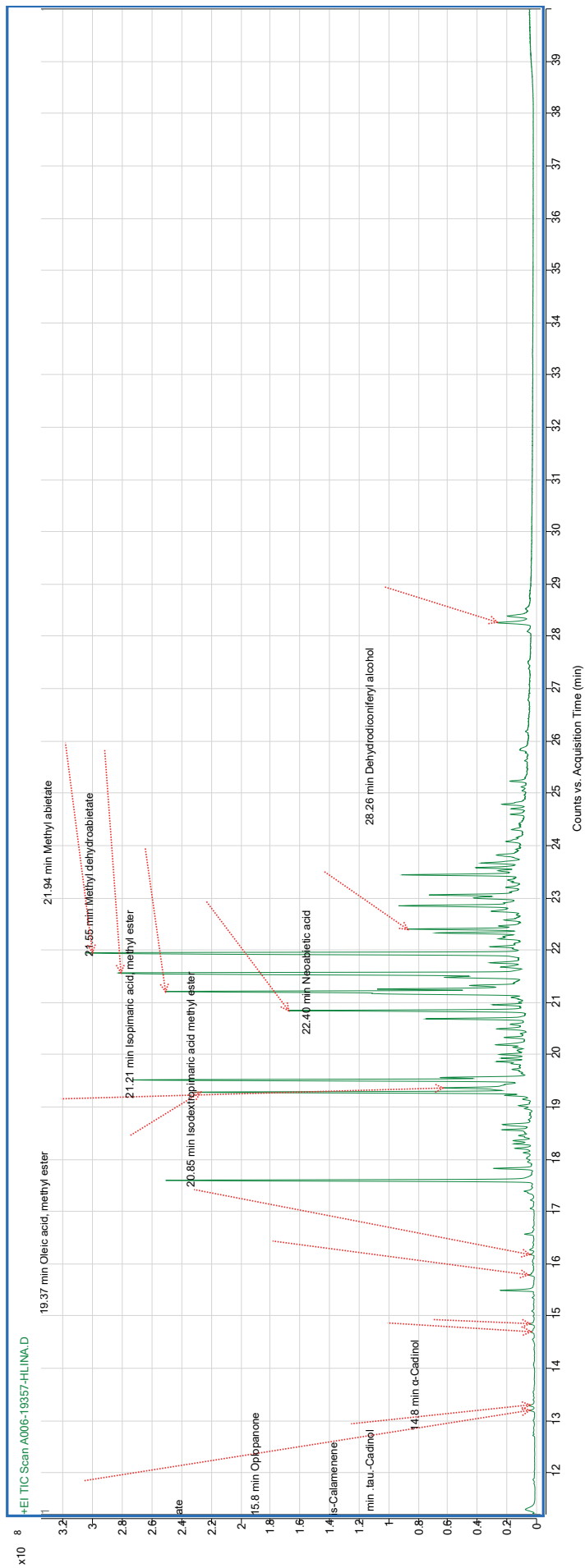
Vzorky keramiky							Ttesty Pavelka ELISA testy na protilátky					Verifikace Kučera GC/MS (Met-Prep) analýza tuky, vosky, pryskyřice		Verifikace Kučera MALDI
lokality	kontext	interpretace kontextu	číslo vzorku	typ nádoby	část nádoby	datace	gladin - obiloviny	kasein	"pork" - nevařené maso	"pork" - vařené maso	Interpretace masa			maso
Brno - Vojtova	s. j. 1344/83	výplň suterénu	A17 1344/83 seškrabané	zásobnice	T	2. pol. 11.-1. pol. 12. stol.	"0"	"0"	"0"	"0+"	možná slabá kontaminace	„0“		„0“
Počátky u Jihlavy, Školní ul.	obj. 0504, vrstva 0120	suterén	JiA 112/215-0337	zásobnice	T	2. pol. 13. stol.	"++"		"0+"	"+"	kontaminace hnojem, není jasné zda současným či historickým			„0“
Rokštejn	6/7	šedá vrstva	D5280/27	hrnec?	P	13./14. stol.	"0"		"0+"	"+"	kontaminace hnojem			„0“
Rokštejn	C2	černá požárová vrstva	D3019/13	hrnec	P	13./14. stol.	"0+"		"0+"	"+"	kontaminace hnojem			"0"
Rokštejn	čtverec 6/6		D5017/3	hrnec	O	13./14. stol.	"0+"		"0+"	"0+"	snad původní maso			"0"
Rokštejn	čtverec 6/6		D5016/20	zásobnice	P	13./14. stol.	"0"		"0+"	"0+"	snad původní maso			"0"
Rokštejn	C2	černá požárová vrstva	D3113/1	hrnec	O	13./14. stol.	"0"		"0+"	"+"	kontaminace hnojem			"0"
Žďár nad Sázavou	124	suterén	70/4 124/26	hrnec	OH	2. pol. 13. stol.	"0"	"0"	"0"	"0"	negativní	"+"	mastné kyseliny => slabé signály	"0"
Žďár nad Sázavou	239	pec s předpecní jamou	70/4 239/7	hrnec	OHP	2. pol. 13. stol.	"0"		"0+"	"0+"	vařené původní maso - slabý signál			"0"

Vzorky keramiky							Testy Pavelka ELISA testy na protilátky					Verifikace Kučera GC/MS (Met-Prep) analýza tuky, vosky, pryskyřice		Verifikace Kučera MALDI
lokality	kontext	interpretace kontextu	číslo vzorku	typ nádoby	část nádoby	datace	gladin - obiloviny	kasein	"pork" - nevařené maso	"pork" - vařené maso	Interpretace masa			maso
Žďár nad Sázavou	252	suterén	2R 70/4 252/5	hrnec	O	2. pol. 13. stol.	"0"		"+"	"+"	vařené původní maso - slabý signál			"0"
Žďár nad Sázavou	obj. 594, kontext 195	sídlištní jáma	70/04 -195/4	zásobnice	SD	2. pol. 13. stol.	"0"		"0+"	"+"	kontaminace hnojem	"0"		"0"
Žďár nad Sázavou	206	výrobní a hospodářský objekt	70/4 206/254	zásobnice	SD	2. pol. 13. stol.	"0"	"0"	"0"	"0"	negativní	"0"		"0"

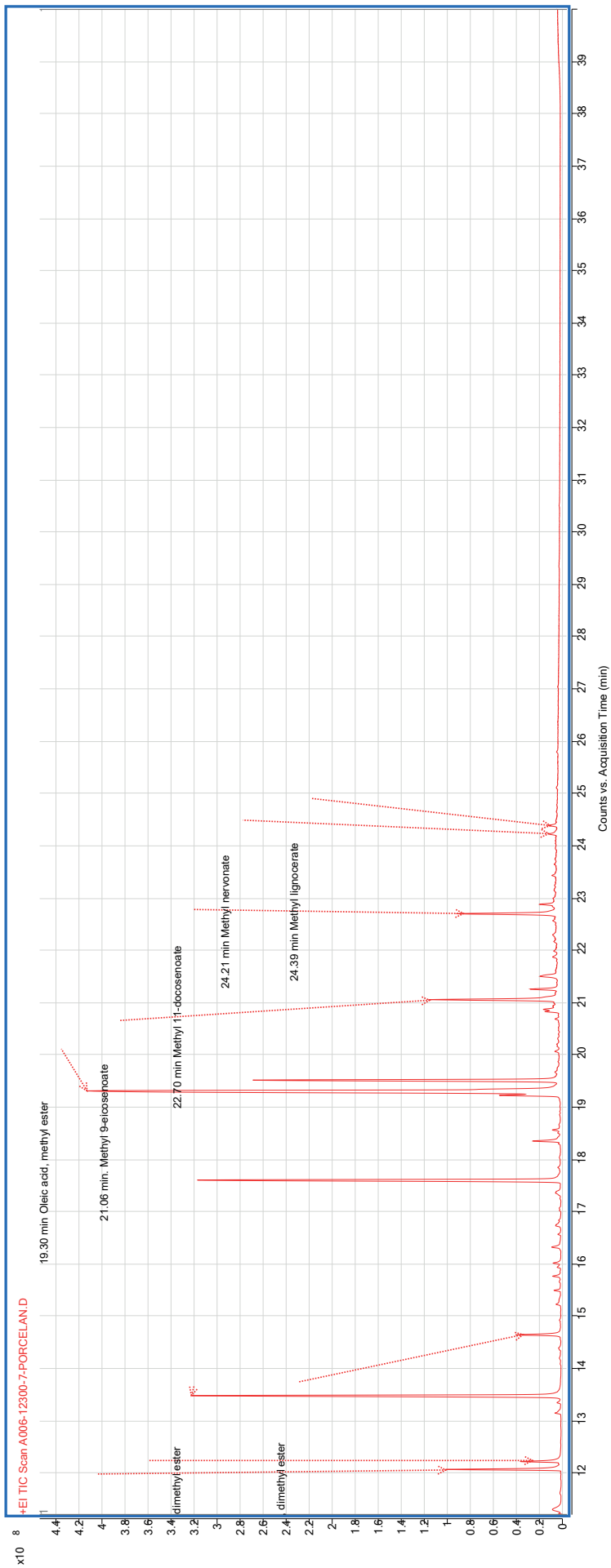
Vysvětlivky:	
"0"	negativní výsledek
"++"	pozitivní výsledek
"+"	nízce pozitivní výsledek
"0+"	výsledek na hranici detekovatelnosti (není vyloučena pouze nespecifická reakce)

**Tab. 2. Výsledky imunologické a hmotnostně spektroskopické analýzy vzorků keramiky z Katovic (Pavelka et al. 2020).**

Sample type (C=ceramics, S=soil)	Uncooked sample tested for pork	Cooked sample tested for pork	Lipids	Proteins MS
C1	0	++	animal	Mammal Collagen alpha 1 and 2
S1	0+	+		Mammal Collagen alpha 1 and 2
C2	+	++		Mammal Collagen alpha 1 and 2
S2	0	+		Mammal Collagen alpha 1 and 2
C3	+	+	animal, plant oil	Mammal Collagen alpha 1 and 2
S3	0	+		Mammal Collagen alpha 1 and 2
C4	0	+	animal	Mammal Collagen alpha 2
S4	0	0+		Mammal Collagen alpha 1
C5	0	+	0	Mammal Collagen alpha 2
S5	0+	+		Any Collagen
C6	0	+	0	Mammal Collagen alpha 1 and 2
S6	0	+		Any Collagen
C7	0	0+		Mammal Collagen alpha 2
S7	0	0+		Mammal Collagen alpha 1 and 2
C8	+	+	0	Mammal Collagen alpha 2
S8	0+	+		Mammal Collagen alpha 1 and 2
Soil from pig enclosure (abandoned for 5 years)	0+	+++		

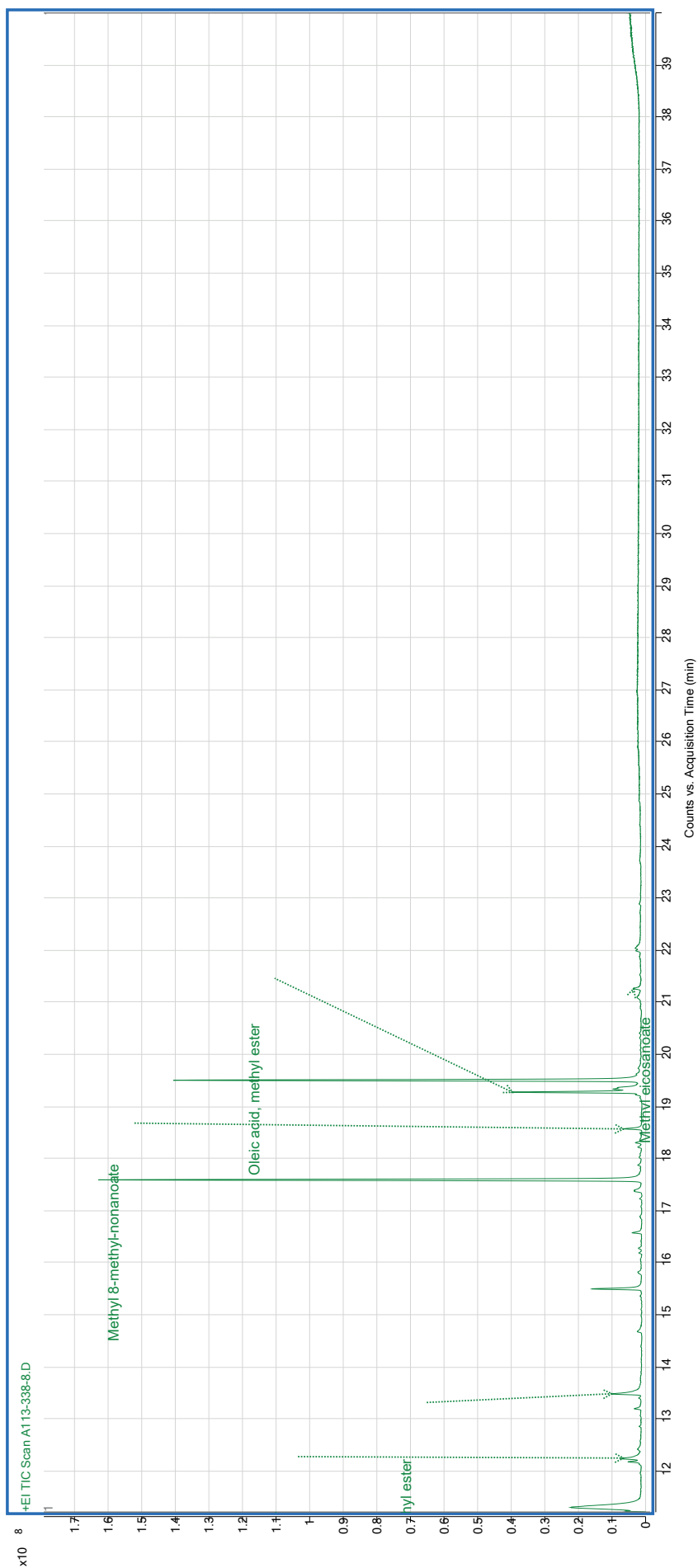


Obr. 15. Chromatogram vzorku A006 19357 - hlina.

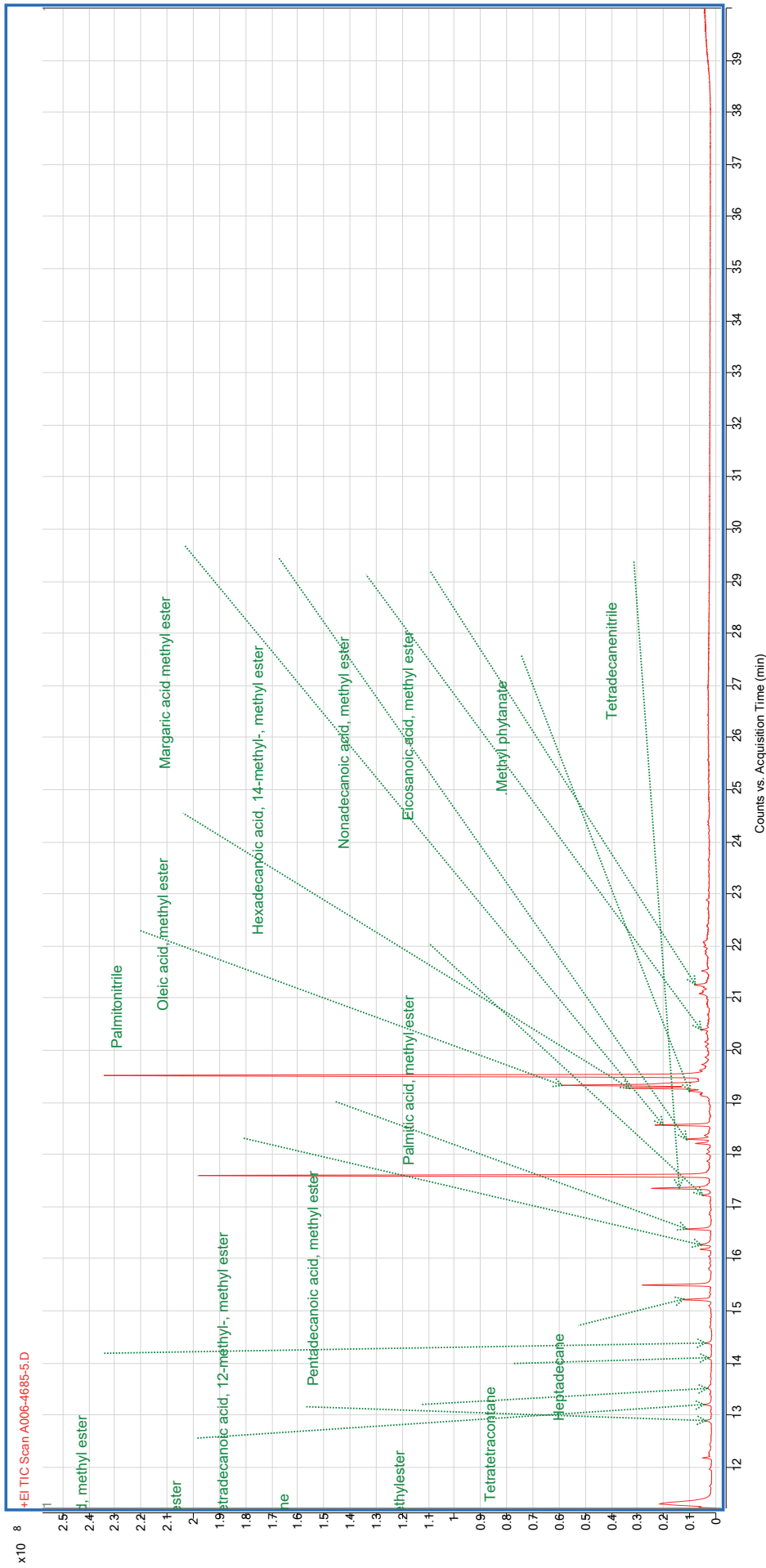


Obr. 16. Chromatogram vzorku A006 1230-7 - porcelán.

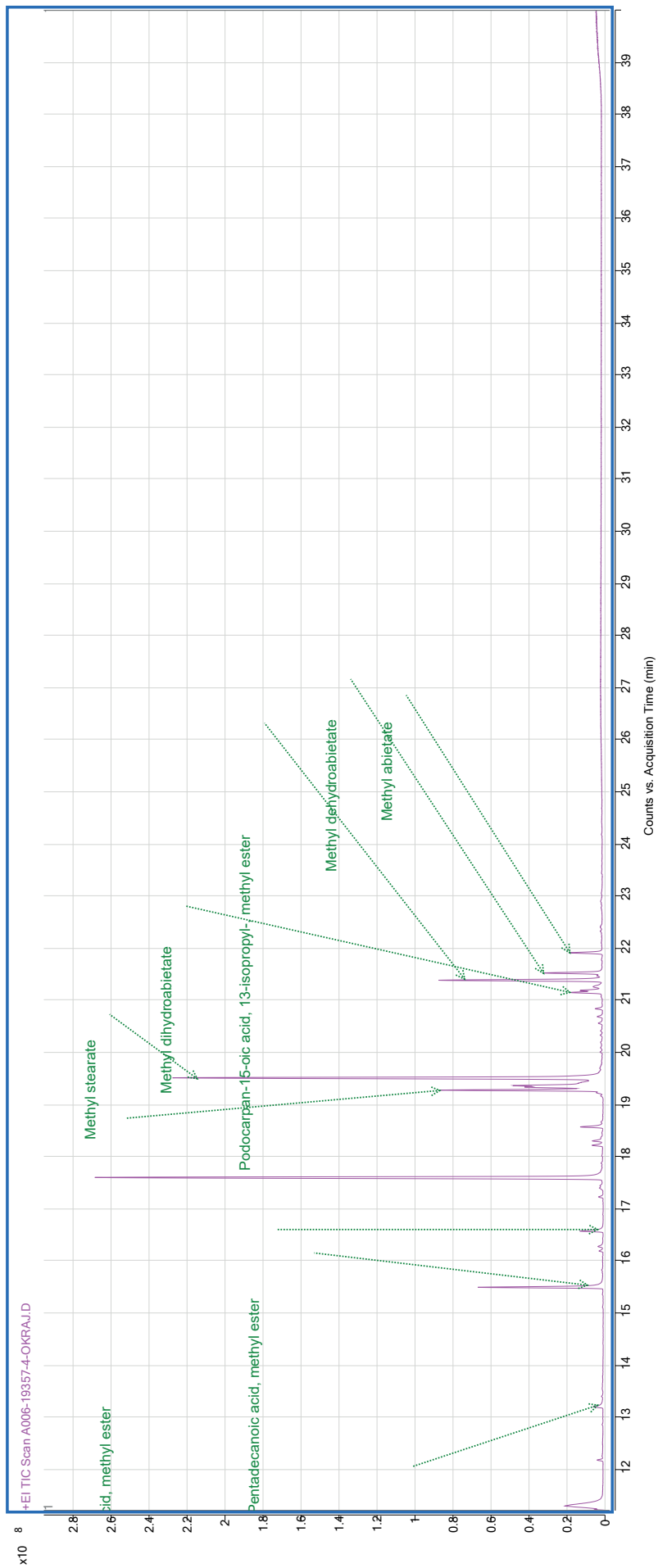




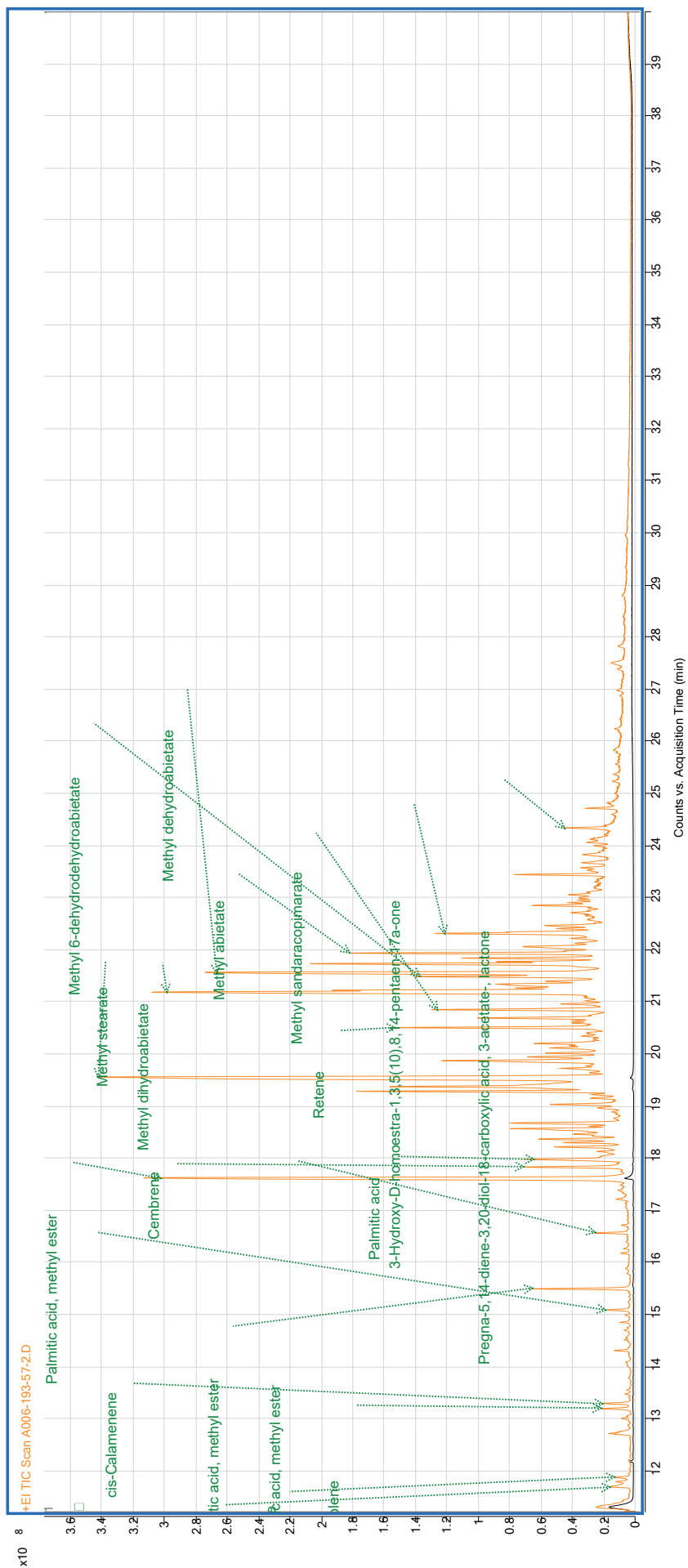
Obr. 17. Chromatogram vzorku A113 - 338.



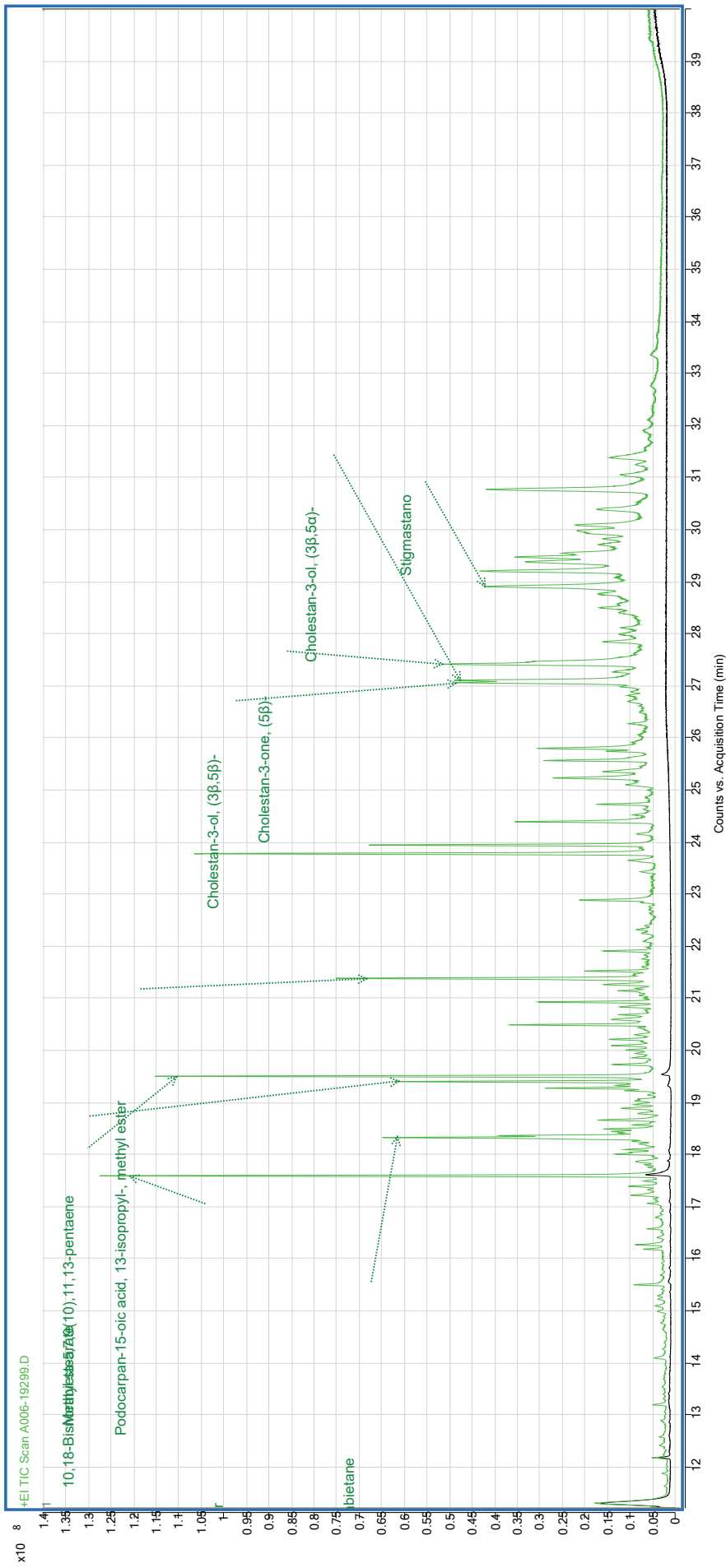
Obr. 18. Chromatogram vzorku A006 - 4685-5.



Obr. 19. Chromatogram vzorku A006 - 19357-4.

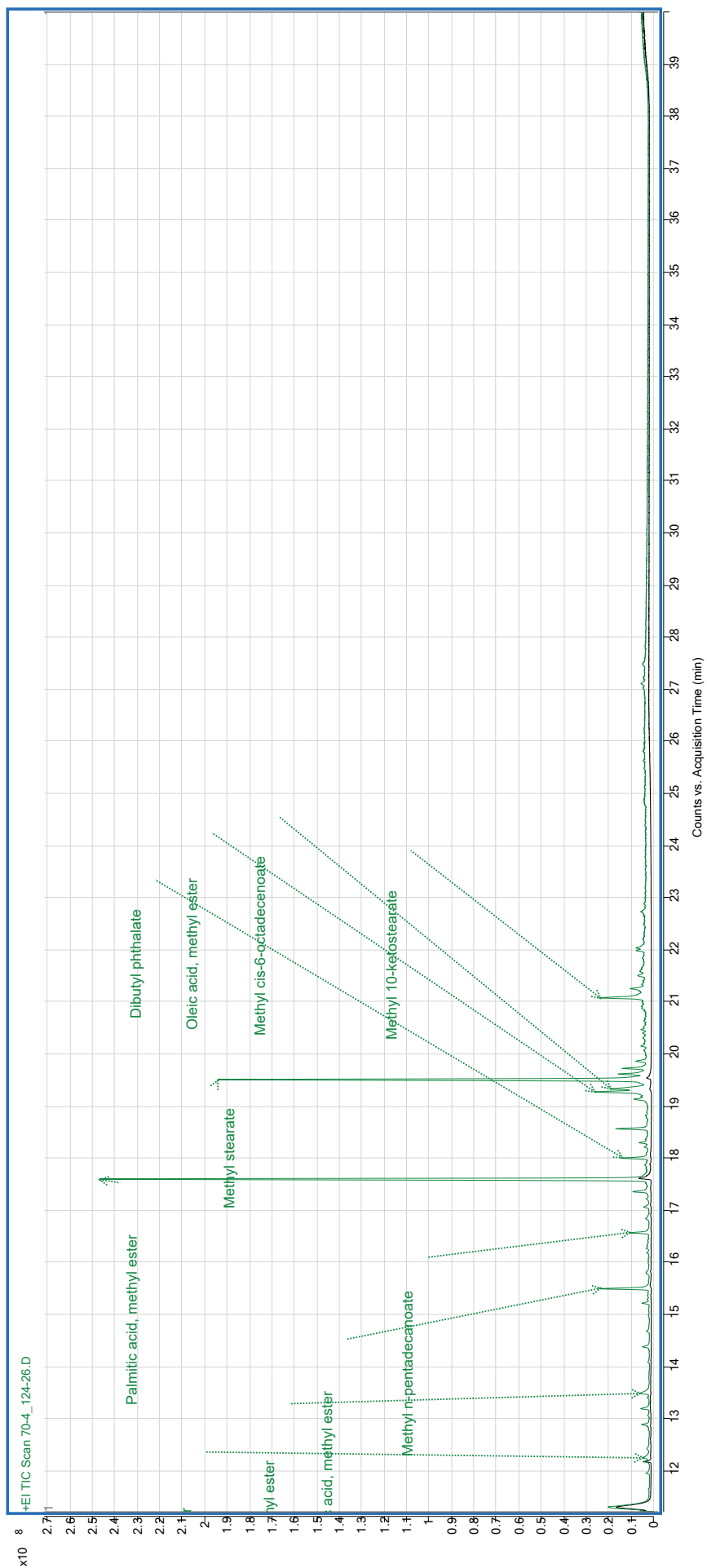


Obr. 20. Chromatogram vzorku A006 - 193-57.



Obr. 21. Chromatogram vzorku A006 - 19299.





Obr. 22. Chromatogram vzorku 70-4 - 124-26.





Ministerstvo kultury, Maltézské náměstí 1, Praha 1, odbor výzkumu a vývoje  
Č. j. MK 23213/2021 OVV  
Sp. Zn. MK-S 13150/2017 OVV

v y d á v á  
**OSVĚDČENÍ**  
č. 222

o uznání uplatněné metodiky

v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výzkumných organizací a hodnocení programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací“

**Název metodiky:** Analýza reziduí z archeologické keramiky pomocí specifických protilátek a hmotnostní spektrometrie

**Autorský kolektiv:** Mgr. Jaroslav Pavelka, Ph.D.

**Příjemce podpory, na jehož základě byla metodika vytvořena:** Západočeská univerzita v Plzni


**Dedikace:** Projekt NAKI II „Vrcholně středověká keramika jako součást movitého kulturního dědictví“

**Identifikační kód projektu:** DG18P02OVV020

**Uživatelé metodiky v praxi:**

- metodika je určena pro archeologické účely (metodika představuje nový způsob k detekci a rozlišování mezi vařenými a tepelně neupravenými proteiny z archeologických vzorků)
- metodika je určena pro vědecké odborníky z řad archeologů, bioarcheologů a imunologů
- metodiku lze využít i na jiném než archeologickém materiálu, např. na recentních biologických vzorcích v rámci forenzních věd

V Praze dne 4. 5. 2021

V. Z.   
Ing. Martina Dvořáková  
ředitelka Odboru výzkumu a vývoje

