

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA PEDAGOGICKÁ

CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

**Rozeznatelnost antigenních epitopů při analýze
proteinů na středověké keramice**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. et. Bc. Kateřina Hejnová

Přírodovědná studia, obor Biologie se zaměřením na vzdělávání

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

Plzeň, 2022

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

V Plzni, 30. června 2022

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování

Srdečně bych chtěla poděkovat svému vedoucímu Mgr. Jaroslavu Pavelkovi, PhD., za jeho kreativitu, ochotu, zkušenosti a hlavně za drahocenné rady při zpracování mé kvalifikační práce. Chtěla bych také poděkovat své rodině a blízkým přátelům za obrovskou podporu při mém studiu.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Historie metody ELISA.....	11
3. Princip imunoenzymatických testů	13
3.1 Pevná fáze	13
3.2 Komponenty reakce	13
3.3 Konjugáty a substráty	14
4. Degradace proteinů	16
4.1 Typy degradace.....	17
4.2 Problematika uchování potravin	18
6. Materiál a metody.....	19
6.1 Příprava vzorku.....	19
6.2 Příprava vzorků- hmotnostní spektrometrie	21
6.3 ELISA test.....	21
6.3.1 Testovací sady.....	22
6.3.2 Sendvičová ELISA	22
6.3.3 Hmotnostní spektrometrie	24
6.3.4. Testované proteiny.....	28
6.3.5 Vyhodnocení reakcí	28
7. Lokalita.....	29
7.1 Hrad Hausberg – lokalita pro odběr vzorků ze středověké keramiky ...	29
8. Výsledky.....	34
9. Diskuse	42

10. Závěr.....	47
Resumé	49
Použitá literatura:	50
Seznam obrázků	53

1. Úvod

Hlavním cílem této práce je detekovat zbytky potravin v porézní středověké keramice z přelomu 13. - 14. století. Práce se zaměřuje na skladbu potravy ze strážního hrádku a porovnává výsledky s podhradím na téže lokalitě. Dá se předpokládat, že ve skladbě potravin nalézáných v keramice na sledované lokalitě, případně na jiných lokalitách by měl být patrný sociální původ majitelů.

V dnešní době se stále více setkáváme s rozvojem vědeckých identifikačních metod, ať už na biologické úrovni (chromatografie, elektroforéza), na imunologické úrovni (EIA, RIA), nebo na molekulární úrovni (PCR). Identifikační metody na molekulární úrovni (PCR) jsou už mnoho let široce používanou metodou. Tyto metody jsou s technologickým vývojem dále zlepšovány tak, aby mohly plnit svojí funkci ve zdravotnictví, v laboratořích nebo v průmyslu.

Základní metoda předkládané práce se označuje jako ELISA. (z angl. EnzymeLinked ImmunoSorbent Assay). Tato metoda byla již použita v některých konkrétních publikacích (Pavelka a Vařeka 2008, Pavelka a Orna 2011, Čiperová et al. 2015, Pavelka et al. 2016, Pavelka et al. 2020, Hejnová 2020) a touto prací bych na tyto studie chtěla navázat. Studium potravních zvyklostí v minulosti může prohloubit pouze větší množství dat z různých období a prostředí a teprve tato komplexita výsledků může dát objektivnější představy o skladbě potravin v minulosti v různých prostředích. Testované vzorky pochází ze středověkých lokalit z okolí hradu Hausburgu. V této diplomové práci prověřuji historické poznatky o skladbě jídelníčku mezi vojáky ze strážního hrádku a obyčejných lidí, kteří bydleli v chudších lokalitách v podhradí.

Používám zde metody analýzy, které jsou založeny na schopnosti protilátek analyzovat historické archeologické proteiny. Na akademické půdě ZČU existují některé odborné archeologické publikace nebo i kvalifikační práce, které se zaměřují na podobné téma, zejména na téma detekce potravin ve středověké keramice (např. Hejnová 2020) nebo odlišování původních proteinů od kontaminací (např. Slaná 2018). V již publikovaných studiích byly zaznamenány signifikantní množství původních historických proteinů i obvykle nežádoucích kontaminací. Výsledky dokazují výskyt živočišných proteinů, které je možno díky jejich epitopům, pomocí protilátek určit do druhů a jako vhodný typ pro analýzy potravin se také ukázalo testování mastných kyselin (Pavelka et al. 2016).

Pro výzkum je nejlepší porézní keramika, protože absorbuje organické zbytky a dobře je uchovává. Zbytky jsou zde chráněny před destrukčními vlivy prostředí (Craig a Collins 2000, Eerkens 2005, Baker 2010).

Středověké pozůstatky potravin a nádoby jsou jeden z nejpřesnějších zdrojů informací o výživě uživatelů této keramiky, které věrohodně vypovídají o daném historickém kontextu. Pomáhají nám nahlédnout do tehdejší situace ať již ekonomické či jiné. Přibližují nám poměry tehdejší doby v dané lokalitě. Dalším zdrojem informací o stravě v minulosti jsou zejména archeozoologické nálezy, které prozrazují druhy zvířat na zkoumané lokalitě. S analýzou potravních zbytků v keramice se mohou doplňovat, ale z různých důvodů nemusí být závěry spolu v souladu.

Různé druhy keramiky sloužily k tepelné úpravě a přípravě řady pokrmů. V období středověku v Evropě se předpokládá především konzumace obilných, či pohankových kaší, ale jistě byly také tepelně zpracovávány živočišné produkty. Keramika se někdy dochovala celá, častěji bohužel jen ve zlomcích (střepey). V předkládané práci jsou použity pouze vzorky získané z keramické matrix. Seškrábaná keramika z vnitřku nádob obsahuje původní proteiny a lipidy z potravin. Podařilo se dokázat, že není nutno oddělovat proteiny od keramiky, jemně nadrcená keramika při analýzách a detekcích původních proteinů nijak nevadí a reakce antigenů a protilátek dává relevantní výsledky (Číperová et al. 2015). V předchozích pracích byly také zpracovány zuhelnatělé zbytky potravin (příškvarky) (Pavelka Vařeka 2008). Avšak těchto zbytků se nachází poměrně málo, naproti tomu porézní keramika je velmi často nalézána při nejrůznějších archeologických exkavacích. Z většiny těchto keramických zlomků lze získat nějaké informace o původních historických potravinách, které byly v této keramice zpracovány, nebo umístěny.

Předkládaná práce se pokouší kromě příspěvku k poznání stravy na strážním hrádku a v podhradí také o hlubší analýzu drůbežích proteinů. V minulosti se podařilo odlišit tepelně zpracované proteiny prasat (*Sus scrofa*) od prasečího trusu, který obsahuje také proteiny pocházející ze střevních bukálních sliznic. Proteiny z trusu zvířat mohou sekundárně kontaminovat keramiku a přinášet falešné výsledky o výskytu proteinů domněle pocházejících z potravin (Slaná 2018, Pavelka et. al 2020). Tyto proteiny mohou pocházet z trusu historických zvířat, nebo ze současného zemědělského hnojení. Nicméně důkaz existence trusu hospodářských zvířat na archeologických lokalitách může být v některých případech rovněž cennou informací.

Podobné rozlišení tentokrát drůbežích proteinů představuje další možnosti ohledně analýz potravin z archeologické keramiky. Nové kolekce kitů s protilátkami na denaturované drůbeží proteiny představovaly možnost získání dalších informací ze středověké keramiky. Proto byly uskutečněny pokusy na středověké keramice, ale i na pravěké (Hons v přípravě). Drůbež v pravěku nebyla ve střední Evropě příliš rozšířena, i když nejstarší nálezy patří do pozdní doby kamenné a do doby bronzové, nejde však o časově dobře určené doklady (Beranová 2005). Lépe je drůbež doložena v halštatu u Keltů, ale i tam jí bylo poměrně málo, až Slované chovali drůbež ve větší míře. Ibrahím ibn Jakúb který navštívil Prahu v desátém století píše, že se dalo koupit za jeden denár deset slepic, což v kontextu doby není právě levné, protože za stejnou částku se tehdy dala pořídit pšenice, která stačila ke stravě pro jednoho člověka na měsíc (Beranová 2005). Ale z období o které nám v této práci jde, tedy konec středověku 13. - 14. století se už zachovalo i množství receptů a drůbež zřejmě byla na jídelním stole častější.

V tomto období se nejvíce se konzumovaly slepice, tedy samice kura domácího (*Gallus gallus*), proto také pro kontrolní experimenty byl vybrán čerstvý trus kura. Ze slepic se vařily polévky a do jídel se často přidávala slepičí krev (Beranová 2005). Slepice se také využívala na přípravu oblíbených kaší a varmuží, (obdoba kaše, pro některé by se dal použít současný výraz hašé). Tyto kaše a varmuže se vyráběly z vařeného i syrového masa, i kostí, krků a nožiček, které se roztloukly v hmoždíři (Beranová 2005). Prestižním jídlem byly různě nadívané slepice i kuřata, nebo „slepice bez kostí“ (viz Beranová 2005). Kohouti se připravovali méně často a zachovalo se řada receptů i na přípravu kuřat, které se však na rozdíl od současné doby jedly méně než slepice (Beranová 2005). Použitý kit s protilátkami však detekují i jinou drůbež.

Musíme vzít v úvahu, že tyto testy nejsou vyráběny pro potřeby archeologie a biologie, ale pro detekci kvůli antigenům nebezpečným pro alergiky, nebo na rozlišení masa z náboženských důvodů a v neposlední řadě se pomocí nich ověřuje, zda výrobek opravdu obsahuje deklarované složení. Pro naše potřeby jsou ale tyto testy značně důvěryhodné a pro vysokou spolehlivost a je také zaručená opakovatelnost výsledků. Nicméně u testů na drůbeží proteiny je nutno počítat, že nemusí jít pouze o kura domácího (*Gallus gallus*), ale také o jiné druhy jako je kachna domácí (*Anas platyrhynchos*), husa domácí (*Anser anser domesticus*), nebo krůta domácí (*Meleagris gallopavo domesticus*). Krůtu domácí, ale můžeme v období evropského středověku vyloučit.

Dalšími testovanými proteiny byly proteiny prasat. Zde byla využita již zmiňovaná metodika vyvinutá dříve (Slaná 2018, Pavelka et. al 2020), která umožňovala rozlišit tepelně upravené proteiny od neupravených, což představovalo proteiny z trusu, který byl v zemině, kde byly keramické zlomky uloženy. Ve starších dobách byly nebyly prasata tak často konzumována jako skot, ale u Keltů a Slovanů se podíl prasat ve výživě zvyšoval. Ve středověku a v novověku se opět zvýšila konzumace hovězího masa, ale spíše mezi šlechtou a bohatými měšťany, u chudšího a tedy většinového obyvatelstva konzumace vepřového převládala (Beranová 2005). Ovšem díky tomu se zachovalo méně receptů na vepřové, zřejmě proto, že psaní knih, tedy i kuchařských, nepatřilo k běžným činnostem chudších lidí.

Proteiny skotu (*Bos primigenius* f. *taurus*) nebyly testovány i když je lze v keramice také očekávat. Je to proto, že metoda na rozlišení proteinů prasat a drůbeže nefunguje v případě protilátek proti proteinům skotu. Protilátky reagují stejně na proteiny tepelně upravené i neupravené. Díky zemědělskému hnojení, působení spodních vod a větru jsou výsledky téměř vždy pozitivní, (v jiných zemích ale může být situace jiná, například půda ze Sýrie se ukázal na proteiny skotu jako téměř negativní). Pozitivní výsledky se ukazují v půdě do hloubky 50cm, (nižší nebyla testována) i v hlíně na skalách pod mechem blízko zemědělských polí (Pavelka et. al. nepublikováno). Proto bylo od testování těchto proteinů upuštěno. V této souvislosti jsou také zpochybněny pozitivní výsledky na hovězí proteiny získané z keramiky pomocí hmotnostní spektrometrie.

Další byl testován kasein, což je hlavní protein savčích bílkovin, Obsahuje více typů molekul, které se od sebe liší strukturou a vlastnostmi. Zde nebylo testováno, zda se jinak detekuje tepelně upravený a neupravený kasein, jednak se vycházelo z předpokladu, že kasein není tak častou složkou zemědělských hnojiv a také proto, že se jedná o značně termostabilní protein, kde nedochází k denaturaci teplem, např. mléko se vařením nesráží. Nicméně je možno kasein destabilizovat jinak. Destabilizaci, v tomto případě mluvíme o srážení molekul kaseinu, se dá docílit v kyselém prostředí, nebo pomocí některých enzymů (výroba sýrů). Avšak testy jsou vyvinuté na kasein v jakékoliv formě. Kasein byl proto testován pouze na přítomnost či nepřítomnost, která prozrazuje přítomnost mléka, nebo mléčných výrobků. Jak moc se na dané lokalitě používalo mléko a mléčné výrobky se dokládá většinou podle osteologického materiálu, kde se předpokládá, že pokud byli poráženi staří býci a volí, tak předtím sloužili k tahu, případně jako plemenci a krávy poražené přibližně ve věku osmi let a vyšším sloužily předtím na mléko.

Na maso se obvykle porážely kusy po dosažení dospělosti (Beranová 2005). Zde představuje analýza keramiky další z dokladů konzumace mléka, V tomto případě se jedné o přímý, nikoliv odvozený důkaz. U kaseinu není možno rozlišit za jakého savčího druhu pochází. Beranová (2005) uvádí, že kozy byly v pravěké a středověké Evropě málo rozšířeny a mléko těchto savců nehrálo ve výživě velkou roli. S tímto závěrem jsou v rozporu právě některé analýzy keramiky, kde zejména v městské zástavbě ve středověku bylo detekováno až na řídké výjimky výlučně pouze kozí mléko (Pavelka a Vařeka 2008, Pavelka et al. 2016). Tyto analýzy je bohužel nemožné provádět v současné době. Dříve byly k dispozici velmi kvalitní protilátky na testování kozího mléka, sloužící k jeho odlišení od ostatního mléka. Bohužel firma přestala tyto detekční sady vyrábět a protilátky od jiných firem na identifikaci kozího mléka se ukázaly pro archeologický materiál jako nevhodné.

Poslední sledovanou potravinou bylo obilí, testoval se protein gliadin, který je součástí lepku. Lepek se uplatňuje při kynutí těsta. Testy byly vyvinuté kvůli lidem postiženým celiakií, kteří mají závažné problémy s trávením lepku. V potravinách je nutné testovat přítomnost lepku, aby se předcházelo potížím, které nastanou při neplánovaném požití lidmi s celiakií. Z hlediska testování potravin v keramice se tím nabídla možnost snadného určování přítomnosti obilnin. Gliadin má oproti jiným testovaným proteinům jednu velkou výhodu, nerozpouští se ve vodě, ale v alkoholu, takže spodní vody nemohou gliadinem kontaminovat studovanou keramiku a tak navodit falešně pozitivní výsledky. Testy na gliadin tedy potvrzují přítomnost některé z těchto obilnin: ječmen setý *Hordeum vulgare*, pšenice planá jednozrnka *Triticum boeoticum*, pšenice kulturní jednozrnka *T. monococcum*, pšenice tvrdá *T. durum*, pšenice špalda *T. spelta*, pšenice setá *T. aestivum*, Je nutno mít na paměti, že nereagují na rýži (*Oryza*), (skupina rýžovitých *Oryzaceae* obsahuje asi 21–25 druhů a velké množství taxonů nižších než druh), proso (*Panicum miliaceum*), ale také ani na oves (*Avena sativa*).

2. Historie metody ELISA

V 70.-80. letech 20. století byly vynalezeny metody ELISA a EIA, na jejichž objevení se podílely výzkumné týmy z Nizozemska a ze Švédska (Enzyme ImmunoAssay). Obě metody vychází z metody RIA ((RadioImmunoAssay) a jsou založeny na stejném principu, a to na principu imunotestu s využitím enzymu (Straková 2011).

Metoda RIA byla vyvinuta v 50 letech 20. století v USA. V roce 1960 byla metoda popsána Rosalyn Sussman Yalow a Solomonem Bersonem. Metoda RIA je imunologická metoda, při které se používá radioaktivní látka. Snahou bylo zesílit bezpečnost všech pracovníků, dále zde panovalo znepokojení spojené s problémy s radioaktivním odpadem, pořizováním drahého zařízení a také kvůli budování dalších budov (Straková 2011). Při rozmachu této metody se nejčastěji pracovalo s jódem-131, který má poločas rozpadu 8,02 dní a také i β a γ - záření. Později začali výrobci distribuovat jód-125, který má slabší γ -záření, dostatečně vysokou specifitu a také i čistotu. Díky slabějšímu γ -záření se předešlo mnohým zdravotním problémům. Touto metodou byla poprvé změřena hladina inzulínu v krvi (Yalow a Berson 1960, Straková 2011). Jednalo se o první stanovení hladiny hormonů v krvi. Rosalyn Sussman Yalow za tento objev v roce 1977 dostala Nobelovu cenu za medicínu. Tím, že bylo možné stanovit hladinu inzulínu v krvi, se léčba diabetu melites posunula rapidně dopředu.

Na začátku 70. let 20. století se na sjezdu v Basileji ERIAC (*European RadioImmunoAssay Club*), bylo zpochybněno využití enzymu. Účastníci se zabývali tím, zda je možné, aby se tak rozměrná a velká molekula navázala na protilátku nebo antigen, bez toho, aby nedošlo k nespecifickým reakcím probíhající mezi nimi. Všechny tyto obavy byly odůvodněny a vyvráceny sérií naplánovaných experimentů (Lequin 2005).

Mezi lety 1966 - 1969 došlo k úspěšnému navázání enzymů (gluko-oxidáza a alkalická fosfatáza) na antigeny a protilátky a to díky výzkumnému francouzského týmu z Paříže (S. Avrameas, G.B. Pierce). Avrameas a jeho výzkumný tým popsali navázání molekul pomocí glutaraldehydu (Avrameas a Uriel 1966). Záměr jejich práce směřoval k detekci přítomnosti protilátky nebo antigenu imunofluorescencí za pomoci enzymově značené protilátky nebo antigenu. Tato technika byla používána a dále rozvíjena v histopatologii a histochemii díky úspěšnosti těchto experimentů (Engvall 1977).

V roce 1971 vědci ze Stockholmské university ve Švédsku Petr Permann a Eva Engvallová vydali první publikace o výsledcích metody ELISA. Výsledky byly postaveny na měření hodnoty IgG (imunoglobulin G) v králičím séru s aplikací alkalické fosfatázy (Straková 2011). Ve stejném roce vědci van Weemen a Schuurs zveřejnili jejich další publikace týkající se metody EIA. Objevili, že metodou EIA je možné určit koncentraci gonadotropinu v moči. Avidin-peroxidáza spojená se stanoveným množstvím glutaraldehydu byla využita jako detekční enzym (van Weemen a Schuurs 1971).

Na přelomu 60. a 70. let mnoho vědců a výzkumníků začalo testy RIA vyrábět doma. Tito vědci však nemohli udržet tempo s velkými firmami, a proto začal komerční prodej EIA/ELISA kitů. V průběhu let se technika zdokonalovala a vylepšovala, laboratoře se technicky zdokonalovaly, což pomohlo k rozvoji a automatizaci pipetování, k rozvoji čteček mikrotitračních destiček a kromě dalších inovací vznikly např. pipety s více kanálky. K plné automatizaci těchto přístrojů došlo v 80. letech, tyto přístroje se přednostně uplatnily hlavně v lékařských laboratořích (Lequin 2005).

Objev metod EIA A ELISA způsobil kompletní převrat ve vývoji celých sérií testovacích sad. Testovací sady se vyvíjely od nejjednodušších (imunoenzymové měření) po složitější testy (Bosch a kol. 1975). Dále se vývojem a výzkumem této metody zabývala Nizozemská výzkumná skupina, která úspěšně zdokonalila metodu EIA pro reprodukci endokrinologii včetně výzkumu lidského gonadotropinu, lidského laktogenu a celkového množství estrogenu (Straková 2011).

S postupným rozvojem se na začátku 70. let začala používat poloautomatická metoda RIA pro screening krve na různá virová onemocnění (hepatitida B). K zjištění povrchového antigenu hepatitidy B (HbsAg) v roce 1976 Organon institut navrhl velmi přínosný EIA kit. Tento vynalezený test využívající metodu EIA je považován za první komerčně dostupný kit (Straková 2011). Po tomto objevu následovaly další virologické a mikrobiologické testy např. detekce protilátek k zarděnkám, detekce „e“ antigenu hepatitidy B, dále i toxoplasmóze a viru HIV (Straková 2011).

3. Princip imunoenzymatických testů

3.1 Pevná fáze

V posledních letech je zaznamenán vzrůstající zájem používání pevných fází při enzymatických imunotestech. Dříve se jako imunosorbční povrch používaly materiály jako agaróza, celulóza nebo polyakrylamid s kovalentně navázaným antigenem či protilátkou (van Weemen a Schuurs 1974). Postupem času se postupy zjednodušily a antigen mohl být adsorbován na nosiče jako např. polyvinyl, polypropylen, polykarbonát, sklo nebo silikon, a to díky použití pevných fází jako zkumavky, destiček, kuliček atd. (Straková 2011).

Pro vizuální pozorování se mohou používat destičky s kulatým dnem, ale pro spektrofotometrii se doporučují využívat mikrodestičky s plochým dnem. Vzniká zde kovalentní vazba mezi protilátkou (antigenem) a pevnou fází za pomoci bifunkčního reagentu např. glutaraldehydu, bromidu kyanovodíku nebo molekuly imunoglobulinu přichycující se na pevnou fází vodíkovými vazbami. K velké úspěšnosti navázání vede přidání imunoglobulinu nebo séra zředěného na 1-10 ug/ml v patřičném pufru (0,06M uhličitan s pH 9,6). Mikrotitrační destička se musí promývat tekutinou obsahující detergent, aby se zamezilo vzniku nespecifickým reakcím (Yolken 1978).

3.2 Komponenty reakce

3.2.1 Antigeny

Antigeny jsou látky zpravidla bílkovinné povahy. Konkrétně se jedná o struktury buňky, proteiny, DNA nebo nízkomolekulárních látek, které pomocí nekovalentních vazeb vzájemně působí a ovlivňují specifickou protilátku. Tyto bílkovinné látky jsou vyhodnocovány jako cizí látky organismu. Stimulují buňky imunitního systému k produkci protilátek. Imunitní systém cizorodou látku identifikuje a reaguje na ni. Protilátky jsou vázány na několika oblastech specifického antigenu formou interakce. Tímto procesem je antigen neutralizován nebo dokonce poškozen. Oblast molekuly antigenu, kterou identifikují imunitní receptory, se nazývá epitop (Hořejší 2002). Mezi nejvýznamnější antigeny patří proteiny, lipidy, lipoproteiny, nukleové kyseliny a různé komplexní polysacharidy. Všechny tyto látky pocházejí převážně z vnějšího prostředí, nejčastější antigeny jsou infekční mikroorganismy nebo jejich produkty.

3.2.2 Protilátky (Imunoglobuliny)

Protilátky patří mezi nezastupitelnou součást imunitního systému. Jedná se o proteiny, které dokáží identifikovat a zneškodnit cizí objekty jako jsou bakterie a viry v těle. V těle vznikají v mízní tkáni, jsou produkovány plazmatickými buňkami (diferencované B-lymfocyty). V našem těle se nacházejí především v krevním séru. Z celkového séra proteinů tvoří imunoglobuliny 20%. Jedná se o heterogenní glykoproteinové molekuly, které lze elektroforeticky charakterizovat a popsat. Imunoglobuliny se specificky váží na antigen, což patří mezi jejich základní vlastnost (Straková 2011).

Základní jednotka imunoglobulinu se skládá z 4 polypeptidových řetězců. Dva řetězce jsou označeny jako L (lehké) a zbylé dva se jsou označovány jako H (těžké). Těžké řetězce jsou kovalentně spojeny disulfidickými vazbami. Místo, kde jsou spojeny těžké řetězce disulfidickými vazbami se označuje jako pantová oblast. Řetězec L je disulfidickou vazbou připojen ke každému H řetězci. Těžké řetězce jsou nejčastěji složeny ze čtyř strukturně podobných domén. Každá tato doména je vytvořena souborem sekvencí 110-120 aminokyselin (Straková 2011).

3.3 Konjugáty a substráty

Aby byla specifická reakce antigenu a protilátky detekovatelná je třeba ji zviditelnit. Na antigen či protilátku je nutno kovalentně navázat enzym, který bude schopen katalyzovat nějaký substrát, která je do reakce přidán a změnit ho na barevný. Nejčastěji tímto enzymem je peroxidáza nebo alkalická fosfatáza. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci přeměněného substrátu a to odpovídá koncentraci označené protilátky, nebo antigenu. Důležité je, aby protilátka, nebo antigen, které se nespojí byly řádně z reakce vymyty a nevytvořily falešný barevný signál. Intenzita zbarvení se dá určit pouhým okem, ale je mnohem přesnější stanovení spektrofotometrické, nebo fluorimetrické, to záleží na použitém substrátu a typu enzymu (Hejnová 2020).

3.3.1 Alkalická fosfatáza (ALP)

Alkalická fosfatáza je enzym katalyzující hydrolýzu monoesterů kyseliny fosforečné v alkalickém prostředí (pH 9,5 – 10,5) na kyselinu fosforečnou a alkohol. Napomáhá transportu anorganických fosfátů přes buněčnou membránu a působí na metabolismus fosfátových vazeb. Během tzv. defosforylace je alkalická fosfatáza schopna odebrat fosfátovou skupinu z mnoha typů molekul. Mnohdy se jí říká bazická fosfatáza, protože

její reaktivita je nejvyšší v bazickém prostředí (Tomás et. al. 2002). V imunotestech se nejvíce používá fosfatáza, která pochází ze střevní sliznice hovězího dobytka nebo z *Escherichia coli* a obě mají rozdílné vlastnosti. U *Escherichia coli* je 0,1 M Tris-HCl pufr a pro bovinní enzym 10% dietanolamin. P-nitrofenylfosfát (pnpp) se považuje za nejčastější substrát pro ALP. Tento substrát se s nepasterizovaným mlékem zabarvuje žlutě na rozdíl od pasterizovaného mléka, se kterým se nevyskytuje žádné zbarvení. Alkalická fosfatáza podléhá varu. Dalšími substráty mohou být chromogenní substráty. Mezi tyto substráty patří fenolftalein monofosfát, B- glycerofosfát, uridin fosfát a tymoftalein monofosfát. Za flurogenní substráty se považuje B-naftylfosfát, 4- methylumbelliferyl fosfát a 3-omethylfluorescein (Ngo 1991). V zásaditém prostředí je aktivní alkalická fosfatáza nejlépe při pH 8, avšak jsou nutné hořčičnaté ionty pro enzymatickou aktivitu. Mezi nejpoužívanější pufrů se řadí dietanolamin/HCl v pH 9,6 (Ngo 1991, Straková 2011).

3.3.2 Avidin-peroxidáza (horseradish peroxidase (HPR))

Jedná se o modifikovanou peroxidázu, na které je kovalentně připojen protein avidin pocházející z vaječného bílku. Tento enzym je nejčastěji získávaný ze křenu selského (*A Armoracia rusticana*).

Tento holoenzym se často používá k vizualizaci různých biochemických interakcí (protein- proteinových, protein - sacharidových). Jeden z komponentů této interakce je modifikován biotinem. Avidin je schopný silně vázat biotin a pomocí avidin-biotinového můstku dokáže připojit peroxidasu k interagujícím látkám. Po přidání vhodného substrátu (jenž oxiduje a ovlivňuje jeho vlastnosti- rozpustnost, barva) a zdroje peroxidu (H_2O_2 , $NaBO_3$) vizualizuje tuto interakci. Mezi vhodné substráty patří 4-chloro-1-naftol, po jehož oxidaci dochází ke vzniku nerozpustné fialové látky a a ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonát), který tvoří stabilní, zeleně zbarvené rozpustné radikály (Straková 2011).

4. Degradace proteinů

Mezi zásadní problémy při zachování zbytků potravy nebo při uchovávání proteinů je možnost jejich denaturace. Jedná se o změnu terciální struktury a kvartérní struktury (Pavelka a Orna 2011). Terciální struktura udává orientaci bílkoviny v trojrozměrném útvaru a kvartérní struktura popisuje způsob propojení bílkovinných přednostek do větších celků.

Při denaturaci proteinů jde o nevratné ztráty biologické aktivity a ztrátu prostorové struktury. Postupem času jsou proteiny ovlivňovány řadou přirozených procesů degradace. Mezi tyto procesy patří denaturace, deaminace, hydrolýza peptidových vazeb nebo může docházet k jejich rozkladu působením mikroorganismů (Slaná 2018). Řetězce aminokyselin jsou uspořádány do prostorových struktur. Tyto prostorové struktury vypadají jako tzv. klubička a vlivem vnějšího prostředí dochází k jejich výraznému poškození (Bollag 1990).

Vnější podmínky mohou nepříznivě bílkovinnou strukturu ovlivnit působením fyzikálních, chemických či bílkovinných vlivů. Jedním z fyzikálních procesů, které dokáží způsobit denaturaci bílkoviny, je její zahřátí na teplotu vyšší než 80 °C. Je to nejběžnější způsob denaturace potravy člověkem, v případě, že se jedná o bílkovinu živočišného původu. S touto denaturací se setkáváme při ohřívání a přípravě pokrmů. Principem chemické denaturace proteinů je působení chemických látek na peptidické vazby, chemikáliemi, které mohou tyto vazby rozbít jsou například různé anorganické i organické kyseliny (McMurry 2007). S chemickou denaturací se setkáváme i při uchovávání keramiky. Co se týče historických peptidů na ty mohou působit různé chemické látky obsažené v půdě, ať už anorganického či biologického původu.

V dnešní době se může jednat o látky, které se do půdy dostávají vlivem zemědělství (hnojiva, pesticidy aj.), průmyslu a uplatňují se i další antropologické vlivy. K rozpadu peptidů mohou dále přispět látky vytvořené činností půdních mikroorganismů (Barnard et al. 2007).

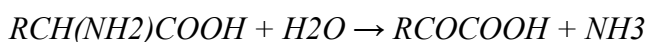
4.1 Typy degradace

4.1.1 Denaturace

Při denaturaci dochází k nevratné ztrátě hormonálního a enzymového účinku. Změní se celkové prostorové uspořádání molekuly (bílkoviny nebo nukleové kyseliny). Chemické látky, které jsou schopné uvolnit iontové působí denaturačně. Jedná se o látky jako jsou kyseliny, zásady, organická rozpouštědla (alkohol, aceton). Denuraci můžou zapříčinit i vysoké teploty. Dále jsou bílkoviny náchylné na různé fyzikální faktory, patří mezi ně ultrafialové paprsky a rentgenové záření. Důsledkem těchto faktorů přijdou o hydrofilní vlastnosti (Slaná 2018, Hejnová 2020).

4.1.2 Deaminace

Při deaminaci je odstraněna aminoskupina ($-NH_2$) od molekuly. Tímto procesem jsou aminokyseliny rozebírány. Aminokyselina se přemění na amoniak (čpavek) za vzniku 2-oxo- (α -keto-) kyseliny.



Zbytek aminokyseliny je tvořen nejčastěji vodíkem a uhlíkem. Enzymy změní amoniak na kyselinu močovou nebo na močovinu přidáním molekul oxidu uhličitého v močovinovém cyklu, který probíhá i v játrech. Kyselina močová a močovina přejde bezpečně do krve a následně je vyloučena močí (Hejnová 2020).

4.1.3 Hydrolýza peptidových vazeb

Peptidová vazba (kovalentní vazba) obsahuje uspořádání atomů $-CO-NH-$. Tato vazba spojuje dvě skupiny aminokyselin. Hydrolýzou nebo přidáním molekuly vody dochází k degradaci peptidové vazby. Přidáním molekuly vody se uvolní energie a peptidová vazba se rozpadne. Tento proces trvá několik století (Hejnová 2020).

4.1.4 Maillardova reakce

Jedná se o neenzymatickou reakci mezi redukcujícími sacharidy a aminosloučeninami (aminokyseliny a bílkoviny). Při průběhu reakcí se vytváří mnoho reaktivních karbonylových sloučenin, které vzájemně reagují také s přítomnými aminosloučeninami, což způsobuje tzv. neenzymatické hnědnutí potravin. Průběh reakce začíná okolo $150^\circ C$.

4.2 Problematika uchování potravin

Na uvedených stanovištích byly objeveny keramické nádoby, které se zřejmě využívaly k přípravě pokrmů, je proto pravděpodobné, že se na nich zachytily stopy původní stravy z minulosti (viz Baker 2010). Z archeologických vzorků se důsledkem nových metod a technik začaly realizovat analýzy a extrakce ancient DNA (ancient deoxyribonucleic acid). Vzhledem k pravděpodobné kontaminaci, která v archeologii způsobuje výrazný problém byly výsledky ostře zkritizovány a zpochybněny (Pruvost et al. 2005). Problémy s kontaminací do určité míry vyřešily metody sekvenování nové generace, zde můžeme detekovat většinu sekvencí ve vzorky a mnohdy rozeznat ancient DNA od nových kontaminací. Avšak DNA podléhá snadněji degradaci a zvláště v případě potravinových zbytků na keramice nelze počítat s jejím uchováním. Avšak dlouhá doba uchování působí i na proteiny.

V průběhu času proteiny podléhaly mnohým přeměnám, mezi které patří hydrolýza peptidových vazeb, deaminace, denaturace nebo také napadení mikroorganismy (Barnard et al. 2007). Jedná se o velmi složité a rozmanité makromolekulární látky, proto je práce s nimi náročná. Každý protein se díky této struktuře chová odlišně. K identifikaci a extrakci všech proteinů nelze zvolit pouze jednu metodu (Barker 2010).

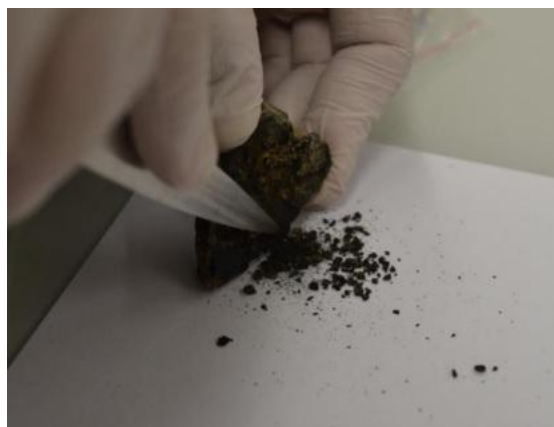
6. Materiál a metody

6.1 Příprava vzorku

Pro analýzy zbytků potravin z hradu Hausberg a jeho podhradí byly použity zlomky keramiky nalezené na této lokalitě při exkavacích (ukázka na obr.1.) Materiál pro analýzy proteinů pochází z keramických střepů tedy z nádob, ve kterých byly potraviny zpracovávány či uchovávány. Ze zbytku dochované keramiky se seškrábala vrstva 2-5 cm² do hloubky 1-3mm. Povrchová vrstva keramiky se netestuje, protože bývá často kontaminovaná. Seškrábané vzorky keramiky se nasypají do plastických zkumavek (ependorf). Při stanovení vhodné keramiky pro odběr se vybíraly dna nádob, kde se předpokládala silnější koncentrace usazených proteinů.

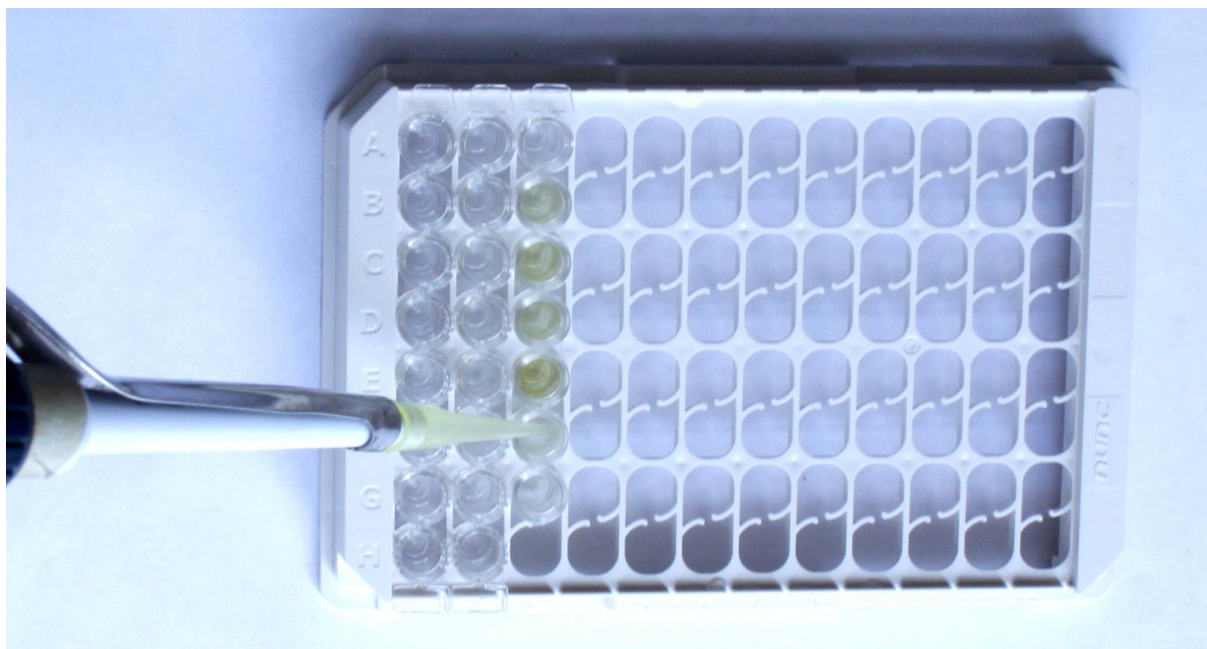
Tato směs seškrábané keramiky a předpokládaných proteinů musí být mechanicky rozdrčena na jemnější prášek a smíchána s extrakčním roztokem v objemu 200 - 400μl. V případě kaseinu a gliadinu jsou extrakční roztoky jsou součástí komerčních kitů. V případě analýzy proteinů svaloviny a mukózních sliznic střev se připravují fyziologické roztoky jako 0,9% NaCl v destilované vodě. Není vhodné pro ELISA testování tyto proteiny z keramiky izolovat protože samotná keramika je v antigenní reakci pouze inertní složkou, která reakci neovlivňuje (viz Čiperová et al. 2015). Reakce antigenu, což byly proteiny z keramiky a komerčních druhově specifických protilátek protilátek z kitů, byly zviditelněny pomocí biotinylovaného značení. Nezbytný byl sled promývání a barvení, který byl proveden podle doporučení výrobce. Pozitivní reakce se projevovaly žlutým zabarvením, podobně jako v pozitivní kontrole (obr.2). Pozitivní reakce vzorku se musí odlišovat od negativní kontroly. V předkládané práci byl pro stanovení intenzity reakcí použit spektrofotometr ELISA READER VERSAmax™ (Molecular Devices), při vlnové délce 450 nm (Hejnová 2020).

Obr. 1: Odběr vzorku z keramiky bohaté na karbonizované usazeniny (příškvarky)





Obr. 2. Hausberg. Profilace okrajů získaných povrchoým sběrem. Kresba autorka.



Obr.3. Závěrečná fáze, kdy se projevuje žlutě biotinylovaného značení, které určuje intenzitu reakce

6.2 Příprava vzorků- hmotnostní spektrometrie

Vzorky byly dvě hodiny štěpeny trypsinem, následně přečištěny a zahuštěny na reversní fázi C18. Poté byly analyzovány pomocí nanokapalinové chromatografie spojené s hmotnostním spektrometrem ESI-Q-TOF Maxis Impact. Peaklisty byly ze změřených dat extrahovány programem Data Analysis 4.1. Proteiny byly identifikovány za pomoci softwaru Mascot verze 2.2.04 vyhledáváním v proteinové databázi SwissProt a MS/MS přesností přiřazení hmotností peptidových štěpů 0,05 Da. Vzorky byly porovnány s živočišnou i rostlinnou proteinovou databází. Měření bylo provedeno na VŠCHT v Praze.

6.3 ELISA test

ELISA je analytická metoda využívaná ke kvantitativnímu stanovení nebo k detekci různých antigenů. V našem případě vybrané a prověřené testy ELISA slouží primárně pro testování alergenů v historických proteinech (Pavelka et. al. 2016). Celý postup je prováděn na mikrotitrační destičce. Na dně mikrotitrační destičky je navázána primární protilátka na kterou se pasivně váží, jak proteiny tak protilátky. V tomto principu spočívá jednoduchost tohoto testu. V průběhu testu vazba reagujících látek usnadňuje jednoduché oddělení navázaného a nenavázaného materiálu. Na primární protilátku navázanou na destičce může být navázán detekční enzym, ten je zpravidla napojen na sekundární protilátku, která dokáže primární protilátku označit. Detekční enzym by se mohl navázat přímo na protein, pokud by byla primární protilátka něčím označena např. biotinem. Ke značení enzymů se nejčastěji využívá alkalická fosfatáza (AP) a peroxidáza (HRP).

ELISA testy se zakládají na reakci substrátu (antigenu) a protilátky. Nežádoucí proteiny na keramice, které se považují za nepostřehnutelné kontaminace jsou často zachyceny ELISA testy. Tyto testy mají výraznou citlivost pro historické denaturované proteiny z potravin. V archeologické keramice se dochovaly jako makro zbytky potravy nebo v omezeném množství, které je nasáklé v keramické matrix. Testy jsou zaměřené na různé proteiny, především na takové, které se vyznačují termostabilitou. Např. albuminy z masa hospodářských zvířat. Testy jsou přizpůsobeny tak, aby zachytily tepelně zpracovanou potravu, tedy i degradované proteiny (Pavelka a Vařeka 2008).

Kvůli této degradaci není míra karbonizace pro ELISA test překážkou. Pozitivní reakce testu se vyznačuje žlutým zbarvením, stejně tak jako kontrola. Negativní kontrola se projeví pouze mírným odstínem či zůstane nezbarvena (Pavelka a Orna 2011). Mezi pozitiva této metody patří finanční dostupnost a snadné provedení.

Při porovnání s jinými metodami je tato metoda schopna vyhodnotit desítky vzorků za relativně krátký časový interval. Mezi negativa patří to, že objem vzorku je limitovaný. S porovnáním s hmotnostní spektrometrií, kde potřebujeme pouze 20-30 µg, na ELISA test potřebujeme množství větší a to 0,5 - 1mg na jednu analýzu (Pavelka a Vařeka 2008).

6.3.1 Testovací sady

Testovací sady BioKis - Cooked Species Identifikacion Test Kit vyrobené firmou Neogen Corporation® byly využity k analýze různého druhu masa. Rozbor kravského mléka se realizoval díky identifikaci β -laktoglobulinu a kaseinu skotu pomocí ověřených komerčních sad, které zprostředkovala firma *Neogen Corporation*® (viz Pavelka et al. 2016). Tyto komerční sady byly také využity k identifikaci gliadinu u obilovin. Testy pracují na základě metody ELISA (z angl. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Jedná se o jednu z nejcitlivějších imunologických analýz, kterou je možno v rutinních laboratorních analýzách provádět. ELISA využívá vlastnosti imunoglobulinů, což je schopnost navázat na sebe antigeny. Na povrch leukocytů se vážou protilátky pomocí tzv. FC fragmentů na adekvátní FC receptory. Toto je způsob, kterým připevňuje imunoglobulin k povrchu mikrotitrační jamky (Hejnová 2020).

6.3.2 Sendvičová ELISA

K analýze všech vzorků byly použity sady ELISA od Neogen Corporation® Jedná se o typ sendvičové ELISY.

Podmínkou pro reakci je výskyt nejméně dvou a více vazebných míst na antigenu. Z počátku se na pevný povrch pasivně naváže protilátka. Antigeny jsou navázány těmito protilátkami. Antigeny musí být v blokujícím pufru naředěné, aby nedocházelo ke nespecifickému navázání. Blokující pufr by z pravidla neměl obsahovat žádné antigeny, které by se mohly vázat na záchytné protilátky. Po promývání a inkubaci by se měl vytvořit stabilní antigen-protilátkový komplex (Hejnová 2020).

Zachycený antigen je analyzován přidáním enzymově označené specifické protilátky a celý tento komplex je znova inkubován v pufru. Záchytná protilátka může být se stejného druhu jako tato sekundární protilátka. Po inkubaci a promytí následuje přidání substrátu, a tím dojde po určité době k zastavení reakce (Slaná 2011). Pro vyhodnocení výsledků se použije spektrofotometr. Použitím jednotné enzymově konjugované protilátky je značně omezená přesnost a vlastnosti. Tato protilátka brání univerzálnosti této metody.

Každá zhotovená protilátka (pro různé antigeny) musí být řádně označena. Antigeny musí mít nejméně 2 epitopy (oblast molekuly, která vyznačuje, zda je antigen schopen navázat protilátku), což může být dalším omezením. Antigeny potřebují navázat detekující protilátku, tak zachytnou protilátku. K zásadnímu problému může vést použití detekující protilátky druhově stejné jako zachytné protilátky, protože na antigenu není dostatek místa pro navázání protilátky. Prostor a velikost protilátky pro navázání mohou ovlivnit test. Na závěr se změří intenzita vzniklého zbarvení. V naší analýze byla použita sendvičová ELISA Neogen Corporation® Biokits for Species Identification pro detekci vzorků z vepřového, ovčího a hovězího masa, které se vyskytovaly v daných lokalitách.

Postup při sendvičové metodě ELISA

1. Nejprve se musí připravit přiměřené množství testovacích kitů a promývací a naředěné extrakční roztoky.
2. Do připravených testovacích kitů se automatickou pipetou napipetuje 100 µl extrakčního roztoku nebo pozitivní kontroly. Vždy musíme použít novou špičku při každém pipetování, díky tomuto zabráníme vzniku cross-kontaminaci.
3. Vzorky je potřeba jemně protřepat v ruce. Nechají se inkubovat 45 minut při pokojové teplotě. Na následující ELISA testy je vzorky možné znova použít. Do plastických zkumavek značky eppendorf se pouze vzorky odpipetují a tím, jsou připraveny k dalšímu využití.
4. Obsah testovacích jamek se nejméně třikrát vymyje a promyje se předem připraveným promývacím roztokem.
5. Do všech testovacích kitů se přidá 50 µl biotinu. Poté je potřeba vzorky zlehka protřepat a nechat je v klidu inkubovat 45 minut při pokojové teplotě.
4. Obsah testovacích jamek se nejméně třikrát vymyje a promyje se předem připraveným promývacím roztokem.
5. Do všech testovacích kitů se přidá 50 µl biotinu. Poté je potřeba vzorky zlehka protřepat a nechat je v klidu inkubovat 45 minut při pokojové teplotě.
6. Testovací jamky se promyjí předem připraveným promývacím roztokem a to nejméně třikrát.

7. Do všech testovacích jamek, které se nachází v mikrotitrační destičce se přidá 50 µl konjugátu (bílkovina s navázaným enzymem) avidin peroxidázy. Je nutné testovací jamky protřepat a nechat je odstát po dobu 15 minut při pokojové teplotě.
8. Všechny testovací jamky se pětkrát promyjí promývacím roztokem. Do všech jamek k testování se přidá 100 µl TMB roztoku.
9. Vzorky se opatrně v ruce protřepou, zakryjí a nechají se inkubovat 45 minut při pokojové teplotě.
10. Na závěr do každé testovací jamky musíme přidat 50 µl stop solution roztoku, a tím zastavíme reakci (Hejnová 2020).

Testovány byly proteiny drůbežního a vepřového masa, dále přítomnost kaseinu a gliadinu. Pro identifikaci gliadinu byl použit kit Veratox for Gliadin. Protein gliadin je součástí lepku a vyskytuje se v obilovinách (*Hordeum vulgare*, *Triticum boeoticum*, *T. monococcum*, *T. durum*, *T. spelta*, *T. aestivum* atd.). Je možno zachytit i relativně malé množství, ale protilátky nejsou schopny zachytit proteiny rostlin, které lepek neobsahují, např. proso (*Panicum miliaceum*). Pro stanovení drůbežích proteinů (*Gallus gallus*, *Anas platyrhynchos*, *Anser anser*, *Meleagris gallopavo*) a prasečích (*Sus scrofa*) proteinů byl použit kit BioKits for Speciation Identification Beef/Pork/Poultry/Sheep (Raw). Dále byl testován kasein, který je součástí každého savčího mléka a pro test byl použit Veratox® for Casein allergen test kit. Všechny použité kity pochází od firmy Neogen 620 Leshner Place, Lansing, MI 48912 USA.

6.3.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je výkonná a velmi citlivá analytická metoda, která převádí molekuly na ionty. Podává informace o jejich hmotnosti (relativní molekulové hmotnosti M_r), a struktuře molekul analytů, nacházejících se ve stopových koncentracích ve směsích (McMurry 2007).

Jedná se především o nástroj biologického výzkumu k charakteristice a kvantifikaci metabolitů a proteinů, dále k identifikaci neznámých sloučenin ve vzorku a k objasnění struktury a chemických vlastností různých molekul.

Molekuly látky jsou ionizovány a separovány na soubor fragmentů odlišujících se poměrem hmotnost/náboj (m/z) (Opekar a kol. 2005). Podstatou metody je detekce iontů vznikajících v iontovém zdroji a v hmotnostním analyzátoru (Hejnová 2020). Hmotnostní spektra vznikají v hmotnostním spektrometru. Je důležité, aby hmotnostní spektrometry byly složeny z několika důležitých částí- analyzátor, iontový zdroj a detektor částic (Fridecký a Lemr 2012).

Vzorek látky je zasunut do zdroje iontů, neboli spektrometru. Zde se analyzovaná látka převádí do plynné fáze, poté začíná ionizace. Je důležité převést analyty na ionty za pomoci patřičné ionizační techniky. Dopadem ionizování dochází k vytvoření nabitých částic- iontů. Ionty jsou dále oddělovány v analyzátoru vlivem elektromagnetického pole podle poměru (m/z) neboli hmotnosti.

Měkké ionizační techniky se používají pro ionizaci biologických látek, protože nepodléhají jejich fragmentaci. Nejčastěji se setkáváme s ionizací elektrosprejem, (electrospray ionization – ESI) či nanosprejem (nanoESI) nebo s ionizací za pomoci laseru za přítomnosti matrice(matrix-assisted laser desorption ionization – MALDI) (Karas 2003).

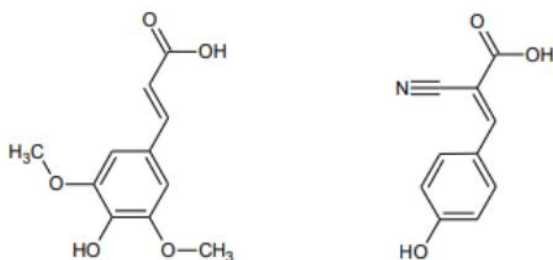
Elektrosprejová ionizace (ESI) je atmosferická ionizační technika, která k tvorbě iontů využívá elektrosprej. Ionizace probíhá v přítomnosti rozpouštědla (acetonitril, methanol, nebo jejich směs s vodou). Působením vysokého elektrického napětí (2-6 kV) na kapalinu se vytváří aerosol.

Při této ionizaci mohou vznikat i vícenásobně nabité ionty, a proto je vhodná i pro sledování vysokomolekulárních látek. Metoda (ESI) se spojuje s dalšími separačními technikami a to s kapilární elektroforézou CE-ESI nebo s kapalinovou chromatografií LC-ESI a to proto, že jsou analyty ionizovány v roztoku. Působením vysokého napětí dochází k vytváření kapiček analytu obalených rozpouštědlem. Vzniklé ionty se uvolnily postupným odpařováním rozpouštědla a jsou elektricky směřovány do MS. Při této ionizaci mohou vznikat i vícenásobně nabité ionty $[M+nH]n+$, a proto je vhodná i pro sledování vysokomolekulárních látek (Hejnová 2020).

MALDI neboli matricí asistovaná laserová ionizace je metoda, která užívá matrice absorbující energii laseru k tvorbě iontů z velkých molekul za minimální fragmentace. Používá se na analýzu biomolekul (DNA), bílkoviny, peptidy a sacharidy a velkých

organických molekul (polymery). Tyto biomolekuly jsou nestabilní a při použití odlišných způsobů ionizace dochází u nich k fragmentaci.

Provedení MALDI je složeno ze tří kroků. Nejdříve se vzorek smíchá s vyhovující látkou nebo směsí, která tvoří matrici a celý tento roztok se nanese na kovovou destičku. Pro proteiny se jako matrice používá kyselina sinapová a pro peptidy např. α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina) a celé to necháme společně krystalizovat.



Obr. 4: Používané matrice MALDI: kyselina sinapová a kyselina α -kyano-4- hydroxyskořicová

Poté je vzorek ozářen pulzním laserem, což vyvolá ablaci a desorpci vzorku a matrice. Na závěr jsou molekuly analytu ionizovány protonací nebo deprotonací v proudě žhavých ablatovaných plynů a analyzují se hmotnostním spektrometrem (Karas 2003). Při ionizaci MALDI vznikají jednonásobně nabitě ionty.

Vzniklé ionty se objevují v ionizačním zdroji, které jsou dále regulovány iontovou optikou a jsou převedeny do hmotnostního analyzátoru. Oddělování iontů probíhá za vysokého vakua v hmotnostním analyzátoru (Fridecký a Lemr 2012).

Hmotnostní analyzátor slouží k dělení iontů v plynné fázi podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Hmotnostní analyzátor je umístěný před detektorem a za iontovým zdrojem. Dělení iontů probíhá za vysokého vakua, záleží na typu analyzátoru.

Iontová past (ion trap – IT), zachycuje ionty pomocí napětí na elektrodách a poté je analyzuje. Výsledkem je velmi vysoká frekvence sběru dat. Analyzátor doba letu (TOF) měří dobu letu iontů, díky které získává poměr hmotnosti a náboje iontů. Ionty se zrychlují elektrickým polem o známe intenzitě.

Kvadrupól (quadrupole – Q) skládá se ze čtyř rovnoběžných válců, které vytvářejí kvadrupól. Tento hmotnostní analyzátor odděluje jednotlivé ionty podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). V kvadrupólových spektrometrech jsou ionty oddělovány na základě stability svých drah v oscilujících elektrických polích přiváděných na tyče.

Existují různé typy hmotnostní spektrometrie, které se liší v různých kritériích, ať už jde o rychlost analýzy nebo o hmotnostní nebo dynamický rozsah, senzitivitu nebo rozdílnými specifikacemi.

Rozdělené ionty pokračují na detektor, který detekuje a vyhodnocuje signál z dopadajících iontů. Nejvíce využívané detektory jsou elektronové fotonásobiče. Ionty dopadají na povrch elektrody (tzv. dynody), kde dochází k fotoelektrickému jevu - k vyražení elektronů nad povrch katody. Elektrony jsou opakovanými kolizemi nebo systémem dynod zesilovány. Vytvoří se hmotnostní spektrum, ve kterém se zobrazují všechny naměřené měrné hmotnosti a jejich intenzity. Tato metoda prosperuje více výhodami s porovnáním s imunologickými technikami. Hmotnostní spektrometrie se může honosit vyšší škálou analyzovaných látek. Zatím nedokáže příliš dobře vzájemně druhově rozlišit některé druhy proteinů, mezi které patří proteiny hovězí, vepřové nebo mléčné. Na detekci vzorku pomocí hmotnostní spektrometrie musí být vzorek speciálně upravený, což u archeologického materiálu může být úskalí této metody. Další nevýhodou je dostupnost vhodného zařízení (Baker 2010).

6.3.4. Testované proteiny

Záměrem práce je stanovit konkrétní proteiny. Testuje se zde archeologická keramika, která může ukrývat zachované proteiny.

Gliadin

Patří mezi proteiny, které se nachází v obilných zrnech a v travním rodu *Triticum*. Nejvíce je zastoupený v pšenici. Je významnou součástí bílkovinného komplexu lepku (glutenu). Napomáhá regulaci buněčných procesů. Je složený z polypeptidů s jedním řetězcem. V gliadinu se tvoří cystein disulfidové můstky, které mohou výrazně ovlivnit jeho globulární charakter. ELISA test je vyhrazený k detekci gliadinu obsaženého v obilovinách (Slaná 2018, Hejnová 2020).

Kasein

Je považován za hlavní bílkovinu (protein) v savčím mléce. Podíl kaseinu se pohybuje okolo 80% a zbylých 20% tvoří různé syrovátkové proteiny. Jedná se o velmi důležitý zdroj vápníku, aminokyselin a fosfátu. Vyznačuje se velmi specifickou zrnitou strukturou, ale i odlišným chováním od ostatních proteinů (Hejnová 2020).

Beta-laktoglobulin

Beta-laktoglobulin je globulární syrovátkový protein, který tvoří 7-12% mléčných bílkovin. Jeho primární strukturu tvoří 162 aminokyselinových zbytků (Čiperová 2015). Nejvíce se vyskytuje v ovčím a kravském mléce. Testování beta-globulinu se věnuje kompetitivní ELISA. Test zachytává jen protilátky beta-laktoglobulinu a jiné protilátky se zde nedokáží udržet (Hejnová 2020).

6.3.5 Vyhodnocení reakcí

Podle intenzivního zabarvení stanovíme pozitivní výsledky. Pozitivní kontrola se zabarvuje žlutě a negativní kontrola se barevně neprojevuje vůbec. Slabě pozitivní výsledky byly zabarveny světle žlutě. Nezabarvené výsledky hodnotíme negativně. Optické stanovení není vždy stoprocentně přesné, proto jsou výsledky kontrolovány spektrofotometricky na přístroji Elisa reader VERSAmax™ (Molecular Devices) při 450 nm (Hejnová 2020).

7. Lokalita

7.1 Hrad Hausberg – lokalita pro odběr vzorků ze středověké keramiky

Zaniklý hrad na vrchu Hradiště (940 m n. m.) na katastrálním území Maňávka (okr. Český Krumlov) patří k nejvýše položeným hradům nejen na vrcholcích Šumavy, ale obecně k nejvýše položeným hradům v Čechách. Vůbec nejvýše položeným hradem na našem území (1293 m. n. m.) je hrad na vrcholku hory Velký Ostrý na Šumavě (Fröhlich 1996). Objekty ve vrcholových partiích pohraničních hor, či objekty vystavěné ke kontrole dálkových komunikací, jsou souhrnně označovány jako tzv. horské hrádky (Durdík 2004).

U těchto objektů, vybudovaných nejen na vrcholcích Šumavy, ale také např. v Krušných horách, můžeme sledovat řadu společných znaků. Kromě velmi extrémní polohy mimo přímé vazby na soudobé sídelní struktury, měla většina obytných staveb těchto hradů podobu jednoduché obytné věže. Kamenným opevněním byly většinou tyto hrady, tedy pokud zde kamenná fortifikace vůbec vznikla, zajištěny jen na nejsnáze přístupných stranách. Příkopy pak byly zajištěny zpravidla jen přístupové stany, přičemž v některých případech došlo k pouze k úpravě přirozených skalních rozsedlin. Příkladem tohoto velmi úsporného řešení je hrad na vrcholu hory Velký Ostrý, nebo hrad Kunžvart (Durdík - Sušický 2002). Mezi naopak nejlépe opevněné lokality patří hrad Hausberg (viz dále). Královské horské hrádky vybudované na vrcholcích Šumavy, zejména pak v její západní části, můžeme dávat do souvislosti s potřebou zajištění nové zemské hranice Přemyslem Otakarem II., nebo Václavem II. po ukončení sporů o dědictví hrabat z Bogenu s Ottou II. Bavorským (např. Žemlička 2005). Po stabilizaci situace většina těchto objektů (např. s výjimkou hradu Kunžvart) v průběhu 1. poloviny 14. století zaniká.

Písemné prameny, podobně jako v případě dalších objektů tohoto charakteru, o existenci hradu na vrcholu Hradiště mlčí. Archeologický materiál v podobě poměrně rozsáhlé kolekce keramiky získané povrchovými sběry ve svazích pod hradem umožňuje rámcové datování doby života hradu do čtvrté čtvrtiny 13. století až 1. poloviny následujícího věku. Nálezový soubor je tvořen tvrdě pálenou oxidační keramikou. Všechny nalezené zlomky keramiky náleží hrncovitým nádobám utvářených obtáčením. Všechny fragmenty den nesou stupy podsýpky. Profilace okrajů pak mají bez výjimky podobu spíše nižších pravých a nepravých okružích. Mezi výzdobnými prvky se na výdutích nádob

vyskytuje rytá a vývalková šroubovice, v menší míře pak jednoduchá rytá vlnice či kombinace vodorovných rytých linií přerušovaných jednoduchou vlnicí.

Hradu Hausberg byla v historických a možných stavebně-historických souvislostech věnována pouze okrajová pozornost (Durdík 1999; Kubů 2003; Durdík 2004,; Durdík 2011). Z hlediska poznání lokality a její interpretace je tak stěžejní práce A. Pojarové (2016), která přináší výsledky prvního komplexního povrchového průzkum, které umožňují rekonstrukci stavební podoby zaniklého hradu. Jako staveniště hradu Hausberg byly zvoleny vrcholové partie dominantního šumavského vrcholu Hradiště, které protíná s mírnými odchylkami od severovýchodu k jihozápadu mohutné skalní žebro (obr. 1). Vrchol Hradiště, který se po dokončení hradu stal hradním nádvořím, je rozčleněn do dvou výškových stupňů o rozměrech 30 x 10 a 10 x 15m. Oba stupně přiléhají k jižní hraně skalního žebra. Severní, východní a západní strana hradního areálu byla dobře chráněna vystupujícími skalisky a prudkými svahy. Pouze jižní svah pod hradem bylo nutné, s ohledem na mírnější sklon terénu, zajistit mohutnějším opevněním. Na severovýchodní a jihozápadní straně bylo skalní žebro procházející staveništěm hradu přeřato dvojicí příkopů. Případnému příchozímu tak bylo zamezeno v přístupu bezprostředně před obvodovou fortifikací, která byla, vyjma jižního svahu, tvořena jednoduchou obvodovou hradbou. V místech, kde skalní podklad přecházel ve skalní stěny, mohl být obvod hradu vymezen také lehčí formou opevnění.

Přístupová cesta do hradu, jejíž šířka nepřesahovala 5 m, byla vedena od jihozápadu po úzké koruně skalního žebra. Nevelká šíře přístupové komunikace v kombinaci s poměrně příkrým svahem znemožňovala rozvinutí přicházejících osob do širší formace. Ve vzdálenosti 16 m před čelem hradu byl v trase této cesty vylámán poměrně úzký a relativně mělký příkop (obr. 5 a 6). Jeho vyústění nebyla nejspíš nijak zajištěna. Čelo hradu je dnes vymezeno výrazným valovitým terénním reliktem, který navazuje na severovýchodní průběh skalního žebra. S ohledem na kumulaci balvanité destrukce v západním svahu pod hradem podél přístupové cesty můžeme předpokládat existenci kamenné hradby v čele hradu, která byla prolomena branou neznámé podoby. S ohledem na absenci malty v polích destrukce nelze vyloučit, že hradba byla vystavěna z nasucho kladeného kamene. Za čelní fortifikací se nachází poměrně pravidelná vnitřní plocha hradu zakončená na jižní straně hranou, přecházející ve skalní stěnu a prudký svah. Tato plocha představovala někdejší hradní nádvoří, na kterém byl vystavěn nejen hlavní obytný objekt hradu, ale nejspíše také nějaká lehčí zástavba provozního charakteru. S ohledem na

dimenze hradního staveniště i jeho charakter můžeme předpokládat, že hlavním objektem hradu byla obytná věž. Z pošumavských hradů zůstala obytná věž nejlépe dochovaná na hradě Kunžvart (Durdík - Sušický 2002; Durdík - Kubů - Zavřel 2002).

Obytná věž hradu Hausberg mohla v úrovni přízemí dosahovat, s ohledem na dimenze hradního staveniště, maximálně 15 x 15 m. V tomto případě by se obytná věž, pokud by tedy bylo plně využito limitů staveniště, řadila k největším stavbám tohoto charakteru v Čechách. Rozměry předpokládané obytné věže, přiložené ke skalnímu žeburu, však byly s největší pravděpodobností výrazně skromnější. Pozůstatkem tohoto objektu je dnes mohutné pole kamenné destrukce ve východním svahu pod hradem, která je tvořena kameny o rozměrech 20-50 cm, místy se stopami malty.

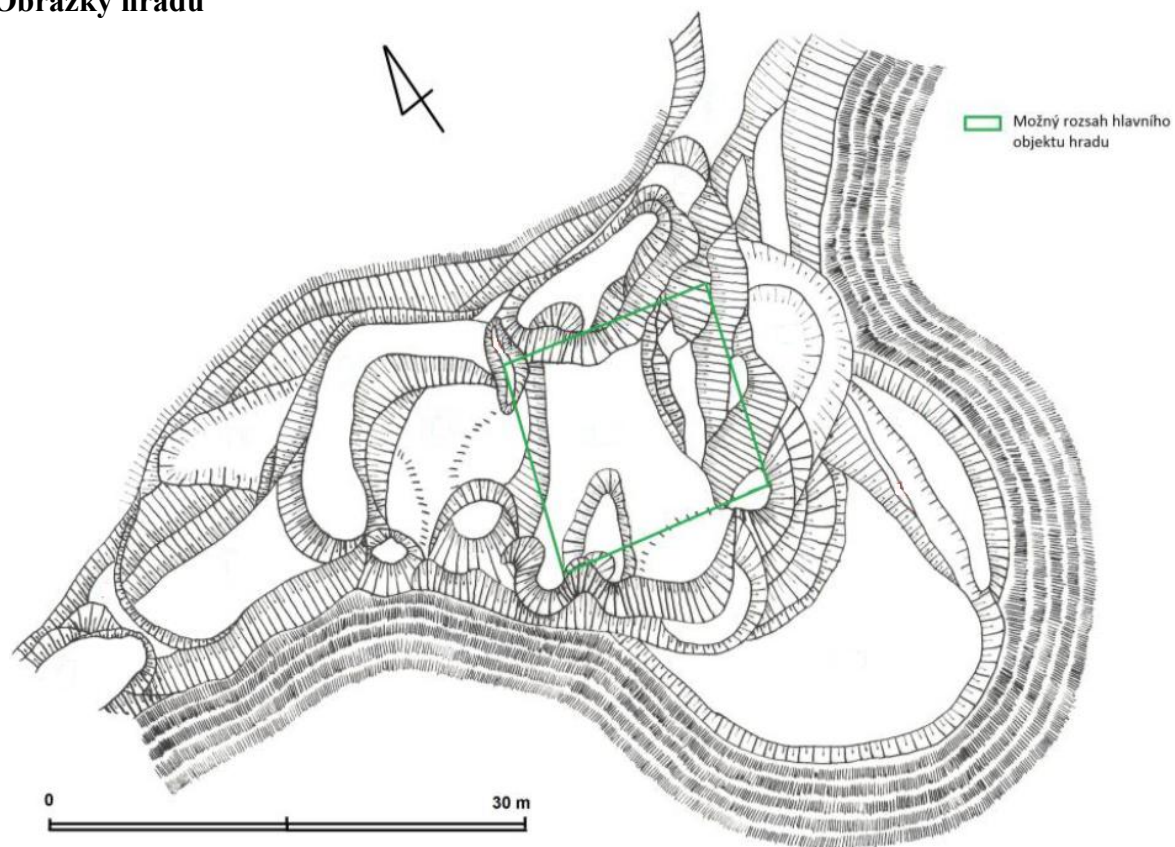
Na východní, resp. severovýchodní straně přechází hradní staveniště v kolmou stěnu. Výškový rozdíl zde dále umocnil druhý příkop, který oddělil hradní staveniště od severovýchodního průběhu skalního žebra. Vzniklo tak zde převýšení o 6-8m, které je dnes částečně zkresleno zřícením části skalní stěny. Východní hrana hradního staveniště je tvořena stupňovitě odlámaným povrchem skály přecházejícím v příkrý svah.

Z hlediska obrany se jako nejproblematictější jeví pozvolnější jihovýchodní partie hradního staveniště. Zde je v terénu patrná výrazná nápadně rovná plošina ve tvaru půlměsíce, která se nachází 6-8m pod úrovní hradního nádvoří. Její severní okraj je remodelován v důsledku kumulace kamenné destrukce pocházející za zaniklé centrální stavby hradu, patrně obytné věže. Vnější hrana této plošiny má charakter 2-3 m vysokého terénního stupně, na který navazuje pozvolný jihovýchodní svah. Tato plošina mohla mít v době života hradu z obranného hlediska nemalý význam, neboť nejspíše svou funkcí suplovala parkán.

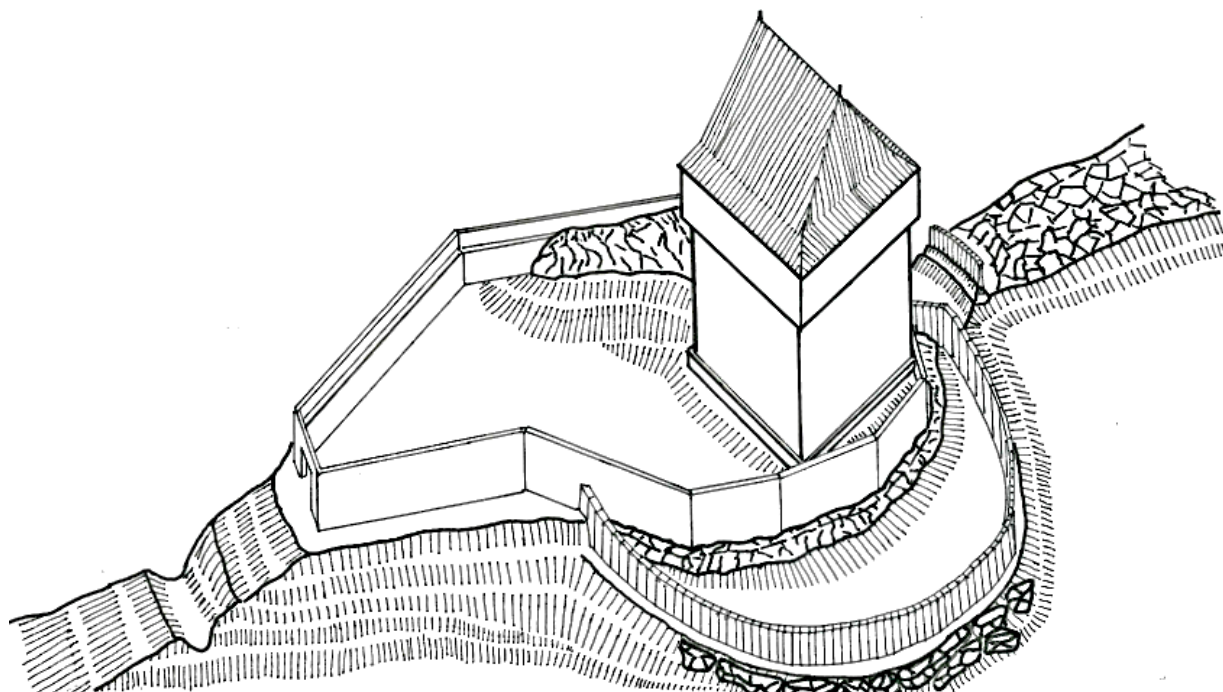
Shrneme-li dosavadní poznatky o hradu vybudovaném za účelem kontroly horního toku Vltavy a zemské hranice je zřejmé, že jeho obranným kvalitám, byť spíše pasivním, byla věnována značná pozornost. Na nejpřístupnějších stranách byl hrad chráněn dvěma příkopy, valovým tělesem a plošinou mající nejspíše funkci parkánu. Hradu dominovala, s ohledem na množství destrukce ve svazích pod hradem, spíše z valné části kamenná, vápennou maltou pojená věžovitá stavba (obr. 6). Nevelké nádvoří bylo minimálně zčásti vymezeno kamennou hradbou založenou na povrchu skalního žebra tvořícího severní stranu hradního areálu. S ohledem na dimenze nádvoří by pak bylo možné tomto prostoru předpokládat také vznik další lehčí zástavby provozního charakteru. Přestože se v destrukci

na západní i jižní straně hradu nahodile nachází přepálené kameny, nelze předpokládat, že by hrad zanikl katastrofálním požárem. K přepálení některých kamenů mohlo dojít v zejména v souvislosti s jejich zakomponování např. do otopných zařízení. Druhotné přepálení těchto kamenů v době nedávné, zejména v souvislosti s aktivitami trampů, pak můžeme s ohledem na místa jejich výskytu spíše vyloučit.

Obrázky hradu



Obr. 5: Hausberk. Půdorys hradu podle A. Pojarové (2016, 72).



Obr. 6: Hausberk. Hmotová rekonstrukce hradu v pohledu od jihozápadu. Kresba J. Hlože

8. Výsledky

Tab1. Výsledky detekce historických proteinů na keramice z hradu a podhradí lokality Hausberg

	Drůbež <i>Gallus gallus, Anas platyrhynchos, Anser anser, Meleagris gallopavo</i>		Prase domácí/divoké <i>Sus scrofa</i>		Obilí <i>Hordeum vulgare, Triticum boeoticum, T. monococcum, T. durum, T. spelta, T. aestivum</i>	Kasein mléko	Relevantní data z hmotnostní spektrometrie
	nevařeno	vařeno	nevařeno	vařeno			
Hrad							
H5a	+	++			0		
H4a	0	++			0		
H3a	++	++			0		
H4	0	++	++	++	0	+0	
H5	+	++	++	++	0	0	
H6	0	++	++	++	0	0	
H7	+	++	++	++	0	+	
H8	++	++	++	++	0	0	Lidské keratiny – zřejmě kontaminace
H9	+	++	++	++	++	0	
H10	0	++	0		+	+	
H11	+	++	0		0	0	
H12	0	++	0		0	+0	
H13	++	++	+		0	+0	
H14	++	++	++	++	0	+	Lidské keratiny – zřejmě kontaminace
H15	++	++	++	++	0	0	

podhradí							
159-57	0	++	0	++	0	0	
97-57	0	++	0	+	0	+0	
158-54	++	++	++	++	0	0	Kolageny: <i>Bos primigenius</i> , <i>Canis lupus</i> , <i>Mus musculus</i>
159-57	+	++	++	++	0+	0	Kolagen a krevní séum: <i>Homo sapiens</i> Savčí hemoglobin
162-57	0	++	++	++	0+	0	
162-57b	0	++	+	+	0		
162-57	0	++	0	+	0+	0	
169-57	+	++	0	+	0	+	
159-57b	0	+	0	0	0	0	
162-57	+	+	0	0	0	0	
Kontrola k drůbežím proteinům – čerstvý trus od kura domácího (<i>Gallus gallus</i>)							
	0+	++					
	0+	0+ (65°C)					

0	Negativní výsledek
++	Positivní výsledek
+	Slabě pozitivní
0+	Velmi slabý signál (není vyloučena pouze nespecifická reakce)
Nevařeno	Reagují vařené proteiny- projevují se historicky vařené
Vařeno	Projeví se hnůj (trus), při vaření proteinů se tepelně denaturují proteiny z mukózní sliznice ze střev

U vzorku H5a se podařilo zaznamenat drůbeží proteiny z tepelně upraveného masa společně s trusem drůbeže trusem, v tomto vzorku se netestovaly proteiny prasat a mléčný kasein, obilniny se nalézt nepodařilo. Vzorek H4a neobsahoval vůbec vařené drůbeží proteiny, ale pouze drůbeží trus, stejně tak byl negativní na obilniny. Ve vzorku H3a bylo tak silné zastoupení vařených drůbežích proteinů, že nelze určit, zda tam byl také drůbeží trus, ale vzhledem k ostatním vzorkům z této lokality je to pravděpodobné, obilniny byly negativní. V případě vzorku H4 lze vidět, že drůbeží proteiny jsou jen ve formě hnoje, tedy kontaminace, nicméně je zde vysoký podíl vařených prasat, tedy asi vepřového masa, podobně jako případě silného signálu u drůbežího masa nelze v tomto případě určit přítomnost proteinů z mukózních sliznic zvířat, tedy z trusu, obilí je opět negativní, ale je zde velmi slabá přítomnost mléka. Vzorek H5 vykazuje stejně vysoký signál vařeného masa a nezjistitelný podíl kontaminací, naproti tomu drůbeží proteiny jsou přítomné jak ve formě masa tak ve formě trusu, mléko a obilniny nebyly zachyceny. U H6 je stejná situace jako u H4, drůbež jen ve formě hnoje a silný signál, který označuje tepelně denaturované proteiny prasat, obilí a kasein nepřítomen. U H7 jsou přítomny tepelně denaturované drůbeží proteiny a také drůbeží trus, silně jsou zastoupeny vařené proteiny prasat, obilí chybí, ale je přítomno mléko. H8 neobsahoval mléko a obilí, ale silně drůbeží a prasečí proteiny. Protože vzorek obsahoval řadu proteinů byl podroben analýze na hmotnostní spektrometrii. Bohužel byly nalezeny jen lidské keratiny, zřejmě z kůže a nelze určit, zda patřily současným archeologům, nebo původním obyvatelům ze středověku. Původní data jsou uvedena v Tab 2. H9 vykazoval drůbeží proteiny i kontaminace z drůbežího trusu, naopak velmi silný byl signál proteinů tepelně upravených prasat, zde sice nebylo přítomno mléko, ale ojedinele vidíme na této lokalitě silný signál přítomnosti obilí. H10 je poněkud odlišný, vařené drůbeží proteiny se nevyskytují vůbec, tepelně upravené vepřové maso nebylo nalezeno žádné, hnůj prasat testován nebyl, ale je zde signál pro obilí a mléko. H11 má negativní vařené vepřové maso, obilí i mléko, ale pozitivní je pro drůbeží proteiny a pro drůbeží hnůj. U H12 se podařilo velmi slabě identifikovat mléko a pak jen drůbeží trus. H13 vykazoval silnou reakci pro drůbeží tepelně upravené maso, signál pro vařené proteiny prasat, hnůj prasat nebyl testován, obilí bylo negativní a velmi slabě bylo detekováno mléko. U H14 nebylo nalezeno obilí, ale vařené proteiny drůbeže a prasat byly velmi silné, natolik, že nelze určit výskyt drůbežího a prasečího trusu z pozdějších kontaminací, navíc bylo detekováno i mléko. Podobně u vzorku H14 bylo pro průkazné množství proteinů po imunotestech provedena analýza pomocí hmotnostního spektrometru (Tab. 3). Opět se objevil lidský keratin. Nicméně se prokázal i keratin ze psa, a aktin skotu.

U H15 je situace podobná jako u H14, mléko sice chybí, ale existují silné signály pro drůbeží a vepřové vařené proteiny.

V podhradí vzorek z keramiky 159-57 vykazoval kontaminaci z drůbežího a prasečího trusu, ale žádné testované proteiny potravin, mléko i obilí bylo negativní. Podobně vzorek 97-57 vykazuje kontaminace z trusu, ale je zde slabý signál přítomnosti mléka. 158-54 liší, vykazuje silný signál pro vařené drůbeží i vepřové maso, tedy vařené proteiny, ale nebyly detekovány obilniny, ani mléko. U tohoto vzorku byla provedena hmotnostně spektrometrická analýza s výsledky, které lze pravděpodobně označit jako zbytky pro potravinách. Kromě obvyklého lidského keratinu je zde hovězí kolagen, ale také kolagen ze psa (*Canis lupus*) a myši (*Mus musculus*) (Tab. 3). Vzorek 159-57 vykazuje drůbeží vařené proteiny, ale i kontaminace drůbežího trusu, také je zde silný signál pro proteiny prasat, natolik silný, že nelze určit možnou přítomnost prasečího trusu, ale vidíme zde i velmi slabý signál pro obilí. Také vzorek 159-57 byl podroben spektrálně hmotnostní analýze. Pokud zanedbáme lidský keratin je třeba se zastavit u lidského kolagenu a lidského krevního albuminu doplněného savčím hemoglobinem, Tato nádoba s velkou pravděpodobností obsahovala lidskou krev (Tab. 4). Vzorek 162-57 obsahuje pouze drůbeží trus nikoliv drůbeží tepelně upravené bílkoviny, nicméně je zde silná přítomnost proteinů prasat, proto jsou nedetekovatelné proteiny z trusu, i zde je velmi slabá přítomnost obilí a nebylo detekováno mléko. U vzorku 162-57b nebyly nalezeny drůbeží proteiny, jen drůbeží trus, tepelně denaturované proteiny prasat byly nalezeny, ale kontaminace z prasečího trusu se nenalezly, obilí se zde nevyskytovalo a mléko nebylo testováno. Vzorek 162-57 vykazoval pouze kontaminace z kuřecího a prasečího trusu, žádné mléko, ale velmi slabý signál pro obilniny. Vzorek 169-57 obsahoval signál pro vařené drůbeží maso, podařilo se detekovat i drůbeží trus, žádné vařené proteiny prasat, ale kontaminace z prasečího trusu, žádné obilniny, ale bylo detekováno mléko. Ve vzorku 159-57b se podařilo pouze detekovat drůbeží trus, ostatní testy byly negativní. Ve vzorku 162-57 byly drůbeží proteiny, ale ne drůbeží trus, případně jen v omezené koncentraci, proteiny prasat nebyly nalezeny žádné, stejně tak byly negativní testy na obilí a mléko. Pro kontrolu byl testován kuřecí trus (*Gallus gallus*) v čerstvém stavu, po povaření 15 min ve 100°C pro napodobení podmínek v kompostu 24 hod při 65 °C. Vždy se ukázala velmi slabá reakce na hranici detekovatelnosti, přesto, že šlo o silnou koncentraci proteinů, pouze při působení 100°C došlo k denuraci a vzniku silného signálu.

Tab 2. vzorek H8

Accession	Protein	#Peptides
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	37
K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	32
K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	30
K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	29
K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14	25
K1C16_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 16	24
K2C6B_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6B	22
K2C6C_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal	22
K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5	21
K2C5_BOVIN	Keratin, type II cytoskeletal 5	15
K1C14_MOUSE	Keratin, type I cytoskeletal 14	15
DESP_HUMAN	Desmoplakin	14
K1C17_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 17	13
K2C6A_MOUSE	Keratin, type II cytoskeletal 6A	12
K22E_CANFA	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	8
K2C7_BOVIN	Keratin, type II cytoskeletal 7	6
K2C1B_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1b	5
POTEE_HUMAN	POTE ankyrin domain family member E	4
ACTA_LIMPO	Actin, acrosomal process isoform	4
PLAK_BOVIN	Junction plakoglobin	3
K2C80_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 80	2

Tab 3. vzorek H14

Accession	Protein	#Peptides
K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	6
ACTB_BOVIN	Actin, cytoplasmic 1	4
K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5	3
K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	3
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	2
K1C10_CANFA	Keratin, type I cytoskeletal 10	2

Tab 4. vzorek 158-54

Accession	Protein	#Peptides
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	29
CO1A1_BOVIN	Collagen alpha-1(I) chain	27
K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	26
K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	24
K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	18
CO1A2_BOVIN	Collagen alpha-2(I) chain	18
K1C16_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 16	17
K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14	17
K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5	12
K2C6A_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6A	11
K1C14_MOUSE	Keratin, type I cytoskeletal 14	11
K2C6B_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6B	10
CO1A2_CANFA	Collagen alpha-2(I) chain	9
K1C17_MOUSE	Keratin, type I cytoskeletal 17	9

K2C5_BOVIN	Keratin, type II cytoskeletal 5	7
K2C5_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 5	6
K1C15_SHEEP	Keratin, type I cytoskeletal 15	6
DESP_HUMAN	Desmoplakin	6
POTEE_HUMAN	POTE ankyrin domain family member E	4
K1H1_HUMAN	Keratin, type I cuticular Ha1	4
CO1A2_MOUSE	Collagen alpha-2(I) chain	3
H3C_BOVIN	Histone H3.3C	2
ALDH2_HORSE	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	2
K2C80_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 80	2
KRT85_MOUSE	Keratin, type II cuticular Hb5	2
TRYP_PIG	Trypsin	2
CO2A1_MOUSE	Collagen alpha-1(II) chain	2
COKA1_MOUSE	Collagen alpha-1(XX) chain	1

Tab 5. vzorek 159-57

Accession	Protein	#Peptides
K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	9
K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	7
CO1A2_HUMAN	Collagen alpha-2(I) chain	7
K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	7
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	4
ALBU_HUMAN	Serum albumin	3
K2C6A_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6A	3

K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14	3
K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5	3
TRYP_PIG	Trypsin	2
HBA_AILFU	Hemoglobin subunit alpha	2
CYTA_HUMAN	Cystatin-A	2

9. Diskuse

Studie se pokouší doplnit znalosti o poměrech ve středověku, konkrétně o stravě na strážním horském hrádku a u obyvatel v podhradí. Nejedná se tedy o fungující velké šlechtické sídlo s poměrně rozsáhlou lidskou komunitou, ženami a dětmi, ale o omezenou vojenskou jednotku v pohraniční oblasti. Nedalo se očekávat výrazně lepší zastoupení hodnotnějších potravin, zejména masa, než mělo místní obyvatelstvo v okolí. Přestože vzorků není určeno mnoho je možno připustit určité závěry a interpretace. Zejména ohledně masa.

Vepřové maso bylo nalezeno u 8 z 12 testovaných vzorků z keramiky z hrádku. Bohužel z finančních důvodů nebyly testy na vepřové maso provedeny u všech dostupných vzorků. Zatímco v podhradí bylo vepřové maso jen u 4 z 10 vzorků. Zřejmě si mohli vojáci dovolit konzumaci masa přece jen častěji, než místní obyvatelé v podhradí. Metodika umožňuje odlišit proteiny prasat (*Sus scrofa*) od prasečího trusu. Na keramice z podhradí byl trus prasat ve 4 vzorcích z 10, zatímco na hrádku se na keramice trus nepodařilo prokázat vůbec. Ovšem zde nebylo testování z finančních důvodů provedeno dostatečně. Nicméně je pravděpodobné, že živá prasata se na území hrádku nevyskytovala.

V případě drůbežího masa byly testovány všechny dostupné vzorky na přítomnost drůbežích proteinů i na výskyt drůbežího trusu. Jak bylo uvedeno výše, tyto testy nerozlišují o který druh drůbeže jde, ale lze se domnívat, že v tomto případě převažoval kur domácí (*Gallus gallus*). Drůbeží maso bylo identifikováno poměrně běžně a podle očekávání častěji v hrádku, kde bylo v 10 z 15 testovaných vzorků, zatímco v podhradí to bylo ve 4 z 10 vzorků. Rozdíl je větší než v případě vepřového masa.

Zajímavý je výskyt drůbežího trusu, který je na keramice všudypřítomný, v podhradí i na hrádku. Lze se tedy domnívat, že kura domácího chovali vojáci pro vlastní potřebu, stejně jako obyvatelé podhradí. Trus byl široce rozšířen v půdě a tak se později dostal i do keramiky stěpů. Značné rozšíření kura bylo zřejmě kvůli vejším, kterými si obyvatelé i vojáci doplňovali stravu.

Také byl testován kasein, který je přítomen ve veškerém mléku savců. Obvykle se v potravinách jedná o mléko kravské, nebo kozí, v některých lokalitách můžeme uvažovat ovčí. Běžné používání mléka jiných savců včetně lidského, je méně pravděpodobné. Mléčný kasein byl zastoupen více v keramice na hrádku u 5 z 12 testovaných vzorků,

zatímco v podhradí to bylo pouze u 2 z 9 vzorků. Představa, že by na menším hrádku měli více dobytka, než v podhradí je poněkud absurdní. Je také poněkud zvláštní předpoklad, že by vojáci na hradě konzumovali více mléka, než lidé v podhradí. K takovému výsledku mohlo dojít náhodně, analyzovaných vzorků je poměrně malý počet, případně není vyloučeno, že v podhradí používali na mléčné produkty spíše dřevěné, než keramické nádoby. Tato otázka zůstává dosti nejasná. Víme, že ve středověku lidé konzumovali mléčné produkty poměrně často a to i v městské zástavbě, kde se byly v keramice nalezeny stopy kozího mléka (Pavelka a Vařeka 2008, Pavelka et al. 2016).

Dalším problémem získaných výsledků je obilní protein gliadin, který je součástí lepku. Podle současných představ v jídelníčku středověku značně dominovaly obilné kaše, proto bylo značně překvapivé malé zastoupení gliadinu a tedy obilnin v keramice. I v případech kde se podařilo obilniny detekovat, šlo většinou o velmi slabé signály na hranici významu s nebezpečím falešné detekce. Silně byly proteiny zastoupeny jen v jednom vzorku z hrádku a slaběji v druhém. V podhradí jsou tři případy, ale velmi slabé.

Je třeba se zastavit a uvažovat proč tomu tak je. Je možné, že by v této lokalitě konzumovali lidé obilných kaší méně? Je to výše položená oblast v současnosti poměrně zalesněná, ve středověku zřejmě také, nicméně lze předpokládat, že obyvatelé okolních vsí řadu polí s nějakou základní výživnou plodinou měli. Nabízí se jako první proso (*Panicum miliaceum*) (jáhly) dříve hodně konzumovaná potravina od neolitu až do raného novověku.

Proso použitý test na obilniny není schopen detekovat, protože je zaměřený na identifikaci gliadinu v lepku, který proso neobsahuje. Avšak proso je teplomilné a má raději suché půdy, což v oblasti kolem hrádku Hausberg neplatí. Kromě vyšší polohy na Šumavě se jedná o půdu blízkou řece Vltavě, kde je podle současného stavu spíše vlhko, a je pravděpodobné, že tak tomu bylo i v minulosti. Rýži a kukuřici lze v této době na dané lokalitě vyloučit, ale existuje plodina, která by mohla být pro kaše vhodná. Je to oves setý (*Avena sativa*). Oves použitý test nezachytí, je primárně určen na lepek z obilnin jako je pšenice a ječmen. Navíc oves lze pěstovat v chladnějším a vlhčím prostředí, což zkoumaná lokalita splňuje. Ale ani tento závěr není jednoznačný, hmotnostní spektrometrie nezachytila ve vzorcích žádné rostlinné relevantní proteiny. Ovšem pomocí hmotnostní spektrometrie nebyla testovány všechny dostupné vzorky a navíc je možné, že pokud v keramice byly ovesné proteiny v nedostatečném množství nemusely být identifikovány. Ačkoliv je v současné době hmotnostní spektrometrie uznávanější metoda než detekce

pomocí protilátek, především kvůli špatně prováděným testům s protilátkami v minulosti, zdá se pravděpodobné, že protilátky jsou přece jen citlivější na velmi omezená množství proteinů v keramice (Pavelka et al. 2016, 2020).

Údaje z hmotnostní spektrometrie v této práci nepotvrdily výsledky z analýzy pomocí protilátek jako v jiných případech, kdy byly výsledky z analogických měření do značné míry kompatibilní (Pavelka et al. 2016). Ve vzorcích H8 a H14 z hrádku nebyly nalezeny žádné relevantní proteiny (Tab. 2 a 3). Přestože právě tyto vzorky vykazovaly při analýzách pomocí protilátek velké množství proteinů drůbeže i z prasat. Byly nalezeny pouze lidské keratiny, tedy proteiny z lidské kůže a není jasné, pochází od historických obyvatel, nebo současných archeologů, případně od obojích. V podhradí byla situace o něco lepší. Byly nalezeny proteiny skotu (*Bos primigenius*), psa (*Canis lupus*), myši (*Mus musculus*) a vzorek obsahuje opět keratiny (Tab. 4). Proteiny skotu nebyly testovány pomocí protilátek, přestože odpovídající fungující kit od firmy Neogen je na trhu. Důvod vysvětlím níže. Odkud se tyto proteiny na keramice vzaly? Je pochybné, že si obyvatelé podhradí běžně vařili psy a ještě méně, že myši. Domnívám se, že zdroj těchto proteinů je z půdy, ve které byly keramické zlomky uloženy. V půdě byly proteiny z trusu těchto zvířat, ostatně byl detekován trus prasat i drůbeže. Hmotnostní spektrometrie nedokáže určit, zda se jedná o proteiny z mukózní sliznice střev, nebo ze svaloviny. Protilátky, protože jsou vytvořené na tepelně denaturované proteiny toho schopny jsou, ale protilátky pro tepelně denaturované proteiny skotu, psa a myši testovány nebyly. Jiný případ představuje vzorek 159-57 (Tab. 5), kde byl nalezen hemoglobin a lidský krevní albumin a kolagen. Jsou to tedy stopy krve. Není jasné, zda nádoba obsahovala krev, nebo ji jen někdo držel v zakrvácené ruce. Vzorky byly sice odebírány z keramických zlomků, ale z původního dna nádob, proto se zdá pravděpodobnější, že nádoba skutečně obsahovala krev. O jakou krev šlo a proč byla v nádobě, není jasné. Můžeme jen spekulovat o zranění, či pouštění žilou.

Kromě informací o některých potravinách a krvi a na keramice práce přináší inovaci ohledně rozlišení proteinů drůbežího masa a trusu. Metodika vychází z bakalářské práce Slané (2018) nebo dalších studií (Pavelka et al. 2020). Bylo určeno, že původní historické tepelně upravené proteiny pro prasata (*Sus scrofa*) reagují pozitivně na protilátky od firmy Neogen (kit BioKits for Speciation Identification). Bez tepelné úpravy nereagují proteiny z mukózních sliznic střev, které jsou v trusu. Firma doporučuje vzorky vždy povařit v 100°C po doby 15 minut. V tomto bodě, ale je nutno se od zadaného

protokolu odchýlit. Historické proteiny již jsou tepelně upravené a protilátky s nimi reagují. Jakmile jsou vzorky vyhodnoceny, teprve pak je nutno je povařit a opět otestovat protilátkami v titračních jamkách. Teprve nyní se projeví proteiny z mukózních sliz, obsažené v trusu zvířat, protože se tepelně denaturují. Pokud obě měření porovnáme, prokáže se často, které vzorky jsou kontaminované trusem (Slaná 2018, Pavelka et al. 2020).

Analogická metoda byla použita s drůbežími proteiny. Jako kontrola byl přímo použit kuřecí trus (*Gallus gallus*) (Tab.1). Výsledky byly obdobné jako u proteinů prasat. Metodika tedy může být použita na středověkou keramiku. Případně na hlínu, kde jsme takto schopni zjistit přítomnost trusu. Nárůst signálu při ELISA analýze prozrazuje že jsou přítomny proteiny z trusu, obvykle jde o nežádoucí kontaminaci. To je dost zásadní poznatek, protože hmotnostní spektrometrie nedokáže určit původ proteinů a tak může podávat falešné výsledky, pokud bude vyhodnocovat proteiny z trusu jako zbytky po vaření. To je zásadní problém, proteiny z trusu jsou v krajině vysoce zastoupeny, zřejmě se roznáší i větrem. Mohou být i na skalách blízko polí, nebo s vodou pronikají hluboko do spodních vrstev (Pavelka v přípravě).

Zemědělství v minulosti i v současnosti používá hnůj zvířat k hnojení polí. Na rozdíl od protilátek na detekce proteinů prasat a drůbeže se ukázalo, že protilátky od firmy Neogen nejsou schopny rozlišit tepelně upravené proteiny skotu (*Bos primigenius*) od nativních, takže nejde rozlišit proteiny z vařené svaloviny od nevařených proteinů z trusu zvířat. Protože je hnojení trusem skotu dlouhodobé a časté, jsou tyto proteiny téměř všudypřítomné a jsou tedy pozitivní téměř v jakékoliv archeologické keramice (Pavelka v přípravě). Z tohoto důvodu test pomocí protilátek na proteiny skotu nebyl na zkoumané vzorky použit.

Tato situace ale neplatí vždy, na neolitických vzorcích ze Sýrie toto pozorováno nebylo, zřejmě tam nedocházelo k tak intenzivnímu hnojení hnojem skotu (Klaisnerová 2020). Pomohlo by znát způsob příprav těchto komerčních protilátek, abychom případně vytvořili vlastní protilátky, nebo metodiku analýzy zkusili upravit. Ovšem které klíčové termostabilní proteiny byly určeny pro výrobu protilátek zůstává firemním tajemstvím. Lze se jen domnívat, že by mohlo jít o některé albuminy, která vykazují termostabilní vlastnosti. Souhrnně lze uvést, že protilátky z použitých kitů firmy Neogen, jsou připraveny, tak aby reagovaly na denaturované proteiny, proto jsou schopny reagovat na

historické proteiny poškozené postupnou degradací během času. Ovšem ne všechny komerční protilátky na tepelně upravené proteiny se hodí na detekci z archeologických nálezů, např. protilátky od firmy ELISA – TEK, se ukázaly jako naprosto nevhodné (Pavelka et al. 2016; 2020). Dalším problémem který bylo nutno řešit bylo, zda nemůže docházet k tepelně denaturaci proteinů v kompostu. Je známo, že v kompostu může teplota hnoje vystoupat až na 65 °C (Xu et al. 2009). Proto bylo provedeno testování kuřecího trusu v normálním stavu a pak 24 hodin při 65 °C (Tab. 1). Ale prokázalo se že tato teplota k denaturaci nestačí a protilátky proteiny téměř nedetekovaly.

10. Závěr

Před 50 lety byla objevena metoda ELISA. V dnešní době již nedochází k jejímu zdokonalování, ale i přesto je její místo nezastupitelné v různých mikrobiologických technikách. Mezi její přednosti patří spolehlivost a rychlost, dokáže detekovat antigen či protilátku o velmi nízké koncentraci. Každá metoda má samozřejmě i své nevýhody. Mezi nevýhody lze zahrnout náročnost na vybavení a na čas. Monoklonální protilátky jsou obtížné na přípravu a hlavně finančně obtížně dostupné, zejména pokud jsou vyvíjeny jednorázově na omezený počet měření.

Práce podporuje ideu, že nejspolehlivější pro analýzu potravin z archeologických zbytků je kombinace více metod, a to hmotnostní spektrometrie a metody antigen-protilátka. Kombinace těchto metod podporuje správnost a množství získaných dat. Je obtížné některé vzorky analyzovat, protože proteiny degradují. Degradace proteinů může být způsobena nevhodným skladováním vzorků, případně nevhodným ošetřením keramiky, např. kyselinou chlorovodíkovou (Hejnová 2020).

Práce dokládá konkrétní historické skutečnosti, které se písemným projevem nedochovaly. Přestože vzorků nebyl příliš reprezentativní počet, lze si na základě výsledků udělat nějakou představu o rozdílech v konzumaci potravin mezi vojáky na strážním hrádku Hausberg a v podhradí. Na hrádku vidíme větší podíl v konzumaci masa a překvapivě také mléka. Malé zastoupení obilnin vzbuzuje podezření, že místní obyvatelé na polích dávali větší přednost např. ovsu (*Avena sativa*), než obilí a ječmenu.

Hmotnostní spektrometrie tyto data nepotvrdila, ale prokázala proteiny dalších savců o kterých je však podezření, že se mohly do keramiky dostat sekundárně z hlíny, ve které byl trus zvířat. Hmotnostní spektrometrie neprokázala žádné rostlinné proteiny ve významném množství. Na trhu bohužel nejsou vhodné protilátky na testování ovoce a zeleniny. Co by bylo vhodné ještě otestovat jsou proteiny z vajec na které sice vhodné testy existují (Pavelka et al. 2016), avšak z finančních důvodů nebyly provedeny.

Na základě 100% přítomnosti drůbežního trusu se lze ale domnívat, že na hrádku i v podhradí byla drůbež na vejce chována. Jedním z hlavních výstupů práce je úspěšná aplikace metodiky na detekci drůbežního masa historicky tepelně upraveného a jeho odlišení od drůbežního trusu, který se může sekundárně dostat do keramiky. Také samotná existence drůbežního trusu může být signifikantní důkaz existence drůbeže na lokalitě, i když

je zde riziko recentních kontaminací ze současného zemědělství. Nebyly provedeny testy pomocí hmotnostní spektrometrie na lipidy, které mohou identifikovat rostlinné oleje a živočišné lipidy. Za zajímavý lze považovat nález zbytků lidské krve v jedné z nádob.

Resumé

ELISA was discovered 50 years ago. Its advantages include reliability and speed, it can detect antigen or antibody at a very low concentration. Disadvantages may include equipment and time requirements. Monoclonal antibodies are difficult to prepare and, in particular, difficult to obtain financially, especially when developed in a single dose for a limited number of measurements. The work supports the idea that the most reliable for the analysis of food from archaeological remains is a combination of several methods, namely mass spectrometry and antigen-antibody methods. The combination of these methods supports the accuracy and amount of data obtained. Although the number of samples was not very representative, the results give some idea of the differences in food consumption between soldiers at the Hausberg guard castle and in the castle grounds. At the castle we see a larger share in the consumption of meat and, surprisingly, also milk. The small proportion of cereals suggests that locals in the fields preferred, for example, oats (*Avena sativa*) to cereals and barley. Mass spectrometry did not confirm these data, but showed proteins from other mammals that were suspected to have entered the pottery secondarily from clay containing animal faeces. However, based on the 100% presence of poultry droppings, it can be assumed that poultry was kept on eggs in the castle and in the castle grounds. One of the main outputs of the work is the successful application of the methodology for the detection of historically heat-treated poultry meat and its differentiation from poultry manure, which can be secondary to ceramics. The very existence of poultry manure can also be evidence of the existence of poultry on the site, although there is a risk of recent contamination from current agriculture. Residues of human blood in one of the vessels can be considered an interesting finding.

Použitá literatura:

Avrameas S., Uriel J. (1966): Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. C.R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D. 262: 2543-2545 s.

Barker, A. L. (2010): Archaeological proteomics: method development and analysis of proteinceramic binding. University of North Texas, Denton. 86 s.

Barnard, H., Schoemaker, L., Craig, O. E., Rider, M., Parr, R. E., Sutton, M. Q. a Yohe II, R. M. (2007): Introduction to the analysis of protein residues in archaeological ceramics, Oxford. 216-228 s.

Beranová, M. (2005): Jídlo a pití v pravěku a ve středověku, Praha : Academia, 360 s.

Bollag J. M. (1990): Soil Biochemistry, CRC Press. 584 s.

Bosch A.M.G.; van Hell H.; Brands J.A.M.; van Weemen B.K.; Schuurs A.H.W.M. (1975): Methods for the determination of total estrogens (TE) and human placental lactogen (HPL) in plasma of pregnant women by enzymeimmunoassay. Clin. Chem. 21. 1009-1012 s.

Craig, O. E.; 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. 89-97 s.

Číperová, 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. 193-211 s.

Durdík, T.; Kubů, F.; Zavřel, P. (1998): Hrad na Stožecké skále, Castellologica bohemia 6/II. 257-274 s.

Durdík, T.; Sušický, V. (2002): Zříceniny hradů, tvrzí a zámků. Jižní Čechy. Praha.

Durdík, T. (2004): K problematice pohraničních tzv. horských hrádků, Archaeologia historica 29. 343 – 356 s.

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 s.

- Engvall, E.; Perlmann, P.: (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),. Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 871–884 s.
- Engvall E. (1977): Quantitative enzyme immunoassay (ELISA) in microbiology. *Med. Biol.* 55: 193-200 s.
- Friedecký, D.; Lemr, K. (2012). Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Bichem. Metab.* 152-157 s.
- Fröhlich J. (1996): Hraniční horský hrádek na Ostrém na Šumavě, *Castellologica bohemia* 5. 101–106 s.
- Hejnová, K. (2020): Detekce proteinů ze středověké archeologické keramiky. 10- 31 s. [Bakalářská práce; depon. in: Centrum biologie, geověd a envigogiky, FPE ZČU, Plzeň.].
- Hořejší, V.; Bartůňková, J. (2002): *Základy Imunologie*. Praha: Triton.
- McMurry, J., (2007). *Organická chemie*. V Brně: VUTIUM, Překlady vysokoškolských učebnic. 985-1027 s.
- Michael Karas; Ralf Krüger. (2003): Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chemical Reviews*. 427–440 s.
- Kubů, F. (2003): Středověký hrad Waltershausen, *Šumava* 8, 32-33 s.
- Lequin R. M. (2005): Enzyme immunoassay (EIA) / Enzyme-linked immunosorbnet assay (ELISA). *Clin. Chem.* 51. 2415-2418 s.
- Ngo T.T. (1991): Immunoassay. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2. 102-109 s.
- Pavelka, J.; Orna, J. (2011). Výsledky analýzy potravinových zbytků na pozdně středověké keramice v Plzni. *Acta Fakulty filozofické Západočeské univerzity v Plzni* 3, 85-98 s.
- Pavelka, J.; Vařeka, P. (2008): Příspěvek v poznání stravy ve vrcholném a pozdním středověku: první výsledky analýzy potravinových zbytků na keramice z archeologických výzkumů. 98-109 s.
- Pavelka, J.; Šmejda, L.; Hynek, R.; 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 s.

Pojarová A. (2016): Problematika tzv. horských hrádků na Šumavě. Nepublikovaná bakalářská práce obhájená na Katedře archeologie Západočeské univerzity v Plzni.

Pruvost, M.; Grange, T.; Geigl, E. M. (2005): Minimizing DNA contamination by using UNGcoupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies. *Biotechniques*. 569- 575 s.

Slaná, K. (2018). Identifikace proteinů z keramické matrix archeologických nálezů. 44 s. [Bakalářská práce; depon. in: Centrum biologie, geověd a envigogiky, FPE ZČU, Plzeň.].

Straková P. (2011): Využití metody ELISA pro vyhodnocování efektivity vakcinace u vybraných druhů onemocnění, Brno. 6-14 s.

Xu W.; Reuter T.; Inglis GD.; Larney FJ.; Alexander TW.; Guan J.; Stanford K; Xu Y, McAllister TA. (2009): A biosecure composting system for disposal of cattle carcasses and manure following infectious disease outbreak. *J Environ Qual*. 2009 437-50 s.

Yalow R.S.; Berson S.A. (1960): Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *Clin. Invest*. 1157-1175 s.

Yolken R.H.; Wyatt R.G.; Zissis G.P. (1978): Comparative epidemiology of human rotavirus types 1 and 2 as studied by enzyme-linked immunosorbent assay. *N. Engl. J. Med*. 299: 1161-1165 s.

Tomás L.; Huttová J.; Mistrk I.; Kogan G.(2002): Effect of carboxymethyl chitinglucan on the activity of some hydrolic enzymes in maize plants. 326-329 s.

Van Weemen B.K.; Schuurs A.H.W.M. (1971): Immunoassay using antigen enzyme conjugates. *FEBS Lett*. 15: 232-236 s.

Žemlička, J. (2005): Přemyslovci. Jak žili, vládli, umírali. Praha.

Seznam obrázků

Obr. 1: Odběr vzorku z keramiky bohaté na karbonizované usazeniny (příškvarky).....	19
Obr. 2. Hausberg. Profilace okrajů získaných povrchovým sběrem.....	20
Obr.3. Závěrečná fáze, kdy se projevuje žlutě biotinylovaného značení, které určuje intenzitu reakce.....	20
Obr. 4: Používané matrice MALDI.....	26
Obr. 5: Hausberk. Půdorys hradu podle A. Pojarové (2016, 72).....	32
Obr. 6. Hausberk. Hmotová rekonstrukce hradu v pohledu od jihozápadu.	32