

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

BIOLOGICKÁ ANALÝZA ARCHEOLOGICKÝCH VZORKŮ Z

PŘEDNÍHO VÝCHODU

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Marie-Dorothea Klaisnerová

Přírodovědná studia

Vedoucí práce: Mgr. Jaroslav Pavelka, PhD.

Plzeň 2020

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

V Plzni dne

.....

Marie-Dorothea Klaisnerová

RÁDA BYCH TÍMTO PODĚKOVALA VEDOUCÍMU SVÉ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE MGR. JAROSLAVU
PAVELKOVI, PHD ZA POMOC PŘI ZÍSKÁVÁNÍ ÚDAJŮ PRO VÝZKUMNOU ČÁST PRÁCE,
ODBORNÉ VEDENÍ, ZA RADY, KTERÉ MI JI POMOHLY ZKOMPLETOVAT A ZA VEŠKERÝ ČAS,
KTERÝ MI PŘI JEJÍ TVORBĚ VĚNOVAL.

TAKÉ BYCH RÁDA PODĚKOVALA SVÉ RODINĚ ZA JEJICH TRPĚLIVOST A PODPORU V DOBĚ
MÉHO STUDIA.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Cíl práce	1
2. Proteiny	3
2.1 Analyzované proteiny	3
2.2 Proteiny v archeologii	4
2.3 Degradace proteinů	4
3. Testovací metody	6
3.1 Princip sandwichového ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) testu	6
3.2 Princip hmotnostní spektrometrie	7
4. Archeologický kontext	9
4.1 Lokalita Tell Arbid Abyad v Sýrii	9
4.2 Lokality Tel Burna a Tell es-Safi v Izraeli	9
5. Příprava materiálu	10
5.1 Vzorky ze Sýrie	10
5.2 Vzorky z Izraele	11
6. Postup při zjišťování přítomnosti proteinů	13
6.1 ELISA kit pro vařené vepřové maso	13
6.2 ELISA kit pro vařené hovězí maso	14
6.3 ELISA kit pro vařené skopové maso	15
6.4 ELISA kit pro obilnou bílkovinu gliadin	17
6.5 ELISA kit pro mléčnou bílkovinu kasein	18
6.6 ELISA kit pro mléčnou bílkovinu β -laktoglobulin v kravském mléce	19
6.7 Hmotnostní spektrometrie	20
7. Výsledky	21
7.1 Výsledky pro vzorky ze Sýrie	21
7.2 Výsledky pro vzorky z Izraele	25
8. Diskuze	27
8.1 Uchování proteinů v keramice	27
8.2 Obilný protein gliadin	27
8.3 Mléčné proteiny	28
8.4 Proteiny vepřového masa	29
8.5 Proteiny skopového masa	30
8.6 Proteiny hovězího masa	31

8.7	Proteiny zjištěné pomocí hmotnostní spektrometrie	32
9.	Závěr	33
10.	Resumé	34
11.	Seznam použité literatury	35
11.1	Seznam obrázků a tabulek	37

1. Úvod

V současné době se archeologové zajímají o zkoumání přítomnosti residuí potravinových zbytků v archeologické keramice a nádobách z dalších materiálů (bronz atd.). Víme, že zvláště v keramických nádobách mohou být díky jejich porézní struktuře zachovány proteiny a lipidy velmi vysokého stáří (Colombini et al. 2005, Copley et al. 2005, Barker 2010, Correa-Ascencio a Evershed 2014). Tyto výzkumy mají objasnit jaké zdroje potravy byly v daných obdobích využívány a zda byly ovlivněny náboženstvím, či jinými sociálními nebo geologickými podmínkami.

1.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je detekce potravinových zbytků v archeologické keramice z povrchových nalezišť v Sýrii datovaných do neolitu a zbytků základů obydlí budovaných ze dřeva a mazanice z vykopávek v Izraeli datovaných do doby železné. Budeme se zabývat ověřením chovu či dokonce konzumace prasete domácího (*Sus scrofa f. domestica*) na území s islámskou a hebrejskou historií. Dále budeme porovnávat naše údaje s nálezy z Evropy, zaměříme se především na přítomnost vepřových proteinů přítomných v půdě jako důsledek hnojení. Také se zaměříme na účinnost kitu k detekci vařených proteinů ze skopového masa zachovaných v archeologické keramice.

Vzorky ze Sýrie budeme testovat na přítomnost residuí několika druhů potravin, a to obilí (detekce proteinu gliadinu), mléka kozího (detekce kaseinu) a kravského (detekce β -laktoglobulinu). Dále budeme zjišťovat přítomnost residuí různých druhů masa, respektive masa vepřového, skopového a hovězího. Detekci jednotlivých látek budeme provádět pomocí imunologické analytické metody za pomoci sandwichových ELISA testů. V případě masa skopového budeme také ověřovat funkčnost kitu specifického na vařené skopové maso. Zaměříme se na residuální zbytky jeho proteinů v archeologické keramice a půdě z nalezišť, v závislosti ověření jeho funkčnosti v případě detekce přítomnosti v těchto proteinů v příškvarcích (zuhelnatělé kousky pečeného skopového masa) odebraných z archeologických nádob (Pavelka et al. 2016).

U vzorků mazanic z nezávislých lokalit Tel Burna a Tell es-Safi v Izraeli, datovaných podle izraelského archeologického kontextu do doby železné, budeme testovat přítomnost obilnin (detekce gliadinu) a přítomnost proteinů živočišného původu, a to zejména trusu prasete domácího (*Sus scrofa f. domestica*). V tomto případě budeme porovnávat důkazy chovu těchto zvířat na území s hebrejskou historií s výsledky z Evropy, tedy s územím s

odlišnou historií. Detekci jednotlivých látek budeme provádět pomocí analytické imunologické metody za použití Sandwichových ELISA testů. Dále budeme zjišťovat přítomnost dalších organických zbytků živočišného použitím hmotnostní spektrometrie.

2. Proteiny

Proteiny jsou biomakromolekuly složené z malých aminokyselinových jednotek, které jsou navzájem propojeny pomocí peptidických vazeb. Peptidická vazba je vazba mezi aminovou a karboxylovou skupinou dvou aminokyselin. Díky těmto vazbám dokážou aminokyseliny tvořit dlouhé peptidové řetězce a patří tedy mezi významné stavební jednotky. Jako peptidy (bílkoviny) jsou označovány řetězce, které obsahují více než padesát aminokyselinových jednotek. Proteiny jsou rozpustné v polárních rozpouštědlech, jako jsou například voda či ethanol. Tvoří také většinu enzymů, což jsou v podstatě vysokomolekulární bílkoviny působící jako katalyzátory biochemických reakcí. Těchto reakcí se využívá v při jednom z kroků imunologické analýzy za použití komerčního kitu ELISA sandwichového typu (McMurry 2007).

2.1 Analyzované proteiny

Kasein je hlavní mléčná bílkovina, nacházející se v každém savčím mléku, kde tvoří přibližně 80 % všech bílkovin. Jedná se o složený protein – do jeho struktury je kromě aminokyselin zabudována ještě kyselina fosforečná, která je pomocí esterové vazby vázána na serin – jedná se tedy o fosfoprotein. Navíc se jak na peptidický řetězec, tak na kyselinu fosforečnou váží vápenaté ionty, kasein tedy tvoří komplex kaseinátu a fosforečnanu vápenatého. Kaseinové frakce se uspořádávají do micel. Tyto složky jsou důležité pro rozvoj mláďat. Kasein přítomný v kozím mléce je jednou z více rozpustnějších forem kaseinu. Je tvořen z několika podobných proteinů, díky čemuž má micela zrnitou strukturu, což usnadňuje jeho trávení ve střevě, micely totiž tvoří jakousi formu gelu, a tak vstřebávání kaseinu probíhá pomaleji než u ostatních mléčných bílkovin (Svačinová 2012). Při následujících imunologických analýzách budeme používat kit s vysokou specificitou na savčí kaseiny.

β -laktoglobulin je dalším proteinem přítomným v kravském mléce. Jedná se však o protein syrovátkový, ne mléčný. V syrovátce je zastoupen nejvíce ze všech syrovátkových proteinů, a to v množství 7-12 %. Má velké zastoupení valinu a lysinu, velmi důležitými aminokyselinami jsou zde také aminokyseliny sирné – cystein a cystin. Patří mezi globuliny a skládá se ze dvou podsložek, a to z euglobulinu a pseudoglobulinu. Najdeme ho především v mléce kravském a ovčím. Jde o globulární protein s primární strukturou (Hejdová 2009). ELISA kit, který budeme při následující imunologické analýze používat je určený k detekci β -laktoglobulinu v kravském mléce.

Gliadin je protein přítomný v některých obilninách, navíc jednou ze dvou složek, která tvoří lepek. Gliadin lepku dodává dobrou tažnost (druhá složka lepku – glutenin – dodává lepku pružnost a schopnost bobtnat). Patří mezi zásobní bílkoviny prolaminy a je rozpustný v ethanolu. (Hlaváčová 2011).

2.2 Proteiny v archeologii

Z počátku byla snaha zjišťování přítomnosti proteinů v archeologických artefaktech kritizována, protože nikdo nevěřil, že by mohly zůstat po tak dlouhou dobu zachovány, zvláště když na ně působily všemožné přírodní podmínky a v neposlední řadě také mikroorganismy přítomné v půdě. Přestože už byly analyzovány proteiny miliony let staré (Asara 2007; Schweitzer et al. 2009), není izolace a identifikace historických proteinů jednoduchou záležitostí. Během času dochází k rozpadům, chemickým změnám a degradacím proteinové struktury (Barnard et al. 2007). ELISA testy na archeologické proteiny byly používány již v minulosti, ale s rozporuplnými výsledky, což bylo způsobeno hlavně tím, že nebyly používány protilátky, které by byly funkční proti degradovaným proteinům, ale byly aplikovány protilátky proti nativním proteinům. Všechny použité testy v této práci byly vyvinuty pro proteiny tepelně degradované, což do značné míry odpovídá poškození v průběhu času a byly odzkoušeny pro potřeby archeologie již dříve (viz Pavelka et al 2016).

Při dřívějších pokusech o analýzu reziduí bílkovin v archeologických nálezech bylo ale nejprve hlavním problémem zjištění způsobu extrakce proteinů z archeologických keramických artefaktů. Proteiny jsou v keramice uchyceny zejména Van der Waalovými silami, proto je jejich izolace z keramiky složitá a často může proteiny poškodit (Baker 2010). Ale díky Čiperové (2015) která zjistila, že při odběru malého vzorku z archeologické keramické nádoby ve formě suspenze se dají pomocí imunologické analýzy testu ELISA sandwichového typu detekovat proteiny v keramice přítomné bez nutnosti oddělení bílkoviny od nádoby. Samotná keramika ve formě jemných částic není pro ELISA testy na překážku a proteiny nejsou izolacemi ničeny (viz. Čiperová 2015).

2.3 Degradace proteinů

Hlavním problémem při uchovávání proteinů je možnost jejich denaturace. Jedná se o změnu jejich terciální (ta udává orientaci bílkoviny v trojrozměrném útvaru) a kvarterní (popisuje způsob propojení bílkovinných podjednotek do větších celků) struktury působením fyzikálních, chemických či biologických vlivů. Jednou

z nejpodstatnějších fyzikálních sil, které mohou způsobit denaturaci proteinů je vysoká teplota, této denaturace využívá lidstvo při přípravě většiny přírodních surovin, zvláště pokud jsou živočišného původu. Chemická denaturace proteinu může nastat například při působení kyseliny na peptidické vazby (McMurry 2007), ale v případě historických peptidů se jedná především o působení různých chemických látek obsažených v půdě, a to působením jak látek anorganických, tak látek organických (Bernard et al. 2007). Biologická degradace proteinu je způsobena především působením různých mikroorganismů, ale také může být následkem působení větších živočichů žijících v půdě, jakou jsou například larvy hmyzu či žížaly. Dalším druhem degradace proteinů je deaminace, která spočívá v odběru aminové skupiny z molekuly aminokyseliny.

3. Testovací metody

Při analýze vzorků z Předního východu bylo využito dvou testovacích metod. První z těchto metod je imunologická analýza za použití sandwichových ELISA kitů určených k detekci hledaných proteinů. Druhou použitou metodou je hmotnostní spektrometrie, ta byla prováděna v laboratoři VŠCHT v Praze.

3.1 Princip sandwichového ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) testu

ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay) je kvalitativní analytická metoda určená k detekci a kvantifikaci takových látek, jako jsou peptidy, protilátky a hormony, zjištěním přítomnosti antigenů pomocí jejich protilátek. Je prováděna na jamkové destičce, na jejímž dně je navázána primární protilátka, na kterou jsou následně pasivně vázány jak protilátky, tak i proteiny. Právě tato vazba a imobilizace činidel, je to, co dělá tento test tak snadno použitelným. Vazba reagujících látek na destičku umožňuje snadné oddělení navázaného a nenavázaného materiálu v průběhu testu, umožnění vymytí nespecificky vázané látky vytváří výkonný nástroj pro měření specifických analytů. Detekční enzym může být navázán přímo na primární protilátku navázanou na destičce, anebo napojena přes sekundární protilátku, která primární protilátku dokáže identifikovat. Pokud by byla primární protilátka označena biotinem dal by se detekční enzym navázat přímo na protein například na streptavidin. Nejčastěji se na značení enzymů používá křenuvová peroxidáza (HRP) a alkalická fosfatáza (AP). Široký výběr substrátů je dostupný pro použití při ELISA k reakci s HRP a AP konjugáty. Volba substrátu závisí na požadované citlivosti testu a dostupném zařízení pro detekci signálu, která bude v případě našich analýz prováděna za použití spektrometru.

Nejvýkonnější variantou ELISA testu je sandwichová metoda. Tento typ testu je takto nazýván z toho důvodu, že měřený analyt je vázán mezi dvě primární protilátky (protilátku k zachycení a protilátku k detekci). V sendvičovém uspořádání testu je kritické to, aby sekundární protilátka byla specifická pouze pro detekci primární protilátky, a ne k té protilátce, která zachytí antigen k podložce. Tuto metodu používáme, protože díky své vysoké specifitě, nevedí při postupu mírné znečištění vzorků (Cviček 2012).

3.2 Princip hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je v podstatě separační technikou stejně jako je jí například chromatografie. Nejpodstatnějším rozdílem je prostředí, ve kterém k separaci dochází, je totiž založena na interakci nabytých částic s magnetickým či elektrickým polem ve vakuu. Každý hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí, a to z iontového zdroje, detektoru částic a analyzátoru. Iontový zdroj vyrábí ionty v plynné fázi, které se případně po svém vzniku rozpadají. Analyty vstupují do iontového zdroje společně s maticí a vznikají kladně či záporné ionty molekulární, aduktové či v případech některých méně stabilních látek mohou vznikat i fragmenty ionizované molekuly. Při analýze makromolekul, jako jsou třeba proteiny se velmi často využívá desorpční ionizace vzorku laserem za asistence matrice. Bezprostředně před ionizací se vzorek obvykle smíchá s organickou kyselinou (matrice), která při zásahu paprskem laseru absorbuje jeho energii a při tom se vysuší. Krátký intenzivní puls laseru desorbuje matici a analyty, zároveň se matrice ionizuje a předá náboj analytu. Celý tento proces probíhá ve vakuu. Analyzátor je klíčovou součástí hmotnostního spektrometru, ve vakuu na něm dochází k oddělení iontů na základě poměru hmotnosti ku náboji. Nejrozšířenějším hmotnostním analyzátozem je s největší pravděpodobností kvadrupól, a to hlavně kvůli cenové přístupnosti. Jde o soustavu čtyř tyčí, do kterých je vedena kombinace střídavého a stejnosměrného napětí. Na základě velikosti napětí stejnosměrného s amplitudou napětí střídavého v daném okamžiku se mohou ionty se stabilní hodnotou poměru hmotnosti ku náboji pohybovat dál k detektoru či další části analyzátoru. Ionty s nestabilní trajektorií jsou vychýleny z kurzu a na detektor nedopadnou. Analyzátor může pracovat ve dvou režimech. V prvním případě může kontinuálně měnit elektrické pole a tak změřit všechny hodnoty poměru hmotnosti ku náboji za velmi krátký časový úsek. V druhém případě se dá nastavit elektrické pole tak, aby mohly procházet pouze ionty s příslušnou velikostí poměru hmotnosti ku náboji., tento režim se používá pro kvantifikaci předem zvolených látek. Ionty vybrané hmotnostním analyzátozem jsou zaznamenány detektorem, který převádí získané informace do digitální podoby, dají se rozdělit do dvou skupin. První skupina je zaměřena na přímé měření elektrického proudu vzniklého při srážce iontu s diodou a který je následně zesilován pomocí násobičů. Druhé skupiny jsou řazeny detektory,

které jsou schopny zaznamenat ionty i ve vztahu k velikosti hmotnosti ku náboji. Ionty jsou detekovány jako komplexní proudový obraz všech přítomných iontů s různými hodnotami velikostí hmotnosti ku náboji díky indukci proudu v důsledku pohybu iontů v hmotnostním analyzátoru. Signál je dále zpracován Fourierovou transformací. (Friedecký a Lemr 2012).

4. Archeologický kontext

Všechny archeologické nálezy na Předním východě byly prováděny na třech na sobě nezávislých lokalitách, a to na lokalitě Tell Arbid Abyad v Sýrii a lokalitách Tel Burna a Tell es-Safi v Izraeli.

4.1 Lokalita Tell Arbid Abyad v Sýrii

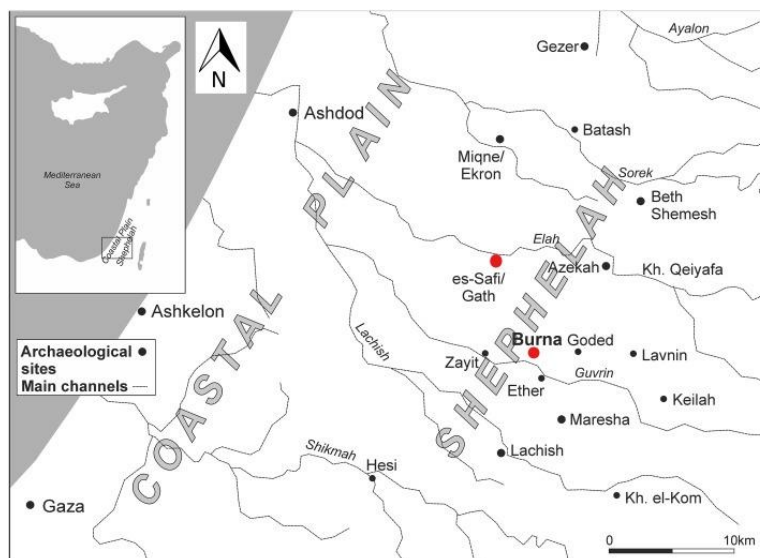
Lokalita se nachází na severovýchodě Sýrie, jedná se o území nacházející se v povodí řeky Khabur, bohaté mimo jiné na archeologické nálezy datované do neolitického období. Jedná se o malý kopec vysoký přibližně dva metry a pokrývající plochu o rozloze zhruba 0,5 Ha (Mateiciucová 2010).

4.2 Lokality Tel Burna a Tell es-Safi v Izraeli

Obě oblasti se nacházejí poměrně blízko u sebe, na Obr.1 jsou zvýrazněny červenou barvou, a leží na pobřežní planině Shephelah poblíž středozemního moře. Oba pozůstatky osad leží na vrcholcích jejichž bezprostředním okolím protéká říčka. V současné době se na území planiny nachází kulturní půda, na které se pase hovězí dobytek (Šmejda et al. 2017).

Osada na lokalitě Tell es-Safi se nachází na vrcholku, který přechází úroveň terénu. V jeho nedaleké blízkosti protéká říčka Elah.

Osada Tel Burna, která je ohraničena viditelnými zbytky kamenných zdí je obklopena pastvinami s keři a travním porostem. Jedná se o typ vegetace typický pro středomoří, který nazýváme garrigue. Tato osada byla sídlištěm Hebrejců na hranici judského království (Šmejda et al. 2017). Nedaleko od pahorku protéká říčka Guvrin.



Obr.1 Plánek pobřežní planiny Shephelah (Šmejda et al. 2017)

5. Příprava materiálu

Pro výzkum jsme připravovali materiál dvojího druhu. Nejprve se jedná o materiál získaný z keramických střepů nádob, ve kterých byly potraviny uchovávány či zpracovávány. Tento materiál pochází ze Sýrie z lokality Tell Arbid Abyad, naleziště jsou datována do období pozdního neolitu. Druhým typem materiálu je mazanice, což je směs hlíny, zvířecího trusu, vody a různých druhů travin, která se používala k utěsnění spár obydlí s dřevěnou a proutěnou konstrukcí. Tento materiál byl získán ze dvou lokalit v Izraeli, a to z lokalit Tel Burna a Tell es-Safi. Obě tato naleziště byla datována do doby železné (Šmejda et al. 2017).

5.1 Vzorky ze Sýrie

Keramické střepy z lokality v Syrském Arbidu byly odebírány z archeologicky zkoumaných kulturních vrstev (Mateiciucová 2010). Tyto vrstvy byly datovány do neolitického období, stejně jako veškeré keramické a jiné artefakty, které byly v těchto vrstvách nalezeny. Kontaminace hnojivy či jiným živočišným materiálem je velmi málo pravděpodobná. Nalezená keramika byla okamžitě po nalezení odebrána a pečlivě uložena tak, aby nepřišla do kontaktu s čerstvou půdou naleziště.

Na místě, kde byl proveden odkryv, se v současné době nachází kulturní půda. Odběr byl proveden pomocí několika sond náhodně rozmístěných po celé ploše lokality.

Vnitřní strana vybraných kousků keramiky byla pomocí skalpelu očištěn od povrchových nečistot. Dále byl povrch vyčištěn zbroušením přibližně o 0,5mm smirkovým papírem a z tohoto místa se poté odebralo malé množství keramické hmoty do plastových zkumavek (eppendorf). Ke vzorku byl dále přidán fyziologický roztok a tato směs byla následně vortexována po dobu pěti minut, aby se pevný materiál oddělil od směsi a usadil se na dně zkumavky.

Vzorky půdy byly odebrány ze stejných vrstev, ve kterých byly nalezeny keramické střepy a ostatní předměty. Další kontrolní vzorky půdy byly odebrány ze dvou výběhů pro ovce na kozí farmě u obce Žalmanov. V prvním byly ovce přítomné do chvíle odběru přibližně po dobu pěti let. Druhý byl opuštěný přibližně tři roky před odběrem. V obou případech byly vzorky půdy odebrány z hloubky deseti centimetrů na místě, kde měly ovce přístřešek chránící je proti dešti. Vzorky půdy byly uloženy do plastových zkumavek (eppendorf), dále k nim byl přidán fyziologický roztok, s výjimkou u vzorku, ve kterém byla zjišťována přítomnost gliadinu, ke kterému se byl přidán roztok

ethanolu, a všechny takto upravené vzorky byly dále vortexovány, aby se pevný materiál usadil na dně zkumavky.

U vzorků půdy byly provedeny dva cykly imunologické analýzy. U prvního cyklu probíhala příprava stejně jako u vzorků odebraných z keramiky. Před druhým cyklem byly vzorky vařeny v termostatu ve vodní lázni po dobu patnácti minut při teplotě 97°C. Zkumavky musely být při tomto postupu otevřené, aby díky expanzi plynů při vaření nedošlo k poškození vzorku. Tento krok byl proveden proto, že komerční kit ELISA, který byl při postupu použit je zaměřený specificky na denaturované proteiny, proto bylo nutné případné proteiny v půdě denaturovat.

U vzorků byly následně provedeny testy na přítomnost denaturovaných proteinů z vepřového, hovězího a skopového masa, kaseinu, gliadinu a β -laktoglobulinu kravského mléka.

Dále byla vyzkoušena imunologická analýza na vařeném a nevařeném ovčím trusu, odebraném na stejné lokalitě jako půdní vzorky z ovčích výběhů. Při jejich analýze jsme postupovali stejně, jako při analýze půdních vzorků. Všechny tyto testy jsme provedly jako ověření funkčnosti kitu specifického na zjišťování přítomnosti proteinů ze skopového masa při detekci historických denaturovaných proteinů v půdě i v archeologické keramice.

5.2 Vzorky z Izraele

Zbytky obydlí datovaných do doby železné byly nalezeny na dvou nezávislých lokalitách Tel Burna a Tell es-Safi v Izraeli. Vzorky byly v obou případech odebrány z hloubkových sond prováděných přibližně 1 m pod úroveň současného terénu z jistého archeologického kontextu, který je datovaný do doby železné. Vzorky byly vždy odebírány z kopaných sond (Šmejda ústní sdělení). Vykopávky na nalezišti Tel Burna odhalily sídliště Hebrejců na hranici Judského království, zatímco na nalezišti Tell es-Safi byly nalezeny pozůstatky pelištejského města.

Na lokalitách Tel Burna i Tell es-Safi se v současné době nachází kulturní krajina, a to jak zemědělská půda, tak hospodářsky nevyužitá půda porostlá náletovými rostlinami a nízkými křovinami (Šmejda et al. 2017).

U všech odebraných vzorků byly provedeny dva cykly imunologické analýzy v případě zjišťování přítomnosti proteinů vepřového masa a jeden cykl imunologické analýzy na přítomnost gliadinu a nedenaturovaných proteinů masa hovězího. Všechny

vzorky byly uloženy do plastových zkumavek (eppendorf), dále k nim byl přidán fyziologický roztok, s výjimkou u vzorku, ve kterém byla zjišťována přítomnost gliadinu, ke kterému se byl přidán roztok ethanolu. Všechny takto upravené vzorky byly vortexovány, aby se pevný materiál usadil na dno zkumavky. V případě druhého cyklu při analýze vepřových proteinů, byly vzorky tepelně denaturovány v termostatu po dobu patnácti minut při teplotě 97°C. Zkumavky musely být při tomto postupu otevřené, aby díky expanzi plynů při vaření nedošlo k poškození vzorku.

Dále máme k porovnání jeden vzorek mazanice z vykopávek z Evropy, respektive z lokality u Českých Hostivic.

6. Postup při zjišťování přítomnosti proteinů

Při zjišťování přítomnosti všech hledaných proteinů používáme ELISA kity sandwichového typu od firmy Neogen®. Všechny tyto kity obsahují promývací roztok (wash solution), sadu mikrotitračních destiček s navázanou protilátkou specifickou k hledanému antigenu příslušného proteinu, sekundární protilátku specifickou k hledanému antigenu, pozitivní a negativní kontrolu, substrát, STOP solution (roztok slabé kyseliny fosforečné k ukončení série reakcí). Při všech následujících postupech jsme se obvykle drželi kroků v návodech přiložených k jednotlivým kitům, samozřejmě s ohledem na specifičnost vzorků a jejich omezené množství. Některé protokoly musely být mírně upraveny.

6.1 ELISA kit pro vařené vepřové maso

Zjišťování přítomnosti proteinů, které se nacházejí v mase domácích zvířat provádíme pomocí ELISA kitu 'Cooked Species Identification Test Kit' pro identifikaci vepřového masa od společnosti Neogen®. Test je určený na detekci vařených bílkovin, protilátky v kitu mají vysokou afinitu k proteinům denaturovaným tepelnou úpravou (vaření, pečení, aj).

- 1) K 0,05 - 0,20g vzorku odebraného ze zkoumané nádoby přidáme pomocí pipety do plastové zkumavky (eppendorf) 200 µl solného roztoku. Tímto způsobem připravíme dva vzorky.
- 2) Jeden ze vzorků umístíme na 15 minut do třepačky zahřáté na 95-100°C, druhý vzorek necháme bez tepelné úpravy.
- 3) Dále vzorky necháme 15 minut protřepat při pokojové teplotě.
- 4) Nakonec necháme vzorky odpočívat dalších 15 minut.
- 5) Do vaničky připravíme promývací roztok (wash).
- 6) Připravíme mikrotitrační destičku s potřebným počtem testovacích jamek na příslušné vzorky.
- 7) Do testovacích jamek napipetujeme 100 µl od každého vzorku (1 jamka na 1 vzorek) a od pozitivní i negativní kontroly. Pro každý vzorek používáme novou pipetovací špičku, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci vzorků či kontrol.
- 8) Necháme inkubovat při pokojové teplotě 45 minut.
- 9) Po uplynulé době 3x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky vzorku.

- 10) Do vypláchnutých jamek napipetujeme 50 μ l sekundární protilátky pro vařené vepřové maso a necháme inkubovat 45 minut při pokojové teplotě.
- 11) Po uplynulé době 3x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky sekundární protilátky.
- 12) Do vypláchnutých jamek napipetujeme 50 μ l konjugátu avidin peroxidázy a necháme inkubovat 15 minut při pokojové teplotě.
- 13) Po uplynulé době 5x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky konjugátu avidin peroxidázy.
- 14) Do vypláchnutých jamek napipetujeme 100 μ l TMB substrátu a necháme inkubovat 45 minut při pokojové teplotě a na zatemněném stanovišti.
- 15) Po uplynulé době napipetujeme do každé jamky 50 μ l slabé kyseliny fosforečné označované v kitu jako 'STOP solution', která zastaví probíhající reakce.
- 16) Jamky, ve kterých byl přítomen vzorek obsahující hledaný protein jsou nyní žlutě zbarveny. Intenzitu tohoto zbarvení měříme na spektrometru ELISA reader VERSAmax™ (Molecular Devices) při 450 nm.
- 17) Porovnáním intenzity vzorku s intenzitou pozitivní a negativní kontroly určíme množství antigenu hledané protilátky ve vzorku.
- 18) Výsledky jsou díky speciálnímu softwaru zaznamenány do excelové tabulky.

6.2 ELISA kit pro vařené hovězí maso

Zjišťování přítomnosti proteinů, které se nacházejí v mase domácích zvířat provádíme pomocí ELISA kitu 'Cooked Species Identification Test Kit' pro identifikaci hovězího masa od společnosti Neogen®. Test je určený na detekci vařených bílkovin, protilátky v kitu mají vysokou afinitu k proteinům denaturovaným tepelnou úpravou (vaření, pečení, aj).

- 1) K 0,05 -0,20g vzorku odebraného ze zkoumané nádoby přidáme pomocí pipety do plastové zkumavky (eppendorf) 200 μ l solného roztoku.
- 2) Vzorky umístíme na 15 minut do třepačky zahřáté na 95-100°C (tento krok může být podle potřeby vynechán).
- 3) Dále vzorky necháme 15 minut protřepat při pokojové teplotě.
- 4) Nakonec necháme vzorky odpočívat dalších 15 minut.
- 5) Do vaničky připravíme promývací roztok (wash).
- 6) Připravíme mikrotitrační destičku s potřebným počtem testovacích jamek na příslušné vzorky.

- 7) Do testovacích jamek napipetujeme 100 μ l od každého vzorku (1 jamka na 1 vzorek) a od pozitivní i negativní kontroly. Pro každý vzorek používáme novou pipetovací špičku, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci vzorků či kontrol.
- 8) Necháme inkubovat při pokojové teplotě 45 minut.
- 9) Po uplynulé době 3x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky vzorku.
- 10) Do vypláchnutých jamek napipetujeme 50 μ l sekundární protilátky pro vařené hovězí maso a necháme inkubovat 45 minut při pokojové teplotě.
- 11) Po uplynulé době 3x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky sekundární protilátky.
- 12) Do vypláchnutých jamek napipetujeme 50 μ l konjugátu avidin peroxidázy a necháme inkubovat 15 minut při pokojové teplotě.
- 13) Po uplynulé době 5x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky konjugátu avidin peroxidázy.
- 14) Do vypláchnutých jamek napipetujeme 100 μ l TMB substrátu a necháme inkubovat 45 minut při pokojové teplotě a na zatemněném stanovišti.
- 15) Po uplynulé době napipetujeme do každé jamky 50 μ l slabé kyseliny fosforečné označované v kitu jako 'STOP solution', která zastaví probíhající reakce.
- 16) Jamky, ve kterých byl přítomen vzorek obsahující hledaný protein jsou nyní žlutě zbarveny. Intenzitu tohoto zbarvení měříme na spektrometru ELISA reader VERSAmax™ (Molecular Devices) při 450 nm.
- 17) Porovnáním intenzity vzorku s intenzitou pozitivní a negativní kontroly určíme množství antigenu hledané protilátky ve vzorku.
- 18) Výsledky jsou díky speciálnímu softwaru zaznamenány do excelové tabulky.

6.3 ELISA kit pro vařené skopové maso

Zjišťování přítomnosti proteinů, které se nacházejí v mase domácích zvířat provádíme pomocí ELISA kitu 'Cooked Species Identification Test Kit' pro identifikaci skopového masa od společnosti Neogen®. Test je určený na detekci vařených bílkovin, protilátky v kitu mají vysokou afinitu k proteinům denaturovaným tepelnou úpravou (vaření, pečení, aj).

- 1) K 0,05 -0,20g vzorku odebraného ze zkoumané nádoby přidáme pomocí pipety do plastové zkumavky (eppendorf) 200 μ l solného roztoku.

- 2) Vzorky umístíme na 15 minut do třepačky zahřáté na 95-100°C (tento krok může být podle potřeby vynechán).
- 3) Dále vzorky necháme 15 minut protřepat při pokojové teplotě.
- 4) Nakonec necháme vzorky odpočívat dalších 15 minut.
- 5) Do vaničky připravíme promývací roztok (wash).
- 6) Připravíme mikrotitrační destičku s potřebným počtem testovacích jamek na příslušné vzorky.
- 7) Do testovacích jamek napipetujeme 100 µl od každého vzorku (1 jamka na 1 vzorek) a od pozitivní i negativní kontroly. Pro každý vzorek používáme novou pipetovací špičku, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci vzorků či kontrol.
- 8) Necháme inkubovat při pokojové teplotě 45 minut.
- 9) Po uplynulé době 3x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky vzorku.
- 10) Do vypláchnutých jamek napipetujeme 50 µl sekundární protilátky pro vařené skopové maso a necháme inkubovat 45 minut při pokojové teplotě.
- 11) Po uplynulé době 3x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky sekundární protilátky.
- 12) Do vypláchnutých jamek napipetujeme 50 µl konjugátu avidin peroxidázy a necháme inkubovat 15 minut při pokojové teplotě.
- 13) Po uplynulé době 5x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky konjugátu avidin peroxidázy.
- 14) Do vypláchnutých jamek napipetujeme 100 µl TMB substrátu a necháme inkubovat 45 minut při pokojové teplotě a na zatemněném stanovišti.
- 15) Po uplynulé době napipetujeme do každé jamky 50 µl slabé kyseliny fosforečné označované v kitu jako 'STOP solution', která zastaví probíhající reakce.
- 16) Jamky, ve kterých byl přítomen vzorek obsahující hledaný protein jsou nyní žlutě zbarveny. Intenzitu tohoto zbarvení měříme na spektrometru ELISA reader VERSAmax™ (Molecular Devices) při 450 nm.
- 17) Porovnáním intenzity vzorku s intenzitou pozitivní a negativní kontroly určíme množství antigenu hledané protilátky ve vzorku.
- 18) Výsledky jsou díky speciálnímu softwaru zaznamenány do excelové tabulky.

6.4 ELISA kit pro obilnou bílkovinu gliadin

Gliadin je obilný protein, rozpustný v alkoholu. Na jeho detekci byl využit ELISA kit Veratox® for Gliadin od společnosti Neogen®. Test je určený na detekci syrových i tepelně zpracovaných vzorků, my se zaměřily na detekci vzorků tepelně zpracovaných, což se odrazilo na postupu práce. Ten jsme prováděli podle přiloženého návodu.

- 1) Připravíme 55 % roztok ethanolu pro extrakci proteinu ze vzorku.
- 2) Do čisté plastové zkumavky (eppendorf) odvážíme asi 0,2 g vzorku namleté keramiky a připipetujeme 10 ml 55 % ethanolu.
- 3) Vzorky vložíme na 10 minut do třepačky.
- 4) Dále všechny vzorky vložíme na 5 sekund do vortexu.
- 5) Připravíme mikrotitrační destičku s potřebným počtem testovacích jamek na příslušné vzorky a promývací roztok (wash).
- 6) Do testovacích jamek napipetujeme 100 µl (1 jamka na 1 vzorek) od každého vzorku a od pozitivní i negativní kontroly. Pro každý vzorek používáme novou pipetovací špičku, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci vzorků či kontrol.
- 7) Následně vzorky po dobu 20 sekund mícháme a poté je necháme inkubovat 10 až 30 minut při pokojové teplotě.
- 8) Po uplynulé době 5x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky vzorku.
- 9) Do vypláchnutých jamek napipetujeme 100 µl sekundární protilátky pro gliadin, na 20 sekund je promícháme a necháme inkubovat 10 až 30 minut při pokojové teplotě.
- 10) Po uplynulé době 5x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky sekundární protilátky.
- 11) Do vypláchnutých jamek napipetujeme 100 µl TMB substrátu, na 20 sekund je promícháme a necháme inkubovat 10 až 30 minut při pokojové teplotě.
- 12) Podle doporučení výrobce by se měla po uplynulé době přidat do každé jamky 50 µl slabé kyseliny označované v kitu jako 'STOP solution', která zastaví probíhající reakce, která je součástí kitu. Nám se však místo ní osvědčila níže koncentrovaná kyselina sírová přidaná ve stejném množství.
- 13) Jamky, ve kterých byl přítomen vzorek obsahující hledaný protein jsou nyní výrazně zbarveny. Intenzitu tohoto zbarvení měříme na spektrometru ELISA reader VERSAmax™ (Molecular Devices) při 450 nm.

- 14) Porovnáním intenzity vzorku s intenzitou pozitivní a negativní kontroly určíme množství antigenu hledané protilátky ve vzorku.
- 15) Výsledky jsou díky speciálnímu softwaru zaznamenány do excelové tabulky.

6.5 ELISA kit pro mléčnou bílkovinu kasein

Kasein je mléčný protein, rozpustný ve vodě. Na jeho detekci jsme využily ELISA kit Veratox® 'Casein Allergen Quantitative Test' od společnosti Neogen®. Test je určený na detekci syrových i tepelně zpracovaných vzorků.

- 1) Nadrčenou keramiku vložíme do zkumavky a k ní přidáme destilovanou vodu. Směs necháme promíchat 20 sekund v třepačce.
- 2) Připravíme promývací roztok při nejmenší nabízené koncentraci a mikrotitrační destičku s potřebným počtem testovacích jamek na příslušné vzorky.
- 3) Do testovacích jamek napipetujeme 100 µl (1 jamka na 1 vzorek) od každého vzorku a od pozitivní i negativní kontroly. Pro každý vzorek používáme novou pipetovací špičku, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci vzorků či kontrol.
- 4) Vzorky necháme inkubovat 30 minut při pokojové teplotě.
- 5) Po uplynulé době 3x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky vzorků.
- 6) Následně naředíme protilátku s pufrem, jelikož samotná by byla příliš nestabilní. Do každé jamky napipetujeme 100 µl tohoto roztoku.
- 7) Směs necháme inkubovat 30 minut při pokojové teplotě.
- 8) Po uplynulé době 3x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky protilátky s pufrem.
- 9) Do každé jamky přidáme 50 µl chromogenu a 50 µl substrátu. Roztoky po přidání jemně protřepeme, ale tak aby se jednotlivé vzorky mezi sebou nekontaminovaly.
- 10) Směs necháme inkubovat 30 minut při pokojové teplotě a na temném stanovišti.
- 11) Po uplynulé době napipetujeme do každé jamky 50 µl slabé kyseliny fosforečné označované v kitu jako 'STOP solution', která zastaví probíhající reakce.
- 12) Jamky, ve kterých byl přítomen vzorek obsahující hledaný protein jsou nyní výrazně zbarveny. Intenzitu tohoto zbarvení měříme na spektrometru ELISA reader VERSAmax™ (Molecular Devices) při 450 nm.
- 13) Porovnáním intenzity vzorku s intenzitou pozitivní a negativní kontroly určíme množství antigenu hledané protilátky ve vzorku.

14) Výsledky jsou díky speciálnímu softwaru zaznamenány do excelové tabulky.

6.6 ELISA kit pro mléčnou bílkovinu β -laktoglobulin v kravském mléce

β -laktoglobulin je mléčný protein rozpustný ve vodě. Na jeho detekci byl využit ELISA kit Veratox® 'BioKits BLG Assay Kit' od společnosti Neogen®. Test je určený na detekci syrových i tepelně zpracovaných vzorků.

- 1) Do vaničky připravíme promývací roztok (wash).
- 2) Připravíme mikrotitrační destičku s potřebným počtem testovacích jamek na příslušné vzorky.
- 3) Do testovacích jamek napipetujeme 100 μ l od každého vzorku (1 jamka na 1 vzorek) a od pozitivní i negativní kontroly. Pro každý vzorek používáme novou pipetovací špičku, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci vzorků či kontrol.
- 4) Do každé jamky přidáme 50 μ l BLG biotinu s navázanou sekundární protilátkou.
- 5) Necháme inkubovat při pokojové teplotě 60 minut.
- 6) Po uplynulé době 5x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky vzorku a sekundární protilátky.
- 7) Do každé jamky přidáme 50 μ l avidin peroxidázy a necháme inkubovat 15 minut při pokojové teplotě.
- 8) Po uplynulé době 3x důkladně propláchneme jamky promývacím roztokem, aby v jamkách nezůstaly zbytky avidin peroxidázy.
- 9) Do každé jamky přidáme 100 μ l TMB substrátu a necháme inkubovat 45 minut při pokojové teplotě a na temném stanovišti.
- 10) Nakonec přidáme do každé jamky 50 μ l STOP solution, která zastaví všechny probíhající reakce.
- 11) Podle pokynů výrobce by se měly vzorky nechat inkubovat dalších deset minut, nám se osvědčilo tuto dobu protáhnout až na 20 minut.
- 12) Jamky, ve kterých byl přítomen vzorek obsahující hledaný protein jsou nyní výrazně zabarveny. Intenzitu tohoto zabarvení měříme na spektrometru ELISA reader VERSAmax™ (Molecular Devices) při 450 nm.
- 13) Porovnáním intenzity vzorku s intenzitou pozitivní a negativní kontroly určíme množství antigenu hledané protilátky ve vzorku.

14) Výsledky jsou díky speciálnímu softwaru zaznamenány do excelové tabulky.

6.7 Hmotnostní spektrometrie

Vzorky byly po dobu dvou hodin štěpeny trypsinem, následně byly přečištěny a zahuštěny na reversní fázi C18 (Zip Tip). Poté byly analyzovány pomocí nanokapalinové chromatografie spojené s hmotnostním spektrometrem ESI-Q-TOF Maxis Impact. Peaklist byl ze změřených dat extrahován programem Data Analysis 4.1. Proteiny byly identifikovány za pomoci softwaru Mascot verze 2.2.04 vyhledáváním v proteinové databázi SwissProt. NCBI a MS/MS přesností přiřazení hmotnostních peptidových štěpů 0,05 Da. Měření bylo provedeno v laboratoři na VŠCHT v Praze.

7. Výsledky

7.1 Výsledky pro vzorky ze Sýrie

Tab.1 Výsledky imunologické analýzy u vzorků z archeologické keramiky a kontrolních vzorků pšůdy

	GLIADIN (obilí)	KASEIN	β - LAKTOGLOBULIN (kravské mléko)	VEPŘOVÉ MASO	SKOPOVÉ MASO	HOVĚZÍ MASO
ARBID 07 16-130-20-HORNÍ	"+"		0	0		
ARBID 07 13-34-19			0	0	0	
ARBIDA 07 114-421-4 HORNÍ	"++"		0	0	0	
ARBID 07 124-489-9	0	"0+"		0		0
ARBID 07 16-130-29 HORNÍ	0	0		0		
ARBID 07 102-362-31 DOLNÍ		0		0	0	
ARBID 07 16-79-82 HORNÍ		"0+"	0	"+"		"+"
ARBID 07 16-79-82 DOLNÍ				"+"	0	
ARBID 07 15-124-10 HORNÍ	"+"	0		0	0	
ARBID 08 102-376-13 HORNÍ	"++"	0		"+"	0	
ARBID 08 10?-396-136 HORNÍ	"++"					
ARBID 08 102-449-11 DOLNÍ	0	"+"	0			
ARBID 08 102-449-11 HORNÍ		"+"		0		
ARBID 07 14-439?-41 DOLNÍ		0			0	0
ARBID 07 14-439?-41 HORNÍ	0			0		
ARBID 07 197-425-9		0		0		0
ARBID 07 14-439?-41 HORNÍ	0			0		
ARBID 07 197-425-9		0		0		0
ARBID B52 1		"+"	0			
LT 013 (20)	"++"			"0+"	0	
LT 013 (19)	"+"			0	0	
LT 013 (21)	"+"			0		
LT 006 (6)				0	0	
LT 006(8) INT CLEANING	"+"			0		
LT 010 (10)				0		"+"
LT 0011(15)	"++"			"0+"		
HLÍNA ARBID 48 90 nevařeno	"+"	"0+"		0		0
HLÍNA ARBID 58 nevařeno	0	"0+"	0	0		0

Tab.1 (pokračování)

KONTROLY						
5 let starý trus prasete v hlíně Denaturace vařením - protilátka na vařené maso					“+++”	
5 let roky starý trus prasete v hlíně nevařeno- protilátka na vařené maso					“0+”	
5 let stará půda z ovčího výběhu nevařená					0	
5 let stará půda z ovčího výběhu vařená					0	
čerstvá půda z ovčího výběhu nevařená					0	
čerstvá půda z ovčího výběhu vařená					0	
čerstvý ovčí trus nevařený					“++”	
čerstvý ovčí trus vařený					“++”	

LEGENDA:	0	negativní výsledek
	“0+”	velice slabá detekce proteinu
	“+”	slabší pozitivní reakce
	“++”	silná pozitivní reakce
	“+++”	extrémně silná pozitivní
	ARBID	keramické vzorky z lokality Tell Arbid Abyad
	LT	keramické vzorky z lokality Tell Arbid Abyad, prostorově mírně vzdálený od předchozích sběrů
	HORNÍ	materiál odebraný těsně pod povrchem
	DOLNÍ	materiál odebraný cca 0,5mm pod povrchem
	prázdná buňka	analýza nebyla provedena

Všechny použité postupy byly již v minulosti s většinovým úspěchem použity (Pavelka a Vařeka 2008, Pavelka et al. 2011, Pavelka a Orna 2011, Čiperová et al. 2015).

V Tab.1 najdeme všech 26 testovaných vzorků, odebraných z keramických nádob. Z toho bylo 15 vzorků testováno na přítomnost gliadinu, 12 na přítomnost kaseinu, 6 na přítomnost β -laktoglobulinu, 22 na přítomnost vepřových proteinů, 10 na přítomnost skopových proteinů a 6 na přítomnost proteinů hovězích.

Dále bylo testováno 5 vzorků půdy na různé protilátky. Vzorky půdy z lokality v Tell Arbid Abyad byly testovány na přítomnost gliadinu, kaseinu, β -laktoglobulinu a protilátek přítomných ve vepřovém a hovězím mase. Vzorky půdy ze starého výběhu pro prasata byly testovány na přítomnost protilátek ve vepřovém mase, a to jak v denaturovaném, tak v nevařeném stavu. Stejným způsobem byly ošetřeny oba vzorky z výběhu pro ovce.

Posledními testovanými byly vzorky ovčího trusu, které byly k analýze připraveny stejným způsobem jako vzorky půdy z výběhů pro zvířata a testovány byly na protilátky přítomné ve skopovém mase, a to jak v denaturovaném stavu, tak nevařené.

U kontrolních vzorků půdy je nutné pečlivě porovnat výsledek před a po převaření vzorku. Tento rozdíl je velmi důležitý pro konečnou interpretaci výsledků.

Pokud došlo u vzorku pouze k velmi slabé detekci proteinu, výrobce kitu uvádí, že se může jednat o klamnou reakci, značící, že byla celá procedura nesprávně provedena. To mohlo být způsobeno nedostatečným promytím vzorku promývacím roztokem, což způsobilo jeho kontaminaci, a tedy i zbarvení konečného roztoku. Samozřejmě se může jednat i o případ, že množství proteinů v detekovaném stavu je velmi omezené, což u archeologických vzorků není nijak ojedinělé. Odlišný případ by to byl, pokud ovšem byla takto slabá reakce detekována u vzorku nepřevařené půdy, může to značit přítomnost hledaných proteinů, což by měla následně prokázat reakce se vzorkem povařeným (Slaná 2019).

V případě gliadinu, bylo 10 vzorků z 15 testovaných vzorků keramiky na jeho přítomnost pozitivní (+) nebo silně pozitivní (++). U pěti vzorků keramiky byly výsledky negativní (0). U vzorků půdy z povrchových nálezů byl jeden vzorek na přítomnost proteinu pozitivní (+) a druhý negativní (0).

Co se týče mléčného proteinu kaseinu, vyšly jako pozitivní (+) 3 vzorky z 12. U 7 vzorků keramiky byly výsledky negativní (0) a u dvou došlo jen k velmi slabé detekci proteinu (0+), což může u těchto vzorků ukazovat na chybu při měření. U vzorků půdy z exkavací zkoumané lokality byla v obou případech zjištěna jen velmi slabá detekce proteinu (0+).

U β -laktoglobulinu byl detekován pouze negativní (0) výsledek u všech zkoumaných vzorků. U vzorků půdy z exkavací byla tedy z finančních důvodů provedena analýza jen u jednoho ze vzorků, a i ta měla negativní (0) výsledek.

Výsledky analýzy přítomnosti vepřových proteinů byly v masivní většině negativní (0). Došlo zde jen ke třem pozitivním (+) výsledkům z 22 a k jedné slabé detekci proteinu. U vzorků půdy z vykopávek došlo v obou případech k negativní reakci. V případě kontrolních vzorků z výběhu pro prasata byla reakce s nevařenou půdou velmi slabě pozitivní (0+) a s vařenou půdou extrémně silně pozitivní (+++), což dokazuje přítomnost prasečího trusu ve výběhu. Tento výsledek také vylučuje případnou kontaminaci půdy z nálezů, u které byly oba výsledky negativní.

Při analýze přítomnosti proteinů ze skopového masa vyšlo všech 10 vzorků s negativním (0) výsledkem, což je kvůli údajnému velkému množství ovčích kostí (Piątkowska-Małecka a Smogorzewska 2010) na nalezištích zkoumané lokality celkem závažnější. Proto jsme neprovedli analýzu půdy ze sond, místo toho jsme provedli pokusy s půdou z ovčích výběhů, kvůli kontrole funkčnosti kitu, ty měly však také ve všech případech negativní (0) výsledky. Dále byly tedy provedeny analýzy čerstvého ovčího trusu v povařené i nevařené formě, při této analýze došlo v obou případech k poměrně silné detekci proteinu (++). Tento kit byl dříve s úspěchem použit při analýze přípečků nalezených na archeologických nádobách (Pavelka et al. 2016) s pozitivní reakcí na přítomnost antigenů nacházejících se ve skopovém mase. Proto jsme usoudili, že má kit problémy s detekcí proteinů, které degradují nechráněně, na rozdíl od přípečků, kde jsou proteiny chráněny krustou zuhelnatělých látek.

Při analýze přítomnosti proteinů z hovězího masa jsme získali 2 pozitivní (+) výsledky z 6. U zbylých vzorků byla reakce negativní (0), stejně jako v případě obou vzorků půdy z povrchových nálezů zkoumané lokality.

7.2 Výsledky pro vzorky z Izraele

Tab.2 Výsledky imunologické analýzy a hmotnostní spektrometrie u vzorků mazanic

	GLIADIN	VEPŘOVÉ MASO (nevařené)	VEPŘOVÉ MASO (vařené)	HOVĚZÍ MASO (nevařené)	Hmotnostní spektrometrie	Typ proteinu
Hostivice A707672	0	"0+"	"+"			
TB 85 102	"+"	0	0	"++"	Collagen alpha-1(I) chain Collagen alpha-2(I) chain Collagen alpha-2(I) chain mouse	Nespecifické savčí + myší
TB 85 208	"+"	0	"0+"	"++"	Collagen alpha-1(I) chain Collagen alpha-2(I) chain Collagen alpha-2(I) chain Collagen alpha-1(III) chain	Nespecifické savčí, myší, potkaní, psí
TB1	0	"0+"	"++"	"++"		
TB2	0	0	"0+"	"++"	Collagen alpha-1(I) chain	hovězí
TB3	0	0	"0+"	"++"	Collagen alpha-1(I) chain	hovězí
TB4	0	0	"0+"	"++"		
TeS	"++"	"+"	"++"	"+"	Collagen alpha-2(I) chain Collagen alpha-2(I) chain Collagen alpha-1(I) chain Collagen alpha-2(I) chain	Hovězí, myší, psí

LEGENDA:	0	negativní výsledek
	"0+"	velice slabá detekce proteinu
	"+"	slabší pozitivní reakce
	"++"	silná pozitivní reakce
	Hostivice	vzorek mazanice z Hostivic v Čechách
	TB	vzorek z lokality Tel Burna
	TeS	vzorek z lokality Tell es-Safi
	prázdná buňka	analýza nebyla provedena

V Tab.2 je znázorněno osm testovaných vzorků, z čehož jeden je vzorek mazanice z Evropy, šest vzorků mazanic z lokality Tel Burna a jeden vzorek mazanice z lokality Tell es-Safi. U všech vzorků byla analyzována přítomnost gliadinu, hovězího proteinu a proteinu z vepřového masa ve vařené i nevařené formě.

V případě gliadinu byly čtyři negativní (0) a dva pozitivní výsledky z Tel Burny, výsledek z Hostivic vyšel negativní (0), u vzorku z Tell es-Safi byl výsledek pozitivní (+) silně pozitivní (++).

Při analýze proteinů nevařeného hovězího masa byly silně pozitivní (++) všechny výsledky, kromě vzorku z Tell es-Safi, který byl jen pozitivní (+). Také nám schází výsledek z lokality u Hostivic, zde jsme analýzu neprovedly, jelikož jsme tento vzorek zpracovaly dlouho před tím, než jsme zpracovávaly vzorky ostatní a analýzu hovězího masa jsme k ostatním analýzám přidali až při analýze zbylých vzorků.

Detekce vepřových proteinů u nevařených vzorků zjistila negativní (0) výsledek u většiny vzorků. U vzorku z Hostivic a vzorku z Tel Burny (TB1) byla zaznamenána slabá detekce proteinu (0+), což značí možnost přítomnosti proteinů vepřového masa ve vzorcích. Vzorek z Tell es-Safi měl jako jediný při analýze pozitivní (+) výsledek.

Při detekci vepřových proteinů ve vařených vzorcích zůstal jediný negativní (0) výsledek, a to u vzorku TB 85 102. U ostatních vzorků, které prve vyšly negativně došlo ke slabé (0+) detekci proteinu, což spíše, než špatnému promytí promývacím roztokem posuzujeme jako velmi slabou existenci proteinů a počítáme jako reakci pravděpodobně velmi slabě pozitivní. U vzorku z Hostivic došlo k pozitivní (+) reakci. U vzorků z TeS i a TB1 došlo k silné pozitivní (++) reakci.

Hmotnostní spektrometrie byla provedena u čtyř vzorků z Tel Burny a u vzorku z Tell es-Safi a odhalila nespecifické savčí proteiny ve vzorcích TB 85 102 a TB 85 208. Dále odhalila myší proteiny ve vzorcích TB 58 102, TB 85 208 a TeS. Ve vzorku TB 85 102 byly detekovány proteiny potkaní. Hovězí proteiny byly detekovány ve vzorcích TB2, TB3 a TeS. Nakonec byly ještě detekovány proteiny psí ve vzorcích TB 85 208 a TeS.

8. Diskuze

8.1 Uchování proteinů v keramice

Díky tomu, že je keramika vysoce porézní materiál, se v nalezených keramických nádobách nachází relativně velké množství biologického materiálu, který byl v příslušných nádobách skladován nebo tepelně či jinak zpracováván. Proteiny obsažené v potravinách měly možnost vsáknout se do jejich povrchu, kde jsou relativně dobře konzervovány. Ty proteiny, které byly navíc tepelně zpracovány, odolávají lépe působení mikroorganismů v půdě a mají tedy větší potenciál k dlouhodobé konzervaci v půdě (Bernard et al. 2007).

8.2 Obilný protein gliadin

Podle nálezů na keramických střepích z lokality Tell Arbid Abyad v Sýrii, mohu usoudit, že se v této oblasti pěstovaly druhy obilí, které jsou komerční kity schopné zaznamenat, tedy že se zde pěstovala pšenice, ječmen či žito. Další obiloviny komerční kity nedetekují, jelikož jsou většinou zaměřeny na detekci alergenů v potravinových a jiných vzorcích. Nedetekují tedy na příklad žito nebo proso, které bylo v minulosti nedílnou součástí jídelníčku jak lidí, tak i domácích zvířat (Jílková 2015). Residuální zbytky rostlinného původu mohou archeologové zjišťovat jak pomocí komerčních ELISA kitů (Pavelka a Orna 2011) tak například za použití plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) kterou použil s pozitivním výsledkem například Colonese et al. (2017) při detekci residuí rostlinných lipidů v dřevěné nádobě. Jako dalším důkazem přítomnosti rostlinné potravy v jídelníčku starověkých populací se dá využít zkoumání přítomnosti a identifikace škrobových zrn v zubním kameni starověkých lidí (Hardy et al. 2009). Zkoumané neolitické vzorky z Tell Arbid Abyad prokazovaly relativně nejvyšší zastoupení právě obilných proteinů. Stanovení vlastního jídelníčku je poměrně diskutabilní, ale co se týče keramiky můžeme usuzovat, že vlastní keramika sloužila ve velké míře pro přípravu a konzumaci obilných kaší.

Při zkoumání přítomnosti obilných residuí ve vzorcích mazanic, jak z Čech, tak z Izraele byl obilný protein gliadin pozitivně detekován u tří vzorků z osmi. Při výrobě dřevěného obydlí byly ve starověku i středověku dřevěné či proutěné stěny vymazávány směsí hlíny smíšené s organickým i jiným materiálem (Vařeka 1992). Velkou složkou tohoto organického materiálu jsou zbytky obilovin (sláma) či jiné sušené traviny. Přítomnost obilných proteinů ve vzorcích mazanic, dokazuje že v příslušných oblastech byly obiloviny pěstovány a s velkou pravděpodobností tedy i konzumovány. Je zvláštní, že

obilniny nebyly nalezeny všude, i když se předpokládá, že byly podstatnou složkou organické části mazanice. Zřejmě se ale v mazanicích, kde nebyly nalezeny stopy po obilovinách skutečně použily jiné traviny. Podobnost nalezeného stavebního materiálu s materiálem z Evropy můžeme dávat za důvod předpokládanému indoevropskému původu Pelištejců (Killebrew 2005).

Velikou výhodou zjišťování přítomnosti gliadinu v archeologické keramice pomocí ELISA kitu, je to, že se k rozpuštění bílkoviny nepoužívá fyziologický roztok, ale roztok ethanolu, ve kterém je oproti ostatním zkoumaným proteinům rozpustný, takže zkoumané vzorky nemohly být kontaminovány případným pěstováním obilovin v okolí naleziště. Gliadin tedy není přenášen vodou, ve vzorku půdy se však stopy obilovin nacházejí, protože se jedná o hlínu z pole (Mateiciucová ústní sdělení), kde byl uskutečněn sběr archeologického materiálu.

8.3 Mléčné proteiny

Další uvažovanou potravinou bylo mléko získávané od několika druhů hospodářských zvířat. Zpracování mléka v neolitu předpokládáme, protože dospělí lidé v této době povětšinou nebyli fyziologicky přizpůsobeni k trávení laktózy. To bylo prokázáno sekvencemi lidské DNA z různých oblastí Evropy z mezolitických a neolitických vzorků, ale i období mladších (Burger et al. 2007, Gamba et al. 2014, Witas et al. 2015). U jedinců v Evropě, kteří jsou schopni trávit laktózu v dospělém věku, se musí vyskytovat mutace 13910*T. I když zpracovaných vzorků, zvláště ze starších období, je dosud poměrně málo, zdá se vysoce pravděpodobné, že frekvence mutace začala stoupat až v římském období a ve středověku (Witas et al. 2015). Aby tedy mohli neolitičtí obyvatelé mléko vůbec konzumovat, muselo být nějakým způsobem zpracováno tak, aby byl obsah mléčného cukru eliminován.

Při tomto výzkumu jsme se se zaměřili na detekci proteinů přítomných v mléce kravském (β -laktoglobulin) a všech dalších druhů mléka (kasein). Mléko bylo v minulosti využíváno například k výrobě různých obilných kaší a různých mléčných výrobků. Podle výsledků můžeme usoudit, že na Syrské lokalitě bylo využíváno více mléko kozí či ovčí než mléko kravské, i když i u něho byly pozitivní výsledky velmi sporadické. Pokud navíc přihlídneme k výsledkům při detekci proteinů v hovězím mase, můžeme usoudit, že krávy byly na této lokalitě chovány pravděpodobně v omezenějším množství. Samotný chov hovězího dobytka dokazují zooarcheologické nálezy na zkoumané lokalitě (Piątkowska-Małecka a Smogorzewska 2010). Tomu, že se vyskytoval v omezenější míře

bylo pravděpodobně i proto, že chov koz je o dost jednodušší. Vzorky zeminy také neprokázaly případnou kontaminaci ani jedním z těchto proteinů, ke které by mohlo dojít při hnojení polí živočišnými hnojivy. Dalším důvodem, proč nebyl na střepích detekován β -laktoglobulin může být to, že bez ohledu na laktózu je kravské mléko hůře stravitelné než ku příkladu právě mléko kozí (Čiperová et al. 2015). Další možností je, že bylo ovčí či kozí mléko přechovááno v keramických nádobách a mléko kravské v nádobách dřevěných, které však bohužel nebyly dochovány.

8.4 Proteiny vepřového masa

Na základě výsledků, které nám vyšly při analýze vepřového masa můžeme usoudit, že i chov prasete domácího byl v Syrské lokalitě spíše omezený. Když navíc přihlédneme k výsledkům u půdních vzorků z místa vykopávek a z Evropy, zjistíme, že půda nebyla kontaminována hnojivy tak, jak bývá kontaminována v Evropě (Slaná 2019), což prokázala i naše zkouška funkčnosti kitu vepřových proteinů v půdě opuštěného prasečího výběhu, kde byla jejich přítomnost, kvůli dlouhodobému pohybu zvířat ve výběhu, očekávána. V případě nevařeného vzorku nebyla přítomnost vepřových proteinů téměř detekována. Když byl však vzorek povařen, došlo k silné pozitivní reakci, která přítomnost proteinů v půdě potvrdila. Tento pokus byl proveden proto, abychom poukázali na to, že daný komerční ELISA kit opravdu detekuje pouze denaturované proteiny a případná kontaminace hnojivy by byla celkem snadno zjistitelná. Jednoduše jakýkoliv vzorek keramiky pozitivní na vepřové proteiny před povařením vzorku v laboratoři, již obsahoval tepelně upravené vepřové maso. Můžeme tedy s jistotou tvrdit, že se v takovém vzorku nachází historická denaturovaná bílkovina. I když se v syrské lokalitě Tell Arbid Abyad potvrdilo vepřové maso jen ve dvou případech a ve dvou jsou pozitivní výsledky na hranici detekovatelnosti, můžeme výskyt proteinů prasat na keramice potvrdit. Vepřové maso se tedy sice omezeně, ale jistě konzumovalo. To, že je v keramice tak málo zastoupeno může ale znamenat, že se prasata připravovala ke konzumaci převážně jiným způsobem, např. rožněním a v keramice jejich zbytky proto najdeme jen zřídka. Zooarcheologické nálezy přítomnost prasete v dané lokalitě potvrzují, většina těchto nálezů však spadá spíše do ranějších stádií období osídlení současného naleziště (Piątkowska-Małecka a Smogorzewska 2010).

Naproti tomu byly výsledky detekce vepřových proteinů u vzorků mazanic o dost variabilnější. V případě detekce proteinů u nepovařených vzorků došlo k pozitivní reakci jen u jediného vzorku, a to vzorku TeS1 z pelištejské lokality v Tell es-Safi. Vzorek z Evropy a jeden vzorek z lokality Tel Burna ukázaly mírnou detekci proteinu, což může v případě

nepovařeného vzorku poukazovat na možnou přítomnost hledaných proteinů i v těchto vzorcích, což se dá prokázat jejich dalším povařením. Při další analýze povařených vzorků se tato teorie prokázala. U vzorku z Hostivic došlo k pozitivní reakci a u vzorku TB1 dokonce k reakci silně pozitivní. Ostatní vzorky z lokality Tel Bruna jeví jen slabou detekci proteinu, což přítomnost prasečích proteinů prokazuje méně spolehlivě, nicméně reakci můžeme stále ještě považovat za pozitivní.

Vzorek TeS1 z lokality Tell es-Safi ukázal po povaření reakci velmi silnou a prokázal tedy přítomnost hledaných proteinů. Bohužel se dosud nepodařilo z lokality opatřit více vzorků, které by mohly výsledek potvrdit, nicméně vzhledem k tomu, že jde o pelištejskou lokalitu, je přidávání prasečího trusu do stavební mazanice vcelku očekávané, jedná se o osvědčený materiál i z nedávné minulosti. Ještě nyní lze na venkově v mnohých evropských lokalitách nalézt stavby z „vepřovic, vepříků, prasečáků“ apod. Pelištejci zřejmě měli indoevropské kořeny a na území nynější Sýrie přicestoval pravděpodobně z oblasti starověkého Řecka, kde se nebyl chov prasat nic neobvyklého. Na lokalitě Tel Burna stávalo Hebrejské sídliště, přítomnost prasečích proteinů ve vzorcích je tedy celkem překvapivá, neboť Židé považují prase za zvíře nečisté a jejich víra jim zakazuje jeho konzumaci i chov. Můžeme zatím předběžně spekulovat, zda se Mojžíšovy zákony přeci jen neporušovaly za účelem vytvoření lepšího zdiva.

Všechny vzorky z Izraelských nalezišť byly odebrány z dostatečně velké hloubky (1 m) pod povrchem trénu, nejsou tedy zřejmě kontaminovány případnými živočišnými hnojivými. Zdá se tedy, že prasata byla v malé míře chována na území s hebrejskou a islámskou historií i přes záporný vztah obou těchto náboženství k danému zvířecímu druhu. Nebo by šlo také spekulovat o dovozu mazanice pro stavebnictví od nežidovského obyvatelstva.

8.5 Proteiny skopového masa

Při porovnávání výsledků imunologické analýzy proteinů skopového masa a kosterním nálezům z vykopávek v Sýrii, kde bylo nalezené velké množství ovčích kostí (Piątkowska-Małecka a Smogorzewska 2010), nás zarazilo, že v žádné ze zkoumaných nádob nedošlo ani k jedné pozitivní reakci. Proto jsme přistoupili ke zkoumání funkčnosti ELISA kitu při detekci proteinů ze skopového masa, které nepocházejí přímo ze svalových tkání daného zvířete. Provedli jsme pokusy s půdou z ovčích výběhů v Čechách, ve kterých se ovce aktivně pásly po několik let. V jednom z výběhů byly ovce ustájeny po dobu pěti let před odběrem půdy, ve druhém výběhu byly ovce ustájeny naposledy přibližně tři roky před odběrem. V obou případech byly výsledky imunologické analýzy negativní, a to jak u vzorků

nevařených, tak i vařených. Dále jsme ještě provedli analýzu čerstvého ovčího trusu v považené i nevažené formě, při této analýze došlo v obou případech k normální pozitivní reakci. Při vaření vzorků byla reakce sice o něco silnější, ale nejedná se o podobně výrazně rozdílnou reakci jako u prasečích proteinů. Ke kontaminaci půdy proteiny, které nemají původ ze svalových tkání tedy v případě ovcí nedochází. Tento kit byl dříve s úspěchem použit při analýze přípečků nalezených na archeologických nádobách (Pavelka a kol. 2016) s pozitivní reakcí na přítomnost antigenů nacházejících se ve skopovém mase. Zdá se, že u proteinů ovce dochází k výrazným degradacím a změnám epitopů na které se navazují protilátky. V případě přípečků jsou zřejmě proteiny chráněny krustou spálených organických látek. Protože se jedná o důležité testy bylo by velmi vhodné ještě zkusit kity na tepelně denaturované skopové od jiných výrobců. Ze zooarcheologických nálezů však můžeme dojít k závěru, že chov koz a ovcí v minulosti dominoval nad chodem jiného dobytka (Piątkowska-Małecka a Smogorzewska 2010).

8.6 Proteiny hovězího masa

Ve vzorcích z exkavací v Sýrii byly výsledky u většiny zkoumaných vzorků na přítomnost proteinů z hovězího masa negativní, jen u dvou vzorků vyšla reakce pozitivně. Je tedy možné, že i v této lokalitě byly krávy chovány ve velmi omezeném množství. Je možné že velká zvířata byla moc náročná na stravu a nevyplatilo se je chovat ve velkém. Menší hospodářská zvířata se lépe krmí i ustávají a například kozy jsou velmi soběstačné při hledání potravy, nebylo by tedy překvapivé, kdyby tehdejší obyvatelé lokality dávali přednost těmto menším domácím zvířatům. Nebo stejně jako v případě prasat domácích (*Sus scrofa f. domestica*), můžeme vzít v úvahu, že testovaná keramika nebyla pro přípravu masa často využívána.

Ve všech vzorcích mazanic z Izraele byly výsledky pozitivní na přítomnost hovězích proteinů. Výrazné zastoupení hovězích proteinů v mazanici je zřejmě dokladem, že hovězí trus byl přidáván také bez ohledu na lokalitu a původ obyvatel. I když právě vzorek od Pelištejců prozrazuje nižší podíl těchto proteinů než u židovských lokalit. Snad je to důkaz prasečím trusu jako lepším pojivu v oblasti, ale jeden vzorek je pro takové závěry málo. Hovězí dobytek byl tedy nejspíše v těchto oblastech jedním z hlavních chovaných hospodářských zvířat. Navíc se u v obou případech jednalo o celkem velká sídliště, která zajisté potřebovala velké množství zdrojů.

8.7 Proteiny zjištěné pomocí hmotnostní spektrometrie

Pomocí hmotnostní spektrometrie byla potvrzena přítomnost hovězích proteinů u některých vzorků mazanic z Izraelských lokalit. Navíc se nám povedlo odhalit několik proteinů, na které nebyly k dispozici komerční ELISA kity, jako jsou proteiny myšího, potkaního a psího původu. Myší a potkaní proteiny nejsou až takovým překvapením, vzhledem k využívání obilných a jiných organických zbytků při přípravě mazanic. Je dosti pravděpodobné, že detekované proteiny se do mazanic dostali v myším a potkaním trusu s organickým materiálem přidávaným do hlíny při přípravě mazanice. Přítomnost psích proteinů ve vzorcích z různých lokalit nám potvrzuje domestikaci psů. Je možné, že proteiny, které vyšly jako nespecifické savčí proteiny mohou být i od dalších savců, ale je pravděpodobnější, že se jedná proteiny větších domácích zvířat.

9. Závěr

Použití komerčních ELISA kitů při detekci archeologických proteinů, založených na principu reakce antigenu s protilátkou, je velice efektivní způsob zjišťování jejich přítomnosti, a to jak z hlediska cenového, tak i z hlediska snadné dostupnosti kitů, jejich vysoké specifické a citlivosti na určené bílkoviny a relativně nízké časové náročnosti. Další výhodou těchto kitů je jejich možnost snadného využití přímo v terénu. Na druhou stranu při použití hmotnostní spektrometrie je větší pravděpodobnost zjištění přítomnosti rozsáhlejšího spektra proteinů usazených v nádobách či jiném archeologickém materiálu.

V průběhu práce bylo zjištěno, že proteiny přítomné ve skopovém mase se dají určit pouze přímo z přípečků seškrabaných z nádob a že komerční souprava není schopna detekovat proteiny které degradují v hlíně nebo keramice.

Dále jsme zjistili, že na Předním východě je značně menší kontaminace půdy živočišnými hnojivy, i když se na mnoha lokalitách zvířata volně pásala. Kontaminace jejich výměšky nebyla tak značná jako v Evropě. Zvláště potom kontaminace půdy prasečím trusem nebyla ve výsledcích skoro zaznamenána.

V případě potravinových residuů v archeologické keramice z nálezů ze zkoumané lokality v Sýrii jsme zjistili, že zde byly ve velké míře pěstovány obiloviny obsahující gliadin – pšenice, žito či ječmen – a že zde lidé pravděpodobně nevyužívali svou keramiku ve větší míře ke skladování či zpracování mléčných výrobků, ani pro uchování různých druhů masa.

Co se biologických residuů přítomných ve vzorcích mazanice z Izraele týče, pomocí imunologické analýzy jsme zjistili, že hovězí proteiny byly přítomny ve všech vzorcích v dost silném zastoupení. Gliadin byl detekován u méně než poloviny vzorků, ale byl přítomný ve vzorcích z obou lokalit.

10. Resumé

In this bachelor thesis is tested, whether there are found food or other biological samples of protein type in the archeologic findings of the Middle East using the immunological method ELISA and the mass spectrometry. One ELISA kit analyses proteins which are found in pork, sheep and beef. The others ELISA kits analyse milk proteins casein and β -lactoglobulin, and the cereal protein gliadin. All recognizable types of proteins present in the samples are then analysed by mass spectrometry. By use of a special ELISA kit for the detection of denatured proteins, it is experimentally verified whether the proteins are archaic, or if these proteins were only present due to later contamination of the surrounding soil. In tested samples that came from Neolithic site Tell Arbid Abyad was demonstrated that the most common use of pottery was for cereals, while less used for milk, pork and mutton. Milk was probably of the goat or sheep origin, because proteins contained in cow milk was not confirmed. However, that does not preclude the use of bovine milk otherwise or in other containers. The samples of the daub from Israel seem to show a greater proportion of swine droppings (*Sus scrofa f. domestica*) in the Philistine sample than in the of old Hebrews samples, but these proteins are also found in these, that opens up opportunities for various speculations. In all tested screeds samples were found bovine proteins, apparently indicating the presence of cattle faeces.

11. Seznam použité literatury

Asara, J.M., Schweitzer, M., Freemark, L., Phillips, M., Cantley, L.C., 2007. Protein sequences from mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry. *Science* 360, 280285.

Barker, A.L., 2010. Archaeological Proteomics: Method Development and Analysis of Protein-ceramic Binding. University of North Texas.

Barnard, H., Schoemaker, L., Craig, O. E., Rider, M., Parr, R. E., Sutton, M. Q. a Yohe II, R. M. 2007. Kapitola 17: Introduction to the analysis of protein residues in archaeological ceramics. V: BARNARD, H. a EERKENS, J. W. (Ed.), *Theory and practise of archaeological residue analysis*. Archaeopress, 216-228 s. Oxford.

Barnard, H., Schoemaker, L., Craig, O. E., Rider, M., Parr, R. E., Sutton, M. Q. a Yohe II, R. M. 2007. Kapitola 17: Introduction to the analysis of protein residues in archaeological ceramics. V: BARNARD, H. a EERKENS, J. W. (Ed.), *Theory and practise of archaeological residue analysis*. Archaeopress, 216-228 s. Oxford.

Burger, J., Kirchner, M., Bramanti, B., Haak, W., Thomas, M. G., 2007. Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *PNAS* 104/10, 3736–3741.

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*, roč.7. č.2, s.193-211, ISSN 1802-0364.

Colombini, M.P., Giachi, G., Modugno, F., Ribechini, E., 2005. Characterisation of organic residues in pottery vessels of the Roman age from Antinoe (Egypt). *Microchemical Journal* 79, 83-90.

Colonese, A.C., Hendy, J., Lucquin, A., Speller, C.F., Collins, M.J., Carrer, F., Gubler, R., Kühn, M., Fischer, R., Craig, O.E., 2017. New criteria for the molecular identification of cereal grains associated with archaeological artefacts. *Scientific Reports* 7, 6633.

Copley, M.S., Berstan, R., Dudd, S.N., Aillaud, S., Mukherjee, A.J., Straker, V., Payne, S., Evershed, R.P., 2005a. Processing of milk products in pottery vessels through British prehistory. *Antiquity* 79, 895908.

Copley, M.S., Berstan, R., Dudd, S.N., Straker, V., Payne, S., Evershed, R.P., 2005b. Dairying in antiquity. I. Evidence from absorbed lipid residues dating to the British Iron Age. *Journal of Archaeological Science* 32, 485-503.

Correa-Ascencio, M., Evershed, R.P., 2014. High throughput screening of organic residues in archaeological potsherds using direct acidified methanol extraction. *Analytical Methods* 6, 1330-1340.

Cviček, P. Aplikace imunochemické metody ELISA v analytice životního prostředí. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2012, 51s. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/23068>.

Friedecký, D. a Lemr, K. 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Bichem. Metab.* 20(41), 152-157.

Gamba, C., Jones, E. R., Teasdale, M. D., McLaughlin, R. L., GonzalezFortes, G., Mattiangeli, V., Domboróczki, L., Kővári, I., Pap, I., Anders, A., Whittle, A., Dani, J., Raczky, P., Higham, T. F., Hofreiter, M., Bradley, D. G., Pinhasi, R., 2014. Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nat Commun.* 21/5: 5257.

Hardy, K., Blakeney, T., Copeland, L., Kirkham, J., Wrangham, R., Collins, M., 2009. Starch granules, dental calculus and new perspectives on ancient diet. *Journal of Archaeological Science* 36, 248-255.

Hejdová, A., 2009. Chemické složení a vlastnosti sladké a kyselé syrovátky. MS, Bakalářská práce, depon. in Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 51 s.

Hlaváčová, T., 2011. Analýza obsahu aminokyselin ve vybraných netradičních druzích cereálií. MS, Bakalářská práce, depon. in Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 63 s.

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

Killebrew A.E. 2005 *Biblical Peoples and Ethnicity: An Archaeological Study of Egyptians, Canaanite* Publisher: Atlanta: Society of Biblical Literature; Leiden: Brill str 230. ISBN: 1589830970

Mateiciuchová, I., 2010. Tell Arbid Abyad – A new Late Neolithic Site in the Upper Khabur Basin, NE Syria: The Preliminary Report. In Paolo Matthiae. *Proceedings of the 6th International Congress on the Archeology of the Ancient Near East (ICAANE), May, 5th-10th 2008, "Sapienza" – Università di Roma Volume 3.* Weistbaden: Harrassowitz Verlag, s. 411-422, 22 s. ISBN 978-3-447-06175-9.

McMurry, J., 2007. *Organická chemie.* V Brně: VUTIUM, Překlady vysokoškolských učebnic. 985-1027. ISBN 978-80-214-3291-8.

Pavelka, J. a Vařeka, P., 2008. Příspěvek k poznání stravy ve vrcholném a pozdním středověku: první výsledky analýzy potravinových zbytků na keramice z archeologických výzkumů. *Kuděj*, roč. 10, s. 98109.

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

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* 73/6, 25-35. ISSN: 0305-4403.

Piątkowska-Matecka J., Smogorzewska A., 2010. Animal bone remains from Tell Arbid (season 2009) – Archaeozoological analysis. Polish Archeology in the Mediterranean 22 (Research 2010). 2013. Polish Centre of Mediterranean Archaeology, University of Warsaw (PCMA UW), Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego (WUW). 439-450. ISSN: 2083–537X.

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

Slaná, K., 2019. Identifikace proteinů z keramické matrix archeologických nálezů. MS, Bakalářská práce, depon. in Západočeská univerzita v Plzni, 44 s. Plzeň.

Šmejda, L., Hejzman, M., Horak, J. & Shai, I., 2017. Ancient settlement activities as important sources of nutrients (P, K, S, Zn and Cu) in Eastern Mediterranean ecosystems – The case of biblical Tel Burna, Israel. Catena 156, 62-73.

Svačinová, M., 2012. Porovnání vybraných technologických vlastností mléka kozího a kravského. MS, Bakalářská práce, depon. in Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 53 s.

Vařeka, P., 1992. Mazanice – středověký stavební materiál v archeologických pramenech a problematika jeho interpretace. Sborník Společnosti přátel starožitností 3, 105–110.

Witas, H. W., Płoszaj, T., Jędrychowska-Dańska, K., Witas, P. J., Masłowska, A., Jerszyńska, B., Kozłowski, T., Osipowicz, G., 2015. Hunting for the LCT-13910*T Allele between the Middle Neolithic and the Middle Ages Suggests Its Absence in Dairying LBK People Entering the Kuyavia Region in the 8th Millennium BP. PLoS ONE 10: e0122384.

11.1 Seznam obrázků a tabulek

Obr.1 Plánek pobřežní planiny Shephelah	9
Tab.1 Výsledky imunologické analýzy u vzorků z archeologické keramiky a kontrolních vzorků půdy.....	21
Tab.2 Výsledky imunologických analýz u vzorků mazanic	25