
Proteomické rozlišení kostí různých živočišných druhů

Alena Meledina, Štěpánka Kučková

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie

Petr Menšík

Západočeská univerzita v Plzni, Filozofická fakulta

KLÍČOVÁ SLOVA

archeologické kosti – kolageny – druhové rozlišení – ZooMS – MALDI-TOF MS – analýza hlavních komponent (PCA)

KEY WORDS

archaeological bones – collagens – species identification – ZooMS – MALDI-TOF MS – principal component analysis (PCA)

PROTEOMIC DIFFERENTIATION OF BONES OF VARIOUS ANIMAL SPECIES

Vertebrate bones or their fragments are, together with fragments of ceramic vessels, among the most common finds at archaeological sites in the Czech Republic. There has been an increased interest in determining the animal origin of bones both in the field of archaeology and palaeontology, as well as in the field of food safety or criminal investigations. Methods based on proteomic analysis are also used today to identify animal species of the given material. In the case of archaeological bone samples, this is ZooMS (Zooarchaeology by Mass Spectrometry), where the basis is the analysis of collagens, which represent the most abundant bone proteins. Recent bones from nine animal species and three bones dated to the Early Middle Ages were analysed. The samples were enzymatically cleaved, and the resulting peptides were analysed using the MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight) mass spectrometry technique. The evaluation of the mass spectra was carried out using the mathematical method of PCA (Principal Component Analysis).

Úvod

- 1 | Mike Buckley – Muxin Gu – Sanu Shameer – Soyab Patel – Andrew T. Chamberlain, High-throughput collagen fingerprinting of intact microfaunal remains; a low-cost method for distinguishing between murine rodent bones, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 30, 2016, č. 7, s. 805–812.

- 2 | Emidio Albertini – Lorenzo Raggi – Manuela Vagnini – Alessandro Sassolini – Alessandro Achilli – Gianpiero Marconi – Laura Cartechini – Fabio Veronesi – Mario Falcinelli – Brunetto Giovanni Brunetti – Costanza Miliani, Tracing the biological origin of animal glues used in paintings through mitochondrial DNA analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399, 2011, s. 2987–2995.

- 3 |** Eske Willerslev – Alan Cooper, *Ancient DNA, Proceedings of the Royal Society. B: Biological Sciences* 272, 2005, č. 1558, s. 3–16.

- 4 | Jennifer A. Leonard – Orin Shanks – Michael Hofreiter –
Eva Kreuz – Larry Hodges – Walt Ream – Robert K. Wayne, Robert C.
Fleischer, Animal DNA in PCR reagents plagues ancient DNA research,
Journal of Archaeological Science 34, 2007, č. 9, s. 1361-1366.

- 5 | James Haile – Richard Holdaway – Karen Oliver – Michael Bunce – M. Thomas P. Gilbert – Rasmus Nielsen – Kasper Munch – Simon Y. W. Ho – Beth Shapiro – Eske Willerslev, Ancient DNA chronology within sediment deposits: Are paleobiological reconstructions possible and is DNA leaching a factor?, *Molecular Biology and Evolution* 24, 2007, č. 4, s. 982–989.

O metodu, která by umožnila identifikaci zvířecího druhu kostí (včetně jejich fragmentů a úlomků), je zájem nejen v oboru archeologie i paleontologie, ale také v oblasti bezpečnosti potravin (např. při padělání a falšování surovin, kontrole dodržování obchodních norem) a v rámci forenzního zkoumání kostních vzorků. V archeologické praxi kosterní pozůstatky obratlovců (počítají se do toho savci, ptáci, plazi, obojživelníci a ryby) představují nejhojnější organické nálezy na archeologických lokalitách. Identifikace zvířecího původu kostních vzorků je důležitá např. pro posouzení klimatických podmínek v minulosti, pochopení postupů chovu v dané lokalitě nebo pro zjištění vlivu lidské činnosti na životní prostředí v historických dobách.¹¹

Identifikace kosterních nálezů se zpravidla provádí na základě charakteristických morfologických znaků, ale fragmentární zbytky tyto znaky v některých případech nemají. Metody na základě analýzy DNA se často používají pro určení zvířecích druhů,^[2] avšak tento způsob identifikace je velmi obtížný, případně není ani proveditelný. Molekuly nukleových kyselin jsou totiž poměrně nestabilní a jejich struktura může být porušena různými vlivy vnějšího prostředí (vysokou teplotou, chemickými látkami, vlhkostí) a vlivem času.^{[3][4]} Archeologické vzorky mohou být také kontaminovány exogenní DNA nacházející se na používaných nástrojích, rukavicích, rypadlech, taktéž však v rámci celé řady přírodních faktorů, které člověk neovlivní atd.^{[4][5]}

OBŘ. 1 Procentuální porovnání podobnosti kolagenu typu I u savců; světle šedou barvou je vyznačena podobnost pro řetězce alfa-1, bílou – pro řetězce alfa-2. *Bos* (cow) – kráva, *Ovis* (sheep) – ovce, *Sus* (pig) – vepř, *Felis* (cat) – kočka, *Canis* (dog) – pes, *Myotis* (bat) – netopýr, *Ictidomys* (squirrel) – veverka, *Mus* (mouse) – myš, *Rattus* (rat) – potkan, *Nomascus* (gibbon) – gibbon, *Pan* (chimpanzee) – šimpanz, *Homo* (human) – člověk. Zdroj: Buckley, Zooarchaeology (pozn. 14).

	<i>Bos</i> (cow)	<i>Ovis</i> (sheep)	<i>Sus</i> (pig)	<i>Felis</i> (cat)	<i>Canis</i> (dog)	<i>Myotis</i> (bat)	<i>Ictidomys</i> (squirrel)	<i>Mus</i> (mouse)	<i>Rattus</i> (rat)	<i>Nomascus</i> (gibbon)	<i>Pan</i> (chimpanzee)	<i>Homo</i> (human)
<i>Bos</i>		98.5	95.6	93.8	94.0	92.2	92.3	90.4	91.3	93.5	93.5	93.3
<i>Ovis</i>	99.4		95.7	93.6	93.9	92.0	91.9	89.8	90.5	93.5	93.5	93.3
<i>Sus</i>	98.0	98.1		95.2	95.6	91.8	94.1	91.3	92.1	94.3	94.2	94.2
<i>Felis</i>	98.2	97.8	98.1		97.6	92.4	94.6	91.4	92.7	94.7	94.6	94.6
<i>Canis</i>	98.3	97.9	98.1	99.4		93.0	94.6	91.5	92.7	94.5	94.6	94.6
<i>Myotis</i>	96.9	96.9	97.0	97.8	97.3		92.4	90.5	91.6	92.1	92.3	92.1
<i>Ictidomys</i>	97.4	97.3	97.4	98.0	97.9	97.5		93.3	94.7	94.8	94.3	94.3
<i>Mus</i>	95.9	95.7	95.7	96.2	96.1	95.5	96.1		96.1	91.2	91.0	90.8
<i>Rattus</i>	96.1	96.1	96.1	96.5	96.4	96.0	96.5	98.5		92.6	92.2	92.2
<i>Nomascus</i>	98.1	98.0	98.4	98.4	98.5	97.1	97.7	95.5	96.1		99.5	99.5
<i>Pan</i>	98.3	98.1	98.1	98.4	98.5	96.8	97.4	95.5	96.0	99.7		99.6
<i>Homo</i>	98.3	98.1	98.1	98.4	98.5	96.8	97.4	95.5	96.0	99.7	100	

Proteiny jsou slibným prostředkem pro identifikaci živočišného původu kostních vzorků. Kolageny (zejména kolagen typu I) jsou dominantními proteiny v kostech obratlovců. Tyto bílkoviny mají vysoký obsah glycinu (Gly), třetinu prolinu (Pro) a stejné množství hydroxyprolinu (HyPro). Molekula kolagenu se skládá ze tří vláken (tzv. α -řetězců) obsahujících kolem 1000 zbytků aminokyselin.^[617] Jednotlivé α -řetězce (např. alfa-1 a alfa-2) se liší zastoupením jednotlivých aminokyselin a jejich posttranslačními modifikacemi.^[6] Kolagenová vlákna chrání před degradací a negativními vlivy vnějšího prostředí minerální „plášť“, který je umístěn na jejich povrchu. Ten způsobuje, že protein je odolný jak vůči vysokým teplotám a vlhkosti, tak i vůči stárnutí.^[819]

V současné době se pro identifikaci živočišného původu kolagenu čím dál tím častěji využívá hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS),^{[10][11]} která umožňuje změřit hmotnost molekul peptidů a identifikovat v nich přítomné aminokyseliny. Na základě této techniky byla vytvořena metoda peptidového mapování (Peptid Mass Fingerprint). Během analýzy vznikají pro každý přítomný protein, pomocí enzymatického štěpení, specifické peptidové fragmenty tvořící peptidovou mapu neboli otisk prstu, který je charakteristický pro každý jednotlivý protein.^[12]

V případě určování zvířecího druhu kostí získaných v rámci archeologických výzkumů se tento přístup nazývá ZooMS (Zooarchaeology by Mass Spectrometry) a charakteristické peptidy (markery) pochází z kolagenu typu I, který je dominantním kostním proteinem.^{[10][13]} Metoda je méně náchylná k problémům kontaminace (na rozdíl od technik založených na analýze DNA) a vyžaduje malá množství vzorku (4–10 mg kosti). ZooMS dokáže identifikovat zvířecí druh z fragmentů kostí, tavené masokostní moučky nebo kostních vzorků získaných při archeologických výkumech, přestože savčí kolagen typu I (řetězce alfa-1 a alfa-2) má vysoký stupeň mezidruhové podobnosti [Obr. 1]^[14].

- 6 |** Petra Peterková – Lubomír Lapčík, Kolagen – vlastnosti, modifikace a aplikace, *Chemické listy* 94, 2000, č. 6, s. 371–379.

- 7 |** Robert K. Murray – Daryl K. Granner – Peter A. Mayes – Victor W. Rodwell, Harperova biochemie, Jinočany 2002, 873 s.

- 8 | Anthony Dale Covington – Lijiang Song – Ono Suparno – Hannah E. C. Koon – Matthew J. Collins, Link-lock: the mechanism of stabilising collagen by chemical reactions, *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* 92, 2008, s. 1–7.

- 9 | Michael Buckley – Richard Cosgrove – Jillian Garvey – Gavin J. Prideaux, Identifying remains of extinct kangaroos in Late Pleistocene deposits using collagen fingerprinting, *Journal of Quaternary Science* 32, 2017, č. 5, s. 653–660.

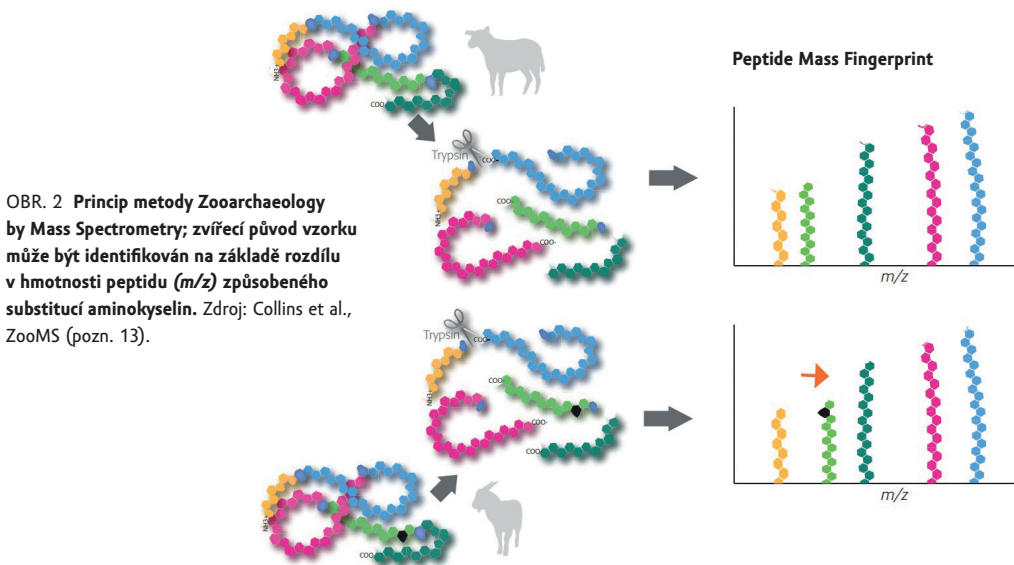
- 10 |** Michael Buckley – Matthew Collins – Jane Thomas-Oates – Julie C. Wilson, Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23, 2009 s. 3843–3854.

- 11 | Frido Welker – Matthew J. Collins – Jessica A. Thomas – Marc Wadley – Selina Brace – Enrico Cappellini – Samuel T. Turvey – Marcelo Reguero – Javier N. Gelfo – Alejandro Kramarz – Joachim Burger – Jane Thomas-Oates – David A. Ashford – Peter D. Ashton – Kerri Rowsell – Duncan M. Porter – Benedikt Kessler – Roman Fischer – Carsten Baessmann – Stephanie Kaspar – Jesper V. Olsen – Patrick Kiley – James A. Elliott – Christian D. Kelstrup – Victoria Mullin – Michael Hofreiter – Eske Willerslev – Jean-Jacques Hublin – Ludovic Orlando – Ian Barnes – Ross D. E. MacPhee, Ancient proteins resolve the evolutionary history of Darwin's South American ungulates, *Nature* 522, 2015, s. 81–84.

- 12 |** Hana Vaňková, Peptidové mapy, *Chemické listy* 93, 1999, s. 120–127.

- 13 |** Matthew Collins – Mike Buckley – Helen H. Grundy – Jane Thomas-Oates – Julie Wilson – Nienke Doorn, ZooMS: the collagen barcode and fingerprints, *Spectroscopy Europe* 22, 2010, č. 2, s. 6–10

- 14 | Michael Buckley, Zooarchaeology by mass spectrometry (ZooMS): collagen fingerprinting for the species identification of archaeological bone fragments, in: Christina M. Giovias – Michelle J. Lefebvre (edd.) *Zooarchaeology in Practice*, Cham 2018, s. 227–247.



15 | Simon Hickinbotham – Sarah Fiddymment – Timothy L. Stinson – Matthew J. Collins, How to get your goat: automated identification of species from MALDI-ToF spektra, *Bioinformatics* 36, 2020, č. 12, s. 3719–3725.

16 | Petr Menšík – Ladislav Čapek – Josef Hložek – Lenka Starková – Petr Kočár – Romana Kočárová – Zdenka Súvová – Zlata Gersdorfová – Vlastimil Král – Antonín Majer – Petr Šída, *Kněží hora u Katovic. Praveké a raně středověké hradiště a výšinné sídliště v jižních Čechách*, Plzeň 2020, 307 s.

Metoda se skládá ze třech kroků, které jsou uvedeny na Obr. 2. Na začátku jsou vzorky štěpeny enzymem (obvykle trypsinem), a poté jsou vzniklé peptidy izolovány. Následuje měření pomocí techniky hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight).^{[10][12]} Ve své studii Hickinbotham et al. použili ZooMS k živočišné klasifikaci pergamenů z exempláře Evangelia podle Lukáše, které bylo sepsáno kolem roku 1120 n.l. Zde se podařilo určit správně původ 80 z 81 vzorků.^[15]

V této práci bylo testováno proteomické rozlišení recentních kostí devíti živočišných druhů a kostních fragmentů datovaných do 9.–10. a 18. století. Analýza vzorků byla provedena pomocí techniky hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a získaná hmotnostní spektra byla dále vyhodnocena pomocí analýzy hlavních komponent (PCA, Principal Component Analysis).

Experimentální část
Vzorky

Analyzované recentní kostní vzorky kapra, králíka, krávy, krůty, kura, ovce, psa, pstruha a vepře včetně jejich zdrojů jsou uvedené v Tab. 1. Zvířecí kosti získané na základě archeologického výzkumu [Obr. 3] (dodány PhDr. Petrem Menšíkem, Ph.D., ze Západočeské univerzity v Plzni) jsou datované do 9.–10. a 18. století a pochází z výšinné opevněné lokality na k. ú. Katovice^[16] a lokalit městského církevního prostředí jímky v prostoru kláštera na k. ú. v Plasích (Plasy, jímka). Vzorky [Tab. 2] byly očíslovány a jejich zvířecí původ byl dodavatelem sdělen až po dokončení práce.

Kosti byly vrtány modelářskou vrtačkou a ze získaného prášku bylo připraveno pět navážek, každá o hmotnosti 5,0 ± 0,5 mg. Kosti z obou uvedených archeologických lokalit byly zpracovány analogickým způsobem.



OBR. 3 Kosterní nálezy z archeologických výzkumů datovaných do 9. století až první poloviny 10. století a 18. století. Foto: Alena Meledina

Příprava vzorků k měření pomocí MALDI-TOF MS

Pracovní postup je uveden na Obr. 4. Ke každé navážce o hmotnosti 5,0 ± 0,5 mg bylo přidáno 200 µl 0,1M HCl pro odstranění minerální složky kosti. Demineralizace probíhala při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Vzniklé pelety byly resuspendovány pomocí 400 µl 50mM hydrogenuhličitanu amonného. Následná inkubace probíhala při 65 °C po dobu 24 hodin. Ke štěpení a analýze byl použit supernatant. Vzorky byly štěpeny trypsinem při teplotě 37 °C po dobu čtyř hodin. Vzniklé peptidy byly přečištěny pomocí mikrokolonky ZipTip C18, jejíž reverzní fáze je tvořena chemicky modifikovaným silikagelem se zakotveným alkylem obsahujícím 18 uhlíků (Millipore, Thermo Fisher Scientific).

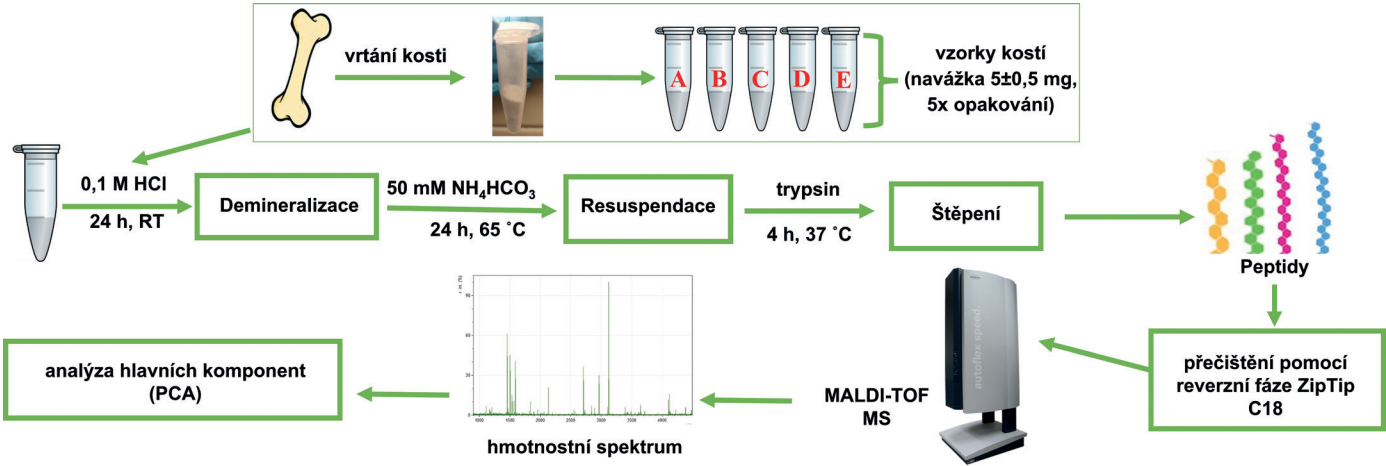
TAB. 1 Zvířecí kosti použité pro přípravu referenčních vzorků.

Zvíře	Použitá kost	Zdroj
Kapr	Žebra	Makro
Králík	Stehenní kost	Rohlik.cz
Kráva	Stehenní kost	Řeznictví MÚÚÚ
Krůta	Stehenní kost	Rohlik.cz
Kur	Stehenní kost	Rohlik.cz
Ovce	Žebro a část páteře	Řeznictví MÚÚÚ
Pes (pudl)	Kost nártu	Veterinární klinika
Pstruh	Žebra	Makro
Vepř	Žebro	Rohlik.cz

TAB. 2 Archeologické kostní vzorky.

Číslo	Zvíře	Lokace	Datace
3	Vepř	Katovice, sonda 5/A2, vrstva 5002, sektor A2, hradiště	9. – pol. 10. stol.
4	Kuře	Plasy, jímka ZK 44, vrstva 15, klášter	18. stol.
5	Kur	Plasy, jímka ZK 41, vrstva 14, klášter	18. stol.

OBR. 4 Pracovní postup použitý v této práci. Autor: Alena Meledina



17 | Pavel Cejnar – Štěpánka Kučková – Aleš Procházka – Ludmila Karamonová – Barbora Svobodová, Principal component analysis of normalized full spectrum mass spectrometry data in multiMS-toolbox: An effective tool to identify important factors for classification of different metabolic patterns and bacterial strains, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 32, 2018, č. 11, s. 871–881.

18 | Štěpánka Kučková – Gabriela Rambousková – Radovan Hynek – Pavel Cejnar – Doris Oltrogge – Robert Fuchs, Evaluation of mass spectrometric data using principal component analysis for determination of the effects of organic lakes on protein binder identification, *Journal of Mass Spectrometry* 50, 2015, č. 11, s. 1270–1278.

Měření vzorků pomocí MALDI-TOF MS a zpracovávání dat pomocí analýzy hlavních komponent (PCA)

K 6 µl matrice (2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB)) byly přidány 2 µl vzorku. Obdobně byl smíchán s matricí i standard (*Pepmix*), ale v poměru 1 µl standardu a 6 µl matrice. Na ocelovou měřicí desku byly ve třech opakováních naneseny 2 µl vzorku a po 1 µl standardu. Z toho vyplývá, že vzorek každého zvířete byl nanesen na destičku 15krát (5 navážek od vzorku byly naneseny ve třech opakováních). Po vykristalizování směsí byla destička vložena do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF/TOF (*Autoflex Speed*, Bruker Daltonics, Německo) a bylo na ni nastaveno napětí 19 kV. Pro měření byl použit pozitivní reflektorový mód s mezí detekce 900–4500 Da. Získaná spektra byla sumarizována do jednoho výsledného spektra s počtem 3000 laserových shotů.

K vyhodnocení získaných spekter byl použit počítačový software mMass a matematický software R pro analýzu hlavních komponent (PCA) s využitím skriptu multiMS-toolbox.^{[17][18]} Pomocí softwaru ms-alone (mass spectrum analysis and data conversion tool) byla extrahována data z hmotnostních spekter do souborů „peaklist“ a „spectrum“. Následně proběhla normalizace dat za použití softwaru multiMS-toolbox pro sumarizaci všech přiřazených píků na stejnou hodnotu. Tento krok umožnil sledování změn intenzit píků u jednotlivých vzorků. Na závěr byla provedena samotná PCA analýza, která transformuje původní proměnné (v našem případě hodnoty *m/z* a intenzity píků) do hlavních komponent. Tyto komponenty popisují míru variability a rozptylu celého souboru dat. Komponenty jsou uspořádány tak, že první komponenta (PC1) obsahuje větší část informace o celkové variabilitě dat. Každá následující komponenta (PC2 a PC3) popisuje co největší část ze zbývajících celkové variability.

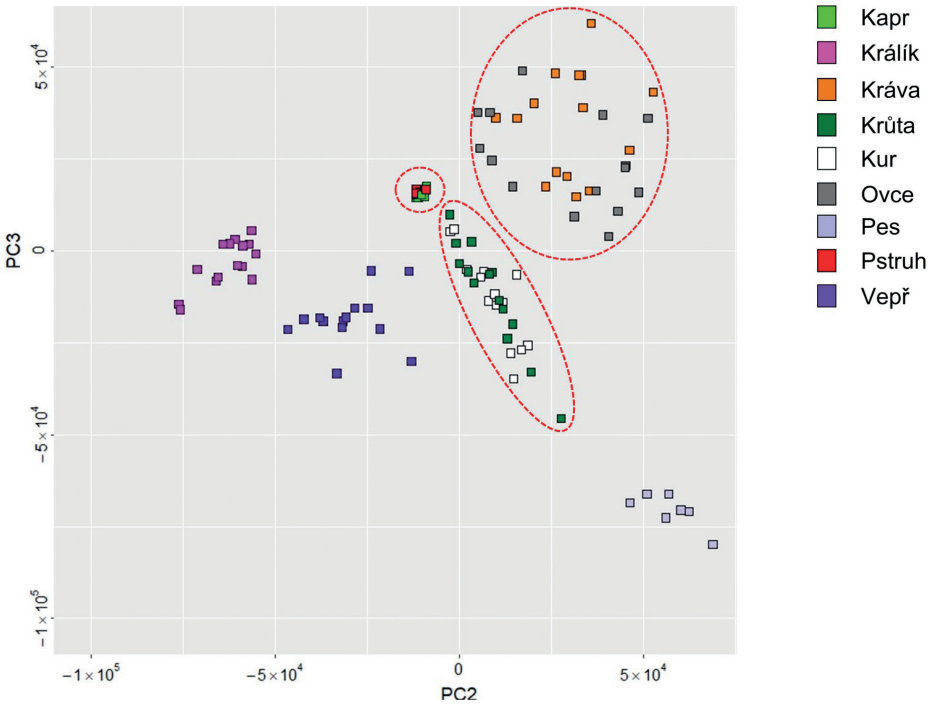
Výsledky a diskuse

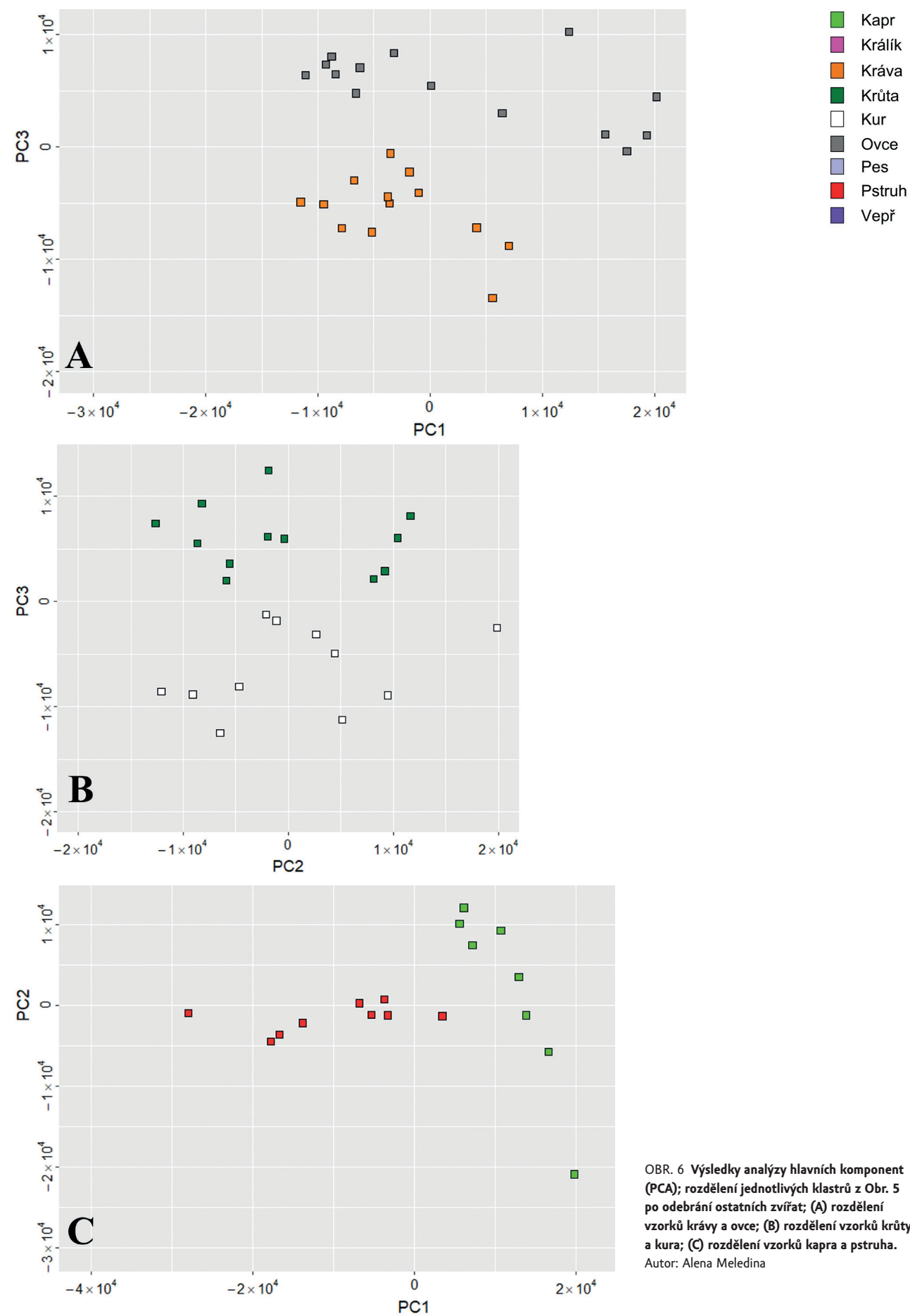
Na začátku bylo zjišťováno, je-li možné odlišit od sebe vzorky recentních kostí pocházejících z různých zvířecích druhů (kapra, králíka, krávy, krůty, kura, ovce, psa, pstruha a vepře). Z Obr. 5 vyplývá, že po vyhodnocení analýzou hlavních komponent vzorky vytvořily šest nepřekrývajících se skupin: přežvýkaví sudokopytníci (kráva, ovce), ptáci (krůta, slepice), ryby (kapr, pstruh), králík, pes a vepř. Rozdíly v proteinovém, respektive v peptidovém složení vzorků způsobují oddálení jednotlivých skupin od sebe. Následně byly vyhodnoceny pouze vzorky přežvýkavých sudokopytníků, kde se podařilo rozdělit vzorky krávy a ovce [Obr. 6]. Poté byly zvlášť vyhodnoceny výsledky ptáků, které se rozdělily celkem na dvě nepřekrývající se skupiny [Obr. 6]. Nakonec, odděleně od ostatních zvířat, byly vyhodnoceny ryby, jejichž vzorky také vytvořily dvě oddělené skupiny [Obr. 6]. Analýza hlavních komponent hmotnostních spekter z MALDI-TOF MS ukázala dobré rozlišení mezi savci, přestože kolagen typu I je velmi konzervativním proteinem.^[13]

Předpokladem pro určení živočišného původu archeologického vzorku bylo, jestli bude během analýzy hlavních komponent zařazen do některé skupiny vytvořené z referenčních vzorků recentních kostí. Bylo proto rozhodnuto, že se pomocí PCA bude současně vyhodnocovat jeden archeologický vzorek spolu s vybranými referenčními vzorky (např. králíkem, krávou, krůtou, kurem, ovci a vepřem). Jak je patrné z Obr. 7, referenční vzorek vepře (fialový) a archeologický vzorek číslo 3 (modrý) se překrývají. Z toho lze usoudit, že tento vzorek pravděpodobně pochází z prasete. Archeologický vzorek č. 4 (je vyznačen žlutou barvou) a č. 5 (světle modrá barva) vytvořily klustry s referenčními vzorky ptáků (slepici a krůtou). Avšak další pokus zjistit pomocí PCA, z jakého ptáka, jestli z krůty nebo kura domácího, vzorky 4 a 5 pocházejí, nebyl uspokojivý. S určitostí ale lze oba archeologické vzorky zařadit do skupiny ptáků.

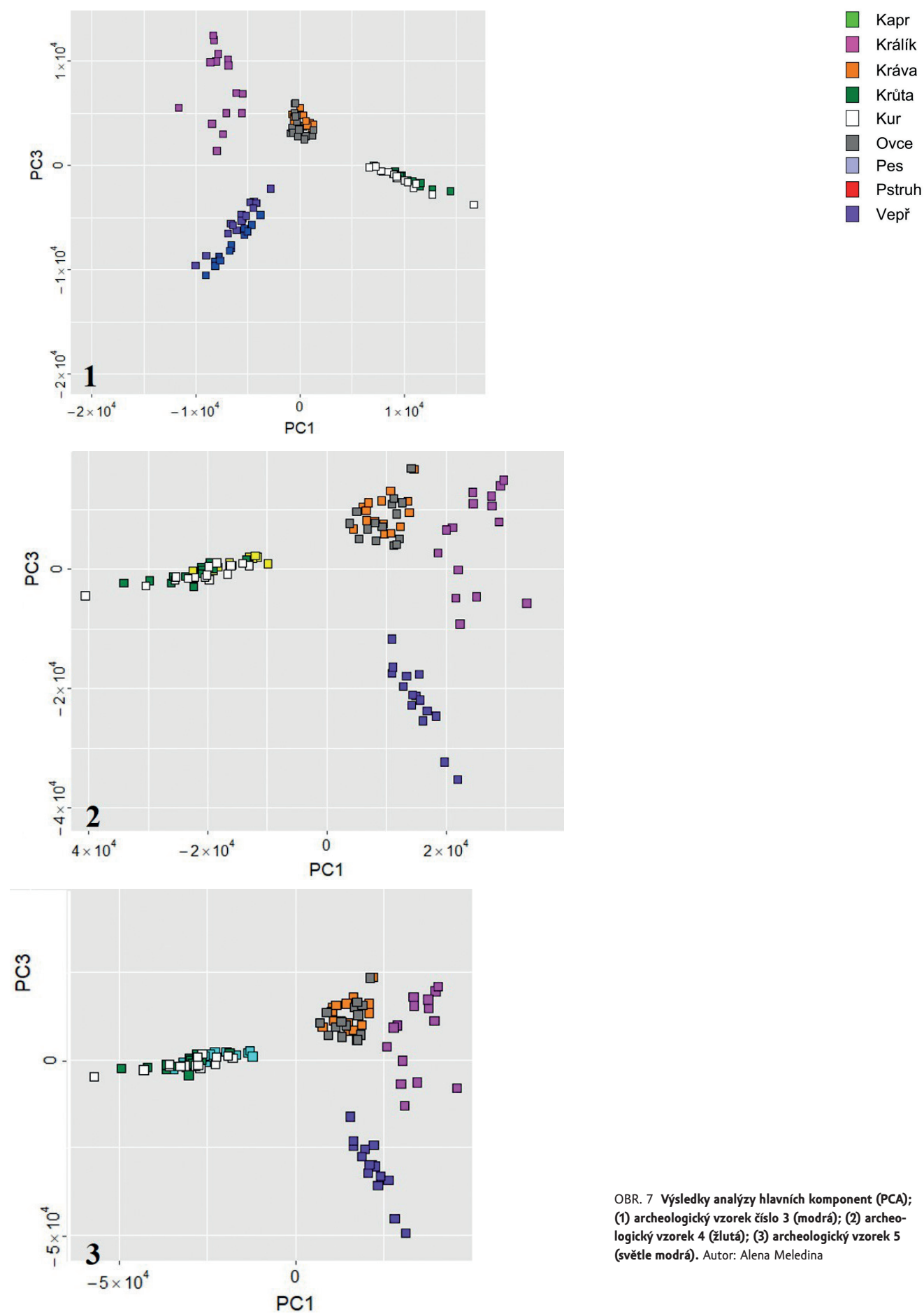
Pro přesnější druhovou identifikaci archeologických vzorků č. 4 a č. 5 ze souboru hmotnostních spekter recentních kostních vzorků byly vyhodnoceny charakteristické hodnoty *m/z* pro vybrané zvířecí druhy [Tab. 3]. Obě charakteristické hodnoty pro kura (1489,8 a 1620,9) byly nalezeny v hmotnostních spektrech archeologických vzorků, které během PCA byly zařazeny do klustru ptáků [Obr. 8]. Z toho lze usoudit, že s velkou pravděpodobností oba vzorky mají původ spíše z kura než z krůty. Správné určení zvířecího původu všech tří archeologických vzorků bylo potvrzeno jejich dodavatelem, PhDr. Petrem Menšíkem, Ph.D., ze Západočeské univerzity v Plzni na základě výsledků druhového určení Mgr. Z. Sůvové. Dále bylo upřesněno, že vzorek 4 pochází z kuřete, a vzorek 5 patří dospělému jedinci kura domácího.

OBR. 5 Výsledky analýzy hlavních komponent (PCA); rozdělení vzorků recentních kostí kapra, králíka, krávy, krůty, kura, ovce, psa, pstruha a vepře. Červené ovály vyznačují klustry přežvýkavých sudokopytníků (krávy a ovce), ptáků (krůty a slepice) a ryb (kapra a pstruha). Autor: Alena Meledina





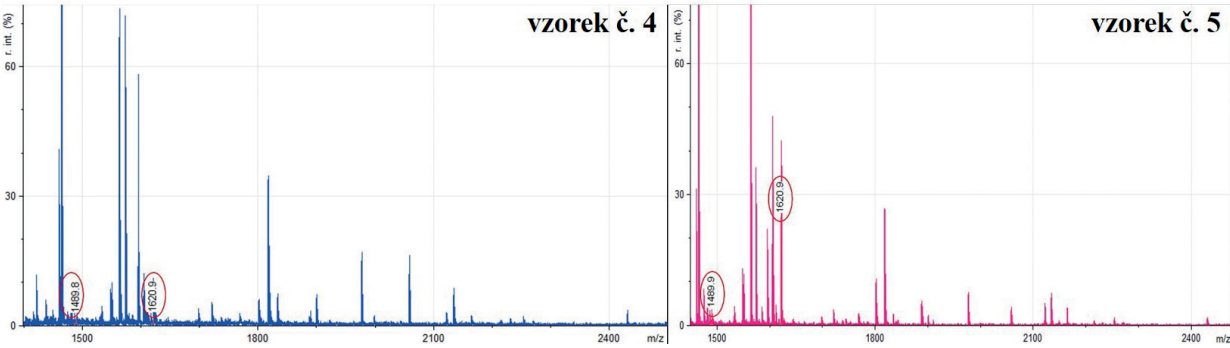
OBR. 6 Výsledky analýzy hlavních komponent (PCA); rozdělení jednotlivých klastrů z Obr. 5 po odebrání ostatních zvířat; (A) rozdělení vzorků krávy a ovce; (B) rozdělení vzorků krůty a kura; (C) rozdělení vzorků kapra a pstruha. Autor: Alena Meledina



OBR. 7 Výsledky analýzy hlavních komponent (PCA); (1) archeologický vzorek číslo 3 (modrá); (2) archeologický vzorek 4 (žlutá); (3) archeologický vzorek 5 (světle modrá). Autor: Alena Meledina

TAB. 3 Charakteristické hodnoty *m/z* získané pomocí MALDI-TOF MS pro zkoumané zvířecí druhy; žlutě jsou vyznačeny hodnoty nalezené v archeologických vzorcích.

Zvíře	<i>m/z</i>
Králík	974,7; 1235,8; 1437,9; 1452,9; 1502,0; 1632,3; 1841,1; 1948,2; 2027,3; 2129,4; 2525,5; 2727,6; 2836,7; 2957,9; 4219,7; 4477,4
Kráva	1493,1; 2781,7
Kur	1489,8; 1620,9
Krůta	1438,8; 1622,9
Ovce	1503,1; 2485,6; 2501,6; 3414,4; 3496,3; 3535,6; 3652,5
Pes	1454,4; 2004,4; 2041,4; 2104,3; 2613,7; 2911,9; 2975,8; 3000,1; 4364,9
Vepř	971,6; 1273,8; 1353,8; 1482,9; 1926,9; 1962,2; 2013,2; 2188,2; 2811,7; 2987,7; 3226,2; 3409,3; 4140,6



OBR. 8 Hmotnostní spektra archeologických vzorků č. 4 a č. 5; červeně jsou označeny charakteristické hodnoty *m/z* pro kura.
Autor: Alena Meledina

Závěr

Na základě dosažených výsledků lze shrnout, že metoda MALDI-TOF MS v kombinaci s PCA má potenciál pro analýzu archeologických kostních nálezů, jelikož tyto vzorky poskytují různé výsledky v závislosti na svém proteinovém složení. Proteiny zodpovědné za rozdělení vzorků (zejména kolagen typu I) mají dlouhou životnost, a díky tomu je možné analyzovat i vzorky archeologických kostí pocházejících i z daleké minulosti.^{[10] [13]}

V této práci se podařilo prokázat, že pomocí metody MALDI-TOF MS a analýzy hlavních komponent (PCA) lze rozlišit vzorky jak čerstvých, tak i archeologických kostí. Určení archeologických vzorků bylo provedeno na základě jejich zařazení do příslušné referenční skupiny a nalezením charakteristických *m/z* hodnot. Podařilo se určit, že archeologický vzorek č. 3 pocházel z vepře (podle informace od dodavatele vzorek skutečně pocházel z prasete). Při společné analýze čerstvých a archeologických vzorků kostí ptáků je sice nebylo možné rozdělit podle jednotlivých druhů, ale ptáci vždy tvořili svůj vlastní klastr nepřekrývající se se vzorky savců. Archeologické vzorky č. 4 a č. 5 byly původem ze slepice. Z toho vyplývá, že současné uspořádání metody umožňuje rozlišit zvířecí původ ptáků na úrovni čeledi (rodiny).

Pro přesnější identifikaci ptačích vzorků až na úroveň druhu bude nutné určit charakteristické peptidy a jejich *m/z* hodnoty zodpovědné za mezidruhové rozlišení pomocí LC-MS/MS (Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry).

Poděkování
Tato práce byla podpořena granty pod správou Interní grantové agentury VŠCHT – A2_FPBT_2023_034 a A1_FPBT_2023_001.

SUMMARY

PROTEOMIC DIFFERENTIATION OF BONES OF VARIOUS ANIMAL SPECIES

Determining the animal origin of bones is needed in the field of archaeology and palaeontology, as well as in the field of food safety (checking compliance with commercial standards for meat and bone meal) and for forensic examination.

The goal of this work was to test the proteomic methodology suitable for differentiating the animal origin of bones based on their protein composition.

This work dealt with the proteomic analysis of bone samples using the mass spectrometry (MS) technique – MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight). Ground bone samples after demineralisation were enzymatically digested with trypsin and purified using reverse phase ZipTip C18. Mass spectra obtained from MALDI-TOF MS were processed by PCA (Principal Component Analysis).

MALDI-TOF MS with PCA evaluation was able to distinguish recent bone samples from five species of mammals (cow, rabbit, sheep, dog, and pig), two birds (chicken and turkey) and two fish (carp and trout). An animal species origin of archaeological bones dating back to the Middle Ages was also identified.

From the obtained data, it can be concluded that this approach has the potential to determine the origin of bone samples based on differences in their protein composition. This information can be used to determine the animal species from which the found archaeological bone material comes.