

Jihočeská univerzita
Fakulta rybářství a ochrany vod

Bakalářská práce

2010

Tomáš Gavenda

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybnářství a ochrany vod

Ústav akvakultury/výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

**ÚROVEŇ ATP U SPERMIÍ
NĚKTERÝCH DRUHŮ RYB**

Autor: Tomáš Gavenda

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Marek Rodina, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: prof. Ing. Otomar Linhart, Dr.Sc.

Místo a rok odevzdání: České Budějovice, 2010

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2006/2007

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tomáš GAVENDA**
Osobní číslo: **V09B052P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Úroveň ATP u spermií některých druhů ryb**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

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

Cílem práce je ověření úrovně ATP spermií ryb s ohledem na rozdíly mezi samci v rámci druhu. Pro potřeby práce bude jako zástupce kostnatých ryb zvolen kapr obecný nebo lín obecný a jako zástupce chrupavčitých ryb jeseter sibiřský nebo jeseter malý. ATP bude ve vzorcích stanovována tzv. bioluminiscenční metodou. Jejím principem je reakce luciferin luciferázy a ATP, při které je emitováno světelné záření, jehož intenzita je přímo úměrná množství ATP ve vzorku. Intenzita emitovaného záření je měřena luminometrem. Koncentrace ATP bude vypočítávána podle kalibrační křivky v závislosti na koncentraci spermií.

Použité přístroje a hlavní chemikálie:

Luminometr TOXALERT 100 firmy MERC

Standard ATP - SIGMA FL-AAS

Luciferin luciferáza FLUKA

Fixační médium pro ATP složení: HEPES 25Mm, EDTA 2 mM, NaN3 3 mM, Mg acetát 10mM

Rozsah grafických prací: 5 - 10 grafů, tabulek a schémat
Rozsah pracovní zprávy: do 35 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- Baulny BO, Labbe C and Maisse G, 1999. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of the European catfish (*Silurus glanis*). Testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology* 39, 177-184.
- Christen R, Schackmann RW and Shapiro BM, 1983. Metabolism of sea urchin sperm: Interrelationships between intracellular pH, ATPase activity and mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* 258, 5392-5399.
- Christen R, Gatti JL and Billard R, 1987. Trout sperm motility: the transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement. *Eur. J. Biochem.* 166, 667-671.
- Cosson J, Billard R, Cibert C, Dréanno C and Suquet M, 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: *The male gamete: From basic science to clinical applications*, (C. Gagnon ed), Cache River Press, Vienna, IL, USA 161-186.
- Cosson J, Linhart, O, Mims S.D, Shelton W.L and Rodina M, 2000. Analysis of motility parameters from paddlefish (*Polyodon spathula*) and shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) spermatozoa. *J. Fish Biology* 56, 1348-1367.
- Dreanno C, Cosson J, Suquet M, Seguin F, Dorange G and Billard R, 1999a. Nucleotide content, oxydative phosphorylation, morphology, and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period. *Molecular Reproduction and Development* 53, 230-243.
- Dreanno C, Cosson J, Suquet M, Cibert C, Fauvel C, Dorange G and Billard R, 1999b. Effects of osmolality, morphology perturbations and intracellular nucleotide content during the movement of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa. *J. Reproduction and Fertility* 116, 113-125.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Marek Rodina, Ph.D.
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant bakalářské práce: prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: 15. února 2007
Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2010


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zetěší 728/III
389 25 Vodňany (3)


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

Ve Vodňanech dne 6. dubna 2010

Abstract:

In the present work we study the possibility of measurement ATP content in inactive fish sperm. The samples were measured after demembration of the fish sperm using the method of chemiluminescence by luciferin-luciferase. Light emission was measured by TECAN Infinite 200 in the mode of luminescence. Content of ATP was calculated and amount of ATP in nM to 10^8 sperm cells is shown in the result of the work. For our work we chose *Cyprinus carpio* and *Acipenser baeri* as model organisms.

key words: ATP, fish sperm cell, luciferin-luciferase

Abstrakt:

V předložené práci studujeme možnost jak měřit obsah ATP v inaktivním spermatu ryb. Z odebraných vzorků byl po demembraci spermií měřen obsah ATP za použití metody chemiluminiscence luciferin-luciferázy. K měření světelné emise byl použit přístroj TECAN Infinite 200 v módu měření luminiscence. Výsledek měření byl zpracován a podle něj vypočten obsah ATP v nM na 10^8 spermií. Zjištěný obsah ATP pro kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a jesetera sibiřského (*Acipenser baeri*) je uveden ve výsledcích práce.

klíčová slova: ATP, rybí spermie, luciferin-luciferáza

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU (viz. opatření rektora R 83). Zveřejnění je elektronickou formou v databázi STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Datum: 25.4.2010

Podpis studenta:

Obsah

1 ÚVOD.....	1
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1 Faktory úspěšné cesty spermie k vajíčku a ATP.....	2
2.2 Spermie a potřeba ATP.....	2
2.3 Druhové srovnání pohybu spermií	4
2.4 Metabolismus spermie.....	4
2.5 Funkční stavba spermií ryb.....	5
2.5.1 Axonema.....	5
2.5.2 Dynein.....	7
2.5.3 Mitochondrie.....	7
2.6 Glykolýza.....	8
2.7 Bioluminiscence.....	9
2.7.1 Obecný princip chemiluminiscence.....	9
2.7.2 Reakce luciferinu.....	10
2.7.2.1 Podrobný popis reakce luciferin-luciferázy.....	10
2.7.3 Bioanalytické vzorkování ATP luciferin-luciferázou.....	12
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	13
3.1 Materiál a metody.....	13
3.1.1 Odběr vzorků spermatu ryb.....	13
3.1.1.1 Odběr vzorků jesetera malého a jesetera sibiřského.....	13
3.1.1.2 Odběr vzorků kapra obecného.....	13
3.1.2 Příprava vzorků k analýze.....	14
3.1.2.1 Zpracování vzorku k analýze.....	14
3.1.2.2 Výpočet obsahu koncentrace spermií.....	15
3.1.2.3 Příprava kalibrační křivky.....	15
3.2 Výsledky.....	17
3.2.1 Hustota spermatu ryb.....	17
3.2.2 Příprava ATP standardu a výpočet kalibrační rovnice.....	18
3.2.3 Naměřené hodnoty luminiscence a obsahu ATP.....	20
3.2.3.1 Obsah ATP pro zástupce kaprovitých.....	20
3.2.3.2 Obsah ATP pro zástupce jeseterovitých.....	22
3.3 Diskuse.....	24
3.4 Závěr.....	25
4 Přílohy.....	26
4.1 Ukázka protokolu měření pro zástupce kaprovitých, přístroj TECAN.....	26
5 Seznam použitých zkratk.....	27
6 Použitá literatura.....	28

1 ÚVOD

Metody řízené reprodukce jsou stále více využívány pro zajištění dostatku váčkového plůdku v požadované kvalitě. Produkce váčkového plůdku je přímo závislá na dobré oplozenosti jiker a dostatečná oplozenost jiker je nutná k úspěšné inkubaci a odchovu váčkového plůdku. Vysokou oplozenost je možné zajistit pouze dostatečným množstvím kvalitního spermatu a správnou technikou oplození (Linhart et Pokorný, 1984). U některých druhů je množství spermatu malé (lín, štika, sumec) a je tedy nutné chovat dostatečné množství kvalitních chovných samců, nejen z hlediska kvality přírůstku a stavby těla, ale také z hlediska dobré oplozovací schopnosti spermatu. Proto je nutné provádět kvalitativní zkoušky pohyblivosti, koncentrace a možnosti uchovatelnosti (kryokonzervace) spermatu generačních ryb. Jakmile se spermie začne pohybovat, mnohé faktory prostředí postupně inhibují pohyb bičíku, až pohyb úplně ustane. Což je základním problémem umělého výtěru ryb. Proto se zkouší mnohé pro prodloužení životnosti (motility spermií), například dodáním energie pro pohyb bičíku ve formě ATP nebo zvýšením oxidativní fosforylace spermií. Zkouší se také různé druhy oplozovacích roztoků, vliv teploty a jiné změny prostředí k docílení delší pohyblivosti spermií. Pohyb bičíku není ve všech fázích od doby iniciace stejně intenzivní a postupně s dobou pohybu klesá jeho intenzita (Cosson et al., 1997). Při posuzování pohyblivosti spermatu, hraje důležitou roli ATP, jakožto primární zdroj energie pro pohyb spermie. Experimentální část bakalářské práce se zabývá metodou stanovení ATP úrovně u inaktivních spermií některých druhů ryb.

2 TEORETICKÁ ČÁST

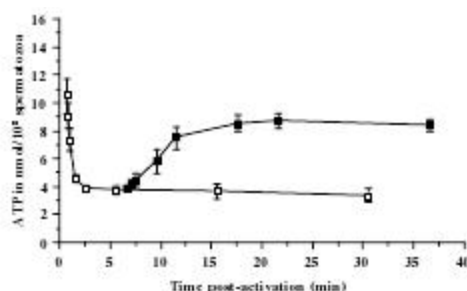
2.1 Faktory úspěšné cesty spermie k vajíčku a ATP

Pohyb spermií ryb je limitován následujícími faktory: primitivní strukturou spermií, endogenním využíváním kapacity substrátu a kvantifikovaným metabolickým procesem, který může zabezpečit optimální pohyblivost spermií jen ve vhodném prostředí (Rodina, 2010). Obsah ATP v krčku spermie zde hraje jednu z klíčových rolí. Pohyblivost je závislá jak na ATP, které je uloženo v buňce spermie před iniciací jejího pohybu, tak na ATP syntetizovaném v průběhu motility spermie (Burness et al., 2005). U většiny ryb s vnějším oplozením nedokáže následná syntéza ATP udržet vysoké tempo hydrolýzy ATP, které je vyžadováno při pohybu spermie a jako důsledek úroveň ATP rychle klesá (Yeates et al., 2007). Tento pokles ATP je přímo roven poklesu frekvence kmitání bičíku a rychlosti pohybu spermie (Christen et al., 1987; Perchec et al., 1998).

2.2 Spermie a potřeba ATP

Kapří spermie jsou neaktivní v semenné plazmě a nebo pokud jsou v roztoku o vysoké osmolalitě ($>400 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$). Spermie kapra se začínají pohybovat, až pokud jsou přeneseny do sladké vody a nebo prostředí s nízkou osmolalitou ($<160 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$). Obsah ATP v buňce spermie je nejvyšší pokud k žádnému pohybu spermie nedošlo a to v imobilizačním médiu o vyšší osmolalitě (např. 200 mM KCl, Tris 30mM, pH 8.0) (Perchec et al., 1998). Po přenesení do prostředí o nižší osmolalitě se v důsledku změny rovnováhy iontů, spermie začíná pohybovat kmitáním bičíku postupným pohybem vpřed. Snížením osmolality prostředí (45 mM NaCl, 5 mM KCl, Tris 30 mM, pH 8.0) nastává hromadný pohyb spermií a v důsledku toho jsou počáteční zásoby ATP rychle spotřebovány. Rychlost kmitání bičíku je závislá na teplotě prostředí, ve spermiích jsou katalyzovány bioenergetické

děje. Při teplotě 20°C obsah ATP ve spermích rychle klesá, z 12 na 4 nmol/10⁸ spermíí, klesá rychlost pohybu spermíí a také frekvence kmitání bičíku (Perchec et al., 1998). Přenesením spermíí po několika minutách do imobilizačního roztoku (>300 mosmol*kg⁻¹), pohyb spermíí ustane a během 10 minut jsou spermie schopny obnovit ATP až na úroveň 90% počátečního množství (Perchec et al., 1998) viz. **Graf 2.1.**



Graf 2.1 Srovnání obsahu ATP ve spermích kapra po přenesení do imobilizačního roztoku. Vzrůstající úroveň obsahu ATP u spermíí po přidání imobilizačního roztoku (■), klesající úroveň ATP u spermíí v aktivačním roztoku (□)(Perchec et al., 1998).

Můžeme tedy soudit, že se ATP vytváří i během pohybu spermie (Perchec et al., 1998). Vysoké energetické požadavky ATP nejsou spermie schopny dlouhodobě krýt, jak se tomu děje např. u spermíí savčích. V mitochondrii probíhají glykolitické a oxidační reakce za tvorby ATP. Pokles rychlosti spermie s frekvencí vlnění bičíku koresponduje s úbytkem koncentrace ATP. Využitelná energie pro potřeby pohybu bičíku se tedy spotřebovává pouze z nahromaděné ATP v pohybovém aparátu bičíku před začátkem aktivace. Po zastavení pohybu bičíku je u spermatu kapra původní hodnoty obsahu ATP dosaženo po 15 minutách, viz. **Graf 2.1.**

2.3 Druhové srovnání pohybu spermií

Délka pohybu spermií kapra a jiných kostnatých ryb po vypuzení do vnějšího prostředí nepřekračuje 2 minuty, u jesetera sibiřského 6 minut (Linhart, 2008). U mořských druhů ryb se délka motility pohybuje okolo 30 minut, v kontrastu s délkou pohybu spermií mořské ježovky, kdy je doba pohybu až několik hodin (Gibbons, 1981). U mořské ježovky je spotřeba ATP kryta mitochondriálním dýcháním a pohyb spermie je výrazně delší oproti spermiím ryb (Christen et al., 1982; Lee et al., 1983), stejně tak u spermií savců (Jeulin et Soufir, 1992). U sladkovodních ryb je na rozdíl od spermií savců rychlé vyčerpání ATP způsobeno rychlým pohybem spermií (u jesetera malého $250 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) (Psenicka et al. 2005) a vysokou frekvencí vlnění bičíku. U pstruha duhového princip zastavení pohybu spermií je ještě o něco složitější a nevyhází pouze z jednoduchého vyčerpání ATP. Ve skutečnosti těsně před ukončením pohybu bičíku není intracelulární úroveň ATP vyčerpána (zbývá zhruba koncentrace 0,5 - 1 mM). Přesto po 1 - 2 s dojde k zastavení vlnění bičíku. Toto náhlé zastavení koresponduje s vysokou úrovní extracelulárního vápníku, které způsobují snížení frekvence vlnění na nulu a intracelulární úroveň ATP je bez využití odčerpána (Billard et Cosson, 1990).

2.4 Metabolismus spermie

Kvalita spermatu je závislá na množství pohybujících se spermií a délce trasy, kterou je spermie schopna překonat na cestě k vajíčku, tím vyšší bude pravděpodobnost oplození, obzvláště u živočichů jako jsou ryby s vnějším oplozením. K pohybu spermie slouží bičík, na jeho struktuře je závislá schopnost pohybu vpřed a bylo dokázáno, že rychlost a doba kmitání bičíku je závislá na obsahu ATP v axonemě bičíku. Demembrací spermie detergentem (nejčastěji Triton X-100) a následnou reaktivací pohybu přidáním ATP je frekvence kmitání bičíku přímo závislá na koncentraci ATP (Gagnon et Laminarde, 2006). Množství ATP potřebné pro pohyb spermie je různé v závislosti na druhu ryby (Mansour et al., 2003; Casselman, 2006).

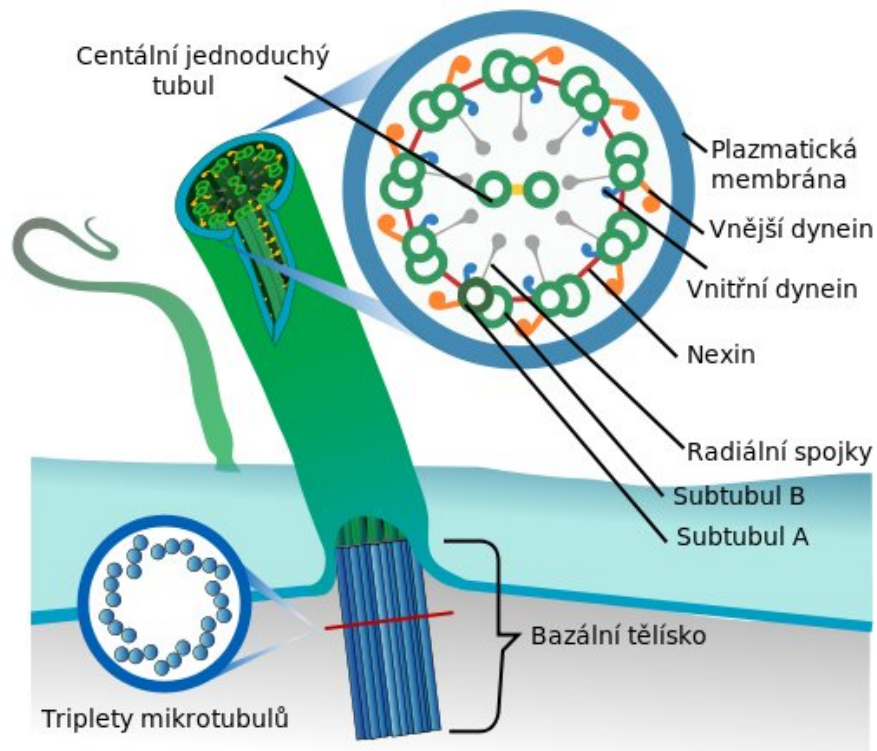
2.5 Funkční stavba spermií ryb

Spermie chrupavčitých a kostnatých ryb s vnějším osemeněním mají jednoduchou strukturu. Hlavní charakteristikou spermií chrupavčitých ryb je protáhlá hlavička s akrosomální strukturou o délce 5-10 μ m, střední částí o délce 1 μ m s dvěma až devíti mitochondriemi a bičíkem o délce 50-100 μ m se zřetelným ukončením a viditelným lemem (Dettlaf et al. 1993). Vajíčka u chrupavčitých ryb mají několik mikropylárních otvorů např. veslonosa amerického od 4 do 12 (Linhart et Kudo, 1997), kdežto u kostnatých ryb se vyskytuje jeden mikropylární otvor (Ginzburg, 1972). Kostnaté ryby mají primitivní strukturu spermií tzv. „aqua sperm“ (Jamieson, 1991). Hlavička spermie je sférická o délce 2 – 3 μ m s absencí typického akrosomu, přítomen je pouze rudiment akrosomu. Seminální plazma neobsahuje pouze kationy Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, ale také organické komponenty glycidy, proteiny, lipidy atd. (Linhart et al., 1991). Spermie mají buněčné rezervy jako jsou fosfolipidy a glykolipidy využitelné v metabolismu (Linhart et al., 1995). Pohybový aparát spermie je představován architekturou mikrotubulí v bičíku, který nazýváme axonema (Cosson, 1996).

2.5.1 Axonema

Vlnivým pohybem bičíku je umožněn postupný pohyb buňky spermie vpřed. Bičík obsahuje dvě základní morfologicky rozlišitelné komponenty. Bazální tělísko ukotvující bičík v buňce a axonemu generující pohyb (Klimeš, 2009). Axonema má strukturu 9 + 2 (Alberts et al., 2002), střed tvoří dva singlety, okraj pak devět dubletů mikrotubulů (viz. 1.1), které probíhají celou délkou bičíku spermie (Inaba, 2003). Základní schéma stavby axonemy je na **Obr. 2.2**. Z mikrotubulů vybíhají dvě řady dyneinových ramének. Vnější raménko je ostře zalomené, zatímco vnitřní raménko se ohýbá směrem do středu axonemy pozvolně. Kolmo k mikrotubulu A jsou umístěny pevné proteinové struktury radiálních spojek. Jejich hlavní funkcí je omezení posunu mikrotubulů a převod tohoto posunutí na ohnutí. Připojení na centrální část nejsou pevná. Vnější dublety mikrotubulů jsou drženy pohromadě

pomocí obvodových spojů, které jsou tvořené nexinem, jsou trvalé a elastické. Jejich funkcí je omezení většího posunutí mezi tubuly (Gibbons, 1981). Pohyb bičíku je výsledkem aktivního klouzání mezi přilehlými mikrotubuly axonemy, které je poháněno ATP pomocí mechanochemického cyklu dyneinových ramének. Raménka spojená s A tubulem interagují s vazebnými místy na B tubulu sousedního dubletu. Pohyb je koordinován a omezován pomocí radiálních spojek a nexinových spojů, které převádějí klouzání na ohyb (Gibbons, 1981).



Obr. 2.2: Struktura axonémy a bazálního tělíska.

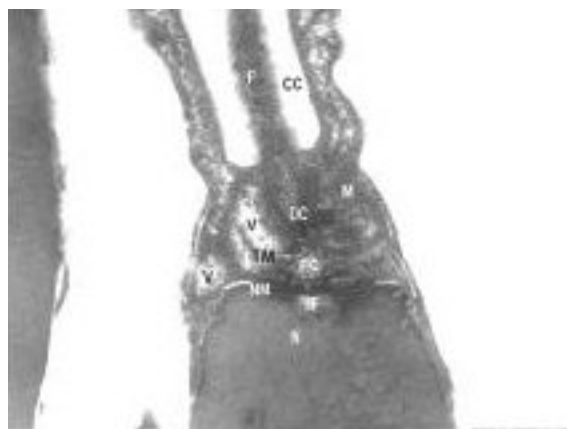
Zdroj: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eukaryotic_cilium_diagram_en.svg, upraveno.

2.5.2 Dynein

Na každém dubletu mikrotubulů jsou dva postranní výběžky, dyneinová raménka, tvořená proteinem dyneinem. Dyneiny jsou motorové proteiny, které mají schopnost štěpit ATP, provádějí hydrolyzu ATP, tj. dynein je ATPázou (Sládeček, 1981). Dělí se na dvě třídy: cytoplazmatické a axonemální. Cytoplazmatické slouží pro pohyb proteinových komplexů podél mikrotubulů. Axonemální poté slouží k pohybu bičíku, konkrétně vytvářejí posunutí mezi mikrotubuly, které je poté převáděno na pohyb (Klimeš, 2009).

2.5.3 Mitochondrie

Mitochondrie je semiautonomní, membránou obalená organela, kterou lze nalézt u většiny eukaryotických buněk, v buňce se jich může vyskytovat několik stovek, ale i sto tisíc (Wikipedie: Mitochondrie, 15.2.2010). U kaprovitých ryb se množství mitochondrií v buňce spermie pohybuje od 2 - 10 a jsou lokalizovány nesorušeně ve středním oddílu, na rozdíl od spermií savců kde je množství mitochondrií 75 - 100 a přiléhají přímo k bičíku ve formě spirály (Psenicka et al., 2006). U kapra a jiných kaprovitých ryb je bičík oddělen od mitochondrií cytoplazmatickým kanálem a přenos ATP nejde přímo od mitochondrií k axonémně bičíku (Billard, 1970). U jesetera sibiřského je po obvodu krčku spermie 3 - 6 mitochondrií (Psenicka et al., 2007), střední část krčku spermie jesetera sibiřského znázorňuje **Obr 2.3**. V procesu buněčného dýchání v mitochondrii vzniká energeticky bohatý adenosintrifosfát (ATP) používaný jako zdroj energie pro potřeby buňky. Krátká doba pohybu spermií ryb s vnějším oplozením souvisí s nedostatečnou kapacitou oxidativní fosforylace mitochondrií (Christen et al., 1987).



Obr 2.3 Krček spermie jesetera

sibiřského pod elektronovým mikroskopem; mitochondrie (M), bičík (F), cytoplazmatický kanál (CC) Zdroj: (Psenicka et al., 2007)

2.6 Glykolýza

Při ejakulaci savců se spermie dostávají do prostředí i s množstvím seminální plazmy. V seminální plazmě jsou obsaženy energeticky bohaté látky (glukóza, fruktóza), které dále slouží jako zdroj energie pro syntézu ATP. Savčí spermie se díky takto příznivým podmínkám mohou pohybovat v řádu hodin (Mukai and Okuno, 2004). Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenasa-S (GAPDS) a pro spermie specifické glykolitické enzymy, jsou odpovědny za více než 90% ATP vytvářené v buňce spermie (Miki et al., 2004). Glykolýza je metabolická dráha, kdy z molekuly glukózy vznikají dvě molekuly ATP a NADH v cytosolu buňky (Wikipedie: Glykolýza, 6.4.2010). GAPDS je přítomna v cytoskeletu myších spermií v okolí bičíku a je schopna krýt zásoby ATP pro jeho pohyb, testy ukázaly, že oxidativní fosforylace mitochondrií je pro zásobování dyneinu ATP nevýznamná a vyřazení genu pro expresi GAPDS, vede k neplodnosti (Miki et al., 2004). Spermie pstruha duhového mají také enzymatické kapacity pro glykolýzu, pokud dojde k iniciaci motility ve fyziologickém roztoku, úroveň ATP je schopna se obnovit,

nedojde k osmotické degradaci buňky, ale spíše k vyčerpání ATP a tím k ustání pohybu bičíku, glykolýza není schopna dlouhodobě krýt počáteční zásoby ATP. Glykolitické štěpení cukrů probíhá i v neaktivovaném spermatu (Lahnsteiner et al., 1993).

2.7 Bioluminiscence

Bioluminiscence, vydávání studeného světla organismy za účelem komunikace, je dnes významně využíváno k získávání informací o procesech v živých buňkách a v bioanalytických metodách. Jedním z nejvíce využívaných a studovaných je reakce luciferin-luciferázy, její využití je převážně k detekci a kvantifikování obsahu ATP v živých buňkách. Princip bioluminiscence pramení ze schopnosti přeměny potenciální energie chemických vazeb na světlo (Viviano et Ohmiya, 2006).

2.7.1 Obecný princip chemiluminiscence

Při chemiluminiscenční reakci musí být splněny tři základní požadavky:

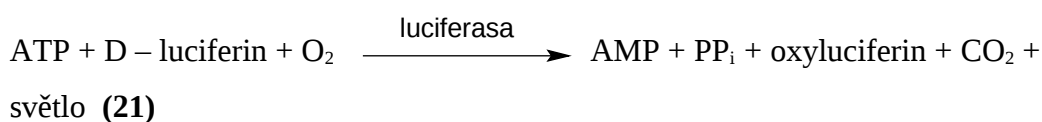
- Při reakci musí vznikat dostatek energie, aby došlo k excitaci elektronů. Proto musí být reakce exotermní a obvykle je to oxidace.
- Musí existovat způsob jak tuto energii usměrnit do excitace elektronů. Jestliže se chemická energie ztrácí ve formě tepla jako obvykle, pak se chemiluminiscence neobjevuje.
- Excitovaný produkt musí být schopný ztrácet svoji energii buď ve formě fotonu nebo ji převádět na fluoreskující sloučeniny. Přímá emise fotonu z excitovaného produktu obvykle poskytuje krátké záblesky světla, zatímco

transfer energie na fluoreskující sloučeniny se většinou projevuje jako dlouhodobá (v minutách) světelná emise (Štern, 2000).

2.7.2 Reakce luciferinu

Reakce luciferin-luciferázy je exotermní reakce. Luciferin je oxidován, přes peroxidový meziprodukt na excitovaný-oxyluciferin, který se postupně rozkládá a tím emituje světelné záření, jako katalyzátor je nezbytná luciferáza (Viviano et Ohmiya, 2006; Hastings et Morin, 1998).

Průběh reakce vystihuje tato sumární rovnice (21):

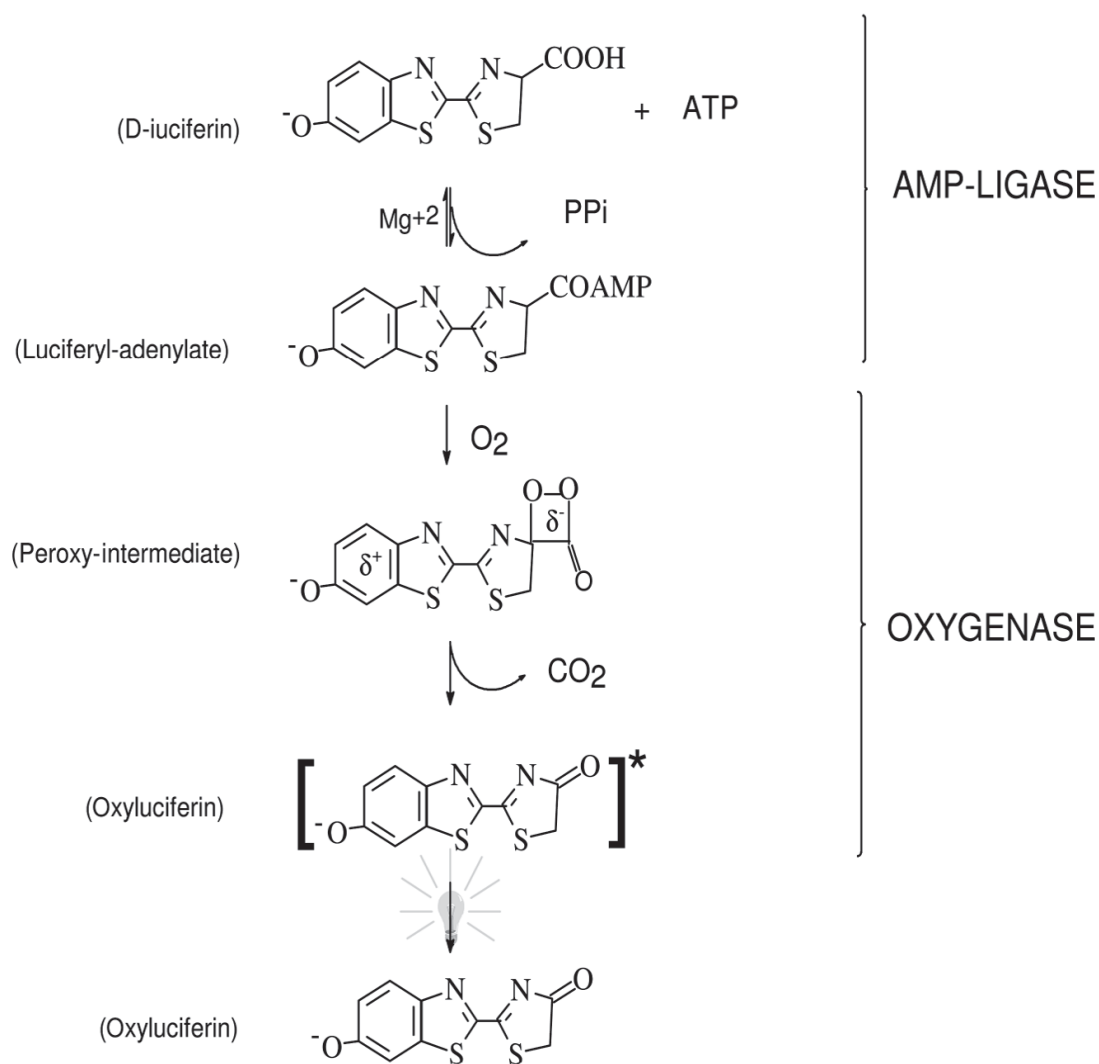


2.7.2.1 Podrobný popis reakce luciferin-luciferázy

Nejprve katalyzátor luciferáza aktivuje D-luciferin adenylací za spotřeby ATP. Během druhé fáze reakce luciferáza katalyzuje oxidaci luciferin-adenilátu na peroxidový meziprodukt (dioxetanon), který se štěpí na oxid uhličitý a excitovaný oxyluciferin. Při rozkladu excitovaného oxyluciferinu vzniká foton zelenožluté barvy viditelného světla, úroveň světelné emise je 88%, viz níže **Obr.2.4** a **Obr.2.5** (Viviano et Ohmiya, 2006).

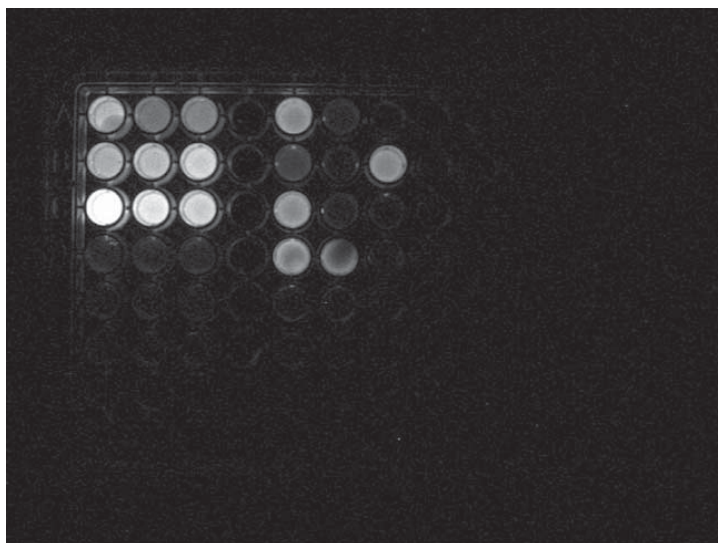
Aktivita luciferázy závisí na řadě parametrů včetně: D – luciferinu, hořčnatých iontů, pufru (typ, koncentrace a pH), aktivátorech (např. PP_i), inhibitoroch (např. analogy luciferinu) a přídatných sloučenin s vlastnostmi lyofilizace nebo stabilizace reagentů. Nízká kvalita přípravku D – luciferinu často obsahuje inhibitory, které mohou ovlivnit světelnou emisi dokonce na úroveň pod 0,1%. S vysokou kvalitou přípravku D – luciferinu je optimum koncentrace okolo 0,4 mM.

Koncentrace hořčnatých iontů by měla být v nadbytku oproti často přidávaným chelátům jako EDTA. S přidavkem 0,5 – 2 mM EDTA je zajištěna vysoká stabilita ATP roztoku. Optimální koncentrace PPi je kolem 1 M, zatímco vyšší koncentrace jsou inhibující (Divíšková, 2006; Lundin, 2000).



Obr.2.4 Schématický popis biolumiscenční reakce katalyzované luciferásou.

Zdroj: VIVIANO, V.R.; OHMIYA, Y. *Photoproteins in Bioanalysis*. 2006



Obr.2.5 Luminiscence luciferin-luciferázy v závislosti na koncentraci ATP ve vzorku.

Zdroj: VIVIANO, V.R.; OHMIYA, Y. *Photoproteins in Bioanalysis*. 2006

2.7.3 Bioanalytické vzorkování ATP luciferin-luciferázou

Reakce luciferin-luciferázy je využívána ke kvantifikování obsahu ATP ve vzorku (dolní hranice měřitelnosti 0,01 fmol), měření obsahu biomasy, mikrobiální kontaminace v potravinách, hygienických testech, k měření rychlosti obnovování krevních destiček, nervů, svalů a plasmy (Viviano et Ohmiya, 2006; Campbell, 1988).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentu je stanovení energetického obsahu ATP v inaktivním spermatu generačních ryb, pomocí bioluminiscenční metody měření ATP s ohledem na rozdíly mezi samci v rámci druhu. Pro potřeby práce byl jako zástupce kostnatých ryb zvolen kapr obecný (*Cyprinus carpio*) a jako zástupci chrupavčitých ryb jeseter malý (*Acipenser ruthenus*) a jeseter sibiřský (*Acipenser baeri*).

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Odběr vzorků spermatu ryb

Odběr vzorků spermatu probíhal na VÚRH ve Vodňanech. K pokusu bylo použito sperma generačních ryb jesetera malého, jesetera sibiřského a kapra obecného.

3.1.1.1 Odběr vzorků jesetera malého a jesetera sibiřského

Pět dní před výtěrem byly ryby přeneseny do recirkulačních nádrží v líhni, teplota vody v nádrži byla 14°C, spermiace mlíčáků byla indukována jednorázovou dávkou kapří hypofýzy v dávce 4 mg*kg⁻¹ váhy ryby. Odběr spermatu se uskutečnil 48 hodin po hormonální stimulaci k výtěru, sperma bylo odebráno přes urogenitální papilu a dále skladováno při 4°C.

3.1.1.2 Odběr vzorků kapra obecného

Ryby byly před výtěrem přeneseny do recirkulačních nádrží v líhni a indukovány k výtěru dávkou kapří hypofýzy 2 mg*kg⁻¹ váhy ryby. Po 24 hodinách bylo sperma odebíráno a uchováno při 4°C.

3.1.2 Příprava vzorků k analýze

Odebraný vzorek spermatu se naředil neaktivujícím ředidlem, pro jeseterovité 1:50 a ryby kaprovité 1:1000. K zjištění koncentrace spermií byla použita metoda výpočtu pomocí Burkerovy komůrky a část vzorku byla po demembranaci spermií použita k měření ATP na luminometru.

Chemikálie:

fyziologický roztok s přídavkem KCl (20mM KCl, 9% NaCl)

fixační médium (100 mM Tris, 4 mM EDTA, pH = 7,5)

luciferin-luciferáza

3.1.2.1 Zpracování vzorku k analýze

1. Naředit sperma neaktivujícím ředidlem, jeseterovité 1:200 a ryby kaprovité 1:1000 a vypočteme koncentraci spermií.
2. Zahřát ve vodní lázni, v každé zkumavce 5 ml fixačního média (100 mM Tris, 4 mM EDTA, pH = 7,5) na teplotu 95 °C.
3. Přidat 500 µl naředěného spermatu, jednu nechat prázdnou = slepý vzorek.
4. Zahřívát 5 minut ve vodní lázni při teplotě 95 °C, poté zchladit.
5. Odstředit (10 min, při 5000 ot.).
6. Odebereme 1 ml vzorku do tří zkumavek eppendorf.

7. Vytvoříme kalibrační řadu za použití vzorků ATP o známé koncentraci, změříme svítivost a vypočteme kalibrační rovnici.
8. Na mikrotitrační destičku odpipetujeme vždy 50 μ l vzorku a 50 μ l ATP reagentu, změříme svítivost a na základě kalibrační rovnice vypočteme koncentraci ATP.

3.1.2.2 Výpočet obsahu koncentrace spermií

1. Naředit sperma fyziologickým roztokem, v poměru 1:200 u ryb jeseterovitých a u ryb kaprovitých 1:1000
2. Provést odečet počtu spermií ve čtvercích Burkerovy komůrky o velikosti 0,1x0,2x0,2mm.
3. Podle koeficientu ředění a velikosti čtverců Burkerovy komůrky, provedeme výpočet koncentrace na 10^8 spermií na ml spermatu.

3.1.2.3 Příprava kalibrační křivky

Určení ATP

Určení ATP ve vzorcích bylo prováděno chemiluminiscenční metodou, přesněji ATP analýza, na přístroji TECAN Infinite M200 v módu měření lumiscence. Během celého měření se používal ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II firmy Roche. Jedna sada kitu obsahovala (Roche, 2005):

- ATP reagent – lyofilizovaný reagent s luciferázou a luciferinem
- ATP standard (10 mg ATP)

Princip stanovení ATP vystihuje rovnice **Obr.2.4** popsaná v kapitole **2.7.2.1**. Intenzita světla je přímo úměrná množství ATP. Složení reakční směsi bylo následující:

- 1) 50 μ l vzorku
- 2) 50 μ l ATP reagentu

S jedním vzorkem se provedlo pět měření. Ze získaných hodnot se vypočítalo množství ATP ve vzorku podle kalibrační křivky.

Určení kalibrační rovnice

ATP standart se naředil destilovanou vodou a vypočetla se koncentrace ATP na základě množství vody a obsahu ATP, takto získaný standart o známém obsah ATP se 1000x naředil a dále podle požadované koncentrace pro sestrojení kalibrační křivky (viz. **Tab.3.1**)

po naředění 1000x ještě x krát	μ l předředěného ATP	μ l pufru
1000	1	999
500	3	997
200	5	995
100	10	990
50	20	980
25	40	960
17	60	940
13	80	920
10	100	900

Tab.3.1 Poměr ředění ATP pro sestrojení kalibrační křivky.

Získané hodnoty svítivosti ke koncentraci logaritmičsky převedeme a sestrojíme kalibrační křivku a vypočteme kalibrační rovnici. Na základě kalibrační rovnice, vypočteme množství ATP ve vzorcích spermií ryb, převedeme dle koncentrace na nmol ATP pro $1 \cdot 10^8$ spermií.

3.2 Výsledky

3.2.1 Hustota spermatu ryb

Ke zjištění hustoty spermatu byla použita Burkerova komůrka (viz. 3.1.2.2.), naměřené hodnoty jsou uvedeny níže, pro jeseterovité **Tab.3.2** a kaprovité **Tab.3.3**

číslo vzorku	evidenční číslo ryby	koncentrace spermií v $10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$
Acipenser ruthenus		
1	4030	14,1
2	4035	13,1
3	bez značky	2,9
4	4021	1,9
Acipenser baeri		
5*	2113	5,4
6*	2106	2
7*	2108	1,1
8	2106	9,6
9	2108	6,8
10	2113	9,4

* jednalo se o druhý odběr spermatu stejných ryb po dvou dnech

Tab.3.2 Hustota spermatu zástupců jeseterovitých v 10^8 spermií / ml (* jednalo se o druhý odběr spermatu stejných ryb po dvou dnech)

číslo vzorku	evidenční číslo ryby	koncentrace spermií v $10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$
1	1025	33,5
2	6903	40,38
3	4980	138,75
4	4255	191,25
5	5977	121,25
6	4266	207,5

Tab.3.3 Hustota spermatu kaprovitých v 10^8 spermií / ml (*Cyprinus carpio*)

Hustota spermatu se pohybovala u jesetera malého $2-14 \cdot 10^8$ spermií na mililitr spermatu, u jesetera sibiřského $1-10 \cdot 10^8$. Hustota spermatu u ryb jeseterovitých se pohybuje od $1,4 - 75,5 \cdot 10^8$ spermií na mililitr spermatu (Ginzburg, 1972) a u jesetera sibiřského $0,5-5 \cdot 10^8$ (Gallis et al., 1991). S tím, že koncentrace spermatu je vyšší s prodlužující se dobou hormonální stimulace (Williot et al., 2000). Hustota spermií kapra byla v rozmezí od 33,5 do $207,5 \cdot 10^8$ spermií / mililitr. Kapří sperma je vysoce koncentrováno $40-300 \cdot 10^8$ spermií ml^{-1} a velice viskózní (Perchec et al., 1995).

3.2.2 Příprava ATP standardu a výpočet kalibrační rovnice

Po smísení 10,4mg ATP standardu ($M_m = 605,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) a 1,0003 ml destilované vody, jsme získali ATP standard o finální koncentraci $17,18 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

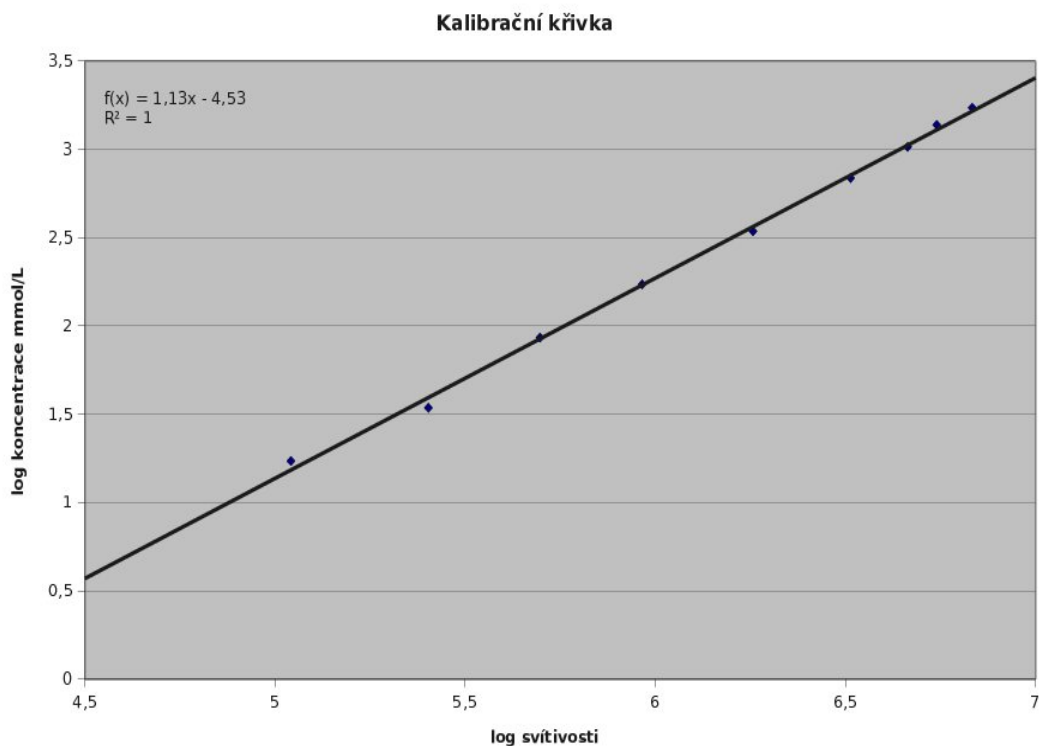
Výpočet kalibrační rovnice byl proveden na základě metody popsané v kap 3.1.2.3..

Průměr naměřených hodnot je uveden níže v **Tab.3.4** a grafické znázornění **Obr.3.1**, na základě těchto hodnot byla vypočtena kalibrační rovnice (31).

po naředění 1000x ještě x krát	finální koncentrace mmol	log(x) finální koncentrace	svítivost	log(x) svítivosti
1000	17,18	1,24	110124,4	5,04
500	34,36	1,54	253146,4	5,4
200	85,90	1,93	497741,0	5,7
100	171,79	2,24	924099,4	5,97
50	343,58	2,54	1807884,2	6,26
25	687,17	2,84	3264795,0	6,51
17	1030,75	3,01	4611535,0	6,66
13	1374,34	3,14	5501045,6	6,74
10	1717,92	3,24	6816546,2	6,83

Tab.3.4. Naměřené hodnoty svítivosti ATP standardu.

$$f(x) = 1,13x - 4,53 \quad (31)$$



Obr.3.1 Závislost svítivosti na obsahu ATP.

3.2.3 Naměřené hodnoty luminiscence a obsahu ATP

3.2.3.1 Obsah ATP pro zástupce kaprovitých

Svítivost každého vzorku byla v módu luminiscence pětkrát proměřena **Tab.3.5**, ukázka protokolu měření viz. Kapitola 5 **Přílohy**, průměrné hodnoty měření jsou uvedeny v **Tab.3.6**, koncentraci ATP vypočteme podle vzorce (32), provedeme korekci na obsah ATP v médiu. Tři hodnoty obsahu ATP ve spermatu pro každou rybu, jsou uvedeny v **Tab.3.7**.

Cycle Nr.	1	2	3	4	5
Time [s]	0	52,2	104,4	156,5	208,7
Temp. [° C]	30	30	29,7	29,8	29,8
E1	2617	2672	2712	2687	2622
E2	117275	121344	123411	124154	123768
E3	148313	154133	157259	158209	158041
E4	542553	563481	573506	575828	574702
E5	358753	376256	384240	387753	387414
E6	424172	442941	451990	453342	451705
E7	704152	733906	744510	747326	743629

Tab.3.5. Naměřené hodnoty svítivosti pro první sadu vzorků: E1= slepý vzorek

$$y = 10^{(1,13 \times \log \text{svítivosti} - 4,53)} \quad (32)$$

číslo vzorku	evidenční číslo ryby	hodnota naměřené svítivosti		
		vzorek č. 1.	vzorek č.2	vzorek č.3
1	1025	121990,4	111244	119311,2
2	6903	155191	210889,6	149033,4
3	4980	566014	470835,6	493160,2
4	4255	378883	785865,6	494369,6
5	5977	444830	335943	412032,4
6	4266	734704,6	790980,8	690185,4

Tab 3.6. Průměrné hodnoty svítivosti, vždy pěti měření luminiscence daného vzorku.

Obsah ATP v médiu (slepý pokus) se rovnal průměrné svítivosti 2687 a odpovídal koncentraci $0,22 \text{ nM} \cdot \text{l}^{-1}$.

číslo vzorku	evidenční číslo ryby	obsah ATP v nM na 10^8 spermií			
		vzorek č. 1.	vzorek č.2	vzorek č.3	Průměr hodnot
1	1025	5,571	5,012	5,431	5,34
2	6903	6,090	8,645	5,814	6,85
3	4980	7,738	6,278	6,617	6,88
4	4255	3,562	8,160	4,820	5,51
5	5977	6,734	4,894	6,173	5,93
6	4266	6,959	7,567	6,482	7

Tab.3.7. Obsah ATP v nM na 10^8 spermií pro zástupce kaprovitých

Obsah ATP ve spermiích kapra obecného před začátkem aktivace spermií je $6,25 \pm 0,9 \text{ nM} \cdot 10^8$ spermií, což je hodnota dvakrát nižší než $12 \text{ nM} \cdot 10^8$ spermií uváděná (Perchec et al., 1995).

3.2.3.2 Obsah ATP pro zástupce jeseterovitých

Před měřením obsahu ATP ve vzorcích spermatu jeseterovitých ryb byla zjištěna kalibrační rovnice (viz. 9.2), funkce (33) a výpočet proveden podle rovnice (34), s korekcí na obsah ATP v médiu.

$$f(x) = 1,09x - 3,89 \quad (33)$$

$$y = 10^{(1,09 \times \log \text{svítivosti} - 3,89)} \quad (34)$$

Obsah ATP v médiu (slepý pokus) se rovnal průměrné svítivosti 1530 a odpovídal koncentraci $0,38 \text{ nM} \cdot \text{l}^{-1}$.

Hodnoty luminiscence vzorků pro zástupce jeseterovitých uvádí **Tab 3.8**, a obsah ATP v nM na 10^8 spermií **Tab 3.9**.

číslo vzorku	evidenční číslo ryby	hodnota naměřené svítivosti		
		vzorek č. 1.	vzorek č.2	vzorek č.3
Acipenser ruthenus				
1	4030	152218	157385	166408
2	4035	125217	139907	156148
3	bez značky	29408	25541	22953
4	4021	81445	100841	102348
Acipenser baeri				
5*	2113	194527	344525	365025
6*	2106	74045	72771	81195
7*	2108	36583	38280	34872
8	2106	202158	212270	209784
9	2108	208184	204875	220642
10	2113	46817	37390	34775

* jednalo se o druhý odběr spermatu po dvou dnech od stejných ryb

Tab 3.8 Průměrné hodnoty svítivosti, vždy pěti měření luminiscence daného vzorku pro zástupce jeseterovitých.

číslo vzorku	evidenční číslo ryby	obsah ATP v nM na 10 ⁸ spermií			Průměr hodnot
		vzorek č. 1.	vzorek č.2	vzorek č.3	
Acipenser ruthenus					
1	4030	2,210	2,293	2,437	2,31
2	4035	1,931	2,180	2,459	2,19
3	bez značky	1,941	1,654	1,464	1,69
4	4021	1,319	1,669	1,696	1,56
Acipenser baeri					
5*	2113	7,561	14,125	15,045	12,24
6*	2106	7,066	6,931	7,822	7,27
7*	2108	5,866	6,172	5,559	5,87
8	2106	4,436	4,680	4,620	4,58
9	2108	6,467	6,355	6,892	6,57
10	2113	0,904	0,703	0,649	0,75

* jednalo se o druhý odběr spermatu po dvou dnech od stejných ryb

Tab 3.9 Obsah ATP v nM na 10⁸ spermií pro zástupce jeseterovitých. (* jednalo se o druhý odběr spermatu stejných ryb po dvou dnech)

U spermií jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) byl naměřen v neaktivovaném spermatu obsah ATP **1,95 ± 0,35 nM*10⁸ spermií** a jesetera sibiřského (*Acipenser baeri*) byla koncentrace ATP **4 ± 3,2 nM*10⁸ spermií** a po dvou dnech od prvního odběru **8,5 ± 3,8 nM*10⁸ spermií**.

3.3 Diskuse

Obsah ATP v buňce není stálý, ale je ovlivňován např. strukturou buňky, stadiem růstu a růstovou teplotou. Stanovení obsahu ATP ve spermatu ryb navazuje na metodu mikroskopického posouzení pohyblivosti spermií, z hlediska procentuální pohyblivosti spermií a charakteru jejich pohyb. Na obsah ATP ve spermatu má vliv teplota při tření ryb a teplota při skladování spermatu. Čím vyšší je teplota při tření, tím vyšší je obsah ATP a čím delší je skladování a čím vyšší teplota, tím nižší obsah ATP, nejlíp konzervováno je ATP, když jsou spermie uchovávány v glycerolu (Sadeghi et al., 2009). Hustota spermatu se pohybovala u jesetera malého $2-14 \cdot 10^8$ spermií na mililitr spermatu, u jesetera sibiřského $1-10 \cdot 10^8$, což odpovídalo hodnotám uváděných v literatuře (Ginzburg, 1972; Gallis et al., 1991). Hustota spermií kapra byla v rozmezí od 33,5 do $207,5 \cdot 10^8$ spermií / mililitr, hodnota shodná s literaturou, kdy kapří sperma je vysoce koncentrováno $40-300 \cdot 10^8$ spermií ml^{-1} a velice viskózní (Perchec et al., 1995). Z provedeného pokusu lze soudit, že na obsah ATP ve spermiích ryb má vliv také kondice ryb a čas odběru, zralost spermií k výtěru. Významný rozdíl mezi obsahem ATP kaprovitých a chrupavčitých ryb se nepotvrdil, u jeseterovitých ryb však byla zaznamenána vysoká nevyrovnanost obsahu ATP u jednotlivých ryb a jednotlivých výtěrů ryb; což však může souviset s nevhodností použité metody pro měření obsahu ATP u spermií jeseterovitých. Celkové množství spotřebované ATP od začátku do konce pohybu, může také souviset s enzymatickou kapacitou buňky pro glykolýzu, mnohem spíše než s kapacitou oxidativní fosforylace mitochondrií (Miki et al., 2004). V tomto případě by pohyb spermií mohl být ovlivněn obsahem glukózy v seminální plazmě. Vypočtený obsah ATP ve spermiích kapra obecného před začátkem aktivace spermií byl **6,25** $\text{nM} \cdot 10^8$ spermií, což je hodnota dvakrát nižší než $12 \text{ nM} \cdot 10^8$ spermií uváděná (Perchec et al., 1995). U spermií jesetera sibiřského byla průměrná hodnota koncentrace ATP **6,21** $\text{nM} \cdot 10^8$ spermií. Žádný rozdíl v obsahu ATP ve spermiích kaprovitých a zástupce jeseterovitých ryb nebyl zaznamenán.

3.4 Závěr

Práce přináší literární přehled o funkci ATP v buňce rybí spermie, konkrétněji se zabývá částmi spermie, kde se ATP buďto spotřebovává a nebo může vytvářet. Experimentální část práce se zabývá možnostmi využití chemiluminiscenční metody na určení obsahu ATP v rybích spermích *Cyprinus carpio*, *Acipenser baeri*. Řešil se metodický postup a použitá metoda pro stanovení ATP ve spermích ryb, po porovnání s autory lze metodu chemiluminiscence označit za vhodnou pro stanovení obsahu ATP u spermíí kaprovitých ryb.

5 Seznam použitých zkratek

ATP	adenosintrifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctovou
GAPDS	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenasa-S
M _m	molekulární hmotnost
NADH	nikotinadenindinukleotid
PP _i	pyrofosfát
Tris	Tris(hydroxymetyl)aminometan

6 Použitá literatura

ALBERTS, B., et al. *Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition: A Problems Approach*. Garland : Taylor and Francis, 2002. 1616 s.

BILLARD, R. *Comparative spermatology*.. New York : Academic Press, 1970. Ultrastructure comparée de spermatozoides de quelques poissons téléostéens, s. 71-79.

BILLARD, R.; COSSON, M.P. *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Boston : CRC Press, LLC, 1990. 352 s.

BURNES, G.; MOYES, CD.; MONTGOMERIE, R. Motility, ATP levels and metabolic enzyme activity of sperm from bluegill (*Lepomis macrochirus*).. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*.. 2005, 140, s. 11-17.

CAMPBELL, A.K. *Chemiluminescence: Principles & Applications In Biology And Medicine*. Chichester : Vch Pub, 1988. 608 s.

CASSELMAN, S.J.; SCHULTE-HOSTEDDE, A.I.; MONTGOMERIE, R. Sperm quality influences male fertilization success in walleye (*Sander vitreus*).. *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*. 2006, 63, s. 2119-2125.

COSSON, J. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating.. *Cell Biology International*. 1996, 20, s. 83-94.

COSSON, J., et al. Movements of fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analysis. *Poliskie Archiwum Hydrobiologii*. 1997, 44, s. 103-113.

DETTLAFF, T.A.; GINSBURG, A.S.; SHMALHAUSEN, O.I. *Sturgeon Fishes: Developmental Biology and Aquaculture*. Berlin : Springer, 1993. 299 s.

DIVÍŠKOVÁ, E. *Využití bioluminiscence ve studiu biooxidace sirných látek*. Brno, 2006. 50 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně.

GAGNON, C.; LAMINARDE, E. *The Sperm Cell*. Cambridge : Cambridge University Press, 2006. Controls of sperm motility, s. 108-134.

GALLIS, J.L., et al. *Acipenser. Actes du premier colloque international sur l'esturgeon*. France : Cemegref, 1991. Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*, spermatozoa: effects of dilution, pH, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility, s. 143-151.

GIBBONS, I.R. Cilia and flagella of eukaryotes. *Journal of Cell Biology*. 1981, 91, s. 107-124.

GINZBURG, A.S. *Fertilization in fishes and the problem of polyspermy*. Jerusalem : Israel Program for Scientific Translations, 1972. 366 s.

HASTINGS, J.W.; MORIN, J.G. *Photons for reporting molecular events: green fluorescent protein and four luciferase systems..* New York : A Wiley-Liss publication, 1998. In *Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols*, s. 17-41.

CHRISTEN, R.; GATTI, J.L.; BILLARD, R. Trout sperm motility. The transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement.. *European journal of biochemistry / FEBS..* 1987, 166, s. 667-671.

CHRISTEN, R.; SCHACKMANN, R.W.; SHAPIRO, B.M. Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus..* *Journal of Biological Chemistry*. 1982, 257, s. 14881-14890.

INABA, K. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling.. *Zoological Science*. 2003, 20, s. 1043-1056.

JAMIESON, B.G.M. *Fish evolution and systematics : evidence from spermatozoa : with a survey of lophophorate, echinoderm, and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation*. New York : Cambridge University Press : Cambridge, 1991. 319 s.

JEULIN, C.; SOUFIR, J.C. Reversible intracellular ATP changes in intact rat spermatozoa and effects on flagellar sperm movement.. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1992, 21(3), s. 210-222.

KLIMEŠ, V. *Reduktivní evoluce bičíkového aparátu eukaryot*. Praha, 2009. 27 s. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R.A.; WEISMANN, T. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei).. *Reproduction Nutrition Development*. 1993, 33(4), s. 349-360.

LEE, H.C.; JOHNSON, C.H.; EPEL, D. Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm.. *Developmental Biology*. 1983, 95, s. 31-45.

LINHART, O., VÚRH JU, Zátíší 728/II, Vodňany, přednášky z řízené reprodukce ryb 2008, ústní sdělení

LINHART, O.; KUDO, S. Surface ultrastructure of paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum, 1792) eggs before and after fertilization.. *Journal of Fish Biology*. 1997, 51, s. 573-582.

LINHART, O.; MIMS, S.D.; SHELTON, W.L. Motility of spermatozoa from Shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*), and Paddlefish (*Polyodon spathula*). *Journal of Fish Biology*. 1995, 47, s. 902-909.

LINHART, O.; POKORNÝ, J. *Hodnocení čerstvého spermatu ryb*. Vodňany : VÚRH, 1984. 17 s.

LINHART, O.; SLECHTA, V.; SLAVIK, T. Fisch sperm composition and biochemistry. *Bulletin of the Institute of Zoology, monografie*. 1991, 16, s. 285-311.

LUNDIN, A. *Methods in Enzymology*. New York : Academic Press, 2000. Use of firefly luciferase in ATP related assay of biomass, enzymes and metabolites, s. 346-370.

MANSOUR, N.; LAHNSTEINER, F.; BERGER, B. Metabolism of intra-testicular spermatozoa of a tropical teleost fish (*Clarias gariepinus*).. *Comp. Biochem. Physiol.*. 2003, 135, s. 285-296.

MIKI, K., et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *PNAS*. 2004, 47, s. 16501-16506.

MUKAI, Ch.; OKUNO, M. Glycolysis Plays a Major Role for Adenosine Triphosphate Supplementation in Mouse Sperm Flagellar Movement. *Biology of Reproduction*. 2004, 71(2), s. 540-547.

PERCHEC, G., et al. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science*. 1995, 108, s. 747-753.

PSENICKA, M., et al. Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. *Biology of the Cell*. 2007, 99, s. 103-115.

PSENICKA, M., et al. Ultrastruktura spermií lína obecného (*Tinca tinca* L.). *Bulletin VÚRH*. 2006, 42(2), s. 88-92.

RODINA, M., VÚRH JU, Zátíší 728/II, Vodňany, 16.1.2010, ústní sdělení

ROCHE; *ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II : návod vydaný k postupu měření*.
ROCHE applied science : ROCHE, 2005. 4 s.

SADEGHI, S.; HEDAYATI, M.; JAMILI, S. Determination of sperms' ATP content of golden grey mullet (*Mugil auratus*) at different conditions.. *Biotechnology*. 2009, 8, s. 375-379.

SLÁDEČEK, F. *Rozmnožování a vývoj živočichů*. Praha : Academia, 1986. 487 s.

ŠTERN, P. *Studijní materiály* [online]. 11.3.2000 [cit. 2010-04-10]. Základy instrumentální analýzy v klinické biochemii. Dostupné z WWW: < <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm> >.

VIVIANO, V.R.; OHMIYA, Y. *Photoproteins in Bioanalysis*. Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KgaA, 2006. Section 3, Beetle Luciferase: Colorful Lights on Biological Processes and Disease, s. 49-60.

Wikipedie, otevřená encyklopedie [online]. 15.2.2010 [cit. 2010-04-10]. Mitochondrie. Dostupné z WWW: < <http://cs.wikipedia.org/wiki/Mitochondrie> >.

Wikipedie, otevřená encyklopedie [online]. 6.4.2010 [cit. 2010-04-10]. Glykolýza. Dostupné z WWW: < <http://cs.wikipedia.org/wiki/Glykol%C3%BDza> >.

WILLIOT, P.; KOPEIKA, E.F.; GONCHAROV, B.F. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Aquaculture*. 2000, 189, s. 53-61.

YEATES, S., et al. A two-second delay confers first-male fertilization precedence within in vitro sperm competition experiments in Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*. 2007, 70, s. 318-322.