

MAATALOUDEN TUTKIMUSKESKUS

KOTIELÄINHOIDON TUTKIMUSLAITOKSEN TIEDOTE N:o 7

---

Mäkelä, R. & Kossila, V.

**Naudan veriseerumin prolaktiinipitoisuuden  
määrittämisessä käytetyn radioimmunologisen  
menetelmän luotettavuus**

---

TIKKURILA 1976

## LYHENNYKSET

RIA	= radioimmunologinen määrittäminen
I-125	= jodi-125-isotooppi
BPR	= naudan prolaktiini
BPR-I-125	= jodi-125:llä merkattu naudan prolaktiini
BGH	= naudan kasvuhormoni
BFSH	= naudan follikkelia stimuloiva hormoni
BLH	= naudan luteinisoiva hormoni
BTSH	= naudan tyreoidia stimuloiva hormoni
OPR	= lampaan prolaktiini
OGH	= lampaan kasvuhormoni
OFSH	= lampaan follikkelia stimuloiva hormoni
OLH	= lampaan luteinisoiva hormoni
OTSH	= lampaan tyreoidia stimuloiva hormoni
NKJ	= Nordiska kontaktorganet för jordbruksforskning
B %	= immunologinen sitoutumisprosentti

## SISÄLLYSLUETTELO

	Sivu
1. YDIN .....	3
2. JOHDANTO .....	3
3. AINEISTO JA MENETELMÄT .....	3
3.1. Aineisto .....	3
3.1.1. Hormonivalmisteet .....	3
3.1.2. Antiseerumi .....	4
3.1.3. Merkattu hormoni .....	4
3.1.4. Naudan verinäytteet .....	4
3.2. RIA-menetelmä .....	4
3.2.1. Inkubointi .....	4
3.2.2. Erotus .....	5
3.2.3. Radicaktiivisuusmittaukset .....	5
3.2.4. Immunologisen sitoutumisen laskeminen .....	5
3.2.5. Hormonipitoisuuden laskeminen .....	6
3.3. Luotettavuuskokeet .....	7
3.3.1. Herkkyys .....	7
3.3.2. Spesifisyys .....	7
3.3.3. Toistettavuus .....	8
3.3.4. Täsmävyys .....	9
4. TULOKSET .....	10
4.1. Herkkyys .....	10
4.2. Spesifisyys .....	10
4.3. Toistettavuus .....	12
4.4. Täsmävyys .....	12
5. TULOSTEN TARKASTELU .....	13
5.1. Herkkyys .....	13
5.2. Spesifisyys .....	14
5.3. Toistettavuus .....	17
5.4. Täsmävyys .....	18
6. TIIVISTELMÄ .....	19
7. KIITOKSET .....	20
8. KIRJALLISUUSLUETTELO .....	21
9. KUVAT .....	23
10. TAULUKOT .....	32
11. LIITTEET .....	38

## 1. YDIN

Tutkimuksessa selvitettiin hiilierotustekniikkaan perustuvan RIA-menetelmän luotettavuutta naudan verinäytteiden prolaktiinipitoisuuden analysoimiseen. Menetelmän herkkyydeksi saatiin 0.5 ng BPR/ml plasmaa tai seerumia. Naudan prolaktiinia vastaan marsussa tuotettu antiseerumi osoittautui testattujen ristireaktioiden perusteella riittävän spesifiseksi. Menetelmän toistettavuus verinäytteille oli hyvä. Eri kerroilla saadut hormonipitoisuudet erosivat toisistaan keskimäärin 6.3 %. Menetelmällä saatiin keskimäärin 10 % alhaisempia arvoja kuin mitä olivat näytteiden todelliset hormonipitoisuudet. Saatujen tulosten perusteella menetelmä on riittävän luotettava naudan verinäytteiden prolaktiinimäärityksiin.

## 2. JOHDANTO

Tässä tutkimuksessa määritettiin tutkimuksen suorittajien jo aikaisemmin käytäntöön soveltaman hiilierotustekniikkaan perustuvan naudan prolaktiinin radioimmunologisen menetelmän (MÄKELÄ & KOSSILA 1975) luotettavuutta. Tutkimus kuului yhteispohjoismaiseen tutkimusprojektiin NKJ-22:een.

## 3. AINEISTO JA MENETELMÄT

### 3.1. Aineisto

#### 3.1.1. Hormonivalmisteet

Kaikki tässä tutkimuksessa käytetyt hormonivalmisteet ja niiden biologinen aktiivisuus käyvät ilmi taulukosta 3.1.1.1. Ne olivat lahjoituksia the National Institutes of Healthistä.

### 3.1.2. Antiseerumi

Antiseerumi naudan prolaktiinia vastaan tuotettiin marsussa viisi kuukautta kestäneen immunisoinnin aikana (MÄKELÄ & KOSSILA 1975). Tuona aikana tehtiin seitsemän hormoni-ruiskutusta ihon alle. Kullakin kerralla eläin sai 0.5-1.0 mg naudan prolaktiinia (NIH-P-B2) fysiologisessa suolaliuoksessa yhdessä Freund's complete adjuvantin kanssa. Antiseerumi otettiin suoraan marsun sydäimestä. Antiseerumin käyttöläimennus oli 1 : 250 000.

### 3.1.3. Merkattu hormoni

Naudan prolaktiinin merkitseminen jodi-125-radioisotoopilla suoritettiin GREENWOODin et al. (1963) kloramiini-T-tekniikalla. Merkatun hormonin (BPR-I-125) puhdistamiseen käytettiin Sephadex G-100 geelisuodatusta. Spesifisen aktiivisuuden määrittäminen tapahtui tutkijoiden jo aikaisemmin kehittämällä menetelmällä (MÄKELÄ & KOSSILA 1975). Merkattua naudan prolaktiinia käytettiin noin 0.15 ng/koeputki.

### 3.1.4. Naudan verinäytteet

Seitsemän seeruminäytettä ja yksi plasmanäyte saatiin melko nuorista nautaeläimistä eri vuodenaikoina teurastuksen yhteydessä (Taulukko 3.1.4.1.). Ne säilytettiin  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa.

## 3.2. RIA-menetelmä

### 3.2.1. Inkubointi

Standardiliuokset ja näytelaimennukset oli etukäteen valmiiksi pipetoitu koeputkiin, jotka säilytettiin  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa. Kullakin RIA-määrittyskerralla käytetty koeputkisarja käy ilmi taulukosta 3.2.1.1.. Kun analysointi aloitettiin, lisättiin putkiin taulukossa mainitut puskurit ja antiseerumi. Tämän jälkeen putkia inkuboitiin  $+4^{\circ}\text{C}$ :ssa seuraavaan päi-

vään. Silloin lisättiin merkattu hormoni, minkä jälkeen inkubointia jatkettiin vielä neljä vuorokautta +4°C:ssa.

### 3.2.2. Erotus

Vapaan ja vasta-aineisiin sitoutuneen merkattun hormonin erottamiseen toisistaan käytettiin dekstraanilla päällystettyä hiiltä. Ennen hiilisuspension lisäämistä putkiin pipetoitiin 0.1 ml hevosen seerumia laimennettuna 1 : 4. Hiilisuspensio sisälsi 5 % hiiltä (Norit A) ja 0.5 % dekstraania (Dextran T-110). Suspensiota käytettiin 1 ml/koeputki. Putkia inkuboitiin huoneenlämmössä 15 min, minkä jälkeen ne sentrifugoitiin (20 min, 2000 rpm) huoneenlämmössä. Supernatantti kaadettiin välittömästi pois ja putket valutettiin hyvin 15 minuutin ajan. Putkien suut kuivattiin imukykyisellä paperilla ja putket suljettiin korkilla. Radioaktiivisuusmittauksiin käytettiin hiili-osaa, joka oli adsorboinut vapaan hormonin.

### 3.2.3. Radioaktiivisuusmittaukset

Radioaktiivisuusmittaukset suoritettiin automaattisella gammanäytteenvaihtajalla (UltroGamma 1280, Wallac Oy). Käytetyllä energia-alueella laitteen mittaustehokkuus oli noin 45 %. Mittausaika putkea kohti oli 1 min.

### 3.2.4. Immunologisen sitoutumisen laskeminen

Immunologisen sitoutumisen määrittämiseen tarvittiin joukko erisisältöisiä putkia (Taulukko 3.2.1.1.). Kaikille muille paitsi T-putkille suoritettiin hiilierotus. T-putket sisälsivät pelkästään merkattua hormonia osoittaen siten kuhunkin putkeen lisätyn merkattun hormonin kokonaismäärää. O-putket ilmaisivat, kuinka suuri osa merkattusta hormonista adsorboitui hiileen erotusvaiheen aikana ilman antiseerumia.

M-putkien sisältö poikkesi O-putkista siinä, että ne sisälsivät lisäksi antiseerumia. Maksimaalinen immunologinen sitoutuminen saatiin selville vähentämällä O-putkien radioaktiivisuudesta M-putkien radioaktiivisuus. Standardien (S-putket) immunologiset sitoutumiset selvitettiin vastavasti vähentämällä O-putkien radioaktiivisuudesta S-putkien radioaktiivisuus. Immunologinen sitoutuminen ilmaistiin prosenteissa (B %). Maksimaalinen B % ja standardien B %:t laskettiin siis seuraavan kaavan avulla:

$$B \% = \frac{100(R_O - R_M \text{ tai } S)}{R_O}, \text{ jossa}$$

$R_O$  = O-putken radioaktiivisuus (cpm)

$R_M$  tai  $S$  = M- tai S-putken radioaktiivisuus (cpm)

Kun tutkittavien näytteiden immunologiset sitoutumisprosentit määritettiin, käytettiin siinä apuna E-putkia, jotka muuten vastasivat O-putkia, paitsi että inkubointipuskurin tilalla oli vastaava määrä tutkittavaa näytelaimennusta (Taulukko 3.2.1.1.). Näytteiden (N-putket) B %:t laskettiin seuraavasti:

$$B \% = \frac{100 \cdot (R_E - R_N)}{R_E}, \text{ jossa}$$

$R_E$  = E-putken radioaktiivisuus (cpm)

$R_N$  = N-putken radioaktiivisuus (cpm)

### 3.2.5. Hormonipitoisuuden laskeminen

Näytteen hormonipitoisuus, ng/0.2 ml, saatiin suoraan standardikäyrältä immunologisen sitoutumisprosentin perusteella. Pitoisuudet ilmoitettiin lopullisesti ng/ml muodossa, jolloin standardikäyrältä saatu ng-määrä kerrottiin 5:llä sekä

näytteen laimennuskertoimella.

### 3.3. Luotettavuuskokeet

#### 3.3.1. Herkkyys

RIA-menetelmän herkkyyttä tutkittiin kolmen standardikäyrän avulla. Kunkin käyrän kaikki testatut BPR-pitoisuudet analysoitiin kolmena rinnakkaismäärityksenä. Tulokset käsiteltiin tilastollisesti varianssianalyysillä ja keskiarvojen väliset erot testattiin Tuckeyn testillä (STEEL & TORRIE 1960).

Lisäksi tässä tutkimuksessa tarkasteltiin myös inkubointiajan vaikutusta standardikäyrään. Kokeessa vertailtiin toisiinsa kahta muuten samoin tehtyä standardikäyrää, paitsi että toista inkuboitiin viisi ja toista kuusi vuorokautta.

#### 3.3.2. Spesifisyys

RIA-menetelmän spesifisyyttä määriteltäessä tutkittiin erikseen antiseerumin, merkatun hormonin, hormonistandardin sekä erotusmenetelmän spesifisyyttä.

Antiseerumin spesifisyyttä selvitettiin ristireaktioiden avulla. Antiseerumin annettiin reagoida sekä naudan että lampaan aivolisäkkeen etulohkosta peräisin olevien hormonien (Taulukko 3.1.1.1.) kanssa standardiolosuhteissa. Immunologisten sitoutumisprosenttien perusteella selvitettiin kunkin hormonin inhibitiokäyrä pitoisuusalueella 0.05-10 000 ng.

Merkatun hormonin spesifisyyttä tutkittiin mittaamalla merkkauksessa saatavien molekyylikooltaan erilaisten jaosten (kts. MÄKELÄ & KOSSILA 1975) sitoutumista vasta-aineisiin. Vastaavasti tutkittiin myös vapaan jodi-125:n sitou-



tuminen. Kunkin kolmen jaoksen säteily määrä kokeessa oli suunnilleen sama, noin 21 500 cpm/100  $\mu$ l. Kukin jaos testattiin 10 rinnakkaismäärityksenä. Merkatun hormonin spesifisyyttä tutkittiin lisäksi selvittämällä merkatun hormonin adsorboituminen hiileen näytelisyäysten jälkeen. Tutkitut näytelaimennukset olivat 1 : 1, 1 : 3, 1 : 10 tai 1 : 80. Näytelisyäyksen aiheuttama merkatun hormonin inhiboitumisprosentti (E %) laskettiin seuraavan kaavan avulla:

$$E \% = \frac{100(R_0 - R_E)}{R_0}, \text{ jossa}$$

$R_0$  = 0-putken radioaktiivisuus (cpm)

$R_E$  = E-putken radioaktiivisuus (cpm)

Hormonistandardin ja näytteessä olevan hormonin immunologista samankaltaisuutta selvitettiin kolmen seerumin (hiehosta no. 4 sekä sonnista no. 2 ja 3, Taulukko 3.1.4.1) laimennuskäyrien avulla. Kaikki tutkitut näytelaimennukset (1 : 1, 1 : 3, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20, 1 : 25, 1 : 30, 1 : 35, 1 : 40, 1 : 45, 1 : 50, 1 : 60, 1 : 70, 1 : 80, 1 : 90, 1 : 100, 1 : 110, 1 : 120, 1 : 130, 1 : 140 ja 1 : 150) analysointiin kolmena rinnakkaismäärityksenä.

Hiilierotusmenetelmän spesifisyyttä tutkittiin määrittämällä merkkauksessa saatavan kolmen erilaisen jaoksen (kts. MÄKELÄ & KOSSILA 1975) adsorboitumista hiileen. Mainitut jaokset samoin kuin niiden laimennukset olivat samat kuin tutkittaessa niiden sitoutumista vasta-aineisiin (3.3.2.). Adsorboitumismittaukset suoritettiin 10 rinnakkaismäärityksenä.

### 3.3.3. Toistettavuus

RIA-menetelmän toistettavuuden tutkimiseen käytettiin kahdeksaa verinäytettä (3.1.4.). Kolmella eri analysointikerralla määritettiin näytteiden prolaktiinipitoisuudet. Saatujen

analyysitulosten perusteella laskettiin standardipoikkeamat. Niiden avulla laskettiin edelleen suhteellinen standardipoikkeama eli vaihtelukerroin (V %) (MATTILA 1974).

Tämän lisäksi selvitettiin, kuinka suuri osa menetelmän kokonaisvaihtelukertoimesta johtui säteilyn mittausvirheestä ja automaattisen pipetin aiheuttamasta virheestä.

Radioaktiivisuusmittauksiin käytetty gammanäytteenvaihtaja (3.2.3.) oli tutkimuksissa ohjelmoitu siten, että se automaattisesti tulosti myös säteilyn mittausvirheen mitatulle radioaktiivisuusmäärälle ja käytetylle mittausajalle jokaisen säteilymittauksen jälkeen.

Immunologisten reagenssien pipetointiin käytetyn automaattisen pipetin (100  $\mu$ l Eppendorf) toistettavuus tutkittiin punnitsemalla sen 10 eri kerralla pipetoimat tilavuudet. Sen jälkeen laskettiin saatujen punnitustulosten standardipoikkeama ja vaihtelukerroin (MATTILA 1974).

#### 3.3.4. Täsmävyys

RIA-menetelmän tarkkuus eli täsmävyys määritettiin ns. recovery-kokeella. Siinä tunnettuun näytteeseen lisättiin tunnettuja määriä tutkittavaa naudan prolaktiinia (NIH-P-B2). Analyysituloksista laskettiin, kuinka monta prosenttia näytteeseen lisätystä prolaktiinimäärästä voitiin analyysillä todeta (= recovery %). Tunnettuna näytteenä toimi seerumi sonnista no. 2 (3.1.4.) laimennettuna 1 : 40, jota käytettiin 100  $\mu$ l/putki. Tämä määrä seerumilaimennusta sisälsi 0.16 ng prolaktiinia. Prolaktiinilisäykset olivat 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ja 0.6 ng/100  $\mu$ l putkea kohti.

## 4. TULOKSET

### 4.1. Herkkyys

Menetelmän herkkyydellä tarkoitetaan tässä tutkimuksessa sitä tutkittavan prolaktiinihormonin pienintä määrää, joka RIA-analyysissä erosi 0-näytteestä tilastollisesti merkittävästi. Tässä tarkastelussa riski-% oli 1 ( $P < 0.01$ ). Tutkitun hiilierotustekniikkaan perustuvan RIA-menetelmän standardikäyrän herkkyydeksi saatiin 0.1 ng (Liite 1. ja 2.). Tämän perusteella pienin BPR-pitoisuus, joka voitiin näytteestä tällä menetelmällä mitata 99 %:n tilastollisella varmuudella, oli 0.5 ng/ml, koska yhteen määrittelyyn käytettiin 0.2 ml näytettä.

Tutkimuksessa tarkastehtiin myös standardikäyrän erotuskykyä hormonin eri pitoisuusalueilla. Tuckeyn testin mukaan standardikäyrän erotuskyky oli tilastollisesti luotettava ( $P < 0.01$ ) pitoisuusalueella 0.1 - 0.4 ng (Liite 1. ja 2.). Tämä käy ilmi myös kuvasta 4.1.1., jossa on esitettyinä menetelmälle tyypillinen standardikäyrä. Sen erotuskyky oli suurimmillaan välillä 0.2 - 0.3 ng.

Tässä yhteydessä tutkittiin myös inkubointiajan vaikutusta standardikäyrän erotuskykyyn. Normaalilla (5 vrk) ja pidennetyllä (6 vrk) inkuboinnilla saaduilla standardikäyrillä ei ollut oleellista eroa (Kuva 4.1.1.). Pidennetty inkubointiaika saattoi ehkä hiukan parantaa standardikäyrän erotuskykyä.

### 4.2. Spesifisyys

Antiseerumin ristireaktiot naudan aivolisäkkeen etulohkosta peräisin olevien hormonien (BGH, BFSH, BLH ja BTSH) kanssa käyvät ilmi kuvasta 4.2.1.. Tutkitun antiseerumin vasta-ainesten ristireaktiointi oli voimakkainta kasvuhormonin kanssa. Tämä ristireaktio tapahtui kuitenkin kokonaan standardi-

käyrän ulkopuolella olevalla pitoisuusalueella, joten korigistireaktio ei häirinnyt standardikäyrää. Antiseerumin ristiinreagointi muiden etulohkon hormonien kanssa oli erittäin vähäistä.

Antiseerumin ristireaktiot lampaan aivolisäkkeen etulohkon hormonien kanssa (Kuva 4.2.2. ja 4.2.3.) muistuttivat yleisesti ristireaktioita naudan vastaavien hormonien kanssa (Kuva 4.2.1.). Antiseerumin ristiinreagointi lampaan prolaktiinin kanssa oli vain hiukan heikompaa kuin antiseerumin immunologinen reagointi naudan prolaktiinin kanssa (Kuva 4.2.3.). Ristireaktio lampaan kasvuhormonin kanssa oli jopa voimakkaampaa kuin naudan kasvuhormonin kanssa (Kuva 4.2.1.). Ristireaktiot lampaan FSH:n, LH:n ja TSH:n kanssa olivat heikkoja samoin kuin vastaavien naudan hormonien kanssa.

Merkkauksessa saatavan kolmen erilaisen jaoksen (MÄKELÄ & KOSSILA 1975) sitoutumiset vasta-aineisiin käyvät ilmi kuvasta 4.2.4.. Pienimolekyylinen (monomeerinen) hormonijaos, joka oli merkkauksessa haluttu tuote, sitoutui vasta-aineisiin yli kaksi kertaa paremmin kuin suurimolekyylinen (aggregoitunut) hormonijaos, joka taas oli ei-haluttu sivutuote merkkauksessa, sekä yli 30 kertaa paremmin kuin vapaa jodi.

Kokeet joissa selvitettiin merkatun hormonin adsorboitumista hiileen näytelisäysten jälkeen, osoittivat, että näytteen läsnäolo esti (inhiboi) merkattua hormonia adsorboitumasta hiileen (Kuva 4.2.5.). Näytteet erosivat inhibointivoimakkuudeltaan (Taulukko 4.2.1.). Inhibitiovaikutus väheni näyttettä laimennettaessa. Laimentamattoman (1 : 1) näytelisäyksen aiheuttama inhibitio oli keskimäärin lähes 25 %. 1 : 3, 1 : 10, 1 : 26 ja 1 : 80 laimennettujen näytelisäysten aiheuttamat inhibitiot olivat vastaavasti noin 15.6, 4 ja 2 %.

Kolmen seerumin laimennuskäyrät näkyvät kuvasta 4.2.6. Ne olivat standardikäyrän muotoisia.

Merkkauksessa saatavan kolmen erilaisen jaoksen (MÄKELÄ & KOSSILA 1975) adsorboitumiset hiileen näkyvät kuvasta 4.2.7.. Pienimolekyylinen hormonijaos adsorboitui parhaiten, 94.1 %-isesti, hiileen. Suurimolekyylinen hormonijaos adsorboitui 90.3 %-isesti. Sen sijaan vapaa jodi-125 adsorboitui vain 30.4 %-isesti.

#### 4.3. Toistettavuus

Taulukoista 4.3.1. ja 4.3.2. näkyy verinäytteiden prolaktiinipitoisuudet kolmella eri määrityskerralla. Näytteet sisälsivät prolaktiinia keskimäärin  $21.13 \pm 0.82$  ng/ml. Talvella otettujen näytteiden prolaktiinipitoisuudet olivat muutaman ng/ml-luokkaa (keskimäärin  $6.66 \pm 0.56$  ng/ml), kun taas kesällä otettujen näytteiden prolaktiinipitoisuudet olivat muutaman kymmenen ng/ml-luokkaa (keskimäärin  $35.60 \pm 1.08$  ng/ml). Saatujen analyysitulosten vaihtelukertoimeksi (V %) saatiin keskimäärin 6.3 %. Runsaasti prolaktiinia sisältäneiden näytteiden toistettavuus näytti olevan parempi (V % = 4.0) kuin vähän prolaktiinia sisältäneiden näytteiden toistettavuus (V % = 8.5).

Osa saatujen analyysitulosten vaihtelusta (V %) johtui säteilyn mittausvirheestä ja pipetointivirheistä. Säteilyn mittausvirhe (V %) oli 0.8 - 1.5 % riippuen pulssimäärästä. 100  $\mu$ l:n automaattipipetin annostelemien määrien vaihtelukertoimeksi saatiin 1.5 %. Jos virhe oli samansuuntainen pipetoitaessa kahta immunologista reagenssia ko. pipetillä, pipetoinneista aiheutuva virhe oli tällöin 3 %. Vähentämällä näiden tunnettujen osavirheiden summa (3.8 - 4.5 %) kokonaisvaihtelukertoimesta (6.3 %) saatiin itse menetelmästä johtuvaksi virheeksi vain keskimäärin 1.8-2.5 %.

#### 4.4. Täsmävyys

Menetelmän täsmävyyden selvittämiseksi suoritettujen recovery-kokeiden tulokset käyvät ilmi kuvasta 4.4.1. ja tau-

lukosta 4.4.1.. Keskimääräiseksi recovery %:ksi saatiin noin 90 %, kun prolaktiinilisäykset seerumiin olivat välillä 0.05-0.60 ng eli kun analysoitava kokonaisprolaktiinimäärä oli 0.21-0.76 ng. Näin ollen RIA-menetelmällä saadut hormonipitoisuudet olivat keskimäärin 10 % alhaisemmat kuin näytteiden todelliset pitoisuudet. Recovery % vaihteli hormonimäärän mukaan. Kun analysoitava prolaktiinimäärä oli 0.36-0.76 ng (BPR-lisäys 0.2-0.6 ng), havaittiin siitä analysoinnin tuloksena vähintään 90 %. Analysoitavan prolaktiinimäärän ollessa 0.46 ng (BPR-lisäys 0.3 ng) todettiin se 100 %-isesti. Sen sijaan pienet prolaktiinimäärät 0.21 ng:sta 0.26 ng:aan (BPR-lisäys 0.05-0.10 ng) voitiin havaita vain 80 %-isesti.

## 5. TULOSTEN TARKASTELU

### 5.1. Herkkyys

Menetelmän luotettavuuden mittoina käytettiin tässä tutkimuksessa LORAINEN ja BELLIN (1971) mukaan herkkyyttä, spesifisyyttä, toistettavuutta ja täsmävyyttä.

Menetelmän herkkyyttä eli aineen alhaisinta havaitsemisrajaa määritettäessä on 95 %:n tilastollinen varmuus ( $P < 0.05$ ) yleensä riittävä (MIDGLEY ym. 1969). Tässä nyt suoritettussa tutkimuksessa tilastollinen varmuus oli vielä suurempi eli 99 % ( $P < 0.01$ ). Tällä varmuudella saatua menetelmän herkkyyttä, 0.1 ng BPR/putki, voidaan pitää hyvänä, koska ko. RIA-menetelmällä siten pystyttiin luotettavasti analysoimaan 0.5 ng BPR/ml plasmaa tai seerumia. Menetelmältä vaadittava herkkyys riippuu yleensä tutkittavien näytteiden pitoisuuksista. Alhaisimmatkin pitoisuudet täytyy pystyä luotettavasti mittaamaan. Tässä tutkimuksessa saatu menetelmän herkkyys täyttää em. vaatimuksen kun herkkyyttä (0.5 ng BPR/ml) verrataan havaittuihin veren prolaktiinipitoisuuksiin (vrt. kohta 5.3. ja SCHAMS 1974). Useille

proteohormoneille kehitettyjen RIA-menetelmien herkkyydet ovat olleet samaa suuruusluokkaa kuin tässä tutkimuksessa (mm. JACOBS 1969, McNEILLY 1971, OXENDER ym. 1972 ja JACOBS 1974).

Tässä tutkimuksessa havaittu standardikäyrän erotuskyvyn vaihtelu eri pitoisuusalueilla oli luonnollista, koska aritmeettisellä asteikolla kuvattuna standardikäyrä on muodoltaan sigmakäyrä. Jyrkimmällä ja suoraviivaisimmalla alueella (tässä tutkimuksessa välillä 0.1-0.4 ng) käyrän erotuskyky on parhaimmillaan. Tässä tutkimuksessa saatu standardikäyrä muistutti suuresti SCHAMSin ja KARGin (1969) ja SCHAMSin (1974) julkaisemia standardikäyriä.

Standardikäyrän herkkyyteen ja erotuskykyyn vaikuttavat myös inkubointiolosuhteet (ALBANO ym. 1972 ja JACOBS 1968). Inkubointiaikaa pidentämällä herkkyys ja erotuskyky tavallisesti paranevat tiettyyn rajaan saakka, jonka jälkeen edistymistä ei enää tapahdu. Tässä tutkimuksessa saadut tulokset osoittivat, että tutkituissa olosuhteissa immunologinen reaktio ehti tapahtua melko täydellisesti jo viiden vrk:n kuluessa, koska kuuden vrk:n inkubointi ei aiheuttanut standardikäyrän oleellista paranemista.

## 5.2. Spesifisyys

Menetelmän spesifisyys riippuu yleensä kaikkien menetelmään vaikuttavien osatekijöiden spesifisyydestä. RIA-menetelmän spesifisyys on kuitenkin ratkaisevimmin riippuvainen merkätun hormonin ja antiseerumin spesifisyydestä (HUNTER 1969).

Hormonin merkkaukseen käytetäänkin yleensä puhtainta mahdollista hormonivalmistetta, koska RIA-menetelmässä mitataan juuri merkätun hormonin sitoutumista vasta-aineisiin. Tässä tutkimuksessa merkkaukseen käytettiin samaa hormonia (NIH-P-B2), jota myös SCHAMS ja KARG (1969) ja SCHAMS (1974)

ovat menestyksellisesti käyttäneet merkkaukseen RIA-menettelymissään.

Nyt suoritettussa tutkimuksessa selviteltiin merkatussa hormonissa mahdollisesti epäpuhtautena esiintyvän suurimolekyylisen hormonijaoksen ja vapaan jodin sitoutumista vasta-aineisiin sekä adsorboitumista hiileen. RIA-määrittelyyn käytetyn pienimolekyylisen hormonijaoksen todettiin sitoutuneen vasta-aineisiin paremmin sekä myös adsorboituneen hiileen runsaammin kuin suurimolekyylisen hormonijaoksen. Tulokset on yhdenmukainen JACOBSin (1969) havainnon kanssa. Hän totesi, että se hormonijaos, joka parhaiten sitoutui vasta-aineisiin, myös parhaiten adsorboitui hiileen. Tätä tulosta hän käytti hyväksensäkin siten, että juuri adsorboitumisoimaisuuden perusteella hän valitsi hormonijaoksen RIA-määrittelyyn. Vapaan jodin sitoutuminen vasta-aineisiin nyt suoritettussa tutkimuksessa ei ilmeisesti ollut immunologista, vaan aivan epäspesifistä. Jodin adsorboituminen hiileen sen sijaan oli luonnollista, koska yleensä kaikki päällysteainetta pienemmät molekyylit tulevat adsorboitua hiileen (HERBERT 1969).

Tämä vain osoitti, että hiillierotusmenetelmä ei ole täysin spesifinen. Vaikka suurimolekyylinen hormonijaos ja vapaa jodi jossain määrin sitoutuivat vasta-aineisiin sekä adsorboituivat hiileen, ei sillä voinut olla oleellista merkitystä itse menetelmän spesifisyyteen, koska mainittuja aineita esiintyi merkatussa hormonissa puhdistuksen jälkeen hyvin vähän (MÄKELÄ & KOSSILA 1975).

Näytelisäyksen jälkeen todetut merkattun hormonin adsorboitumismuutokset johtuivat todennäköisesti veren proteolyytisistä ja/tai hapettavista järjestelmistä, jotka ADDISONin ym. (1971) mukaan tuhoavat merkattua hormonia inkubaation aikana. SCHAMSin (1974) mielestä näytelisäys aiheuttaa merkattun hormonin epäspesifistä sitoutumista, jonka suuruus riippuu näytteen valkuaisainepitoisuudesta. Jos näyte lisättiin laimentamattomana, epäspesifinen sitoutuminen saattoi olla hänen mukaansa jopa 25 %-ista eli samaa suuruus-



luokkaa kuin tässä nyt suoritettussa tutkimuksessa. Näytelisiä vaikutukset merkatussa hormonissa eivät silti estä menetelmää käyttämästä. Näytteen aiheuttamat virheet voidaan poistaa määrittämällä erikseen kunkin näytteen kussakin tutkittavassa laimennuksessa aiheuttama merkatus hormonin tuhoutuminen ja ottamalla se huomioon laskutoimituksissa. Näin teki SCHAMS (1974) ja näin tehtiin tässäkin tutkimuksessa.

RIA-menetelmän spesifisyyden määrittäminen tapahtuu käytännössä yleensä vain tutkimalla antiseerumin spesifisyyttä. Koska tässä tutkimuksessa antiseerumin valmistamiseen käytettiin aivolisäkkeestä eristettyä prolaktiinia (NIH-P-B2), saattoi siinä siten olla epäpuhtauksina muita aivolisäkkeen hormoneita, joita vastaan antiseerumieläin saattoi tuottaa vasta-aineita. Antiseerumin immunologiset reaktiot näiden muiden hormonien kanssa (ristireaktiot) eivät saa olla liian voimakkaita. RIA-menetelmiin käytettyjen antiseerumeiden heikot ristireaktiot ovat kyllä pikemminkin sääntö kuin poikkeus (MIDGLEY ym. 1969). Tässä tutkimuksessa käytetyn antiseerumin ristireaktiot naudan aivolisäkkeen etulohkosta peräisin olevien hormonien kanssa tapahtuivat kokonaan standardikäyrän ulkopuolella olevalla pitoisuusalueella, joten ne eivät häirinneet prolaktiinimäärittäystä.

GONZALEZ-PADILLAN ym. (1975) RIA-menetelmässä käyttämän ja naudan prolaktiinia vastaan tuottaman antiseerumin ristireaktiot muistuttivat suuresti tässä tutkimuksessa testatun antiseerumin ristireaktioita. Ristireaktiot naudan ja vastaavien lampaan hormonien kanssa olivat melko samanlaisia, mikä osoittaa näiden kotieläinlajien vastaavien hormonien läheistä immunologista sukulaisuutta. Saatujen tulosten perusteella naudan prolaktiinia vastaan tuotettu antiseerumi saattaisi soveltua myös lampaan prolaktiinin RIA-määrittäykseen.

Jos näytteen laimennuskäyrä on standardikäyrän kanssa samansuuntainen, kuten oli tässäkin tutkimuksessa, osoittaa se

standardin ja tutkittavan aineen immunologista samankaltaisuutta (LANDON ym. 1968) sekä standardin sopivuutta näytteessä olevan aineen mittaamiseen.

### 5.3. Toistettavuus

Myös toistettavuuskokeen tulokset antoivat aiheen uskoa tässä tutkitun RIA-menetelmän luotettavuuteen, koska menetelmällä saadut veren prolaktiinipitoisuudet olivat samaa suuruusluokkaa kirjallisuusmainintojen kanssa (SCHAMS 1974). Lisäksi eri vuodenaikoina otettujen verinäytteiden prolaktiinipitoisuuksien välille saatu selvä ero on sopuinnussa SCHAMSin (1974) tutkimusten kanssa.

Menetelmän toistettavuutta tässä tutkimuksessa voidaan pitää hyvänä määrittyskertojen pienestä lukumäärästä huolimatta, sillä analysoitujen näytteiden prolaktiinipitoisuudet vaihtelivat eri kerroilla vain keskimäärin 6.3 %. Vaihtelukerroin oli erilainen (0-13.6 %) eri näytteillä.

RATCLIFFEN (1974) mukaan radioimmunologisten määrittysten vaihtelukerroin on harvoin parempi kuin 6 %. ALBANON ym. (1972) hiilierotustekniikkaan perustuvien radioimmunologisten insuliinimäärittysten vaihtelukerroin oli välillä 4.6-7.5 % määrittyskertojen vaihdellessa viidestä yhteentoista. Naudan prolaktiinimäärittysten vaihtelukerroin oli SCHAMSin (1974) tutkimuksissa  $13.4 \pm 4.4$  %, kun määrittyskertoja oli useita kymmeniä.

RIA-menetelmän toistettavuus riippuu eniten merkatusta hormonista, koska muiden määrittämiin käytettävien reagenssien laatu on helppo pitää samana määrittyskerrasta toiseen (kun antiseerumia on riittävästi). Merkkauksessa saattaa jodia sitoutua hormoniin erilaisiamääriä eri kerroilla. Merkatua hormonia olisi kuitenkin eri määrittyskerroilla käytettävä aina sama määrä. Tästä syystä merkatun hormonin spesifinen aktiivisuus pitäisi pystyä määrittämään mahdollisimman tarkasti. Toistaiseksi ei ole olemassa ehdottoman luotetta-

vaa menetelmää spesifisen aktiivisuuden määrittämiseksi (vrt. CARO ym. 1975). Tämän tutkimuksen suorittajien kehittämä spesifisen aktiivisuuden määrittäminen menetelmä (MÄKELÄ & KOSSILA 1975) on RIA-menetelmälle saadun hyvän toistettavuuden perusteella täysin tyydyttävä.

#### 5.4. Täsmävyys

Menetelmän tarkkuudessa päästään harvoin 100 %:n täsmävyyteen todellisten pitoisuuksien kanssa, vaikka siihen tietysti pyritään. Yleensä joudutaan tyytymään analyysituloksiin, jotka ovat jonkinverran pienempiä tai suurempia kuin aineen todelliset pitoisuudet. RIA-menetelmien kokonaisvirherajana pidetään yleisesti  $\pm 20\%$  (JACOBS 1974). Tämän mukaan tässä tutkimuksessa saatu 10 %:n keskimääräinen ero RIA-menetelmällä mitattujen ja todellisten pitoisuuksien välillä ei ole liian suuri, vaikka otettaisiin huomioon vielä mittaustulosten keskimääräinen vaihtelukerroin, 6.3 %.

Täsmävyys saattaa lisäksi vaihdella tutkittavan aineen eri pitoisuusalueilla. Nyt tutkitulla RIA-menetelmällä päästään lähes 100 %:n täsmävyyteen, kun näytteet analysoidaan useana laimennuksena ja kun lopputulos lasketaan sen laimennuksen mukaan, jonka prolaktiinimäärä on lähimpänä 0.46 ng.

Tutkitun RIA-menetelmän tulokset herkkyydestä, spesifisyydestä, toistettavuudesta ja täsmävyydestä osoittanevat, että menetelmää voidaan luotettavasti käyttää naudan verinäytteiden prolaktiinipitoisuuksien määrittämiseen.

## 6. TIIVISTELMÄ

Radioimmunologisen menetelmän luotettavuuden selville saamiseksi tutkittiin erikseen menetelmän herkkyys, spesifisyys, toistettavuus ja täsmävyys soveltaen verinäytteille.

Menetelmän herkkyydeksi saatiin 0.1 ng BPR/putki eli 0.5 ng BPR/ml plasmaa tai seerumia.

Menetelmän spesifisyyttä selvitettiin tutkimalla osatekijöiden spesifisyyttä erikseen. Antiseerumin ristireaktiot aivolisäkkeen etulohkon hormonien kanssa eivät häirinneet prolaktiinin RIA-määrittämiä. Ristireaktiot lampaan aivolisäkkeen etulohkon hormonien kanssa muistuttavat suuresti ristireaktioita vastaavien naudan hormonien kanssa. Vasta-aineiden todettiin epäspesifisesti sitovan jossain määrin myös merkkauksessa tuhoutunutta hormonia (= suurimolekyylinen hormonijaos) sekä vapaata jodia. Näytelisäykset saattoivat osittain estää merkattua hormonia adsorboitumasta hiileen. Esto voi olla suuruudeltaan jopa 25 % riippuen näytteestä ja laimennusasteesta. Estosta aiheutuva virhe voitiin korjata sopivalla kontrollilla. Käytetty hormoni-standardi ja näytteiden sisältämä hormoni osoittautuivat immunologisesti melko samanlaisiksi. Erotusmenetelmä ei ollut täysin spesifinen, koska hiili adsorboi itseensä jonkin verran myös merkkauksessa tuhoutunutta hormonia ja vapaata jodia.

Toistettavuuskokeissa eri kerroilla suoritettujen prolaktiininmäärittysten vaihtelukertoimeksi (V %) saatiin keskimäärin 6.3 %. Menetelmälle saatu hyvä toistettavuus osoitti myös merkattoman hormonin spesifisen aktiivisuuden määrittämiseen käytetyn menetelmän luotettavaksi. Toistettavuuskokeet osoittivat lisäksi, että näytteille saatu prolaktiinipitoisuustaso edusti muiden tutkijoiden jo aikaisemmin havaitsemaa ja siten todennäköisesti oikeata suuruusluokkaa. Myös vuodenajasta johtuvat erot prolaktiinipitoisuuksissa tulivat selvästi esille käytetyllä RIA-menetelmällä.

Täsmävyyskokeet osoittivat, että tutkitulla RIA-menetelmällä saadut analyysitulokset olivat keskimäärin 10 % alhaisemmat kuin näytteiden todelliset hormonipitoisuudet.

Saadut tulokset RIA-menetelmän herkkyydestä, spesifisyydestä, toistettavuudesta ja täsmävydestä osoittanevat, että ko. menetelmää voidaan luotettavasti käyttää naudan verinäytteiden prolaktiinimäärityksiin.

#### KIIITOKSET

Tutkimus on tehty Helsingin yliopiston kotieläintieteen laitoksen ystävällisellä myötävaikutuksella, josta parhaat kiitokset ansaitsee laitoksen esimies, prof. Esko Poutiainen. Tutkimuksen radioaktiivinen osa on suoritettu Helsingin yliopiston maatalousmetsätieteellisen tiedekunnan isotoppi-osastolla FM Antti Uusi-Rauvan ystävällisellä opastuksella. Tutkimuksen tekijät haluavat kiittää häntä lämpimästi. Arvokasta RIA-tekniikkaa koskevaa ohjausta on saatu alan asiantuntijalta tri Dieter Schamsilta, Saksasta, Münchenin Teknillisen yliopiston fysiologian laitokselta, Weihenstephanista, mistä tekijät ovat kiitollisia.

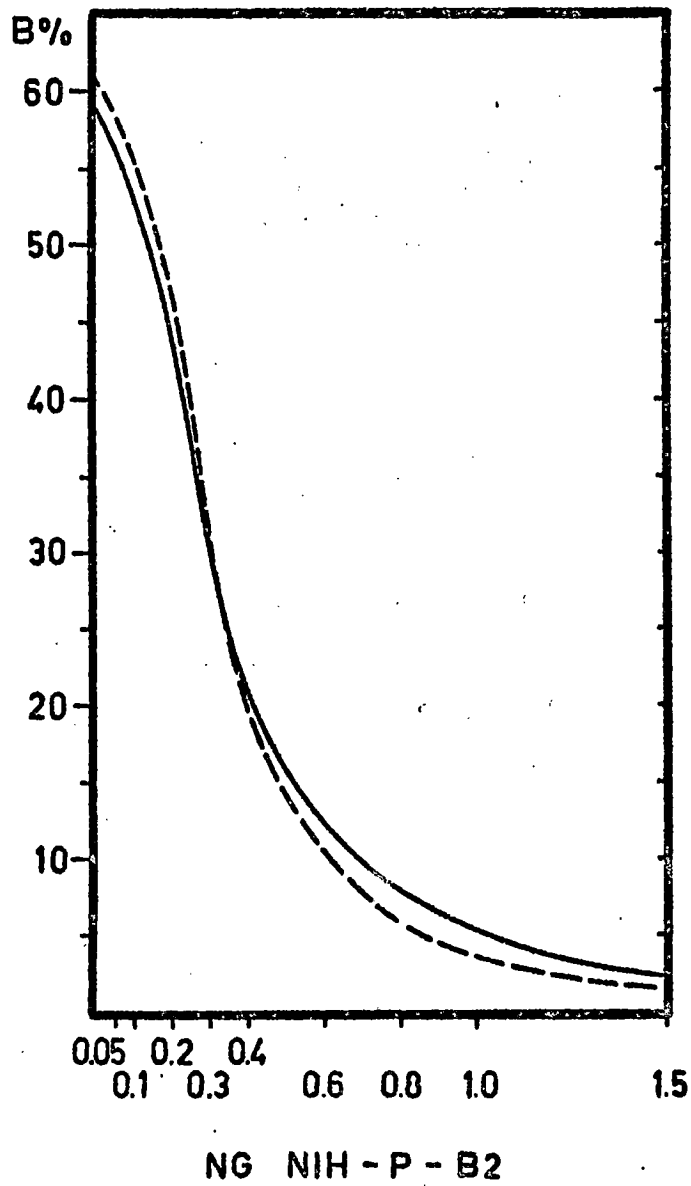
Tutkimuksen päärahoittajana on ollut Suomen Akatemian maatalous-metsätieteellinen toimikunta. Muina rahoittajina ovat olleet Suomen Kulttuurirahasto (Alma ja Jussi Jalkasen rahasto), Emil Aaltosen Säätiö, Helsingin yliopiston kotieläintieteen laitos sekä Maatalouden tutkimuskeskuksen kotieläinhoidon tutkimuslaitos, mistä tutkimusten suorittajat täten lausuvat lämpimät kiitoksensa.

## 8. KIRJALLISUUSLUETTELO

- ADDISON, G.M., HALES, C.N. & MILES, L.E.M. 1971. Principles and modifications of radioimmunological assays of protein hormones. "Immunological Methods in Endocrinology" toim. FEDERLIN, K. & HALES, C.N. Academic Press. New York. 22-25.
- ALBANO, J.D.M., EKINS, R.P., MARITZ, G. & TURNER, R.C. 1972. A sensitive, precise radioimmunoassay of serum insulin relying on charcoal separation of bound and free hormone moieties. *Acta Endocr.* 70. 487-509.
- CARO, R.A., CISCATO, V.A., DE GIACOMINI, S.M.V., QUIROGA, S. & RADICELLA, R. 1975. Labeling of proteins with <sup>125</sup>I and experimental determinations of its specific activity. *Int. J. Appl. Rad. Isot.* 26. 527-532.
- GREENWOOD, F.C., HUNTER, W.L. & GLOVER, J.S. 1963. The preparation of <sup>131</sup>I-labeled growth hormone of high specific activity. *Biochem. J.* 89. 114-123.
- GONZALES-PADILLA, E., WILTBANK, J.N. & NISWENDER, G.D. 1975. Puberty in beef heifers. 1. The interrelationship between pituitary hypothalamic and ovarian hormones. *J. Anim. Sci.* 40. 1091-1104.
- HERBERT, V. 1969. Coated charcoal separation of free labelled hormone from hormone bound to antibody. "Protein and Polypeptide Hormones" toim. MARGOULIES, M. Excerpta Medica Foundation. Amsterdam. 55-60.
- HUNTER, W.M. 1969. Control of specificity in the radioimmunoassay. "Protein and Polypeptide Hormones" toim. MARGOULIES, M. Excerpta Medica Foundation. Amsterdam. 5-13.
- JACOBS, H.S. 1969. Use of activated charcoal in the radioimmunoassay of human growth hormone in plasma. *J. Clin. Path.* 22. 710-717.
- JACOBS, L.S. 1974. Prolactin. "Methods of Hormone Radioimmunoassay" toim. JAFFE, B.M. & BEHRMAN, H.R. Academic Press, Inc. New York. 87-102.
- LANDON, J., GIRARD, J. & GREENWOOD, F.C. 1968. The specificity of a radioimmunoassay for human plasma ACTH. "Protein and Polypeptide Hormones" toim. MARGOULIES, M. Excerpta Medica Foundation. Amsterdam. 29-31.
- LORRAINE, J.A. & BELL, E.T. 1971. "Hormone Assays and their Clinical Application". E. & S. Livingstone, Edinburgh. 1-20.
- MATTILA, S. 1974. Tilastotiede I. Helsinki. 1-272.

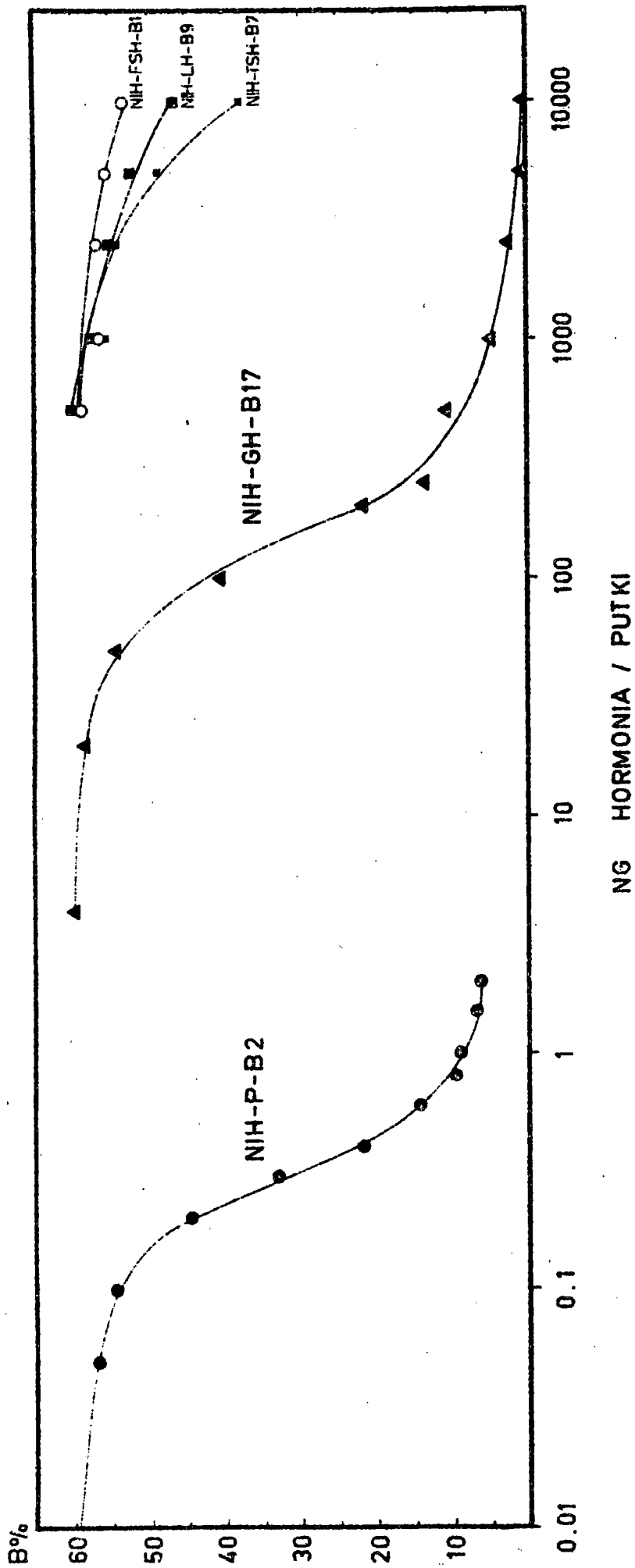
- 1966. Tilastotiede 2. Helsinki. 174.
- McNEILLY, J.R. 1971. A solid phase radioimmunoassay for ovine prolactin. J. Endocr. 49. 141-149.
- MIDGLEY, A.R., NISWENDER, G.D. & REBAR, R.W. 1969. Principles for the assesment of the reliability of radioimmunoassay methods. "Immunoassay of Gonadotropins" toim. E. DICZFALUSY, Acta Endocr. (Kbh) (Suppl. No. 142). 163-184.
- MÄKELÄ, R. & KOSSILA, V. 1975. Naudan prolaktiinin määrittämisestä radioimmunologisesti. Maatalouden tutkimuskeskusten kotieläinhoidon tutkimuslaitoksen tiedote 4. 25-86.
- OXENDER, W.D., HAFS, H.D. & EDGERTON, L.A. 1972. Serum growth hormone, LH and prolactin in the pregnant cow. J. Anim. Sci. 35. 51-55.
- RATCLIFFE, M.A. 1974. Separation techniques in saturation analysis. Br. Med. Bull. 30. 32-43.
- SCHAMS, D. 1974. Untersuchungen über Prolaktin beim Rind. Fortschr. Tierphysiol. Tierernähr. 5. 1-125.
- & KARG, H. 1969. Radioimmunologische Bestimmung von Prolaktin im Blutserum vom Rind. Milchwissenschaft 24. 263-265.
- STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. 1960. "Principles and Procedures of Statistics". New York. 481.

## 9. KUVAT

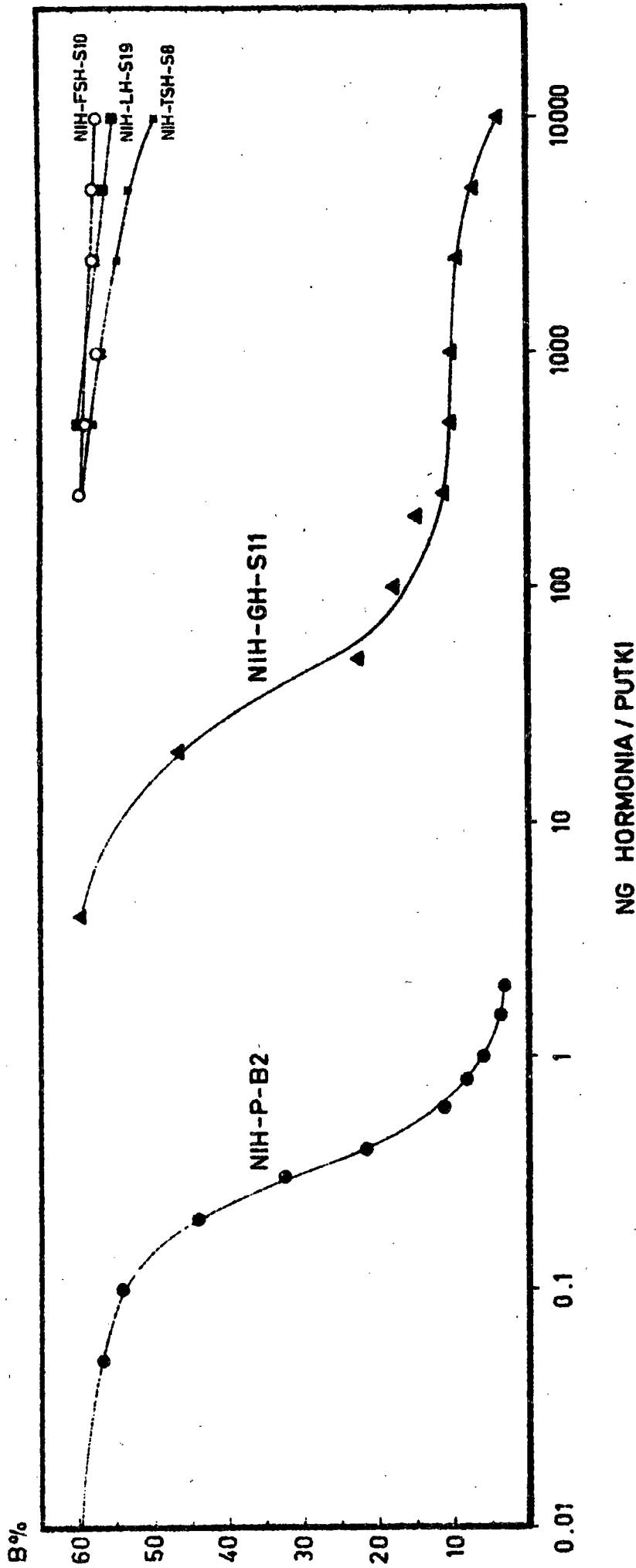


Kuva 4.1.1. RIA-menetelmän tyypillinen standardikäyrä ( — ) naudan prolaktiinille (NIH-P-B2), kun inkubointiaika 5 vrk sekä standardikäyrä ( --- ), kun inkubointiaika 6 vrk.

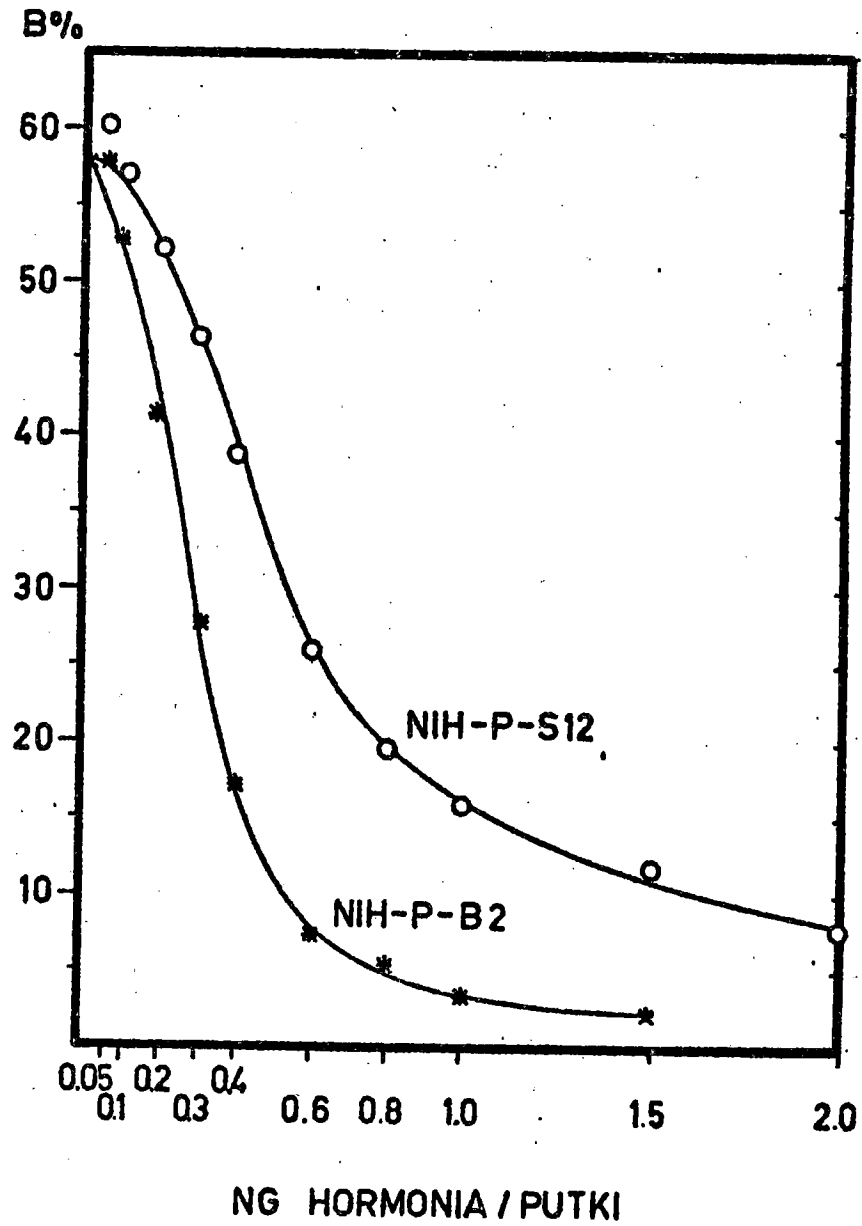




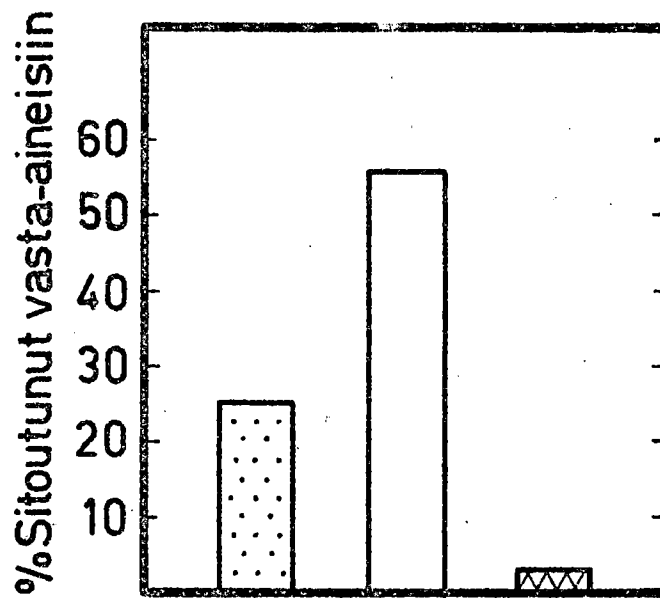
Kuva 4.2.1. Naudan prolaktiinin (NIH-P-B2) standardikäyriä ja sen määrittämiseen käytetyn antiseerumin ristinreakointi naudan kasvuhormonin (NIH-GH-B17), tyreoidiaa stimuloivan hormonin (NIH-TSH-B7), luteinisoivan hormonin (NIH-LH-B9) ja follikkelia stimuloivan hormonin (NIH-FSH-B1) kanssa.






Kuva 4.2.2. Naudan prolaktiinin (NIH-P-B2) standardikäyrä ja sen määrittämiseen käytetyn antiseerumin ristiinreagointi lampaan kasvuhormonin (NIH-GH-S11), tyreoidiaa stimuloivan hormonin (NIH-TSH-S8), luteinisoivan hormonin (NIH-LH-S19) ja follikkelia stimuloivan hormonin (NIH-FSH-S10) kanssa.

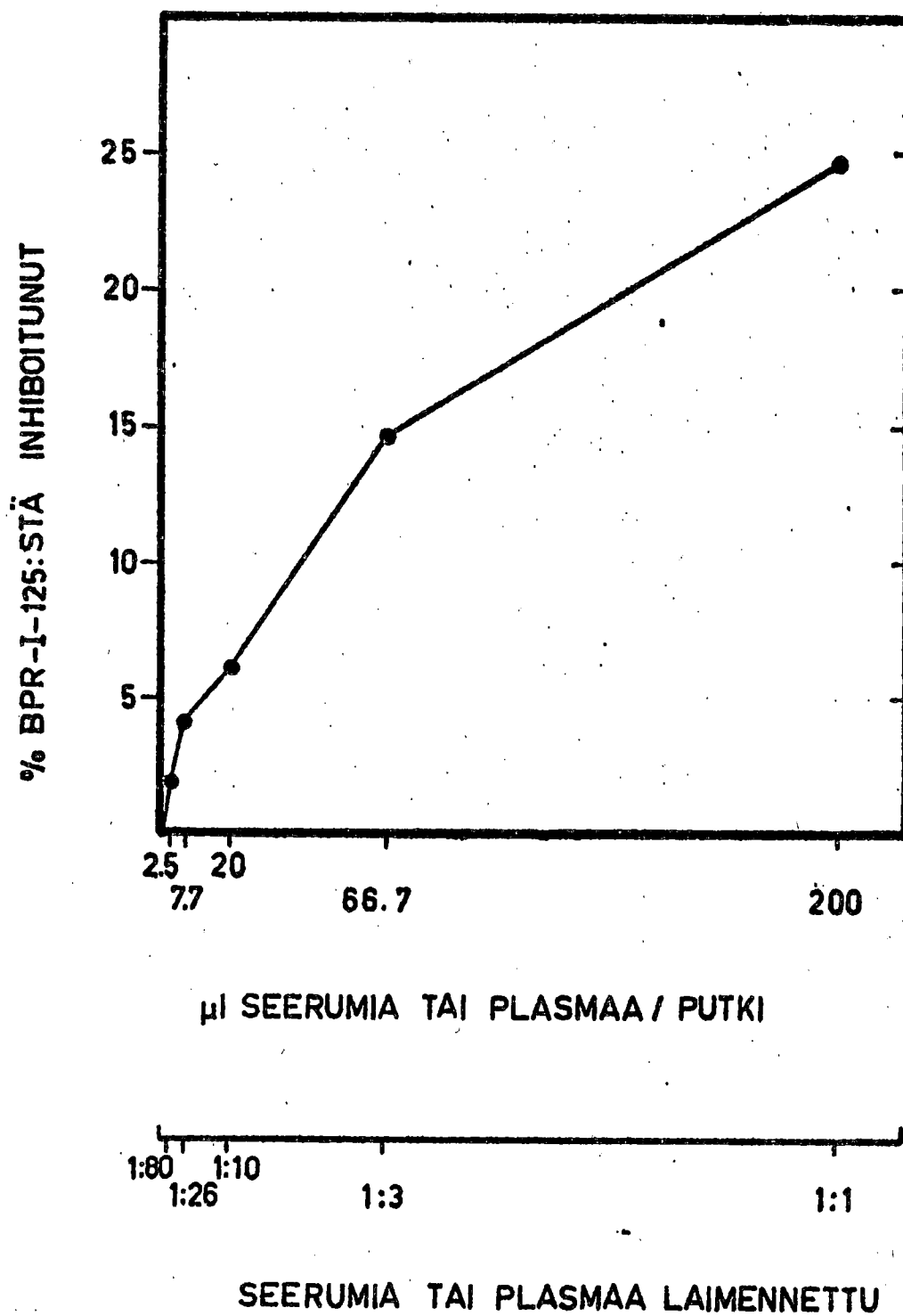


Kuva 4.2.3. Naudan prolaktiinin (NIH-P-B2) standardikäyrä ja sen määrittämiseen käytetyn antiseerumin ristiinreagoiminen lampaan prolaktiinin (NIH-P-S12) kanssa.

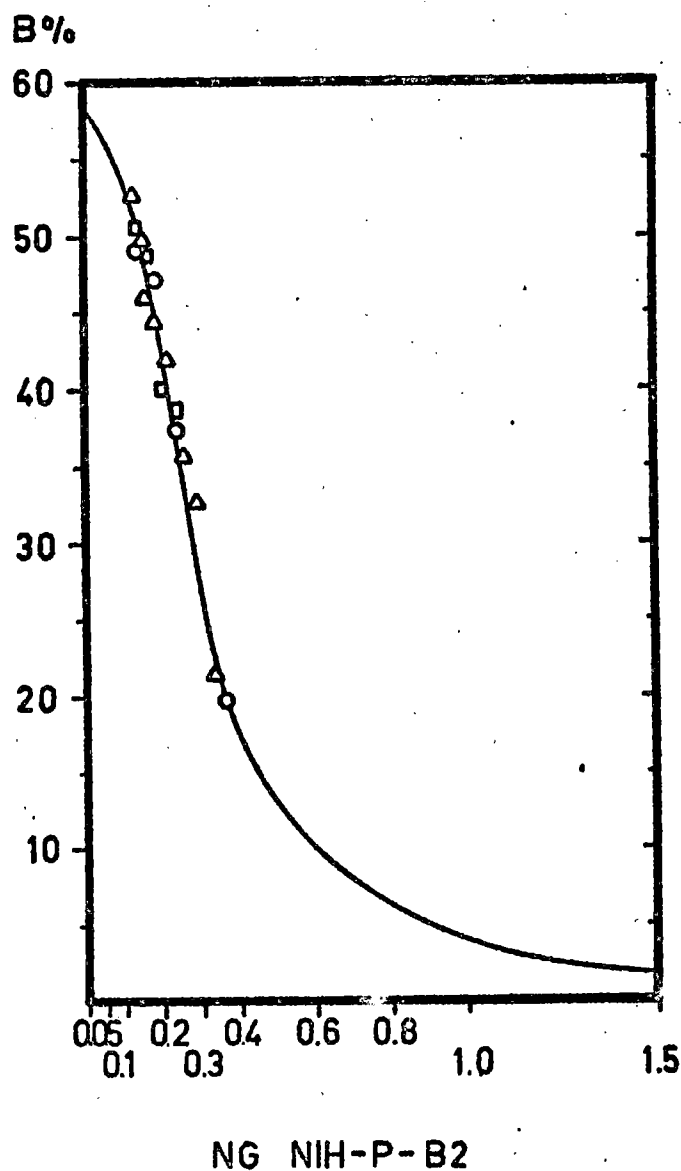


-  Aggregoitunut BPR-I-125
-  Monomeerinen BPR-I-125
-  Vapaa I-125

Kuva 4.2.4. Aggregoituneen ja monomeerisen naudan prolaktiinin (BPR-I-125) sekä vapaan jodin (I-125) sitoutuminen (%) naudan prolaktiinin vasta-aineisiin standardikäyräolosuhteissa.

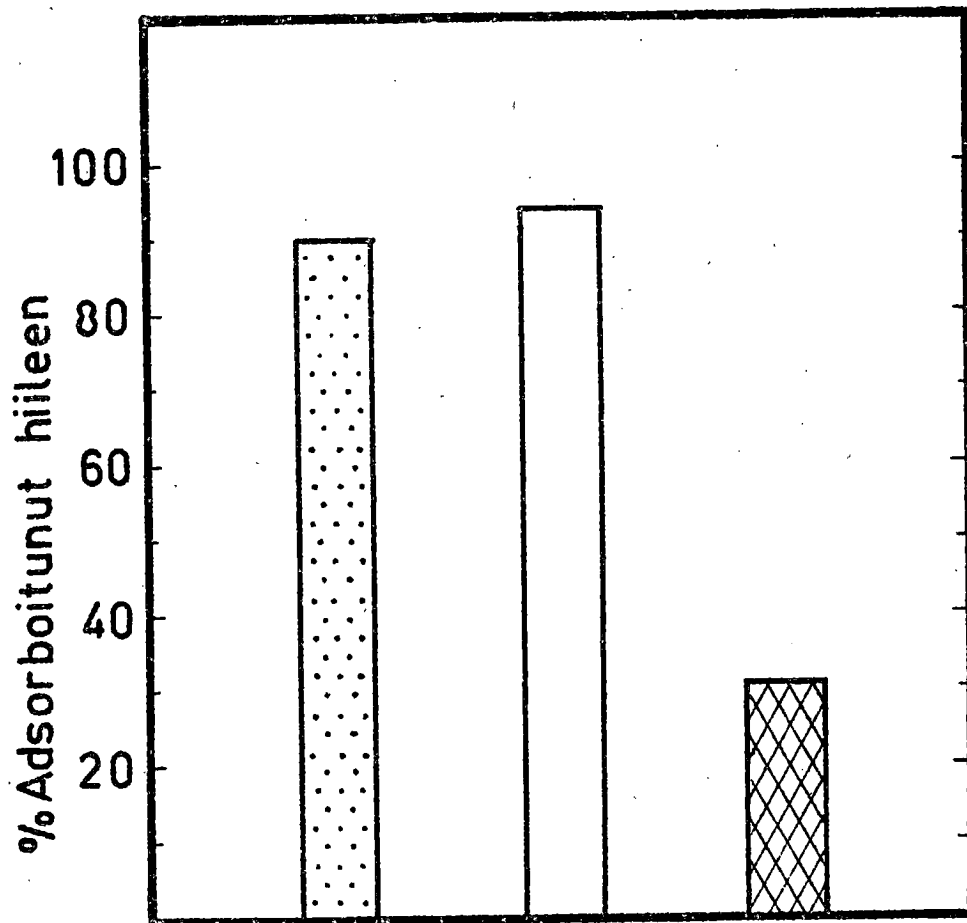





Kuva 4.2.5. Merkatun naudan prolaktiinin (BPR-I-125) keskimääräiset inhiboitumisprosentit kahdeksan seerumi- tai plasmalisäyksen jälkeen.



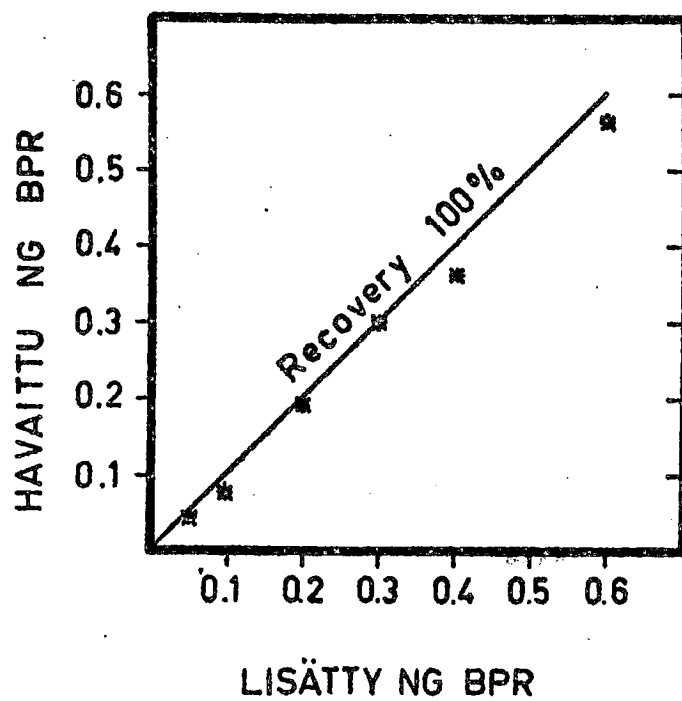
- Seerumia hiehosta n<sup>o</sup>.4, laimennukset 1:10 - 1:25  
BPR - pitoisuus 18.1 ng/ml
- △ Seerumia sonnista n<sup>o</sup> 2., laimennukset 1:20 - 1:60  
BPR - pitoisuus 36.8 ng/ml
- ◻ Seerumia sonnista n<sup>o</sup>3., laimennukset 1:60 - 1:110  
BPR - pitoisuus 72.3 ng/ml

Kuva 4.2.6. Naudan prolaktiinin (NIH-P-B2) standardi-  
käyrä ja kolmen seerumin laimennuskäyrät.



-  Aggregoitunut BPR-I-125
-  Monomeerinen BPR-I-125
-  Vapaa I-125

Kuva 4.2.7. Aggregoituneen ja monomeerisen nau-  
dan prolaktiinin (BPR-I-125) sekä vapaan jodin  
(I-125) adsorboituminen (%) dekstraanilla  
(Dextran T-110) päällystettyyn hiileen (Norit A).



Kuva 4.4.1. Prolaktiinilisäysten havaitseminen (recovery) seerumista RIA-menetelmällä.



## 10. TAULUKOT

## Taulukko 3.1.1.1.

Tutkimuksessa käytetyt hormonivalmisteet, niiden koodimerkinnot ja biologiset aktiivisuudet

Valmisteen nimi	Koodimerkintä	Biologinen aktiivisuus
Naudan prolaktiini (BPR)	NIH-P-B2	19.9 IU/mg
Naudan kasvuhormoni (BGH)	NIH-GH-B17	0.92 IU/mg
Naudan follikkeliä stimuloiva hormoni (BFSH)	NIH-FSH-B1	0.49 NIH-FSH-S1 units/mg
Naudan luteinisoiva hormoni (BLH)	NIH-LH-B9	0.70 NIH-LH-S1 units/mg
Naudan tyreoidiaa stimuloiva hormoni (BTSH)	NIH-TSH-B7	3.58 USP units/mg
Lampaan prolaktiini (OPR)	NIH-P-S12	35 IU/mg
Lampaan kasvuhormoni (OGH)	NIH-GH-S11	0.56 IU/mg
Lampaan follikkeliä stimuloiva hormoni (OFSH)	NIH-FSH-S10	1.10 NIH-FSH-S1 units/mg
Lampaan luteinisoiva hormoni (OLH)	NIH-LH-S19	1.01 NIH-LH-S1 units/mg
Lampaan tyreoidiaa stimuloiva hormoni (OTSH)	NIH-TSH-S8	1.70 USP units/mg

## Taulukko 3.1.4.1.

Verinäytteiden ottoon käytetyt eläimet ja ajankohdat sekä analysoitu veren osa

Eläin no.	Veren ottamis- ajankohta	Analysoitu veren osa
Lehniä 1.	22.1.1974	seerumi
Hieho 1.	23.1.1975	"
Hieho 2.	23.1.1975	"
Hieho 3.	1.7.1975	"
Hieho 4.	1.7.1975	"
Sonni 1.	14.1.1975	plasma
Sonni 2.	1.7.1975	seerumi
Sonni 3.	1.7.1975	"

Taulukko 3.2.1.1.

Immunologisen sitoutumisen mittaamiseen tarvittavat putket ja niiden sisältämät liuokset (µl)

Liukset	T-putki	O-putki	E-putki	M-putki	S-putki	N-putki
Inkubointipuskuri	-	200	-	200	100	-
Antiseerumin laimennuspuskuri	-	100	100	-	-	-
Antiseerumi	-	-	-	100	100	100
BPR-I-125	100	100	100	100	100	100
Standardi	-	-	-	-	100	-
Näyte	-	-	200	-	-	200
Inkubointilavuus	100	400	400	400	400	400

Taulukko 4.2.1.

Merkatun naudan prolaktiinin (BPR-I-125) inhiboiminen (%) kahdeksan eri verinäytteen vaikutuksesta

Näytteen laimennus aste	Näytettä lisätty µl/putki	% BPR-I-125:STA INHIBOITUNUT								$\bar{x}$
		LL	H1.	H2.	H3.	H4.	S1.	S2.	S3.	
1 : 1	200	22.7	23.0	28.5	24.4	26.3	28.2	19.5	23.9	24.6
1 : 3	66.7	12.9	16.0	14.8	12.0	18.1	17.0	12.1	12.9	14.5
1 : 10	20	4.8	4.6	6.9	7.0	5.2	8.1	6.6	6.7	6.2
1 : 26	7.7	1.4	1.4	4.5	3.8	3.8	2.3	7.1	9.4	4.2
1 : 80	2.5	1.0	1.7	0.9	3.7	2.5	0.5	1.8	3.7	2.0

$\bar{x}$  = keskiarvo

Taulukko 4.3.1.

Talvella otettujen verinäytteiden prolaktiini (BPR)-pitoisuudet

Eläin no.	Laimennus- aste	BPR ng/ml+s	V %	Määrittys- kertoja
Lehmä 1.	1 : 1	1.48+0.13	8.8	3
Heiho 1.	1 : 10	7.67+1.04	13.6	3
Hieho 2.	1 : 10	9.33+0.76	8.1	3
Sonni 1.	1 : 10	8.17+0.29	3.5	3
$\bar{X}$		6.66+0.56	8.5	3

s = keskihajonta  
V % = vaihtelukerroin  
 $\bar{X}$  = keskiarvo

Taulukko 4.3.2.

Kesällä otettujen verinäytteiden prolaktiini (BPR)-pitoisuudet

Eläin no.	Laimennus- aste	BPR ng/ml+s	V %	Määrittys- kertoja
Hieho 3.	1 : 10	10.17+0.29	2.9	3
Hieho 4.	1 : 26	20.80+1.30	6.3	3
Sonni 2.	1 : 80	72.00+0.00	0	3
Sonni 3.	1 : 26	39.43+2.71	6.9	3
$\bar{X}$		35.60+1.08	4.0	3

s = keskihajonta  
V % = vaihtelukerroin  
 $\bar{X}$  = keskiarvo

Taulukko 4.4.1.

Prolaktiini (BPR)-lisäysten (ng) havaitseminen (recovery)  
RIA-menetelmällä

BPR lisätty	BPR havaittu	Recovery %
0.05	0.04	80
0.10	0.08	80
0.20	0.19	95
0.30	0.30	100
0.40	0.36	90
0.60	0.56	93
$\bar{x}$		89.7

$\bar{x}$  = keskiarvo

11. LIITTEET

LIITE I

Standardiliuosten välisiä variانسseja

EPR	ng	0.000	0.005	0.010	0.020	0.030	0.040	0.050	0.100	0.200	0.300	0.400	0.600	0.800	1.000
0.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.005	-0.3319	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.010	-0.2303	0.1016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.020	0.0619	0.3938	0.2922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.030	-0.6408	-0.3089	-0.4105	-0.7027	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.040	-1.6175	-1.2856	-1.3972	-1.6794	-0.9767	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.050	-1.1458	-0.8139	-0.9156	-1.2078	-0.5050	0.4717	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.100	-4.0124	-3.6805	-3.7821	-4.0743	-3.3716	-2.3949	-2.8666	-	-	-	-	-	-	-	-
0.200	-14.6750	-14.3431	-14.4447	-14.7369	-14.0342	-13.0575	-13.5292	-10.6626	-	-	-	-	-	-	-
0.300	-28.1986	-27.8667	-27.9683	-28.2606	-27.5578	-26.5811	-27.0528	-24.1862	-13.5236	-	-	-	-	-	-
0.400	-38.0346	-37.7027	-37.8043	-38.0966	-37.3938	-36.4171	-36.8888	-34.0222	-23.3596	-9.8360	-	-	-	-	-
0.600	-44.4554	-44.1235	-44.2251	-44.5173	-43.8146	-42.8379	-43.3096	-40.4430	-29.7804	-16.2568	-6.4208	-	-	-	-
0.800	-46.2976	-45.9657	-46.0673	-46.3595	-45.6568	-44.6801	-45.1518	-42.2852	-31.6226	-18.0990	-8.2630	-1.8422	-	-	-
1.000	-49.6588	-49.3269	-49.4286	-49.7208	-49.0180	-48.0413	-48.5130	-45.6465	-34.9838	-21.4602	-11.6242	-5.2035	-3.3613	-	-
1.500	-51.8441	-51.5121	-51.6138	-51.9060	-51.2033	-50.2266	-50.6982	-47.8317	-37.1691	-23.6455	-13.8095	-7.3887	5.5465	-2.1852	-

Tuckeyn q-arvo (15, 118 vap. astetta):

P <	q	(g/√2)
0.05	4.90	3.47
0.01	5.61	3.97

## LIITE 2.

Kolmen standardikäyrän standardiliuosten vasta-aineisiin sitoutuneiden säteilymäärien rinnakkaismääritysten keskiarvot (cpm) 0-näytteestä ja edeltävästä näytteestä sekä keskimääräiset immunologiset sitoutumisprosentit (B %).

Standardiliuos (ng BPR/putki)	Rinnakkaisten keskiarvo	Ero 0- näytteestä	Ero edellisestä	B %
0.000	5395.66700	-	-	58.1
0.005	5442.11134	46	46	57.7
0.010	5427.88965	32	-14	57.8
0.020	5387.00098	-9	-41	58.2
0.030	5485.33399	89	98	57.4
0.040	5622.00098	226	137	56.3
0.050	5556.00098	160	-66	56.8
0.100	5957.11231	561	401	53.7
0.200	7449.11231	2054	1492	42.1
0.300	9341.44729	3945	1892	27.4
0.400	10717.77931	5322	1377	16.8
0.600	11616.22463	6220	898	9.8
0.800	11874.00197	6478	258	7.8
1.000	12344.33596	6948	470	4.1
1.500	12650.11330	7254	306	1.7

$$s_{\bar{X}} = \sqrt{\frac{88109}{9}} = 98.9$$

$$P < 0.05 \quad q = 4.90$$

$$P < 0.01 \quad q = 5.61$$

$$w = 4.90 \times 98.9 = 485 \quad (P < 0.05)$$

$$w = 5.61 \times 98.9 = 555 \quad (P < 0.01)$$



