



**Monoclonal Mouse  
Anti-Human  
Ki-67 Antigen**  
Clone MIB-1  
Code M7240

ENGLISH	
<b>Intended use</b>	For in vitro diagnostic use.  Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1, is intended for use in immunohistochemistry. With more than 400 literature citations, the MIB-1 antibody has now been established as a reference monoclonal mouse antibody for the demonstration of the Ki-67 antigen in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens. In diagnostic histopathology and cell biology, the antibody has proven valuable for the demonstration of the Ki-67 antigen in normal and neoplastic cells, for example in soft-tissue sarcoma (1), prostatic adenocarcinoma (2), and breast carcinoma (3). The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.
<b>Introduction</b>	The Ki-67 antigen is a nuclear protein, which is defined by its reactivity with monoclonal antibody from the Ki-67 clone (4). Two isoforms of 345 and 395 kDa have been identified (5). The Ki-67 antigen is preferentially expressed during all active phases of the cell cycle (G <sub>1</sub> , S, G <sub>2</sub> and M-phases), but it is absent in resting cells (G <sub>0</sub> -phase) (4). During interphase, the antigen can be exclusively detected within the nucleus, whereas in mitosis most of the protein is relocated to the surface of the chromosomes. The antigen is rapidly degraded as the cell enters the non-proliferative state (6), and there appears to be no expression of Ki-67 during DNA repair processes (7).
<b>Reagent provided</b>	Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 0.05 mol/L Tris/HCl, 1% Bovine Serum Albumin, pH 7.2, and containing 15 mmol/L NaN <sub>3</sub> . <u>Clone:</u> MIB-1 (8). <u>Isotype:</u> IgG1, kappa. <u>Mouse Ig concentration:</u> see label on vial.  The protein concentration between lots may vary without influencing the optimal dilution. The titer of each individual lot is compared and adjusted to a reference lot to ensure a consistent immunohistochemical staining performance from lot-to-lot.
<b>Immunogen</b>	Human recombinant peptide corresponding to a 1002 bp Ki-67 cDNA fragment (8).
<b>Specificity</b>	In Western blotting of lysates of the multiple myeloma cell line, IM-9, the MIB-1 antibody labels bands of 345 and 395 kDa, identical to the bands labelled by the original Ki-67 antibody. Furthermore, Western blotting and competitive binding experiments clearly demonstrate that MIB-1, like the original Ki-67 antibody, reacts with an epitope encoded by a 66 bp repetitive element in the Ki-67 gene. In immunohistochemistry, the MIB-1 and the Ki-67 antibodies provide identical staining patterns on serial tonsillar frozen sections (8). The MIB-1 antibody recognizes native Ki-67 antigen and recombinant fragments of the Ki-67 molecule (8).  As demonstrated by immunohistochemistry, the antibody cross-reacts with the Ki-67-equivalent protein in various mammals, including cow, dog, horse, sheep (6), and swine.
<b>Precautions</b>	1. For professional users. 2. This product contains sodium azide (NaN <sub>3</sub> ), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing. 3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used. 4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. 5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
<b>Storage</b>	Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Services.
<b>Specimen preparation</b>	<u>Paraffin sections:</u> The antibody can be used for labeling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin, Bouin's fixative, B5-fixative, Dubosq-Brazil or Zenker's solution (9). For tissues fixed in formalin, optimal results are obtained with Dako Target Retrieval Solution, Code S1700, Dako Target Retrieval Solution, High pH, Code S3308, 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0, or 10 mmol/L Tris/HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. Pre-treatment of tissues with proteinase K was found inefficient. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. <u>Frozen sections and cell preparations:</u> The antibody can be used for labelling acetone-fixed frozen sections and fixed cell smears.
<b>Staining procedures</b>	<u>Dilution:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Code M7240, may be used at a dilution range of 1:75-1:150 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human tonsil or human intestinal mucosa and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in Dako Target Retrieval solution, Code S1700, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory. The recommended negative control is Dako Mouse IgG1, Code X0931, diluted to the same mouse IgG concentration as the primary antibody. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, it is recommended to dilute these reagents immediately before use, or dilute in Dako Antibody Diluent, Code S0809. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimen. <u>Visualization:</u> Dako LSAB™+/HRP kit, Code K0679, and Dako EnVision™+/HRP kits, Codes K4004 and K4006, are recommended. For frozen sections and cell preparations, the Dako APAAP kit, Code K0670, is a good alternative if endogenous peroxidase staining is a concern. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit. <u>Automation:</u> The antibody is well-suited for immunohistochemical staining using automated platforms, such as the Dako Autostainer.

(104980-003)

M7240/EFG/KRM/2008.11.07 p. 1/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

<b>Product-specific limitations</b>	Occasional labelling of tissue components in vessel walls and pancreatic stroma has been observed in immunohistochemistry.
<b>Performance characteristics</b>	Cells labelled by the antibody display a nuclear staining pattern except in mitotic cells, where the chromosomes and the cytoplasm are labelled. <u>Normal tissues:</u> In small intestine and colon, mucosal neck cells and deep crypt cells are positive with the antibody. The same is the case with germinal centre cells of Payer's patches. Surface epithelium cells and other mucosal cells, e.g. Paneth's cells and cells of submucosal connective tissue are completely negative. The same is true for muscle cells, with the exception of a few positive cells in smooth muscles. Kidney, liver, pancreas and brain are negative (9). <u>Abnormal tissues:</u> In a study of 123 soft tissue sarcomas, Ki-67 was demonstrated with the highest expression in malignant fibrous histiocytomas and the lowest in liposarcomas using the MIB-1 antibody. The antibody was also applied successfully for the demonstration of the Ki-67 antigen in 221 prostate carcinomas (2) and 919 breast carcinomas (3).

FRANÇAIS	
<b>Intérêt</b>	Pour diagnostic in vitro.  Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1, est destiné pour un usage en immunohistochimie. Avec plus de 400 citations dans la documentation, l'anticorps MIB-1 constitue désormais une référence parmi les anticorps monoclonaux de souris pour la mise en évidence de l'antigène Ki-67 sur des échantillons inclus en paraffine, fixés au formol. Pour les diagnostics histopathologiques et la biologie cellulaire, l'anticorps a fait la preuve de son intérêt pour la mise en évidence de l'antigène Ki-67 dans les cellules normales et néoplasiques, dans les sarcomes des tissus mous (1), les adénocarcinomes prostatiques (2), et les cancers du sein (3), par exemple. L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.
<b>Introduction</b>	L'antigène Ki-67 est une protéine nucléaire définie par sa réactivité avec l'anticorps monoclonal provenant du clone Ki-67 (4). Deux isoformes de 345 et 395 kDa ont été identifiées (5). L'antigène Ki-67 est exprimé de façon préférentielle au cours de toutes les phases actives du cycle cellulaire (phases G <sub>1</sub> , S, G <sub>2</sub> et M), mais il est absent dans les cellules en repos (phase G <sub>0</sub> ) (4). Au cours de l'interphase, l'antigène est exclusivement détecté dans le noyau, alors que pendant la mitose il se situe à la surface des chromosomes. L'antigène est rapidement dégradé dès que la cellule passe dans un état non-prolifératif (6), et il semble n'y avoir aucune expression du Ki-67 pendant les processus de réparation de l'ADN (7).
<b>Réactif fourni</b>	L'anticorps de souris monoclonale fourni à l'état liquide comme culture cellulaire surnageante dialysée contre 0,05 mol/L Tris/HCl, albumine de sérum bovin à 1%, pH 7.2, et contenant 15 mmol/L NaN <sub>3</sub> . <u>Clone:</u> MIB-1 (8). <u>Isotype:</u> IgG1, kappa. <u>Concentration de l'IgG de souris:</u> Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.  La concentration en protéines peut varier d'un lot à l'autre sans que cela influence la dilution optimale. Le titre de chaque lot est comparé et ajusté par rapport à un lot de référence pour assurer des performances de coloration immunohistochimiques cohérentes d'un lot à l'autre.
<b>Immunogène</b>	Peptide humain recombinant correspondant à un fragment 1002 bp de l'ADNc du Ki-67 (8).
<b>Spécificité</b>	Lors de transfert du type Western de lysats de lignées cellulaires de myélomes multiples, IM-9, l'anticorps MIB-1 a marqué des stries de 345 et 395 kDa, identiques à celles qui ont été marquées par l'anticorps Ki-67 d'origine. De plus, la technique Western Blot et les expériences de liaison compétitive mettent clairement en évidence que le MIB-1, tout comme par l'anticorps Ki-67 d'origine, montre une réaction à un épitope codé par un élément répétitif 66bp du gène du Ki-67. En immunohistochimie, les anticorps MIB-1 et le Ki-67 fournissent des modèles de marquage identiques sur une série de coupes d'amygdales congelées (8). L'anticorps MIB-1 reconnaît l'antigène Ki-67 natif et les fragments recombinants de la molécule de Ki-67 (8).  Comme l'a déterminé l'immunohistochimie, l'anticorps montre une réaction croisée à la protéine équivalente au Ki-67 chez divers mammifères dont la vache, le chien, le cheval, le mouton (6) et le porc.
<b>Précautions d'emploi</b>	1. Pour utilisateurs professionnels. 2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN <sub>3</sub> ), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit pas classé comme étant nuisible, l'azide de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre pour former des dépôts hautement explosifs d'azides métallisés. Lors de l'élimination du produit, laisser couler l'eau à flot pour éviter toute accumulation d'azides métallisés dans la tuyauterie. 3. Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose. 4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau. 5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.
<b>Conservation</b>	Stocker entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur le flacon. Dans le cas où les réactifs sont conservés sous d'autres conditions que celles spécifiées, les conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles doivent être opérés simultanément avec les échantillons du patient. En cas de résultats imprévus qui ne peuvent pas être expliqués par des changements de procédures de laboratoire et qu'un problème avec le produit est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.
<b>Préparation de l'échantillon</b>	<u>Coupes en paraffine:</u> L'anticorps peut être utilisé pour marquer les coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol, le fixateur de Bouin, le fixateur B5, la solution de Dubosq-Brazil ou de Zenker (9). Pour les tissus fixés au formol, des résultats optimaux sont obtenus par démasquage de l'épitope dans Dako Target Retrieval Solution, code S1700, Dako Target Retrieval Solution, à pH élevé, code S3308, en tampon citrate 10 mmol/L, à 6,0 de pH, ou avec en tampon Tris 10 mmol/L, de l'EDTA 1 mmol/L, à 9,0 de pH. Le prétraitement des tissus par la protéinase K est inefficace. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher pendant le traitement ou la procédure d'immunomarquage immunohistochimique suivante. <u>Coupes congelées et préparations cellulaires:</u> L'anticorps peut être utilisé pour marquer des coupes congelées fixées à l'acétone et les frottis cellulaires fixés.
<b>Procédure d'immunomarquage</b>	<u>Dilution:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, code M7240, peut être dilué entre 1:75 et 1:150 pour application sur coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol de l'amygdale humaine ou de la muqueuse intestinale humaine pendant 20 minutes de démasquage de l'épitope induite par la chaleur dans Dako Target Retrieval Solution, code S1700, et pendant 30 minutes d'incubation à température ambiante avec l'anticorps primaire. Les conditions optimales peuvent varier selon l'échantillon et la méthode de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire particulier. Le contrôle négatif requis est Dako Mouse IgG1, code X0931, dilué à la même concentration de l'IgG de souris que celle de l'anticorps primaire. A moins que la stabilité de l'anticorps dilué et du contrôle négatif ait été établie dans la procédure d'immunomarquage, il est recommandé de diluer ces réactifs juste avant leur emploi, ou de les diluer dans Dako Antibody Diluent, code S0809. Les contrôles positifs et négatifs doivent être opérés simultanément avec l'échantillon du patient.

(104980-003)

M7240/EFG/KRM/2008.11.07 p. 2/4





Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

**Révélation:** Dako LSAB™+/HRP kit, code K0679, et Dako EnVision™+/HRP kits, codes K4004 et K4006, sont requis. Pour les coupes en congélation et préparations cellulaires, Dako APAAP kit, code K0670, est une alternative valable si le marquage endogène péroxydasique est à craindre. Suivre la procédure incluse avec le kit de révélation choisi.

**Automatisation:** L'anticorps est bien adapté au marquage immunohistochimique sur des plates-formes automatisées comme le Dako Autostainer.

<b>Limitations spécifiques du produit</b>	Le marquage occasionnel d'éléments tissulaires des parois vasculaires et du stroma pancréatique a été observé en immunohistochimie.
<b>Performances</b>	Les cellules marquées par l'anticorps présentent un modèle de marquage nucléaire à l'exception des cellules mitotiques dans lesquelles les chromosomes et le cytoplasme sont marqués. <b>Tissus normaux:</b> Dans l'intestin grêle et le colon, les cellules du col muqueux et des cryptes profondes sont positives à l'anticorps. C'est également le cas des cellules des centres germinatifs des plaques de Payer. Les cellules de l'épithélium de surface et les autres cellules muqueuses, les cellules de Paneth, par exemple, ainsi que les cellules conjonctives sous-muqueuses sont complètement négatives. Les cellules des muscles, à l'exception de quelques cellules positives dans les muscles lisses. Les reins, le foie, le pancréas et le cerveau sont négatifs (9). <b>Tissus anormaux:</b> L'étude de 123 sarcomes des tissus mous à l'aide de l'anticorps MIB-1 a montré que le Ki-67 présentait une expression maximale en cas d'histiocytomes fibreux malins et une expression minimale en cas de liposarcomes. L'anticorps a également été utilisé avec succès à la mise en évidence de l'antigène Ki-67 dans 221 cas de cancers de la prostate (2) et 919 cas de cancers du sein (3).
<b>DEUTSCH</b>	
<b>Zweckbestimmung</b>	Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen. Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1, ist für den immunhistochemischen Gebrauch bestimmt. Mit mehr als 400 Erwähnungen in der Fachliteratur hat sich der MIB-1-Antikörper unterdessen als ein monoklonaler muriner Referenz-Antikörper für den Nachweis des Ki-67-Antigens in formalinfixierten, paraffineingebetteten Proben etabliert. In der diagnostischen Histopathologie und Zellbiologie hat sich der Antikörper als wertvoll für den Nachweis des Ki-67-Antigens in gesunden und neoplastischen Zellen erwiesen, wie z. B. bei Weichteilsarkomen (1), Adenokarzinom der Prostata (2) und Mammakarzinom (3). Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit geeigneten Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer diagnostischer Tests des Patienten vorgenommen werden.
<b>Einleitung</b>	Als nukleäres Protein ist das Ki-67-Antigen durch seine Reaktivität mit dem monoklonalen Antikörper des Ki-67-Klons definiert (4). Es wurden zwei Isoformen mit 345 und 395 kDa identifiziert (5). Das Ki-67 Antigen wird während aller aktiven Phasen des Zellzyklus (G <sub>1</sub> -, S-, G <sub>2</sub> - und M-Phase) präferentiell exprimiert, fehlt jedoch in ruhenden Zellen (G <sub>0</sub> -Phase) (4). Während der Interphase kann das Antigen ausschließlich innerhalb des Nukleus nachgewiesen werden, wohingegen bei der Mitose der überwiegende Teil des Proteins auf die Oberfläche der Chromosomen umgelagert wird. Das Antigen wird schnell abgebaut, wenn die Zelle in den nicht proliferativen Zustand übergeht (6) und während der DNA-Reparaturprozesse scheint keine Expression von Ki-67 stattzufinden (7).
<b>Geliefertes Reagenz</b>	Der monoklonale Mausantikörper wird in flüssiger Form als Zellkulturüberstand geliefert, wurde gegen 0,05 mol/L Tris/HCl, 1 <span> </span> % bovinem Serumalbumin, pH-Wert 7,2 dialysiert und enthält 15 mmol/L NaN <sub>3</sub> . <b>Klon:</b> MIB-1 (8). <b>Isotyp:</b> IgG1, Kappa. <b>Murine Ig-Konzentration:</b> Siehe Produktetikett. Die Proteinkonzentration kann bei den Chargen verschieden ausfallen, ohne die optimale Verdünnung zu beeinflussen. Der Titer wird bei jeder einzelnen Charge mit einer Referenzcharge verglichen und dieser angeglichen, um konstante immunhistochemische Färbeergebnisse zwischen den Chargen zu gewährleisten.
<b>Immunogen</b>	Humanes rekombinantes Peptid, entsprechend einem Ki-67-cDNA-Fragment mit 1002 bp (8).
<b>Spezifität</b>	Beim Western-Blott von Lysaten der multiplen Myelom-Zelllinie IM-9 markiert der MIB-1-Antikörper Banden von 345 und 395 kDa, die mit den durch den ursprünglichen Ki-67-Antikörper markierten Banden identisch sind. Zudem zeigen Experimente mithilfe des Western-Blotting und kompetitiven Bindens eindeutig auf, dass MIB 1 – in gleicher Weise wie der ursprüngliche Ki-67-Antikörper – mit einem Epitop reagiert, das durch ein repetitives Element mit 66 bp im Ki-67-Gen kodiert wird. In der Immunhistochemie erbringen die Antikörper MIB-1 und Ki-67 identische Färbemuster bei tiefgekühlten Serienschnitten der Tonsille (8). Der MIB-1-Antikörper erkennt das native Ki-67-Antigen sowie rekombinante Fragmente des Ki-67-Moleküls (8). Es wurde der immunhistochemische Nachweis erbracht, dass der Antikörper bei verschiedenen Säugetieren wie Kuh, Hund, Pferd, Schaf und Schwein eine Kreuzreaktion mit dem Ki-67-äquivalenten Protein eingeht.
<b>Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>Für geschultes Fachpersonal.</li> <li>Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN<sub>3</sub>), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natrium-Azid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden.</li> <li>Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.</li> <li>Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.</li> <li>Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.</li></ol>
<b>Lagerung</b>	Bei 2 – 8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum verwenden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Wenn unerwartete Verfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.
<b>Probenvorbereitung</b>	<b>Paraffinschnitte:</b> Der Antikörper kann für die Markierung von in Paraffin eingebetteten, in Formalin, Bouin-Fixativ oder B5-Fixativ, Dubosq-Brazil- oder Zenker-Lösung fixierten histologischen Schnitten genutzt werden (9). Für formalinfixierte Gewebe werden optimale Resultate erzielt mit Dako Target Retrieval Solution, Code-Nr. S1700, Dako Target Retrieval Solution, pH 9,9, Code-Nr. S3308, 10 mmol/L Citratpuffer, pH 6,0, oder 10 mmol/L Tris/HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 9,0. Die Vorbehandlung der Gewebe mit Proteinase K hat sich als ineffizient erwiesen. Während der Gewebevorbehandlung oder während der sich anschließenden immunhistochemischen Färbeprozedur dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen.

DEUTSCH	
<b>Zweckbestimmung</b>	Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen. Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1, ist für den immunhistochemischen Gebrauch bestimmt. Mit mehr als 400 Erwähnungen in der Fachliteratur hat sich der MIB-1-Antikörper unterdessen als ein monoklonaler muriner Referenz-Antikörper für den Nachweis des Ki-67-Antigens in formalinfixierten, paraffineingebetteten Proben etabliert. In der diagnostischen Histopathologie und Zellbiologie hat sich der Antikörper als wertvoll für den Nachweis des Ki-67-Antigens in gesunden und neoplastischen Zellen erwiesen, wie z. B. bei Weichteilsarkomen (1), Adenokarzinom der Prostata (2) und Mammakarzinom (3). Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit geeigneten Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer diagnostischer Tests des Patienten vorgenommen werden.
<b>Einleitung</b>	Als nukleäres Protein ist das Ki-67-Antigen durch seine Reaktivität mit dem monoklonalen Antikörper des Ki-67-Klons definiert (4). Es wurden zwei Isoformen mit 345 und 395 kDa identifiziert (5). Das Ki-67 Antigen wird während aller aktiven Phasen des Zellzyklus (G <sub>1</sub> -, S-, G <sub>2</sub> - und M-Phase) präferentiell exprimiert, fehlt jedoch in ruhenden Zellen (G <sub>0</sub> -Phase) (4). Während der Interphase kann das Antigen ausschließlich innerhalb des Nukleus nachgewiesen werden, wohingegen bei der Mitose der überwiegende Teil des Proteins auf die Oberfläche der Chromosomen umgelagert wird. Das Antigen wird schnell abgebaut, wenn die Zelle in den nicht proliferativen Zustand übergeht (6) und während der DNA-Reparaturprozesse scheint keine Expression von Ki-67 stattzufinden (7).
<b>Geliefertes Reagenz</b>	Der monoklonale Mausantikörper wird in flüssiger Form als Zellkulturüberstand geliefert, wurde gegen 0,05 mol/L Tris/HCl, 1 <span> </span> % bovinem Serumalbumin, pH-Wert 7,2 dialysiert und enthält 15 mmol/L NaN <sub>3</sub> . <b>Klon:</b> MIB-1 (8). <b>Isotyp:</b> IgG1, Kappa. <b>Murine Ig-Konzentration:</b> Siehe Produktetikett. Die Proteinkonzentration kann bei den Chargen verschieden ausfallen, ohne die optimale Verdünnung zu beeinflussen. Der Titer wird bei jeder einzelnen Charge mit einer Referenzcharge verglichen und dieser angeglichen, um konstante immunhistochemische Färbeergebnisse zwischen den Chargen zu gewährleisten.
<b>Immunogen</b>	Humanes rekombinantes Peptid, entsprechend einem Ki-67-cDNA-Fragment mit 1002 bp (8).
<b>Spezifität</b>	Beim Western-Blott von Lysaten der multiplen Myelom-Zelllinie IM-9 markiert der MIB-1-Antikörper Banden von 345 und 395 kDa, die mit den durch den ursprünglichen Ki-67-Antikörper markierten Banden identisch sind. Zudem zeigen Experimente mithilfe des Western-Blotting und kompetitiven Bindens eindeutig auf, dass MIB 1 – in gleicher Weise wie der ursprüngliche Ki-67-Antikörper – mit einem Epitop reagiert, das durch ein repetitives Element mit 66 bp im Ki-67-Gen kodiert wird. In der Immunhistochemie erbringen die Antikörper MIB-1 und Ki-67 identische Färbemuster bei tiefgekühlten Serienschnitten der Tonsille (8). Der MIB-1-Antikörper erkennt das native Ki-67-Antigen sowie rekombinante Fragmente des Ki-67-Moleküls (8). Es wurde der immunhistochemische Nachweis erbracht, dass der Antikörper bei verschiedenen Säugetieren wie Kuh, Hund, Pferd, Schaf und Schwein eine Kreuzreaktion mit dem Ki-67-äquivalenten Protein eingeht.
<b>Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>Für geschultes Fachpersonal.</li> <li>Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN<sub>3</sub>), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natrium-Azid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden.</li> <li>Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.</li> <li>Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.</li> <li>Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.</li></ol>
<b>Lagerung</b>	Bei 2 – 8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum verwenden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Wenn unerwartete Verfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.
<b>Probenvorbereitung</b>	<b>Paraffinschnitte:</b> Der Antikörper kann für die Markierung von in Paraffin eingebetteten, in Formalin, Bouin-Fixativ oder B5-Fixativ, Dubosq-Brazil- oder Zenker-Lösung fixierten histologischen Schnitten genutzt werden (9). Für formalinfixierte Gewebe werden optimale Resultate erzielt mit Dako Target Retrieval Solution, Code-Nr. S1700, Dako Target Retrieval Solution, pH 9,9, Code-Nr. S3308, 10 mmol/L Citratpuffer, pH 6,0, oder 10 mmol/L Tris/HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 9,0. Die Vorbehandlung der Gewebe mit Proteinase K hat sich als ineffizient erwiesen. Während der Gewebevorbehandlung oder während der sich anschließenden immunhistochemischen Färbeprozedur dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen.
(104980-003)	M7240/EFG/KRM/2008.11.07 p. 3/4
Dako Denmark A/S   Produktionsvej 42   DK-2600 Glostrup   Denmark   Tel. +45 44 85 95 00   Fax +45 44 85 95 95   CVR No. 33 21 13 17	

<b>Färbeprozedur</b>	<b>Gefrierschnitte und zytologische Präparate:</b> Der Antikörper kann für die Markierung von azetoxifixierten Gefrierschnitten und fixierten Zellausstrichen verwendet werden. <b>Verdünnung:</b> Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Code-Nr. M7240, kann bei einem Verdünnungsbereich von 1:75-1:150 eingesetzt werden, wenn es für formalinfixierte paraffineingebettete Schnitte der menschlichen Tonsille oder der humanen Intestinalschleimhaut genutzt wird und wenn 20 Minuten lang die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung mit Dako Target Retrieval solution, Code-Nr. S1700, gefolgt von 30 Minuten Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur, durchgeführt wird. Die optimalen Bedingungen schwanken je nach Probe und Methode der Probenvorbereitung und sollten von jedem einzelnen Labor bestimmt werden. Die empfohlene Negativkontrolle ist Dako Mouse IgG1, Code-Nr. X0931, das auf dieselbe murine IgG-Konzentration wie der primäre Antikörper verdünnt wurde. Solange mit dem eigentlichen Testsystem die Stabilität des verdünnten Antikörpers und der Negativkontrolle nicht sichergestellt ist, wird empfohlen, diese Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch zu verdünnen oder die Verdünnung mit Dako Antibody Diluent, Code-Nr. S0809, vorzunehmen. Es sollten die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. <b>Visualisierung:</b> Folgende Kits werden empfohlen: Dako LSAB™+/HRP-Kit, Code-Nr. K0679 und Dako EnVision™+/HRP-Kits, Code-Nr. K4004 und K4006. Falls bei Gefrierschnitten und Zellpräparaten Probleme mit endogener Peroxidasefärbung auftreten, bietet der Dako APAAP Kit, Code-Nr. K0670, eine gute Alternative. Es ist dem Verfahren zu folgen, das in den Anleitungen des genutzten Kits für die Visualisierung erläutert wird. <b>Automatisierung:</b> Der Antikörper ist gut für das immunhistochemische Färben unter Nutzung automatisierter Plattformen wie beispielsweise des „Autostainer“ von Dako geeignet.		
<b>Produktspezifische Beschränkungen</b>	In der Immunhistochemie wurde gelegentlich die Markierung von Gewebebestandteilen in Gefäßwänden und im Stoma des Pankres beobachtet.		
<b>Leistungseigenschaften</b>	Durch den Antikörper markierte Zellen zeigen ein nukleäres Färbemuster. Hiervon ausgenommen sind mitotische Zellen, bei denen die Chromosomen und das Zytoplasma markiert werden. <b>Normalgewebe:</b> Positive Reaktionen mit dem Antikörper werden bei Zellen des Dünn- und Dickdarms, Becherzellen der Magenschleimhaut und dem Fundus der Krypten entstammenden Zellen erhalten. Das Gleiche gilt für Keimzentrumszellen der Payer-Areale. Oberflächliche Epithelzellen und weitere Schleimhautzellen, wie z. B. Paneth-Körnerzellen und Zellen des submukosalen Bindegewebes, testen vollständig negativ. Das Gleiche gilt für Muskelzellen, jedoch mit Ausnahme einiger weniger positiver Zellen der glatten Muskulatur. Niere, Leber, Pankreas und Hirn testen negativ (9). <b>Anomales Gewebe:</b> In einer Studie an 123 Weichteilsarkomen wurde bei Einsatz des MIB-1-Antikörpers für Ki-67 der Nachweis seiner höchsten Expression in malignen fibrösen Histiozytomen (Fibroxanthom) und seiner niedrigsten Expression in Liposarkomen erbracht. Der Antikörper wurde zudem erfolgreich für den Nachweis des Ki-67-Antigens bei 221 Prostatakarzinomen (2) und 919 Mammakarzinomen eingesetzt (3).		
<b>References/ Références/ Literatur</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>Huutanan RL, Blomqvist CP, Wiklund TA, Böhling TO, Virolainen MJ, Tukiainen EJ, et al. Comparison of the Ki-67 score and S-phase fraction as prognostic variables in soft-tissue sarcoma. Br J Cancer 1999;79:945-51.</li> <li>Borre M, Bentzen SM, Nerstrøm B, Overgaard J. Tumor cell proliferation and survival in patients with prostate cancer followed expectantly. J Urol 1998;159:1609-14.</li> <li>Seshadri R, Leong AS-Y, McCaul K, Firgaira FA, Setlur V, Horsfall DJ. Relationship between p53 gene abnormalities and other tumour characteristics in breast-cancer prognosis [published erratum appears in Int J Cancer 1996;69:354]. Int J Cancer 1996;69:135-41.</li> <li>Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol 1984;133:1710-5.</li> <li>Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. Am J Pathol 1991;138:867-73.</li> <li>Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown [review]. J Cell Physiol 2000;182:311-22.</li> <li>Key G, Kubbutat MH, Gerdes J. Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein. J Immunol Methods 1994;177:113-7.</li> <li>Key G, Becker MHG, Baron B, Duchrow M, Schlüter C, Flad H-D, et al. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. Lab Invest 1993;68:629-36.</li> <li>Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. J Pathol 1992;168:357-63.</li></ol>		
<b>Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole</b>			
<b>REF</b>	Catalogue number Référéncé du catalogue Bestellnummer	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Manufacturer Fabricant Hersteller
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	<b>LOT</b> Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung	
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 Use by Utiliser jusque Verwendbar bis	
(104980-003)	M7240/EFG/KRM/2008.11.07 p. 4/4		
Dako Denmark A/S   Produktionsvej 42   DK-2600 Glostrup   Denmark   Tel. +45 44 85 95 00   Fax +45 44 85 95 95   CVR No. 33 21 13 17			