

## Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone Ki-67

**Code No./ Code/ Code-Nr. F 0788**      **FITC-Conjugated**  
**Code No./ Code/ Code-Nr. R 0840**      **RPE-Conjugated**

### ENGLISH

#### Intended use

For in vitro diagnostic use.

F 0788 and R 0840 are intended for use in flow cytometry. Anti-Ki-67 antigen is useful for assessing cellular proliferation in acute leukaemia, lymphoproliferative disorders and breast cancer (1-3). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.

#### Introduction

The Ki-67 antigen is a nuclear protein defined by its reactivity with the monoclonal antibody from the Ki-67 clone (4, 5). 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 (4). The complete gene locus of the Ki-67 has been sequenced. The size of the gene is approximately 30,000 base pairs organized in 15 exons with sizes from 67 to 6845 base pairs and in 14 introns with sizes from 87 to 3569 base pairs. The gene is located on chromosome 10 (6).

The Ki-67 protein is expressed in all proliferating cells during late G<sub>1</sub>, S, M and G<sub>2</sub> phases of the cell cycle while cells in the G<sub>0</sub> (non-cycling cells) phase consistently lack the Ki-67 antigen. Un-stimulated normal human cells do not express the Ki-67 antigen (4, 5).

Numerous studies have shown the use of anti-Ki-67 antigen in measuring the Ki-67 labelling index or growth fraction in various solid tumours using immunohistochemical methods (4).

Flow cytometric analysis has demonstrated to be a useful method for detecting Ki-67 antigen and assessing cellular proliferation in tumor cells as an alternative to S-phase cell cycle determination, continuous 3H-thymidine labelling, acridine orange and bromodeoxyuridine staining (7, 8).

#### Reagent provided

The Anti-Ki-67 Antigen conjugates, F 0788 and R 0840, have been produced from a purified monoclonal mouse antibody. The conjugates are provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN<sub>3</sub>, pH 7.2. Each vial contains 100 tests (10 µL of conjugate for up to 10<sup>6</sup> RAJI Cells).

Isotype: IgG1, kappa. Conjugate concentration mg/L: See label on vial.

Antibody Code No.	Fluorochrome	Negative Control Code No.
F 0788	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X 0927
R 0840	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928

#### Immunogen

Crude nuclear fraction of L428 cells (4).

#### Specificity

Immunohistochemical and flow cytometric analysis has shown that Anti-Ki-67 Antigen reacts negatively or weakly with un-stimulated cells from normal healthy donors (1-3, 5).

Flow cytometric analysis of breast cancer samples demonstrated that Anti-Ki-67 Antigen labelled proliferating tumor cells (2, 3). One study with 438 breast cancer cases showed variable cellular Ki-67 expression levels (1 – 60% above normal level) (2). Infiltrating lobular carcinomas showed lower Ki-67 antigen expression levels compared to ductal carcinomas. Medulary carcinomas had the highest Ki-67 antigen levels. Another study with 154 breast cancer cases showed overall (all cell cycle phases: G0+G1, S+G2M) and G1 cellular Ki-67 antigen expression levels from 5 – 100% and 2 - 95%, respectively (3). In both studies there was a positive correlation between S-phase or S+G<sub>2</sub>M-phase fraction and Ki-67 staining (2, 3).

Anti-Ki-67 Antigen also reacts with proliferating neoplastic cells in acute lymphoblastic leukaemia (ALL), acute myeloid leukaemia (AML), chronic myeloid leukaemia (CML), chronic myeloid leukaemia in blast crisis (CML-BC), B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL), hairy cell leukaemia (HCL), prolymphocytic leukaemia (PLL) and immunocytoma (IC). Results show high cellular Ki-67 antigen levels in ALL (10 - 65%), IC (10 - 44%), B-CLL (up to 20%) and CML-BC cases (10 – 35%). Prolymphocytic leukaemia and hairy cell leukaemia have lower Ki-67 antigen levels (1).

#### Precautions

- For professional users.
- 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.
- As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

#### Storage

Store in the dark 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 our Technical Services.

#### Staining procedure

- Harvest cells and determine total number present. Wash twice in wash buffer. (If required, this procedure may also be used with whole blood samples)
- If required perform staining of cell surface antigens using appropriate directly conjugated monoclonal antibodies at this stage. Following staining wash cells once in PBS and discard supernatant. N.B. Phycoerythrin conjugates are not suitable for the detection of cell surface antigens using this method.
- Add DakoCytomation IntraStain Reagent A (Fixation), code No. K 2311, using 50µl per 1x10<sup>6</sup> cells. Mix gently by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension.
- Incubate at room temperature for 10 minutes.
- Add 500µl cold (-20°C) absolute methanol. Mix gently by using a vortex mixer and incubate for 10 minutes at room temperature.
- Add 2 mL PBS and mix gently by using a vortex mixer.
- Centrifuge at 300 x g for 5 minutes, then aspirate the supernatant, leaving approximately 50 µL of fluid..

(102453-002)

F 0788/R 0840/EFG/SSA/01.03.03 p. 1/4

- Mix thoroughly by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension and add DakoCytomation IntraStain Reagent B (Permeabilization), code No. K 2311, using 50µl per 1 x 10<sup>6</sup> cells.
- Add 10 µl of the anti-Ki-67 Antigen conjugate. Mix gently by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension.
- Use a non-reactive monoclonal antibody of the same isotype, and conjugated with the same fluorochrome, as a negative control (see table).
- Incubate in the dark at 4 °C for 30 minutes.
- Repeat steps 6 and 7.
- Resuspend in 0.25 mL 0.5% paraformaldehyde (fixative) in 0,01 mol/L PBS, pH 7,4.PBS.
- Analyse on a flow cytometer.

It is recommended to include a suitable positive and negative control sample with each run for reagent and preparation control. Note that fluorochrome conjugates are light sensitive, and samples should be protected from light during the staining procedure and until the analysis.

### FRANÇAIS

#### Intérêt

Pour diagnostic *in vitro*.

F 0788 et R 0840 sont destinés pour un usage en cytométrie en flux. L'antigène Anti-Ki-67 est utile pour évaluer la prolifération cellulaire dans la leucémie aiguë, les troubles lymphoprolifératifs et le cancer du sein (1-3). L'interprétation des résultats doit être entreprise par un professionnel certifié dans le contexte de l'histoire clinique du patient ainsi que des autres examens diagnostics.

#### Introduction

L'antigène Ki-67 est une protéine nucléaire définie par sa réactivité avec l'anticorps monoclonal du clone Ki-67 (4, 5). Pendant l'interphase, l'antigène peut être exclusivement détecté dans le noyau, alors que dans la mitose la majorité de la protéine s'installe à la surface des chromosomes (4). Le locus du gène complet de Ki-67 a été séquencé. La dimension du gène est approximativement 30,000 paires de bases organisées dans 15 exons à dimensions variées de 67 à 6845 paires de base et dans 14 introns à dimensions variées de 87 à 3569 paires de bases. Le gène est situé sur le chromosome 10 (6).

La protéine Ki-67 est exprimée dans toutes les cellules prolifératives durant les phases évoluées G<sub>1</sub>, S, M et G<sub>2</sub> du cycle cellulaire alors que les cellules dans la phase G<sub>0</sub> (cellules non-proliférantes) manquent constamment d'antigène Ki-67. Les cellules humaines normales non stimulées n'expriment pas l'antigène Ki-67 (4, 5).

De nombreuses études ont révélé l'usage de l'antigène anti-Ki-67 pour mesurer l'index de marquage Ki-67 ou fraction de croissance dans plusieurs tumeurs solides en utilisant les méthodes immunohistochimiques (4).

L'analyse cytométrique de flux a été mise en évidence comme étant une méthode utile pour la détection de l'antigène Ki-67 et évaluer la prolifération cellulaire dans les cellules tumorales, comme une alternative à la détermination du cycle cellulaire à phase S, le marquage continu 3H-thymidine, acridine orange et le marquage bromodésoxyuridine (7, 8).

#### Réactif fourni

Les conjugués de l'antigène Anti-Ki-67, F 0788 et R 0840, ont été produits à partir d'un anticorps monoclonal purifié de la souris. Les conjugués sont fournis à l'état liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) et 15 mmol/l de NaN<sub>3</sub>, à 7,2 de pH. Chaque flacon contient 100 tests (10 µl de conjugué pour un maximum de 10<sup>6</sup> de cellules RAJI).

Isotype: IgG1, kappa. Concentration du conjugué mg/l: Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

Code de l' anticorps	Fluor	Code du Contrôle Négatif
F 0788	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X 0927
R 0840	RPE (R-Phycoérythrine)	X 0928

#### Immunogène

Fraction nucléaire brute de cellules L428 (4).

#### Spécificité

L'analyse immunohistochimique et cytométrique en flux ont révélé que l'antigène Anti-Ki-67 montre une réaction négative ou faible avec les cellules non stimulées de donneurs sains normaux (1-3, 5).

L'analyse cytométrique d'échantillons du cancer du sein ont mis en évidence que l'antigène Anti-Ki-67 marquait les cellules tumorales prolifératives (2, 3). Une étude de 438 cas de cancer du sein révélait des niveaux variés d'expression cellulaire Ki-67 (1 – 60% au-dessus du niveau normal) (2). Des carcinomes lobulaires infiltrants ont révélé des niveaux d'expression moindres d'antigène Ki-67 en comparaison aux carcinomes canalaire. Les carcinomes médullaires avaient les niveaux d'antigène Ki-67 les plus élevés. Une autre étude de 154 cas de cancer du sein a mis en évidence dans l'ensemble (toute phase du cycle cellulaire : G0+G1, S+G2M) et G1 les niveaux d'expression de l'antigène cellulaire Ki-67 de 5 – 100% et 2 - 95%, respectivement (3). Une corrélation positive dans les deux études a été démontrée entre la fraction de croissance de la phase S ou S+G<sub>2</sub>M et le marquage Ki-67 (2, 3).

L'antigène Anti-Ki-67 montre une réaction aux cellules néoplastiques proliférantes dans la leucémie lymphoblastique aiguë (ALL), la leucémie myéloïde aiguë (AML), la leucémie myéloïde chronique (CML), la leucémie myéloïde chronique en crise blastique (CML-BC), la leucémie lymphocytiqne chronique des cellules B (B-CLL), la leucémie tricholeucocytaire (HCL), la leucémie polymphocytiqne (PLL) et l'immunocytome (IC). Les résultats révèlent des niveaux cellulaires élevés de l'antigène Ki-67 dans ALL (10 - 65%), IC (10 - 44%), B-CLL (20% maximum) et cas de CML-BC (10 – 35%). La leucémie polymphocytiqne et la leucémie tricholeucocytaire ont des niveaux d'antigène Ki-67 moindres (1).

#### Précautions d'emploi

- Pour utilisateurs professionnels.
- 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.
- Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.

#### Stockage

Conserver à l'obscurité entre 2° et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur le flacon. Si les réactifs ont été conservés dans d'autres conditions que celles spécifiées, ces 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, contactez nos Services Techniques.

(102453-002)

F 0788/R 0840/EFG/SSA/01.03.03 p. 2/4

