

VINEO™ Unstable Proteins

100 tests

Ref: 354-8121

Notice d'utilisation (Français)

page 3

Instructions (English)

page 15

Détection spécifique des protéines instables
Specific detection of unstable proteins

BIO-RAD

VINEO™ Unstable Proteins

100 tests

Réf : 354-8121

Notice d'utilisation

Détection spécifique des protéines instables

BIO-RAD

SOMMAIRE

- 1 - INTRODUCTION ET PRINCIPE DU TEST
- 2 - COMPOSITION DU KIT
 - Réactifs
 - Consommables
- 3 - PRÉLÈVEMENT DE L'ÉCHANTILLON
- 4 - PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON
 - Contrôle direct sur le vin de la présence de protéines instables
 - Détermination de la juste quantité de bentonite à ajouter à la cuve pour éliminer les protéines instables
- 5 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE, NON FOURNI DANS LE KIT
- 6 - UTILISATION DE LA BANDELETTE
- 7 - PROTOCOLE
- 8 - LECTURE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS
- 9 - PRÉCAUTIONS D'EMPLOI - SÉCURITÉ
- 10 - RÉFÉRENCES

1 - INTRODUCTION ET PRINCIPE DU TEST

L'apparition d'un trouble dans les vins blancs et rosés après embouteillage n'altère en rien les qualités gustatives du vin mais sa présence peut gêner le consommateur.

Le phénomène de casse protéique, largement décrit depuis longtemps, lié à la précipitation de protéines instables est connu pour être responsable de ce trouble (Laborde, 1904). L'absence de ces protéines garantit en effet la stabilité du vin et sa limpidité au cours du temps.

La formation des colloïdes est complexe et multifactorielle. Les experts s'entendent néanmoins sur l'implication des protéines du raisin, Chitinase et Thaumatine-like dans ce processus (Manteau et collaborateurs, 2010). Le traitement par collage à la bentonite permet d'éliminer ces protéines indésirables par floculation (Ribéreau-Gayon et Penaud, 1961).

Si l'ajout de bentonite est la solution reconnue à cette problématique, il est nécessaire de maîtriser son utilisation. En excès, la bentonite peut appauvrir le vin de sa richesse organoleptique.

Le kit VINEO™ Unstable Proteins est basé sur une technique d'immunologie qui cible spécifiquement les protéines impliquées dans le phénomène de casse protéique. Il permet de contrôler la présence de protéines instables dans un vin et de déterminer la juste quantité de bentonite à utiliser pour éliminer la totalité de ces protéines. Sa précision permet de limiter la perte des atouts organoleptiques du vin.

Ce test se déroule en 4 étapes :

- Dépôt de l'échantillon de vin
- Immuno-détection des protéines instables
- Révélation
- Lecture des résultats

2 - COMPOSITION DU KIT

• Réactifs

Désignation	Composant	Nombre d'unités ou volume (mL)	Température de stockage
R1	Bandelette de dépôt	1 flacon de 100	+2°C à +25°C
R2	Solution de lavage concentrée (20X) à diluer 20 fois	1 flacon de 250 mL	+2°C à +25°C
R3	Contrôle négatif	1 tube en verre à bouchon vert de 0,55 mL	+2°C à +8°C
R4	Contrôle positif	1 tube en verre à bouchon rouge de 0,55 mL	+2°C à +8°C
R5	Solution de saturation	3 flacons de 220 mL	+2°C à +8°C
R6	Anticorps primaires	1 flacon brun à bouchon blanc de 5 mL	+2°C à +8°C
R7	Anticorps secondaires	1 flacon brun à bouchon jaune de 5 mL	+2°C à +8°C
R8	Solution de révélation	4 flacons à bouchon brun de 115 mL	+2°C à +8°C

- Ce kit contient 100 bandelettes permettant de tester respectivement jusqu'à 600 échantillons.
- Les réactifs R1, R3, R4, R5, R6, R7 et R8 sont des solutions prêtes à l'emploi.
- Les réactifs R2, R3, R4 et R5 contiennent du ProClin™ 300 à la concentration de 0.1%. Ils sont classés comme substance irritante au sens de la réglementation européenne.
- Le kit doit être conservé entre +2°C et +8°C.

• Consommables

Composant	Nombre d'unités	Température de stockage
Tube (Chambre d'incubation)	Tubes 5 mL à bouchons vert 100 unités, usage unique	+2°C à +25°C

3 - PRÉLÈVEMENT DE L'ÉCHANTILLON

- **Vins non embouteillés** : les échantillons à analyser devront être collectés dans des conditions propres, sur une cuve homogène. Les échantillons d'au minimum 100 mL seront prélevés dans des récipients propres en verre, polyéthylène ou autres flacons. L'analyse peut être réalisée sur des vins non filtrés.

La collecte des vins sur cuve homogène se fera au choix :

- après un remontage
 - par le dégustateur au niveau du robinet après avoir fait couler 500 mL de vin
 - par un plongeur avec une bouteille propre
- **Vins en bouteilles** : analyses à réaliser à partir de la bouteille.
 - Les échantillons doivent être remis au laboratoire de préférence dans les 24 hrs, sans dépasser 72 hrs après le prélèvement. Si les échantillons sont transportés et analysés dans les 24 hrs, le transport et le stockage peuvent être effectués à température ambiante (+18°C à +30°C). Si les échantillons sont transportés et analysés dans les 48 hrs, le transport et le stockage doivent s'effectuer entre +2°C et +8°C.

4 - PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

• Contrôle direct sur le vin de la présence de protéines instables

Les échantillons de vins sont déposés directement sur la bandelette à l'aide d'une pipette, sans préparation préalable.

• Contrôle de la présence de protéines instables sur des échantillons de vins traités avec des quantités croissantes de bentonite

- L'objectif, lors de la réalisation d'une gamme de bentonite sur le vin à tester, est d'évaluer la juste quantité de bentonite à ajouter à la cuve pour éliminer les traces de protéines instables et de faire le traitement le plus raisonné possible.
- Il existe différents types de bentonites sur le marché, suivez les recommandations de votre fournisseur pour sa réhydratation et son utilisation.

- La bentonite utilisée pour ce test doit être la même que celle qui sera ajoutée à la cuve pour traitement. Chacune des bentonites disponibles sur le marché réagit de manière spécifique sur l'élimination des protéines, et la concentration préconisée avec une bentonite ne sera pas la même que celle préconisée avec une autre bentonite.
- Certaines bentonites peuvent être sensibles aux variations de pH et de dureté de l'eau. Veillez à tester la bentonite dans des conditions similaires à celles utilisées lors du traitement du vin.

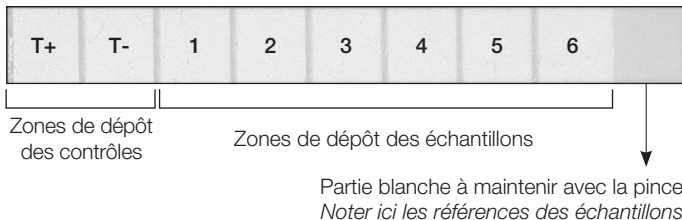
Traitement des échantillons de vin à la bentonite

- 1 - La bentonite doit être réhydratée à la concentration de 15 g/L.
NB : pour les échantillons de bentonite liquide prête à l'emploi, suivre les recommandations du fournisseur.
- 2 - Préparer autant de tubes servant à la préparation de l'échantillon que de points de gamme à tester : le vin non traité et 5 points de gamme.
- 3 - Déposer 2 mL ou 4 mL de vin dans chaque tube.
- 4 - Déposer dans chaque tube un volume variable de bentonite afin d'obtenir une concentration croissante de bentonite (**voir Annexe 1 : Volume d'une bentonite à Xg/L à ajouter pour réaliser la gamme souhaitée entre 5 et 300 g/hL**).
- 5 - Fermer les tubes et homogénéiser 4 à 6 fois par simple retournement.
- 6 - Laisser sédimenter une nuit. Pour les laboratoires équipés, une centrifugation est possible à 2500 g pendant 10 min.
- 7 - **Ne déposer que le surnageant, sans bentonite, sur la bandelette.**

5 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE, NON FOURNI DANS LE KIT

- Agitateur rotatif
- Micropipette 20 µL
- Micropipette 100 ou 200 µL
- Cônes adaptables sur les micropipettes 100 µL ou 200 µL
- Cônes adaptables sur les micropipettes 20 µL
- Éprouvette graduée pour dilution du réactif R2
- Eau distillée ou minérale (de type Evian ou Volvic)
- Papier absorbant
- Pince plastique
NB : une pince en métal peut affecter l'intégrité des résultats
- Tubes pour la réalisation des points de gamme de bentonite

6 - UTILISATION DE LA BANDELETTE



7 - PROTOCOLE

La température du lieu où est réalisée la manipulation du test doit être comprise entre +18°C et +30°C.

Protocole avec agitation continue

Résultats obtenus en 2 hrs

Placer toutes les solutions à température ambiante 15 min au minimum avant le début des manipulations.

La pince sera utilisée pour sortir la bandelette à chaque fois qu'il est nécessaire de vider les solutions du tube.

Diluer la solution de lavage R2 à la concentration 1X : préparer 40 mL pour 1 bandelette (soit 2 mL de R2 concentré à 20X et compléter à 40 mL avec de l'eau distillée ou de l'eau minérale Volvic ou Evian).

NB : La solution ainsi diluée peut être conservée 8 jours à +4°C.

1 - Dépôt des échantillons

- Déposer 5 μ L de R4 sur la zone de dépôt T+.
- Déposer 5 μ L de R3 sur la zone de dépôt T-.
- Déposer 5 μ L de l'échantillon à tester dans les zones 1 à 6 de dépôt des échantillons :

- Dans le cas d'une gamme de bentonite :

- ▶ Déposer 5 μ L d'échantillon de vin non traité dans la zone 1.
- ▶ Déposer 5 μ L des points de gamme d'intérêt dans les zones suivantes (2 à 6).

- Dans le cas du contrôle direct sur vins :

- ▶ Déposer 5 μ L d'échantillon de vin à tester dans les zones 1 à 6.
- Laisser sécher 10 min à l'air libre.

2 - Saturation

- Placer la bandelette dans le tube et ajouter 4 mL de solution de saturation R5.
- Placer en agitation sur le rotor pendant 15 min (vitesse 15 rpm).
- Sortir la bandelette à l'aide de la pince, vider le tube de la solution de saturation et remettre la bandelette dans ce même tube.

3 - Détection primaire

- Ajouter dans le tube :
 - ▶ 3 mL de solution R2 diluée à 1X.
 - ▶ 1 mL de solution de saturation R5.
 - ▶ 50 μ L d'anticorps primaires R6 (bouchon blanc).
- Placer en agitation sur le rotor pendant 30 min (vitesse 15 rpm).
Remarque : cette étape est critique dans le déroulement du test, respecter les temps d'incubation des anticorps.
- Sortir la bandelette à l'aide de la pince plastique, vider le tube de la solution d'anticorps primaires et remettre la bandelette dans ce même tube.

4 - Lavages

- Effectuer 3 lavages de la bandelette :
NB : Après chaque lavage, la bandelette est retirée du tube à l'aide de la pince plastique, le réactif est éliminé. La bandelette est remise dans le même tube.
- Mettre 4 mL de solution R2 diluée à 1X dans le tube, rincer 10 secondes par retournement du tube à la main.
- Mettre 4 mL de solution R2 diluée à 1X dans le tube, laver 5 minutes sur agitateur.
- Mettre 4 mL de solution R2 diluée à 1X dans le tube, laver 5 minutes sur agitateur.

5 - Détection secondaire

- Ajouter dans le tube
 - ▶ 3 mL de solution R2 diluée à 1X
 - ▶ 1 mL de solution de saturation R5
 - ▶ 50 μ L d'anticorps secondaires R7 (bouchon jaune)
- Placer en agitation sur le rotor pendant 30 min (vitesse 15 rpm).

Remarque : cette étape est critique dans le déroulement du test, respecter les temps d'incubation des anticorps.

- Sortir la bandelette à l'aide de la pince, vider le tube de la solution d'anticorps secondaires.

6 - Lavages

- Faire de nouveau 3 lavages avec 4 mL de solution R2 diluée à 1X (idem étape 4).









7 - Révélation

- Ajouter 4 mL de solution de révélation R8.
- Placer en agitation sur le rotor pendant 10 min (vitesse 15 rpm).
- Sortir la bandelette à l'aide de la pince puis rincer la bandelette à l'eau.
- Sécher à l'air sur une feuille de papier absorbant.

L'analyse se fait comme indiqué au paragraphe : « Lecture et interprétation des résultats ».

8 - LECTURE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La concentration en bentonite nécessaire à la stabilisation du vin correspond à la dose testée pour laquelle le spot disparaît, ou à partir de laquelle la faible couleur du spot persiste. Dans l'exemple donné, la concentration de bentonite nécessaire est de 70 g/hL.

Zones de dépôt des contrôles		Zones de dépôt des échantillons						Partie blanche à maintenir avec la pince	
T+	T-	1	2	3	4	5	6		
									

T+ : Témoin positif

T- : Témoin négatif

1 : Vin brut (non filtré)

2 : Vin + 30 g/hL de bentonite

3 : Vin + 40 g/hL de bentonite

4 : Vin + 50 g/hL de bentonite

5 : Vin + 60 g/hL de bentonite

6 : Vin + 70 g/hL de bentonite

9 - PRÉCAUTIONS D'EMPLOI - SÉCURITÉ

Xi Irritant



R43 : Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.
S23-24-37-60 : Ne pas respirer les vapeurs/aérosols. Éviter le contact avec la peau. Porter des gants appropriés. Éliminer le produit et son récipient comme un déchet dangereux.

Les réactifs R2, R3, R4 et R5 contiennent du ProClin300™ à la concentration de 0.1%. Ils sont classés comme substance irritante au sens de la réglementation européenne.

Utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines instables, VINEO™ Unstable Proteins ne peut mettre en évidence l'instabilité protéique liée à une mauvaise utilisation de produits œnologiques entraînant des surcollages avec des produits tels que lysozyme, gélatine, albumine d'œuf, produits dérivés de levure, etc.

10 - RÉFÉRENCES

- 1 - Esteruelas, M., Poinssaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M.F., Canals, J.M., Zamora, F. (2009) Comparison of methods for estimating protein stability in white wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **60**: 302-311.
- 2 - Laborde (1904) Sur la clarification des vins blancs. *Revue de viticulture* **21**.
- 3 - Manteau, S., Poinssaut, P. (2010) Instabilité protéique des vins blancs et rosés. Partie 2/2: Comparaison des tests de stabilité protéique dans les vins blancs et rosés et mise au point d'un nouveau test: l'ImmunoTest™. *Revue des Œnologues* **135**: 23-27.
- 4 - Manteau, S., Sauvage, F.-X., Poinssaut, P., Scotti, B., Sieczkowski, N., Moutounet, M. (2006): Haze in white wine: Involvement of proteins other than Pathogenesis-Related proteins in spontaneous haze. In *Macrowine: Macromolecules and Secondary Metabolites of Grape and Wine*. Eds. Jeandet, P., Clement, C., Conreux, A., Intercept Publishers - Lavoisier, Reims, pp. 165-168.
- 5 - Pocock, K.F., Waters, E.J. (2006) Protein haze in bottled white wines: How well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport? *Australian Journal of Grape and Wine Research* **12**: 212-220.

- 6 - Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E. (1961): Précipitation des protéines. In Traité d'oenologie. Tome II - *Composition, transformations et traitements des vins*, Librairie Polytechnique Ch. Béranger, pp. 346-356.
- 7 - Médaille d'argent, Trophées Vinitech (octobre 2008)
Immuno Test[®] : test immunologique utilisant des anticorps spécifiques contre les protéines instables des vins blancs et rosés.
- 8 - Prix à l'innovation catégorie internationale, Viteff 2009 (octobre 2009)
L'Immuno Test[®] : un test immunologique utilisant des anticorps spécifiques contre les protéines instables des vins blancs et rosés.
- 9 - Prix spécial à l'Innovation à Intervitis (mars 2010).
Immuno Test[®]: un nouveau test pour la détermination de la stabilité protéique des vins blancs et rosés.

Annexe 1

Echantillon d'un volume de 4 mL	
Points de gamme à tester (en g/hL)	Volume de solution de bentonite (en μ L) rehydratée à 15 g/L à ajouter à l'échantillon
0	0
5	13
10	27
15	40
20	53,3
30	80
40	107
50	133
60	160
80	213
100	267
125	333
150	400
175	467
200	533
300	800

Echantillon d'un volume de 2 mL	
Points de gamme à tester (en g/hL)	Volume de solution de bentonite (en μ L) rehydratée à 15 g/L à ajouter à l'échantillon
0	0
5	7
10	13
15	20
20	27
30	40
40	53
50	67
60	80
80	107
100	133
125	167
150	200
175	233
200	267
300	400

NB : pour les échantillons de bentonite liquide prête à l'emploi, suivre les recommandations du fournisseur.

VINEO™ Unstable Proteins

100 tests

Ref: 354-8121

Instructions

Specific detection of unstable proteins

BIO-RAD

TABLE OF CONTENTS

- 1 - INTRODUCTION AND TEST PRINCIPLE
- 2 - KIT COMPOSITION
 - Reagents
 - Consumables
- 3 - SAMPLE COLLECTION
- 4 - SAMPLE PREPARATION
 - Direct detection of unstable proteins in wine
 - Detection of unstable proteins in wine samples treated with increasing amounts of bentonite
- 5 - REQUIRED MATERIALS, NOT INCLUDED IN KIT
- 6 - USE OF TEST STRIP
- 7 - PROTOCOL
- 8 - READING AND INTERPRETATION OF RESULTS
- 9 - PRECAUTIONS FOR USE - SAFETY
- 10 - REFERENCES

1 - INTRODUCTION AND TEST PRINCIPLE

The appearance of turbidity in white and rosé wines after bottling does not affect the flavor of the wine in any way, but its presence can bother consumers.

This turbidity, which was described more than a century ago, is caused by the precipitation of unstable proteins (protein haze) (Laborde, 1904). The wine's stability and clarity over time is guaranteed if these proteins are not present.

Colloid formation is a complex, multifactorial phenomenon. However, experts agree that grape proteins (chitinases, thaumatin-like proteins) are involved (Manteau et al. 2010). Bentonite fining treatment eliminates these undesirable proteins through flocculation (Ribereau-Gayon and Penaud, 1961).

Although adding bentonite is the accepted solution to this problem, its use must be fully controlled. Excessive amounts of bentonite can reduce the wine's organoleptic quality.

The VINEO™ Unstable Proteins kit relies on an immunology-based technique to specifically target the proteins involved in protein haze. It detects the presence of unstable proteins in wine and determines the exact amount of bentonite needed to eliminate all of these proteins. Because of the kit's accuracy, the wine preserves its organoleptic assets.

This test is performed in four steps:

- Deposit of wine sample
- Immunodetection of unstable proteins
- Color development
- Reading of results

2 - KIT COMPOSITION

• Reagents

Reference	Component	Number of units or volume (mL)	Storage temperature
R1	Test strip	1 bottle of 100 mL	+2°C to +25°C
R2	20X concentrated wash buffer (to be diluted 20X)	1 bottle of 250 mL	+2°C to +25°C
R3	Negative control	1 glass tube of 0.55 mL, green cap	+2°C to +8°C
R4	Positive control	1 glass tube of 0.55 mL, red cap	+2°C to +8°C
R5	Saturation solution	3 bottles of 220 mL	+2°C to +8°C
R6	Primary antibodies	1 brown bottle of 5 mL, white cap	+2°C to +8°C
R7	Secondary antibodies	1 brown bottle of 5 mL, yellow cap	+2°C to +8°C
R8	Development solution	4 bottles of 115 mL, brown cap	+2°C to +8°C

- This kit contains 100 test strips that can be used to test up to 600 samples.
- The reagents R1, R3, R4, R5, R6, R7 and R8 are supplied as ready-to-use solutions.
- Reagents R2, R3, R4 and R5 contain 0.1% ProClin™ 300. They are considered irritants under European regulations.
- The kit must be stored at temperatures between +2°C and +8°C.

• Consumables

Reference	Component	Storage temperature
Tube (incubation chamber)	5 mL tubes, green caps, single use, 100 units	+2°C to +25°C

3 - SAMPLE COLLECTION

- **Non-bottled wines:** The test samples must be collected from a homogeneous vat in clean conditions. At least 100 mL per sample will be collected into clean glass or polyethylene containers or other bottles. The analysis can be performed on unfiltered wines.

Collection of wine samples from a homogeneous vat will be done in one of three ways:

After pumping over

With a wine taster, from the tap after having let 500 mL of wine flow out

With a wine thief and clean collection bottle

- **Bottled wines:** Test samples are taken from the bottle.
- The samples must be taken to the laboratory preferably within 24 hours and no later than 72 hours after being collected. If the samples will be transported and analyzed within 24 hours, transportation and storage can be performed at room temperature (+18°C to +30°C). If the samples will be transported and analyzed within 48 hours, transportation and storage must be performed at temperatures between +2°C and +8°C.

4 - SAMPLE PREPARATION

• Direct detection of unstable proteins in wine

The wine samples do not need any special preparation; they are directly deposited onto the test strip with a pipette.

• Detection of unstable proteins in wine samples treated with increasing amounts of bentonite

- When testing a range of bentonite concentrations on the wine in question, the goal is to determine the exact amount of bentonite that needs to be added to the vat to eliminate any trace of unstable proteins and to perform the best possible treatment.

- Since various types of bentonite are available, follow the supplier's instructions for its reconstitution and use.
- The bentonite used in this test must be the same one that will be added to the vat during treatment. Every type of commercially-available bentonite reacts in a unique manner to eliminate proteins. The recommended concentration for one bentonite is not the same as the recommended concentration for a different bentonite.
- Some bentonites can be sensitive to variations in pH and water hardness. Make sure the bentonite is evaluated under the same conditions as the ones that will be used when treating the wine.

Treatment of wine samples with bentonite

- 1 - Reconstitute the bentonite to a concentration of 15 g/L.
Note: Follow the supplier's recommendations if using ready-to-use liquid bentonite.
- 2 - Prepare the appropriate number of sample preparation tubes for the range of concentrations being tested: Untreated wine plus five points in the range.
- 3 - Put 2 mL or 4 mL of wine in each tube.
- 4 - Add a different volume of bentonite to each tube to obtain an increasing concentration of bentonite (See Appendix 1: **Volume of bentonite at X g/L to be added when testing a desired range between 5 and 300 g/hL**).
- 5 - Close the tubes and mix by inverting them four to six times.
- 6 - Let precipitate overnight. If a centrifuge is available in the laboratory, the samples can be centrifuged at 2500 g for 10 minutes.
- 7 - **Place only the supernatant, without any bentonite, onto the test strip.**

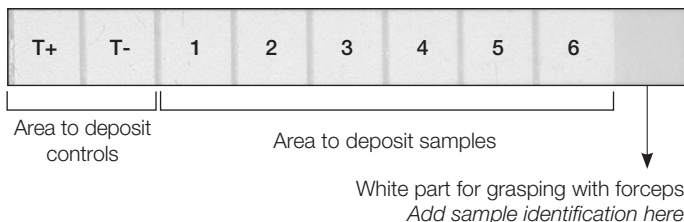
5 - REQUIRED MATERIALS, NOT INCLUDED IN KIT

- Rotary shaker
- Micropipette, 20 μ L
- Micropipette, 100 or 200 μ L
- Tips for micropipette, 100 μ L or 200 μ L
- Tips for micropipette, 20 μ L
- Graduated cylinder for diluting the R2 reagent
- Distilled or mineral (Evian or Volvic) water
- Absorbent paper
- Plastic forceps

Note: Using metal forceps could affect the integrity of the results.

- Tubes used to test various bentonite concentrations

6 - USE OF TEST STRIP



7 - PROTOCOL

The test procedure must be performed in a room kept at a temperature between +18°C and +30°C.

Protocol with continuous shaking Results obtained in two hours

At least 15 minutes before starting the procedure, bring all solutions to room temperature.

Use the forceps to take the test strip out of the tube whenever the solution is being poured out.

Dilute the R2 wash solution to 1X: Prepare 40 mL of this solution for one test strip (thus add 2 mL of 20X concentrated R2 and make up to 40 mL with distilled water or Evian or Volvic mineral water).

Note: This diluted solution can stored for up to eight days at +4°C.

1 - Depositing the samples

- Deposit 5 μL of R4 in the area marked T+.
- Deposit 5 μL of R3 in the area marked T-.
- Deposit 5 μL of the test sample in sample areas 1 to 6:

- In case of detection in wine samples treated with increasing amounts of bentonite:

- Deposit 5 μL of the untreated wine sample in area 1.
- Deposit 5 μL of the various concentrations within the range of interest into the other areas (2 to 6).

- In case of direct detection in wine:

- ▶ Deposit 5 μL of the wine test sample in areas 1 to 6.
- Let air dry for 10 minutes.

2 - Saturation

- Place test strip in tube and add 4 mL of R5 saturation solution.
- Place on rotary shaker for 15 minutes (speed 15 rpm).
- Take out strip using forceps, pour saturation solution out of tube and put strip back into same tube.

3 - Primary detection

- Add the following to the tube:
 - ▶ 3 mL of R2 solution diluted to 1X
 - ▶ 1 mL of R5 saturation solution
 - ▶ 50 μL of R6 primary antibody (white cap)
- Place on rotary shaker for 30 minutes (speed 15 rpm).
Comment: This step is critical to the test procedure – make sure to follow the indicated antibody incubation times.
- Take out strip using forceps, pour antibody solution out of tube and put strip back into same tube.

4 - Washing

- Wash test strip three times:
Note: After each washing step, remove strip from tube using plastic forceps and pour out reagent. Put test strip back into same tube.
- Add 4 mL of R2 solution diluted to 1X into tube; rinse 10 seconds by manually inverting tube.
- Add 4 mL of R2 solution diluted to 1X into tube, wash for five minutes on shaker.
- Add 4 mL of R2 solution diluted to 1X into tube, wash for five minutes on shaker.

5 - Secondary detection

- Add the following to the tube:
 - ▶ 3 mL of R2 solution diluted to 1X
 - ▶ 1 mL of R5 saturation solution
 - ▶ 50 μL of R7 secondary antibody solution (yellow cap)
- Place on rotary shaker for 30 minutes (speed 15 rpm).

Comment: This step is critical to the test procedure – make sure to follow the indicated antibody incubation times.

- Take out strip using forceps and pour secondary antibody solution out of tube.

6 - Washing

- Perform the triple-washing step again with 4 mL of R2 solution diluted to 1X (as in Step 4).

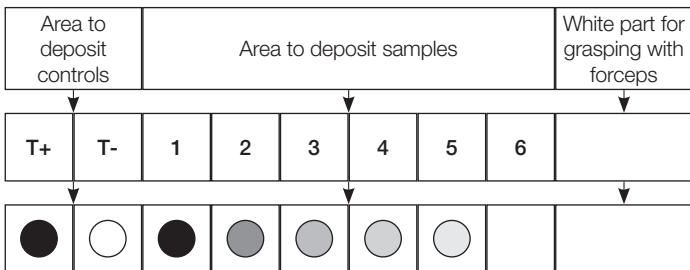
7 - Color development

- Add 4 mL of R8 development solution.
- Place on rotary shaker for 10 minutes (speed 15 rpm).
- Take out strip using forceps, then rinse strip with water.
- Air dry on a piece of absorbent paper.

The analysis is carried out as described in the section, “Reading and interpreting the results”.

8 - READING AND INTERPRETING THE RESULTS

The bentonite concentration needed to stabilize the wine corresponds to the tested dose where the spot disappears or the dose where the light spot color persists. In the example below, the required bentonite concentration is 70 g/hL.



T+: Positive control

T-: Negative control

1: Crude wine (unfiltered)

2: Wine + 30 g/hL bentonite

3: Wine + 40 g/hL bentonite

4: Wine + 50 g/hL bentonite

5: Wine + 60 g/hL bentonite

6: Wine + 70 g/hL bentonite

9 - PRECAUTIONS FOR USE - SAFETY

Xi Irritant



R43: May cause sensitization by skin contact.

S23-24-37-60: Do not breathe vapor/spray. Avoid contact with skin. Wear suitable gloves. This material and/or its container must be disposed of as hazardous waste.

Reagents R2, R3, R4 and R5 contain 0.1% ProClin 300™. They are considered irritants under European regulations.

Using specific antibodies against unstable proteins, VINEO™ Unstable Proteins cannot reveal protein instability related to incorrect use of oenological products, leading to over-fining with products such as lysozyme, gelatin, egg albumin, yeast-derived products, etc.

10 - RÉFÉRENCES

- 1 - Esteruelas, M., Poinsaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M.F., Canals, J.M., Zamora, F. (2009) Comparison of methods for estimating protein stability in white wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **60**: 302-311.
- 2 - Laborde (1904) Sur la clarification des vins blancs. *Revue de viticulture* **21**.
- 3 - Manteau, S., Poinsaut, P. (2010) Instabilité protéique des vins blancs et rosés. Partie 2/2: Comparaison des tests de stabilité protéique dans les vins blancs et rosés et mise au point d'un nouveau test: l'ImmunoTest®. *Revue des Œnologues* **135**: 23-27.
- 4 - Manteau, S., Sauvage, F.-X., Poinsaut, P., Scotti, B., Sieczkowski, N., Moutounet, M. (2006): Haze in white wine: Involvement of proteins other than Pathogenesis-Related proteins in spontaneous haze. In *Macrowine: Macromolecules and Secondary Metabolites of Grape and Wine*. Eds. Jeandet, P., Clement, C., Conreux, A., Intercept Publishers - Lavoisier, Reims, pp. 165-168.
- 5 - Pocock, K.F., Waters, E.J. (2006) Protein haze in bottled white wines: How well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport? *Australian Journal of Grape and Wine Research* **12**: 212-220.
- 6 - Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E. (1961): Précipitation des protéines. In *Traité d'oenologie. Tome II - Composition, transformations et traitements des vins*, Librairie Polytechnique Ch. Béranger, pp. 346-356.

- 7 - Médaille d'argent, Trophées Vinitech (octobre 2008)
Immuno Test[®] : test immunologique utilisant des anticorps spécifiques contre les protéines instables des vins blancs et rosés.
- 8 - Prix à l'innovation catégorie internationale, Viteff 2009 (octobre 2009)
L'Immuno Test[®] : un test immunologique utilisant des anticorps spécifiques contre les protéines instables des vins blancs et rosés.
- 9 - Prix spécial à l'Innovation à Intervitis (mars 2010).
Immuno Test[®]: un nouveau test pour la détermination de la stabilité protéique des vins blancs et rosés.

Annexe 1

4 mL sample volume	
Concentrations being tested (g/hL)	Volume of 15 g/L reconstituted bentonite solution (in μL) to add to sample
0	0
5	13
10	27
15	40
20	53,3
30	80
40	107
50	133
60	160
80	213
100	267
125	333
150	400
175	467
200	533
300	800

2 mL sample volume	
Concentrations being tested (g/hL)	Volume of 15 g/L reconstituted bentonite solution (in μL) to add to sample
0	0
5	7
10	13
15	20
20	27
30	40
40	53
50	67
60	80
80	107
100	133
125	167
150	200
175	233
200	267
300	400

Note: Follow the supplier's recommendations if using ready-to-use liquid bentonite.



Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré • F-92430 Marnes-la-Coquette
Tel.: +33 (0)1 47 95 60 00 • Fax: +33 (0)1 47 41 91 33

Rev. D - 02/2013
Code : 517228