

VINEO™ Extract DNA Kit

Ref.: 354-8100

Instructions

**Kit for extraction of DNA from microorganisms
present in wine**

BIO-RAD

TABLE OF CONTENTS

- 1 - INTRODUCTION
- 2 - KIT COMPOSITION
- 3 - VALIDITY AND PRESERVATION
- 4 - REQUIRED EQUIPMENT (NOT PROVIDED IN THE KIT)
- 5 - PRECAUTIONS
- 6 - SAMPLING AND TRANSPORT OF SAMPLES
- 7 - DNA EXTRACTION PROTOCOL
- 9 - CALCULATION OF THE ANALYSED SAMPLING FRACTION

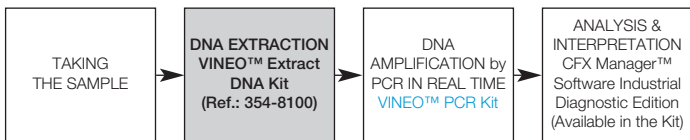
1 - INTRODUCTION

Many microorganisms are found in wine. They are major factors in well-known phenomena such as alcoholic and malo-lactic fermentation. Unfortunately, they are also responsible for many changes. A microbiological control is therefore important in order precisely to understand and find out changes in this microbial flora during wine production, and in this way guarantee and control its quality. Wine-making process, maturing, bottling and ageing in bottles must be supervised.

Current microbiological control techniques are based on classic approaches to culture. These conventional microbiological detection methods have low sensitivity and specificity and long incubation periods. These parameters do not meet the winemaker's needs or those of oenology because they do not guarantee an adequate reaction when there is an imbalance in microbial flora.

Only a molecular biology approach allows genuine reactivity. The real-time Polymerase Chain Reaction or RT - PCR is used to obtain results in less than 24 hours. It is often used today to look for micro-organisms in various environments, in particular, in the food industry to look for pathogenic flora. This method is used to amplify and detect specific DNA sequences of the kind and microbial type of interest. In this way, it brings speed, sensitivity and specificity to micro-biological analyses.

The VINEO™ Extract DNA Kit product is used for an optimal extraction of DNA from microorganisms present in the grape must in fermentation and in all types of wine sample, whatever the production stage, to detect the microorganism of interest using real-time PCR. The detailed protocol shown below is made up of 3 stages: 1) concentration and washing of micro-organisms from wine, 2) cell lysis, and 3) purification of the extracted DNA.



2 - KIT COMPOSITION

The VINEO™ Extract DNA Kit product is used to carry out 96 extractions of DNA from samples of wine.

Designation	Kit components	Preservation	Quantity per kit
R1	Lysis solution - contains a magnetic bar	+2/+8°C	2 x 100 mL
R2	Elution buffer	+2/+8°C	1 x 25 mL
W1	Wash solution 100X	+2/+8°C	1 x 10 mL
W2	Wash solution - contains 12% acetic acid (Xi)	+2/+8°C	1 x 10 mL
	Purification columns	+18/+30°C	1 x 96 units
	Collector vials	+18/+30°C	1 x 192 units

Note: W1 and W2 washing buffers are 2 different buffers with different compositions. Under no circumstances can the W1 buffers diluted to 1X be assimilated to the W2 buffer.

3 - VALIDITY AND PRESERVATION

On reception, the kit must be stored at temperatures between +2°C and +8°C. Each reagent stored between +2°C and +8°C can be used until the expiry date indicated. The reagents must not be frozen.

Note: do not mix reagent batches.

4 - REQUIRED EQUIPMENT (NOT PROVIDED IN THE KIT)

1 - Equipment:

Micro-biological confinement/sterile area

- Microbiological security station (MSS)

DNA extraction

- Heating block with a capacity of 95°C ± 5°C for 2 mL tubes
- Vortex
- Refrigerated centrifuge with a rotation capacity of 12,000 x g (an unrefrigerated centrifuge may be used; in this case, the stages recommended at 4°C will be carried out at ambient temperature).
- Angular rotors for 50mL tubes and adaptors
- Angular rotors for 1.5 - 2 mL tubes
- Magnetic stirring apparatus

2 - Laboratory Equipment:

DNA extraction

- Tubes with sterile screws containing 50 mL (1 tube per 45 mL sample analysed)
- Tubes with sterile screws containing 2 mL (1 tube per sample whatever the analysed volume)
- 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L and 1000 μ L micro-pipettes
- Cones with sterile filters that are adaptable to 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L and 1000 μ L micro-pipettes

Other

- Non-powdered gloves
- Milli Q sterile water (for the 100X W1 dilution to the 1X dilution)
- Graduated test tube (for the 100X W1 dilution to the 1X dilution)
- 5% Chlorine Bleach
- 70° Alcohol

5 - PRECAUTIONS

Extraction is carried out by staff who have had adequate training. Microbiology and molecular biology require a high level of vigilance and discipline in accomplishing meticulous gestures.

- Handle and eliminate the analysed wines as material likely to contaminate the working environment.
- Comply scrupulously with the Laboratory Good Practices; the quality of the results depends on it.
- Do not send the equipment (pipettes, tubes, etc.) from one work station to another.
- Carry out at least one negative extraction control on each series of extractions, preferably at the end of the series.
- Do not use the reagents beyond their expiry date.
- Subject the reagents in the kit to a vortex movement using the apparatus provided for this purpose before using them to work with homogeneous solutions.
- Check the exactness and the precision of the pipettes as well as the proper functioning of the instruments.
- Change gloves regularly and do so as soon as you suspect any contamination.
- Clean work surfaces regularly with a 5% solution of chlorine bleach and rinse the surface with water and 70° alcohol.

Reagent W2 is classified as an irritant in the meaning of the European regulations.



Xi (irritant)
R36/38
S23-26-37-45-60
(12% acetic acid)

Risks: R36/38 - Irritant for eyes and skin

Precautions: S23-26-37-45-60

Do not inhale vapours/aerosols. In the event of eye contact, rinse immediately and abundantly with water and consult a specialist. Wear appropriate gloves. In the event of accident or discomfort, consult a doctor immediately (if possible, show him the label). Dispose of the product and its recipient as dangerous waste.

6 - SAMPLING AND TRANSPORT OF SAMPLES

For analysis of fermenting grape musts and wines that have not yet been bottled, the samples must be collected under aseptic conditions using pipettes or sampling cones. The sampling equipment must be cleaned carefully or replaced when taking several samples. Samples of at least 100 mL will be taken in sterile glass, polyethylene recipients or other vials. The samples must be submitted to the laboratory as quickly as possible, preferably within 24h and not exceeding 48h after taking the sample.

To analyse wine in bottles, analysis is carried out from the bottle.

If the samples are transported and analysed within 24h, transport and storage may be carried out at ambient temperature (+18°C/+30°C). If the samples are transported and analysed within 48H, transport and storage must be carried out at +2°C/+8°C.

7 - DNA EXTRACTION PROTOCOL

We strongly recommend that you read the complete protocol before beginning. Follow the suggested protocol scrupulously. The volume of the sample of wine varies according to the intention of the operator and the information expected.

- 1.8 mL for fermenting grape must, for heavy wine during the wine-making or maturing process.
- 45 mL for slightly heavy wine, close to bottling or already bottled, the analysis of which requires a high level of analytic sensitivity.

Preparing the trial

Preparing the equipment

- Switch on the heating block and set it to 95°C. Check that the temperature has stabilised before continuing with the DNA extraction.
- Prepare the number of purification columns necessary (= Number of samples to be analysed) by placing each column in a recuperation vial.

Preparing the reagents

- Dilute the W1 washing solution to 1/100 in a sufficient quantity for the samples to be analysed. See the Tables to prepare the required quantity of W1 washing solution at 1X dilution on the basis of the number of samples. (Appendix 1: 1.8 mL volume of analysed grape must/wine and Appendix 2: 45 mL volume of analysed wine).
- Homogenise buffer R1: put the vial on a magnetic stirring apparatus. During pipetting, make sure that R1 is continuously being magnetically stirred so that the lysis reagent is quite homogenous. Use a cone with a wide enough opening (i.e. a 200 µL to 1000 µL pipette with the corresponding cone).

1°) - Concentration and washing of micro-organism cells from wine

Protocol “1.8 mL for fermenting grape must or for heavy wine during the wine-making or maturing process”

1. Cell concentration

- Take a 1.8 mL sample of grape must/wine to be analysed and put it in a 2 mL tube with a sterile screw top
- Centrifuge: 5 minutes, at 6000 x g, at 4°C
- Dispose of the supernatant fluid

2. Washing residue

- Add 1.8 mL of diluted W1
- Subject it to a vortex movement using the apparatus provided for this purpose (dissolving residue)
- Centrifuge: 5 minutes, at 6000 x g, at 4°C
- Dispose of the supernatant fluid
- **Repeat this step twice**

At this stage, follow protocol “2°) - Cell lysis”

Protocol “45 mL for a slightly heavy wine - “Brett free” and/or “Zygo free” test at bottling time”

1. Cell concentration

- Take a 45 mL sample of wine to be analysed and put it in a 50 mL tube with a sterile screw top
- Centrifuge for 5 minutes, at 6000 x g, at 4°C
- Dispose of the supernatant fluid

2. Washing residue

- Add 45 mL of diluted W1
- Subject it to a vortex movement using the apparatus provided for this purpose
- Centrifuge for 5 minutes, at 6000 x g, at 4°C
- Dispose of the supernatant fluid
- **Repeat this step once**
- Add 1 mL of diluted W1
- Subject it to a vortex movement for 20 seconds using the apparatus provided for this purpose (dissolving residue)
- Transfer it to a 2 mL tub with a sterile screw top
- Centrifuge for 5 minutes, at 6000 x g, at 4°C
- Dispose of the supernatant fluid

At this stage, follow protocol “2°) - Cell lysis”

2°) - Cell lysis

From this stage on, work with non-powdered gloves on.

- Add 800 µL of R1 buffer
- Subject it to a vortex movement using the apparatus provided for this purpose
- Incubate the tubes for 15 min. in a heating block heated to 95°C

- Take it out and let it cool for 5 min. at ambient temperature
- Add 100 μL of cool W2 buffer (4°C)
- Subject it to a vortex movement for 5 seconds using the apparatus provided for this purpose
- Leave the supernatant fluid for 15 min. at $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (in a refrigerator)
- Centrifuge: 15 minutes, at 12 000 x g, at 4°C

3°) - Purifying the DNA

1. Put **500 μL** of supernatant fluid from the lysis reaction on a purification column. Warning: do not include resin at the bottom of the tube in the sample. Seal each purification column with recuperation tube stopper.
Note: *When pipetting the supernatant fluid, if resin is taken, let the 500 μL out into the tube and centrifuge it at 900 x g for 3 min.*
2. Centrifuge: 10 minutes, at 6,000 x g, at 20°C
Notes: • *If clogging occurs in the purification column, increase the centrifuging time without increasing speed.* • *A slight mist may form on the surface of the columns during extraction of DNA from fermenting grape must; continue manipulations as indicated in the protocol.*
3. Empty the recovery tube of its contents.
4. Add **250 μL** of supernatant fluid from the lysis reaction on the same purification column.
5. Centrifuge: 10 minutes, at 6,000 x g, at 20°C.
Notes: • *If clogging occurs in the purification column, increase the centrifuging time **without increasing speed**. Check that all of the supernatant fluid has gone through the column. If this is not the case, centrifuge again,* • *A slight mist may form on the surface of the columns during DNA extraction from fermenting grape must; continue the procedure as indicated in the protocol.*
6. Place 100 μL of R2 reagent in the purification column.
7. Throw away the recuperation tube.
8. Cover the purification column with a new clean recuperation tube and turn the whole upside down.

9. Centrifuge for 3 min., at 1000 x g, at 20°C. Throw away the purification column.

Note: *In this step, the cap can not be closed.*

10. Store the recovery tube containing the 100 µL of purified DNA solution. The DNA solution can be stored for 24 hours at 4°C and several months at -20°C. After storing, centrifuge for 3 min., at 1000 x g, at 20°C.

The DNA of the micro-organisms initially present in the sample of wine that are processed in this way may be analysed using a real-time PCR reaction.

8 - CALCULATION OF THE ANALYSED SAMPLING FRACTION AND THE Z FACTOR

Any analysis method that included an extraction stage followed by a detection stage must be accompanied by calculation of the fraction of the processed sample that is actually analysed during the final detection.

This value is taken into account in the calculation of the detection limit and the quantification limit of the overall method, and is used to give a final result in a quantitative test. To do this, you should calculate the remaining fraction with respect to the initial sample at each stage in the protocol (concentration, elimination, etc.).

The Z value is specific to each extraction protocol. Here the fraction of the sample analysed using PCR corresponds to 1/24th of the total volume of the wine processed (1.8 or 45 mL) in the event that 5 µL of pure DNA extract are analysed using PCR.

The Z factor corresponds to the denominator of the fraction analysed.

The Z factor value for this protocol is Z = 24.

It is calculated as follows:

- Fraction of the initial sample in the 100 µL of DNA extracted at the end of the extraction protocol:

All micro-organisms present in the initial volume of wine sample (1.8 mL or 45 mL) is found in the 900 µL of the cell lysis fraction at the end of stage 2. The fraction of cells that was initially presented remains unchanged. Up to this stage $Z_0=1$.

Only a 750 μL of the 900 μL of this supernatant fluid from the lysis is purified on the column and is found in concentrate in the 100 μL at the end of stage 3. The fraction preserved during this protocol is therefore 900/750, i.e. 1.2.
 $Z_1 = 1.2$.

- Fraction of the initial sample analysed using PCR:

Only 5 μL of the 100 μL of eluted DNA are subjected to the PCR. The analysed fraction is therefore 1/20.
 $Z_2 = 20$

- Determination of overall Z factor from the method:

$$Z = Z_0 \times Z_1 \times Z_2 = 1 \times 1,2 \times 20 = 24$$

APPENDIX 1

Preparation of the quantity required for the W1 washing solution in the 1X dilution to process the samples of grape must/wine with a volume of **1.8 mL**.

Number of samples	Volume of W1 100X (mL)	Volume of sterile Milli Q water (mL)	Number of samples	Volume of W1 100X (mL)	Volume of sterile Milli Q water (mL)
1	NA	NA	51	3.83	378.68
2	NA	NA	52	3.90	386.10
3	NA	NA	53	3.98	393.53
4	NA	NA	54	4.05	400.95
5	NA	NA	55	4.13	408.38
6	NA	NA	56	4.20	415.80
7	NA	NA	57	4.28	423.23
8	NA	NA	58	4.35	430.65
9	NA	NA	59	4.43	438.08
10	0.75	74.25	60	4.50	445.50
11	0.83	81.68	61	4.58	452.93
12	0.90	89.10	62	4.65	460.35
13	0.98	96.53	63	4.73	467.78
14	1.05	103.95	64	4.80	475.20
15	1.13	111.38	65	4.88	482.63
16	1.20	118.80	66	4.95	490.05
17	1.28	126.23	67	5.03	497.48
18	1.35	133.65	68	5.10	504.90
19	1.43	141.08	69	5.18	512.33
20	1.50	148.50	70	5.25	519.75
21	1.58	155.93	71	5.33	527.18
22	1.65	163.35	72	5.40	534.60
23	1.73	170.78	73	5.48	542.03
24	1.80	178.20	74	5.55	549.45
25	1.88	185.63	75	5.63	556.88
26	1.95	193.05	76	5.70	564.30
27	2.03	200.48	77	5.78	571.73
28	2.10	207.90	78	5.85	579.15
29	2.18	215.33	79	5.93	586.58
30	2.25	222.75	80	6.00	594.00
31	2.33	230.18	81	6.08	601.43
32	2.40	237.60	82	6.15	608.85
33	2.48	245.03	83	6.23	616.28
34	2.55	252.45	84	6.30	623.70
35	2.63	259.88	85	6.38	631.13
36	2.70	267.30	86	6.45	638.55
37	2.78	274.73	87	6.53	645.98
38	2.85	282.15	88	6.60	653.40
39	2.93	289.58	89	6.68	660.83
40	3.00	297.00	90	6.75	668.25
41	3.08	304.43	91	6.83	675.68
42	3.15	311.85	92	6.90	683.10
43	3.23	319.28	93	6.98	690.53
44	3.30	326.70	94	7.05	697.95
45	3.38	334.13	95	7.13	705.38
46	3.45	341.55	96	7.20	712.80
47	3.53	348.98	97	7.28	720.23
48	3.60	356.40	98	7.35	727.65
49	3.68	363.83	99	7.43	735.08
50	3.75	371.25	100	7.50	742.50

NA: The solution must be prepared for at least 10 samples.

When the W1 washing solution is reconstituted at 1X, it can be stored for 7 days at $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

APPENDIX 2

Preparation of the quantity required for the W1 washing solution in the 1X dilution to process the samples of wine with a volume of **45 mL**.

Number of samples	Volume of W1 100X (mL)	Volume of sterile Milli Q water (mL)	Number of samples	Volume of W1 100X (mL)	Volume of sterile Milli Q water (mL)
1	1	99	51	51	5049
2	2	198	52	52	5148
3	3	297	53	53	5247
4	4	396	54	54	5346
5	5	495	55	55	5445
6	6	594	56	56	5544
7	7	693	57	57	5643
8	8	792	58	58	5742
9	9	891	59	59	5841
10	10	990	60	60	5940
11	11	1089	61	61	6039
12	12	1188	62	62	6138
13	13	1287	63	63	6237
14	14	1386	64	64	6336
15	15	1485	65	65	6435
16	16	1584	66	66	6534
17	17	1683	67	67	6633
18	18	1782	68	68	6732
19	19	1881	69	69	6831
20	20	1980	70	70	6930
21	21	2079	71	71	7029
22	22	2178	72	72	7128
23	23	2277	73	73	7227
24	24	2376	74	74	7326
25	25	2475	75	75	7425
26	26	2574	76	76	7524
27	27	2673	77	77	7623
28	28	2772	78	78	7722
29	29	2871	79	79	7821
30	30	2970	80	80	7920
31	31	3069	81	81	8019
32	32	3168	82	82	8118
33	33	3267	83	83	8217
34	34	3366	84	84	8316
35	35	3465	85	85	8415
36	36	3564	86	86	8514
37	37	3663	87	87	8613
38	38	3762	88	88	8712
39	39	3861	89	89	8811
40	40	3960	90	90	8910
41	41	4059	91	91	9009
42	42	4158	92	92	9108
43	43	4257	93	93	9207
44	44	4356	94	94	9306
45	45	4455	95	95	9405
46	46	4554	96	96	9504
47	47	4653	97	97	9603
48	48	4752	98	98	9702
49	49	4851	99	99	9801
50	50	4950	100	100	9900

Once the W1 washing solution is reconstituted at 1X, it can be stored for 7 days at 4 ± 2°C.

VINEO™ Extract DNA Kit

Réf. : 354-8100

Notice d'utilisation

**Trousse pour l'extraction de l'ADN des microorganismes
présents dans le vin**

SOMMAIRE

- 1 - INTRODUCTION
- 2 - COMPOSITION DU KIT
- 3 - VALIDITÉ ET CONSERVATION
- 4 - ÉQUIPEMENT ET MATÉRIEL NÉCESSAIRE (NON FOURNI DANS LE KIT)
- 5 - PRÉCAUTIONS
- 6 - ÉCHANTILLONAGE ET TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS
- 7 - PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN
- 8 - CALCUL DE LA FRACTION D'ÉCHANTILLON ANALYSÉE

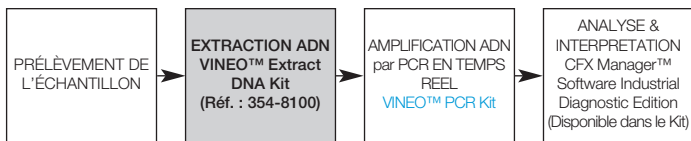
1 - INTRODUCTION

De nombreux microorganismes sont présents dans les vins. Ils sont les acteurs majeurs des phénomènes bien connus : les fermentations alcoolique et malolactique. Ils sont malheureusement aussi responsables de nombreuses altérations. Un contrôle microbiologique est donc important pour comprendre et connaître précisément l'évolution de ces flores microbiennes au cours de l'élaboration du vin, et ainsi garantir et maîtriser sa qualité. Les étapes de vinification, d'élevage, de mise en bouteille et de vieillissement en bouteilles doivent être surveillées.

Les techniques actuelles de contrôles microbiologiques sont basées sur des approches de culture classique. Ces méthodes de détection microbiologiques conventionnelles présentent de faibles sensibilité et spécificité, et de longues périodes d'incubation. Ces paramètres ne sont pas en adéquation avec les besoins du vinificateur ou de l'œnologue pour réagir lors d'un déséquilibre des flores microbiennes.

Seule une approche de biologie moléculaire permet une vraie réactivité. La Réaction de Polymérisation en Chaîne en temps réel ou RT – PCR (real-time Polymerase Chain Reaction) permet l'obtention de résultats en moins de 24h. Elle est aujourd'hui fréquemment utilisée pour la recherche de microorganismes dans divers environnements, notamment en agroalimentaire pour la recherche de flores pathogènes. Cette méthode permet d'amplifier et de détecter des séquences d'ADN spécifiques du genre ou de l'espèce microbienne d'intérêt. Elle apporte ainsi rapidité, sensibilité et spécificité aux analyses microbiologiques.

Le produit VINEO™ Extract DNA Kit permet une extraction optimale de l'ADN des microorganismes présents dans les moûts en fermentation et dans tous types d'échantillons de vin, quelle que soit l'étape d'élaboration, pour une détection du microorganisme d'intérêt par PCR en temps réel. Le protocole détaillé ci-dessous est composé de 3 étapes : 1°) concentration et lavage des microorganismes du vin, 2°) lyse des cellules, et 3°) purification de l'ADN extrait.



2 - COMPOSITION DU KIT

Le produit VINEO™ Extract DNA Kit permet de réaliser 96 extractions d'ADN à partir d'échantillons de vin.

Désignation	Composants du kit	Conservation	Quantité par kit
R1	Solution de Lyse – contient un barreau aimanté	+2/+8°C	1 x 100 mL
R2	Tampon d'élu­tion	+2/+8°C	1 x 25 mL
W1	Solution de lavage 100X	+2/+8°C	1 x 100 mL
W2	Solution de lavage – contient 12% d'acide acétique (X1)	+2/+8°C	1 x 10 mL
	Colonnes de purification	+2/+8°C	1 x 96 unités
	Flacons de récupération	+2/+8°C	1 x 192 unités

NB : Les tampons de lavage W1 et W2 sont 2 tampons de compositions différentes. En aucun cas le tampon W1 dilué à 1X ne peut être assimilé au tampon W2.

3 - VALIDITÉ ET CONSERVATION

Dès réception, le kit doit être conservé entre +2°C et +8°C. Chaque réactif conservé entre +2°C et +8°C peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée. Les réactifs ne doivent pas être congelés.

Note : ne pas mélanger les lots de réactifs.

4 - ÉQUIPEMENT ET MATÉRIEL NÉCESSAIRE (NON FOURNI DANS LE KIT)

1 - Équipement :

Confinement microbiologique/zone stérile

- Poste de sécurité microbiologique (PSM)

Extraction de l'ADN

- Bloc chauffant de capacité 95°C ± 5°C pour tubes de 2 mL
- Vortex
- Centrifugeuse réfrigérée avec une capacité de rotation de 12 000 x g (une centrifugeuse non réfrigérée pourra être utilisée, dans ce cas, les étapes préconisées à 4°C seront réalisées à température ambiante)
- Rotors angulaires pour tubes de 50mL et adaptateurs
- Rotors angulaires pour tubes 1,5 – 2 mL
- Agitateur magnétique

2 - Matériel de laboratoire

Extraction de l'ADN

- Tubes à vis stériles de contenance de 50 mL (1 tube pour échantillon de 45 mL analysé)
- Tubes à vis stériles de contenance de 2 mL (1 tube par échantillon quelque soit le volume analysé)
- Micropipettes de 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL et 1000 µL
- Cônes à filtre stériles, adaptables sur les micropipettes de 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL et 1000 µL

Autres

- Gants non poudrés
- Eau Milli Q stérile (pour la dilution du W1 100X à la dilution 1X)
- Eprouvette graduée (pour la dilution du W1 100X à la dilution 1X)
- Eau de Javel 5%
- Alcool 70°

5 - PRÉCAUTIONS

L'extraction doit être réalisée par des personnes ayant reçu une formation adéquate. La microbiologie et la biologie moléculaire nécessitent une grande vigilance et une grande discipline dans l'accomplissement de gestes méticuleux.

- Manipuler et éliminer les vins analysés comme des matières susceptibles de contaminer l'environnement de travail.
- Respecter scrupuleusement les Bonnes Pratiques de Laboratoire, la qualité des résultats en dépend.
- Ne pas faire circuler le matériel (pipettes, tubes etc...) d'un poste de travail à l'autre.
- Réaliser au moins un contrôle négatif d'extraction à chaque série d'extractions, de préférence en fin de série.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.
- Vortexer les réactifs du kit avant leur utilisation pour travailler avec des solutions homogènes.
- Vérifier l'exactitude et la précision des pipettes ainsi que le bon fonctionnement des instruments.
- Changer de gants régulièrement et ceci dès suspicion d'une contamination.
- Nettoyer les surfaces de travail régulièrement avec de l'eau de Javel 5% et rincer la surface avec de l'eau et de l'alcool 70°.

Le réactif W2 est classé comme substance irritante au sens de la réglementation européenne.



Xi (irritant)
R36/38
S23-26-37-45-60
(12% acide acétique)

Risques : R36/38 - Irritant pour les yeux et la peau

Conseils de prudence : S23-26-37-45-60

Ne pas respirer les vapeurs / aérosols. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Porter des gants appropriés. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette). Eliminer le produit et son récipient comme un déchet dangereux.

6 - ÉCHANTILLONNAGE ET TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

Pour l'analyse des moûts en fermentation et des vins encore non embouteillés, les échantillons devront être collectés dans des conditions aseptiques à l'aide de pipettes ou de canes de prélèvement. Le matériel de prélèvement devra être soigneusement nettoyé ou bien remplacé lors du prélèvement de plusieurs échantillons. Les échantillons d'au minimum 100 mL seront prélevés dans des récipients stériles en verre, polyéthylène ou autres flacons. Les échantillons doivent être remis au laboratoire le plus rapidement possible, de préférence dans les 24H, sans dépasser 48H après le prélèvement de l'échantillon.

Pour l'analyse des vins en bouteilles, l'analyse est réalisée à partir de la bouteille.

Si les échantillons sont transportés et analysés dans les 24H, alors le transport et le stockage peuvent être effectués à température ambiante (+18°C/+30°C). Si les échantillons sont transportés et analysés dans les 48H, alors le transport et le stockage doivent s'effectuer à +2°C/+8°C.

7 - PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN

Nous vous recommandons vivement de lire l'ensemble du protocole avant de commencer. Respecter scrupuleusement le protocole proposé. Le volume de l'échantillon de vin est variable selon l'intention du manipulateur et l'information attendue.

- 1,8 mL pour un moût en fermentation, un vin chargé en cours de vinification ou d'élevage.
- 45 mL pour un vin peu chargé, proche de l'embouteillage ou déjà mis en bouteille dont l'analyse nécessite un niveau de sensibilité analytique élevé.

Préparation de l'essai

Préparation du matériel

- Allumer le bloc-chauffant et le régler à 95°C. Vérifier que la température soit bien stabilisée avant de procéder à l'extraction d'ADN
- Préparer le nombre de colonnes de purification nécessaires (= Nombre d'échantillons à analyser) en plaçant chaque colonne dans un flacon de récupération

Préparation des réactifs

- Diluer la solution de lavage W1 au 1/100 en quantité suffisante pour les échantillons à analyser
Voir les Tableaux de préparation de la quantité nécessaire de la solution de lavage W1 à la dilution 1X en fonction du nombre d'échantillons. (Annexe 1 : volume de moût/vin analysé de 1,8 mL et Annexe 2 : volume de vin analysé de 45 mL)
- Homogénéiser le tampon R1 : placer le flacon sur un agitateur magnétique. Lors du pipetage, veiller à ce que R1 soit constamment sous agitation magnétique de façon à ce que le réactif de lyse soit bien homogène. Utiliser un cône avec une ouverture suffisamment large (soit une pipette de 200 µL à 1000 µL avec le cône correspondant)

1°) - Concentration et lavage des cellules des microorganismes du vin

Protocole « 1,8 mL pour un moût en fermentation ou un vin chargé en cours de vinification ou d'élevage »

1. Concentration des cellules

- Prélever 1,8 mL du moût/vin à analyser et les placer dans un tube de 2 mL à vis stérile

- Centrifuger : 5 minutes, à 6000 x g, à 4°C
- Eliminer le surnageant

2. Lavage du culot

- Ajouter 1,8 mL de W1 dilué
- Vortexer 20 secondes et agiter par retournement du tube (dissolution du culot)
- Centrifuger : 5 minutes, à 6000 x g, à 4°C
- Eliminer le surnageant
- **Répéter cette étape 2 fois**

A cette étape suivre le protocole « 2°) - Lyse des cellules »

Protocole « 45 mL pour un vin peu chargé - test « Brett free » et/ou « Zygo free » à l'embouteillage»

1. Concentration des cellules

- Prélever 45 mL du vin à analyser et les placer dans un tube de 50 mL à vis stérile
- Centrifuger 5 minutes, à 6000 x g, à 4°C
- Eliminer le surnageant

2. Lavage du culot

- Ajouter 45 mL de W1 dilué
- Vortexer 20 secondes et agiter par retournement du tube
- Centrifuger 5 minutes, à 6000 x g, à 4°C
- Eliminer le surnageant
- **Répéter cette étape 1 fois**
- Ajouter 1 mL de W1 dilué
- Vortexer 20 secondes (dissolution du culot)
- Transférer dans un tube de 2 mL à vis stérile
- Centrifuger 5 minutes, à 6000 x g, à 4°C
- Eliminer le surnageant

A cette étape suivre le protocole « 2°) - Lyse des cellules »

2°) - Lyse des cellules

A partir de cette étape, travailler avec des gants non poudrés.

- Ajouter 800 µL de tampon R1
- Vortexer 20 secondes et agiter par retournement du tube

- Incuber les tubes 15 min dans un bloc chauffant à 95°C
- Sortir et laisser refroidir 5 min à température ambiante
- Ajouter 100 µL de tampon W2 froid (4°C)
- Vortexer 5 secondes
- Laisser reposer le surnageant pendant 15 min à 4±2°C (réfrigérateur)
- Centrifuger : 15 minutes, à 12 000 x g, à 4°C

3°) - Purification de l'ADN

1. Déposer **500 µL** de surnageant de la réaction de lyse sur une colonne de purification . Attention, ne pas prélever la résine au fond du tube. Fermer chaque colonne de purification avec le bouchon du tube de récupération.

Remarque : *Lors du pipetage du surnageant, si de la résine est prélevée, relâcher les 500 µL dans le tube et centrifuger à 900 x g pendant 3 min.*

2. Centrifuger : 10 minutes, à 6000 x g, à 20°C

Remarque : • *En cas de colmatage de la colonne de purification, augmenter le temps de centrifugation sans en augmenter la vitesse.*

• *Il est possible qu'un léger voile se forme à la surface des colonnes lors de l'extraction d'ADN à partir de moûts en fermentation, poursuivre les manipulations comme indiqué dans le protocole.*

3. Vider le tube de récupération de son contenu.

4. Ajouter de nouveau **250 µL** de surnageant de la réaction de lyse sur la même colonne de purification.

5. Centrifuger : 10 minutes, à 6000 x g, à 20°C.

Remarque : • *En cas de colmatage de la colonne de purification, augmenter le temps de centrifugation **sans en augmenter la vitesse.***

• *Vérifier que tout le surnageant est bien passé au travers la colonne. Si ce n'est pas le cas, centrifuger de nouveau.* • *Il est possible qu'un léger voile se forme à la surface des colonnes lors de l'extraction d'ADN à partir de moûts en fermentation, poursuivre les manipulations comme indiqué dans le protocole.*

6. Déposer 100 μL de réactif R2 dans la colonne de purification.
7. Jeter le tube de récupération.
8. Couvrir la colonne de purification avec un nouveau tube de récupération propre, retourner l'ensemble.
9. Centrifuger 3 min, à 1000 x g, à 20°C. Jeter la colonne de purification.
Remarque : A cette étape, le bouchon ne peut être fermé.
10. Conserver le tube de récupération contenant les 100 μL de solution d'ADN purifié. La solution d'ADN peut être conservée 24 h à 4°C et plusieurs mois à -20°C. Après conservation, centrifuger 3 min, à 1000 x g, à 20°C.

L'ADN des microorganismes initialement présents dans l'échantillon de vin ainsi traité pourra être analysé par une réaction de PCR en temps réel.

8 - CALCUL DE LA FRACTION D'ÉCHANTILLON ANALYSÉE ET DU FACTEUR Z

Toute méthode d'analyse comprenant une étape d'extraction suivie d'une étape de détection doit être accompagnée du calcul de la fraction de l'échantillon traité réellement analysée au cours de la détection finale.

Cette valeur est prise en compte dans le calcul de la limite de détection et de quantification de la méthode globale, et permet de donner un résultat final en cas de test quantitatif. Il convient pour cela de calculer à chaque étape du protocole (concentration, élimination...) la fraction restante par rapport à l'échantillon de départ.

La valeur de Z est spécifique de chaque protocole d'extraction. Ici la fraction de l'échantillon analysée en PCR correspond à $1/24^{\circ}$ du volume total de vin traité (1,8 ou 45 mL) dans le cas où 5 μL d'ADN extrait pur sont analysés en PCR.

Le facteur Z correspond au dénominateur de la fraction analysée.

La valeur du facteur Z pour le présent protocole est $Z = 24$.

Elle est calculée de la manière suivante :

- Fraction de l'échantillon initial présente dans les 100 μL d'ADN extrait à la fin du protocole d'extraction :

La totalité des microorganismes présents dans le volume initial d'échantillon de vin (1,8 mL ou 45 mL) se retrouve dans les 900 μL de la fraction « lyse des cellules » à la fin de l'étape 2°. La fraction de cellules initialement présente est inchangée. Jusqu'à cette étape $Z_0=1$.

Seule une fraction de 750 μL sur les 900 μL de ce surnageant de lyse est purifiée sur colonne et se retrouve concentrée dans les 100 μL , à la fin de l'étape 3.

La fraction conservée au cours de ce protocole est donc de 900/750, soit 1,2.
 $Z_1= 1,2$.

- Fraction de l'échantillon initial analysée en PCR :

Seuls 5 μL sur les 100 μL d'ADN élués sont soumis à la PCR. La fraction analysée est donc de 1/20.

$Z_2= 20$

- Détermination du Facteur Z global de la méthode :

$$Z= Z_0 \times Z_1 \times Z_2 = 1 \times 1,2 \times 20 = 24$$

ANNEXE 1

Préparation de la quantité nécessaire de la solution de lavage W1 à la dilution 1X pour le traitement d'échantillons de moût/vin d'un volume de **1,8 mL**.

Nombre d'échantillons	Volume de W1 100X (mL)	Volume d'Eau Mili Q stérile (mL)	Nombre d'échantillons	Volume de W1 100X (mL)	Volume d'Eau Mili Q stérile (mL)
1	NA	NA	51	3.83	378.68
2	NA	NA	52	3.90	386.10
3	NA	NA	53	3.98	393.53
4	NA	NA	54	4.05	400.95
5	NA	NA	55	4.13	408.38
6	NA	NA	56	4.20	415.80
7	NA	NA	57	4.28	423.23
8	NA	NA	58	4.35	430.65
9	NA	NA	59	4.43	438.08
10	0.75	74.25	60	4.50	445.50
11	0.83	81.68	61	4.58	452.93
12	0.90	89.10	62	4.65	460.35
13	0.98	96.53	63	4.73	467.78
14	1.05	103.95	64	4.80	475.20
15	1.13	111.38	65	4.88	482.63
16	1.20	118.80	66	4.95	490.05
17	1.28	126.23	67	5.03	497.48
18	1.35	133.65	68	5.10	504.90
19	1.43	141.08	69	5.18	512.33
20	1.50	148.50	70	5.25	519.75
21	1.58	155.93	71	5.33	527.18
22	1.65	163.35	72	5.40	534.60
23	1.73	170.78	73	5.48	542.03
24	1.80	178.20	74	5.55	549.45
25	1.88	185.63	75	5.63	556.88
26	1.95	193.05	76	5.70	564.30
27	2.03	200.48	77	5.78	571.73
28	2.10	207.90	78	5.85	579.15
29	2.18	215.33	79	5.93	586.58
30	2.25	222.75	80	6.00	594.00
31	2.33	230.18	81	6.08	601.43
32	2.40	237.60	82	6.15	608.85
33	2.48	245.03	83	6.23	616.28
34	2.55	252.45	84	6.30	623.70
35	2.63	259.88	85	6.38	631.13
36	2.70	267.30	86	6.45	638.55
37	2.78	274.73	87	6.53	645.98
38	2.85	282.15	88	6.60	653.40
39	2.93	289.58	89	6.68	660.83
40	3.00	297.00	90	6.75	668.25
41	3.08	304.43	91	6.83	675.68
42	3.15	311.85	92	6.90	683.10
43	3.23	319.28	93	6.98	690.53
44	3.30	326.70	94	7.05	697.95
45	3.38	334.13	95	7.13	705.38
46	3.45	341.55	96	7.20	712.80
47	3.53	348.98	97	7.28	720.23
48	3.60	356.40	98	7.35	727.65
49	3.68	363.83	99	7.43	735.08
50	3.75	371.25	100	7.50	742.50

NA : La solution doit être préparée pour un minimum de 10 échantillons.

Une fois reconstituée la solution de lavage W1 à 1X et peut être conservée 7 jours à $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

ANNEXE 2

Préparation de la quantité nécessaire de la solution de lavage W1 à la dilution 1X pour le traitement d'échantillons de vin d'un volume de **45 mL**.

Nombre d'échantillons	Volume de W1 100X (mL)	Volume d'Eau Mili Q stérile (mL)	Nombre d'échantillons	Volume de W1 100X (mL)	Volume d'Eau Mili Q stérile (mL)
1	1	99	51	51	5049
2	2	198	52	52	5148
3	3	297	53	53	5247
4	4	396	54	54	5346
5	5	495	55	55	5445
6	6	594	56	56	5544
7	7	693	57	57	5643
8	8	792	58	58	5742
9	9	891	59	59	5841
10	10	990	60	60	5940
11	11	1089	61	61	6039
12	12	1188	62	62	6138
13	13	1287	63	63	6237
14	14	1386	64	64	6336
15	15	1485	65	65	6435
16	16	1584	66	66	6534
17	17	1683	67	67	6633
18	18	1782	68	68	6732
19	19	1881	69	69	6831
20	20	1980	70	70	6930
21	21	2079	71	71	7029
22	22	2178	72	72	7128
23	23	2277	73	73	7227
24	24	2376	74	74	7326
25	25	2475	75	75	7425
26	26	2574	76	76	7524
27	27	2673	77	77	7623
28	28	2772	78	78	7722
29	29	2871	79	79	7821
30	30	2970	80	80	7920
31	31	3069	81	81	8019
32	32	3168	82	82	8118
33	33	3267	83	83	8217
34	34	3366	84	84	8316
35	35	3465	85	85	8415
36	36	3564	86	86	8514
37	37	3663	87	87	8613
38	38	3762	88	88	8712
39	39	3861	89	89	8811
40	40	3960	90	90	8910
41	41	4059	91	91	9009
42	42	4158	92	92	9108
43	43	4257	93	93	9207
44	44	4356	94	94	9306
45	45	4455	95	95	9405
46	46	4554	96	96	9504
47	47	4653	97	97	9603
48	48	4752	98	98	9702
49	49	4851	99	99	9801
50	50	4950	100	100	9900

Une fois reconstituée la solution de lavage W1 à 1X et peut être conservée 7 jours à $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

VINEO™ Extract DNA Kit

Ref.: 354-8100

Instrucciones de uso

Kit para la extracción del ADN de los microorganismos presentes en el vino

ÍNDICE

- 1 - INTRODUCCIÓN
- 2 - COMPOSICIÓN DEL KIT
- 3 - CADUCIDAD Y CONSERVACIÓN
- 4 - EQUIPO Y MATERIAL NECESARIOS NO SUMINISTRADOS CON EL KIT
- 5 - PRECAUCIONES
- 6 - MUESTREO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS
- 7 - PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL ADN
- 8 - CÁLCULO DE LA FRACCIÓN DE MUESTRA ANALIZADA Y DEL FACTOR Z

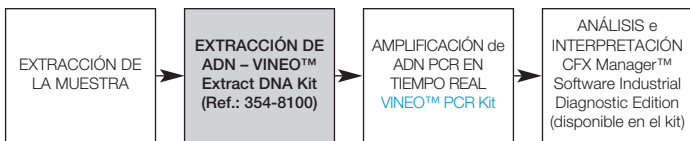
1 - INTRODUCCIÓN

En los vinos hay presentes numerosos microorganismos, que son los principales causantes de fenómenos bien conocidos como las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Desafortunadamente, también son los causantes de numerosas alteraciones. Por tanto, es importante el control microbiológico para comprender y conocer de forma precisa la evolución de estas floras microbianas a lo largo de la elaboración del vino, para así garantizar y controlar su calidad. Deben supervisarse las etapas de vinificación, crianza, embotellado y envejecimiento en botella.

Las técnicas actuales de control microbiológico se basan en métodos de cultivo clásico. Estos métodos de detección microbiológica convencionales tienen una sensibilidad y una especificidad bajas y precisan de periodos de incubación largos. Estos parámetros no son adecuados a las necesidades del vinicultor o del enólogo para reaccionar cuando se produce un desequilibrio de las floras microbianas.

Sólo en método de biología molecular permite una auténtica reactividad. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o RT-PCR (del inglés «Real-time Polymerase Chain Reaction») permite obtener resultados en menos de 24 horas. Actualmente suele utilizarse para la búsqueda de microorganismos en distintos entornos, especialmente en el sector agroalimentario para buscar floras patógenas. Este método permite amplificar y detectar secuencias de ADN específicas del género o especie microbiana de interés. Aporta por tanto rapidez, sensibilidad y especificidad a los análisis microbiológicos.

El producto VINEO™ Extract DNA Kit permite extraer de forma óptima el ADN de los microorganismos presentes en los mostos en fermentación y en todo tipo de muestras de vino, sea cual sea la etapa de elaboración en que se encuentren, para detectar mediante PCR en tiempo real el microorganismo de interés. El protocolo que se detalla a continuación consta de tres etapas: 1) concentración y lavado de los microorganismos del vino, 2) lisis de las células y 3) purificación del ADN extraído.



2 - COMPOSICIÓN DEL KIT

El producto VINEO™ Extract DNA Kit permite realizar 96 extracciones de ADN a partir de muestras de vino.

Denominación	Componentes del kit	Conservación	Cantidad por kit
R1	Solución de lisis; contiene una barra imantada	+2/+8°C	2 x 100 mL
R2	Tampón de elución	+2/+8°C	1 x 25 mL
W1	Solución de lavado 100X	+2/+8°C	1 x 10 mL
W2	Solución de lavado; contiene 12 % de ácido acético (X)	+2/+8°C	1 x 10 mL
	Columnas de purificación	+18/+30°C	1 x 96 unidades
	Frascos de recuperación	+18/+30°C	1 x 192 unidades

Nota: Los tampones de lavado W1 y W2 tienen composiciones diferentes. El tampón W1 diluido a 1x nunca puede ser semejante al tampón W2.

3 - CADUCIDAD Y CONSERVACIÓN

Desde el momento de su recepción, el kit debe conservarse entre +2°C y +8°C. Cada reactivo conservado entre +2°C y +8°C puede ser utilizado hasta la fecha de caducidad indicada. No deben congelarse los reactivos.

Nota: No mezclar lotes de reactivos.

4 - EQUIPO Y MATERIAL NECESARIOS NO SUMINISTRADOS CON EL KIT

1 - Equipo:

Contención microbiológica/ zona estéril

- Cabina de seguridad microbiológica

Extracción del ADN

- Bloque térmico con capacidad de hasta 95°C ± 5°C para tubos de 2 mL
- Vórtex
- Centrífuga refrigerada con una capacidad de rotación de 12 000 x g (podrá usarse una centrífuga no refrigerada, en cuyo caso las etapas en que se recomienda una temperatura de 4°C se realizarán a temperatura ambiente)
- Rotores angulares para tubos de 50 mL y adaptadores
- Rotores angulares para tubos de 1,5 – 2 mL
- Agitador magnético

2 - Material de laboratorio:

Extracción del ADN

- Tubos con tapa de tornillo estériles de 50 mL de capacidad (1 tubo para cada muestra de 45 mL analizada)
- Tubos con tapa de tornillo estériles de 2 mL de capacidad (1 tubo por muestra, sea cual sea el volumen analizado)
- Micropipetas de 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L y 1000 μ L
- Conos con filtro estériles, adaptables a las micropipetas de 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L y 1000 μ L

Otros

- Guantes sin polvo
- Agua Milli-Q estéril (para la dilución del W1 100X a 1x)
- Probeta graduada (para la dilución del W1 100X a 1x)
- Lejía diluida al 5%
- Alcohol 70°

5 - PRECAUCIONES

La extracción debe ser realizada por personas que hayan recibido una formación adecuada. La microbiología y la biología molecular precisan de una gran vigilancia y una gran disciplina a la hora de realizar movimientos meticulosos.

- Manipular y eliminar los vinos analizados como si fueran materias susceptibles de contaminar el entorno de trabajo.
- Cumplir escrupulosamente las buenas prácticas de laboratorio: la calidad de los resultados depende de ello.
- No cambiar el material (pipetas, tubos, etc.) de puesto de trabajo.
- Realizar al menos un control negativo de extracción con cada serie de extracciones, preferiblemente al final de la serie.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
- Agitar con vórtex los reactivos del kit antes de utilizarlos para trabajar con soluciones homogéneas.
- Comprobar la exactitud y la precisión de las pipetas, así como el correcto funcionamiento del instrumental.
- Cambiarse los guantes de forma regular y en cuanto se sospeche que puedan estar contaminados.
- Limpiar regularmente las superficies de trabajo con lejía diluida al 5 % y aclarar la superficie con agua y alcohol de 70°.

El reactivo W2 está clasificado como sustancia irritante según la normativa europea.



Xi (irritant)
R36/38
S23-26-37-45-60
(12% ácido acético)

Riesgos: R36/38: Irrita los ojos y la piel

Consejos de precaución: S23-26-37-45-60

No respirar los vapores/aerosoles. En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. Úsense guantes adecuados. En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta). Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos.

6 - MUESTREO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Para analizar los mostos en fermentación y los vinos que aún no se han embotellado, las muestras deberán recogerse en condiciones asépticas con pipetas o varillas de muestreo. El material usado para la obtención de las muestras se limpiará a fondo o será sustituido cuando vayan a extraerse varias muestras. Las muestras superiores a 100 mL se recogerán en recipientes estériles de vidrio, polietileno o en otros frascos. Las muestras deben enviarse al laboratorio lo más rápidamente posible, preferentemente antes de 24 horas y sin superar las 48 horas tras su extracción.

Para analizar los vinos embotellados, el análisis se realiza a partir de la botella.

Si las muestras se transportan y analizan en un plazo de 24 horas, el transporte y almacenamiento pueden realizarse a temperatura ambiente (entre +18 C y +30 C). Si las muestras se transportan y analizan en un plazo de 48 horas, el transporte y almacenamiento deben realizarse a una temperatura de entre +2°C y +8°C.

7 - PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL ADN

Recomendamos encarecidamente leer el protocolo completo antes de empezar. Cumpla escrupulosamente el protocolo propuesto. El volumen de la muestra de vino varía según la intención del manipulador y la información que se espere.

- 1,8 mL para un mosto en fermentación o un vino pesado durante la vinificación o la crianza.
- 45 mL para un vino poco pesado, próximo al embotellado o ya embotellado cuyo análisis precise de un nivel elevado de sensibilidad analítica.

Preparación del ensayo

Preparación del material

- Encender el bloque térmico y ponerlo a 95°C. Comprobar que la temperatura se haya estabilizado antes de proceder a la extracción del ADN.
- Preparar el número de columnas de purificación necesarias (= número de muestras que va a analizarse) colocando cada columna en un frasco de recuperación.

Preparación de los reactivos

- Diluir la solución de lavado W1 en relación 1:100 en cantidad suficiente para las muestras que van a analizarse.
Ver las tablas de preparación de la cantidad necesaria de la solución de lavado W1 en dilución 1x en función del número de muestras (Anexo 1: volumen para analizar muestras de mosto/vino de 1,8 mL; Anexo 2: volumen para analizar muestras de vino de 45 mL).
- Homogeneizar el tampón R1: colocar el frasco en un agitador magnético. Durante el pipeteado, asegurarse de que el R1 esté constantemente sometido a agitación magnética de modo que el reactivo de lisis sea muy homogéneo. Usar un cono con un orificio lo suficientemente ancho (es decir, una pipeta de entre 200 μ L y 1000 μ L con el cono correspondiente).

1º) - Concentración y lavado de las células del vino

Protocolo «1,8 mL para un mosto en fermentación o un mosto-vino pesado durante el proceso de vinificación o la crianza»

1. Concentración de las células

- Sacar 1,8 mL del mosto/vino que se desee analizar y ponerlos en un tubo de 2 mL con tapa de tornillo estéril.
- Centrifugar durante 5 minutos a 6000 x g y 4°C.
- Eliminar el sobrenadante.

2. Lavado del residuo

- Añadir 1,8 mL de W1 diluida.
- Agitar con vórtex durante 20 segundos y dándole la vuelta al tubo (disolución del residuo).
- Centrifugar durante 5 minutos a 6000 x g y 4°C.
- Eliminar el sobrenadante.
- **Repetir esta etapa 2 veces.**

A partir de aquí, seguir el protocolo «2) Lisis de las células».

Protocolo «45 mL para un vino poco pesado» [prueba para comprobar la ausencia de *Brettanomyces* y/o *Zygosaccharomyces* en el momento del embotellado](#)

1. Concentración de las células

- Sacar 45 mL del vino que se desee analizar y ponerlos en un tubo de 50 mL con tapa de tornillo estéril.
- Centrifugar durante 5 minutos a 6000 x g y 4°C.
- Eliminar el sobrenadante.

2. Lavado del residuo

- Añadir 45 mL de W1 diluida.
- Agitar con vórtex durante 20 segundos y dándole la vuelta al tubo.
- Centrifugar durante 5 minutos a 6000 x g y 4°C.
- Eliminar el sobrenadante.
- **Repetir esta etapa 1 vez.**
- Añadir 1 mL de W1 diluida.
- Agitar con vórtex durante 20 segundos (disolución del residuo).
- Transferir a un tubo de 2 mL con tapa de tornillo estéril.

- Centrifugar durante 5 minutos a 6000 x g y 4°C.
- Eliminar el sobrenadante.

A partir de aquí, seguir el protocolo «**2) Lisis de las células**».

2º) - Lisis de las células

A partir de esta etapa, trabajar con guantes sin polvo.

- Añadir 800 µL de tampón R1.
- Agitar con vórtex durante 20 segundos y dándole la vuelta al tubo.
- Incubar los tubos 15 minutos en un bloque térmico a 95°C.
- Sacarlos del bloque térmico y dejar enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Añadir 100 µL de solución W2 fría (4°C).
- Agitar con vórtex durante 5 segundos.
- Dejar reposar el sobrenadante durante 15 minutos a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (frigorífico).
- Centrifugar durante 15 minutos a 12 000 x g y 4°C.

3º) - Purificación del ADN

1. Depositar **500 µL** de sobrenadante de la reacción de lisis sobre una columna de purificación. Atención: no tomar la resina del fondo del tubo. Cerrar cada columna de purificación con el tapón del tubo de recuperación.

Observación: *Si se tomara resina durante el pipeteado del sobrenadante, soltar los 500 µL en el tubo y centrifugar a 900 x g durante 3 minutos.*

2. Centrifugar durante 10 minutos a 6000 x g y 20°C.

Observaciones: • *En caso de obturación de la columna de purificación, aumentar el tiempo de centrifugación sin aumentar la velocidad.* • *Es posible que se forme un pequeño velo en la superficie de las columnas durante la extracción de ADN a partir de mostos en fermentación; la manipulación puede continuarse según lo indicado en el protocolo.*

3. Vaciar el tubo de recuperación.

4. Añadir 250 µL de sobrenadante de la reacción de lisis sobre la misma columna de purificación.

5. Centrifugar durante 10 minutos a 6000 x g y 20°C.
Observaciones: • En caso de obturación de la columna de purificación, aumentar el tiempo de centrifugación **sin aumentar la velocidad**. • Comprobar que todo el sobrenadante haya atravesado completamente la columna. Si no fuera así, volver a centrifugar. • Es posible que se forme un pequeño velo en la superficie de las columnas durante la extracción de ADN a partir de mostos en fermentación; la manipulación puede continuarse según lo indicado en el protocolo.
6. Depositar 100 µL de reactivo R2 en la columna de purificación.
7. Desechar el tubo de recuperación.
8. Cubrir la columna de purificación con un nuevo tubo de recuperación limpio y dar la vuelta a todo.
9. Centrifugar durante 3 minutos a 1000 x g y 20°C. Desechar la columna de purificación.
Observación: A esta etapa el tapón no puede cerrarse.
10. Conservar el tubo de recuperación con los 100 µL de solución de ADN purificado. La solución de ADN puede conservarse durante 24 horas a 4°C y varios meses a -20°C. Tras el almacenamiento, centrifugar durante 3 minutos a 1000 x g y 20°C.

El ADN de los microorganismos presentes inicialmente en la muestra de vino que se ha procesado de esta forma podrá ser analizado mediante PCR en tiempo real.

8 - CÁLCULO DE LA FRACCIÓN DE MUESTRA ANALIZADA Y DEL FACTOR Z

Todo método de análisis que incluya una etapa de extracción seguida de una etapa de detección debe ir acompañado del cálculo de la fracción de la muestra tratada realmente analizada durante la detección final.

Este valor se toma en cuenta en el cálculo del límite de detección y de cuantificación del método global y permite ofrecer un resultado final en caso de pruebas cuantitativas. Conviene para ello calcular en cada etapa del protocolo (concentración, eliminación...) la fracción restante en relación a la muestra inicial.

El valor de Z es específico para cada protocolo de extracción. Aquí, la fracción de la muestra analizada mediante PCR corresponde a 1/24 del volumen total del vino tratado (1,8 o 45 mL) en el caso de que se analicen mediante PCR 5 μ L de ADN extraído puro.

El factor Z corresponde al denominador de la fracción analizada.

El valor del factor Z para el protocolo actual es Z=24.

Se calcula de la forma siguiente:

- Fracción de la muestra inicial presente en los 100 μ L de ADN extraído al final del protocolo de extracción:

La totalidad de los microorganismos presentes en el volumen inicial de la muestra de vino (1,8 mL o 45 mL) vuelve a aparecer en los 900 μ L de la fracción «lisis de las células» al final de la etapa 2. La fracción de células presente al inicio no ha cambiado. Hasta esta etapa $Z_0=1$.

Sólo una fracción de 750 μ L de los 900 μ L del sobrenadante de la lisis se purifica en la columna y aparece concentrada en los 100 μ L al final de la etapa 3.

La fracción conservada a lo largo del protocolo es por tanto de 900/700, es decir: 1,2.

$Z_1= 1,2$.

- Fracción de la muestra inicial analizada mediante PCR:

Sólo 5 μ L de los 100 μ L de ADN eluidos son sometidos a la PCR. La fracción analizada es por tanto de 1/20.

$Z_2= 20$

- Determinación del factor Z global del método:

$$Z = Z_0 \times Z_1 \times Z_2 = 1 \times 1,2 \times 20 = 24$$

ANEXO 1

Preparación de la cantidad necesaria de la solución de lavado W1 en dilución 1x para el tratamiento de muestras de mosto/vino de **1,8 mL**.

Número de muestras	Volumen de W1 100X (mL)	Volumen de agua Milli Q estéril (mL)	Número de muestras	Volumen de W1 100X (mL)	Volumen de agua Milli Q estéril (mL)
1	NA	NA	51	3.83	378.68
2	NA	NA	52	3.90	386.10
3	NA	NA	53	3.98	393.53
4	NA	NA	54	4.05	400.95
5	NA	NA	55	4.13	408.38
6	NA	NA	56	4.20	415.80
7	NA	NA	57	4.28	423.23
8	NA	NA	58	4.35	430.65
9	NA	NA	59	4.43	438.08
10	0.75	74.25	60	4.50	445.50
11	0.83	81.68	61	4.58	452.93
12	0.90	89.10	62	4.65	460.35
13	0.98	96.53	63	4.73	467.78
14	1.05	103.95	64	4.80	475.20
15	1.13	111.38	65	4.88	482.63
16	1.20	118.80	66	4.95	490.05
17	1.28	126.23	67	5.03	497.48
18	1.35	133.65	68	5.10	504.90
19	1.43	141.08	69	5.18	512.33
20	1.50	148.50	70	5.25	519.75
21	1.58	155.93	71	5.33	527.18
22	1.65	163.35	72	5.40	534.60
23	1.73	170.78	73	5.48	542.03
24	1.80	178.20	74	5.55	549.45
25	1.88	185.63	75	5.63	556.88
26	1.95	193.05	76	5.70	564.30
27	2.03	200.48	77	5.78	571.73
28	2.10	207.90	78	5.85	579.15
29	2.18	215.33	79	5.93	586.58
30	2.25	222.75	80	6.00	594.00
31	2.33	230.18	81	6.08	601.43
32	2.40	237.60	82	6.15	608.85
33	2.48	245.03	83	6.23	616.28
34	2.55	252.45	84	6.30	623.70
35	2.63	259.88	85	6.38	631.13
36	2.70	267.30	86	6.45	638.55
37	2.78	274.73	87	6.53	645.98
38	2.85	282.15	88	6.60	653.40
39	2.93	289.58	89	6.68	660.83
40	3.00	297.00	90	6.75	668.25
41	3.08	304.43	91	6.83	675.68
42	3.15	311.85	92	6.90	683.10
43	3.23	319.28	93	6.98	690.53
44	3.30	326.70	94	7.05	697.95
45	3.38	334.13	95	7.13	705.38
46	3.45	341.55	96	7.20	712.80
47	3.53	348.98	97	7.28	720.23
48	3.60	356.40	98	7.35	727.65
49	3.68	363.83	99	7.43	735.08
50	3.75	371.25	100	7.50	742.50

NA: La solución debe prepararse para un mínimo de 10 muestras.

Una vez reconstituida la solución de lavado W1 a 1x, puede conservarse 7 días a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

ANEXO 2

Preparación de la cantidad necesaria de la solución de lavado W1 en dilución 1x para el tratamiento de muestras de vino de **45 mL**.

Número de muestras	Volumen de W1 100X (mL)	Volumen de agua Milli Q estéril (mL)	Número de muestras	Volumen de W1 100X (mL)	Volumen de agua Milli Q estéril (mL)
1	1	99	51	51	5049
2	2	198	52	52	5148
3	3	297	53	53	5247
4	4	396	54	54	5346
5	5	495	55	55	5445
6	6	594	56	56	5544
7	7	693	57	57	5643
8	8	792	58	58	5742
9	9	891	59	59	5841
10	10	990	60	60	5940
11	11	1089	61	61	6039
12	12	1188	62	62	6138
13	13	1287	63	63	6237
14	14	1386	64	64	6336
15	15	1485	65	65	6435
16	16	1584	66	66	6534
17	17	1683	67	67	6633
18	18	1782	68	68	6732
19	19	1881	69	69	6831
20	20	1980	70	70	6930
21	21	2079	71	71	7029
22	22	2178	72	72	7128
23	23	2277	73	73	7227
24	24	2376	74	74	7326
25	25	2475	75	75	7425
26	26	2574	76	76	7524
27	27	2673	77	77	7623
28	28	2772	78	78	7722
29	29	2871	79	79	7821
30	30	2970	80	80	7920
31	31	3069	81	81	8019
32	32	3168	82	82	8118
33	33	3267	83	83	8217
34	34	3366	84	84	8316
35	35	3465	85	85	8415
36	36	3564	86	86	8514
37	37	3663	87	87	8613
38	38	3762	88	88	8712
39	39	3861	89	89	8811
40	40	3960	90	90	8910
41	41	4059	91	91	9009
42	42	4158	92	92	9108
43	43	4257	93	93	9207
44	44	4356	94	94	9306
45	45	4455	95	95	9405
46	46	4554	96	96	9504
47	47	4653	97	97	9603
48	48	4752	98	98	9702
49	49	4851	99	99	9801
50	50	4950	100	100	9900

Una vez reconstituida la solución de lavado W1 a 1x, puede conservarse 7 días a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

VINEO™ Extract DNA Kit

Rif. : 354-8100

Istruzioni per l'uso

**Valigetta per l'estrazione del DNA dei microrganismi
presenti nel vino**

SOMMARIO

- 1 - INTRODUZIONE
- 2 - COMPOSIZIONE DEL KIT
- 3 - PERIODO DI VALIDITÀ E CONSERVAZIONE
- 4 - ATTREZZATURA E MATERIALE NECESSARIO (NON FORNITO CON IL KIT)
- 5 - PRECAUZIONI
- 6 - PRELIEVO E TRASPORTO DEI CAMPIONI
- 7 - PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DEL DNA
- 8 - CALCOLO DELLA FRAZIONE DI CAMPIONE ANALIZZATO

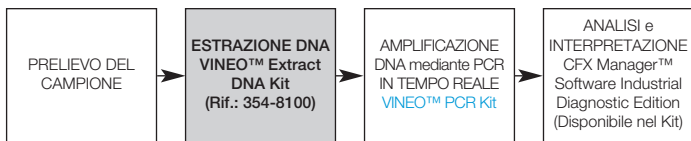
1 - INTRODUZIONE

Nel vino sono presenti numerosi microrganismi. Sono i protagonisti principali di fenomeni ben conosciuti: la fermentazione alcolica e malolattica. Malauguratamente, sono anche responsabili di numerose alterazioni. È quindi importante un controllo microbiologico per comprendere e conoscere con precisione l'evoluzione di questa flora microbica nel corso della vinificazione, e garantire e controllare in tal modo la qualità del vino. Le fasi di vinificazione, affinamento, imbottigliamento e invecchiamento in bottiglia devono essere controllate.

Le tecniche attuali per i controlli microbiologici si basano su approcci di coltura classica. Questi metodi di rilevazione microbiologici convenzionali presentano scarsa sensibilità e specificità e lunghi periodi di incubazione. Questi parametri non sono adeguati ai bisogni del vinificatore o dell'enologo per adottare delle misure in caso di squilibrio della flora microbica.

Solo un approccio di biologia molecolare consente una vera reattività. La Reazione di Polimerizzazione a Catena in tempo reale o RT – PCR (real-time Polymerase Chain Reaction) permette di ottenere dei risultati in meno di 24 ore. Al giorno d'oggi viene frequentemente utilizzata per la ricerca di microrganismi in diversi ambienti, soprattutto nel settore agroalimentare per la ricerca di flora patogena. Questo metodo consente di amplificare e di rilevare sequenze di DNA specifiche del genere o della specie microbica di interesse. Apporta così rapidità, sensibilità e specificità alle analisi microbiologiche.

Il prodotto VINEO™ Extract DNA kit permette di estrarre in modo ottimale il DNA dei microrganismi presenti nei mosti in fermentazione e in tutti i tipi di campioni di vino, qualunque sia la fase di vinificazione, per la rilevazione del microrganismo che interessa mediante PCR in tempo reale. Il protocollo dettagliato qui di seguito si compone di 3 fasi: 1°) concentrazione e lavaggio dei microrganismi del vino, 2°) lisi delle cellule, e 3°) purificazione del DNA estratto.



2 - COMPOSIZIONE DEL KIT

Il prodotto VINEO™ Extract DNA Kit permette di effettuare 96 estrazioni di DNA a partire da campioni di vino.

Designazione	Componenti del kit	Conservazione	Quantità per kit
R1	Soluzione di Lisi – contiene un magnete a barra	+2/+8°C	2 x 100 mL
R2	Tampone di eluizione	+2 /+8°C	1 x 25 mL
W1	Soluzione di lavaggio 100X	+2 /+8°C	1 x 10 mL
W2	Soluzione di lavaggio – contiene il 12% di acido acetico (X)	+2 /+8°C	1 x 10 mL
	Colonne di purificazione	+18/ +30°C	1 x 96 unità
	Flaconi di recupero	+18/ +30°C	1 x 192 unità

NB: I tamponi di lavaggio W1 e W2 sono 2 tamponi di composizione diversa. In nessun caso il tampone W1 diluito a 1X può essere assimilato al tampone W2.

3 - PERIODO DI VALIDITÀ E CONSERVAZIONE

Dal momento della ricezione, il kit deve essere conservato ad una temperatura tra +2°C e +8°C. Ogni reagente conservato ad una temperatura tra +2°C e +8°C può essere utilizzato fino alla data di scadenza indicata. I reagenti non devono essere congelati.

Nota: non mischiare i lotti di reagenti.

4 - ATTREZZATURA E MATERIALE NECESSARIO (NON FORNITO CON IL KIT)

1 - Attrezzatura:

Contenimento microbiologico/zona sterile

- Postazione di sicurezza microbiologica (PSM)

Estrazione del DNA

- Blocco riscaldante di capacità 95°C ± 5°C per provette da 2 mL
- Vortex
- Centrifuga refrigerata con una capacità di rotazione di 12000 x g (potrà essere utilizzata una centrifuga non refrigerata, in questo caso, le fasi che si consiglia di effettuare a 4°C saranno realizzate a temperatura ambiente)
- Rotor angolari per provette da 50 mL e adattatori
- Rotor angolari per provette da 1,5 – 2 mL
- Agitatore magnetico

2 - Materiale di laboratorio

Estrazione del DNA

- Provette con tappo a vite sterili di capacità 50 mL (1 provetta per campione da 45 mL analizzato)
- Provette con tappo a vite sterili di capacità 2 mL (1 provetta per campione indipendentemente dalla quantità analizzata)
- Micropipette da 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L e 1000 μ L
- Coni con filtro sterili, adattabili alle micropipette da 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L e 1000 μ L

Altri

- Guanti non talcati
- Acqua Milli Q sterile (per la diluizione del W1 100X alla diluizione 1X)
- Cilindro graduato (per la diluizione del W1 100X alla diluizione 1X)
- Candeggina al 5%
- Alcool a 70°

5 - PRECAUZIONI

L'estrazione va effettuata da persone che hanno ricevuto una formazione adeguata. La microbiologia e la biologia molecolare richiedono molta vigilanza e molta disciplina nella realizzazione di gesti meticolosi.

- Maneggiare ed eliminare i vini analizzati come materie suscettibili di contaminare l'ambiente di lavoro.
- Rispettare scrupolosamente le Buone Prassi di Laboratorio, ne va della qualità dei risultati.
- Non far circolare il materiale (pipette, provette, ecc....) da una postazione di lavoro all'altra.
- Effettuare almeno un controllo negativo di estrazione per ogni serie di estrazioni, preferibilmente alla fine della serie.
- Non utilizzare i reagenti oltre la loro data di scadenza.
- Agitare con il vortex i reagenti del kit prima di utilizzarli in modo da lavorare con soluzioni omogenee.
- Verificare l'accuratezza e la precisione delle pipette e il corretto funzionamento degli strumenti.
- Sostituire i guanti regolarmente e ogniqualvolta si sospetti una contaminazione.
- Pulire le superfici di lavoro regolarmente con candeggina al 5% e risciacquare la superficie con acqua e alcool a 70°.

Il reagente W2 è classificato come sostanza irritante ai sensi della normativa europea.



Xi (irritant)
R36/38
S23-26-37-45-60
(12% acido acetico)

Rischi: R36/38 – Irritante per gli occhi e per la pelle

Consigli di prudenza: S23-26-37-45-60

Non respirare i vapori / aerosol. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare uno specialista. Indossare guanti adatti. In caso di incidente o malore, consultare immediatamente un medico (se possibile, mostrargli l'etichetta). Smaltire il prodotto e il suo recipiente come rifiuto pericoloso.

6 - PRELIEVO E TRASPORTO DEI CAMPIONI

Per l'analisi dei mosti in fermentazione e dei vini ancora non imbottigliati, i campioni andranno raccolti in condizioni di asepsi per mezzo di pipette o di bastoncini da prelievo. Il materiale utilizzato per il prelievo dovrà essere accuratamente pulito o sostituito in caso di prelievo di molti campioni. I campioni di minimo 100 mL verranno prelevati in recipienti sterili di vetro, di polietilene o in altri flaconi. I campioni devono essere consegnati al laboratorio il più rapidamente possibile, preferibilmente entro le 24 ore, senza superare le 48 ore dal prelievo del campione.

Per l'analisi dei vini in bottiglia, l'analisi viene effettuata a partire dalla bottiglia.

Se i campioni vengono trasportati e analizzati entro le 24 ore, allora il trasporto e la conservazione possono essere effettuati a temperatura ambiente (+18°C/+30°C). Se i campioni vengono trasportati e analizzati nelle 48 ore, allora il trasporto e la conservazione devono essere effettuati a +2°C/+8°C.

7 - PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DEL DNA

Vi consigliamo vivamente di leggere tutto il protocollo prima di iniziare. Rispettare scrupolosamente il protocollo proposto. Il volume del campione di vino varia a seconda dell'intenzione di colui che esegue l'analisi e dell'informazione attesa.

- 1,8 mL per un mosto in fermentazione, un vino carico in corso di vinificazione o di affinamento
- 45 mL per un vino poco carico, prossimo ad essere imbottigliato o già imbottigliato la cui analisi richiede un livello di sensibilità analitica elevato.

Preparazione del saggio

Preparazione del materiale

- Accendere il blocco riscaldante e regolarlo a 95°C. Verificare che la temperatura sia stabilizzata prima di procedere all'estrazione del DNA
- Preparare il numero di colonne di purificazione necessarie (= Numero di campioni da analizzare) mettendo ogni colonna in un flacone di recupero.

Preparazione dei reagenti

- Diluire la soluzione di lavaggio W1 a 1/100 in quantità sufficiente per i campioni da analizzare.

Vedere le Tabelle di preparazione della quantità necessaria della soluzione di lavaggio W1 alla diluizione 1X in funzione del numero di campioni. (Allegato 1: volume di mosto/vino analizzato di 1,8 mL e Allegato 2: volume di vino analizzato di 45 mL).

- Omogeneizzare il tampone R1: porre il flacone su un agitatore magnetico. Al momento del pipettaggio, controllare che R1 sia costantemente sotto agitazione magnetica in modo che il reagente di lisi sia omogeneo. Utilizzare un cono con un'apertura sufficientemente ampia (o una pipetta da 200 µL a 1000 µL con il cono corrispondente)

1°) - Concentrazione e lavaggio delle cellule dei microrganismi del vino

Protocollo "1,8 mL per un mosto in fermentazione o un vino carico in corso di vinificazione o di affinamento"

1. Concentrazione delle cellule

- Prelevare 1,8 mL del mosto/vino da analizzare e porli in una provetta da 2 mL con tappo a vite sterile

- Centrifugare: 5 minuti, a 6000 x g, a 4°C
- Eliminare il surnatante

2. Lavaggio del sedimento

- Aggiungere 1,8 mL di W1 diluito
- Agitare con il Vortex per 20 secondi e agitare capovolgendo la provetta (dissoluzione del sedimento)
- Centrifugare: 5 minuti, a 6000 x g, a 4°C
- Eliminare il surnatante
- Ripetere questa fase 2 volte

In questa fase seguire il protocollo “2°) – Lisi delle cellule”

Protocollo 45 mL per un vino poco carico – test “Brett free” e/o “Zygo free” all’imbottigliamento”

1. Concentrazione delle cellule

- Prelevare 45 mL del vino da analizzare e porli in una provetta da 50 mL con tappo a vite sterile
- Centrifugare 5 minuti, a 6000 x g, a 4°C
- Eliminare il surnatante

2. Lavaggio del sedimento

- Aggiungere 45 mL di W1 diluito
- Agitare con il Vortex per 20 secondi e agitare capovolgendo la provetta
- Centrifugare 5 minuti, a 6000 x g, a 4°C
- Eliminare il surnatante
- **Ripetere questa fase 1 volta**
- Aggiungere 1 mL di W1 diluito
- Agitare con il Vortex per 20 secondi (dissoluzione del sedimento)
- Trasferire in una provetta da 2 mL con tappo a vite sterile
- Centrifugare 5 minuti, a 6000 x g, a 4°C
- Eliminare il surnatante

In questa fase seguire il protocollo “2°) - Lisi delle cellule”

2°) - Lisi delle cellule

A partire da questa fase, lavorare con guanti non talcati.

- Aggiungere 800 µL di tampone R1
- Agitare con il Vortex per 20 secondi e agitare capovolgendo la provetta

- Incubare le provette 15 min in un blocco riscaldate a 95°C
- Tirarle fuori dal blocco e farle raffreddare per 5 min a temperatura ambiente
- Aggiungere 100 µL di tampone W2 freddo (4°C)
- Agitare con il Vortex per 5 secondi
- Far riposare il surnatante per 15 min a 4 ± 2°C (frigorifero)
- Centrifugare: 15 minuti a 12000 x g, a 4°C

3°) - Purificazione del DNA

1. Deporre **500 µL** di surnatante della reazione di lisi su una colonna di purificazione. Attenzione, non prelevare la resina al fondo della provetta. Chiudere ciascuna colonna di purificazione con il tappo della provetta di recupero.

***Nota:** Al momento del pipettaggio del surnatante, se viene prelevata della resina, rilasciarne 500 µL nella provetta e centrifugare a 900 x g per 3 minuti.*

2. Centrifugare: 10 minuti, a 6000 x g, a 20°C

***Nota:** • In caso di ostruzione della colonna di purificazione, aumentare il tempo di centrifugazione senza aumentare la velocità. • È possibile che si formi un leggero velo sulla superficie delle colonne al momento dell'estrazione del DNA a partire dai mosti in fermentazione, proseguire le manipolazioni come indicato nel protocollo*

3. Svotare la provetta di recupero del suo contenuto.

4. Aggiungere altri 250 µL di surnatante della reazione di lisi sulla stessa colonna di purificazione.

5. Centrifugare: 10 minuti, a 6000 x g, a 20°C.

***Nota:** • In caso di ostruzione della colonna di purificazione, aumentare il tempo di centrifugazione **senza aumentare la velocità**. Verificare che tutto il surnatante sia passato attraverso la colonna. In caso contrario, centrifugare nuovamente. • È possibile che si formi un leggero velo sulla superficie delle colonne al momento dell'estrazione del DNA a partire dai mosti in fermentazione, proseguire le manipolazioni come indicato nel protocollo.*

6. Porre 100 μL di reagente R2 nella colonna di purificazione.
7. Gettare la provetta di recupero.
8. Coprire la colonna di purificazione con una nuova provetta di recupero pulita, e capovolgere il tutto giù.
9. Centrifugare 3 min, a 1000 x g, a 20°C. Gettare la colonna di purificazione.
Nota: *A questa fase il tappo non può essere chiuso.*
10. Conservare la provetta di recupero che contiene i 100 μL di soluzione di DNA purificato. La soluzione di DNA può essere conservata per 24 ore a 4°C e per molti mesi a -20°C. Dopo la conservazione, centrifugare 3 min, a 1000 x g, a 20°C.

Il DNA dei microrganismi inizialmente presenti nel campione di vino trattato in questo modo potrà essere analizzato mediante una reazione di PCR in tempo reale.

8 - CALCOLO DELLA FRAZIONE DI CAMPIONE ANALIZZATO E DEL FATTORE Z

Qualunque metodo di analisi che comprenda una fase di estrazione seguita da una fase di rilevazione deve essere accompagnato dal calcolo della frazione del campione trattato realmente analizzato nel corso della rilevazione finale.

Questo valore viene preso in considerazione nel calcolo del limite di rilevazione e di quantificazione del metodo totale, e consente di fornire un risultato finale in caso di test quantitativo. Conviene pertanto calcolare ad ogni fase del protocollo (concentrazione, eliminazione...) la frazione restante in rapporto al campione di partenza.

Il valore di Z è specifico di ogni protocollo di estrazione. Qui la frazione del campione analizzato in PCR corrisponde a 1/24° del volume totale di vino trattato (1,8 o 45 mL) nel caso in cui vengano analizzati in PCR 5 μL di DNA estratto puro.

Il fattore Z corrisponde al denominatore della frazione analizzata.

Il valore del fattore Z per il presente protocollo è $Z = 24$.

Viene calcolato nel modo seguente:

- Frazione del campione iniziale presente nei 100 μL di DNA estratto al termine del protocollo di estrazione:

La totalità dei microrganismi presenti nel volume iniziale del campione di vino (1,8 mL o 45 mL) si trova nei 900 μL della frazione "lisi delle cellule" alla fine della fase 2°. La frazione di cellule inizialmente presente è invariata. Fino a questa fase $Z_0=1$.

Solo una frazione di 750 μL sui 900 μL di questo surnatante di lisi è purificata su colonna e si ritrova concentrata nei 100 μL , alla fine della fase 3.

La frazione conservata nel corso di questo protocollo è quindi di 900/750, vale a dire 1,2.

$$Z_1 = 1,2.$$

- Frazione del campione iniziale analizzata in PCR:

Solo 5 μL sui 100 μL di DNA sono sottoposti alla PCR. La frazione analizzata è quindi di 1/20.

$$Z_2 = 20$$

- Determinazione del Fattore Z totale del metodo:

$$Z = Z_0 \times Z_1 \times Z_2 = 1 \times 1,2 \times 20 = 24$$

ALLEGATO1

Preparazione della quantità necessaria della soluzione di lavaggio W1 alla diluizione 1X per il trattamento di campioni di mosto/vino di un volume di **1,8 mL**.

Numero di campioni	Volume di W1 100X (mL)	Volume di Acqua Mili Q sterile (mL)	Numero di campioni	Volume di W1 100X (mL)	Volume di Acqua Mili Q sterile (mL)
1	NA	NA	51	3.83	378.68
2	NA	NA	52	3.90	386.10
3	NA	NA	53	3.98	393.53
4	NA	NA	54	4.05	400.95
5	NA	NA	55	4.13	408.38
6	NA	NA	56	4.20	415.80
7	NA	NA	57	4.28	423.23
8	NA	NA	58	4.35	430.65
9	NA	NA	59	4.43	438.08
10	0.75	74.25	60	4.50	445.50
11	0.83	81.68	61	4.58	452.93
12	0.90	89.10	62	4.65	460.35
13	0.98	96.53	63	4.73	467.78
14	1.05	103.95	64	4.80	475.20
15	1.13	111.38	65	4.88	482.63
16	1.20	118.80	66	4.95	490.05
17	1.28	126.23	67	5.03	497.48
18	1.35	133.65	68	5.10	504.90
19	1.43	141.08	69	5.18	512.33
20	1.50	148.50	70	5.25	519.75
21	1.58	155.93	71	5.33	527.18
22	1.65	163.35	72	5.40	534.60
23	1.73	170.78	73	5.48	542.03
24	1.80	178.20	74	5.55	549.45
25	1.88	185.63	75	5.63	556.88
26	1.95	193.05	76	5.70	564.30
27	2.03	200.48	77	5.78	571.73
28	2.10	207.90	78	5.85	579.15
29	2.18	215.33	79	5.93	586.58
30	2.25	222.75	80	6.00	594.00
31	2.33	230.18	81	6.08	601.43
32	2.40	237.60	82	6.15	608.85
33	2.48	245.03	83	6.23	616.28
34	2.55	252.45	84	6.30	623.70
35	2.63	259.88	85	6.38	631.13
36	2.70	267.30	86	6.45	638.55
37	2.78	274.73	87	6.53	645.98
38	2.85	282.15	88	6.60	653.40
39	2.93	289.58	89	6.68	660.83
40	3.00	297.00	90	6.75	668.25
41	3.08	304.43	91	6.83	675.68
42	3.15	311.85	92	6.90	683.10
43	3.23	319.28	93	6.98	690.53
44	3.30	326.70	94	7.05	697.95
45	3.38	334.13	95	7.13	705.38
46	3.45	341.55	96	7.20	712.80
47	3.53	348.98	97	7.28	720.23
48	3.60	356.40	98	7.35	727.65
49	3.68	363.83	99	7.43	735.08
50	3.75	371.25	100	7.50	742.50

NA: La soluzione deve essere preparata per un minimo di 10 campioni.

Una volta ricostituita la soluzione di lavaggio W1 a 1X e può essere conservata per 7 giorni a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

ALLEGATO 2

Preparazione della quantità necessaria della soluzione di lavaggio W1 alla diluizione 1X per il trattamento di campioni di vino di un volume di **45 mL**.

Numero di campioni	Volume di W1 100X (mL)	Volume di Acqua Mili Q sterile (mL)	Numero di campioni	Volume di W1 100X (mL)	Volume di Acqua Mili Q sterile (mL)
1	1	99	51	51	5049
2	2	198	52	52	5148
3	3	297	53	53	5247
4	4	396	54	54	5346
5	5	495	55	55	5445
6	6	594	56	56	5544
7	7	693	57	57	5643
8	8	792	58	58	5742
9	9	891	59	59	5841
10	10	990	60	60	5940
11	11	1089	61	61	6039
12	12	1188	62	62	6138
13	13	1287	63	63	6237
14	14	1386	64	64	6336
15	15	1485	65	65	6435
16	16	1584	66	66	6534
17	17	1683	67	67	6633
18	18	1782	68	68	6732
19	19	1881	69	69	6831
20	20	1980	70	70	6930
21	21	2079	71	71	7029
22	22	2178	72	72	7128
23	23	2277	73	73	7227
24	24	2376	74	74	7326
25	25	2475	75	75	7425
26	26	2574	76	76	7524
27	27	2673	77	77	7623
28	28	2772	78	78	7722
29	29	2871	79	79	7821
30	30	2970	80	80	7920
31	31	3069	81	81	8019
32	32	3168	82	82	8118
33	33	3267	83	83	8217
34	34	3366	84	84	8316
35	35	3465	85	85	8415
36	36	3564	86	86	8514
37	37	3663	87	87	8613
38	38	3762	88	88	8712
39	39	3861	89	89	8811
40	40	3960	90	90	8910
41	41	4059	91	91	9009
42	42	4158	92	92	9108
43	43	4257	93	93	9207
44	44	4356	94	94	9306
45	45	4455	95	95	9405
46	46	4554	96	96	9504
47	47	4653	97	97	9603
48	48	4752	98	98	9702
49	49	4851	99	99	9801
50	50	4950	100	100	9900

Una volta ricostituita la soluzione di lavaggio W1 a 1X e può essere conservata per 7 giorni a 4±2°C.

Purchaser's information: VINEO is a trademark of Bio-Rad
Information à l'acheteur : VINEO is a trademark of Bio-Rad
Información al comprador: VINEO es una marca registrada de Bio-Rad
Informazione per l'acquirente: VINEO è un marchio registrato di Bio-Rad

Bio-Rad

3, bd Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France
Tel.: +33 1 47 95 60 00
Fax.: +33 1 47 41 91 33
www.bio-rad.com

