



RESOLUTION OIV-OENO 529-2017

NACHWEIS VON CHITINASE UND THAUMATIN-ÄHNLICHEN PROTEINEN IN WEISSWEINEN

DIE GENERALVERSAMMLUNG,

gestützt auf Artikel 2 Absatz 2 iv des Übereinkommens vom 3. April 2001 zur Gründung der Internationalen Organisation für Rebe und Wein,

auf Vorschlag der Unterkommission „Analysemethoden“,

BESCHLIESST, die Sammlung internationaler Analysemethoden für Wein und Most durch folgende Methode zu ergänzen:

NACHWEIS VON CHITINASE UND THAUMATIN-ÄHNLICHEN PROTEINEN IN WEISSWEINEN (Typ IV-Methode)

1. Einleitung

Zum Nachweis von instabilen Proteinen und Risiken der Eiweißtrübung in Weiß- und Roséweinen werden zahlreiche Tests verwendet, die auf der Anwendung von Wärme oder der Fällung durch Chemikalien beruhen. Sie liefern sehr unterschiedliche Ergebnisse, die unzuverlässig bzw. widersprüchlich sind.

Die immunologische semiquantitative Methode (Western Blot) gibt Aufschluss darüber, ob instabile Proteine in Wein vorhanden sind oder nicht. Sie ermöglicht den Nachweis von Thaumatin-ähnlichen Proteinen und Chitinase in Wein ab einer Konzentration von insgesamt 1 mg/l. Dieser Wert ergibt sich aus dem Vergleich der Ergebnisse mit der in der Sammlung der Analysemethoden beschriebenen SDS-Elektrophorese (OIV-MA-AS315-12), die eine Nachweisgrenze von 1 mg/l aufweist.

2. Anwendungsgebiet

Das immunologische Western-Blot-Verfahren findet bei Weißweinen Anwendung.

3. Prinzip

Das Western Blot-Verfahren lässt sich in drei Phasen unterteilen:

3.1 Auftragen der Weinprobe auf eine Nitrocellulose-Membran

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

3.2 Nachweis der instabilen Proteine

3.3 Sichtbarmachung der instabilen Proteine

Die Farbintensität der auf der Membran sichtbaren Flecken ist proportional zur Menge der instabilen Proteine sowie zum Risiko einer Eiweißtrübung des Weins.

4. Reagenzien und Produkte

4.1 Liste der Reagenzien und Produkte

Sofern nicht anders angegeben, sind die Produkte so zu verwenden, wie sie in den Verkehr gebracht werden.

- 4.1.1 Ultrareines Wasser: spezifischer Widerstand $\geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ bei 25°C
- 4.1.2 Stark proteinhaltiger Wein und Wein, der nach einer Behandlung mit Bentonit keine Proteine enthält. Diese Weine werden jeweils für die Positiv- und Negativkontrollen verwendet: Die Überprüfung und die quantitative Bestimmung der in den Weinen vorhandenen Proteine können mittels SDS-PAGE-Elektrophorese (Methode OIV-MA-AS315-12) erfolgen
- 4.1.3 Polyklonale Antikörper von Kaninchen, die gegen die instabilen Proteine des Weins gerichtet sind (siehe Protokoll im Anhang)
- 4.1.4 Polyklonale Antikörper von Ziegen, die gegen IgA-Antikörper von Kaninchen gerichtet und mit Meerrettichperoxidase konjugiert sind (im Weiteren: Antikörper Goat anti-Rabbit-HRP)
- 4.1.5 Wasserfreies Natriumchlorid (NaCl), CAS-Nr. 7647-14-5
- 4.1.6 Wasserfreies Tris-HCl, CAS-Nr. 1185-53-1
- 4.1.7 Konzentriertes HCl in Lösung, Reinheit $\geq 36,5\%$, CAS-Nr. 7647-01-0
- 4.1.8 Tween 20, CAS-Nr. 9005-64-5
- 4.1.9 Rinderserumalbumin (BSA), lyophilisiertes Pulver, Reinheit $\geq 96\%$, CAS-Nr. 9048-46-8
- 4.1.10 4-Chlor-1-naphthol, Reinheit $\geq 99\%$, CAS-Nr. 604-44-4
- 4.1.11 Methanol, Reinheit $\geq 99,8\%$, CAS-Nr. 67-56-1
- 4.1.12 Wasserstoffperoxid in Lösung (H_2O_2), Reinheit $\geq 30\%$, CAS-Nr. 7722-84-1

4.2 Herstellung der Arbeitslösung

Alle Lösungen können 1 Jahr bei 4°C aufbewahrt werden.

4.2.1 TBS-Puffer (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)

29,22 g Natriumchlorid (4.1.5) und 2,42 g Tris-HCl (4.1.6) in 1 Liter ultrareinem Wasser (4.1.1) lösen. Den pH-Wert mit konzentrierter HCl-Lösung (4.1.7) auf 7,5 einstellen.

4.2.2 TBS-Tween 20 Puffer

Dem TBS-Puffer (4.2.1) 0,05% Tween 20, (4.1.8) zugeben.

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

4.2.3 Blockierlösung

Dem TBS-Puffer (4.2.1) 4 % BSA, (4.1.9) zugeben.

4.2.4 polyklonale Antikörper-Lösung (aus dem Handel oder wie im Protokoll in der Anlage beschrieben)

4.2.4.1 Die gegen instabile Proteine gerichteten polyklonalen Antikörper (Primärantikörper) nach den Handlungsempfehlungen oder unter Berücksichtigung ihres Titors mit TBS-Puffer (4.2.1) verdünnen.

4.2.4.2 Die polyklonalen Antikörper „Goat anti-Rabbit-HRP“ (Sekundärantikörper) nach den Handlungsempfehlungen oder unter Berücksichtigung ihres Titors mit TBS-Puffer (4.2.1) verdünnen.

4.2.5 Lösungen für den Nachweis instabiler Proteine

4.2.5.1 30 mg 4-Chlor-1-naphthol (4.1.10) in 10 mL Methanol (4.1.11) lösen. Diese Lösung bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C dunkel lagern.

4.2.5.2 30 µL H₂O₂ (4.1.12) zu 50 mL TBS (4.2.1) geben.

5. Material

5.1 Liste der Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Western Blot-Reaktion:

- 5.1.1 Nitrocellulose-Membran, Porengröße 0,2µm zur Durchführung der Western Blot-Methode
- 5.1.2 Automatische Pipetten, 0,5 – 10 µL und 100 – 1000 µL, entsprechende Pipettenspitzen
- 5.1.3 Reagenzgläser, Reagenzglashalterung für die Verdünnungen der Antikörper
- 5.1.4 Messzylinder der Klasse A
- 5.1.5 Saugfähiges Papier
- 5.1.6 Laborpinzette
- 5.1.7 Laborgeräte aus Glas zur Durchführung der Reaktion: kleiner Kristallisator, Petrischalen, Röhren mit Stopfen, usw.
- 5.1.8 Wippschüttler (für Reaktionen in Schalen) oder Kreisschüttler (für Reaktionen in Röhren), maximal 20 U/min.

5.2. Material zur Herstellung der Lösungen:

- 5.2.1 Messkolben, Klasse A
- 5.2.2 pH-Meter
- 5.2.3 Präzisionswaage, Genauigkeit 0,1 mg
- 5.2.4 Zentrifuge, 3000 g und Zentrifugenröhrchen

6. Probenahme

Die Proben sind bei 4 °C zu entnehmen und aufzubewahren, so dass die im Wein von Natur aus vorhandenen Proteine nicht verändert werden.

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

6.1 Vorbereitung der Probe

Die Weinproben (oder Laborproben) werden ohne vorherige Vorbereitung direkt auf die Nitro-Cellulosemembran (5.1.1) pipettiert (5.1.2).

7. Durchführung

Die Analyse kann an nicht filtrierten Weinen durchgeführt werden, sofern diese kein suspendiertes Bentonit enthalten. Ist dies der Fall, müssen die Weine zentrifugiert werden (3000 g, 10 Minuten bei Raumtemperatur).

Wie unter Ziffer 3 angegeben, erfolgt die Anwendung des immunologischen Western-Blot-Verfahrens in 3 Schritten. Die Reaktionen erfolgen bei Umgebungstemperatur zwischen 18 ° C und 25 ° C.

7.1 Auftragen der Weinprobe

5 µL (5.1.2) Probe und Kontrolllösungen auf die Nitrocellulose-Membran (5.1.1) auftragen, 15-20 min bei Umgebungstemperatur trocknen lassen.

7.2 Zugabe von monoklonalen Antikörpern

7.2.1 Die Membran in eine Schale oder ein Röhrchen (5.1.7) geben. Die Menge der Lösungen ist vom Gefäß und von der Größe der Membran abhängig, die bedeckt sein muss.

Die unten angegebenen Mengen gelten für kleine Petrischalen (5.1.7).

Die Blockierlösung (4.2.3) zugeben und mindestens 30 min schütteln (5.1.8).

7.2.2 Waschvorgang: Zur Entfernung der Lösung ist die Membran notfalls mit einer Pinzette festzuhalten; 20 mL TBS (4.2.1) zugeben und einige Minuten schütteln (5.1.8); ein zweites Mal wie oben beschrieben spülen und die Lösung entfernen.

7.2.3. 20 mL Primärantikörper-Lösung (4.2.4.1) zugeben und eine Stunde schütteln (5.1.8); drei Mal mit TBS-Tween 20-Lösung (4.2.2) spülen.

7.2.4 20 mL Sekundärantikörper-Lösung, Goat anti-Rabbit-HRP (4.2.4.2) zugeben und eine Stunde schütteln;

7.2.5 mit der TBS-Tween 20-Lösung (4.2.2) wie oben beschrieben 5 min waschen; zwei Mal 15 min mit der TBS-Lösung (4.2.1) wie oben beschrieben waschen; die Lösung entfernen.

7.3 Sichtbarmachung der instabilen Proteine

7.3.1 Die beiden Lösungen mischen, um die instabilen Proteine sichtbar zu machen (4.2.5.1 und 4.2.5.2) und auf die nach den Ziffern 7.1 und 7.1 präparierte Membran (5.1.1) auftragen und schütteln. Auf der Membran wird an der Stelle, an der sich die instabilen Proteine befinden, ein schwarzer bis dunkel- oder hellvioletter Farbniederschlag sichtbar. Die Farbintensität hängt von der Konzentration der instabilen Proteine und somit vom Risiko der Eiweißtrübung ab.

Nach 20-30 min, wenn die Stelle, an der die positive Kontrollprobe (4.1.2) aufgetragen wurde, eine intensive Färbung aufweist, die Färbung unterbrechen, indem die Nitrocellulose-Membran (5.1.1) mit Wasser gewaschen wird.

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

Die Membran in saugfähigem Papier (5.1.5) trocknen.

Die Ergebnisse können ausgewertet werden, wenn die Membran trocken ist.

8. Ergebnisse

Für die Auswertung der Reaktionsergebnisse ist folgendes erforderlich:

- Die Stelle, an der die positive kolorimetrische Kontrolllösung aufgetragen wurde, muss einen Fleck mit starker Farbintensität (dunkelviolett bis schwarz) aufweisen.
- Die Stelle, an der die negative kolorimetrische Kontrolllösung aufgetragen wurde, darf keinen Fleck aufweisen.
- Die Stelle der Membran, an der keine Probe aufgetragen wurde, muss hell bzw. weiß sein (Hintergrundrauschen).

Ein semiquantitatives Ergebnis kann erhalten werden, indem eine Kalibriergerade anhand eines Weins mit natürlich hohem Proteingehalt erstellt wird, von dem eine Verdünnungsreihe hergestellt wird. Diese hängt von den Flächen ab, die durch Integration der Intensität der Färbung der Flecken erhalten werden, die der Immunokomplexbildung entsprechen. Es kann die gleiche Ausrüstung wie für die Analyse von Elektrophoresegelen verwendet werden, die in der Methode OIV-MA-AS315-12 beschrieben ist.

Die Auswertung der Ergebnisse kann auch durch eine Sichtprüfung erfolgen.

8.1 Direkte Prüfung der An- oder Abwesenheit von instabilen Proteinen in Wein

Es sind Proteine in der Laborprobe enthalten, wenn die Farbintensität des erhaltenen Flecks stärker ist als die des Flecks der negativen Kontrolllösung.

Die Intensität des Flecks, der nach der Reaktion erhalten wird, ist proportional zur Menge der instabilen Proteine und somit zum Risiko der Eiweißtrübung in diesem Wein.

8.2 Kontrolle nach einer Behandlung (insbesondere mit Bentonit)

Es sind Proteine in der Probe enthalten, wenn die Intensität des Flecks, der bei dem Test ohne Behandlung mit Bentonit erhalten wird, stärker ist als die des Flecks der negativen kolorimetrischen Kontrolllösung.

Wird im Labor eine Versuchsreihe mit Behandlungsmitteln (Bentonit) durchgeführt, muss die Intensität der Flecken bei jedem Versuch parallel zur Erhöhung der Konzentration des Behandlungsmittels abnehmen. Wenn die Intensität eines Flecks gleich null oder minimal, jedoch gegenüber den anderen Punkten der Versuchsreihe konstant ist, wird zur Erreichung der Eiweißstabilität des getesteten Weins die Dosis des Behandlungsmittels verwendet, die diesem Fleck entspricht.

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

9. Anlagen

Herstellung polyklonaler Antikörper, die gegen instabile Proteine gerichtet sind

Antikörper, die gegen instabile Proteine in Weiß- und Roséweinen gerichtet sind, können mit Kaninchen hergestellt werden. Aufgrund ihrer Spezifität ist die Methode zuverlässig und genau.

9.1 Reinigung von Chitinase und Thaumatin-ähnlichem Protein

9.1.1 Liste der Verbrauchsmaterialien und Geräte

- 9.1.1.1 Ultrareines Wasser: spezifischer Widerstand $\geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$
- 9.1.1.2 Technologisch ausgereifte Keltertrauben (z.B. Rebsorte Chardonnay oder Sauvignon blanc)
- 9.1.1.3 Wasserfreies Natriumacetat, CAS-Nr. 127-09-3
- 9.1.1.4 Triton X-100, CAS-Nr.9002-93-1
- 9.1.1.5 Wasserfreies Ammoniumsulfat, CAS-Nr.127-09-3
- 9.1.1.6 Wasserfreies Natriumchlorid (NaCl), CAS-Nr. 7647-14-5
- 9.1.1.7 Wasserfreies Tris-HCl, CAS-Nr. 1185-53-1
- 9.1.1.8 Reine Salzsäure, 37 %, CAS-Nr. 7647-01-0
- 9.1.1.9 Natriumhydroxid NaOH 1M, CAS-Nr. 1310-73-2
- 9.1.1.10 Laborgeräte wie Messkolben und Pipetten, Klasse A
- 9.1.1.11 Laborpinzette
- 9.1.1.12 Zentrifuge, 10 000 g
- 9.1.1.13 Laborwaage, Genauigkeit 0,1 mg
- 9.1.1.14 pH-Meter
- 9.1.1.15 Stark anionisches Harz
- 9.1.1.16 Anionisches Harz
- 9.1.1.17 Membran, Ausschlussgrenze 10 kDa
- 9.1.1.18 Niederdruck-Flüssigchromatograph mit Gradientenpumpe
- 9.1.1.19 Detektor zur Messung der Extinktion bei 280 nm
- 9.1.1.20 konduktometrischer Detektor

9.1.2 Herstellung des Natriumacetatpuffers (9.1.1.3), 50 mM; 0,25 % Triton X-100 (9.1.1.4), pH 5

In einen 1 L-Messkolben (9.1.1.10) nacheinander

- 4,1 g Natriumacetat (9.1.1.3)
- 2,5 g Triton X-100 (9.1.1.4) geben
- mit ultrareinem Wasser (9.1.1.1) bis zur Marke auffüllen und schütteln; pH-Wert mit HCl, 37 % (9.1.1.8) auf 5 einstellen, um zu verhindern, dass sich ein basisches Milieu negativ auf die zu extrahierenden Proteine auswirkt oder ihre Extraktion behindert.

9.1.3 Herstellung des Tris-HCl-Puffers, 50 mM, pH 8,0

In einen 1 L-Messkolben (9.1.1.10)

- 7,9 g wasserfreies Tris HCl Anhydre (9.1.1.7) geben
- mit ultrareinem Wasser (9.1.1.1) bis zur Marke auffüllen und schütteln; pH-Wert mit NaOH 1M-Lösung (9.1.1.9) auf 8 einstellen.

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

9.1.4 Herstellung des Tris-HCl-Puffers 50 mM, 100 mM NaCl

- In einen 1 L-Messkolben (9.1.1.10) nacheinander
- 7,9 g wasserfreies Tris HCl (9.1.1.7)
- 5,8 g wasserfreies Natriumchlorid (9.1.1.6) geben
- mit ultrareinem Wasser (9.1.1.1) bis zur Marke auffüllen und schütteln.

9.1.5 Herstellung der Natriumchlorid-Lösung, 100 mM

- In einen 1 L-Messkolben (9.1.1.10) nacheinander
- 5,8 g wasserfreies Natriumchlorid (9.1.1.5 6)
- mit ultrareinem Wasser (9.1.1.1) auf 1 Liter auffüllen und schütteln.

9. 2 Durchführung

Trauben der Rebsorten Pinot Noir oder Chardonnay werden in reifem Zustand geerntet und bei -20 °C eingefroren. Vor dem Zerkleinern der eingefrorenen Beeren werden die Kerne entfernt. 3 g entkernte Beeren werden in 10 mL auf 50 mM verdünntem Natriumacetat-Puffer (9.1.2), pH 5 mit 0,25% Triton X-100 (9.1.1.4) zerkleinert.

Das unlösliche Material wird durch Zentrifugation entfernt (3000 g, 5 min) (9.1.1.12). Der Überstand (2 mL) wird zur Klärung über Nacht bei -20 °C eingefroren. Zur Entfernung des unlöslichen Materials wird der Extrakt zentrifugiert (10000 g, 15 min).

Dem Überstand wird bis zum Erreichen einer Konzentration von 30 %, Ammoniumsulfat (9.1.1.5) zugegeben. Das Gemisch wird 1 Stunde bei 4 °C geschüttelt und dann erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert.

Dem Überstand wird erneut Ammoniumsulfat (9.1.1.5) zugegeben, bis eine endgültige Konzentration von 60% erreicht ist. Das Gemisch wird 2 Stunden bei 4 °C geschüttelt und dann erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert.

Der Proteinniederschlag wird aufgefangen und in 1 mL Tris-HCl Puffer, 50 mM, pH 8,0 (9.1.3) gelöst. Die Proteine werden auf einer Säule (5 x 30 cm), die mit stark anionischem Harz (9.1.1.15) gefüllt ist, fixiert. Die Säule wird mit dem oben beschriebenen Tris-HCl Puffer gewaschen. Chitinase und Thaumatin-ähnliches Protein werden durch Tris-HCl Puffer mit 100 mM NaCl eluiert. Alle Fraktionen werden aufgefangen und auf einer Membran mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa (9.1.1.17) mit Tris-HCl Puffer, 50 mM, pH 8,0 (9.1.3) entsalzt. Die entsalzten Proteinfractionen werden dann auf eine mit anionischem Harz (9.1.1.16) gefüllte Niederdruck-Chromatographie-Säule (9.1.1.18) gegeben. Die Elution erfolgt mit 120 mL eines NaCl-Gradienten (9.1.5) von 0 bis 100 mM (9.1.1.18) anhand einer Gradientenpumpe unter Verwendung einer Lösung A in ultrareinem Wasser (9.1.1.1) und einer Lösung B in Natriumchlorid, 100 mM (9.1.5). Die Protein- und Salzkonzentrationen werden durch Messung der Extinktion bei 280 nm und der Leitfähigkeit der Flüssigkeiten am Säulenausgang anhand der Detektoren (9.1.1.19 und 9.1.1.20) ermittelt. Die gereinigten und getrennten Proteinfractionen von Chitinase und Thaumatin-ähnlichem Protein werden zur Herstellung der Antikörper verwendet.

9.3 Herstellung von gegen Chitinase und Thaumatin-ähnliches Protein gerichteten Antikörpern aus Kaninchen

Vorliegendes Verfahren entspricht dem Protokoll der Methode OIV-MA-AS315-12.

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

10. Literatur

1. **Anonymous.** 2004. "Recherche Des Matières Protéiques D'origine Végétale Dans Les Vins Et Les Moûts," OIV, *Resolution Oeno 24/2004*. 1-7 (Methode OIV-MA-AS315-12).
2. **Derckel, J. P.; J. C. Audran; B. Haye; B. Lambert and L. Legendre.** 1998. "Characterization, Induction by Wounding and Salicylic Acid, and Activity against *Botrytis cinerea* of Chitinases and Beta-1,3-Glucanases of Ripening Grape Berries." *Physiologia Plantarum*, 104(1), 56-64.
3. **Manteau, S.; B. Lambert; P. Jeandet and L. Legendre.** 2003. "Changes in Chitinase and Thaumatin-Like Pathogenesis-Related Proteins of Grape Berries During the Champagne Winemaking Process." *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(4), 267-72.
4. **Manteau, S. and P. Poinssaut.** 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 TM." *Revue des Œnologues*, 135, 23-27.
5. **Manteau, S.; F.-X. Sauvage; P. Poinssaut; B. Scotti; N. Sieczkowski and M. Moutounet.** 2006. "Haze in White Wine: Involvement of Proteins Other Than Pathogenesis-Related Proteins in Spontaneous Haze," P. Jeandet, C. Clement and A. Conreux, *Macrowine: Macromolecules and Secondary Metabolites of Grape and Wine*. Reims: Intercept Publishers - Lavoisier, 165-68.
6. **Ribéreau-Gayon, J. and E. Peynaud.** 1961. "Précipitation Des Protéines," *Traité D'oenologie. Tome II - Composition, Transformations Et Traitements Des Vins*. Librairie Polytechnique Ch. Béranger, 346-356.
7. **Waters, E.; Y. Hayasaka; D. Tattersall; K. Adams and P. Williams.** 1998. "Sequence Analysis of Grape (*Vitis Vinifera*) Berry Chitinases That Cause Haze Formation in Wines." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4950-57.

Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung

Jean-Marie AURAND