

Hexokinase/Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (HK/G6P-DH)

Aus Hefe/Leuconostoc Überproduzent ATP: D-Hexose 6-Phosphotransferase/
D-Glucose-6-phosphat: NADP 1-Oxidoreductase EC 2.7.1.1/1.1.1.49

Best. Nr. 127 825 15 mg (5 ml)

Best. Nr. 737 275 30 mg (10 ml)

Version 2, Jan. 2003

stabil bei 2-8°C

Produktbeschreibung

Formulierung

Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung, pH ca. 6.

Herstellung

Hergestellt durch Mischen von Hexokinase mit G6P-DH. Das Verhältnis von HK zu G6P-DH liegt bei ca. 2:1 bezüglich des Proteingehaltes.

Volumen-Aktivität

340 U Hexokinase/ml bei 25°C mit Glucose und ATP als Substrat. 170 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase/ml bei 25°C mit Glucose-6-phosphat als Substrat.

Lagerung und Stabilität

Das ungeöffnete Reagenz ist bei 2-8°C bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

Handhabungshinweise

- Der optimale pH für die gekoppelte HK/G6P-DH Reaktionen ist pH 7,6-7,7. Die HK/G6P-DH kann jedoch in Assays von pH 6,6 (Kreatin-Kinase) bis pH 9,5 (D-Sorbitol) eingesetzt werden.
- Für die HK-Reaktion wird Mg^{2+} benötigt. Um eine optimale Aktivität zu erhalten, ausreichend Mg^{2+} zufügen (in der Regel 2,5-4,0 mM) um die HK zu aktivieren, jedoch kein überschüssiges Mg^{2+} zusetzen.
- Keine hohen Konzentrationen an Phosphatpuffer in Assays mit HK/G6P-DH einsetzen, da Phosphat G6P-DH inhibiert (die Assays in der Literatur verwenden typischerweise 20-69 mM Phosphat). Der Ersatz von Phosphat durch einen anderen Puffer (z.B., Triethanolamin) umgeht das Problem.
- Trichloressigsäure (TCA) inhibiert die HK/G6P-DH. Verwenden Sie keine TCA, um Proben zur Bestimmung mit diesen Enzymen zu deproteinieren, sondern verwenden Sie statt dessen Perchlorsäure.

Analysen Information

Roche Qualität Kontrollassay

HK

D-Glucose + ATP $\xrightarrow{\text{HK}}$ Glucose-6-phosphate + ADP

G6P-DH

G6P + NADP⁺ $\xrightarrow{\text{G6P-DH}}$ Gluconate-6-P + NADPH + H⁺

Definition der Enzym-Einheit

Eine Einheit (U) HK phosphoryliert 1 μ mol D-Glucose in 1 min bei 25°C und pH 7,6.
Eine Einheit (U) G6P-DH oxidiert 1 μ mol Glucose-6-phosphat in 1 min bei 25°C und pH 7,6.
Der gekoppelte Assay erzeugt 1 μ mol NADH pro μ mol phosphorylierter D-Glucose.

Spezifität

In der folgenden Tabelle finden Sie die Spezifitäten von HK und G6P-DH.

Parameter	HK	G6P-DH
pI	4.5-4.8	4.6
pH Optimum	7.6-9.0	7.0-8.5 (maximale Aktivität bei 7.8)
Aktivatoren	<ul style="list-style-type: none">• Mg^{2+}• Catecholamine	leichte Aktivierung durch HCO_3^- (≤ 0.3 M)
Stabilisatoren	Thiole	
Inhibitoren	<ul style="list-style-type: none">• Glucose-6-phosphate (G6P) ($K_i = 9.1$ mM; pH 8.0; 25°C)• Lyxose• Sorbose-1-phosphat,• 6-Deoxy-6-fluoro-glucose• EDTA• Thiol-blockierende Reagentien (z.B. Hg^{2+} und 4-chloromercuribenzoat)• Polyphosphate	<ul style="list-style-type: none">• Phosphat ($K_i = 50$ mM)• Pyridoxal-5'-phosphat ($K_i = 0.004-0.006$ mM)• Acetyl-CoA• CoA• NADPH ist ein kompetitiver Inhibitor der NAD-abhängigen Reaktion• ATP ist ein kompetitiver Inhibitor der Reaktion mit NAD oder NADP• Mg^{2+} hebt die Hemmung durch ATP auf

Hexokinase

Ursprung

Aus Hefe

Gleichgewicht

Die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat ist bei 30°C und pH 6,0 stark bevorzugt.

Relative Geschwindigkeit

Hexokinase phosphoryliert die folgenden Substrate (pH 7.5); 30°C

Hinweis: HK benötigt Mg^{2+} ($K_m = 2,6$ mM) zur Aktivität.

Substrat	Relative Geschwindigkeit	K_m
D-Glucose	0,1 mM	1,0
D-Fructose	0,7 mM	1,8
D-Mannose	0,05 mM	0,8
D-Glucosamin	1,5 mM	0,7
2-Desoxy-D-Glucose	0,3 mM	1,0

Hinweis: HK phosphoryliert nicht: L-Arabinose, D-Xylose, D-Lyxose, L-Rhamnose, D-Galactose, Sucrose, Lactose, Maltose, Trehalose, Raffinose und N-Acetyl-D-Glucosamin.

Phosphat-Donor

In der folgenden Tabelle sind die Phosphat-Donoren aufgelistet:

Phosphat Donor	Relative Geschwindigkeit
ATP	1,0 (K_m 0,1 mM)
dATP	0,5
ITP	0,03
UTP	0,004
CTP	0,001
GTP	0,001

Andere Aktivitäten Das Enzym weist eine niedrige Aktivität der XTPase gegenüber ATP, ITP und GTP auf, welche in der Gegenwart einer nicht-phosphorylierbaren Hexose wie D-Xylose erhöht ist.

Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6P-DH)**Ursprung**

D-Glucose-6-phosphat: NAD(P)⁺ 1-oxidoreductase, EC 1.1.1.49

aus *Leuconostoc mesenteroides* und recombinant in *E. coli*

Gleichgewichtskonstante

Die Oxidation (Vorwärts- Reaktion) ist stark bevorzugt.

Specificität, K_m und relative Geschwindigkeit

(pH 7,8; 25° C) G6P-DH aus *Leuconostoc* (LG6P-DH) ist hoch spezifisch für D-Glucose-6-phosphat (K_m = 36 μ M, NADP als Coenzym; 64 μ M, NAD als Coenzym), aber benötigt entweder NADP (K_m = 7,4 μ M; relative Geschwindigkeit = 1,0) oder NAD (K_m = 115 μ M; relative Geschwindigkeit = 1,8) als Coenzym.

LG6P-DH reagiert nicht mit:

- Fructose-6-phosphat
- Fructose-1,6-bisphosphat,

Hinweis: LG6P-DH oxidiert 2-Deoxy-Glucose-6-phosphat mit NADP, aber nicht mit NAD, als Coenzym. Mit D-Glucose findet eine langsame Reaktion statt.

- Glucose-1-phosphat
- Ribose-1-phosphat.

Enzymstruktur und Mr

LG6P-DH (Mr \approx 110 000) ist ein Dimer.

Extinktion des gereinigten Enzyms

1,15 (1 mg Enzym/ml, 280,5 nm)

Umsatzzahl

$3,2 \times 10^4$ mol Substrat/mol Enzym/min (NADP als Coenzym)

Literatur

- 1 Kunst, A., Draeger, B. & Ziegenhorn, J. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis
- 2 (Bergmeyer, H.U., ed), 3rd Ed, Vol. 6, pp. 163-172, VCH, Weinheim, W. Germany-Deerfield
- 3 Beach, FL.
- 4 Beutler, H-O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis Vol. 6, pp. 321-327.
- 5 See reference 1.
- 6 Heaney, R.K. & Fenwick, G.R. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis Vol. 6, pp.
- 7 See reference 1.
- 8 Keppler, D. & Decker, K. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis Vol. 6, pp. 11-17.
- 9 See reference 1.
- 10 Beutler, H-O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis Vol. 6, pp. 119-126.
- 11 See reference 1.
- 12 Gawehn, K. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis Vol. 6, pp. 262-267. See ref 1.
- 13 Supp, M. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis Vol. 6, pp. 268-271. See reference 1.
- 14 Beutler, H-O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis Vol. 6, pp. 356-362.
- 15 See reference 1.
- 16 Beutler, H-O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis Vol. 6, pp. 2-10. See ref 1.
- 17 Outlaw, W.H., Jr. & Tarczynski, M.C. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis Vol. 6, pp. 96-103. See ref 1.

www.roche-applied-science.com/pack-insert/0127825b.pdf



Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany