

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 | <ul style="list-style-type: none"> 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 Mg²⁺ benötigt. Um eine optimale Aktivität zu erhalten, ausreichend Mg²⁺ zufügen (in der Regel 2,5-4,0 mM) um die HK zu aktivieren, jedoch kein überschüssiges Mg²⁺ 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 µmol D-Glucose in 1 min bei 25° C und pH 7,6.
Eine Einheit (U) G6P-DH oxidiert 1 µmol Glucose-6-phosphat in 1 min bei 25° C und pH 7,6.
Der gekoppelte Assay erzeugt 1 µmol NADH pro µmol 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"> Mg²⁺ 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 Sorbitose-1-phosphat, 6-Deoxy-6-fluoro-glucose EDTA Thiol-blockierende Reagentien (z.B. Hg²⁺ 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 Mg²⁺ 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 Mg²⁺ (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-DG 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