J. Exp. Biomed. Sci. 11 (2005) 327-332

Hexose Uptake and Kinetic Properties of the Endogenous Sugar Transporter(s) in *Spodoptera frugiperda* Clone 21-AE Cells

Chong-Kee Lee†

Department of Immunology, School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu 705-718, Korea

Sf21 cells become popular as the host permissive cell line to support the baculovirus AcNPV replication and protein synthesis. The cells grow well on TC-100 medium that contains 0.1% D-glucose as the major carbon source, strongly suggesting the presence of endogenous glucose transporters. However, unlike human glucose transporters, very little is known about the characteristics of the endogenous sugar transporter(s) in Sf21 cells. Thus, some kinetic properties of the sugar transport system were investigated, involving the uptake of 2-deoxy-D-glucose (2dGlc). In order to obtain a true measure of the initial rate of uptake, the uptake of [^{3}H]2dGlc from both low (100 μM) and high (10 mM) extracellular concentrations was measured over periods ranging from 30 sec to 30 min. The data obtained indicated that the uptake was linear for at least 2 min at both concentrations, suggesting that measurements made over a 1 min time course would reflect initial rates of the hexose uptake. To determine K_m and V_{max} of the endogenous glucose transporter(s) in Sf21 cells, the uptake of 2dGlc was measured over a range of substrate concentrations (50 μM~10 mM). 2dGlc uptake by the Sf21 cells appeared to involve both saturable and non-saturable (or very low affinity) components. A saturable transport system for 2dGlc was relatively high, the K_m value for uptake being < 0.45 mM. The V_{max} value obtained for 2dGlc transport in the Sf21 cells was about 9.7-folds higher than that reported for Chinese hamster ovary cells, which contain a GLUT1 homologue. Thus, it appeared that the transport activity of the Sf21 cells was very high. In addition, the Sf21 glucose transporter was found to have very low affinity for cytochalasin B, a potent inhibitor of human erythrocyte glucose transporter

Key Words: Sf21 cells, Insect cell transporter, Hexose uptake, Cytochalasin

서 론

대부분 포유동물에 있어 당 (sugar) 특히 포도당 (glucose)의 세포내 영입은 passive glucose transporter (GLUT1-7)에 의해 이루어지며 prototype인 사람 적혈구형 포도당 수송체인 GLUT1은 이러한 형태의 잘 알려진 단백질 중 하나이다 (Baldwin 1993; Bell et al., 1993). 최근 유전공학의 발달로 인해 박테리아를 포함한 미생물과 포유동물들에 존재하는 당 수송체 (sugar transporter)들의 염기서열 (Mueckler et al., 1985; James et al., 1989)들이 밝혀지고 있고 있으며 또한, 이들 당 수송체들의 염기서열은 상동성을 가지는 커다란 당 수송체 집단 (sugar transporter family)을 구성하고 있음을 보여 주었다 (Baldwin and Henderson, 1989; Baldwin 1993; Wood and Trayhurn, 2003). 이는 이들 당 수송체들이 공동의 조상으로부터 진화하였음을 암시하고 있으며 집단 중 어느 한 수송체의 당 수송 기전이나, 삼차원적인 구조를 정확히 밝혀 낼 수 있다면 당의 세포내 영입을 주도하는 당 수송체에 관한 귀중한 연구 자료로서 당뇨병의 치료 및 예방에도 큰 도움이 될 수 있을 것이다.

생리적 중요성에도 불구하고 적혈구형 포도당 수송체는 세포막내에 적은 양으로 존재하고 있어 이들의 구조와 기능의 상관관계를 위한 유전공학적 연구, 삼차원적 구조 분석을 위한 결정화 (crystallization)와 같은 생물리학적 연구에 심각한 장애가 되고 있으며 또한, 이들 포도당 수송체의 정제 시에는 nucleoside 수송체와 같은 물질의 오염 (Jarvis and Young, 1981)으로 인해 순수한 포도당 수송체만을 분리, 정제하기가 쉽지 않다. 이러한 연유로 인하여 당 수송체들을 *E. coli* (Sarkar et al., 1988; Thorens et al., 1988), *Xenopus* oocytes (Gould and Lienhard, 1989; Keller et al., 1989), mammalian cells (Asano et al., 1989; Gould et al., 1989; Harrison et al., 1990), transgenic

*논 문 접 수: 2005년 7월 25일
수정재접수: 2005년 8월 31일
†교신저자: 이종기, (우) 705-718 대구광역시 남구 대명4동 3056-6, 대구가톨릭대학교 의과대학 면역학교실
Tel: 053-650-4477, Fax: 053-650-4477
e-mail: leeck@cu.ac.kr

mice (Liu et al., 1992) 등의 유전공학적 방법을 이용하여 많은 양을 생산 하고자 노력해 왔으나 포도당 수송체와 같은 막 단백질 (membrane proteins)들이 갖는 특성으로 인해 단지, 소량의 기능성 있는 단백질 발현만을 보여주었다.

최근에는 이러한 목적을 성취하기 위한 수단으로 baculovirus expression system이 사용되었으며 고무적인 결과를 보여주었다 (Yi et al., 1992; Cope et al., 1994; Lee, 2002). 그러나 발현된 GLUT1 단백질이 포도당을 수송할 수 있다는 직접적인 증거는 이성질적 발현을 허용한 숙주세포에 내재하는 당 수송체의 활동으로 인하여 보여주지 못했다. Baculovirus의 복제와 단백질 합성을 위한 숙주세포로 이용되는 *Spodoptera frugiperda* (Sf) 세포는 주 탄소 원으로 0.1% D-glucose가 함유된 TC-100와 같은 배지에서 잘 자라는데 (Summers and Smith, 1987) 이것은 Sf 세포에도 glucose transporters가 존재하고 있다는 사실을 암시하고 있다. 그러나 현재까지 *Spodoptera frugiperda* 21-AE (Sf21) 세포의 당 수송체 특성에 관해서는 거의 알려진 바가 없다. 따라서 baculovirus와 Sf21 세포를 이용한 당 수송체의 효율적인 이성질적 발현을 위해서는 숙주세포에 내재하는 당 수송체의 생물학적 특성에 관한 보다 많은 연구가 반드시 필요한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 최근 막 단백질의 이성질적 발현에 이용되어지는 Sf21 세포에 내재하는 당 수송체의 육탄당 uptake와 kinetic 특성에 관해 조사하였다.

재료 및 방법

1. Sf21 세포의 배양

Sf21 세포는 Summers와 Smith (1987)의 방법에 따라 완전한 TC-100 medium (Gibco)에 10% FCS, 1% of antibiotics (penicillin 5,000 units/ml + streptomycin 5,000 μg/ml, Gibco-BRL)를 첨가하여 27~28℃에서 CO_2없이 배양하였다. 세포 생존 능력은 0.1 ml trypan blue (0.4% stock, pH 3.0)를 1 ml 세포에 첨가하여 현미경 아래서 관찰하여 이용하였다.

2. Sf21 세포의 plasma membranes 준비

Sf21 세포는 위에서와 같이 배양하였다. 세포는 배양 4~5일 후 수거하여 세 번 세척액 (10 mM-sodium phosphate/150 mM-NaCl, pH 7.2)으로 씻었다. 그 후 단백분해효소 억제제 (2 mM-iodoacetamide, 0.2 mM-phenylmethanesulphonyl fluoride, pepstatin A (10 g/ml)들을 함유하는 부양액 (10 mM-Tris/5 mM-$MgCl_2$, pH 7.4)으로 0℃에서, 1분간 sonication하여 117,000 g_{av}로 1시간 동안 원심 분리하여 soluble fraction으로부터 membrane fraction을 분리하였다.

3. Hexose transport assay

사용된 tritiated sugars들은 2-(1,2-^{3}H)-deoxy-D-glucose (30.2 Ci/mmol)와L-[1-^{3}H(N)]-glucose (10.7 Ci/mmol, NEN)이다. Sf-21 세포의 2-deoxy-D-glucose (2dGlc) uptake 측정을 위해서는 측정 전 두 번 phosphate-buffered saline (PBS, 10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4)으로 Sf21 세포를 씻어 배양액 속에 잔류된 포도당을 제거하였고 필요할 때 까지 얼음에 보관하였다가 사용하였다. Hexose transport assay는 간략히 설명하면 1 ml 세포 현탁액 (1×10^6 cells/ml PBS)을 6,000 × g에서 15초 동안 원심 분리하여 150 μl의 PBS 용액에 다시 현탁 시켰다. 그 후 28℃에서 2분간 배양하였다. Transport는 최종 당 농도 1 mM 주기 위해 1 μCi tritiated sugar를 함유하는 2.5 mM 2dGlc 또는 L-glucose 100 μl를 첨가하면서 시작되었다. 28℃에서 1분간 배양 후 강력한 glucose transport 저해제인 10 μM cytochalasin B와 0.1 mM phloretin을 함유한 얼음에 차게 한 1 ml PBS를 첨가하고 2,000 x g에서 20초간 원심분리하여 transport assay를 끝마쳤다. 세포들은 위와 같은 방법으로 두 번 더 세척하여 10% SDS 200 μl에 vortexing하여 용해하였다. 마지막으로 150 μl의 용해된 세포를 Microman pipette을 이용하여 4 ml의 scintillant 용액이 담긴 용기에 넣고 liquid scintillation counter (Bookman LS 5,000 CE)를 이용하여 방사능을 측정하였다. 모든 결과들은 세 번 측정치의 (평균보다 10% 이하의 차이) 평균값으로 표시하였다.

4. Cytochalasin B binding assay

Cytochalasin B binding은 Sf21 세포에 내재하는 glucose transporter(s)를 위한 functional assay로서 이용하였다. Zoccoli 등의 방법에 따라 (1978) 농도 40 nM의 [4-^{3}H] cytochalasin B를 사용하여 평형투석법 (equilibrium dialysis)으로 측정하였다.

결 과

1. Hexose uptake에 대한 time course

Sf21 세포의 육탄당 수송 특성을 조사하기 위하여 2-(1,2-^{3}H)-deoxy-D-glucose (2dGlc)을 사용하였다. 세포내 당의 섭취가 일직선 (linear) 상에 있는 기간을 결정하기 위해 낮은 (100 μM) extracellular 농도 (Fig. 1)와 10 mM의 높은 extracellular 농도 (Fig. 2)에서 2dGlc의 섭취를 30초에서 30분에 걸친 기간 동안 측정하였다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 낮은 농도에서 적어도 2분 동안은 당 섭취가 linear 하였다. 또한 Fig. 2의 높은 (10 mM) extracellular 농도에서 조차도 적어도 2분 동안은 당 섭취가 Fig. 1과 같이 linear 하였다. 따라서 1분간에 걸친 당 섭취 측정 (uptake measurement)은 세포의 육탄

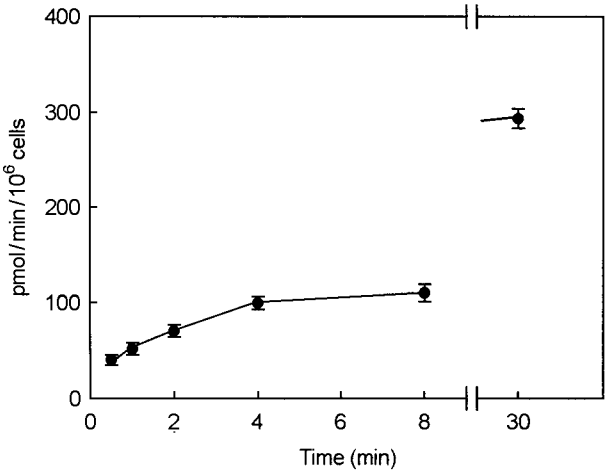

Fig. 1. Time course of 2-deoxy-D-glucose uptake by Sf21 cells from a low extracellular concentration of sugar. Transport was carried out in the presence of 100 μM 2dGlc, as described in Materials and Methods. After the times indicated, uptake was terminated and the radioactivity accumulated was determined by scintillation counting. Each data point on the graph represents the mean of triplicate estimations. The data was corrected for the zero time uptake and converted into pmol/min/10^6 cells. The data points representing for some time intervals (9~29 min) were omitted for convenience.

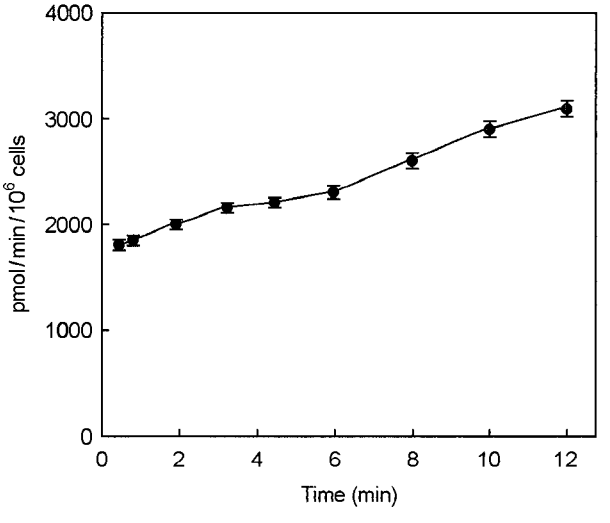

Fig. 2. Time course of 2-deoxy-D-glucose uptake by Sf21 cells from a high extracellular concentration of sugar. Transport was carried out in the presence of 10 mM 2dGlc, as described in the Materials and methods. Each data point on the graph represents the mean of triplicate estimations. The data was corrected for the zero time uptake and converted into pmol/min/10^6 cells.

당 초기 섭취 율을 반영하는 것임을 제시하였다.

2. Sf21 cell sugar transporter의 kinetic parameters

Sf21 세포에 내재하는 당 수송체의 K_m (the half-saturation concentration)과 V_{max} (the maximum velocity)를 결정하기 위

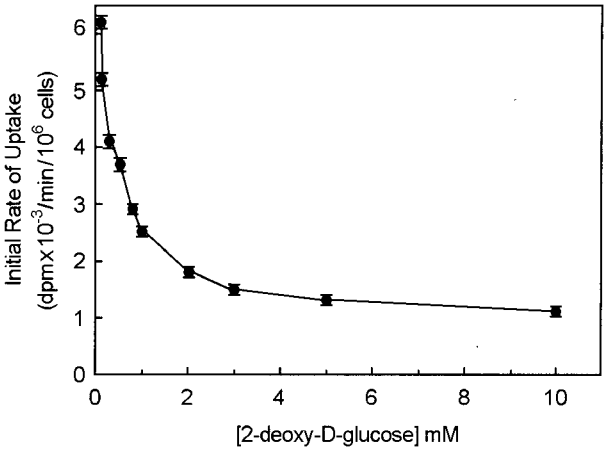

Fig. 3. Uptake of 2-deoxy-D-glucose in Sf21 cells. Transport was carried out as described in Materials and Methods. Shown is a representative experiment in which increasing concentrations of 2dGlc were added to the extracellular medium of the cells. The concentration of radiolabelled 2dGlc used was held constant. Each data point is the mean of triplicate estimations. The K_m for 2dGlc transport was determined as described in the text.

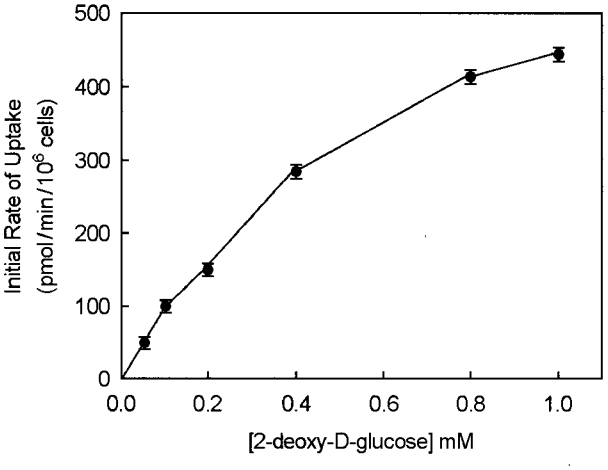

Fig. 4. Determination of the maximal rate of transport (V_{max}). The V_{max} was determined as described in the text. The curve was produced by using the data points upto 1 mM of 2dGlc, which approach saturation. Each data point on the graph represents the mean of triplicate estimations.

하여 실험 방법에 안내된 hexose transport assay 방법에 따라 50 μM~10 mM에 이르는 기질 농도 범주 내에서 2dGlc 섭취를 측정하였다. Fig. 3~5에 나타난 결과에서 Sf21 세포의 2 dGlc uptake는 포화시킬 수 있는 (saturable) 성분 (Fig. 3 and 4)과 포화시킬 수 없는 (non-saturable) 또는 매우 낮은 친화성의 성분 (Fig. 5) 둘 다를 포함하는 것으로 나타났다. 이와는 대조적으로 포유동물의 포도당 수송체의 기질이 아닌 [1-^{3}H]L-glucose 섭취에서는 단지 포화시킬 수 없는 성분만을 포함하는 것으로 나타났다 (Fig. 6). 그러나 uptake의 포화

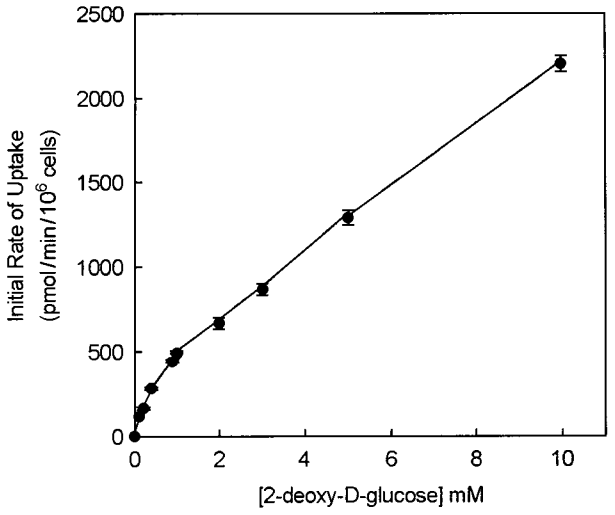

Fig. 5. Determination of the maximal rate of transport (V_{max}). The V_{max} was determined as described in the text. The curve was produced by using the data points at high concentrations (> 1 mM) of 2dGlc. The line drawn through experimental points at high concentrations (> mM) of substrate is straight and represents the non-saturable component. Each data point on the graph represents the mean of triplicate estimations.

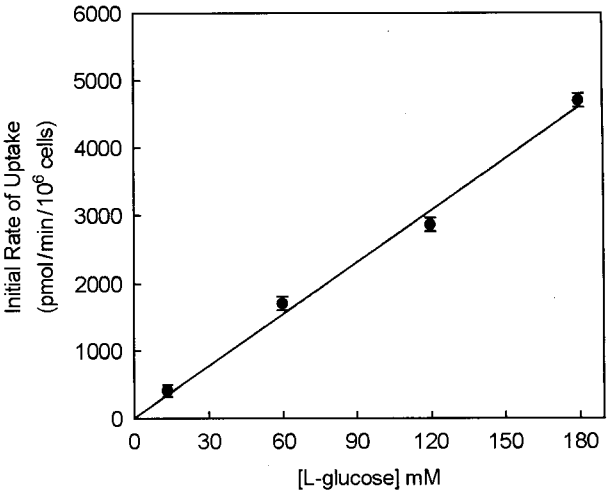

Fig. 6. Transport of [^{3}H]L-glucose by Sf21 cells. Uptake was carried out as described in the Materials and Methods. Shown is a representative experiment in which increasing concentrations of L-glucose were added to the extracellular medium of the cells. Each data point is the mean of triplicate estimations.

시킬 수 없는 성분에 대한 2dGlc transport 자료에 대한 교정 수단으로서의 L-glucose 사용은 L-sugar의 보다 큰 친수성과 같은 L-glucose와 2dGlc와 사이의 화학적 차이점으로 인해 배제하였다. 그 대신에 transport에 대한 K_m과 V_{max}는 아래의 두 방정식과 non-linear regression program인 ENZFITTER (Elsvier Biosoft, UK)를 이용하여 평가하였다:

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} + M \cdot S \qquad (1)$$

V = uptake 속도, S = 기질 농도, M = uptake process의 non-saturable component를 설명하는 상수

$$V_I = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m \cdot (1 + I/K_i) + S} + M \cdot S \qquad (2)$$

V_I = inhibitor 존재 하에서 uptake 속도, I = inhibitor 농도, K_i = inhibition 상수 그리고 다른 기호들은 방정식 (1)에서 설명되었다. Uptake 실험에서 방사성 표지된 당 (radiolabeled sugar)의 농도는 달랐다. Fig. 3은 radiolabel uptake에 대한 unlabeled sugar 농도의 결과적 도표이다. K_m은 이 자료들을 ENZFITTER를 이용 방정식 (2)를 통하여 얻어졌다. 그 결과 unlabeled sugar에 대한 apparent K_i 이자 2dGlc uptake에 대한 K_m은 376±36 μM이었다. V_{max}는 2dGlc uptake의 초기 속도에 대한 기질 농도에 대한 자료 (Fig. 4)와 높은 농도에서의 2dGlc curve slope 자료 (Fig. 5)를 ENZFITTER를 활용하여 계산하였다. 얻어진 V_{max}는 416±25 pmol/min/10^6 cells 이었다.

Table 1. Cytochalasin B binding to Sf21 cell membranes

Sample (1mg/ml)	Cytochalasin B (B/F)		
	(−) D-Glucose	(+) D-Glucose	*Specific B/F
Sf21-AE cells membranes	0.052	0.051	0.001
Erythrocyte membranes	8.048	0.425	7.623

Membranes of Sf21 cell were prepared as described in the Materials and Methods. The assay for cytochalasin B binding activity of membrane samples was performed by equilibrium dialysis using 40 nM-[^{3}H]cytochalasin B, in the absence (−) or presence (+) of 400 mM D-glucose, as described in Zoccoli et al (1978). Cytochalasin B binding activity (*) was calculated as described previously (Gorga and Lienhard, 1981). B/F = [bound cytochalasin B] / [free cytochalasin B]

3. Cytochalasin B binding to Sf21 cell membranes

Cytochalasin B binding은 GLUT1의 강력한 저해제이다. 평형투석 (equilibrium dialysis) 방법 (Zoccoli et al., 1978; Baldwin et al., 1982)을 이용하여 농도 40 nM의 cytochalasin B를 사용하여 3번씩 측정 하였다. Bound cytochalasin B에 대한 Free cytochalasin B의 비율 (B/F)은 기능성 있는 당 수송체 농도 측정에 좋은 척도가 될 수 있다 (Gorga and Lienhard, 1981). Table 1에 요약된 바와 같이 Sf21 세포에 대한 cytochalasin B 결합 활성은 1 mg/ml 시료 당 0.001 이었고 GLUT1을 함유

하는 대조군에서는 7.623으로 나타났다.

고 찰

단백질 결정화와 같은 생물리학적인 방법을 이용한 구조적 연구나 유전공학적인 방법을 이용한 당 수송체의 구조와 기능의 상관관계에 관한 연구 등과 같이 비교적 많은 양의 단백질이 필요한 경우를 위해 당 수송 단백질들의 이성질적 대량 발현을 위한 노력은 지속되고 있으며, 그 노력의 일환으로 baculovirus와 Sf와 같은 곤충세포를 이용한 이성질적 단백질 발현법이 최근 활용되고 있다 (Yi et al., 1992; Cope et al., 1994; Lee, 2002). 그러나 기능성 있는 비교적 많은 양의 GLUT1 발현에도 불구하고 Sf 세포에 발현된 GLUT1의 실제적 당 수송 능력은 직접적으로 보여 주지는 못하였다. 그 이유는 Sf 세포가 주 탄소 원으로 0.1% D-glucose가 함유된 배지에서 잘 자라게 해주는, Sf 세포에 내재하고 있는 왕성한 sugar transport system이 존재하고 있다는 사실 때문 이었다 (Yi et al., 1992; Cope et al., 1994; Lee, 2002). 그러나 현재까지도 Sf와 같은 곤충세포의 당 수송체 특성에 관해서는 알려진 바가 거의 없으며 특히 최근에 막 단백질의 발현도가 높은 것으로 알려진 Sf21 세포의 당 수송체에 관해서도 전혀 알려진 바가 없다. 따라서 baculovirus를 이용한 GLUT의 이성질적 발현을 위한 성공적 체계 구축을 위해서는 Sf 세포의 당 수송체 특성에 관한 연구는 필수적이다.

Baculovirus의 replication과 단백질 발현을 허용하는 Sf21 세포의 육탄당 uptake의 특성을 알아보기 위해 [^{3}H]2dGlc를 사용하였다. 육탄당 uptake 실험은 1분간 측정하였는데 그 이유는 100 μM의 낮은 농도에서나 10 mM의 높은 extracellular 농도에서도 2dGlc의 Sf21 세포내 영입이 적어도 2분간은 linear 함을 보여주었기 때문이다. 이는 1분간 측정된 육탄당 uptake 실험은 Sf21 세포의 육탄당 섭취의 initial rate를 반영하고 있기 때문이다. 이러한 전제를 뒷받침 해주는 또 하나의 사실은 radioactivity uptake와 산정된 Sf21 세포의 intracellular volume을 이용하여 계산되어지는 당의 세포내 농도 (intracellular concentration)를 당의 세포 밖 농도와 비교해 봄으로서도 알 수 있다. 그 예로서, 100 μM 당의 uptake가 조사 되었을 때 계산된 당의 세포내 농도는 uptake가 시작된 지 12분 후 까지도 세포외 당 농도의 15% 이하였다는 사실도 Sf21 세포의 1분간의 육탄당 transport는 육탄당 uptake의 참된 initial rate를 반영함을 보여주었다. 표지되지 않은 당 (unlabeled sugar)의 apparent K_i에 해당하는 얻어진 2 dGlc uptake에 대한 K_m은 GLUT1 상동체를 함유하는 Chinese hamster ovary 세포에서 계산되어진 K_m 보다 약 1.42배 낮았으며 Sf21 세포내 당 수송체의 V_{max}는 약 9.72배 높았다 (Ishihara et al., 1991). 따라서 Sf21 세포의 당 수송체 활동은 매우 높은 것으로 나타났다. 그러나 Sf21 포도당 수송체는 사람 적혈구형 포도당 수송체의 강력한 inhibitor인 cytochalasin B에 대해서는 친화성이 매우 낮은 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구의 수행에 도움이 된 영국 NERC의 연구 지원에 진심으로 감사드립니다.

REFERENCES

Asano T, Shibasaki Y, Ohno S, Taira H, Lin JL, Kasuga M, Kanazawa Y, Akanuma Y, Takaku F, Oka Y. Rabbit brain glucose transporter responds to insulin when expressed in insulin-sensitive Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem. 1989. 264: 3416-3420.

Baldwin SA. Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. Biochim Biophys Acta. 1993. 1154: 17-49.

Baldwin SA, Baldwin JM, Lienhard GE. Monosaccharide transporter of the human erythrocyte: Characterization of an improved preparation. Biochemistry 1982. 21: 3836-3842.

Baldwin SA, Henderson PJF. Homologies between sugar transporters from eukaryotes and prokaryotes. Annu Rev Physiol. 1989. 51: 459-471.

Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. J Biol Chem. 1993. 268: 19161-19164.

Cope DL, Holman GD, Baldwin SA, Wolstenholme AJ. Domain assembly of the GLUT1 glucose transporter. Biochem J. 1994. 300: 291-294.

Gorga FR, Lienhard GE. Equilibria and kinetics of ligand binding to the human erythrocyte glucose transporter. Evidence for an alternating conformation model for transport. Biochemistry 1981. 20: 5108-5113.

Gould GW, Derechin V, James DE, Tordjiman K, Ahern S, Gibbs EM, Lienhard GE, Mueckler M. Insulin-stimulated translocation of the HepG2/erythrocyte-type glucose transporter expressed in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem. 1989. 264: 2180-2184.

Gould GW, Lienhard GE. Expression of a functional glucose transporter in *Xenopus* oocytes. Biochemistry 1989. 28: 9447-9452.

Harrison SA, Buxton JM, Clancy BM, Czech MP. Insulin regulation of hexose transport in mouse 3T3-L1 cells expressing the human HepG2 glucose transporter. J Biol Chem. 1990.

265: 20106-20116.

Ishihara H, Asano T, Katagiri H, Lin JL, Tsukuda K, Shibasaki Y, Yazaki Y, Oka Y. The glucose transport activity of GLUT1 is markedly decreased by substitution of a single amino acid with a different charge at residue 415. Biochem Biophys Res Commun. 1991. 176: 922-930.

James DE, Strobe M, Muecler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. Nature 1989. 338: 83-87.

Jarvis SM, Young JD. Extraction and partial purification of the nucleoside-transport system from human erythrocytes based on the assay of nitrobenzylthioinosine-binding activity. Biochem J. 1981. 194: 331-339.

Keller K, Strube M, Mueckler M. Functional expression of the human HepG2 and rat adipocyie glucose transporters in xenopus oocytes. J Biol Chem. 1989. 32: 18884-18889.

Lee CK. Photoaffinity labelling of the human erythrocyte glucose transporters expressed in *Spodoptera frugiperda* clone 9 cells. J Biomed Lab Sci. 2002. 8: 211-215.

Liu ML, Olson AL, Moye-Rowley WS, Buse JB, Bell GI, Pessin JE. Expression and regulation of the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter gene in transgenic mice. J Biol Chem. 1992. 267: 11673-11676.

Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF. Sequence and structure of a human glucose transporter. Science 1985. 229: 941-945.

Sarker HK, Thorens B, Lodish HF, Kaback HR. Expression of the human erythrocyte glucose transporter in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA. 1988. 85: 5463-5467.

Summers MD, Smith GE. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Tex Agric Exp Stn Bull. 1987. No. 1555.

Thorens B, Sarker HK, Kaback HR, Lodish HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and β-pancreatic islet cells. Cell 1988. 55: 281-290.

Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): Expanded families of sugar transport proteins. Br J Nutr. 2003. 89: 3-9.

Yi CK, Charalambous BM, Emery VC, Baldwin SA. Characterization of functional human erythrocyte-type glucose transporter expressed in insect cells using a recombinant baculovirus. Biochem J. 1992. 283: 643-646.

Zoccoli MA, Baldwin SA, Lienhard GE. The monosaccharide transport system of the human erythrocyte. Solubilization and characterization on the basis of cytochalasin B binding. J Biol Chem. 1978. 253: 6923-6930.