中国科学: 生命科学 2010 年 第 40 卷 第 9 期: 853 ~ 858
SCIENTIA SINICA Vitae www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

论 文

# 肝癌细胞分泌蛋白质的多种提取方法比较

曹晶[①], 沈诚频[①], 张军[①], 姚鋆[①], 申华莉[①], 刘银坤[①②], 陆豪杰[①], 杨芃原[①*]

① 复旦大学化学系/生物医学研究院, 上海 200032;
② 复旦大学附属中山医院肝癌研究所, 上海 200032
* 联系人, E-mail: pyyang@fudan.edu.cn

收稿日期: 2010-06-11; 接受日期: 2010-08-30
国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA02A308)资助项目

**摘要** 由于分泌蛋白在重大生理和病理过程中的重要角色和功能, 使得分泌蛋白质组的研究备受人们关注. 高效提取分泌蛋白质是分泌蛋白质组学研究的第一步, 也是关键的一步. 本研究首次比较了 3 种常用的提取方法: 超滤法、沉淀法和透析法. 以具有高自发性转移潜能的人肝癌细胞系 LM3 为研究对象, 采用 3 种方法平行提取分泌蛋白, 发现超滤法的提取效率最高; 蛋白质经过溶液酶解, 在线的一维反相高效液相色谱分离和 ESI-MS/MS 质谱鉴定, 共鉴定了 360 个非冗余蛋白, 其中有 34, 110 和 29 个蛋白分别只在超滤法、沉淀法和透析法提取的样品中被鉴定到, 沉淀法占优势, 3 种方法互相补充. 360 个蛋白中, 有 42 个分泌蛋白为首次被鉴定到, 扩大了已有的人肝癌转移细胞分泌蛋白数据库.

**关键词**
肝癌
分泌蛋白
蛋白提取
超滤
沉淀
透析
LC-MS/MS

分泌蛋白参与细胞信号的传导、细胞间的相互作用, 细胞增殖、分化和凋亡的调控、生物体的发育等重要生命过程[1~3]. 分泌蛋白质还在癌细胞侵袭和转移过程中发挥重要作用[4~6]. 因此, 分泌蛋白质组学研究备受人们的关注. 分泌蛋白的全息化提取是分泌蛋白质组学研究的第一步, 也是关键的一步. 但是由于分泌蛋白质存在的条件培养基体系是一个含高浓度的盐离子和各类氨基酸的大体积溶液体系, 大部分的分泌蛋白的浓度都很低, 因此, 分泌蛋白质的提取一直是一个研究难题. 目前, 常用的提取分泌蛋白的方法为超滤法[7~9], 是用含有 5 或 3 kD 滤膜的超滤管进行离心超滤以浓缩蛋白质; 沉淀法[10~12]包括用乙醇、丙酮或三氯乙酸等有机物进行蛋白质沉淀; 透析法[13~15]: 培养基用 5 或 3.5 kD 的透析袋进行透析, 再将溶液冷冻干燥. 目前, 3 种方法都被广泛应用, 方法各有优缺点. 在选择一种方法时, 有过对另外两种方法缺点的表述, 但至今未对 3 种方法进行实验比较. 本研究以复旦大学中山医院肝癌研究所建立的具有高自发性转移潜能的人肝癌细胞系 HCCLM3 (简称 LM3)[16]为研究对象, 比较了这 3 种提取方法的差异.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

与细胞培养相关: 高糖 DMEM 培养液为 GIBCO 公司产品, 胎牛血清为 Hyclone 公司的特级胎牛血清; 细胞培养瓶、无菌吸管等其他耗材购自上海普飞生物科技公司. 与浓缩纯化分泌蛋白相关: 三氯乙酸(TCA)、四氢呋喃(THF)和月桂酰肌氨酸钠盐(NLS)为

英文引用格式: Cao J, Shen C P, Zhang J, et al. Comparison of alternative extraction methods for secretome profiling in human hepatocellular carcinoma cells (in Chinese). SCIENTIA SINICA Vitae, 2010, 40: 853—858, doi: 10.1360/062010-409

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/zc2010-40-9-853

Sigma 公司产品; 3 kD 型 15 mL 超滤管为 Millipore 公司产品; 透析袋(3.5 kD, Spectrum, CA, USA)购自上海绿岛科技发展有限公司. Bradford 工作液和 BSA 试剂盒为 Bio-Rad 公司产品. 与 SDS-PAGE 相关: 三羟基甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT)、尿素、甘氨酸和溴酚兰为 Amresco(USA)产品; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)为 Amersham Biosciences 公司产品; 甘油为国产分析纯. 与免疫印迹相关: ECL 免疫印迹试剂盒为 GE 公司产品; 小鼠抗人 β-tubulin 单克隆抗体和辣根过氧化物酶偶联的兔抗小鼠二抗为 Abcam 公司产品; 南山牌脱脂奶粉; 三羟基甲基氨基甲烷(Tris)和甘氨酸为 Amresco(USA)产品; Tween-20, 甲醇, 氯化钠, 盐酸为国产分析纯. 与蛋白溶液酶解和液质联用相关: 乙腈(ACN, 高效液相色谱纯)为德国 Merck 公司产品, 甲酸(色谱纯)和碘乙酰胺(IAA)为 Fluka(Switzerland)产品. 二硫苏糖醇(DTT)为 Amresco(USA)产品; 胰蛋白酶(Proteomics Sequencing Grade Modified Trypsin)为 Sigma 公司产品. 实验中所用水为 Milli-Q 去离子水, 18 MΩ·cm. LM3 细胞系来自中山医院肝癌研究所.

### 1.2 仪器设备

Eppendorf 冷冻离心机购于 Eppendorf 公司; Beckman 超离机(Beckman 公司); 真空冷冻干燥机为德国 Christ 产品; 荧光与化学发光成像系统为富士公司生产的 Las 3000; 色谱 LC-20AD system (Shimadzu, Tokyo, Japan); 10 cm 反相色谱柱(75 μm 内径, New Objective, Woburn, USA); LTQ-Orbitrap 质谱仪(Thermo Electron, Bremen, Germany); NanoESI (Michrom Bioresources, Auburn, USA).

### 1.3 细胞培养

人肝细胞癌细胞系 LM3 在含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中传代培养. 培养至密度 60%~70%[17], 弃去培养基, 用 DPBS 轻轻洗涤 2 遍, 再用条件培养基(无血清无酚红)轻轻洗涤 2 遍, 最后加入条件培养基培养, 24 h 后收集培养基.

### 1.4 分泌蛋白质的提取

以下操作均在 4℃下完成. 收集培养基, 1000×*g* 离心 5 min, 收集上清; 100000×*g* 超速离心 1 h, 收集上清. 采用下面 3 种方法提取分泌蛋白.

(1) 超滤法. 将纯化后的培养基装入含 3 kD 超滤膜的 15 mL 超滤管中进行离心超滤, 使培养基浓缩到 700 μL(超滤管可以浓缩到的最小体积).

(2) 沉淀法. 采用 Chevallet 等人[18]优化的沉淀法. 在纯化好的培养基上清中加月桂酰肌氨酸钠盐, 终浓度 0.5%; 再加 TCA, 终浓度 12%, 静置至少 2 h; 10000×*g* 离心 10 min, 弃去上清; 加 2 mL 预冷好的四氢呋喃(THF), 振荡, 使沉淀完全溶解; 10000×*g* 离心 10 min, 弃去上清; 重复加 THF 离心一次; 最后用裂解液(8 mol/L 尿素)溶解蛋白, 用水浴超声助溶.

(3) 透析法. 将培养基装入透析袋内, 在装满超纯水的大烧杯中透析, 开始时每隔 0.5 h 更换一次, 后来更换透析液的时间适当延长, 时间总计 48 h 左右, 回收样品, 冷冻干燥.

采用常用的 Bradford 法测定各种方法提取到的蛋白含量, –80℃保存备用.

### 1.5 免疫印迹分析

用免疫印迹技术鉴定所得分泌蛋白的纯度. 方法是检测细胞全蛋白和分泌蛋白质组分中 β-tubulin 的表达. 具体方法是细胞全蛋白和分泌蛋白各上样 30 μg, 经 SDS-PAGE 分离和转膜后, 用小鼠抗人 β-tubulin 单克隆抗体孵育, 二抗为辣根过氧化物酶偶联兔抗小鼠, 用 GE 公司的 ECL-免疫印迹试剂盒显色, 采用富士公司生产的 Las 3000 成像.

### 1.6 蛋白质的溶液酶解

将提取的分泌蛋白进行溶液酶解, 基本操作参考本研究组常用方法[19].

### 1.7 液相色谱-质谱分析(LC-MS)

将冻干的肽段重溶于 A 液(5%ACN, 01%FA)中, 进行在线液质联用分析. 反相色谱柱采用一根 MagicTM C18 柱(内径为 75 μm, 柱长为 10 cm, 填料粒径为 5 μm). 流动相 B 液(5%ACN, 01%FA), 流速为 300 nL/min. 样品以 60 μL/min 的速度注入 Loop 环中, 使用梯度分离, 60 min 内由 5%线性增加至 45%, 之后柱再生与平衡共 30 min. 质谱仪使用热电公司的 Finnigan LTQ-Orbitrap 线性离子阱-轨道离子阱质谱仪. 第一步以 Orbitrap 轨道离子阱在 400~2000 的质荷比范围内以 60000 的分辨率采集-级质谱图. 第



https://engine.scichina.com/doi/10.1360/zc2010-40-9-853

二步用 LTQ 线性离子阱将第一步采集得到的质谱图中强度最高的 8 个信号进行串联质谱实验(排除环氧硅烷的离子). 质谱条件: 纳升级电喷雾电离方式(nano-ESI), 正离子模式扫描, 电离电压 1800 V, 离子入口管温度 200℃, 扫描范围 *m/z* 400~2000, 动态排除时间为 60 S, 质量数据由 XCalibur 采集处理.

### 1.8　质谱数据的数据库搜索

采集的质谱数据用 Bioworks 软件根据 Sequest 算法搜索数据库 IPI human 3.35 正库和对应反库. 数据库搜索参数为: 肽段质量误差(peptide tolerance) = 0.01 Da, 肽段碎片离子质量误差(fragment ion tolerance) = 1.0 Da, Enzyme = trypsin, Missed cleavage sites = 2, 单同位素分析, 固定修饰(fixed modification): carboxyamidomethylation(C); 可变修饰(variable modifications): oxidation(M). 搜库后, 根据正库和反库搜索得到全部肽段及 XCorr 值, 用本实验室开发的软件 ReverCal 计算过滤标准: 取置信限为 95%, 带+2, +3 电荷肽段的 XCorr 值分别为 2.81, 3.39; Rsp ≤4[20,21], DeltaCn>0.1, 双肽段匹配.

### 1.9　生物信息学分析

用本实验室开发的软件 SeQPC 分析蛋白质分子理论的等电点(pI)、分子量(MW)和疏水性(GRAVY); 采用在线免费软件 SecretomeP 分析分泌蛋白质的分泌途径[22]; 对具有信号肽的蛋白质, 用 TMHMM 分析其跨膜区(transmembrane domains, TMDs), 即跨膜螺旋区段(transmembrane helices, TMHs)[23].

## 2　结果与讨论

### 2.1　分泌蛋白的纯度

对于分泌蛋白质组学研究而言, 分泌蛋白的纯度是直接影响后续实验效果的关键因素. 为确定分泌蛋白的纯度, 采用 Western blotting 检测法. 采用胞内标志性蛋白, 细胞骨架蛋白 β-微管蛋白(β-tubulin)来检测提取的分泌蛋白质组分(conditioned medium, CM)纯度, 细胞全蛋白(cell extracts, CE)作为阳性对照. 如图 1 所示, β-tubulin 在 CM 中未被检测到, 而在 CE 中有明显的印迹, 说明所提取的分泌蛋白样品达到了纯度要求.

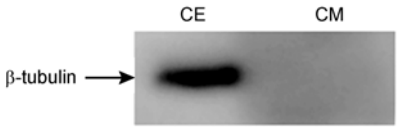


**图 1　分泌蛋白(CM)和细胞全蛋白(CE)的 β-tubulin 免疫印迹图**

### 2.2　3 种提取方法的比较

首先比较 3 种方法的提取效率, 经 Bradford 法定量发现, 从 20 mL 条件培养基中, 利用透析法、超滤法, 沉淀法分别提取了 70, 92.5 和 32.5 μg 蛋白.

再比较 3 种方法鉴定到的蛋白数目. 取相同质量的来自 3 种提取方法的分泌蛋白质, 经过溶液酶解, 在线的一维反相高效液相色谱分离和 ESI-MS/MS 质谱鉴定. 每种方法做 3 次生物学重复实验, 每次富集实验做 3 次 LC-MS/MS 分析, 因此每种方法做了 9 次 LC-MS/MS 分析, 多次重复实验保证了方法间的可比性. 经过上述实验, 3 种方法一共鉴定了 360 个非冗余蛋白. 206 个蛋白来自超滤法处理的样品, 290 个来自沉淀法处理的样品, 157 个出自透析法处理的样品. 如图 2 所示, 3 种方法共同鉴定的蛋白有 106 种, 有 34, 110 和 29 个蛋白分别只在超滤法, 沉淀法和透析法处理的样品中被鉴定到. 从鉴定到的非冗余蛋白的数量来看, 这些方法是互补的.

此外, 就实验操作而言, 3 种方法各有优缺点. 透析法简单, 但耗时长, 需要 2 天时间, 透析结束后, 大体积样品的冷冻干燥也是一个耗时的过程, 冻干的样品由于黏附管壁等因素, 也容易导致样品的损

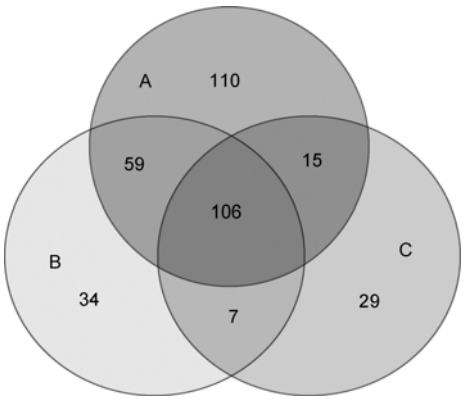


**图 2　3 种提取方法所鉴定的蛋白**

A: 沉淀法; B: 超滤法; C: 透析法



https://engine.scichina.com/doi/10.1360/zc2010-40-9-853

失. 超滤法也是比较耗时的方法, 其原理是超滤离心管内有一定分子量的截流模板, 在离心力的作用下, 小于膜板孔径直径的小分子, 受压力的作用被挤出膜板外, 大分子被截留在膜板上. 超滤开始时, 由于溶质分子均匀地分布在溶液中, 超滤的速度比较快. 但是, 随着小分子的不断排出, 大分子被截留堆积在膜表面, 浓度越来越高, 超滤速度就会逐渐减慢, 大分子往往容易堵塞膜孔, 导致超滤速度更慢; 而且由于用到 3 kD 的超滤膜, 容易造成小分子蛋白的丢失. 沉淀法的机理是有机溶剂的加入可以降低水的介电常数, 导致具有表面水层的生物大分子脱水, 相互聚集, 最后析出. 有机溶剂的选择首先是能和水混溶, 使用较多的有机溶剂是乙醇、甲醇、丙酮和三氯乙酸, 其中三氯乙酸最为常用. 沉淀法的一个最大的缺点是蛋白质沉淀后很难复溶, 即便是用高浓度的尿素等裂解液溶解, 也有一定难度.

为了考查 3 种提取方法对蛋白的偏好性, 对所鉴定的蛋白进行了 MW, pI 和疏水值(the grand average of hydropathicity, GRAVY)分析(图 3). 利用沉淀法获得的 290 个蛋白的分子量分布广泛(8~630 kD), 分子量小于 30 kD 的占 28%, 分子量最少的蛋白是 87 kD. 由图 3(A)可知, 比较而言, 沉淀法鉴定到的小分子量蛋白质比例较大些. 由图 3(B)可见, 360 个蛋白的等电点分布广泛, 鉴定到了等电点高达 11.86 的强碱性蛋白质. 同时可知, 对于蛋白质的酸碱性而言, 没有哪种方法有特别的偏好性. 图 3(C)展示了蛋白质 GRAVY 值分布情况, 可以看到 GRAVY 值小于 0, 即亲水性蛋白质占绝大部分. 相比之下, 沉淀法对于亲水性蛋白质显示出一定的偏好性. 结果表明, 就提取的蛋白质得率而言, 超滤法最高; 就鉴定到的蛋白质种类而言, 沉淀法占优势, 3 种方法具有互补性; 沉淀法对于低分子量和亲水性强的蛋白质也略显偏好性.

### 2.3 数据分析

(1) 分泌蛋白质的分泌途径分析. 分泌蛋白质具有两种分泌途径: 基于内质网-高尔基体的经典分泌途径和不基于内质网-高尔基体的非经典分泌途径. 通过生物信息学分析发现, 78 个蛋白是通过非经典的分泌途径分泌到胞外的, 这些蛋白没有信号肽, 通过软件 SecretomeP 预测为非经典的分泌蛋白; 97 个蛋白是通过经典的分泌途径分泌到胞外的, 这些蛋白质有信号肽, 并且没有跨膜区(Transmembrane domains, TMDs)[24,25]. 另外, 36 个蛋白被 TMHMM 软件预测为具有一个或一个以上跨膜区的膜蛋白. 因此, 鉴定到的分泌蛋白占鉴定到的总蛋白质的 58.6%(211/360). 值得一提的是, 膜蛋白往往容易脱离质膜到胞外空

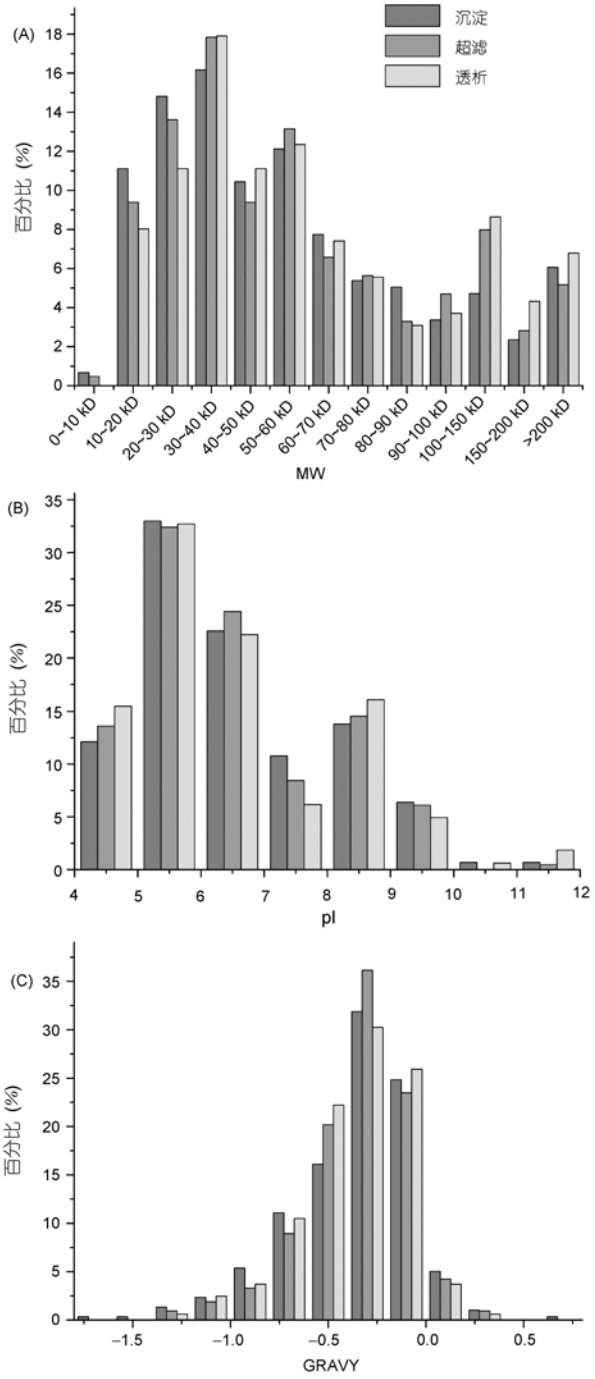


**图 3 蛋白质理化性质分析图**

(A) 分子量(MW); (B) 等电点(pI); (C) 疏水值(GRAVY)



https://engine.scichina.com/doi/10.1360/zc2010-40-9-853

间, 因此, 在现有的文献报道中, 膜蛋白往往也被计算到分泌蛋白的总数中. 而且本实验鉴定到的膜蛋白大部分是只含一个跨膜区的表面蛋白质, 更容易脱离质膜到胞外空间. 不过, 由于软件预测的准确性有待验证, 而且分泌蛋白质本身源自胞内, 所以, 要准确地判断蛋白质是否是分泌蛋白质仍然是分泌蛋白质研究面临的一个挑战.

(2) 已知-未知分泌蛋白分析. 本实验鉴定到 211 个分泌蛋白, 与前期 LM3 细胞分泌蛋白质组研究[19,26]相比, 本实验新鉴定到 42 个分泌蛋白, 扩大了已有的 LM3 分泌蛋白质组数据库. 进一步, 与现有分泌蛋白质数据库(secreted protein database, SPD)[27]相比, 本实验新鉴定到的 42 个分泌蛋白中, 11 个分泌蛋白已知, 31 个为本次实验首次鉴定到.

## 3 结论

高效提取分泌蛋白质是分泌蛋白质组学研究关键的第一步. 超滤法、沉淀法和透析法 3 种方法都被广泛应用, 人们往往不知如何选择. 本研究第一次全面地比较了这 3 种提取方法, 发现超滤法的产率最高, 沉淀法对于低分子量和亲水性强的蛋白质略显偏好性. 就鉴定蛋白质数目而言, 沉淀法占优势, 3 种方法具有互补性.

## 参考文献


1 Welsh J B, Sapinoso L M, Kern S G, et al. Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 3410—3415

2 Huang C M, Ananthaswamy H N, Barnes S, et al. Mass spectrometric proteomics profiles of *in vivo* tumor secretomes: capillary ultrafiltration sampling of regressive tumor masses. Proteomics, 2006, 6: 6107—6116

3 Mbeunkui F, Metge B J, Shevde L A, et al. Identification of differentially secreted biomarkers using LC-MS/MS in isogenic cell lines representing a progression of breast cancer. J Proteome Res, 2007, 6: 2993—3002

4 Ye Q H, Qin L X, Forgues M, et al. Predicting hepatitis B virus–positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. Nat Med, 2003, 9: 416—423

5 Gupta G P, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. Cell, 2006, 127: 679—695

6 Tang Z Y, Ye S L, Liu Y K, et al. A decade's studies on metastasis of hepatocellular carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130: 187—196

7 Diehl H C, Stuhler K, Volmer M W, et al. A catalogue of proteins released by colorectal cancer cells *in vitro* as an alternative source for biomarker discovery. Proteomics Clin Appl, 2007, 1: 47—61

8 Pellitteri-Hahn M C, Warren M C, Didier D N, et al. Improved mass spectrometric proteomic profiling of the secretome of rat vascular endothelial cells. J Proteome Res, 2006, 5: 2861—2864

9 Yamashita R, Fujiwara Y, Ikari K, et al. Extracellular proteome of human hepatoma cell, HepG2 analyzed using two-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Mol Cell Biochem, 2007, 298: 83—92

10 Zwickl H, Traxler E, Staettner S, et al. A novel technique to specifically analyze the secretome of cells and tissues. Electrophoresis, 2005, 26: 2779—2785

11 Trost M, Wehmhöner D D, Kärst U, et al. Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. Proteomics, 2005, 5: 1544—1557

12 Chan X C, McDermott J C, Siu K W. Identification of secreted proteins during skeletal muscle development. J Proteome Res, 2007, 6: 698—710

13 Sardana G, Marshall J, Diamandis E P. Discovery of candidate tumor markers for prostate cancer via proteomic analysis of cell culture-conditioned medium. Clin Chem, 2007, 53: 429—437

14 Lou X M, Xiao T, Zhao K, et al. Cathepsin D is secreted from M-BE cells: its potential role as a biomarker of lung cancer. J Proteome Res, 2007, 6: 1083—1092

15 Wu C C, Cheng H C, Chen S J, et al. Identification of collapsin response mediator protein-2 as a potential marker of colorectal carcinoma by comparative analysis of cancer cell secretomes. Proteomics, 2008, 8: 316—332

16 Li Y, Tang Z Y, Ye S L, et al. Establishment of a hepatocellular carcinoma cell line with unique metastatic characteristics through *in vivo* selection and screening for metastasis-related genes through cDNA microarray. J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 129: 43—51

17 Mbeunkui F, Fodstad O, Pannell L K. Secretory protein enrichment and analysis: an optimized approach applied on cancer cell lines using 2D LC-MS/MS. J Proteome Res, 2006, 5: 899—906




https://engine.scichina.com/doi/10.1360/zc2010-40-9-853

18 Chevallet M, Diemer H, Dorssealer A V, et al. Toward a better analysis of secreted proteins: the example of the myeloid cells secretome. Proteomics, 2007, 7: 1757—1770
19 Cao J, Shen C, Wang H, et al. Identification of N-Glycosylation sites on secreted proteins of human hepatocellular carcinoma cells with a complementary proteomics approach. J Proteome Res, 2009, 8: 662—672
20 Callister S J, Dominguez M A, Nicora C D, et al. Application of the accurate mass and time tag approach to the proteome analysis of sub-cellular fractions obtained from rhodobacter sphaeroides 2.4.1. aerobic and photosynthetic cell cultures. J Proteome Res, 2006, 5: 1940—1947
21 Chen M, Ying W T, Song Y P, et al. Analysis of human liver proteome using replicate shotgun strategy. Proteomics, 2007, 7: 2479
22 Bendtsen J D, Jensen L J, Blom N, et al. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. Protein Eng Des Sel, 2004, 17: 349—356
23 Krogh A, Larsson B, Heijne G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. J Mol Biol, 2001, 305: 567—580
24 Antelmann H, Tjalsma H, Voigt B, et al. A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. Genome Res, 2001, 11: 1484—1502
25 Zhang Z, Henzel W J. Signal peptide prediction based on analysis of experimentally. Protein Sci, 2004, 13: 2819—2824
26 Cao J, Hu Y, Shen C, et al. Zeolite LTL nanocrystal-driving high efficient enrichment of secretory proteins in human hepatocellular carcinoma cells. Proteomics, 2009, 9: 4881—4888
27 Chen Y J, Zhang Y, Yin Y, et al. SPD: a web-based secreted protein database. Nucleic Acids Res, 2005, 33: 169—173

# Comparison of Alternative Extraction Methods for Secretome Profiling in Human Hepatocellular Carcinoma Cells

CAO Jing[1], SHEN ChengPin[1], ZHANG Jun[1], YAO Jun[1], SHEN HuaLi[1], LIU YinKun[1,2], LU HaoJie[1] & YANG PengYuan[1]

[1]*Institutes of Biomedical Sciences and Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200032, China;*
[2]*Liver Cancer Institute Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China*

Given the importance of secreted proteins as a source for early detection and diagnosis of disease, secreted proteins have been arousing considerable attention. One of the difficulties in secretome study is to extract proteins at low concentrations from a large volume of culture media, which always are rich in salts and other compounds interfering with most proteomics techniques. Ultrafiltration, precipitation and dialysis are three major extraction methods. In this study, it is the first time to compare the three mainly used methods without bias, the merits and shortcomings of each method were discussed based on the obtained results. As a result, centrifugal ultrafiltration method represented the best in extracting efficiency, precipitation method obtained the highest number of confidential identification, and these three methods gave us closely related but different information of secretome, and so they are considered complementary or at least supplementary methods at present. Totally, 360 unique proteins were identified, including 211 secreted proteins potentially. Compared to previous studies, there were also 42 secreted proteins newly identified in this study, thus, this study not only offered a reference for the selection of secretome extraction methods but also expanded the secretome database for the investigation of HCC.

**hepatocellular carcinoma, secretome, protein extraction, ultrafiltration, precipitation, dialysis, LC-MS/MS**

doi: 10.1360/052010-409



https://engine.scichina.com/doi/10.1360/zc2010-40-9-853