

• 综 述 •

基于 SH2 超亲体的微量样品酪氨酸磷酸化蛋白质组学技术研究进展及应用

门丽影^{1,2}, 徐锋², 徐平^{1,2}

1 安徽医科大学 基础医学院, 安徽 合肥 230032

2 军事科学院军事医学研究院 生命组学研究所 中国医学科学院蛋白质组学与药物研发新技术创新单元 国家蛋白质科学中心 (北京) 北京蛋白质组研究中心 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

门丽影, 徐锋, 徐平. 基于 SH2 超亲体的微量样品酪氨酸磷酸化蛋白质组学技术研究进展及应用. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2334-2341.

Men LY, Xu F, Xu P. Advances and application of enrichment technology in SH2 superbinder-based tyrosine phosphoproteomics. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2334-2341.

摘 要: 酪氨酸磷酸化是生物体内一种重要的蛋白质磷酸化修饰类型, 参与细胞信号转导、细胞迁移、凋亡等众多的生命活动过程。在磷酸化蛋白质组学研究中, 由于酪氨酸磷酸化蛋白丰度低且有时起始样品量有限, 传统的磷酸化蛋白质组富集方法用于酪氨酸磷酸化肽富集效率较低。微量样品的制备技术以及 SH2 超亲体的引入正在改变酪氨酸磷酸化蛋白质组研究的现状, 现对此进行综述。

关键词: 酪氨酸磷酸化, SH2 超亲体, 微量样品, 膜蛋白, 富集技术

Advances and application of enrichment technology in SH2 superbinder-based tyrosine phosphoproteomics

Liying Men^{1,2}, Feng Xu², and Ping Xu^{1,2}

1 School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui, China

2 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing), Research Unit of Proteomics & Research and Development of New Drug of Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Institute of Lifeomics, Academy of Military Medical Sciences of Academy of Military Science, Beijing 102206, China

Abstract: Tyrosine phosphorylation is one of the important protein phosphorylations in eukaryotes responsible for a variety of biological processes including cell signaling transduction, cell migration, and apoptosis. In the study of phosphoproteomics, due to the low stoichiometry of tyrosine phosphorylation (pTyr) proteins and sometimes limited initial sample, traditional phosphoproteomics enrichment technology is inefficient for the enrichment of pTyr peptides. Here, we

Received: July 10, 2020; **Accepted:** September 30, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFA0505100), National Natural Science Foundation of China (No. 31670834).

Corresponding author: Ping Xu. Tel: +86-10-61777113; E-mail: xupingghy@gmail.com
国家重点研发计划 (No. 2017YFA0505100), 国家自然科学基金 (No. 31670834) 资助。

review the substantial progress in tyrosine phosphoproteomics by preparation of limited amount sample and the newly introduced SH2 superbinder.

Keywords: tyrosine phosphorylation, SH2 superbinder, micro-sample, membrane protein, enrichment technology

蛋白质磷酸化是调控蛋白质活性和功能的一种普遍且重要的手段,其失调与大多数癌症的发生发展有关。在真核生物中,目前最常见的磷酸化修饰出现在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基上^[1]。尽管酪氨酸磷酸化 (pTyr) 不如丝氨酸和苏氨酸磷酸化 (pSer/pThr) 丰富,但由于酪氨酸磷酸化是细胞信号转导的标志^[2],参与多个多效级联反应的蛋白质调控^[3],几乎所有的多肽细胞生长因子都是通过酪氨酸磷酸化的途径来激活和刺激细胞生长的^[4]。此外,其也是诸多重要的药物靶标,并且其抑制剂在多种类型的肿瘤中临床疗效显著,因此广受关注,亟需深度覆盖酪氨酸磷酸化蛋白质组研究的技术手段问世。但由于技术限制,酪氨酸磷酸化的蛋白质组研究极具挑战性^[1,5]。近年发展起来的微量样品制备技术^[6-7]以及基于 SH2 超亲体的微量样品富集技术^[8],使得这一难题得到一定程度的缓解。

1 酪氨酸磷酸化的分布

蛋白质酪氨酸磷酸化调节多种重要的细胞生物学功能,在真核细胞信号转导的过程中发挥重要作用^[5]。研究表明,大多数细胞膜上的受体都是酪氨酸磷酸化受体,能与相应的配体结合,并通过自磷酸化激活其酪氨酸激酶活性,进而激活底物的酪氨酸磷酸化。常见的酪氨酸磷酸化受体有胰岛素受体 (Insulin receptor, INSR)、表皮生长因子受体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR)、血小板衍生的生长因子受体 (Platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)、神经生长因子受体 (Nerve growth factor receptor, NGFR)、成纤维细胞生长因子受体 (Fibroblast growth factor receptor, FGFR)、肝细胞生长因子受体 (Hepatocyte

growth factor receptor, HGFR) 等^[9]。与受体酪氨酸激酶功能相反,非受体酪氨酸激酶功能取决于特定的亚细胞定位信号。大多数非受体酪氨酸激酶位于细胞质中,或与细胞质膜的内表面结合^[10]。在核膜上同样存在酪氨酸磷酸化。2006年, Schlosser 等^[11]就发现有些蛋白质会在核膜上进行酪氨酸磷酸化,并首次通过两种基于质谱的技术实现了核膜蛋白 Emerin 的酪氨酸磷酸化位点的鉴定。在小鼠, Emerin 的酪氨酸磷酸化位点有 Y-75、Y-95、Y-106; 在人 Emerin 中则有 Y-59、Y-74、Y-86、Y-161 和 Y-167 等 5 个酪氨酸磷酸化位点。此外,在细胞器中也存在酪氨酸磷酸化。2018年, Helfenberger 等^[12]通过免疫印迹实验发现线粒体内酪氨酸磷酸化含量持续增加,证实在线粒体中存在酪氨酸磷酸化。因此,酪氨酸磷酸化在细胞的各区域内广泛存在,深入研究蛋白质酪氨酸磷酸化的调控具有重大意义。

2 酪氨酸磷酸化蛋白微量样品的蛋白质组学技术

酪氨酸磷酸化蛋白质组技术研究的快速发展为多种疾病的基础研究及临床医学研究提供了强大的技术支撑。然而,由于大多数临床样本酪氨酸磷酸化肽的丰度低,且传统的磷酸化蛋白质组学技术对酪氨酸磷酸化肽的富集效率低,因此,对癌细胞中酪氨酸磷酸化蛋白质组进行全面分析仍然是一项重大挑战^[13]。近几年出现的微量样品的磷酸化蛋白质组技术在一定程度上缓解了这一难题。

2.1 磷酸化蛋白微量样品的样品制备技术

磷酸化蛋白质组学一般要求蛋白样品起始量达到 1 mg,在蛋白质翻译后修饰、蛋白质-蛋白质

相互作用以及亚细胞蛋白质组功能分析时这个起始量更大^[6]。然而,当起始样品量受到限制时,研究难于为继,亟需一种高灵敏度的酪氨酸磷酸化蛋白质组学技术,微量样品的制备技术成为研究重点。

传统的蛋白质组学样品制备技术因中间步骤多,样品损失大,难以实现磷酸化蛋白质组的深度覆盖。2017年,Xiong等^[14]建立了一种新的磷酸化蛋白质组学分析样品制备方法,将活细胞吸附在真空干燥的聚丙烯酰胺凝胶中,直接消化成多肽,进行LC-MS/MS分析。与经典的基于SDS-PAGE的方法相比,使用该方法一步处理细胞获得肽段,可以鉴定出更多的蛋白质(尤其是高分子量的蛋白质),在覆盖深度方面具有明显优势。2018年,南方科技大学田瑞军教授团队^[6]为了提高磷酸化蛋白质组分析对低微克蛋白质样品的灵敏度,优化了高pH RFP分馏和Ti⁴⁺-IMAC富集策略,开发了一种称为Phospho-SISPROT的新技术。该技术可将磷酸化蛋白质组分析时间从几天缩短到6h,提高了磷酸化蛋白质组分析效率及系统灵敏度。使用此技术从20 μg和1 μg经过钒酸钠处理的HEK 293T细胞蛋白质中分别鉴定出5 500多个和600多个独特的磷酸肽。2020年,Chua等^[15]通过BOOST(Broad-spectrum optimization of selective triggering)策略利用串联质量标签(TMT)的复用能力并使用过钒酸钠(PV) boost通道,有选择性地增加了含磷酸化酪氨酸的肽的相对丰度。进一步基于SH2超亲体进行酪氨酸磷酸化肽段的富集,使用经T细胞受体(T cell receptor, TCR)刺激的Jurkat T细胞蛋白样品,鉴定到2 300多个酪氨酸磷酸化肽段,使酪氨酸磷酸化蛋白质组的定量分析深度提高了6.3倍。

2.2 酪氨酸磷酸化微量样品的富集技术

2.2.1 SH2结构域及SH2超亲体的产生

30多年前,Pawson实验室发表了对SH2结构域(Src homology 2 domain)的第一个描述。当

时,SH2结构域仅被认为是多种非受体酪氨酸激酶之间序列相似的区域;该区域的突变影响相邻酪氨酸激酶结构域的活性,但该区域本身并不需要催化活性。SH2结构域的基本结构为三明治样结构,中间是一个反向平行的β片层,两侧各有一个α螺旋^[16](图1)。在接下来的5年里,SH2结构域从一个神秘的“调节域”变成了一种模块化结构域。在当前的后基因组时代,SH2结构域是数百个保守结构域中的一个,这些结构域是构成细胞的各种蛋白质的基础。但在这些结构域中,SH2结构域最早、最清楚地阐明细胞信号转导的许多关键原理^[17]。

SH2结构域是一个可以特异性识别磷酸化酪氨酸(pTyr)残基的模块化结构域,且为磷酸酪氨酸信号传导的核心^[18]。含有SH2结构域的蛋白质可以与酪氨酸磷酸化的位点结合,在磷酸酪氨酸信号传导以及蛋白质-蛋白质相互作用中起关键作用^[16,19-20]。例如,p120RasGAP和p190RhoGAP两种重要的GAP蛋白之间的主要相互作用就是由SH2-pTyr相互作用介导的^[21]。利用SH2结构域这一结合特异性,可以将其应用于富集酪氨酸磷酸化肽。但天然SH2结构域对酪氨酸磷酸化位点的亲和力十分有限(0.1–10.0 μmol/L),不利于有效富集酪氨酸磷酸化肽,难以实现全局性的酪氨酸磷酸化蛋白质组学分析^[2]。2012年,Kaneko等^[22]

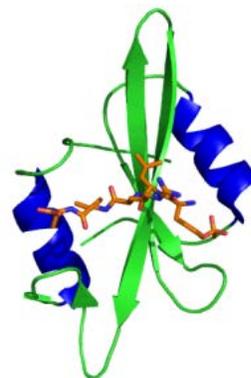


图1 SH2结构域结构^[4]

Fig. 1 Structure of SH2 domain^[4].

对酪氨酸激酶 Fyn 的 SH2 结构域磷酸化酪氨酸结合残基进行定向进化,引入了 Thr8Val、Cys10Ala、Lys15Leu 三个突变的氨基酸残基,生成了 SH2 结构域突变体,即 SH2 超亲体(图 2)。其对含酪氨酸磷酸化肽的肽段的亲和力比天然 SH2 结构域高 100 倍以上^[23]。与酪氨酸磷酸化肽抗体相比,SH2 超亲体价廉、高效,易于推广^[7]。

2.2.2 基于 SH2 超亲体的酪氨酸磷酸化微量样品富集技术

由于磷酸键相较于肽键而言更容易断裂,故磷酸化肽段不稳定,且丰度低,易在质谱鉴定中被高丰度蛋白掩盖,进一步加剧了鉴定的难度。磷酸化肽段的高效富集是有效鉴定的前提和基础。用于富集磷酸化蛋白、肽段的经典方法如金属离子亲和层析 (Immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC) 以及金属氧化物亲和层析 (Metal oxide affinity chromatography, MOAC),此技术对丝氨酸磷酸化肽和苏氨酸磷酸化肽的富集效果较好,对于酪氨酸磷酸化肽的富集能力却非常有限。酪氨酸磷酸化肽富集的传统技术为酪氨酸磷酸化抗体免疫沉淀富集方法,但该方法对酪氨酸磷酸化肽亲和力小,在对复杂样品中酪氨酸磷酸化肽富集时效率低,实验费用高,重现性差。目前,酪氨酸磷酸化蛋白质微量样品的富集技术主要是基于 SH2 超亲体的富集策略。表 1 比较了酪氨酸磷酸化肽的富集方法及其对酪氨酸磷酸化肽富集的能力。

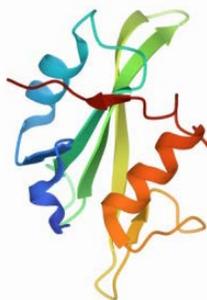


图 2 SH2 超亲体结构域结构^[24]

Fig. 2 Structure of SH2 superbinder domain^[24].

2016 年, Dong 等^[2]为酪氨酸磷酸化蛋白质组分析提出了一种灵敏、稳健且具有成本效益的方法。该方法将前期发展的基于 Ti^{4+} -IMAC 材料的磷酸肽富集方法和 SH2 超亲体亲和色谱法无缝结合,能够从复杂的总细胞蛋白的胰酶消化产物中有效回收低丰度的酪氨酸磷酸化肽,可多鉴定出 41% 的 pTyr 肽,实现酪氨酸磷酸化蛋白质组的深度覆盖。用 5 mg 未经刺激的 Jurkat T 细胞蛋白质组样品,该团队鉴定出 343 个高可信度的酪氨酸磷酸化位点,比基于抗体的方法提高 25.6%。而对于高丰度酪氨酸磷酸化的样品,如经过钒酸钠处理的 Jurkat T 细胞蛋白质组,仅 2 mg 起始样品就鉴定出 1 800 多个高可信度的酪氨酸磷酸化位点。2017 年, Deng 等^[5]又开发了一种双相亲和层析方法,将 SH2 超亲体与 NeutrAvidin 亲和层析结合,用于酪氨酸磷酸化蛋白质组分析。通过分析 2 mg 经过钒酸钠处理的 Jurkat T 细胞蛋白质,鉴定出 3 480 个独特的酪氨酸磷酸化位点,证明了该系统的出色性能。

2018 年, Yao 等^[8]开发了一种从微量样品中特异性捕获酪氨酸磷酸化肽的方法。他们将 SH2 超亲体固定在整体毛细管柱上,构建微反应器,以富集酪氨酸磷酸化肽。从过钒酸钠处理的 100 μ g HeLa 细胞蛋白质样品中成功地鉴定到 796 个独特的酪氨酸磷酸化位点。与此相对应,传统 SH2 琼脂糖凝胶法在同一样品中仅鉴定到 41 个酪氨酸磷酸化位点,占微反应器的 5.2%。该微反应器还用于分析 Shc1 复合物(一种免疫纯化的蛋白质复合物)中的磷酸化酪氨酸,鉴定到 15 个酪氨酸磷酸化位点。2019 年, Yao 等^[13]进一步开发了一种简化的基于 SH2 超亲体的一步式酪氨酸磷酸化肽富集方法,使用固定的 SH2 超亲体对生物样品中的内源性酪氨酸磷酸化肽进行无偏富集,在 3 mg 未刺激的 Jurkat 细胞中鉴定出的酪氨酸磷酸化肽和位点数目比两步法鉴定数目增加了 3 倍,但在酪氨酸磷酸化水平较高的样本优势

表 1 酪氨酸磷酸化肽的富集方法及鉴定量

Table 1 Enrichment method and identification amount of tyrosine phosphorylated peptide

Strategy_sample	pTyr peptide	pTyr site	References
IP(G410)_5 mg Jurkat T (untreated)	/	262	[2]
Ti ⁴⁺ -IMAC+SH2_5 mg Jurkat T (untreated)	/	343	[2]
IP(G410)_2 mg Jurkat T (pervanadate treated)	/	1 400	[2]
Ti ⁴⁺ -IMAC+SH2_2 mg Jurkat T (pervanadate treated)	/	1 800	[2]
Ti ⁴⁺ -IMAC+SH2+NeutrAvidin_2 mg Jurkat T (pervanadate treated)	/	3 480	[5]
Ti ⁴⁺ -IMAC+SH2_3 mg Jurkat (untreated)***	97	75	[13]
SH2_3 mg Jurkat (untreated)***	316	245	[13]
Ti ⁴⁺ -IMAC+SH2_1 mg Jurkat (pervanadate treated)***	2 394	1 871	[13]
SH2_1 mg Jurkat (pervanadate treated)***	2 172	1 666	[13]
SH2 microreactor_100 µg HeLa (pervanadate treated)	/	796	[8]
IP_6 mg Hela (EGF treated)	/	1 475	[25]
IP(pY99)_4 mg Hela (EGF treated)	1 112	/	[26]
SCX+TiO ₂		505	[27]
IP (pY1000)_20 mg MCF10A_ <i>pik3ca</i> mutant	651	/	[28]

Note: *** represents the average of three repeated experiment.

不显著。因此，该法更适合于低水平酪氨酸磷酸化样品中酪氨酸磷酸化肽的富集。

3 SH2超亲体及基于SH2超亲体的酪氨酸磷酸化蛋白质组技术的应用

3.1 SH2超亲体的应用

利用噬菌体展示技术 (Phage display technology) 产生 SH2 超亲体是一个很好的研究信号网络的工具。细胞中表达超亲体可以拮抗 SH2 结构域募集磷酸化信号从而抑制来自 RTKs 的信号。还可以将超亲体改造为现有的 SH2 结构域蛋白，用于合成新的细胞连接或形成细胞连接的蛋白以了解磷酸酪氨酸配体。同时，添加 Grb2 的 SH2 超亲体可能由于人工增强了对跨膜受体的亲和力从而可以触发早熟干细胞分化^[19,29]。2019 年，Veggiani 等^[30]使用噬菌体展示技术设计了数百个具有改变结合特异性和增强亲和力的 SH2 结构域变体，从而能够高效、差异性地富集人类磷酸化蛋白质组以进行质谱分析，这些工程化的 SH2 结构域变体将成为磷酸化蛋白质组分析的有用工具。

Liu 等^[31]将 (Arg)₉ 与 SH2 超亲体通过基因工程技术融合形成 (Arg)₉-SH2 超亲体。文章证实 (Arg)₉-SH2 超亲体可以有效进入黑色素瘤细胞并显示出对酪氨酸磷酸化蛋白的强亲和力。(Arg)₉-SH2 超亲体可以通过调节 PI3K/AKT、MAPK ERK 和 JAK/STAT 信号通路来抑制黑色素瘤细胞的增殖、迁移并诱导其凋亡。

Ke 等^[32]开发了 EGFP-sSH2-(Arg)₉ 亲和探针 (图 3)，用于直接检测活细胞中的酪氨酸磷酸化蛋白，首次在荧光显微镜下直接成像活细胞中酪氨酸磷酸化状态。这些基于 SH2 超亲体的亲和试剂将广泛应用于揭示酪氨酸磷酸化与肿瘤发生之间的关系。

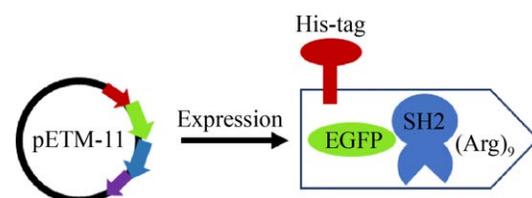
图 3 EGFP-sSH2-(Arg)₉ 重组质粒^[32]

Fig. 3 Recombinant plasmids of EGFP-sSH2-(Arg)₉^[32].

3.2 基于 SH2 超亲体的酪氨酸磷酸化蛋白质组技术的应用

蛋白质酪氨酸磷酸化的失调是导致癌症、糖尿病、自身免疫性疾病和神经系统疾病等诸多人类疾病的一个主要原因^[29,33]。酪氨酸磷酸化修饰在真核细胞的信号传导中发挥重要作用,因此,酪氨酸磷酸化位点的鉴定对于剖析信号通路和了解疾病机制至关重要^[5]。更进一步,多个酪氨酸激酶已成为临床治疗中具有吸引力的药物靶点,开发出了多种酪氨酸激酶抑制剂,并在癌症等疾病治疗中取得了良好疗效,因此对细胞内酪氨酸磷酸化位点进行全面系统的分析可为多种疾病的诊治及其机制研究奠定基础^[34]。

基于 SH2 超亲体的磷酸化蛋白质组学技术被应用于预测激酶活性、研究疾病靶向治疗策略以及研究药物耐药性。酪氨酸激酶的激活一般需要通过其活性环内特定的酪氨酸残基的磷酸化来实现。Bian 等^[7]使用基于 SH2 超亲体的定量磷酸化蛋白质组学技术发现激活(酪氨酸磷酸化)的 ErbB2 募集了更多的 Grb2, 激活的 IGF-1R 募集了更多的 IRS-1, 证明了磷酸化活性环可用于预测激酶活性。选择性抑制驱动肿瘤发生的酪氨酸激酶是分子靶向治疗的有效策略^[35-36]。使用显示出不同激酶活化特征的 4 种乳腺癌细胞系进行酪氨酸磷酸化蛋白质组研究,实现了基于 SH2 超亲体的激酶活性谱分析,验证了受激酶抑制剂或抗癌药物影响的底物和肿瘤靶向药物的特异性^[37-38]。

Yao 等^[13]将基于 SH2 超亲体的一步式酪氨酸磷酸化肽富集方法应用于人乳腺癌细胞株 BT474 和 HCC1954, 鉴定了特定的酪氨酸磷酸化信号通路,揭示了细胞行为差异的潜在酪氨酸磷酸化机制。该研究也尝试了基于 SH2 超亲体的一步式酪氨酸磷酸化肽富集方法在实际乳腺癌样本中酪氨酸磷酸化蛋白质组学研究的可行性,为乳腺癌的分子机制和诊治研究提供新的技术手段。

Chu 等^[39]基于 SH2 超亲体开发了一种混合化学蛋白质组学方法称为 Photo-pTyr-scaffold, 该方

法成功用于从乳腺癌组织样品中鉴定天然酪氨酸磷酸化蛋白复合物,与传统的免疫组化方法相比,检测酪氨酸磷酸化蛋白的灵敏度提高了约 100 倍。证实了在癌相关成纤维细胞上表达的受体酪氨酸激酶 PDGFRB 是一种重要的细胞间信号调节剂,其信号传导的阻断可以有效地抑制肿瘤的生长。该方法可能会成为分析临床样品动态酪氨酸磷酸化蛋白复合物的有力工具。

4 总结

鉴于酪氨酸磷酸化在维持生命体正常生命活动时发挥的重要作用,近年来酪氨酸磷酸化肽段的富集技术的研究逐渐深入。然而,在进行磷酸化蛋白质组学研究时起始样品量通常受到限制,基于 SH2 超亲体的微量样品的酪氨酸磷酸化蛋白质组技术应运而生,即使使用极少量的起始样品也能达到酪氨酸磷酸化蛋白质组的深度覆盖,但实现酪氨酸磷酸化蛋白质组的深度覆盖所需的最少起始样品量还需要进一步探索,该技术能否在临床组织样本中广泛应用还需进一步研究。

微量化(酪氨酸磷酸化)蛋白质组学技术的完善、进步与应用可以成为未来的一个发展方向。成熟的微量化蛋白质组学技术不仅可以帮助我们获得高可信度的蛋白质组学数据、揭示酪氨酸磷酸化失调蛋白及相关调控酶,还可用于指导疾病发生发展分子机制的深入研究、筛选癌症相关的肿瘤标志物及靶标分子,为疾病的临床诊断以及靶向治疗提供支撑。

REFERENCES

- [1] 李素贞, 徐锋, 徐平. 高转移肝癌细胞 HCCLM6 的酪氨酸磷酸化蛋白质组学研究. 军事医学, 2019, 43(2): 106-111.
Li SZ, Xu F, Xu P. Tyrosine phosphoproteomics of high metastatic hepatocellular carcinoma cell line HCCLM6. Military Med Sci, 2019, 43(2): 106-111 (in Chinese).
- [2] Dong MM, Bian YY, Wang Y, et al. Sensitive, robust,

- and cost-effective approach for tyrosine phosphoproteome analysis. *Anal Chem*, 2017, 89(17): 9307-9314.
- [3] De Araujo ED, Orlova A, Neubauer HA, et al. Structural implications of STAT3 and STAT5 SH2 domain mutations. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): 1757.
- [4] 柯艾青. 基于 SH2 超亲体的肿瘤细胞蛋白酪氨酸磷酸化分析的新方法研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2018.
- Ke AQ. Novel methods for protein tyrosine phosphorylation analysis of tumor cells based on SH2 superbinder[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2018 (in Chinese).
- [5] Deng ZZ, Dong MM, Wang Y, et al. Biphasic affinity chromatographic approach for deep tyrosine phosphoproteome analysis. *Anal Chem*, 2017, 89(4): 2405-2410.
- [6] Chen WD, Chen L, Tian RJ. An integrated strategy for highly sensitive phosphoproteome analysis from low micrograms of protein samples. *Analyst*, 2018, 143(15): 3693-3701.
- [7] Bian YY, Li L, Dong MM, et al. Ultra-deep tyrosine phosphoproteomics enabled by a phosphotyrosine superbinder. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(11): 959-966.
- [8] Yao YT, Bian YY, Dong MM, et al. SH2 superbinder modified monolithic capillary column for the sensitive analysis of protein tyrosine phosphorylation. *J Proteome Res*, 2018, 17(1): 243-251.
- [9] Van Der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol*, 1994, 10: 251-337.
- [10] Neet K, Hunter T. Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families. *Genes Cells*, 1996, 1(2): 147-169.
- [11] Schlosser A, Amanchy R, Otto H. Identification of tyrosine-phosphorylation sites in the nuclear membrane protein emerin. *FEBS J*, 2006, 273(14): 3204-3215.
- [12] Helfenberger KE, Villalba NM, Buchholz B, et al. Subcellular distribution of ERK phosphorylation in tyrosine and threonine depends on redox status in murine lung cells. *PLoS ONE*, 2018, 13(2): e0193022.
- [13] Yao YT, Wang Y, Wang SJ, et al. One-Step SH2 superbinder-based approach for sensitive analysis of tyrosine phosphoproteome. *J Proteome Res*, 2019, 18(4): 1870-1879.
- [14] Xiong Y, Zhang Y, Yao J, et al. Direct digestion of living cells *via* a gel-based strategy for mass spectrometric analysis. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53(8): 1421-1424.
- [15] Chua XY, Mensah T, Aballo T, et al. Tandem mass tag approach utilizing pervanadate BOOST channels delivers deeper quantitative characterization of the tyrosine phosphoproteome. *Mol Cell Proteomics*, 2020, 19(4): 730-743.
- [16] Visconti L, Malagrino F, Gianni S, Toto A. Structural characterization of an on-pathway intermediate and transition state in the folding of the N-terminal SH2 domain from SHP2. *FEBS J*, 2019, 286(23): 4769-4777.
- [17] Mayer BJ. What have we learned from SH2 domains?//Machida K, Liu B, Eds. *Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, 2017, 1555: 37-43.
- [18] Liu BA, Ogiue-Ikeda M, Machida K. Expression and production of SH2 domain proteins//Machida K, Liu B, Eds. *SH2 Domains*. New York: Humana Press, 2017, 1555: 117-162.
- [19] Liu BA, Machida K. Introduction: history of SH2 domains and their applications//Machida K, Liu B, Eds. *SH2 Domains*. New York, NY: Humana Press, 2017, 1555: 3-35.
- [20] Troilo F, Malagrino F, Visconti L, et al. The effect of proline *cis-trans* isomerization on the folding of the C-terminal SH2 domain from p85. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 125.
- [21] Chehayeb RJ, Stiegler AL, Boggon TJ. Crystal structures of p120RasGAP N-terminal SH2 domain in its apo form and in complex with a p190RhoGAP phosphotyrosine peptide. *PLoS ONE*, 2019, 14(12): e0226113.
- [22] Kaneko T, Huang HM, Cao X, et al. Superbinder SH2 domains act as antagonists of cell signaling. *Sci Signal*, 2012, 5(243): ra68.
- [23] Tong JF, Cao BY, Martyn GD, et al. Protein-phosphotyrosine proteome profiling by

- superbinder-SH2 domain affinity purification mass spectrometry, sSH2-AP-MS. *Proteomics*, 2017, 17(6): 1600360.
- [24] Triple mutant Src SH2 domain[EB/OL]. [2020-08-27]. <http://www.rcsb.org/structure/4F59>.
- [25] Sharma K, D'Souza RCJ, Tyanova S, et al. Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell Rep*, 2014, 8(5): 1583-1594.
- [26] Boersema PJ, Foong LY, Ding VMY, et al. In-depth qualitative and quantitative profiling of tyrosine phosphorylation using a combination of phosphopeptide immunoaffinity purification and stable isotope dimethyl labeling. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(1): 84-99.
- [27] Salek M, McGowan S, Trudgian DC, et al. Quantitative phosphoproteome analysis unveils LAT as a modulator of CD3 ζ and ZAP-70 tyrosine phosphorylation. *PLoS ONE*, 2013, 8(10): e77423.
- [28] Zahari MS, Wu XY, Blair BG, et al. Activating mutations in PIK3CA lead to widespread modulation of the tyrosine phosphoproteome. *J Proteome Res*, 2015, 14(9): 3882-3891.
- [29] He RJ, Yu ZH, Zhang RY, et al. Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35(10): 1227-1246.
- [30] Veggiani G, Huang HM, Yates BP, et al. Engineered SH2 domains with tailored specificities and enhanced affinities for phosphoproteome analysis. *Protein Sci*, 2019, 28(2): 403-413.
- [31] Liu AD, Xu H, Gao YN, et al. (Arg)₉-SH2 superbinder: a novel promising anticancer therapy to melanoma by blocking phosphotyrosine signaling. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37: 138.
- [32] Ke AQ, Liu AD, Gao YN, et al. Development of novel affinity reagents for detecting protein tyrosine phosphorylation based on superbinder SH2 domain in tumor cells. *Anal Chim Acta*, 2018, 1032: 138-146.
- [33] Tong K, Wang YY, Su ZX. Phosphotyrosine signalling and the origin of animal multicellularity. *Proc Biol Sci*, 2017, 284(1860): 20170681.
- [34] Kim HJ, Lin D, Lee HJ, et al. Quantitative profiling of protein tyrosine kinases in human cancer cell lines by multiplexed parallel reaction monitoring assays. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15(2): 682-691.
- [35] Barretina J, Caponigro G, Stransky N, et al. The cancer cell line encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*, 2012, 483(7391): 603-607.
- [36] Takeuchi K, Ito F. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(12): 1774-1780.
- [37] Zhang SY, Huang WC, Li P, et al. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med*, 2011, 17(4): 461-469.
- [38] Lee MJ, Ye AS, Gardino AK, et al. Sequential application of anti-cancer drugs enhances cell death by re-wiring apoptotic signaling networks. *Cell*, 2012, 149(4): 780-794.
- [39] Chu BZ, He A, Tian YT, et al. Photoaffinity-engineered protein scaffold for systematically exploring native phosphotyrosine signaling complexes in tumor samples. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(38): E8863-E8872.

(本文责编 陈宏宇)