封面文章

工程化OMEGA-TnpB系统的构建及体外靶向*MDM2*基因抑制骨肉瘤细胞恶性生物学行为的研究

王梓颖[1,2]，陈泽华[2]，王 振[1]，朱庆岩[1]，郭子轩[1]，赵雪林[1]，赵子仪[4]，许 猛[3]
[1]解放军医学院，北京 100853；[2]中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室，北京 100101；[3]解放军总医院第四医学中心骨科，北京 100037；[4]解放军总医院第一医学中心，北京 100853

摘要：背景 传统治疗手段对晚期、复发及转移性骨肉瘤患者的治疗效果有限。基因治疗为骨肉瘤提供了新的治疗选择。然而，现有基因编辑工具(如CRISPR-Cas9)因尺寸大、免疫原性高等问题限制了其临床应用。新发现的OMEGA-TnpB系统具有紧凑的尺寸(约400 aa)，在肿瘤基因编辑中展现出巨大潜力。**目的** 通过改造OMEGA-TnpB系统，开发高效、紧凑的基因编辑工具，并验证其在骨肉瘤基因治疗中的应用潜力。**方法** 通过理性设计获取TnpB突变体。利用单链退火(single strand annealing，SSA)报告系统筛选突变体，并在HEK293T和骨肉瘤细胞系(143B)中验证其编辑效率。最后使用优化的TnpB突变体敲除骨肉瘤基因*MDM2*，通过RT-qPCR、流式细胞术、CCK-8、划痕实验和Transwell实验评估其对细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的影响。**结果** 筛选出多个高活性TnpB突变体，其中ISYmu1-L225K在HEK293T细胞($P<0.01$)和143B细胞($P<0.01$)中的编辑效率显著高于enOsCas12f1，在HEK293T细胞部分位点与SpCas9比较无统计学差异。敲除*MDM2*基因后，骨肉瘤细胞的增殖能力下降($P<0.01$)，凋亡率增加($P<0.01$)，迁移($P<0.01$)和侵袭($P<0.05$)能力被抑制。**结论** 成功获取了在哺乳动物细胞内基因编辑效率提高的TnpB突变体ISYmu1-L225K，验证了ISYmu1-L225K能够靶向敲除*MDM2*基因并抑制骨肉瘤细胞的恶性行为，为骨肉瘤的精准治疗提供了新思路。

关键词：OMEGA-TnpB系统；*MDM2*基因；骨肉瘤；基因治疗；基因编辑
中图分类号：R738.1 **文献标志码：**A **文章编号：**2095-5227(2025)04-0315-08
DOI：10.12435/j.issn.2095-5227.25022102
引用本文：王梓颖，陈泽华，王振，等.工程化OMEGA-TnpB系统的构建及体外靶向*MDM2*基因抑制骨肉瘤细胞恶性生物学行为的研究［J］.解放军医学院学报，2025，46（4）：315-322.

Engineering OMEGA-TnpB system for in vitro targeted knockout of *MDM2* gene to suppress malignant behaviors in osteosarcoma cells

WANG Ziying[1,2], CHEN Zehua[2], WANG Zhen[1], ZHU Qingyan[1], GUO Zixuan[1], ZHAO Xuelin[1], ZHAO Ziyi[4], XU Meng[3]
[1]Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; [2]CAS Key Laboratory of Microbial Physiological & Metabolic Engineering and State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; [3]Senior Department of Orthopedics, the Fourth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100037, China; [4]The First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China
Corresponding author: XU Meng. Email: profxum301@163.com

Abstract: Background Conventional treatments have limited effectiveness in patients with advanced, recurrent, or metastatic osteosarcoma. Gene therapy offers a promising therapeutic option for osteosarcoma. However, the clinical application of current gene-editing tools (e.g. CRISPR-Cas9) is limited by their large size and high immunogenicity. The newly discovered OMEGA-TnpB system, with its compact size (~ 400 aa), shows great potential for tumor gene editing. **Objective** To develop efficient and compact gene-editing tools by engineering the OMEGA-TnpB system, and validate their potential for osteosarcoma gene therapy. **Methods** Through rational design, TnpB mutants were obtained. A single-strand annealing (SSA) reporter system was employed to screen mutants, and their editing efficiency was validated in HEK293T and osteosarcoma cell lines (143B). The optimized TnpB mutant (ISYmu1-L225K) was used to knock out the osteosarcoma gene *MDM2*. The effects on cell proliferation, apoptosis, migration, and invasion were assessed by RT-qPCR, flow cytometry, CCK-8, wound-healing assay, and Transwell assay.

收稿日期：2025-02-21
第一作者：王梓颖，在读硕士。Email: wangziying202210@163.com
通信作者：许猛，博士，主任医师，博士生导师。Email: profxum301@163.com

Results　Several high-activity TnpB mutants were identified, among which ISYmu1-L225K exhibited significantly higher editing efficiency than enOsCas12f1 in both HEK293T (P<0.01) and 143B cells (P<0.01). In HEK293T cells, its efficiency at certain loci showed no significant difference compared to SpCas9. Knockout of *MDM2* reduced osteosarcoma cell proliferation (P<0.01), increased apoptosis rates (P<0.01), and inhibited both migration (P<0.01) and invasion (P<0.05). **Conclusion**　This study successfully develops the TnpB mutant ISYmu1-L225K, which exhibits enhanced gene editing efficiency in mammalian cells. ISYmu1-L225K suppresses the malignant behavior of osteosarcoma cells by targeting *MDM2*, providing a novel strategy for precision therapy in osteosarcoma.

Keywords: OMEGA-TnpB system; *MDM2*; osteosarcoma; gene therapy; gene editing

Cited as: Wang ZY, Chen ZH, Wang ZH, et al. Engineering OMEGA-TnpB system for in vitro targeted knockout of *MDM2* gene to suppress malignant behaviors in osteosarcoma cells[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(4): 315-322.

骨肉瘤是一种恶性程度高、易转移的骨肿瘤，传统治疗手段对晚期、复发及转移性骨肉瘤患者的治疗效果有限[1-2]，而基因治疗是一种颇具前景的新选择[3]。*MDM2*基因是骨肉瘤发生、发展及转移的重要驱动基因，其通过多种机制调控肿瘤细胞的增殖、凋亡和血管生成[4]。尽管已有研究运用CRISPR-Cas9系统对骨肉瘤细胞的*MDM2*等基因进行编辑[5-8]，但由于目前广泛使用的基因递送载体——腺相关病毒有基因装载容量限制(约4.7 kb)，SpCas9 (*streptococcus pyogenes* Cas9，SpCas9)过大的分子量(1 368 aa)限制了其在体内基因治疗中的应用[9]。因此开发高效率的紧凑型基因编辑工具用于肿瘤的基因治疗很有必要。新发现的OMEGA-TnpB系统凭借分子结构尺寸紧凑(约400 aa)的特点，在肿瘤基因编辑以及相关机制探索领域展现出良好的应用价值[10]。

TnpB蛋白属于转座子相关RNA(OMEGA RNA，ωRNA)引导的核酸内切酶家族(obligate mobile element guided activity，OMEGA)，其基因编辑方式与Cas9类似，在ωRNA的引导下，切割转座子相关基序(transposon-associated motif，TAM)旁边的DNA，最终引起DNA双链的断裂[10-11]。除了首先被重编程的TnpB核酸酶ISDra2，Xiang等[12]挖掘出了在哺乳动物细胞中具有编辑活性的5种天然TnpB核酸内切酶，相对于其他小尺寸基因编辑工具，TnpB在人类细胞多个基因编辑位点中均表现出较强的编辑活性。虽然已有研究针对ωRNA进行改造并提高了OMEGA-TnpB系统的编辑效率[13]，但针对TnpB蛋白的工程化改造研究相对较少，其基因编辑效率仍有极大的提升空间。

本研究中，我们基于Cas9等基因编辑工具的优化经验，通过家族序列比对以及结构分析，对TnpB蛋白进行初步优化，希望能够提高其基因编辑效率；为探索这种紧凑型基因编辑工具在疾病诊疗中的应用潜力，我们利用优化后的TnpB突变体在体外敲除骨肉瘤原癌基因*MDM2*，期望为骨肉瘤的精准治疗提供新思路。

1　材料与方法

1.1　细胞培养

人骨肉瘤细胞系(143B)和HEK293T细胞购自中国科学院细胞库(中国上海)。143B细胞用MEM (Gibco，美国；C11095500BT)培养，添加10%胎牛血清(Gibco，美国；1091148)、0.015 mg/mL 5-溴-2'-脱氧尿苷(翌圣生物，中国；40204ES60)、1%非必需氨基酸(Gibco，美国；10370021)和1%P en/Strep (Gibco，美国；15140122)。HEK293T细胞用添加了10%胎牛血清和1% Pen/Strep的DMEM (Invitrogen，美国；C11995500BT)培养。所有细胞均培养于37℃、5% CO_2培养箱。用支原体检测试剂盒(翌圣生物，中国；40612ES25)定期检测细胞系支原体污染情况。

1.2　突变位点选取

基于Cas9和Cas12蛋白的工程化经验[14-15]，首先使用MEGA对6种TnpB序列进行比对，观察是否有相对保守区域在某个TnpB蛋白中发生突变，以此作为突变候选位点(图1A)。例如，通过序列比对发现在ISTfu1、ISAba30、ISAam1及ISYmu1第140位氨基酸残基附近存在保守的精氨酸(arginine，R)，而ISDge10在对应位点为谷氨酰胺(glutamine，Q)，由此尝试将ISDge10的Q141位点突变为R (Q141R)。其次，在上述突变候选位点中，根据AlphaFold 3结构预测结果，进一步筛选靠近DNA/ωRNA的位点用于构建TnpB核酸酶单点突变体(PyMOL 2.6)(图1B)，重点关注突变为带正电荷的残基，因其可通过增加亲和力获得编辑活性的提升。

1.3　基于SSA的基因编辑报告系统

我们使用基于单链退火(single strand annealing，SSA)机制构建的基因编辑报告系统[16]在HEK293T细胞中评估突变体的基因编辑效率。该报告系统在

*mCherry*基因中插入一段带有终止子、TAM/PAM及ωRNA/sgRNA靶标位点的序列，序列两端是一段重复序列。当OMEGA-TnpB或CRISPR-Cas系统在细胞内引起*mCherry*的DNA双链断裂(double-strand breaks，DSBs)时，两端的重复序列将互为同源臂，进行同源重组修复，从而有机会形成完整的*mCherry*基因，*mCherry*可以被正确表达，发出红色荧光。同时，使用荧光蛋白EGFP及TagBFP作为转染效率指示标记。最终，通过流式细胞分析技术测定在带有EGFP及TagBFP荧光的细胞中*mCherry*荧光的相对表达量，筛选出编辑效率提高的TnpB突变体(图1D)。

1.4　质粒构建与转染

各种表达载体均使用PrimeSTAR Max DNA聚合酶(TaKaRa，日本；R045A)克隆构建，并通过Gibson法(NEB，美国；E2621L)组装。所有突变体通过点突变PCR获得。本研究中使用的质粒使用EndoFree Mini Plasmid Kit Ⅱ(天根，中国；DP118-03)提取。

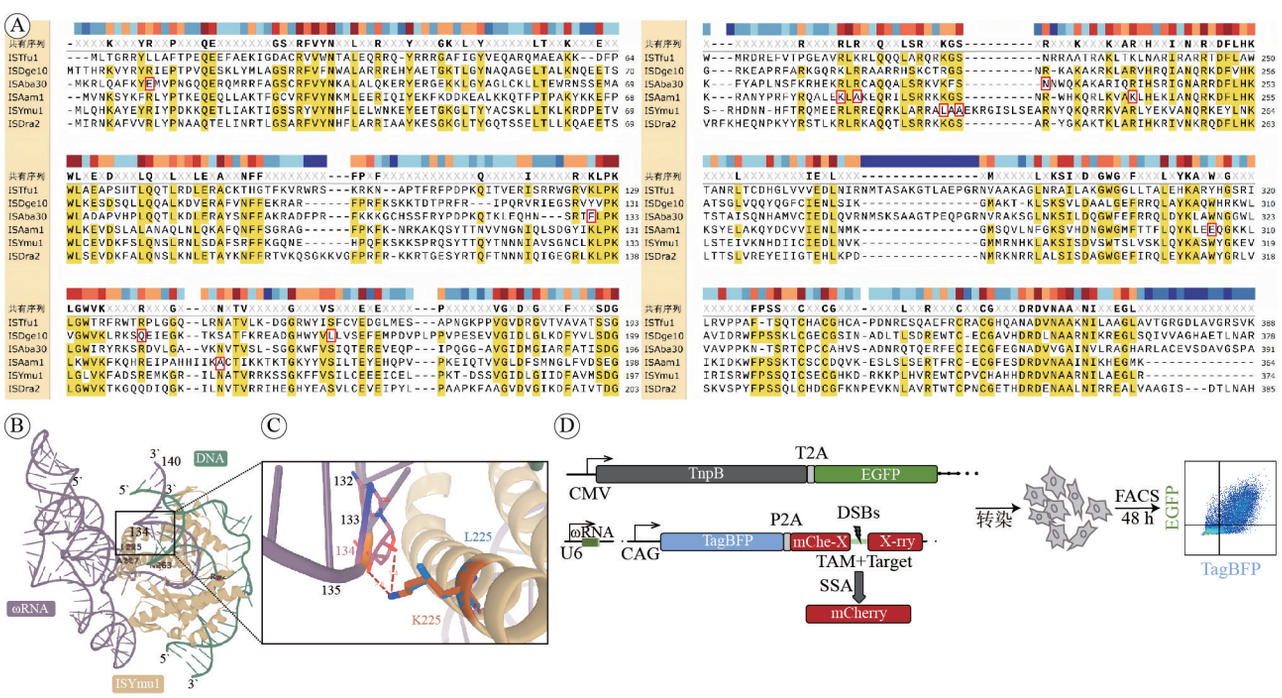
DNA瞬时转染时，先将细胞培养至70%～80%汇合度，然后使用jetOPTIMUS®试剂(Polyplus-transfection®，法国；101000006)按照说明书转染质粒混合物。

1.5　流式细胞术检测SSA基因编辑报告系统中荧光蛋白相对表达量

将HEK293T细胞铺板于48孔板，转染48 h后收集细胞：吸弃旧培养基，使用PBS润洗细胞2遍，胰酶消化细胞并收集于96孔板中，800 r/min离心3 min，弃上清，50～100 μL PBS轻柔重悬细胞，并用细胞筛过滤细胞至新的96孔板中，避光放于冰上，等待检测。流式细胞仪开机后使用流式质控微球进行质检，在初次检测时，制备仅表达单一荧光蛋白的质粒及空载质粒的样本，用于实验电压调节、圈门设置等。

1.6　Sanger测序及高通量测序检测细胞基因组编辑结果

将细胞铺于24孔板，转染24 h后，更换为含有嘌呤霉素(3 μg/mL，翌圣生物；60209ES10)的完全培养基继续培养。转染96 h时，弃去细胞培养基，加入适量PBS润洗细胞1～2遍，每孔加入200 μL PBS使用移液枪轻柔吹落细胞，收集于离心管，5 000 r/min离心10 min，弃去上清。根据每管样品量，使用15～30 μL含25 μg/mL蛋白酶K的裂解缓冲液(Invitrogen，美国；A44647500)重悬细胞团，在PCR仪中65℃恒温孵育10 min，98℃恒温孵育2 min，最后获取样品基因组DNA (gDNA)作为模板



A：TnpB序列比对结果。标黄部分是潜在的保守位点，在单点突变中具有效率提升的位点用红色方框标出；B：AlphaFold 3预测的ISYmu1整体结构模型(PyMOL 2.6)，突变氨基酸残基以红色显示；C：ISYmu1野生型与ISYmu1-L225K突变体的结构差异，取代的残基以棕红色标签显示；D：基于SSA的基因编辑报告系统。

图1　TnpB序列比对结果、部分结构预测模型与基于SSA的报告系统

Fig. 1　Sequence alignment of TnpB, structural prediction models and schematic of the SSA-based reporter system

用于后续基因组PCR，样品储存于-20℃。基因组PCR产物进行Sanger测序，使用SnapGene 6.0.2软件查看基因片段峰图。基因组PCR产物在Illumina NovaSeq平台(金唯智，中国)进行高通量测序，按照先前研究中的方法分析基因的插入/缺失突变率(insertion and deletion，indel)[17]。编辑效率计算方法：

indels% =（indels读数 ÷ reads总数）× 100%。

1.7　RT-qPCR实验检测*MDM2*基因mRNA的相对表达量

通过TRIzol法提取转染24 h后的细胞RNA。使用分光光度计(NanoDrop)检测RNA浓度和纯度。使用HiScript Ⅳ All-in-One Ultra RT SuperMix for qPCR试剂盒进行RNA逆转录(诺唯赞，R433)。使用Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒进行qPCR反应(诺唯赞，Q712)，针对每个编辑位点设计相应的跨编辑位点引物(表1)。

1.8　划痕实验检测骨肉瘤细胞迁移能力

转染24 h后，将细胞铺到6孔板中，培养细胞至＞90%融合。细胞附着在培养皿后，根据培养皿底部预先标记的区域制造划痕。弃去培养基，用PBS润洗细胞3次，然后用添加2%胎牛血清的培养基培养细胞。在培养箱中静置0.5 h后在显微镜下对划痕拍照记录。24 h后，采集相同区域的图像，并使用ImageJ 1.53a软件测量划痕面积。

1.9　CCK-8实验检测骨肉瘤细胞增殖能力

使用CCK-8(聚合美，中国；MF128-01)测定细胞增殖情况。在96孔板中加入200 μL转染细胞悬液(6 000个细胞)，每组设置5个技术复孔。在0 h、24 h、48 h、72 h和96 h，按照产品说明向96孔板中加入100 μL混合试剂。使用酶标仪在450 nm波长处测量吸光度。

1.10　Annexin V-FITC / PI双染法检测骨肉瘤细胞凋亡率

用不含EDTA的胰蛋白酶(翌圣生物，中国；40124ES60)消化转染后48 h的细胞。收集细胞培养液及细胞，离心重悬后用Annexin V-FITC / PI细胞凋亡检测试剂盒(碧云天，中国；C1062M)进行染色。使用LSRFortessa流式细胞仪和FlowJo 10.10.0软件测量和分析细胞的凋亡率。

1.11　Transwell侵袭实验检测骨肉瘤细胞侵袭能力

过夜解冻基质胶(翌圣生物，中国；40183)后用预冷的无血清培养基稀释基质胶(1∶8稀释)。在Transwell小室(Corning，美国；3422)上室加入稀释后的基质胶，37℃孵育1～2 h使其凝固。消化转染后细胞，用无血清培养基重悬。在上室加入200 μL细胞悬液。在下室加入含10%胎牛血清的培养基。将Transwell小室放入24孔板中继续培养。48 h后用4%多聚甲醛固定下室细胞15～20 min。用0.1%结晶紫染色30 min。用PBS轻轻清洗Transwell小室，去除未结合的染料。将小室膜切下，置于载玻片上，显微镜下观察并拍照。使用ImageJ软件计数下室细胞数量。

1.12　统计学方法

采用GraphPad Prism10.1.2进行统计分析及绘图，图片采用ImageJ进行处理以获得数据。所有数据均符合正态分布，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。荧光蛋白相对表达量、高通量测序结果及RT-qPCR实验结果采用单因素方差分析，CCK-8实验、划痕实验、细胞凋亡及侵袭实验结果采用t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　TnpB核酸酶优化

2.1.1　工程化TnpB编辑效率高于enOsCas12f1

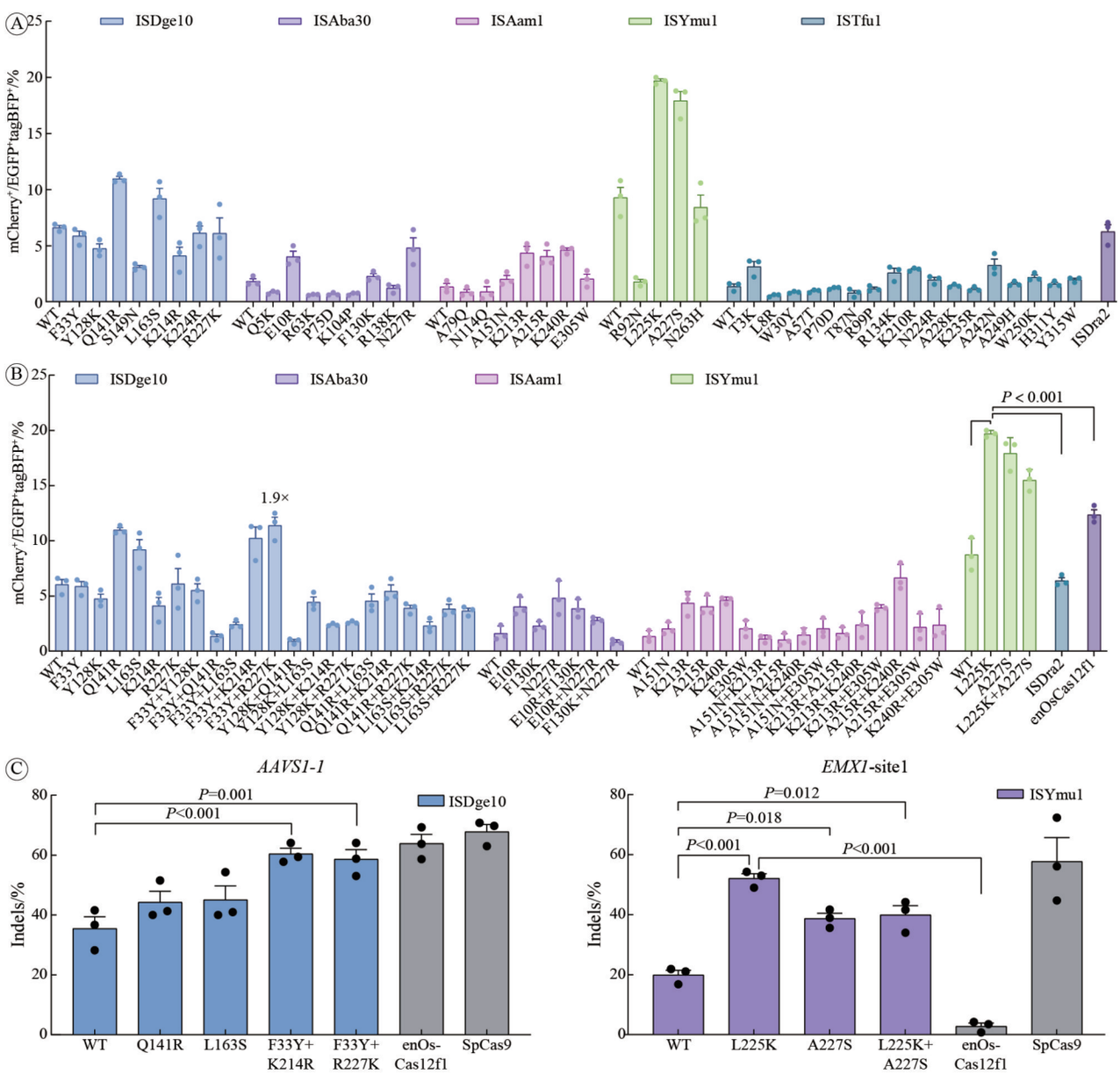
我们使用基于SSA的基因编辑报告系统对TnpB核酸酶单点突变体进行初步筛选，获取了编辑效率提高的突变体：ISDge10-Q141R、ISDge10-L163S、

表1　RT-qPCR引物序列

Tab. 1　RT-qPCR primer sequence

基因名称	正向引物(5’-3’)	反向引物(5’-3’)
MDM2-site1	ATGGTGCTGTAACCACCTCACAG	CTGTGCTCTTTCACAGAGAAGCTTGG
MDM2-site2	CCAAGCTTCTCTGTGAAAGAGCACAG	GCTCTCCTTCTAGATGAGGTAGATGGTC
MDM2-site3	ACCATCTACCTCATCTAGAAGGAGAGC	CCTGATCCAACCAATCACCTGAATGTTC
MDM2-site4	CTTTGATGAAAGCCTGGCTCTGTGTGT	CTTCATCTGAGAGTTCTTGTCCTTCTTCAC
MDM2-site5	GAACATTCAGGTGATTGGTTGGATCAGG	TTCATTGCATGAAGTGCATTTCCAATAGTC
MDM2-site6	CACAAGCTGAAGAGGGCTTTGAT	TGGCATTAAGGGGCAAACTAGATTCCAC
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

ISAba30-E10R、ISAba30-F130K、ISAba30-N227R、ISAam1-A151N、ISAam1-K213R、ISAam1-A215R、ISAam1-K240R、ISAam1-E305W、ISYmu1-L225K及ISYmu1-A227S(图2A)。在ISDge10中，F33Y、Y128K和K214R突变体编辑效率与野生型未见显著差距，因此我们也将其选为第2轮叠加突变的候选位点。依据以上位点，进行了第2轮双点叠加突变(图2B)，部分突变位点叠加后编辑效率下降。通过两轮突变，对各突变体的编辑效率进行综合比较，发现ISYmu1-L225K展现出最优编辑效率，相较于野生型ISYmu1，其在质粒DNA上的基因编辑能力提高约2.3倍($P<0.01$)。同时，我们将各突变体的编辑效率与应用最广的TnpB蛋白——ISDra2($P<0.01$)及已经过工程化改造且具有强编辑能力的紧凑型Cas12蛋白——enOsCas12f1(433 aa)[18]进行对比($P<0.01$)，结果显示ISYmu1-L225K的编辑能力仍较高(图2B)。接着，我们使用TnpB切割HEK293T细胞的基因，通过药物筛选系统(图2C)观察其基因编辑效率。在*AAVS1-1*基因上，ISDge10-F33Y+K214R突变体显示出编辑效率的显著提高，且与SpCas9及enOsCas12f1比较无统计学差异。在*EMX1*基因上，与野生型相比，ISYmu1-



A：TnpB核酸酶单点突变体基因编辑效率结果图；B：TnpB核酸酶双点突变体基因编辑效率结果图；C：TnpB核酸酶野生型(WT)及突变体在HEK293T细胞基因上编辑效率结果图。n=3。

图2　TnpB核酸酶的效率验证

Fig. 2　Efficiency validation of the TnpB nuclease

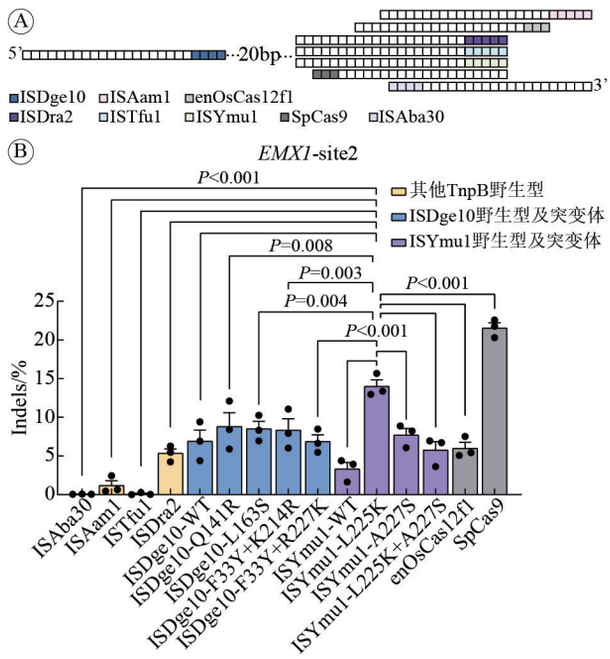
L225K突变体编辑效率仍显著提高($P<0.01$)，这与在报告基因上的编辑结果一致，在该位点上，ISYmu1-L225K突变体的编辑效率相较于SpCas9无统计学差异，但显著高于enOsCas12f1($P<0.01$)。

2.1.2　OMEGA-TnpB系统在骨肉瘤细胞系143B中具有基因编辑活性　我们通过高通量测序验证OMEGA-TnpB系统在骨肉瘤细胞系143B中能否顺利进行基因编辑及其基因编辑效率。根据前述结果，我们主要评估了ISYmu1的L225K、A227S及L225K+A227S突变体，ISDge10突变体Q141R、L163S、F33Y+K214R及F33Y+R227K的基因编辑能力，并与野生型TnpB、enOsCas12f1和SpCas9进行对比。由于这些基因编辑工具存在不同的TAM或PAM，为了确保编辑结果之间的可比性，我们仔细选择了基因编辑区域，以确保所有系统在*EMX1*基因靶位点之间的距离小于80 bp(图3A)。ISYmu1的3个突变体(L225K、A227S及L225K+A227S)在该位点都表现出较高的编辑活性，突变体L225K编辑效率显著高于enOsCas12f1($P<0.01$)(图3B)。基于这些结果，我们尝试使用ISYmu1-L225K突变体敲除骨肉瘤原癌基因*MDM2*，并检测其对骨肉瘤细胞系的增殖能力、抗凋亡能力及迁移能力的抑制情况。

2.2　ISYmu1-L225K敲除骨肉瘤细胞系*MDM2*基因后抑制其恶性行为

2.2.1　ISYmu1-L225K敲除骨肉瘤细胞系*MDM2*基因　在*MDM2*基因外显子中，基于TAM-TTGAT选取了ISYmu1-L225K能识别的所有位点(site1～6)，通过RT-qPCR及Sanger测序评估*MDM2*基因是否敲除成功。靶向这6个基因编辑位点的基因编辑效率结果不同(图4)，根据结果，我们选择ISYmu1-L225K-site4进行细胞功能实验。

2.2.2　ISYmu1-L225K敲除*MDM2*基因后诱导骨肉瘤细胞系凋亡并抑制增殖　使用Annexin V-FITC/PI双染法评估ISYmu1-L225K敲除*MDM2*基因后143B细胞的凋亡情况。实验结果见图5A、图5B，转染ISYmu1-L225K-site4质粒48 h后，相比对照组，骨肉瘤细胞的凋亡率增加($P<0.01$)，主要集中在早期凋亡。同时，我们也通过CCK-8实验测定了基因敲除后对骨肉瘤细胞系的增殖影响，相对于使用ISYmu1-L225K-NC(无靶向位点的质粒)进行转染的细胞，实验组96 h ($P<0.01$)后细胞的增殖能力下降(图5C)，这与RT-qPCR显示出*MDM2*的mRNA表达量下降的结果基本一致。



A：*EMX1*编辑位点示意图。为了使各个核酸酶的编辑结果具有可比性，根据不同的TAM/PAM在*EMX1*基因上选取了集中的靶位点。图中每个小方格代表1个碱基，彩色方格代表TAM/PAM位置；B：TnpB核酸酶野生型及其突变体、enOsCas12f1和SpCas9在143B细胞*EMX1*基因上的编辑结果。n=3。

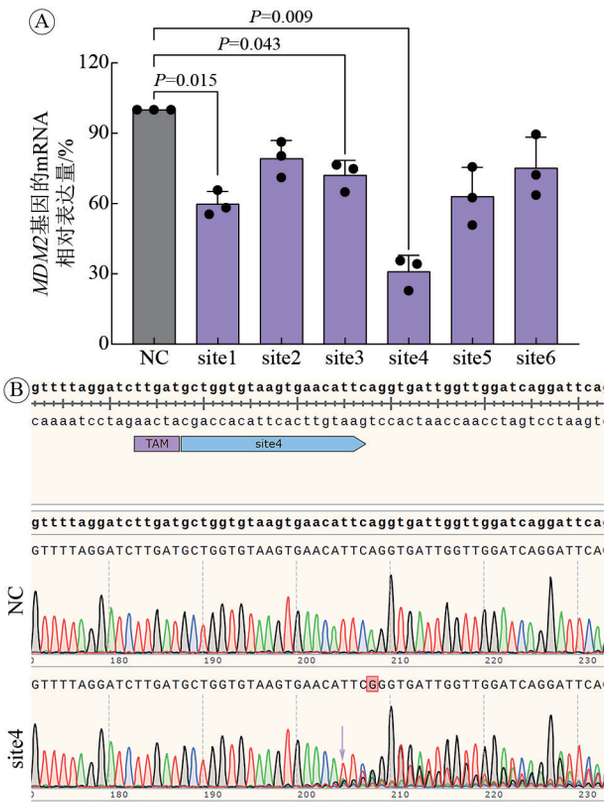
图3　OMEGA-TnpB系统在143B细胞中具有基因编辑活性

Fig. 3　Gene editing activity of the OMEGA-TnpB system in 143B cells

2.2.3　ISYmu1-L225K敲除*MDM2*基因后抑制骨肉瘤细胞系迁移及侵袭　通过划痕、Transwell实验观察敲除*MDM2*基因后骨肉瘤细胞系的迁移及侵袭能力是否被抑制，实验结果见图6，相较于对照组，骨肉瘤细胞的迁移($P<0.01$)及侵袭能力($P<0.05$)得到了显著抑制。以上结果进一步说明，OMEGA-TnpB系统在骨肉瘤细胞中具有基因编辑能力，敲除*MDM2*基因后对骨肉瘤细胞系143B的恶性行为能产生一定的抑制作用。

3　讨论

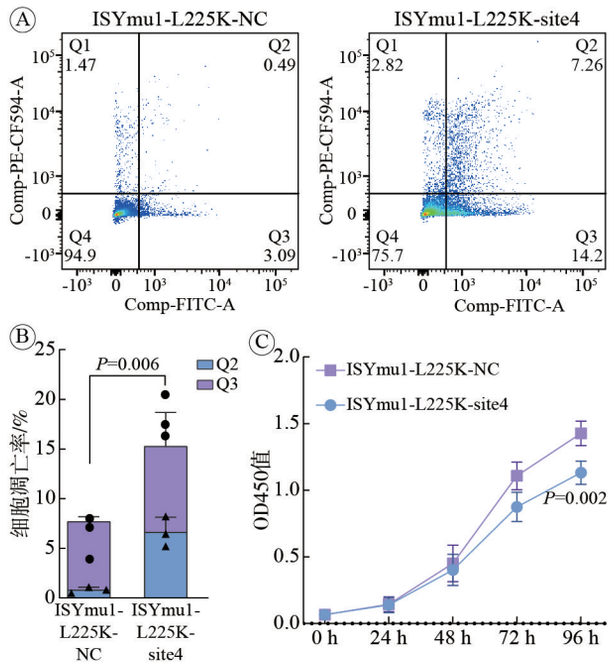
在过去的几年中，得益于CRISPR系统的高效、简便等特性，基因编辑技术迅速发展，Cas9、Cas12等基因编辑工具已用于包括骨肉瘤在内的各种疾病的研究和治疗[19-20]。新近发现的OMEGA-TnpB系统，被认为是Cas12核酸内切酶的进化祖先，现已被重编程为具有与CRISPR-Cas9相似功能的基因编辑工具，其具有天然的紧凑尺寸以及较强的编辑能力[10,21]。本研究通过理性设计，成功筛选出多个TnpB突变体，显著提高了其在哺乳动物细胞中的基因编辑效率。与传统的CRISPR-Cas系统



A：使用ISYmu1-L225K靶向编辑*MDM2*基因不同位点后其mRNA相对表达量；B：使用ISYmu1-L225K靶向编辑*MDM2*基因site4位点后其基因片段Sanger测序峰图，从约200 bp开始出现套峰，表示基因序列出现突变。Site1～6：基于TAM-TTGAT选取的所有*MDM2*靶位点；NC组：转染表达无靶向位点的ωRNA及ISYmu1-L225K质粒。n=3。

图4　ISYmu1-L225K编辑*MDM2*基因后RT-qPCR及Sanger测序结果

Fig. 4　RT-qPCR and Sanger sequencing results after editing of *MDM2* gene by ISYmu1-L225K



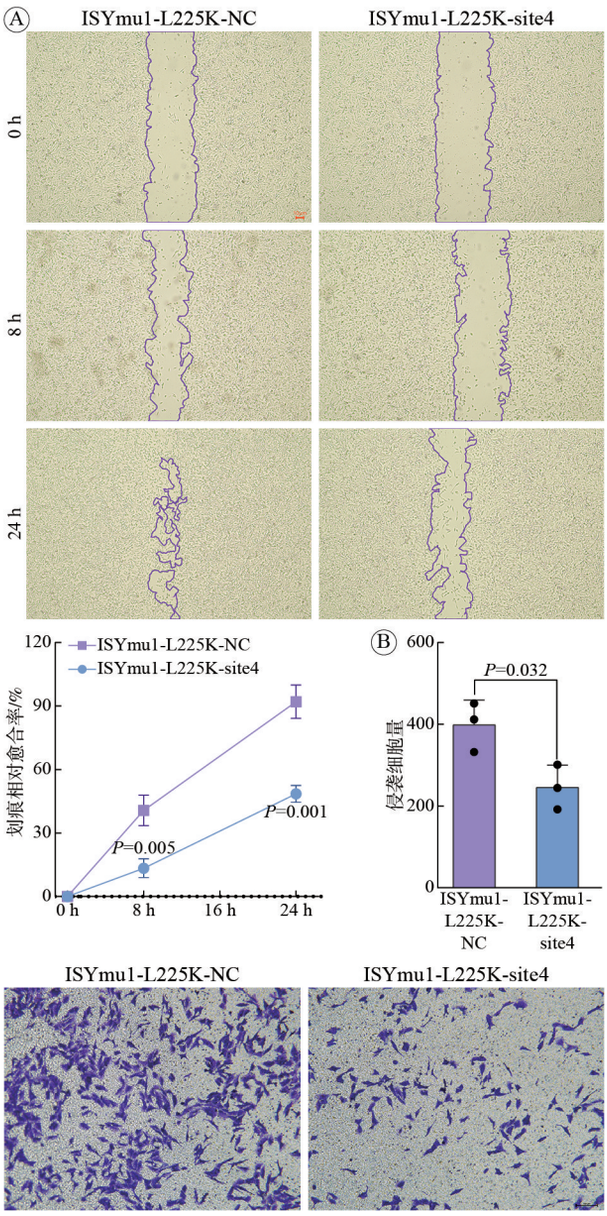
A、B：通过流式测凋亡实验测定细胞的凋亡情况(Q2：晚期凋亡与坏死细胞群；Q3：早期凋亡细胞群)；C：通过CCK-8实验测定细胞的增殖情况。n=3。

图5　敲除*MDM2*基因后对骨肉瘤细胞活力的影响

Fig. 5　Effect of *MDM2* gene knockout on osteosarcoma cell viability

(如SpCas9和enOsCas12f1)比较，TnpB突变体在HEK293T和骨肉瘤细胞中展现出可比的编辑效率，甚至在某些位点优于Cas12f，显示出了OMEGA系统在基因编辑工具开发中的潜力。结构建模表明(AlphaFold3)，相较于野生型ISYmu1(L225)，ISYmu1-L225K中带正电荷的赖氨酸(K225)与ωRNA中引导序列部分形成了新的氢键，这可能增强了TnpB与ωRNA的亲和力，从而提高了突变体ISYmu1-L225K的基因编辑效率(图1C)。值得注意的是，双点叠加突变中部分组合(如ISYmu1-L225K+A227S)未表现出协同效应，提示需结合机器学习模型或适应性进化策略，进一步优化突变组合[22]，这一部分研究在Thornton等[23]发布的预印本中已有报道，该研究通过深度突变扫描及组合优化，使TnpB蛋白在HEK293T细胞中的基因编辑效率提高了近4倍，再次证明TnpB蛋白应用于哺乳动物基因编辑的强大潜力。然而，本研究也揭示了OMEGA系统的局限性——TAM依赖性。TnpB的编辑活性高度依赖TAM序列，在*MDM2*基因的所有外显子中，仅能选取6个编辑位点，其靶点选择灵活性低于Cas9的PAM-NGG，这也将是未来对TnpB系统优化的重要方向。

在骨肉瘤中，*MDM2*往往表现为扩增或过表达，导致p53信号通路被抑制，从而使细胞逃避细胞周期检查点、避免凋亡，并促进增殖、迁移和侵袭。已有许多研究将MDM2蛋白作为骨肉瘤的早期诊断、预后评估的生物学标志物及抗骨肉瘤治疗的新靶点[24]。我们使用ISYmu1-L225K突变体在骨肉瘤细胞系143B中敲除了*MDM2*基因，并在体外实验中证明其削弱了肿瘤的恶性表型，这一结果与*MDM2*对骨肉瘤发生发展的影响基本一致[25]。许多研究结果证实，通过MDM2抑制剂阻断其与p53的相互作用，P53蛋白不再快速降解，其稳定性和活性得以恢复。激活的p53可诱导细胞周期阻滞，促进凋亡，从而抑制骨肉瘤细胞的增殖和恶性转化。但本研究中，敲除*MDM2*后其对骨肉瘤细胞恶性表型影响的具体机制尚未可知(p53依赖途径/非p53依赖途径)，未来可对这一方面进一步探索。本研究不



A：通过划痕实验测定细胞的迁移情况(40 ×)；B：通过Transwell实验测定细胞的增殖情况(100 ×)。n=3。

图 6　敲除 *MDM2* 基因后对骨肉瘤细胞系的迁移与侵袭能力的影响

Fig. 6　Effect of *MDM2* gene knockout on the migration and invasion abilities of osteosarcoma cell lines

仅再次证明了*MDM2*作为骨肉瘤细胞治疗靶点的重要性，作为紧凑型基因编辑工具，理论上TnpB蛋白更易通过腺相关病毒载体进行递送，这也提供了骨肉瘤基因治疗中底盘编辑工具的新选择。

本研究不足之处，首先是需要验证ISYmu1-L225K的脱靶风险和生物安全性，且仅针对骨肉瘤细胞进行了体外研究，尚缺乏体内研究证据。其次，仅针对*MDM2*的单基因敲除，可能并不能带来理想的临床疗效，受益于OMEGA-TnpB系统的紧凑尺寸，其在体内应用上将有更多可变空间，如可以进行多基因同步编辑，或结合合成生物学技术，搭建用于骨肉瘤诊疗的基因回路平台，这一研究正在进行。因此未来应进一步探索ISYmu1-L225K在骨肉瘤基因治疗方面的体内安全性，结合特异性的体内递送系统以及联合其他治疗方式，推动OMEGA-TnpB基因编辑技术向临床转化。

综上所述，本研究通过改造OMEGA-TnpB系统，获取了紧凑型基因编辑工具ISYmu1-L225K，并将其用于骨肉瘤体外基因编辑，发现其抑制了骨肉瘤细胞的恶性行为，为骨肉瘤的治疗提供了新思路。

作者贡献　王梓颖：实验设计，实验操作，统计学分析，文章撰写和修订；陈泽华：方法学，研究指导；王振：实验操作，文章修订；朱庆岩、郭子轩、赵子仪、赵雪林：文献调研，材料提供；许猛：实验设计与指导，审读和修订，获取研究经费。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明　本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取，Email：wangziying202210@163.com。

参考文献

1　Meltzer PS，Helman LJ. New horizons in the treatment of osteosarcoma［J］. N Engl J Med，2021，385（22）：2066-2076.

2　Smeland S，Bielack SS，Whelan J，et al. Survival and prognosis with osteosarcoma：outcomes in more than 2000 patients in the EURAMOS-1（European and American osteosarcoma study）cohort［J］. Eur J Cancer，2019，109：36-50.

3　Gill J，Gorlick R. Advancing therapy for osteosarcoma［J］. Nat Rev Clin Oncol，2021，18（10）：609-624.

4　Nag S，Qin JJ，Srivenugopal KS，et al. The *MDM2*-p53 pathway revisited［J］. J Biomed Res，2013，27（4）：254-271.

5　Hu YW，Zhang H，Guo ZF，et al. CKM and TERT dual promoters drive CRISPR-dCas9 to specifically inhibit the malignant behavior of osteosarcoma cells［J］. Cell Mol Biol Lett，2023，28（1）：52.

6　Wang RX，Wang DD，Bai XS，et al. Kinome-wide CRISPR-Cas9 knockout screens revealed PLK1 as a therapeutic target for osteosarcoma［J］. Cell Death Discov，2023，9（1）：231.

7　Wang YC，Wu JH，Chen H，et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 screen identified KLF11 as a druggable suppressor for sarcoma cancer stem cells［J］. Sci Adv，2021，7（5）：eabe3445.

8　Feng Y，Sassi S，Shen JK，et al. Targeting CDK11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system［J］. J Orthop Res，2015，33（2）：199-207.

9　Wang D，Zhang F，Gao GP. CRISPR-based therapeutic genome editing：strategies and in vivo delivery by AAV vectors［J］. Cell，2020，181（1）：136-150.

（下转第328页）