



解析 T7 RNA 聚合酶：从构效关系到 dsRNA 挑战与生物技术应用*

宁苇辰^{1,2)} 华雨²⁾ 尤慧玲¹⁾ 李秋实²⁾ 吴尧²⁾ 刘云龙^{1)**} 胡振新^{2)**}

(¹⁾ 中国药科大学工学院, 南京 211198; ²⁾ 苏州晶睿生物科技有限公司, 苏州 215000)

摘要 T7 RNA 聚合酶 (T7 RNA polymerase, T7 RNAP) 凭借其独特的结构特性成为研究 RNA 合成机制的重要模型。本文系统解析了其标志性的“右手”结构框架, 并通过整合结构的动态变化和动力学分析, 阐述了完整的 T7 RNAP 转录过程, 构建了从静态结构解析到动态过程的完整框架。T7 RNAP 在催化过程中会产生副产物双链 RNA (dsRNA), 其存在不仅会降低 mRNA 产物的纯度, 还会引发自身非特异性免疫反应, 从而限制 T7 RNAP 在生物技术和医学领域的应用。文中详细探讨了 dsRNA 的形成机理, 并对规避 dsRNA 产生的不同思路及当前研究进展进行了阐述。通过梳理近期研究成果, 本文系统归纳了通过半理性设计改造的 T7 RNAP 突变及突变效果, 如活性和热稳定性的提升、底物和启动子特异性的改变、转录效率改善等, 清晰展现该领域的技术突破路径。此外, T7 RNAP 在基因编辑及基因工程、检测诊断及信号转导、mRNA 疫苗等领域得到快速发展和广泛应用。本文综述了 T7 RNAP 的结构功能、dsRNA 形成机理及规避策略, 同时探讨了 T7 RNAP 工程优化与功能拓展, 并对目前亟待解决的问题进行了阐述, 讨论了当前 T7 RNAP 实际应用中的主要问题并对未来研究的可能方向进行了展望, 旨在为 T7 RNAP 的研发与应用提供新的见解, 促进相关领域的思考与发展。

关键词 T7 RNA 聚合酶, 结构, 功能, 转录, 动力学, dsRNA, mRNA

中图分类号 Q559+.1, Q71

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0115

CSTR: 32369.14.pibb.20250115

分子生物学的核心问题之一是理解遗传信息的传递, 这一过程被称为“中心法则”。在这一框架下, RNA 聚合酶扮演了关键角色: 它负责将 DNA 中的遗传信息转录为 RNA, 实现遗传信息的首次传递。在原核生物中, RNA 聚合酶是由多个亚基组成的大分子复合体, 能够识别特定启动子序列并启动转录; 在真核生物中, RNA 聚合酶进化出用于不同 RNA 合成的 3 类 RNA 聚合酶, 且需要多种辅助因子的参与。

然而, 自然界中还存在一类高度特异的 RNA 聚合酶, 它们由病毒编码, 结构简单却效率极高。19 世纪 70 年代, T7 RNA 聚合酶 (T7 RNA polymerase, T7 RNAP) 首次从噬菌体 T7 感染的大肠杆菌细胞中分离出来^[1-3], 是目前已知催化 RNA 合成最简单的酶之一。与细菌或真核生物的 RNA 聚合酶相比, T7 RNAP 分子质量较小且结构较为简单, 能够独立完成转录过程, 并展现出更高的转录效率和特异性^[4]。

1 T7 RNAP 的特点

1984 年, Moffatt 等^[5] 确定了 T7 RNAP 由 883 个氨基酸组成, 分子质量为 98.8 ku^[5] (表 1), 其功能是将 DNA 转录为 RNA。T7 RNAP 和 T3 RNAP 等单体聚合酶与其他聚合酶的差异在于其转录不需要任何额外的蛋白质因子辅助完成^[4], 且能各自独立介导 T7 和 T3 噬菌体基因的转录。转录过程中, T7 RNAP 的延伸效率约为大肠杆菌 RNA 聚合酶的 5 倍。T7 RNAP 的转录终止仅由 I 类和 II 类终止信号执行^[6-7]。T7 RNAP 还能够复制其他 RNA 聚合酶无法复制的 RNA 发夹环, 并能延长自身互补的 RNA 模板^[4]。

* 国家生物药技术创新中心揭榜挂帅项目 (NCTIB2022HS03002) 和江苏省自然科学基金 (BK20221255) 资助。

** 通讯联系人。

胡振新 Tel: 0512-62626066, E-mail: zhenxin.hu@genevide.com

刘云龙 Tel: 025-86185754, E-mail: liuyunlong@cpu.edu.cn

收稿日期: 2025-03-17, 接受日期: 2025-07-08

Table 1 The comparison of T7 RNAP, *E. coli* RNAP holoenzyme and *Saccharomyces cerevisiae* RNAP II

表1 T7 RNA聚合酶、大肠杆菌RNA聚合酶全酶、酿酒酵母RNA聚合酶II的对比

	T7 RNA聚合酶	大肠杆菌RNA聚合酶	酿酒酵母RNA聚合酶II
组成	单亚基	核心酶5个亚基和σ因子	12个亚基
分子质量/ku	98.8	约500	约500
启动子序列	1种, 17 bp	7种	20余种
转录起始因子	0	4种σ因子	5种转录因子
转录终止因子	I型终止子和II型终止子	ρ因子依赖性终止子和内源性终止子	CPF-CF和NNS等多种蛋白质复合物
转录效率	约230 nt/s	约50 nt/s	—

CPF-CF: 切割与多聚腺苷酸化因子-切割因子(cleavage and polyadenylation factor-cleavage factor); NNS: Nrd1-Nab3-Sen1。

除了转录目标产物RNA之外, T7 RNAP在转录反应中也会产生副产物, 如: 短RNA链、双链RNA或环回双链RNA^[8]等。

2 T7 RNAP的结构与功能

2.1 T7 RNAP的结构

Moffatt等^[5]的工作鉴定了T7 RNAP由N端结

构域(1~325 aa)和聚合酶结构域(326~883 aa)组成, 为后续的研究工作提供了基础框架。聚合酶结构域具有u形折叠^[9], 整体呈α螺旋。T7 RNAP的结构与“右手”类似, 组成T7 RNAP“右手”结构的3个子结构域分别称之为“拇指”、“手掌”和“手指”(图1)。聚合酶的活性位点位于这3个子域形成的深裂缝中^[9], 由Asp537和Asp812与

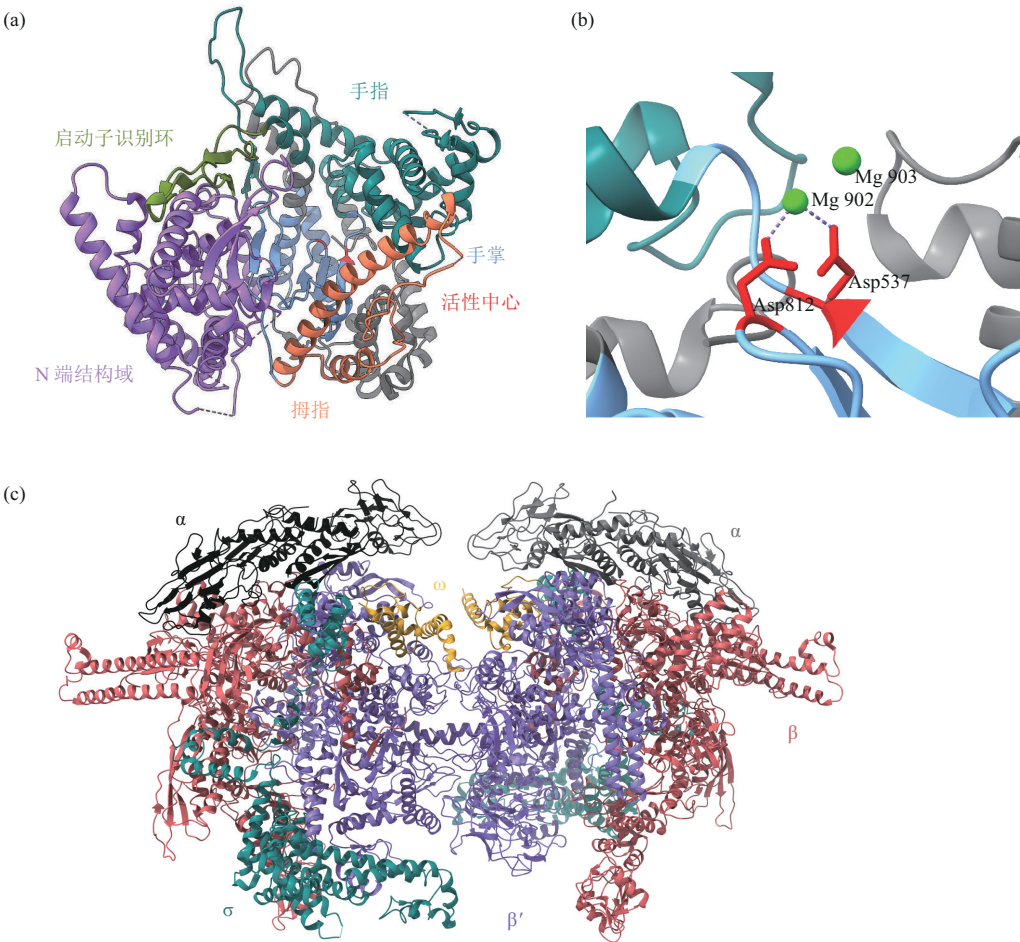


Fig. 1 The structure diagrams of T7 RNAP and *E. coli* RNAP^[11]

图1 T7 RNAP、大肠杆菌RNAP结构图^[11]

(a) T7 RNAP结构图 (PDB 3E2E); (b) T7 RNAP活性中心 (PDB 1S77); (c) *E. coli* RNAP结构图 (PDB 4LJZ)。

Mg²⁺组成其催化活性中心, 其中Mg²⁺ A与活性位点始终保持紧密结合, 并促进RNA末端核苷酸的3'-O对NTP的 α -磷酸的亲核攻击, 而Mg²⁺ B通过释放PPi从活性位点解离, 与NTP的 β 磷酸和 γ 磷酸形成配位键, 确保底物的正确定位和定向。两个Mg²⁺通过中和磷酸基团的负电荷, 降低反应活化能, 促进磷酸二酯键的形成并稳定过渡态构象^[10]。

“拇指”子结构域由第330~410位氨基酸残基组成, 其主要功能是在转录延伸阶段稳定转录复合物并维持活性^[12]。“拇指”与DNA结合时发生第一次构象转变, 形成“夹子”, 以防T7 RNAP-RNA复合体解离, 并允许复合体沿着DNA滑动。当RNA转录本长度达到5 nt时, “拇指”发生第二次构象转变^[12], 这种转变可能会形成“滑动索”以防RNA从复合体中解离。“手掌”子结构域由386~448、532~540和788~838三段氨基酸残基组成, 其中包含Asp537和Asp812, 是催化反应过程中两个关键的残基。第417~429位氨基酸残基会形成发卡结构, 在转录前期稳定DNA-RNA复合体^[12]。“手指”子结构域由541~738和771~778两段氨基酸残基组成, 含高度保守的O-螺旋, 其向活性中心的摆动可推动模板DNA与NTP精准配对。“手指”结构域与“拇指”结构域共同形成“钳状结构”, 将DNA-RNA复合体包裹在活性中心内, 防止其提前解离^[10]。

除此之外, T7 RNAP还有4个结构域: N端结构域(1~325 aa)、四螺旋束(449~531 aa)、启动子识别环(739~770 aa)和C端结构域(839~883 aa)。N端结构域的功能是结合单链RNA, 促进RNA从模板链解离。N端结构域的残基形成聚合酶上游表面带正电的凹槽, 该凹槽与聚合酶活性位点的形成有关^[12]。此外, N端结构域在启动子结合和双链DNA打开中发挥着作用: 第93~101位氨基酸残基结合启动子中富含AT的元件, 第232~242位氨基酸残基形成一个“插入发夹”, 插入模板链和非模板链之间, 打启动子。四螺旋束的功能目前还未完全明确, 有待研究。启动子识别环的N端和C端在空间上距离很近, 因此该元件可以插入聚合酶结构域, 并发生细微改动^[12]。Sousa等^[13]认为第739~770位氨基酸残基参与识别T7启动子, 其与启动子7~11 bp序列有特异性结合, 尤其是Asn748决定模板DNA在核酸间隙中的极性和RNA合成的方向。C端结构域参与T7溶菌酶(T7 lysozyme, T7 L)对T7 RNAP的调控^[12]。T7 L在

T7 RNAP转录进程中有两个作用: a. T7 L固定聚合酶元件之间的相对位置, 可能改变它们的方向或者限制转录周期各阶段的构象变化; b. 抑制T7 RNAP的转录活性^[12]。

2.2 T7 RNAP结构的柔韧性

T7 RNAP的结构域在不同状态下发生相对运动。例如, 上面提到的“拇指”结构和插入发夹等区域在不同的转录阶段可能会发生构象变化, 以适应DNA的结合和转录泡的形成。3个子域形成的深裂缝可以容纳DNA模板, 裂缝的宽度和深度在不同阶段有所变化, 这种变化允许聚合酶在转录过程中适应不同长度的DNA和RNA分子。相较于多亚基RNAP调动多种调控因子, T7 RNAP无需调控因子便能产生这些精妙的转变, 实现对转录精准的动态调整, 足以展现极佳的柔韧性。Grodberg等^[14]发现, T7 RNAP可以被omp T蛋白酶水解生成20 ku和80 ku的两个片段, 被切断的片段在非变性条件下混合后仍保持转录活性。这一特性被朱听团队^[15]得以应用, 他们全化学合成了3个T7 RNAP多肽片段, 并在体外组装成具有完整功能的镜像T7 RNAP。这一策略显著降低了长链镜像RNA的合成难度及成本。传统方法若遵循中心法则的路径合成镜像RNA, 则需要一系列镜像翻译体系与转录体系的支持, 而镜像T7 RNAP的直接转录能力则有效突破了传统化学合成法的技术瓶颈。值得注意的是, T7 RNAP的柔韧性不仅在其镜像异构体中得到验证, 还为基于T7 RNAP片段自组装特性的其他应用开发提供了思路。Chee等^[16]设计了一种新的温度调控系统: 沙门氏菌*TlpA*基因编码一种阻遏蛋白, 该蛋白质的卷曲结构域与T7 RNAP的N端或C端融合, 形成N-TlpA或C-TlpA。Thermal-T7 RNAP系统将能够实现温度控制的内含子引入聚合酶中, 该系统设计简便, 通过改变N-TlpA/C-TlpA比例就可实现对热变化高度敏感的“ON/OFF”响应。

2.3 转录的动态结构

T7 RNAP完整的转录周期包括3个阶段: 起始、延伸和终止^[8]。起始阶段, T7 RNAP特异性识别启动子序列(启动子不同区域对应着不同的功能(图2)^[17-18]), 其与启动子DNA的结合速率约为 $1.9 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[19]。在大多数T7启动子的转录起始位点(+1位), GTP被特异性识别为转录起始NTP。T7 RNAP中Pro266与DNA-RNA复合体的稳定性有关, 其刚性结构在启动子解离和构象转

变中发挥了重要作用。P266L突变体在RNA长度不足7 nt前不会进行耦合运动, 使得突变体C骨架灵活性增加, 能够吸收来自不断增长的DNA-RNA复合体的压力, 提高复合体的稳定性, 并减少流产RNA。

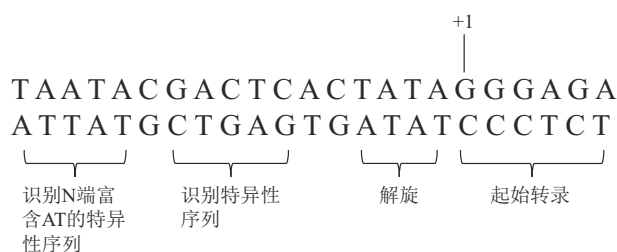


Fig. 2 Sequences and functions of promoter

图2 启动子序列及其功能

刚合成的短片段RNA (≤ 9 nt) 由于与DNA的结合不稳定或由于DNA的退火压力, 会从DNA上解离下来, 形成长度为2~9 nt的流产RNA。当模板DNA压缩到一定程度后, 通常是RNA链延伸至9 nt时, 启动子从转录初始复合物 (initiation complex, IC) 中释放。此时, 转录进入延伸阶段, 形成延伸复合物 (elongation complex, EC)。从IC到EC的转变涉及复合体构象的变化, 包括“手指”子域、N端结构域和插入发夹等结构, 这些结构重排的区域大部分在聚合酶N端结构域^[20], 形成RNA离开通道, 可以观察到的特征如转录泡上游的DNA不再与启动子识别环接触。

延伸过程的中间复合态结构^[21]显示, 当RNA长度达到8 nt时, 启动子及其结合区域旋转 45° 。当T7 RNAP从IC构象到EC构象转变时, N端结构域在结构上重新排列以释放DNA启动子。N端结构域的变化是3个不同类型构象变化共同作用的结果。首先是刚性移动, 6个连续的 α 螺旋共同旋转 140° , 从IC平移30 Å, α 螺旋之间可以容纳至少3 bp的双链。当这6个 α 螺旋重新平移到IC中启动子原先的位置时, T7 RNAP与启动子的相互作用消除, 启动子随即解离^[22]。其次是 α 螺旋的拉伸, 一个 α 螺旋在相邻 α 螺旋的作用下从22 Å拉伸到50 Å, 并且这两个 α 螺旋会重新折叠, 引起第一个 α 螺旋的进一步拉伸。与刚性移动类似, 拉伸的 α 螺旋突出在IC中6个 α 螺旋原先的位置。最后是形成反向平行的 α 螺旋。N端结构域160~190位氨基酸残基区域进行延伸折叠并移动70 Å, 这个区域

新形成一个较短的螺旋和一个环, 再形成反向平行的 α 螺旋, 称为H亚结构域。

新形成的RNA离开孔道由“手掌”、特殊袢环和H亚结构域组成, 直径8 Å, 长20 Å, 内部带有电荷。当DNA-RNA复合体长度为7 bp时, RNA单链产物的5'端与H亚结构域接触进入离开孔道, 孔道可以容纳5个核苷酸, 故此时RNA长度可以达到12 nt^[23]。H亚结构域的另一侧与非模板DNA链接触以稳定EC构象。

当RNA转录至13 nt时, EC稳定地沿着DNA模板链移动, 直到聚合酶识别到终止子, 转录反应终止并释放RNA (图3)。T7 RNAP可以识别I类终止子和II类终止子。I类终止子T Φ 会形成富含GC的发夹^[22], 该发夹可能破坏DNA-RNA复合体之间的碱基对, 无法将RNA固定在复合体中, 从而终止转录。同时, 该结构可以帮助减慢转录速度, 为RNA二级结构的形成提供必要的时间。II类终止子的序列是ATCTGTT, 该序列出现在T7基因组的串联体连接处 (concatemer junction, CJ), 只起到暂停转录的作用, 转录在该元件下游7~8 nt处暂停, 若该序列后紧随一个富含T的序列, 则具有终止子的功能^[7], 由II类终止子终止的RNA链无发卡结构。T7 L能够增强II类终止子的作用, 对IC到EC的转变存在抑制作用, 而I类终止子的终止作用不受T7 L的干扰^[7]。

保真度是衡量RNA转录质量的一个重要指标, T7 RNAP的保真度是 8.1×10^{-5} ^[24]。多亚基RNAP的转录若掺入错误的NTP, 聚合酶会减慢或终止下一个NTP的掺入, 进行“回溯”并通过校对因子辅助聚合酶进行校对^[25]。与多亚基RNAP相比, T7 RNAP没有校正错配NTP的功能。对于T7 RNAP, Y639是确保其保真度的关键残基^[26]: Mg^{2+} 通过与NTP的2'-OH和Y639的羟基形成配位键来区分dNTP和NTP, 确保碱基正确配对, 故而在该位点突变可以影响T7 RNAP区分dNTP和NTP的能力。为了确保NTP底物正确, T7 RNAP在进入催化活性构象之前就开始进行底物选择^[26], 只有底物与模板碱基正确配对, 聚合酶才会转变为催化活性的构象, 为RNA合成的保真度提供保障。

2.4 转录动力学

在研究T7 RNAP的转录机制时, 除了通过结构的动态变化分析转录过程外, 还可以结合酶动力学, 如T7 RNAP与底物结合的亲和力、催化过程中构象变化的速率及动力学特征等, 进而深入理解

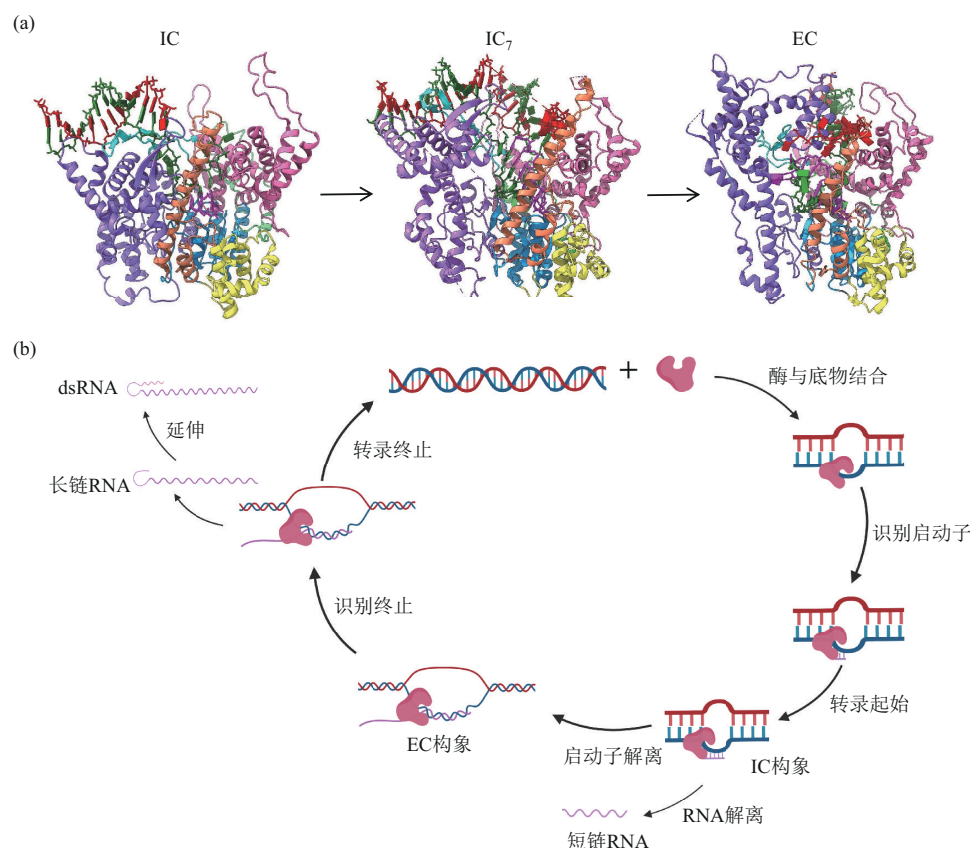


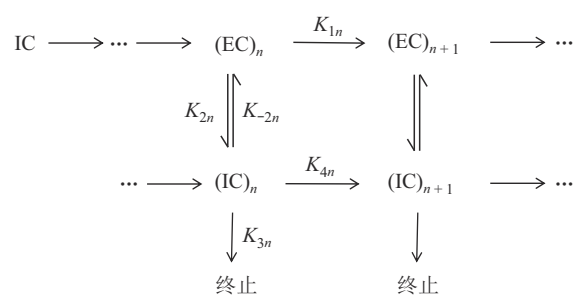
Fig. 3 Transcription schematic diagram of T7 RNAP

图3 T7 RNAP转录示意图

(a) T7 RNAP转录不同阶段结构图^[11]: IC指转录初始构象 (PDB 1QLN)、IC₇指合成7 nt RNA时的中间态构象 (PDB 3E2E)、EC指转录稳定延伸阶段的构象 (PDB 1MSW); (b) T7 RNAP转录流程图。本图使用BioRender.com平台绘制。

T7 RNAP的催化机理。

T7 RNAP对其同源启动子表现出高亲和力，其解离常数 (K_d) 约为 5×10^{-9} mol/L^[27]，可快速形成 IC。从 IC 向 EC 的转变是 T7 RNAP 转录的初始阶段，该阶段转录过程缓慢低效，产生短的转录产物。不同长度的 RNA 合成速率常数存在较大差异^[20, 28]。当 RNA 长度达到 8 nt 时^[28]，IC 构象开始向 EC 构象转变 (图 4，不同 K 值含义见表 2)，此时 EC 形成速率常数 K 为 0.0004 s^{-1} ；RNA 长度达到 9~12 nt 时，T7 RNAP 脱离启动子进入延伸期，此时会有 1.2 s 停顿，是 T7 RNAP 从 IC 转化为 EC 并与启动子分离后，完成 RNA 合成所需的时间^[20]；当 RNA 长度达到 12 nt 时，此时 EC 形成速率常数 K 为 $0.3 \sim 0.6 \text{ s}^{-1}$ 。由此可知，IC 到 EC 的构象转变主要发生在合成 12 nt RNA 阶段。之后，RNA 的合成变得快速和持续。当 $K_1 \gg K_2$ 时，表明 EC 构

Fig. 4 The kinetic model of T7 RNAP transcription^[7]图4 T7 RNAP转录动力学模型^[7]

象稳定，能稳定地进行延伸。Tang 等^[29] 采用荧光法检测的 K_1 为 $2.0 \sim 6.9 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ ，碱基的不同使得 K_1 的具体数值有所差异。

转录进入终止阶段在动力学上表现为 $K_2 > K_1$ ，此时会有两种情况：若 $K_4 > K_3$ ，复合体处于 IC 构

象,能够缓慢进行RNA延伸,直至IC构象不足以支撑复合体;若 $K_3>K_4$,转录彻底终止,复合体解离,新生RNA从复合体中释放。 K_3 的数值与携带T7 RNAP的载体相关^[30]。

Table 2 Transcription parameters of T7 RNAP
表2 T7 RNAP转录参数

参数		含义	参考数值
保真度		错配率	8.1×10^{-5}
K_d		解离常数	5×10^{-9} mol/L
K		初始阶段EC构象的形成速率常数	$0.3\sim0.6$ s ⁻¹
K_1		EC构象中下一个碱基增加常数	$2.0\sim6.9$ $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$
$K_2、K_{-2}$		EC构象与IC构象之间相互转换的常数	—
K_3		IC构象中转录终止常数	—
K_4		IC构象中下一个碱基增加常数	—
$K_{d, \text{ GTP}}$		对GTP的亲力和常数	2.4 ± 0.6 $\mu\text{mol/L}$
$K_{d, \text{ wt}}$		野生型T7 RNAP对二核苷酸帽类似物的亲力和常数	18 ± 3 $\mu\text{mol/L}$
$K_{d, \text{ A488T/R571S}}$		A488T/R571S突变体对二核苷酸帽类似物的亲力和常数	0.82 ± 0.15 $\mu\text{mol/L}$

理论上 T7 L 可能会影响任一速率常数,但研究表明, T7 L 可能在起始和终止时发挥作用^[31]:通过与 T7 RNAP 的 IC 构象结合并抑制其向 EC 构象的转化,即 T7 L 会使 K_2 降低(或使 K_3 升高),学者 Lyakhov 等^[7]倾向 T7 L 的主要作用是降低 K_2 。

2.5 dsRNA的研究

随着 mRNA 药物的研发日益深入, dsRNA 作为转录副产物且引发人体免疫反应,其生成机制及消除方法成为近年来研究的热点。Mu 等^[32]研究表明, dsRNA 可被黑色素瘤分化相关基因 5 (melanoma differentiation-associated protein 5, MDA5) 识别并激活免疫系统,影响 mRNA 药物的安全性和有效性^[33-34]。dsRNA 的形成机制主要涉及以下两种途径。a. 通过模板 RNA 定向延伸扩展机制^[35-37]:释放的 RNA 可以结合静息状态的 T7 RNAP,该过程依赖 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 活性,以自身 RNA 为模板,顺式折叠从上游序列转录进行延伸。T7 RNAP 转录效率高,据报道其可产生 1 000 倍于转录模板量的产物^[38]。随着转录产物 RNA 不断积累,导致 T7 RNAP 与 RNA 结合而延伸生产 dsRNA 的量变得愈发显著。b. 无启动子的 DNA 末端反转录机制^[32]:退火时 T7 RNAP 非特异性识别 DNA 模板末端富含 GC 的序列元件,以不依赖启动子的方式从 DNA 末端启动转录引发反向互补链的转录,生成全长 dsRNA,并可能产生发卡结构或形成链间连接。值得注意的是,这两种转录均可被低浓度的 Mg^{2+} 抑制。如何减少 T7 RNAP

转录中 dsRNA 的形成成为研究人员重点关注的问题之一^[24, 39],相关领域取得的进展有以下几个方面。

2.5.1 增加RNA纯化步骤

dsRNA 作为 T7 RNAP 体外转录体系的主要非特异性副产物,需通过纯化工艺实现高效去除以降低其免疫原性。基于核酸链构象差异的层析技术可特异性分离单链 mRNA 与 dsRNA。BioNTech 公司公开了一种纤维素亲和层析去除 dsRNA 的工艺^[40]——在含乙醇缓冲液中,纤维素基质通过氢键和疏水作用与 dsRNA 形成特异性结合,而对单链 mRNA 的吸附效率极低。该工艺可有效去除 90% 的 dsRNA 杂质,且能高效回收 mRNA。该工艺适用范围广泛,不受编码序列和核苷酸组合的影响,30~1 000 bp 长度范围内的 dsRNA 能被有效去除。这种高兼容性纯化策略显著提升了产物的纯度,代表了一种高效经济且简单的去除 dsRNA 的方法,为治疗性 mRNA 制剂的体内应用提供了重要的质量保障。

2.5.2 提高转录温度

在 mRNA 生产过程中,纯化步骤的增加会导致产物收率下降,因此需优化 mRNA 的生产反应条件以避免过多的纯化步骤。提升转录反应温度具有诸多优点:首先,高温可有效破坏 RNA 分子内碱基配对,有效消除转录产物形成的茎环等二级结构;其次,高温可加快 RNA 聚合酶的转录延伸速度,减少了 RNA 聚合酶在 GC 富集区的暂停现象,从而降低模板链折叠形成的局部双链结构的概

率^[41]；此外，高温可破坏RNA-RNA同源双链或RNA-DNA异源双链的稳定性，抑制dsRNA的积累。然而，高温同样对T7 RNAP的稳定性存在负面影响，优化与筛选耐热的T7 RNAP成为近来相关领域的研究热点之一^[42]。

2.5.3 突变和筛选得到较好的突变体或其他同工酶

筛选出少产生或不产生dsRNA的突变体成为T7 RNAP工程化改造的方向之一^[43]。T7 RNAP的双突变体G47A/884G^[32]，与野生型RNA聚合酶合成的mRNA产物在体内的蛋白质表达一致，而dsRNA产量大幅减少，无需下游RP-HPLC纯化。朱斌团队^[44-45]最近从嗜冷噬菌体VSW-3中发现了一种VSW-3 RNAP，该酶与T7 RNAP有31%的同源性，其产生的mRNA在IVT中的表达水平是T7 RNAP的5倍，且无3'端延伸，几乎不产生dsRNA和末端环回RNA^[45]。

2.5.4 采取融合蛋白质方法

近年来，Martin等^[46-47]将HaloTag结构域融合到T7 RNAP的N端，完成了RNA聚合酶构建体，该构建体与3'-巯基修饰的模板DNA共价交联至同一载体（通常为磁珠），在结合位点周围存在局部

高浓度的启动子。在高盐浓度条件下，其仅发生依赖启动子的转录，而产物RNA与T7 RNAP在高盐条件下无法结合或延伸^[48]。此方法使得目的RNA产量增加而dsRNA的产量大幅度下降，载体可重复使用，适合大规模生产。

2.5.5 碱基修饰

Sioud等^[49]发现，C5位和N1-甲基位修饰的假尿嘧啶（Ψ）可以被T7 RNAP接受为底物，合成完整的mRNA转录本。例如，5-甲基尿苷（m⁵U）、5-甲氧基尿苷（mo⁵U）、5-羟甲基尿苷（hm⁵U）、N1-甲基尿苷（m¹Ψ）和N1-乙基尿苷（Et¹Ψ），这些修饰在转录过程中显著减少dsRNA的形成。但Et¹Ψ会降低翻译效率，故一个理想的策略是，结合具体T7 RNAP突变体和碱基修饰的类型，通过直接检测dsRNA水平来验证优化的效果。

2.6 T7 RNAP的工程化改造

在T7 RNAP研究及应用过程中，野生型酶在热稳定性、启动子特异性等方面存在局限性。近年来有不少关于T7 RNAP突变体的研究，从多个方面对T7 RNAP进行工程化改造（表3）。

Table 3 Research on T7 RNAP mutants

表3 T7 RNAP突变体研究

类别	突变体	特性改变	文献
催化活性	D537N	无活性	[50]
	K631M	活性降至2%	
	Y639F	活性不变	
耐热性	S430P/N433T/S633P/F849I/F880Y/G788A组合突变体	50℃时仍保持高活性	[51]
	Q786L/S430P/L446F/S606V/K642G/S633P/L217L/S397W/L534V/A124N/G618E/L665D组合突变体	T_m 值高出野生型12.8℃，且活性是野生型的4倍	[52]
副产物减少	S43Y	几乎消除了RdRP活性	[53]
	G47A/884G双突变体	RNA 3'同源性比G47A单突变体提高了2倍，消除了dsRNA产物的形成	[54]
	G753A	dsRNA减少，结合K389A突变可保持mRNA的完整性	[55]
转录完整性	K389A	提高了mRNA的完整性，片段率下降	[33]
	N171A	mRNA的完整性有不同程度地提高	
	K172A		
	Q754A		
底物特异性	P266L	短流产RNA减少，长流产RNA增多	[56]
	TM10	能利用dNTP合成单链DNA	[57]
启动子特异性	M5	启动子识别转换为T3启动子	[58]
	M6-L		
	M6-S		
共转录加帽	T7-68	选择性掺入帽类似物，抑制dsRNA生成	[24]

目前已发表的T7 RNAP的突变体不下百种, 但是理想突变体十分稀少, 因为突变可能存在与预期不符甚至截然相反的结果, 如活性降低甚至消失^[50]。例如, D537N突变体丧失催化活性, 而K631M突变催化活性降至2%, 但Y639F突变体则保持催化活性不变。

除了提升催化活性外, T7 RNAP热稳定性提升是不少研究人员关注的方向。洪亮团队^[52]开发的PRIME模型是一种融合掩码语言建模(masked language modeling, MLM)和序列-细菌菌株最佳生长温度(optimal growth temperature, OGT)关联分析的深度学习框架。该模型通过多任务学习策略, 同步优化MLM任务(学习蛋白质序列的上下文规律)和OGT预测任务(捕获耐热性相关的氨基酸使用偏好), 从而在无任何突变数据条件下预测目标蛋白的稳定突变位点。对于T7 RNAP, 研究团队利用PRIME模型对全序列单点饱和突变进行突变评分, 并筛选了高评分的单点突变位点进行后续湿实验验证。纯化后的突变体蛋白与染料结合, 通过差示扫描荧光法(differential scanning fluorimetry, DSF)计算 T_m 值。同时进行转录实验以测定酶活性, 实验使用含有T7启动子的iSpinach DNA模板, 该模板的转录产物与荧光染料DFHBI结合后会发出荧光, 其强度与RNA产量正相关。依据单点突变的 T_m 值, 继续训练PRIME模型, 并预测了2~8点组合突变体的 T_m 值。最后, 整合所有单点及多点突变数据, 直接预测9~14点组合突变体的 T_m 值, 经过3轮迭代优化与实验验证后获得一个具有12个突变位点的突变体(Q786L/S430P/L446F/S606V/K642G/S633P/I217L/S397W/L534V/A124N/G618E/L665D)。该突变体的 T_m 值较野生型T7 RNAP显著提高了12.8°C, 转录活性达到野生型的4倍。

在众多突变体中, 存在一些少产生或不产生dsRNA的突变体。例如G47A/884G的T7 RNAP双突变体^[54], 消除了dsRNA产物的形成, 且流产RNA的生成量降到检测水平以下。该突变体的G47A取代有利于N端结构域重排以释放启动子, 促进了IC向EC的过渡, 极大地减少了流产RNA的生成, C端结构域的884G突变增加了此结构域“足部”区域的体积和空间位阻, 从而降低了T7 RNAP对RNA模板的亲合力, 抑制了RNA模板介导的转录过程。除此之外, 有一些突变体, 如K389A、N171A等突变体能够使T7 RNAP转录出

更多的全长mRNA, 提高全长率, 降低片段mRNA产率^[33]。这些突变体通过降低dsRNA的免疫性或降低mRNA片段率, 同样能减弱mRNA在应用过程中所产生的不利作用。

一部分T7 RNAP在突变后其特异性发生改变。如TM10突变体(D10E/I581F/A586V/A615T)^[57], 对核苷酸底物的特异性发生改变, 能利用dNTP合成DNA。TM10突变体在“手指”结构域引入大体积疏水基团和极性羟基基团, 协同形成疏水环境并产生空间位阻效应, 降低了酶对NTP的亲合力并限制其构象灵活性。因此, 在高NTP环境下, TM10突变体仍能通过其“手指”结构域的关键突变维持对dNTP的底物选择性, 优先利用dNTP合成单链DNA(ssDNA)。

多组合突变体M6-S(R96L/K98R/E207K/E222K/N748D/P759S)的启动子识别完全转化为T3启动子。T7和T3启动子仅有5个碱基的差异。该组合突变体通过引入正电荷, 改变了原有的静电作用和刚性结构, 消除了野生型对T7启动子的静电偏向, 并增强与T3启动子的结合。最终酶的启动子识别彻底转化为T3启动子, 并对其表现出高活性。有少量突变体启动子强度减弱^[39], 表现为与T7 RNAP结合能力减弱或在启动子处无法开始转录, 这类突变给转录带来负面影响, 降低转录效率。

在传统共转录体系中, 野生型T7 RNAP对二核苷酸帽类似物的结合亲和力不到GTP的1/8(表2)^[24, 59]。T7-68突变体能够选择性掺入帽类似物^[24], 结合能力显著提高, 在帽类似物/GTP摩尔比1:1条件下即可实现(93±2)%的加帽效率。此外, 在转录保真度(8.2×10^{-5})与野生型T7 RNAP(8.1×10^{-5})无显著差异的前提下, 该突变体dsRNA副产物的产生减少至原来的1/50以下, 生成的mRNA免疫原性更低, 翻译效率提高8倍。

除此之外, 对T7启动子的修饰或突变亦是优化T7 RNAP功能的一种方式(表4)。如P266L突变体与A-15C启动子的组合可有效减少RNA流产^[56], T7 #4、T7 Max和T7 c62启动子可以提高转录产量^[60-61], T7 D启动子可以增强启动子强度^[62], T7 lac启动子允许T7转录被IPTG等诱导剂调控^[63]。启动子突变与聚合酶突变体协同作用, 极大地提升了T7 RNAP的转录性能及可调控性。

目前对T7 RNAP的功能改造研究取得了不同程度的进展, 但尚未完全满足研究或生产的需要,

Table 4 Research on T7 promoter mutations
表4 T7启动子突变研究

启动子	序列	来源	功能
WT T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGA	野生型T7噬菌体	启动转录
A-15C启动子	TACTACGACTCACTATAGGGAGA	定点突变	减少长的流产性RNA产物并提高转录效率
T7 #4	TAATACGACTCACTATAGGGATAAT	启动子修饰	提高启动子活性
T7 Max	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGA	定点突变	增加基因表达
T7 c62	TAATACGACTCACAAATCCGGAG	定点突变	表达水平提升2倍
T7 DI-7	TAATACGACTCACTATAGGGTTTAA	启动子修饰	转录性能提升50%
T7 D启动子	CTTTAG~CTTTAG~TTGACT(−35)~CTTTAG~CTTTAG	两组重复序列CTTTAG关于−35区域对称排列	增强启动子强度，16℃开始转录
T7 lac启动子	TAATACGACTCACTATAGGGAGA~GGAATTGTGAGCGATAACAATT	T7启动子和大肠杆菌的lac启动子融合	可被IPTG等诱导剂控制转录

T7 D启动子序列详见参考文献 [62]。

因为一个特性的改变常伴有其他特性的变化。在定向进化过程中，进一步研究 T7 RNAP 结构和功能的关系，通过对活性中心或与启动子结合区域的氨基酸残基进行定向进化或理性设计，有望开发出具有更高转录效率和特异性的突变体，在合成复杂 RNA 或进行基因表达调控时更加准确高效，减少副产物的转录。

3 T7 RNAP的应用

T7 RNAP 凭借其高度特异性、高效性及操作简单等优点，常被用于科学研究、医药诊断或 mRNA 生产的酶原料。近年来，T7 RNAP 主要在以下几个方面得到应用和发展。

3.1 体外RNA合成

T7 RNAP 是体外转录反应中常用的酶之一，能够以 DNA 为模板高效地合成各种 RNA 分子，包括 mRNA、rRNA、tRNA 等。这些体外合成的 RNA 可用于多种研究，如 mRNA 的翻译研究、非编码 RNA 的功能研究、RNA-蛋白质相互作用研究等。不久前，朱听课题组 [15] 合成了具有转录活性的“镜像” T7 RNAP，能转录“镜像”的 RNA 分子，进一步扩展了 RNA 研究范围，为抗 RNase 水解的 RNA 药物的开发提供了支持。

3.2 基因编辑和基因工程

T7 RNAP 及其相关系统在基因工程和基因编辑领域展现出显著的应用价值。T7 RNAP 可用于构建 CRISPR 激活系统，例如，经工程化改造的 T7 启动子在多种利什曼原虫物种中成功驱动 CRISPR 基因编辑器（cytosine base editor, CBE）的单链导向 RNA（single-guide RNA, sgRNA）高效表达，

并且对寄生虫的生长速率无显著影响 [64]。相较于传统内源性启动子的表达，T7 RNAP 系统表现出显著增强的转录效率与表达一致性 [65]。通过构建含有 T7 启动子和 T7 RNAP 基因的转录系统，可精准调控外源基因在动植物体内的特异性表达，为动植物基因功能研究和作物精准遗传改良提供了高效且可编程的工具。

3.3 检测诊断与信号转导

T7 RNAP 可用于核酸检测，如核酸依赖性扩增检测技术（nucleic acid sequence-based amplification, NASBA）、RNA 实时荧光核酸等温扩增检测（simultaneous amplification and testing, SAT）反应等，近年来也被应用在基于 CRISPR 酶的核酸检测研究 [66-67]。这些研究利用了 T7 RNAP 转录功能，将模板核酸转化为 RNA 后，能特异性结合与 Cas 酶结合的 sgRNA，激活 Cas13 的旁切酶活性，从而增强检测灵敏度。在生物信号传感领域，T7 RNAP 可以用于放大检测信号。T7 RNAP 催化的荧光扩增技术（fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique, FACTT）是一种能在室温下检测抗原的技术 [68]。当抗原存在时，形成抗原-抗体-适配体复合物，激活 T7 RNAP，产生大量 RNA。这些 RNA 与荧光标记的互补核酸序列杂交发出荧光信号，通过荧光信号的强度判断抗原的浓度。以 FACTT 为代表的新兴免疫检测技术，提高了酶联免疫吸收分析（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）检测的灵敏度 [69]，可以检测出 ELISA 无法识别的抗原物质，弥补了 ELISA 的缺点和不足。T7 RNAP 连接的免疫传感测定（T7 RNA polymerase-linked

immunosensing assay, TLISA) (预印本) 和毛细管免疫测定技术将特异性分子识别与高效信号放大技术结合^[70-71], 实现了复杂生物样本中目标分子的精准检测。

3.4 mRNA疫苗和治疗性药物开发

辉瑞公司的新型冠状病毒感染 (COVID-19) 疫苗是首个获批生产的 mRNA 疫苗^[72], 同时也是首例使用 T7 RNAP 生产的 mRNA 疫苗, 其核心技术依赖于 T7 RNAP 介导的体外转录系统。这一技术的成功应用, 标志着 mRNA 疫苗技术进入快速发展的阶段, 实现了 mRNA 疫苗从基础研究向临床应用转化的关键突破。T7 RNAP 凭借其高效的转录能力和对 T7 启动子的高度特异性, 成为 mRNA 疫苗生产中体外转录的主流生产用酶原料之一。

3.5 病毒学研究

为了克服体外拯救病毒的局限性, 研究人员开发了一种基于 T7 RNAP 的体内病毒拯救系统^[73-74]。该系统通过构建能够稳定表达 T7 RNAP 的细胞系, 并结合相应的转录元件, 病毒 cDNA 在该转录元件控制下将质粒直接转染到宿主细胞内, 在宿主细胞或宿主动物体内达到病毒拯救的目的, 实现病毒的“复活”。此外, 该系统还可进一步应用于动物模型中, 以研究病毒的体内感染特性。这种体内病毒拯救系统的建立, 不仅克服了传统体外拯救方法中病毒组装效率低、易受细胞环境限制等问题, 还为深入研究 RNA 病毒的复制机制、宿主适应性以及病毒与宿主之间的相互作用提供了更为高效和生理相关的实验平台。

4 T7 RNAP的未来研究

尽管 T7 RNAP 的研究已在体外转录、合成生物学及 mRNA 技术等领域取得重要突破, 但其功能优化与创新应用仍存在广阔探索空间。基于结构生物学与蛋白质工程的最新进展以及 T7 RNAP 在工业界的应用前景, 以下问题的解决不仅具有理论意义, 也具有十分重要的应用价值。

4.1 用于mRNA高效生产的T7 RNAP的优化

mRNA 药物的生产过程涉及转录、加帽及甲基化等步骤, 为了提升生产效率, 以下是可以深入研究的几个方向。

4.1.1 提升共转录效率

传统的 mRNA 生产中, 加帽反应发生在转录之后。通过对 T7 RNAP 的改造, 将转录与加帽两

步反应合并成一步, 称之为共转录。该策略减少反应及纯化步骤, 提升了生产效率, 降低生产成本, 逐渐成为主流的 mRNA 合成路线。筛选对帽类似物具有高亲和力的 T7 RNAP 突变体, 突破传统体系中 GTP 竞争性抑制的瓶颈, 提高 mRNA 加帽和翻译效率, 是目前 T7 RNAP 工艺改造的热点。

4.1.2 减少dsRNA形成的T7 RNAP突变体

在转录反应体系中, T7 RNAP、DNA 模板及转录的 RNA 产物的浓度及三者之间的比例, 都会影响 dsRNA 形成。以西兰花 (Broccoli) DNA 为模板进行转录时, 仅稍改 T7 RNAP/DNA 的摩尔比例, 在加入 DFHBI 染料后就能观察到荧光值迅速增加到平台值 (Broccoli 产物与染料结合), 然后缓慢下降 (Broccoli RNA 延伸)^[75]。在筛选能减少 dsRNA 形成的 T7 RNAP 突变体中, 降低聚合酶对 RNA 的亲合力是一个值得努力的方向: 即使在转录产物浓度很高的条件下, T7 RNAP 突变体仍然倾向结合 DNA 进行转录而不是结合高浓度的 RNA 进行 dsRNA 的合成。

4.1.3 多酶偶联系统

开发 T7 RNAP 的多酶偶联系统对加快 mRNA 药物开发等具有积极意义。将 T7 RNAP 与甲基转移酶通过基因工程手段融合在一起, 实现转录-加帽-甲基化“一步式”反应, 减少反应时间和操作复杂性, 提高 mRNA 的合成效率和质量; 将 T7 RNAP 与非洲猪瘟病毒的单亚基加帽酶相结合, 在酿酒酵母菌中进行表达, 其蛋白质表达比野生型高出约两个数量级^[76]。这种多酶偶联系统有效解决了传统 T7 RNAP 转录产物因缺乏 5'端帽结构而导致 mRNA 在真核系统中翻译效率低下的问题。

4.2 新的T7 RNAP活性报告系统

早期 T7 RNAP 活性检测的量化基于放射性标记的 NTP。后来通过转录产物与荧光染料结合进行检测, 例如菠菜 (Spinach) 和 Broccoli 系统, 该荧光报告系统被应用于 T7 RNAP 的动力学研究和定向进化筛选^[77], 并能高效区分 T7 RNAP 的突变体是否形成 dsRNA^[75]。然而, 此类系统在高温条件下功能受限, 推测是由于温度升高影响 Broccoli DNA 的二级及三级结构以及 RNA 与染料的结合, 使得该系统无法应用于高温 T7 RNAP 的筛选。设计耐高温的转录报告系统将是一个非常有意义的方向。

4.3 冻干稳定性提升

T7 RNAP 的冻干有利于提升酶的稳定性, 降

低保存及运输成本。然而,在冻干过程中,T7 RNAP会出现活性受损的情况(作者的未发表数据)。研究T7 RNAP的损伤机制并筛选耐冻干的突变体,对提高其冻干保存的稳定性和活性具有理论意义及应用价值。

4.4 T7 RNAP的深度学习及应用

DeepMind团队因开发AlphaFold 2被授予2024年诺贝尔化学奖^[78-79],以表彰其为蛋白质工程提供了革命性工具。洪亮团队^[52]通过开发的PRIME模型,成功筛选出具有高活性和高稳定性的多点T7 RNAP突变体。这一成果不仅验证了AI预测结构的潜力和创新性,还提升了蛋白质稳定性和活性设计的成功率,同时在资源有限的条件下,提高了实验效率。将已有的T7 RNAP突变体动力学以及结构数据进行深度学习后,利用AI捕获到人类不易理解的结构-功能关系,更精准地输出符合应用目的的T7 RNAP序列。

此外,T7 RNAP在基因电路、活细胞传感器及DNA纳米技术等领域展现出广阔的应用前景。受限于篇幅,本文未能对这些领域进行深入探讨。

5 总 结

本文总结了T7 RNAP研究的当前进展及尚未解决的关键问题。T7 RNAP作为生物技术领域的核心工具酶之一,已成功应用于基因工程、疫苗制备和科学研究等领域。随着T7 RNA结构与功能关系的深入研究,T7 RNA有望在未来拓展新的应用领域。持续的技术创新将加速T7 RNAP从基础科学研究向产业化应用的转化,推动相关学科发展,为基础研究、精准医学及合成生物学等发展注入新动能。

参 考 文 献

- [1] Chamberlin M, McGrath J, Waskell L. New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. *Nature*, 1970, **228**(5268): 227-231
- [2] Summers W C, Siegel R B. Transcription of late phage RNA by T7 RNA polymerase. *Nature*, 1970, **228**(5277): 1160-1162
- [3] Gelfand D H, Hayashi M. *In vitro* synthesis of a DNA dependent RNA polymerase coded on coliphage T7 genome. *Nature*, 1970, **228**(5277): 1162-1165
- [4] Arnaud-Barbe N, Cheynet-Sauvion V, Oriol G, *et al.* Transcription of RNA templates by T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**(15): 3550-3554
- [5] Moffatt B A, Dunn J J, Studier F W. Nucleotide sequence of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *J Mol Biol*, 1984, **173**(2): 265-269
- [6] MacDonald L E, Durbin R K, Dunn J J, *et al.* Characterization of two types of termination signal for bacteriophage T7 RNA polymerase. *J Mol Biol*, 1994, **238**(2): 145-158
- [7] Lyakhov D L, He B, Zhang X, *et al.* Pausing and termination by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J Mol Biol*, 1998, **280**(2): 201-213
- [8] Qin W, Li L, Yang F, *et al.* High-throughput iSpinach fluorescent aptamer-based real-time monitoring of *in vitro* transcription. *Bioresour Bioprocess*, 2022, **9**(1): 112
- [9] Jeruzalmi D, Steitz T A. Structure of T7 RNA polymerase complexed to the transcriptional inhibitor T7 lysozyme. *EMBO J*, 1998, **17**(14): 4101-4113
- [10] Cheetham G M, Steitz T A. Structure of a transcribing T7 RNA polymerase initiation complex. *Science*, 1999, **286**(5448): 2305-2309
- [11] Pettersen E F, Goddard T D, Huang C C, *et al.* UCSF ChimeraX: structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci*, 2021, **30**(1): 70-82
- [12] Sousa R, Mukherjee S. T7 RNA polymerase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2003, **73**: 1-41
- [13] Sousa R, Chung Y J, Rose J P, *et al.* Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Nature*, 1993, **364**(6438): 593-599
- [14] Grodberg J, Dunn J J. ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol*, 1988, **170**(3): 1245-1253
- [15] Xu Y, Zhu T F. Mirror-image T7 transcription of chirally inverted ribosomal and functional RNAs. *Science*, 2022, **378**(6618): 405-412
- [16] Chee W K D, Yeoh J W, Dao V L, *et al.* Highly reversible tunable thermal-repressible split-T7 RNA polymerases (thermal-T7RNAPs) for dynamic gene regulation. *ACS Synth Biol*, 2022, **11**(2): 921-937
- [17] Ikeda R A, Ligman C M, Warshamana S. T7 promoter contacts essential for promoter activity *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**(10): 2517-2524
- [18] Zhu J, Liu Z, Lou C, *et al.* Decoding and reengineering the promoter specificity of T7-like RNA polymerases based on phage genome sequences. *Nucleic Acids Res*, 2025, **53**(5): gkaf140
- [19] Tang G Q, Patel S S. Rapid binding of T7 RNA polymerase is followed by simultaneous bending and opening of the promoter DNA. *Biochemistry*, 2006, **45**(15): 4947-4956
- [20] Koh H R, Roy R, Sorokina M, *et al.* Correlating transcription initiation and conformational changes by a single-subunit RNA polymerase with near base-pair resolution. *Mol Cell*, 2018, **70**(4): 695-706.e5
- [21] Durniak K J, Bailey S, Steitz T A. The structure of a transcribing T7 RNA polymerase in transition from initiation to elongation. *Science*, 2008, **322**(5901): 553-557
- [22] Stano N M, Patel S S. The intercalating beta-hairpin of T7 RNA polymerase plays a role in promoter DNA melting and in

- stabilizing the melted DNA for efficient RNA synthesis. *J Mol Biol*, 2002, **315**(5): 1009-1025
- [23] Yin Y W, Steitz T A. Structural basis for the transition from initiation to elongation transcription in T7 RNA polymerase. *Science*, 2002, **298**(5597): 1387-1395
- [24] Miller M, Alvizo O, Baskerville S, *et al.* An engineered T7 RNA polymerase for efficient co-transcriptional capping with reduced dsRNA byproducts in mRNA synthesis. *Faraday Discuss*, 2024, **252**: 431-449
- [25] Sydow J F, Cramer P. RNA polymerase fidelity and transcriptional proofreading. *Curr Opin Struct Biol*, 2009, **19**(6): 732-739
- [26] Temiakov D, Patlan V, Anikin M, *et al.* Structural basis for substrate selection by T7 RNA polymerase. *Cell*, 2004, **116**(3): 381-391
- [27] Ujvári A, Martin C T. Thermodynamic and kinetic measurements of promoter binding by T7 RNA polymerase. *Biochemistry*, 1996, **35**(46): 14574-14582
- [28] Tang G Q, Roy R, Bandwar R P, *et al.* Real-time observation of the transition from transcription initiation to elongation of the RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(52): 22175-22180
- [29] Tang G Q, Anand V S, Patel S S. Fluorescence-based assay to measure the real-time kinetics of nucleotide incorporation during transcription elongation. *J Mol Biol*, 2011, **405**(3): 666-678
- [30] Arnold S, Siemann M, Scharnweber K, *et al.* Kinetic modeling and simulation of *in vitro* transcription by phage T7 RNA polymerase. *Biotechnol Bioeng*, 2001, **72**(5): 548-561
- [31] Zhang X, Studier F W. Mechanism of inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase by T7 lysozyme. *J Mol Biol*, 1997, **269**(1): 10-27
- [32] Mu X, Greenwald E, Ahmad S, *et al.* An origin of the immunogenicity of *in vitro* transcribed RNA. *Nucleic Acids Res*, 2018, **46**(10): 5239-5249
- [33] He W, Zhang X, Zou Y, *et al.* Effective synthesis of high-integrity mRNA using *in vitro* transcription. *Molecules*, 2024, **29**(11): 2461
- [34] Hu C, Bai Y, Liu J, *et al.* Research progress on the quality control of mRNA vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 2024, **23**(1): 570-583
- [35] Jain N, Blauch L R, Szymanski M R, *et al.* Transcription polymerase-catalyzed emergence of novel RNA replicons. *Science*, 2020, **368**(6487): eaay0688
- [36] Biebricher C K, Luce R. Template-free generation of RNA species that replicate with bacteriophage T7 RNA polymerase. *EMBO J*, 1996, **15**(13): 3458-3465
- [37] Gholamalipour Y, Karunanayake Mudiyansele A, Martin C T. 3' end additions by T7 RNA polymerase are RNA self-templated, distributive and diverse in character-RNA-Seq analyses. *Nucleic Acids Res*, 2018, **46**(18): 9253-9263
- [38] Milligan J F, Groebe D R, Witherell G W, *et al.* Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res*, 1987, **15**(21): 8783-8798
- [39] Yu B, Chen Y, Yan Y, *et al.* DNA-terminus-dependent transcription by T7 RNA polymerase and its C-helix mutants. *Nucleic Acids Res*, 2024, **52**(14): 8443-8453
- [40] Baierdörfer M, Boros G, Muramatsu H, *et al.* A facile method for the removal of dsRNA contaminant from *in vitro*-transcribed mRNA. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, **15**: 26-35
- [41] Wu M Z, Asahara H, Tzertzinis G, *et al.* Synthesis of low immunogenicity RNA with high-temperature *in vitro* transcription. *RNA*, 2020, **26**(3): 345-360
- [42] 韦威, 姚红, 李胤直, 等. 一种T7 RNA聚合酶突变体及其制备方法和应用: 中国, 116179507B. 2025-01-24
- Wei W, Yao H, Li Y Z, *et al.* A T7 RNA polymerase mutant and its preparation method and application: CN, 116179507B. 2025-01-24
- [43] 刘想, 唐琼卫, 朱思思, 等. T7 RNA聚合酶突变体及其应用: 中国, 118222535B. 2025-01-14
- Liu X, Tang Q W, Zhu S S, *et al.* T7 RNA polymerase mutants and their applications: CN, 118222535B, 2025-01-14
- [44] Wang G, Cheng R, Chen Q, *et al.* mRNA produced by VSW-3 RNAP has high-level translation efficiency with low inflammatory stimulation. *Cell Insight*, 2022, **1**(5): 100056
- [45] Xia H, Yu B, Jiang Y, *et al.* Psychrophilic phage VSW-3 RNA polymerase reduces both terminal and full-length dsRNA byproducts in *in vitro* transcription. *RNA Biol*, 2022, **19**(1): 1130-1142
- [46] MalagodaPathiranage K, Banerjee R, Martin C T. A new approach to RNA synthesis: immobilization of stably and functionally co-tethered promoter DNA and T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, 2024, **52**(17): 10607-10618
- [47] Cavac E, Ramírez-Tapia L E, Martin C T. High-salt transcription of DNA cotethered with T7 RNA polymerase to beads generates increased yields of highly pure RNA. *J Biol Chem*, 2021, **297**(3): 100999
- [48] MalagodaPathiranage K, Cavac E, Chen T H, *et al.* High-salt transcription from enzymatically gapped promoters nets higher yields and purity of transcribed RNAs. *Nucleic Acids Res*, 2023, **51**(6): e36
- [49] Sioud M, Juzeniene A, Sæbøe-Larssen S. Exploring the impact of mRNA modifications on translation efficiency and immune tolerance to self-antigens. *Vaccines (Basel)*, 2024, **12**(6): 624
- [50] Osumi-Davis P A, de Aguilera M C, Woody R W, *et al.* Asp537, Asp812 are essential and Lys631, His811 are catalytically significant in bacteriophage T7 RNA polymerase activity. *J Mol Biol*, 1992, **226**(1): 37-45
- [51] He W, Zhang X, Zou Y, *et al.* Effective synthesis of circRNA via a thermostable T7 RNA polymerase variant as the catalyst. *Front Bioeng Biotechnol*, 2024, **12**: 1356354
- [52] Jiang F, Li M, Dong J, *et al.* A general temperature-guided language model to design proteins of enhanced stability and activity. *Sci Adv*, 2024, **10**(48): eadr2641
- [53] Wu H, Wei T, Yu B, *et al.* A single mutation attenuates both the transcription termination and RNA-dependent RNA polymerase activity of T7 RNA polymerase. *RNA Biol*, 2021, **18**(sup1):

- 451-466
- [54] Dousis A, Ravichandran K, Hobert E M, *et al.* An engineered T7 RNA polymerase that produces mRNA free of immunostimulatory byproducts. *Nat Biotechnol*, 2023, **41**(4): 560-568
- [55] He W, Geng Q, Ji G, *et al.* Effective synthesis of mRNA during *in vitro* transcription with fewer impurities produced. *Molecules*, 2024, **29**(19): 4713
- [56] Tang G Q, Nandakumar D, Bandwar R P, *et al.* Relaxed rotational and scrunching changes in P266L mutant of T7 RNA polymerase reduce short abortive RNAs while delaying transition into elongation. *PLoS One*, 2014, **9**(3): e91859
- [57] Chu W, Tian R, Guo Y, *et al.* An evolved, orthogonal ssDNA generator for targeted hypermutation of multiple genomic loci. *Nucleic Acids Res*, 2025, **53**(3): gkaf051
- [58] E C, Dai L, Yu J. Switching promotor recognition of phage RNA polymerase in silico along lab-directed evolution path. *Biophys J*, 2022, **121**(4): 582-595
- [59] Vaidyanathan S, Azizian K T, Ashiquel Haque A M, *et al.* Uridine depletion and chemical modification increase Cas9 mRNA activity and reduce immunogenicity without HPLC purification. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, **12**: 530-542
- [60] Sari Y, Sousa Rosa S, Jeffries J, *et al.* Comprehensive evaluation of T7 promoter for enhanced yield and quality in mRNA production. *Sci Rep*, 2024, **14**(1): 9655
- [61] Deich C, Cash B, Sato W, *et al.* T7Max transcription system. *J Biol Eng*, 2023, **17**(1): 4
- [62] Ozoline O N, Uteshev T A, Masulis I S, *et al.* Interaction of bacterial RNA-polymerase with two different promoters of phage T7 DNA. Conformational analysis. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1172**(3): 251-261
- [63] Liang Q, Tu B, Cui L. Recombinant T7 RNA polymerase production using ClearColi BL21(DE3) and animal-free media for *in vitro* transcription. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2024, **108**(1): 41
- [64] Herrmann May N, Cao A, Schmid A, *et al.* Improved base editing and functional screening in *Leishmania* via co-expression of the AsCas12a ultra variant, a T7 RNA polymerase, and a cytosine base editor. *eLife*, 2025, **13**: RP97437
- [65] 张香琴, 苏承刚, 杜小兵, 等. T7RNAP 基因的克隆及其质体定位表达载体的构建. *南方农业*, 2010, **4**(3): 35-37
Zhang X Q, Su C G, Du X B, *et al.* *South China Agric*, 2010, **4**(3): 35-37
- [66] Zilberzwige-Tal S, Altae-Tran H, Kannan S, *et al.* Reprogrammable RNA-targeting CRISPR systems evolved from RNA toxin-antitoxins. *Cell*, 2025, **188**(7): 1925-1940.e20
- [67] Zhang Z, Li J, Chen C, *et al.* Exploring T7 RNA polymerase-assisted CRISPR/Cas13a amplification for the detection of BNP via electrochemiluminescence sensing platform. *Anal Chim Acta*, 2024, **1300**: 342409
- [68] Zhang H, Cheng X, Richter M, *et al.* A sensitive and high-throughput assay to detect low-abundance proteins in serum. *Nat Med*, 2006, **12**(4): 473-477
- [69] 朱自满, 李世拥, 安萍, 等. T7 RNA 聚合酶催化荧光扩增技术检测结肠癌患者外周血肿瘤细胞的临床意义. *华北国防医药*, 2008, **20**(3): 17-18
Zhu Z M, Li S Y, An P, *et al.* *Med J Natl Defending Forces N China*, 2008, **20**(3): 17-18
- [70] McSweeney M A, Patterson A T, Loeffler K, *et al.* A modular cell-free protein biosensor platform using split T7 RNA polymerase. *bioRxiv*, 2024, DOI:10.1101/2024.07.19.604303
- [71] Shieh Y, Swartz A R, Rustandi R R. Detection of residual T7 RNA polymerase used in mRNA *in vitro* transcription by Simple Western. *Electrophoresis*, 2024, **45**(19/20): 1834-1839
- [72] Vogel A B, Kanevsky I, Che Y, *et al.* BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2. *Nature*, 2021, **592**(7853): 283-289
- [73] 郑海学, 常艳艳, 靳野, 等. 以 T7 RNA 聚合酶为基础的病毒拯救系统研究进展. *动物医学进展*, 2007, **28**(11): 62-65
Zheng H X, Chang Y Y, Jin Y, *et al.* *Prog Vet Med*, 2007, **28**(11): 62-65
- [74] 吴锦艳, 田宏, 郑海学, 等. 逆转录病毒载体介导的 T7RNA 聚合酶在猪源细胞 PK15 及 SK6 中的稳定表达. *畜牧兽医学报*, 2011, **42**(4): 527-532
Wu J Y, Tian H, Zheng H X, *et al.* *Chin J Anim Vet Sci*, 2011, **42**(4): 527-532
- [75] 胡振新, 李秋实, 华雨, 等. 一种筛选 T7RNA 聚合酶是否产生 dsRNA 的检测方法、核酸序列组合及其应用: 中国, 118957023. 2025-06-17
Hu Z X, Li Q S, Hua Y, *et al.* A detection method for screening whether T7 RNA polymerase produces dsRNA, nucleic acid sequence combination and application thereof: CN, 118957023. 2025-06-17
- [76] Kar S, Gardner E C, Javanmardi K, *et al.* Directed evolution of an orthogonal transcription engine for programmable gene expression in eukaryotes. *iScience*, 2024, **28**(1): 111541
- [77] Sawant A A, Tripathi S, Galande S, *et al.* A prebiotic genetic nucleotide as an early Darwinian ancestor for pre-RNA evolution. *ACS Omega*, 2024, **9**(16): 18072-18082
- [78] Li B, Gilbert S. Artificial Intelligence awarded two Nobel Prizes for innovations that will shape the future of medicine. *NPJ Digit Med*, 2024, **7**(1): 336
- [79] Jumper J, Evans R, Pritzel A, *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 2021, **596**(7873): 583-589

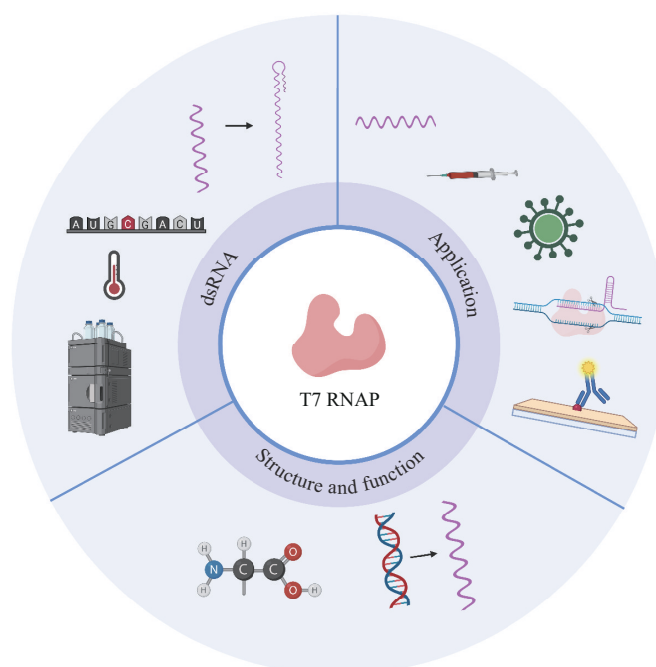
Analysis of T7 RNA Polymerase: From Structure–function Relationship to dsRNA Challenge and Biotechnological Applications*

NING Wei-Chen^{1,2)}, HUA Yu²⁾, YOU Hui-Ling¹⁾, LI Qiu-Shi²⁾, WU Yao²⁾,
LIU Yun-Long^{1)**}, HU Zhen-Xin^{2)**}

(¹⁾School of Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

²⁾GeneVide Biotechnology Co., Ltd, Suzhou 215000, China)

Graphical abstract



Abstract T7 RNA polymerase (T7 RNAP) is one of the simplest known RNA polymerases. Its unique structural features make it a critical model for studying the mechanisms of RNA synthesis. This review systematically examines the static crystal structure of T7 RNAP, beginning with an in-depth examination of its characteristic “thumb”, “palm”, and “finger” domains, which form the classic “right-hand-like” architecture. By detailing these structural elements, this review establishes a foundation for understanding the overall organization of T7 RNAP. This review systematically maps the functional roles of secondary structural elements and their subdomains in transcriptional catalysis, progressively elucidating the fundamental relationships between structure and function.

* This work was supported by grants from “Open Competition to Select the Best Candidates” Key Technology Program for Nucleic Acid Drugs of NCTIB (2022HS03022) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20221255).

** Corresponding author.

HU Zhen-Xin. Tel: 86-512-62626066, E-mail: zhenxin.hu@genevide.com

LIU Yun-Long. Tel: 86-25-86185754, E-mail: liyunlong@cpu.edu.cn

Received: March 17, 2025 Accepted: July 8, 2025

Further, the intrinsic flexibility of T7 RNAP and its applications in research are also discussed. Additionally, the review presents the structural diagrams of the enzyme at different stages of the transcription process, and through these diagrams, it provides a detailed description of the complete transcription process of T7 RNAP. By integrating structural dynamics and kinetics analyses, the review constructs a comprehensive framework that bridges static structure to dynamic processes. Despite its advantages, T7 RNAP has a notable limitation: it generates double-stranded RNA (dsRNA) as a byproduct. The presence of dsRNA not only compromises the purity of mRNA products but also elicits nonspecific immune responses, which pose significant challenges for biotechnological and therapeutic applications. The review provides a detailed exploration of the mechanisms underlying dsRNA formation during T7 RNAP catalysis, reviews current strategies to mitigate this issue, and highlights recent progress in the field. A key focus is the semi-rational design of T7 RNAP mutants engineered to minimize dsRNA generation and enhance catalytic performance. Beyond its role in transcription, T7 RNAP exhibits rapid development and extensive application in fields, including gene editing, biosensing, and mRNA vaccines. This review systematically examines the structure-function relationships of T7 RNAP, elucidates the mechanisms of dsRNA formation, and discusses engineering strategies to optimize its performance. It further explores the engineering optimization and functional expansion of T7 RNAP. Furthermore, this review also addresses the pressing issues that currently need resolution, discusses the major challenges in the practical application of T7 RNAP, and provides an outlook on potential future research directions. In summary, this review provides a comprehensive analysis of T7 RNAP, ranging from its structural architecture to cutting-edge applications. We systematically examine: (1) the characteristic right-hand domains (thumb, palm, fingers) that define its minimalistic structure; (2) the structure-function relationships underlying transcriptional catalysis; and (3) the dynamic transitions during the complete transcription cycle. While highlighting T7 RNAP's versatility in gene editing, biosensing, and mRNA vaccine production, we critically address its major limitation—dsRNA byproduct formation—and evaluate engineering solutions including semi-rationally designed mutants. By synthesizing current knowledge and identifying key challenges, this work aims to provide novel insights for the development and application of T7 RNAP and to foster further thought and progress in related fields.

Key words T7 RNAP, structure, function, transcription, kinetics, dsRNA, mRNA

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0115

CSTR: 32369.14.pibb.20250115