

www.pibb.ac.cn



# 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<sup>1,2)</sup> 华 雨<sup>2)</sup> 尤慧玲<sup>1)</sup> 李秋实<sup>2)</sup> 吴 尧<sup>2)</sup> 刘云龙<sup>1)\*\*</sup> 胡振新<sup>2)\*\*</sup> (<sup>1)</sup> 中国药科大学工学院,南京 211198; <sup>2)</sup> 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、检测诊断及信号传导、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,讨论了当前的 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。 上世纪七十年代,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<sup>[1-3]</sup>,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<sup>[4]</sup>。

# 1 T7 RNAP的特点

1984年, Moffatt 等<sup>[5]</sup>确定了T7 RNAP由883 个氨基酸组成,分子质量为98.8 ku<sup>[5]</sup>(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<sup>[4]</sup>,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

<sup>\*</sup> 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					
	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,18 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	5种		
转录效率	约230 nt/s	约50 nt/s	-		

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

止信号执行<sup>[67]</sup>。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<sup>[4]</sup>。

除了转录目标产物RNA之外,T7RNAP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<sup>[8]</sup>等。

# 2 T7 RNAP的结构与功能

#### 2.1 T7 RNAP的结构

Moffatt等<sup>[5]</sup>的工作鉴定了T7 RNAP由N端结构域(1~325)和聚合酶结构域(326~883)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<sup>[9]</sup>,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<sup>[9]</sup>,由Asp537和Asp812与Mg<sup>2+</sup>组成 其催化活性中心,其中Mg<sup>2+</sup>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Mg<sup>2+</sup>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Mg<sup>2+</sup>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<sup>100</sup>。



 Fig. 1 The structure diagrams of T7 RNAP and E. coli RNAP<sup>[11]</sup>

 图1 T7 RNAP、大肠杆菌RNAP结构图<sup>[11]</sup>

 T7 RNAP(th)
 (RDP 2020)

 (RDP 2020)
 (h) T7 RNAP(th)

 (RDP 2020)
 (h) T7 RNAP(th)

(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)。

"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<sup>[12]</sup>。"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<sup>[12]</sup>,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<sup>[12]</sup>。"手 指"子结构域由 541~738和771~778两段残基组 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<sup>[10]</sup>。

除此之外, T7 RNAP还有4个结构域: N端结 构域 (1~325), 四螺旋束 (449~531), 启动子识 别环 (739~770) 和C端结构域 (839~883)。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<sup>[12]</sup>。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,打开启动子。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<sup>[12]</sup>。Sousa<sup>[13]</sup>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, LYS) 对T7 RNAP的调控<sup>[12]</sup>。LYS在T7 RNAP转录进程 中有两个作用: a. LYS 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<sup>[12]</sup>。

### 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<sup>[14]</sup> 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<sup>[15]</sup>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<sup>[16]</sup>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<sup>[8]</sup>。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)<sup>[17-18]</sup>),其与启动子 DNA的结合速率约为1.9×10<sup>8</sup> mol<sup>-1</sup>·L·s<sup>-1[19]</sup>。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。

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



 Fig. 2
 Sequences and functions of promoter

 图2
 启动子序列及其功能

构重排的区域大部分在聚合酶N端结构域<sup>[20]</sup>,形成RNA离开通道,可以观察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<sup>[21]</sup>显示,当RNA 长度达到8nt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30Å,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<sup>[22]</sup>。其次是α螺旋的拉伸, 一个 a 螺旋在相邻 a 螺旋的作用下从 22 Å 拉伸到 50Å,并且这两个α螺旋会重新折叠,引起第一个  $\alpha$ 螺旋的进一步拉伸。与刚性移动类似,拉伸的 $\alpha$ 螺旋突出在IC中6个a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70Å,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Η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8Å,长20Å,内部带有电荷。当DNA-RNA复合体长度为7bp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<sup>[23]</sup>。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TΦ会形成富含 GC的发夹<sup>[22]</sup>,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<sup>[7]</sup>,由II类终止子终止的RNA链 无发卡结构。LYS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LYS的干扰<sup>[7]</sup>。

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<sup>-5</sup><sup>[24]</sup>。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<sup>[25]</sup>。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<sup>[26]</sup>: Mg<sup>2+</sup>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<sup>[26]</sup>,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T7 RNAP 的催化机理。



图3 T7 RNAP转录示意图

(a) T7 RNAP转录不同阶段结构图<sup>[11]</sup>: IC指转录初始构象 (PDB 1QLN)、IC<sub>7</sub>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 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<sup>-9</sup> mol/L<sup>[27]</sup>,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<sup>[20, 28]</sup>。当RNA长度达到8nt时<sup>[28]</sup>, 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<sup>-1</sup>; 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<sup>[20]</sup>;当RNA长度达到12nt时,此时EC形成速 率常数 K 为 0.3~0.6 s<sup>-1</sup>。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 $K_1 >> K_2$ 时,表明 EC构象稳定,能稳定地进行延伸。Tang等<sup>[29]</sup>采 用荧光法检测的 $K_1$ 为2.0~6.9  $\mu$ mol<sup>-1</sup>·L·s<sup>-1</sup>,碱基的 不同使得K,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<sub>3</sub>>K<sub>4</sub>,转录彻底终止,复合体解 离,新生RNA从复合体中释放。K<sub>3</sub>的数值与携带 T7 RNAP的载体相关<sup>[30]</sup>。

理论上LYS可能会影响任一速率常数,但研究表明,LYS可能在起始和终止时发挥作用<sup>[31]</sup>:通过与T7 RNAP的IC构象结合并抑制其向EC构象的转化,即LYS会使 $K_2$ 降低(或使 $K_3$ 升高),学者Lyakhov等<sup>[7]</sup>倾向LYS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<sup>[32]</sup>的研 究表明,dsRNA 可被 MDA 5 识别并激活免疫系统, 影响 mRNA 药物的安全性和有效性<sup>[33-34]</sup>。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<sup>[35-37]</sup>:释放的 RNA 可以结 合静息状态的 T7 RNAP,依赖 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1000倍于





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

参数	含义	参考数值			
保真度	错配率	8.1×10 <sup>-5</sup>			
$K_{ m d}$	解离常数	5×10 <sup>-9</sup> mol/L			
K	初始阶段EC构象的形成速率常数	0.3~0.6 s <sup>-1</sup>			
$K_1$	EC构象中下一个碱基增加常数	$2.0 \sim 6.9 \ \mu mol^{-1} \cdot L \cdot s^{-1}$			
$K_{2}, K_{-2}$	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	_			
$K_{d, GTP}$	对GTP的亲和力常数	2.4±0.6 µmol/L			
K <sub>d, wt</sub>	野生型T7 RNAP对二核苷酸帽类似物的亲和力常数	18±3 µmol/L			
К <sub>d, А488Т/R571S</sub>	A488T/R571S突变体对二核苷酸帽类似物的亲和力常数	0.82±0.15 µmol/L			

转录模板量的产物<sup>[38]</sup>。随着转录产物RNA不断积 累,导致T7RNAP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<sup>[32]</sup>:退火时T7RNAP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<sup>2+</sup>抑制。如何减少T7RNAP转录中dsRNA的 形成成为研究人员重点关注的问题之一<sup>[24, 39]</sup>,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T7RNAP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<sup>[40]</sup> ——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, 30~1000 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<sup>[41]</sup>;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<sup>[42]</sup>。

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<sup>[43]</sup>。T7 RNAP 的 双突变体 G47A/884G<sup>[32]</sup>,与野生型 RNA 聚合酶合 成的 mRNA 产物在体内的蛋白表达一致,而 dsRNA 产量大幅减少,无需下游 RP-HPLC 纯化。 朱斌团队<sup>[45]</sup>最近从嗜冷噬菌体 VSW-3 中发现了一 种 VSW-3 RNAP<sup>[4445]</sup>,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<sup>[45]</sup>。

2.5.4 采取融合蛋白方法

近年来, Martin 等<sup>[46-47]</sup> 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T7RNAP在高盐 条件下无法结合或延伸<sup>[48]</sup>。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<sup>[49]</sup>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(m<sup>5</sup>U)、 5-甲氧基尿苷(mo<sup>5</sup>U)、5-羟甲基尿苷(hm<sup>5</sup>U)、 N1-甲基尿苷(m<sup>1</sup>Ψ)和N1-乙基尿苷(Et<sup>1</sup>Ψ),这 些修饰在转录过程中显著减少dsRNA的形成。但 Et<sup>1</sup>Ψ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					
类别	突变体	特性改变	文献		
	D537N	无活性			
催化活性	K631M	活性降至2%	[50]		
	Y639F	活性不变			
	S430P/N433T/S633P/F849I/F880Y/G788A	50 ℃时仍保持高活性	[51]		
耐热性	Q786L/S430P/L446F/S606V/K642G/S633P/L217L/S397W/L534V/ A124N/G618E/L665D组合突变体	T <sub>m</sub> 值高出野生型12.8℃,且活性是野生型的4倍	[52]		
	S43Y	几乎消除了RdRP活性	[53]		
副产物减 少	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]		
	K389A	提高了mRNA的完整性,片段率下降			
<b> </b>	N171A		- [22]		
转求元整 性 	K172A	mRNA的完整性有不同程度地提高			
	Q754A				
	P266L	短流产RNA减少,长流产RNA增多	[56]		
底物特异 性	TM10	能利用dNTP合成单链DNA	[57]		
启动子特 异性	M5				
	M6-L	启动子识别转换为T3启动子	[58]		
	M6-S				
共转录加 帽	T7-68	选择性掺入帽类似物,抑制dsRNA生成	[24]		

表3 T7 RNAP突变体研究

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<sup>[50]</sup>。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Tm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<sub>m</sub>值,继续训练PRIME模 型,并预测了2~8点组合突变体的T\_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<sub>m</sub>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Tm值较 野生型 T7 RNAP 显著提高了 12.8℃,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<sup>[54]</sup>,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模板的亲和力,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<sup>[33]</sup>。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)<sup>[57]</sup>,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"结构域引人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的亲和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<sup>[39]</sup>,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)<sup>[24, 59]</sup>。T7-68 突变体能够选择性掺入帽类似 物<sup>[24]</sup>,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<sup>-5</sup>)与野生型T7 RNAP(8.1×10<sup>-5</sup>)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<sup>[56]</sup>,T7 #4、T7 Max和T7 c62启动子可以提高转录产量<sup>[60-61]</sup>,T7 D启动子可以增强启动子强度<sup>[62]</sup>,T7 lac启动子允许T7转录被IPTG等诱导剂调控<sup>[63]</sup>。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,

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	-15C启	定点突变	减少长的流产性RNA产物并提高转	
动子	IACTACICACICACIAIAGGGAGA		录效率。	
T7 #4	TAATACGACTCACTATAGGGA <u>TAAT</u>	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	TAATACGACTCAC <u>A</u> AT <u>CC</u> GGAG	定点突变	表达水平提升2倍	
T7 DI-7	TAATACGACTCACTATAGGG <u>TTTAA</u>	启动子修饰	转录性能提升50%	
T7 D启动	CTTTAG~CTTTAG~TTGACT (-35) ~CTTTAG~CTT-	两组重复序列CTTTAG关于-35区	撤退户办之程度 1600开始转寻	
子	TAG	域对称排列	增强启动了强度,10℃开始转来	
T7 lac启	TAATACGACTCACTATAGGGAGA~GGAATTGT-	T7启动子和大肠杆菌的lac启动子	可被IDTC算话目刘岱制结寻	
动子	GAGCGATAACAATT	融合	可放IFIU守防守刑控制技术	
T7 D 白 計	子 定 列 送 回 条 考 文 献 [62]			

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

T7 D启动子序列详见参考文献<sup>[62]</sup>。

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,常被用于科学研究或医药诊断或 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,朱听课题组合成了具有转录活性的 "镜像"T7 RNAP<sup>[15]</sup>,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(CBE)的 sgRNA 高效表达,并且对寄生虫的生长速率无显著影响<sup>[64]</sup>。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<sup>[65]</sup>。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 检测诊断与信号传导

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实时荧光恒温扩增 技术 (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<sup>[66-67]</sup>。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<sup>[69]</sup>, 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) 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<sup>[70-71]</sup>,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<sup>[72]</sup>,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<sup>[73-74]</sup>。 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)<sup>[75]</sup>。在筛选能减少 dsRNA 形成的 T7 RNAP突变体中,降低聚合酶对 RNA 的亲和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<sup>[76]</sup>。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来检测,例如菠菜(Spinach),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<sup>[77]</sup>,并能高效区分T7 RNAP的突变体是否形成dsRNA<sup>[75]</sup>。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<sup>[78-79]</sup>,以表彰其为蛋白质工程提 供了革命性工具。洪亮团队通过开发的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<sup>[52]</sup>。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。 然而,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

- 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
- 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 A 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 TA. 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 Mudiyanselage 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] Baiersdörfer 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, *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 cotethered 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. SciAdv, 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

·12·

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, Ashiqul 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 polymeraseassisted 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 highthroughput 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 检测结直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 cellfree protein biosensor platform using split T7 RNA polymerase. bioRxiv, 2024: 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<sup>\*</sup>

NING Wei-Chen<sup>1,2)</sup>, HUA Yu<sup>2)</sup>, YOU Hui-Ling<sup>1)</sup>, LI Qiu-Shi<sup>2)</sup>, WU Yao<sup>2)</sup>,

LIU Yun-Long<sup>1)\*\*</sup>, HU Zhen-Xin<sup>2)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>School of Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;
<sup>2)</sup>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. 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

·15·

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 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 structurefunction 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 semirationally 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 wordsT7 RNAP, structure, function, transcription, kinetics, dsRNA, mRNADOI:10.3724/j.pibb.2025.0115CSTR: 32369.14.pibb.20250115

\*\* Corresponding author.

<sup>\*</sup> 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).

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

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

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