

一种利用 Cas 切口酶制备单链 DNA 的方法

相关申请的交叉引用

本发明要求 2023 年 06 月 21 日向中国国家知识产权局提交的专利申请号为 2023107431619、发明名称为“一种利用 Cas 切口酶制备单链 DNA 的方法”的在先申请的优先权。该件在先申请的全文通过引用的方式结合于本发明中。

技术领域

本发明属于生物化学领域，具体涉及单链 DNA 尤其是环状单链 DNA 的制备方法、相关产物及试剂盒。

背景技术

CRISPR/Cas 系统是现代生物科学领域的一个非常重要的角色，它的出现彻底改变了基因组编辑技术。基于同源定向修复 (homology directed repair, HDR) 途径的基因敲入就是其重要应用之一。模板依赖的方式使得合适的 HDR 模板决定了它的基因敲入成败与效率。常用的双链 DNA (dsDNA) 模板就存在效率低、脱靶率高、细胞毒性大的问题。单链 DNA (ssDNA) 被证实是基于 HDR 的基因敲入实验中理想的敲入模板。ssDNA 作为敲入模板，表现出了优越的编辑效率、较小的细胞毒性、更低的脱靶效应等优点。而相较于线性单链 DNA (lssDNA)，环状单链 DNA (cssDNA) 又具有更高的稳定性，可以有效且稳定的插入目的片段，靶向率高，cssDNA 供体在目标位点的模板驱动修复中也胜过 lssDNA 供体。

目前，ssDNA 的合成方法可分为化学合成法、基于细菌的合成法和酶合成法（参见：doi: 10.3390/genes11020116; US10940171B2）。化学合成法对 ssDNA 长度有限制，成本昂贵，并且需要额外的纯化方法。基于噬菌体的合成法可以在生物反应器中大量生产任意序列的 ssDNA，但该方法耗时长，不适合进行快速原型制作（参见：US20200362332）。酶合成法相对是一种低成本、快速的 ssDNA 合成方法，该方法对合成序列长度的限制小，可以有效的合成更长的序列。

针对传统的 cssDNA 酶合成法，一种方法是先获得 lssDNA，再以连接酶环化获得 cssDNA（参见：EP2610352B1; CN107002292A）。另一种方法是以缺刻酶（例如 Nb.BtsI、Nt.BspQI、Nb.Bpu10I）将双链质粒中的非目标链打上缺口，再以核酸外切酶将断裂的 DNA 链消化，最终获得目标 cssDNA（Zhang et al., Engineering BspQI nicking enzymes and application of N.BspQI in DNA labeling and production of single-strand DNA. Protein Expr Purif. 2010 Feb;69(2):226-34. doi: 10.1016/j.pep.2009.09.003; WO 2023069948; WO1995009915A1）。

虽然本领域已经存在多种制备单链 DNA 的方法，但这些方法具有成本昂贵、耗时长、或较高的 dsDNA 残留污染等缺点，因此本领域仍然需要简单易操作的方法来制备高纯度的单链 DNA。

发明内容

本发明第一方面提供一种制备环状单链 DNA 的方法，包括如下步骤：

- 1) 提供模板 DNA，所述模板 DNA 为包含目标链和互补链的环状双链 DNA；
- 2) 向模板 DNA 中加入 gRNA 和 Cas 切口酶，所述 gRNA 和互补链的部分区域互补配对，其中 Cas 切口酶在 gRNA 的引导下在互补链上形成一个或多个缺口；
- 3) 使用核酸外切酶对含有缺口的互补链进行消化，获得含有环状单链 DNA 形式的目标链的消化产物。

一个实施方式中，gRNA 为 sgRNA。另一个具体实施方式中，所述 Cas 切口酶是 Cas9 切口酶，例如所述 Cas9 切口酶是选自下组的一个或多个：D10A、H840A、N863A、和 N854A。

一个实施方式中，所述核酸外切酶是选自下组的一个或多个：核酸外切酶 T7、核酸外切酶 ExoIII、和 Lambda Exo。

另一个实施方式中，所述模板 DNA 是质粒。在更具体的实施方式中，所述质粒包含复制起始位点和目的基因，并且不包含筛选标签基因。所述复制起始位点例如选自 pUC 复制起始位点、pMB1 及其衍生物复制起始位点、ColE1 复制起始位点和 R6K γ 复制起始位点。

一个实施方式中，所述一个或多个缺口是大于或等于两个缺口。

另一个实施方式中，所述模板 DNA 的序列长度及缺口的数量比例小于 10 kb 1 个缺口，优选小于 5 kb 1 个缺刻位点，进一步优选小于 3kb 1 个缺刻位点，进一步优选小于 2kb 1 个缺刻位点，最优选小于 1kb 1 个缺刻位点。

一个实施方式中，所述 Cas 切口酶和 gRNA 以及模板 DNA 的摩尔比为 3: 3: 1-12: 12: 1，优选 4: 4: 1-11: 11: 1，最优选 5: 5: 1-10: 10: 1。

一个实施方式中，在步骤 3) 之后还包括如下步骤：对所述消化产物进行纯化，获得高纯度的环状单链 DNA。

本发明第二方面提供一种制备线性单链 DNA 的方法，包括如下步骤：对根据本发明上述第一方面所述的方法获得的环状单链 (css) DNA 进行切割以获得线性单链 (lss) DNA。

本发明第三方面提供一种用于制备环状或线性单链 DNA 的试剂盒，含有 Cas 切口酶和核酸外切酶。

一个实施方式中，所述 Cas 切口酶是 Cas9 切口酶，例如所述 Cas9 切口酶是选自下组的一个或多个：D10A、H840A、N863A、和 N854A。

一个实施方式中，所述核酸外切酶是选自下组的一个或多个：核酸外切酶 T7、核酸外切酶 ExoIII、和 Lambda Exo。

另一个实施方式中，所述试剂盒还含有阳性参照模板 DNA 和阳性 gRNA。再一个实施方式中，所述试剂盒还含有模板 DNA 和 gRNA。另一个实施方式中，所述试剂盒还含有缓冲液。另一个实施方式中，所述试剂盒还含有用于对环状或线性单链 DNA 进行纯化的试剂。

本发明第四方面提供一种环状或线性单链 DNA，包含复制起始位点和目的基因，并且不包含筛选标签基因。一个实施方式中，所述复制起始位点选自 pUC 复制起始位点、pMB1 及其衍生物复制起始位点、ColE1 复制起始位点和 R6K γ 复制起始位点。

本发明第五方面提供一种组合物，包含如本发明第四方面所述的环状或线性单链 DNA。一个实施方式中，所述组合物为药物组合物。

本发明第六方面提供根据本发明第一方面所述方法获得的含有环状单链 DNA 形式的目标链的消化产物。

本发明第七方面提供如本发明第四方面所述的环状或线性单链 DNA，或如本发明第五方面所述的组合物，或如本发明第六方面所述的消化产物在基因治疗、基因重组、DNA 文库构建、DNA 折纸或 DNA 存储元件中的应用。

有益的技术效果

在 DNA 序列中，5'-NGG-3'或其他 PAM 序列是普遍存在的，可根据实验需求，设计多个 gRNA 序列对双链 DNA 进行缺刻，这解决了传统缺刻酶使用时酶切位点受限的问题。另外，一个酶切体系中使用多个 gRNA，进行多点缺刻，提高缺刻效率的同时，也有效的提高了后续核酸外切酶的消化效率。因而，使用本发明的方法制备环状单链或线性单链 DNA，简单易操作、高效、可得到高纯度的单链 DNA。

附图说明

图 1：闭合环状单链 DNA（cssDNA）模板质粒（图 1a：Nt.BspQI 缺刻位点；图 1b：sgRNA 缺刻位点）

图 2：Nt.BspQI 缺刻酶酶切产物

图 3：Cas9_Nickase 缺刻酶酶切产物

图 4：核酸外切酶 ExoIII 消化处理 Nt.BspQI 缺刻质粒结果

图 5：核酸外切酶 ExoIII 消化处理 Cas9_Nickase 缺刻质粒结果

图 6：模板质粒缺刻结果

图 7：ExoIII 消化 2h 结果

图 8：Nt.BspQI 组 ExoIII 消化 7h 结果

图 9：闭合环状单链 DNA（cssDNA）回收产物纯度对比结果

图 10：不同 sgRNA 个数的闭合环状单链 DNA（cssDNA）制备效率

具体实施方式

除非另有说明，本文使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员所通常理解的含义。出于方便理解本文提供的技术方案的目的，以下对部分技术术语进行简要说明。

技术术语

ssDNA

单链 DNA (ssDNA)

lssDNA

线性单链 DNA (lssDNA)

cssDNA

闭合环状单链 DNA(cssDNA)

本申请中，“模板 DNA”是指作为制备单链 DNA 的起始材料的环状双链 DNA。类似地，“模板质粒”是指作为制备单链 DNA 的起始材料的质粒。模板 DNA 或模板质粒为环状双链，包含目标链和互补链。

“环状”，例如“环状双链 DNA”、“环状单链 DNA”，是指所述的 DNA 是共价闭合的。

模板 DNA 中的“目标链”和“互补链”分别是指意于保留（即作为产物）的那条 DNA 链，以及要进行缺刻的 DNA 链。

本申请上下文中，术语“切口酶”和“缺刻酶”（Nicking endonuclease，也称为 NEases 或 nickases）可互换使用。切口酶识别双链 DNA 中的特定位点，但与核酸酶不同，切口酶仅在相对于识别位点的某个位置上断裂 DNA 双链中的一条链（doi: 10.3390/biom11101420）。以 Cas9 蛋白为例，Cas9 核酸酶断裂 DNA 双链中的两条链，而 Cas9 切口酶是 Cas9 核酸酶的突变体（突变两个或更多个催化性结构域中的一个或多个使其失活，例如通过向 HNH 结构域引入 H840A 或者向 Ruv C 结构域引入 D10A 突变），这种突变体保留了基于 gRNA 特异性而结合 DNA 的能力，但仅能够切割（或称为缺刻（nicking））DNA 双链中的一条链，从而产生单链缺口（nick）（DOI:10.1101/gr.162339.113）。对多种 Cas 切口酶的描述请另参见 WO2023060256A1。

本发明的发明人经过研究发现，当前的技术中使用 Nb.BtsI 等缺刻酶将双链质粒中的非目标链打上缺口、再以核酸外切酶将断裂的 DNA 链消化、最终获得目标 cssDNA 的方法虽然理论上是一种简单、方便的方法，但实际操作中该方法存在显著的缺陷，例如，该方法对酶切位点的要求非常高，为了后续仅对 dsDNA 的非目标链进行缺刻及消化，需要该非目标链上存在至少一个目标酶切位点（不是所有 dsDNA 片段都可以轻易满足这个条件），而且这些目标酶切位点均位于该非目标链上、而完全不存在于目标链上。由于上述缺点，该方法经常需要对 dsDNA 序列加以修饰，去除多余酶切位点，仅保留目标位置的酶切位点，该过程延长了生产周期。由于缺刻效率、消化效率低下，导致终产物中存在较高的 dsDNA 残留污染，影响下游实验。

为了克服上述以及单链 RNA 生产中的其他缺陷, 本发明使用 Cas 切口酶体系(即 Cas 切口酶以及与其配合的 gRNA)来缺刻(nicking)环状双链 DNA 模板中的一条链, 在该链上产生一个或多个缺口。Cas 切口酶是 Cas 核酸酶的突变形式, 只能切割双链 DNA 中的一条链。以 Cas9_D10A Cas 切口酶为例, Cas9_D10A Nickase 是 Cas9 核酸酶的突变形式, 它使 Cas9 核酸酶的一个活性域失活, 因此它只能依赖引导 RNA 识别 PAM 位点、并在与引导 RNA 互补的单链 DNA 上产生单链切割。其中 PAM 位点是位于靶 DNA 3'末端的一个短序列(5'-NGG-3'), 引导 RNA 识别并结合该序列的互补链, 随后 Cas9_D10A Nickase 剪切被识别的靶点 DNA。在 DNA 序列中 PAM 位点(例如 5'-NGG-3')是普遍存在的, 因此可根据需求, 在多个位点, 3'末端含有 PAM 序列(例如 GG 序列)的上游选择 20nt 或其他合适长度作为 gRNA 序列, 这解决了传统缺刻酶使用时酶切位点受限的问题。另外, 一个酶切体系中使用多个 sgRNA, 进行多点缺刻, 提高缺刻效率的同时, 也有效的提高了后续核酸外切酶的消化效率。

本发明提供一种制备环状单链 DNA 的方法, 包括如下步骤:

- 1) 提供(包括但不限于, 提供、获得、产生)模板 DNA, 所述模板 DNA 为包含目标链和互补链的环状双链 DNA;
- 2) 向模板 DNA 中加入 gRNA 和 Cas 切口酶, 所述 gRNA 和互补链的部分区域互补配对, 其中 Cas 切口酶在 gRNA 的引导下在互补链上形成一个或多个缺口;
- 3) 使用核酸外切酶对含有缺口的互补链进行消化, 获得含有环状单链 DNA 形式的目标链的消化产物。

本发明所属领域的技术人员可以理解, 本发明中使用的 gRNA 可以是 sgRNA(single guide RNA)即单分子形式的引导 RNA, 也可以是双分子形式的引导 RNA。本申请中提及 gRNA 时, 在上下文允许的情况下, 理解为也明确提及了 sgRNA。一个优选实施方式中, 所述 gRNA 为 sgRNA。根据模板序列设计 gRNA 包括 sgRNA 的方法, 例如其优选长度、序列等等, 是本领域已知的。

本发明的方法中, 优选针对模板 DNA 序列设计一个或多个 gRNA, 优选多个, 从而这些 gRNA 可以在模板 DNA 上找到多个缺刻位点, 产生多个切口。优选实施方式中, 步骤 2) 中向模板 DNA 中加入多个 gRNA, 例如 2-10 个 gRNA, 或 2-5 个 gRNA, 例如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个 gRNA。Cas 切口酶的数目也可以是一种或多种, 例如 1、2、3、或 4 种。

本发明中使用的 Cas 切口酶可以是任何具有切口酶功能的 Cas 蛋白, 即其能够被 gRNA 引导至特定的(即与 gRNA 互补配对的)目标 DNA 序列并能够行使切口酶功能切断并且仅切断双链 DNA 中的一条链。优选实施方式中, 所述 Cas 切口酶是 Cas9 切口酶。本发明中使用的 Cas9 切口酶可以是任何具有切口酶功能的 Cas9 蛋白, 例如, 包括但不限于在以下氨基酸位点中的一个或多个进行突变: D10, G12, G17, E762, H840, N854, N863, H982, H983, A984, D986, 和 A987, 例如包括但不限于以下 Cas9 切口酶: D10A, H840A, N863A、和 N854A。多种切口酶可以单独或组合使用。

Cas 蛋白的非限制性实例包括：Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为 Csn1 和 Csx12)、Cas10、Cas12、Cas13、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、其同系物、或其功能性变体（例如经过密码子优化）或修饰形式。在一些实施方式中，Cas9 可以是来自化脓链球菌或肺炎链球菌的 Cas9。

在一些实施方式中，所述 Cas 切口酶是 Cas12 切口酶（例如 Cas12a 切口酶）或 Cas13 切口酶。

本发明中可以使用任何合适的核酸外切酶对经过缺刻产生缺口的 DNA 链进行酶切消化，例如，包括但不限于以下核酸外切酶：核酸外切酶 T7、核酸外切酶 ExoIII、和 Lambda Exo。由于核酸外切酶的特性，其仅仅或主要作用于具有游离的 5' 或 3' 端的 DNA，而不会或很少作用于没有游离的 5' 或 3' 端的 DNA（例如共价闭合的环状 DNA），因此核酸外切酶能够将模板 DNA 双链中经过缺刻具有缺口的那条 DNA 链消化降解，而不影响或不显著影响另一条没有缺口的、共价闭合的环状 DNA 链。

一个优选实施方式中，所述模板 DNA 是质粒，即质粒双链 DNA。所述质粒可以是常规质粒，例如包括骨架序列，启动子、复制起始位点、筛选标签基因（例如抗生素抗性基因或其他筛选标签基因）、多克隆位点、目的基因序列等。

一个优选的实施方式中，所述模板质粒包含复制起始位点和目的基因，并且不包含筛选标签基因。所述复制起始位点例如选自 pUC 复制起始位点、pMB1 及其衍生物复制起始位点、ColE1 复制起始位点和 R6K γ 复制起始位点。另一个优选的实施方式中，所述质粒仅包含复制起始位点和目的基因，并且不包含筛选标签基因，即，所述质粒由复制起始位点和目的基因组成，不包含筛选标签基因。另一个优选的实施方式中，所述质粒基本由复制起始位点和目的基因组成，不包含筛选标签基因。所述质粒的制备方式可参见 PCT/CN2021/133141，该申请全文引用作为参考。

一个实施方式中，所述一个或多个缺口是大于或等于两个缺口，例如 2-10 个，或 2-5 个缺口，例如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个缺口。另一个实施方式中，所述模板 DNA 的序列长度及缺口的数量比例小于 10 kb 1 个缺口，优选小于 5 kb 1 个缺口，进一步优选小于 3kb 1 个缺口，进一步优选小于 2kb 1 个缺口，最优选小于 1kb 1 个缺口。

一个实施方式中，所述 Cas 切口酶例如 Cas9 切口酶和 gRNA 以及模板 DNA 的摩尔比为 3: 3: 1-12: 12: 1，优选 4: 4: 1-11: 11: 1，最优选 5: 5: 1-10: 10: 1。

一个优选实施方式中，在步骤 3) 之后还包括如下步骤：对所述消化产物进行纯化，获得高纯度环状单链 DNA。高纯度是指不含、或基本不含杂质，或不含显著量的杂质，例如按质量 (mass) 计算，纯化后得到的终产物中至少 70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%、或 100% 的总 DNA 是环状单链 DNA。在使用核酸外切酶对含有缺口的互补链进行消化之后，可以用合适的纯化方法去除消化产物中除环状单链 DNA 之外的杂质，所述纯化方法包括但不限于，醇沉法、柱回收法、磁珠回收法、苯酚/氯仿/异戊醇回收法等等。

本发明还提供用本发明上述方法获得的含有环状单链 DNA 形式的目标链的消化产物。所述消化产物含有环状单链 DNA、缺刻的 DNA 链经外切酶消化后的产物、gRNA 和 Cas 切口酶。

本发明还提供一种制备线性单链 DNA 的方法，包括如下步骤：对根据本发明方法获得的环状单链（css）DNA 进行切割以获得线性单链（lss）DNA。该步骤可以使用本领域所知的用于对环状单链 DNA 进行切割以获得线性单链 DNA 的任何方法。优选实施方式中，在选定的位点进行切割，例如使用切割单链 DNA 的 Cas9 系统进行定点切割。

本发明还提供一种用于制备环状或线性单链 DNA 的试剂盒，含有 Cas 切口酶和核酸外切酶。一个实施方式中，所述试剂盒还含有阳性参照模板 DNA 和阳性 gRNA，用于确定试剂盒所含组分可以按照预定方式（例如试剂盒带有的说明书中描述的方式）产生环状或线性单链 DNA。再一个实施方式中，所述试剂盒还含有模板 DNA 和 gRNA。另一个实施方式中，所述试剂盒还含有缓冲液，以有利于缺刻反应和/或核酸外切酶消化反应的进行。另一个实施方式中，所述试剂盒还含有用于对环状或线性单链 DNA 进行纯化的试剂。

本发明还提供一种环状或线性单链 DNA，包含复制起始位点和目的基因，并且不包含筛选标签基因。一个实施方式中，所述复制起始位点选自 pUC 复制起始位点、pMB1 及其衍生物复制起始位点、ColE1 复制起始位点和 R6K γ 复制起始位点。另一个优选的实施方式中，所述质粒仅包含复制起始位点和目的基因，并且不包含筛选标签基因，即，所述质粒由复制起始位点和目的基因组成，不包含筛选标签基因。另一个优选的实施方式中，所述质粒基本由复制起始位点和目的基因组成，不包含筛选标签基因。所述质粒的制备方式可参见 PCT/CN2021/133141，该申请全文引用作为参考。

本发明还提供一种组合物，包含如上所述的环状或线性单链 DNA。一个实施方式中，所述组合物为药物组合物，所述药物组合物还包含药剂学上常用的赋形剂，例如，包括但不限于，填充剂、崩解剂、润滑剂、矫味剂、色素等等。根据本发明的环状或线性单链DNA、含有环状单链DNA的消化产物、以及含有环状或线性单链DNA的组合物可合适地应用于基因治疗、基因重组（例如基因敲入）、DNA文库（例如DNA筛选文库）的构建、DNA折纸或DNA存储元件。

本申请引用的所有参考文献均通过引用并入本文，就如同每个单独的文献被单独地指明通过引用而并入本文。

下面通过实施例，并结合附图，对本发明的技术方案作进一步详细的说明。除非另有说明，下文描述的实施例的方法和材料均为可以通过市场购买获得的常规产品。本发明所属领域的技术人员将会理解，下文描述的方法和材料，仅是示例性的，而不应视为以任何方式限定本发明的范围。本发明的范围仅由权利要求限定。

通用实验方法

（1）构建可用于制备cssDNA的模板质粒，根据该质粒的全长序列设计并合成特异性的sgRNA。sgRNA引导Cas9_Nickase缺刻酶对模板质粒进行多位点的定点缺刻。作为对照，该

质粒上也携带有3个串联的位于同一条DNA链上的Nt.BspQI酶切位点，用于提高缺刻酶Nt.BspQI 的缺刻效率。

（2）实验组中，以Cas9_Nickase酶切处理模板质粒，获得一条链上多处断裂的开环DNA；对照组中，以Nt.BspQI酶切处理模板质粒，获得一条链上发生一处断裂的开环DNA。以核酸外切酶ExoIII分别消化处理Cas9_Nickase来源和Nt.BspQI来源的开环DNA，获得目标环状单链DNA，对比两者的纯度。

实施例

实施例 1：构建 cssDNA 模板质粒并设计 sgRNA

构建用于制备 cssDNA 的模板质粒 pMF5-GFP-BspQI（图 1b），该质粒全长 3553bp，由南京金斯瑞生物科技有限公司基因部合成，序列参见序列表。在 sgRNA 设计网站（<http://crispor.tefor.net/>）中导入 pMF5-GFP-BspQI 质粒全长序列，根据自己所需靶标位点及质粒全长选择多个 sgRNA 序列。本实施例中选取 5 条 sgRNA，每条间隔约 700bp，序列参见序列表。由南京金斯瑞生物科技有限公司核酸部合成。

同时作为对照组 *Nt.BspQI* 的模板质粒（图 1a），pMF5-GFP-BspQI 的正链上携带有三个紧密相连的 *Nt.BspQI* 酶切位点，用以提高对照组 *Nt.BspQI* 缺刻酶的缺刻效率。

实施例 2：缺刻酶 Nt.BspQI/Cas9_Nickase 制备 cssDNA

1. 缺刻质粒的制备

1.1 对照组：缺刻酶 *Nt.BspQI* 制备缺刻质粒。

对照组中选择传统的缺刻酶 *Nt.BspQI* 进行缺刻质粒的制备。以 *Nt.BspQI* 处理 pMF5-GFP-BspQI 质粒，获得一条链发生一处断裂的开环 DNA。酶切体系如表 1 所示。*Nt.BspQI* 购自纽英伦生物技术有限公司，货号：R0644S。

表 1 *Nt.BspQI* 酶切体系

体系	体积
Nt.BspQI	50 ul
10×NEBuffer r3.1	500 ul
pMF5-GFP-BspQI 质粒模板 (1000ng/ul)	500 ul
H2O	3950 ul

50℃，500 rpm，酶切反应 2.5 h。取 1ul 样品进行跑胶验证，酶切结果如图 2 所示，确认酶切反应完全。80℃，20 min 热灭活。取 20 ul 灭活样品存于 4℃冰箱，用于后续跑胶对照。

- 苯酚/氯仿/异戊醇回收酶切样品：
- 1) 添加等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)，涡旋 10 s，然后 5000 g 离心 5 min；
 - 2) 将上层水相转移到新管中并添加等体积的氯仿/异戊醇(24:1)。涡旋 10 s，5000 g 离心 5 min；
 - 3) 重复步骤 2；
 - 4) 将上层水相转移到新管中。加入 1/10 体积的 3 M 醋酸钠和 2.5 体积的冰乙醇，混合后-20℃ 孵育 1 h；
 - 5) 10000rpm 离心 10min；
 - 6) 倒掉上清液，用 2000 μL 的 75% 冰乙醇轻轻清洗沉淀，蒸发残留乙醇；
 - 7) 加入适量无 DNase/RNase H₂O 溶解质粒。

1.2 实验组：缺刻酶 Cas9_Nickase 制备缺刻质粒。

为对比传统缺刻内切酶的缺刻效率，实验组中选择 Cas9_Nickase 处理 pMF5-GFP-BspQI 质粒，获得一条链上发生 5 处断裂的开环 DNA。酶切体系如表 2 所示。Engenpy Cas9_Nickase 购自纽英伦生物技术有限公司，货号：M0650S。

表 2 Cas9_Nickase 酶切体系

体系	体积
1μM Cas9_Nickase	2.28 ml
10×NEBuffer r3.1	3.6 ml
10 pM sgRNA	0.228ml*5
H ₂ O	28.48 ml
反应体积	35.5 ml
反应条件	25℃，10 min
pMF5-GFP-BspQI 质粒模板 (1000ng/ul)	0.5 ml
反应条件	37℃，2.5h

取 5 ul 样品加入 1ul proteinase K，室温静置 15min，进行跑胶验证，酶切结果如图 3 所示，确认酶切反应完全。总反应中加入 100ul proteinase K，室温静置 15min，95℃，10min 进行热灭活。取 20ul 灭活样品存于 4℃冰箱，用于后续跑胶对照。

苯酚/氯仿/异戊醇回收酶切样品步骤同 1.1。

2. cssDNA 的制备

以核酸外切酶 *ExoIII* 消化处理步骤 1.1、步骤 1.2 中制备所得的缺刻质粒，对比两种不同来源的缺刻质粒经过 *ExoIII* 消化处理后产物的纯度。*ExoIII* 购自纽英伦生物技术有限公司，货号：M0206L。

2.1 核酸外切酶 *ExoIII* 消化处理 *Nt.BspQI* 来源的缺刻质粒

核酸外切酶 *ExoIII* 消化处理步骤 1.1 中制备所得缺刻质粒，消化体系如表 3 所示。

表 3 *ExoIII* 消化处理 *Nt.BspQI* 来源缺刻质粒体系

体系	体积
<i>ExoIII</i>	3 ul
10×NEBuffer 1	30 ul
<i>Nt.BspQI</i> 缺刻质粒模板（1550ng/ul）	19 ul
H2O	248 ul

在 0.25 h、0.5 h、0.75 h、1 h、1.5 h、2 h、3 h、4 h、5 h、7 h、24 h 时分别取出 20 ul 样品，各自加入 11mM EDTA，70℃，20min 热灭活，暂存于 4℃冰箱，待消化时间结束后跑胶验证使用。

消化结果如图 4 所示，消化 5h 时仍有明显缺刻质粒的残留；消化 24h 后，缺刻质粒也仍未消化完全。而 cssDNA 含量也随着消化时长加长逐渐降低。以 Tanon GIS 系列数码凝胶图像处理系统分析跑胶结果，具体 cssDNA 与残留缺刻质粒比例如表 4 所示。

表 4 *Nt.BspQI* 缺刻 *ExoIII* 消化产物中 cssDNA 与残留缺刻质粒比例

消化时长	0.25h	0.5h	0.75h	1h	1.5h	2h	3h	4h	5h	7h	24h
cssDNA 比例 (%)	50.48	81.28	62.17	76.99	76.76	78.62	74.97	73.6	69.65	69.14	74.45
缺刻质粒残留比例 (%)	49.52	18.72	37.83	23.01	23.24	21.38	25.03	26.4	30.35	30.86	25.55

2.2 核酸外切酶 *ExoIII* 消化处理 *Cas9_Nickase* 来源的缺刻质粒

核酸外切酶 *ExoIII* 消化处理步骤 1.2 中制备所得缺刻质粒，消化体系如表 5 所示。

表 5 *ExoIII* 消化处理 *Cas9_Nickase* 来源缺刻质粒体系

体系	体积
----	----

ExoIII	3 ul
10×NEBuffer 1	30 ul
Cas9_Nickase 缺刻质粒模板（2921.6 ng/ul）	10 ul
H ₂ O	257 ul

在 0.25 h、0.5 h、0.75 h、1 h、1.5 h、2 h、3 h、4 h、5 h、7 h、24 h 时分别取出 20 ul 样品，各自加入 11mM EDTA，70℃，20min 热灭活，暂存于 4℃冰箱，后续跑胶验证使用。

消化结果如图 5 所示，消化 0.25h 时有微弱的缺刻质粒残留，0.5h 时完全消化，未检测到缺刻质粒残留。消化 24h 后，cssDNA 含量随着消化时长加长有所降低，但条带稳定。以 Tanon GIS 系列数码凝胶图像处理系统分析跑胶结果，具体 cssDNA 与残留缺刻质粒比例如表 6 所示。

表 6 Cas9_Nickase 缺刻 *ExoIII* 消化产物中 cssDNA 与残留缺刻质粒比例

消化时长	0.25h	0.5h	0.75h	1h	1.5h	2h	3h	4h	5h	7h	24h
cssDNA 比例 (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
缺刻质粒残留比例 (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

对比传统缺刻酶 *Nt.BspQI* 和本发明的 Cas9_Nickase，选择 sgRNA 依赖性缺刻内切酶 Cas9_Nickase 对模板质粒进行多点缺刻，并以核酸外切酶 *ExoIII* 消化缺刻质粒，可以在更短时间内获得纯度更高的 cssDNA。同时，由于大大的缩短了核酸外切酶消化时长，核酸外切酶对于产物 cssDNA 的降解也是微弱的，有效的提高了 cssDNA 的制备效率。

实施例 3： *Nt.BspQI* 组/*Cas9_Nickase* 组制备 cssDNA 的回收率对比

本实施例以产物纯度作为回收标准对 *Nt.BspQI* 组/*Cas9_Nickase* 组制备 cssDNA 的回收率进行对比。

3.1 缺刻质粒的制备

以缺刻酶 *Nt.BspQI* 和 Cas9_Nickase 分别制备缺刻质粒。模板质粒的初始投入量均为 300ug。

表 7 *Nt.BspQI* 酶切体系

体系	体积
Nt.BspQI	30 ul
10×NEBuffer r3.1	300 ul
pMF5-GFP-BspQI 质粒模板（1000ng/ul）	300 ul
H2O	2370 ul

50℃，500 rpm，酶切反应 3 h。取 1ul 样品进行跑胶验证，酶切结果如图 6 泳道 2 所示，确认酶切反应完全。80℃，20 min 热灭活。取 20 ul 灭活样品存于 4℃冰箱，用于后续跑胶对照。

表 8 Cas9_Nickase 酶切体系

体系	体积
20μM Cas9_Nickase	0.0683 ml
10×NEBuffer r3.1	2 ml
10 pM sgRNA	0.1366 ml*5
H ₂ O	16.9487 ml
反应体积	19.7 ml
反应条件	25℃，10 min
pMF5-GFP-BspQI 质粒模板（1000ng/ul）	0.3 ml
反应条件	37℃，3 h，500 rpm

取 3 ul 样品加入 1ul proteinase K，室温静置 15min，进行跑胶验证，酶切结果如图 6 泳道 3 所示，确认酶切反应完全。总反应中加入 100 ul proteinase K，室温静置 15min，95℃，10min 进行热灭活。取 20ul 灭活样品存于 4℃冰箱，用于后续跑胶对照。

- 3.2 缺刻质粒回收
- 苯酚/氯仿/异戊醇回收酶切样品：
- 1) 添加等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)，涡旋 10 s，然后 5000 g 离心 5 min；
 - 2) 将上层水相转移到新管中并添加等体积的氯仿/异戊醇(24:1)。涡旋 10 s，5000 g 离心 5 min；
 - 3) 重复步骤 2；
 - 4) 将上层水相转移到新管中。加入 1/10 体积的 3 M 醋酸钠和 2.5 体积的冰乙醇，混合后-20℃ 孵育 1 h；
 - 5) 10000rpm 离心 10min；

- 6) 倒掉上清液, 用 2000 μL 的 75% 冰乙醇轻轻清洗沉淀, 蒸发残留乙醇;
- 7) 两组分别加入 200 μl DNase/RNase H_2O 溶解产物;
- 8) 两组各取 1 μl 样品以 NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers.测定浓度。

表 9 缺刻质粒回收效率

组别	回收浓度 (ng/ μl)	A260/280	A260/230	回收总量 (μg)	回收率 (%)
Nt.BspQI 组	1186	1.87	2.38	237.2	79.1
Cas9_Nickase 组	1423.4	1.91	2.36	284.68	94.8

3.3 cssDNA 制备

以核酸外切酶 *ExoIII* 分别消化处理步骤 3.2 中两组的回收产物, 所有回收产物均投入消化体系。消化体系见表 10。最终以产物纯度作为回收标准进行 cssDNA 的回收。

表 10 *ExoIII* 消化体系

体系	体积
ExoIII	30 μl
10 $\times$ NEBuffer 1	300 μl
3.2 步骤的回收产物	200 μl
H_2O	2470 μl

37°C, 500rpm, 消化至 2h 时, 两组各取 1 μl 样品进行琼脂糖凝胶跑胶验证, 结果如图 7 所示。其中, Cas9_Nickase 组经过 2h 消化后, 泳道 3 中的缺刻 DNA 条带转化为泳道 5 中纯度较高的 cssDNA 条带; 而 Nt.BspQI 组经过 2h 的消化后, 泳道 6 的 css DNA 中仍然存在较重的缺刻 DNA 条带污染。将 Cas9_Nickase 组的产物放至 4°C 冰箱暂存。

Nt.BspQI 组继续消化, 分别在 5h、6h、7h 时取样, 跑胶观察消化情况, 结果如图 8 所示。消化至 7h 时, 残余 Nicked DNA 仍未被消化完全, 而目标产物 cssDNA 的含量也随消化时长延长而降低。

Nt.BspQI 组消化继续消化至 8h, 与 Cas9_Nickase 组消化 2h 的产物一同进行苯酚/氯仿/异戊醇回收, 回收后产物进行回收率比较, 并再次进行琼脂糖凝胶跑胶验证产物纯度。回收率如表 11 所示, 跑胶结果如图 9 所示。

表 11 cssDNA 回收效率对比

组别	回收浓度 (ng/ μl)	A260/280	A260/230	回收体积 (μl)	回收总量 (μg)	总回收率 (%)
Nt.BspQI 组	96	1.77	2.14	50	4.8	1.6

Cas9_Nickase 组	1232	1.91	2.36	50	61.6	20.5
----------------	------	------	------	----	------	------

由 Nt.BspQI 组的消化结果可知，核酸外切酶 ExoIII 除了消化降解带缺口的 ssDNA，对于环状的 ssDNA 也具有一定的降解效果。当选择 Nt.BspQI 作为缺刻酶对模板质粒进行单个位点缺刻时，待消化 ssDNA 片段长度过长，核酸外切酶 ExoIII 的消化效率达不到理想状态，产物纯度较低，污染较重。而企图通过延长消化时长来提高产物纯度时，又会导致目标产物 cssDNA 的降解，导致最终回收效率的降低。

对比 Nt.BspQI 组，Cas9_Nickase 组通过多位点缺刻，较大程度的缩短待消化片段的长度，提高了核酸外切酶 ExoIII 短时间内的消化效率，有效地减少消化时长的同时提高产物纯度，终产物的回收效率也远高于 Nt.BspQI 组。

实施例 4： Cas9_Nickase 制备 cssDNA 时 sgRNA 的设计

以图 1b(右)中的质粒序列为模板设计不同的 sgRNA，共设计 4 组。每组中由 Cas9_Nickase-sgRNA 产生的缺刻位点及每个缺刻位点间间隔的序列长度如表 12 所示。4 组分别进行缺刻 DNA 及 cssDNA 的制备，制备过程同实施例 2。

表 12 缺刻位点数及每段的长度

组别	sgRNA 个数	产生的缺刻断裂数	断裂链的长度
1	5	5	0.7 kb
2	3	3	1.2 kb
3	2	2	1.7 kb
4	1	1	3.5 kb

制备结果如图 10 所示。泳道 2-5 分别为 sgRNA 个数是 5 个、3 个、2 个、1 个时的缺刻 DNA 制备结果，泳道 7-10 分别为 sgRNA 个数是 5 个、3 个、2 个、1 个时的 cssDNA 制备结果。

如泳道 9、泳道 10 的结果所示，当选择 2 个或 1 个 sgRNA 进行缺刻、 ExoIII 消化时，得到的产物中有 3 种形态的 DNA，条带从上往下包括，产物 1：未被 ExoIII 消化完全的缺刻 DNA，产物 2：残留的亲本质粒 DNA，以及产物 3：占主要比例的目标产物 cssDNA。其中 1 个 sgRNA 组（泳道 10）中产物 1、2 占比又明显高于 2 个 sgRNA 组（泳道 9）。该结果表明在根据模板质粒的实际大小设计 sgRNA 时，sgRNA 个数、缺刻产生的断裂链的长度对于最终 cssDNA 的制备效率及纯度都有着至关重要的影响，其中 sgRNA 个数不小于 2 个，断裂链的长度小于 1.7kb。

本发明的实施方式并不限于上述实施例所述，在不偏离本发明的精神和范围的情况下，本领域普通技术人员可以在形式和细节上对本发明做出各种改变和改进，而这些均被认为落入了本发明的保护范围。

pMF5-GFP-BspQI (SEQ ID NO:1):
TACCGttcgtataatgtatgctatacgaacggtaCTGCAGgtgcagccggttaagtgttctgtgtcactcaaaattgctttgagaggetcta
agggcttctcagtcgcttacatccctggcttgtgtccacaaccgttaaaccgttaaaagccttaaaagccttatatattctttttctataaaacttaaa

accttagaggctatttaagttgctgatttatattaattttattgttcaaacatgagagcttagtacgtgaaacatgagagcttagtacgttagccatgag
agcttagtacgttagccatgagggttagtcgttaaacatgagagcttagtacgttaaacatgagagcttagtacgtgaaacatgagagcttagta
cgtactatcaacaggttgaactgctgatcttcagatcGGATCCGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGC
CGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCC
TGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCAT
GAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCATCACTGGCATCTGGA
CTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTCT
TGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAA
GCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGCTCTTCCGGTGACCGCTCTT
CTTCTCCCGCTGGCTCTTCTGCTCCATGCTGCGCGACCGGACATTCAAATGACCCAAAC
TACATCTTCTTTGTCTGCTTCCCTGGGTGATCGGGTGACCATTTTCATGTAGAGCCAGTC
AGGATATAAGTAAATACCTGAATTGGTATCAACAGAAGCCAGATGGAACAGTAAAGTT
GCTGATTTATCACACCTCACGATTGCACTCAGGTGTTCCATCCAGGTTTTTCAGGAAGTG
GCTCTGGAACGACTATTCTTTGACAATTAGTAACTTGGAACAAGAAGATATTGCTACG
TATTTCTGCCAACAGGGTAACACTCTTCCTTATACTTTTGCGGCGCGCACTAAATTGGA
GATTACAGGGGGCGGAGGCTCCGGTGCGGAGGATCTGGCGGGGGTGGGAGCGAAGT
TAAGTTGCAGGAAAGTGGGCCTGGGTTGGTTGCACCCAGCCAAAGCCTCTCAGTAACC
TGCACGGTTTCCGGAGTCAGTCTCCAGACTACGGAGTATCATGGATCCGCCAGCCAC
CACGAAGGGGTTGGAGTGGCTGGGAGTCATCTGGGGATCAGAAACGACGTATTACA
ATTCCGCCCTCAAAAGCCGGCTGACTATTATAAAAGACAACAGCAAGTCACAAGTGTT
CCTGAAAATGAATAGTCTCCAGACGGATGACACGGCCATTTACTATTGCGCAAAGCAC
TATTACTACGGTGGGTCTTATGCAATGGACTACTGGGGTCAAGGGACCTCAGTCACAG
TTTCCAGTACTACAACTCCAGCGCCGCGACCCCCGACGCCAGCACCAACGATAGCCTC
TCAGCCGCTTTTCCTTGAGGCCGGAGGCTTGACGGCCCGCGGCCGGGGGCGCAGTTCAT
ACCAGAGGGCTTGATTTTGCCTGTGACATCTACATATGGGCACCGCTCGCAGGAACTTG
TGGTGTAATTGTTGCTTTCACTGGTGATAACCCTCTATTGCAAACGCGGACGGAAGAAGC
TCCTCTATATTTTAAAGCAGCCGTTTATGCGCCCCGGTACAAACGACGCAGGAGGAGGA
TGGCTGTTCTGTAGATTTCTGAAGAGGAAGAGGGTGGATGCGAGCTCAGAGTCAAA
TTCTCACGCTCTGCGGACGCTCCAGCCTACAAACAGGGTCAGAACCAGTTGTACAACG
AGCTTAATTTGGGACGCCGCGAAGAGTATGATGTCCTTGACAAACGCAGGGGCAGGGA
CCCGGAAATGGGCGGCAAGCCACGGCGCAAGAACCCGCGAGGAGGTCTGTATAACGA
GCTTCAGAAGGATAAGATGGCCGAGGCCTACTCAGAAATAGGAATGAAGGGAGAGCG
GCGGAGAGGCAAGGGCCACGATGGTCTGTATCAGGGGCTTCCACGGCAACCAAAGA
CACATATGACGCTCTCCACATGCAGGCCCTCCCCCGCGGGAGGGCAGGGGATCTCTC
CTTACTTGTGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCCAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA
CCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAG
CGTGCGCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCAACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATC
TGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACG
GCGTGACGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCGCCACGACTTCTTCAAGTCC
GCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCAGCTTCAAGGACGACGGCACCT
ACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCT

GAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA
CTTCAACAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCC
AACTTCAAGATCCGCCACAACGTGGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACC
AGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAG
CACCCAGTCCGTGCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTgCTG
GAgTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTtgaTGATCATAATCAAGCCATATCACATCTGTA
GAGGTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGA
ATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAAT
AGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC
AAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGT
GACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGTATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAA
GGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTC
AAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCT
TCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTT
GGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCATCTAGAGTCGACGCATGC

权 利 要 求 书

1. 一种制备环状单链 DNA 的方法，包括如下步骤：
 - 1) 提供模板 DNA，所述模板 DNA 为包含目标链和互补链的环状双链 DNA；
 - 2) 向模板 DNA 中加入 gRNA 和 Cas 切口酶，所述 gRNA 和互补链的部分区域互补配对，其中 Cas 切口酶在 gRNA 的引导下在互补链上形成一个或多个缺口；
 - 3) 使用核酸外切酶对含有缺口的互补链进行消化，获得含有环状单链 DNA 形式的目标链的消化产物。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中 gRNA 为 sgRNA。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，所述 Cas 切口酶是 Cas9 切口酶。
4. 如权利要求 3 所述的方法，所述 Cas9 切口酶是选自下组的一个或多个：D10A，H840A，N863A、和 N854A。
5. 如以上权利要求任一项所述的方法，所述核酸外切酶是选自下组的一个或多个：核酸外切酶 T7、核酸外切酶 ExoIII、和 Lambda Exo。
6. 如以上权利要求任一项所述的方法，所述模板 DNA 是质粒。
7. 如权利要求 6 所述的方法，所述质粒包含复制起始位点和目的基因，并且不包含筛选标签基因。
8. 如权利要求 7 所述的方法，所述复制起始位点选自 pUC 复制起始位点、pMB1 及其衍生物复制起始位点、ColE1 复制起始位点和 R6K γ 复制起始位点。
9. 如以上权利要求任一项所述的方法，所述一个或多个缺口是大于或等于两个缺口。
10. 如以上权利要求任一项所述的方法，所述模板 DNA 的序列长度及缺口的数量比例小于 10 kb 1 个缺口，优选小于 5 kb 1 个缺刻位点，进一步优选小于 3kb 1 个缺刻位点，进一步优选小于 2kb 1 个缺刻位点，最优选小于 1kb 1 个缺刻位点。
11. 如以上权利要求任一项所述的方法，所述 Cas 切口酶和 gRNA 以及模板 DNA 的摩尔比为 3: 3: 1-12: 12: 1，优选 4: 4: 1-11: 11: 1，最优选 5: 5: 1-10: 10: 1。
12. 如以上权利要求任一项所述的方法，在步骤 3) 之后还包括如下步骤：对所述消化产物进行纯化，获得高纯度的环状单链 DNA。
13. 一种制备线性单链 DNA 的方法，包括如下步骤：对根据以上权利要求任一项所述的方法获得的环状单链 (css) DNA 进行切割以获得线性单链 (lss) DNA。
14. 一种用于制备环状或线性单链 DNA 的试剂盒，含有 Cas 切口酶和核酸外切酶。
15. 如权利要求 14 所述的试剂盒，所述 Cas 切口酶是 Cas9 切口酶。
16. 如权利要求 15 所述的试剂盒，所述 Cas9 切口酶是选自下组的一个或多个：D10A，H840A，N863A、和 N854A。
17. 如权利要求 14-16 任一项所述的试剂盒，所述核酸外切酶是选自下组的一个或多个：核酸外切酶 T7、核酸外切酶 ExoIII、和 Lambda Exo。

18. 如权利要求 14-17 任一项所述的试剂盒，还含有阳性参照模板 DNA 和阳性 gRNA。
19. 如权利要求 14-18 任一项所述的试剂盒，还含有模板 DNA 和 gRNA。
20. 如权利要求 14-19 任一项所述的试剂盒，还含有缓冲液。
21. 如权利要求 14-20 任一项所述的试剂盒，还含有用于对环状或线性单链 DNA 进行纯化的试剂。
22. 一种环状或线性单链 DNA，包含复制起始位点和目的基因，并且不包含筛选标签基因。
23. 如权利要求 22 所述的环状或线性单链 DNA，所述复制起始位点选自 pUC 复制起始位点、pMB1 及其衍生物复制起始位点、ColE1 复制起始位点和 R6K γ 复制起始位点。
24. 一种组合物，包含如权利要求 22 或 23 所述的环状或线性单链 DNA。
25. 权利要求 24 所述的组合物，所述组合物为药物组合物。
26. 根据权利要求 1-11 任一项所述方法获得的含有环状单链 DNA 形式的目标链的消化产物。
27. 如权利要求 22 或 23 所述的环状或线性单链 DNA，或如权利要求 24 或 25 所述的组合物，或如权利要求 26 所述的消化产物在基因治疗、基因重组、DNA 文库构建、DNA 折纸或 DNA 存储元件中的应用。