**审稿意见与作者修改说明（稿号：2021-0282）**

|  |
| --- |
| **初审专家意见与作者修改说明** |
| 专家1意见：1. 方法中1.3.2 噬菌体增殖中“菌液应该是从逐渐浑浊到突然澄清”这句改为：可观察到培养液先是逐渐变浑浊，再到突然变澄清。”回复：已按专家意见修改。 2. 双层平板法是否改为双层琼脂平皿法？请确认。 回复：已按专家意见修改。3. 文中提到最佳感染复数，方法和结果里的描述重复。请适当修改。 回复：已按专家意见对结果描述进行了修改。4. “VP2 全基因组的测序进行本课题之前已经完成”关于此部分补充描述，建议你具体知名哪些是之前完成未发表，哪些是本课题深入分析地工作。回复：已按专家意见修改。 5. “将VP2全基因组核苷酸序列在NCBI中进行BLAST，共比较出15株噬菌体”这里提到15株噬菌体包括VP2, 建议明确之前VP2序列之前研究工作已将序列提交数据库，本研究是在此基础上进一步分析和比对序列。请从文字描述上明确。回复：已明确，15株不包括VP2。 6. 尾丝蛋白C末端后10个氨基酸缺失后，与其受体之间的相互作用减弱，表明尾丝蛋白与受体结合部位位于C末端。此结论建议可以不在此讨论。回复：已按专家意见修改。 7. 参考文献再补充一些。 回复：已按专家意见修改。专家2意见1. 1. 2.1噬菌体形态及2.4 噬菌体基因组特征序列分析两部分内容与“王多春，汪敏，李燕萍，董辉，刘中华，刘延清，祁国明，高守一，金维荣，阚飙. 霍乱弧菌噬菌体VP2基因组序列的测定与分析. 病毒学报. 2005, 21(1): 60-64”中内容雷同。 回复：“王多春，汪敏，李燕萍，董辉，刘中华，刘延清，祁国明，高守一，金维荣，阚飙. 霍乱弧菌噬菌体VP2基因组序列的测定与分析. 病毒学报. 2005, 21(1): 60-64”这篇文章是前期课题组的研究成果，当时的拍摄技术拍到的照片不是很清晰，因此在本文中对该噬菌体重新进行了拍摄，获得了清晰的六面体短尾噬菌体照片。 基因组测序，是在之前研究的基础上重新进行了测序和功能预测，是对之前工作的补充，相关描述已经在本文中进行补充。2. Genbank中Vibrio phage VP2, complete genome为AY505112 (NC\_005879，2003年提交)注释有47个ORF。与本文中45个ORF并不相符。回复：解释同上。3. 结果中表述为“将噬菌体VP2提取蛋白后，对浓度进行测定，取5 μg 用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测VP2蛋白的表达，将表达的肽段切下后脱色、酶解、脱盐处理，使用HPLC-MS/MS高效液相色谱-质谱联用技术，以液相色谱作为分离技术，质谱作为检测系统对成熟颗粒中的蛋白质进行质谱分析。” 首先，这段描述应是材料和方法中的内容，不应放在结果部分。其次根据材料和方法中“将纯化得到的噬菌体用裂解液裂解（裂解液中加入蛋白酶抑制剂），重悬，超声破碎，30%振幅，超声1s，停1s，共计2 min，然后离心，12000 g ，30 min，收集上清，常规SDS-PAGE电泳后，对凝胶进行考马斯亮蓝染色、脱色后，对显色条带脱色、酶解、脱盐”表述可知，作者提取的是VP2的组成蛋白，并不是表达的蛋白，更不是表达的肽段，而且肽段如何再进行酶解？SDS-PAGE电泳的是完整的蛋白，酶解后才能得到肽段，进行质谱。作者对实验过程叙述错误。回复：已按专家意见在文中进行了修改。4.将纯化得到的噬菌体用裂解液裂解（裂解液中加入蛋白酶抑制剂），重悬，回复：已改为将纯化得到的噬菌体沉淀用裂解液裂解（裂解液中加入蛋白酶抑制剂）并使其重悬。5. 通过在线 RAST，预测出 49个ORF，起始密码子均为AUG，（图1-3，表1-4），我们对49个 ORF 重新进行了基因注释（表1-4），本文中不存在标注为图1-3，表1-4的图表。重新注释前后有何差异？回复：图注及图表序号已修改。我们重新预测出的ORF数量以与之前的预测结果不同，49个ORF的功能本课题组在2017年注释过，现在是重新注释。6 讨论部分： “VP2是从浙江温州河水中分离到的烈性噬菌体”，已确定是烈性噬菌体了，没必要再说“该噬菌体在霍乱弧菌细胞内生产的潜伏期 60 min，在最佳MOI时，噬菌体在2小时能出现大量碎片，说明其为烈性噬菌体”。回复：已按专家意见在文中修改。 7 讨论部分：我们对VP2的49个ORF重新进行了功能预测，其中预测出了尾丝蛋白（ORF20）审稿意见：根据表可知，ORF20为1074bp（19364-20437），和已发表文章“王多春，汪敏，李燕萍，董辉，刘中华，刘延清，祁国明，高守一，金维荣，阚飙. 霍乱弧菌噬菌体VP2基因组序列的测定与分析. 病毒学报. 2005, 21(1): 60-64”中预测的尾丝蛋白ORF19是一样的，并无差别。回复：已在1中回复。 |
| **复审专家意见与作者修改说明** |
| 专家1意见：2021.6.2专家意见回复2对于与2005年已发表文献的雷同部分，仅阐述为“重新测序、重新注释”，没有重新做的原因，也没有重做后与之前结果的差异比较，不能说明其是个新的研究内容。获得的基因组和2005年提交的是完全一致，没有任何意义。回答：文中已修改，我们将VP2噬菌体全基因组序列的FASTA文件提交至细菌基因预测以及注释的在线序列分析数据库RAST，预测出49个ORF，（不同于05年预测的45个ORF），对这49个ORF重新进行了注释。3. SDS-PAGE需提供胶图，一维的SDS-PAGE是不能完全分离噬菌体的全部蛋白的，作者在SDS-PAGE上获得了几个条带？是按混合蛋白进行质谱鉴定和匹配分析的吗？回答：胶图如下，我们只是对成熟颗粒中的蛋白进行质谱分析，调节蛋白及在噬菌体生命周期过程中的蛋白可能不能在该图中显示出来。 |