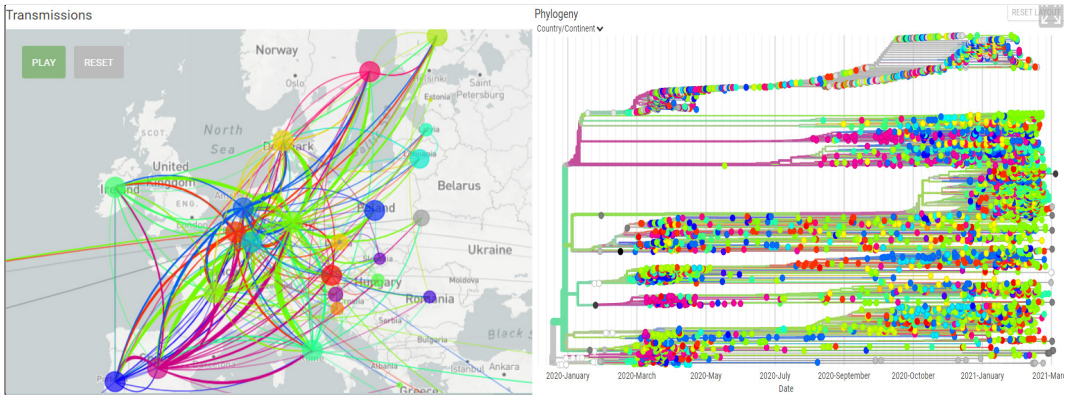


SARS-CoV-2 har spridit sig och muterat. Bild från databasen GISAID (gisaid.org).

SARS-CoV-2

– undersökning med bioinformatik (elevinstruktion)

Det är höst 2021. Person X har efter en veckas förkylning plötsligt fått svårt att andas. Är det covid-19? Varifrån kommer smittan? Du har rollen som sjukhusets bioinformatiker och ska hjälpa läkaren.

Världen har under snart två år genomlevt en pandemi. Antalet smittade har sjunkit ordentligt, men fortfarande förekommer fall där personer hamnar på sjukhus för att få hjälp med de problem med andningen som kännetecknar covid-19.

Under hösten 2021 har arbetet vid Företaget nästan återgått till det normala med riktiga möten med kollegorna. Person X har en nära kollega som nyligen besökt Italien. Är det därifrån smittan har kommit? På sjukhuset tar man genast ett PCR-test från de övre luftvägarna. Svaret är ett positivt och provet skickas in för sekvensering.

Du är bioinformatiker på sjukhuset och får några frågor från läkaren via e-post:

1. ***Har viruset några särskilda förändringar i genen för spikeproteinet i den del av viruset som fäster till människans celler via ACE2-receptorn?***
2. ***Är viruset av någon av de kända varianterna som är i omlopp? ("Brittiska", "Norska" eller "Sydafrikanska").***
3. ***Kan vi se om patienten har smittats av kollegan som nyss varit i Italien?***

På nästa sida visas nukleotid-sekvensen för Spike-proteinet (kallas också för surface glukoprotein, eftersom det sitter på virusets yta). Sekvensen är 3813 baser lång. Virusets totala arvsmassan består av över 29000 baser. Viruset är ett RNA-virus, men sekvensen fås i form av en DNA-sekvens. Bilden till vänster nedan visar att virusets yta är täckt av många utstickande S-proteiner (gula). Varje S-protein är sammansatt av tre peptid-kedjor som sitter ihop i en trimer (tri = tre och mer = byggsten).

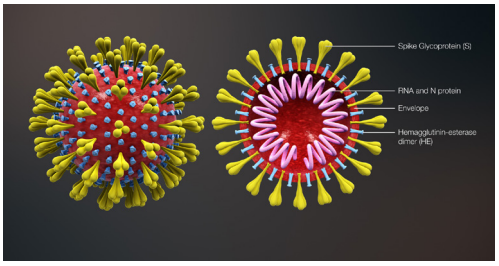
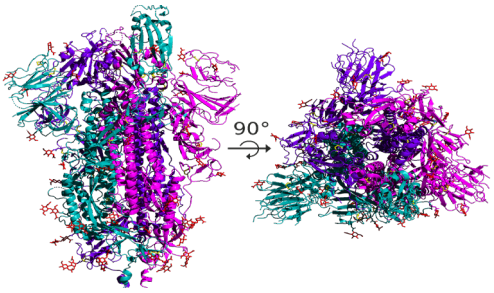


Illustration av SARS-CoV-2-viruset med S-proteinet i gul färg. Varje S-protein består av tre peptider.

Bild vänster: www.scientificanimations.com, CC BY-SA 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>, via Wikimedia Co



I viruset finns en gen för S-proteinet. Tre S-peptider sätts ihop och bildar en trimer som här visas i grönt, rosa och lila. Dels från sidan och dels uppifrån.

Bild: Public domain (Wikimeida commons)

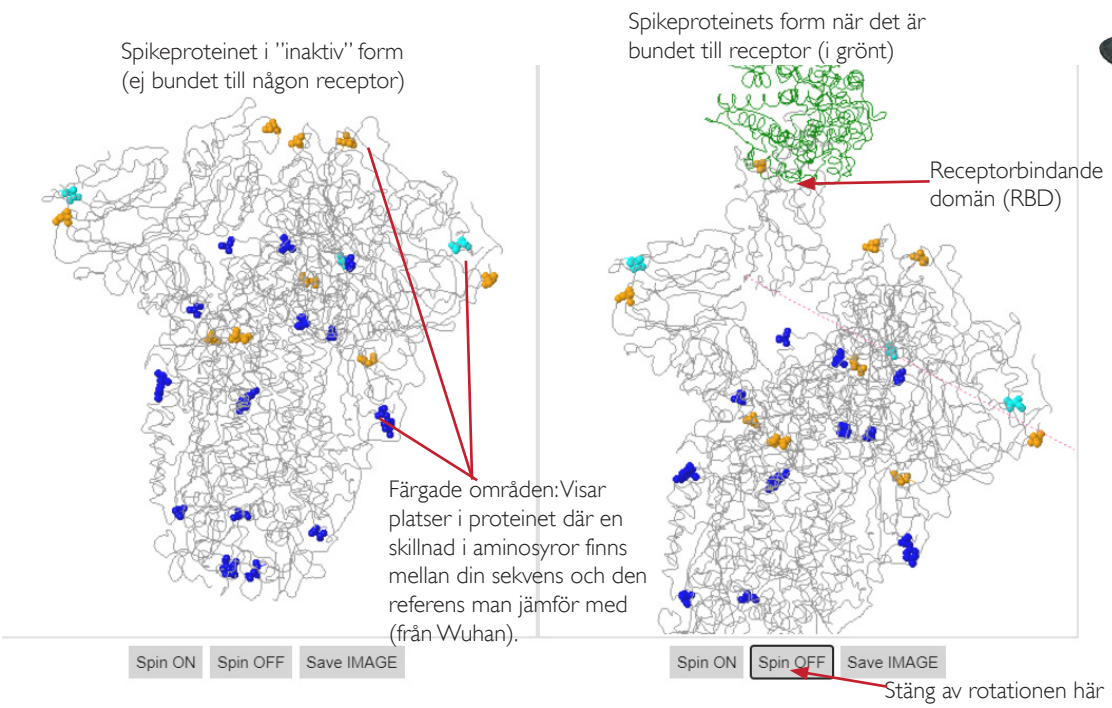
Uppgift 1 - Hur muterat är spikeproteinet?

Du börjar med att jämföra patientens virus-sekvens för S-proteinet med den ursprungliga virusvarianten från Wuhan och ta reda på hur många mutationer som skett. Gör så här:

1. Öppna webbplatsen GISAID https://www.gisaid.org/
2. Under fliken fliken Database Features välj *CoVsurver mutations App*. Du ska se en tom ruta under rubriken ”Paste your protein or nucleotide FASTA sequence(s) into the text area below.”
3. Kopiera sekvensen här nedanför (Ctrl+C).
4. Klistra in sekvensen i den tomma rutan på gisaid.org-sidan. Default är att referensgenomet från Wuhan är valt, låt det stå (hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019).
5. Klicka på *Start analysis*.

Patientens virus nukleotidsekvens (i DNA-format) för S-proteinet (”Spike protein”)

```
ATGTTTGTTTTTCTTGTTTTATTGCCACTAGTCTCTAGTCAGTGTGTTAATCTTACAACCAGAACTCAAT
TACCCCCTGCATACACTAATTCTTTCACACGTGGTGTTTATTACCCTGACAAAGTTTTCAGATCCTCAGT
TTTACATTCAACTCAGGACTTGTTCTTACCTTTCTTTTCCAATGTTACTTGGTTCCATGCTATCTCTGGG
ACCAATGGTACTAAGAGGTTTGATAACCCTGTCCTACCATTTAATGATGGTGTTTATTTTGCTTCCACTG
AGAAGTCTAACATAATAAGAGGCTGGATTTTTGGTACTACTTTAGATTCGAAGACCCAGTCCCTACTTAT
TGTTAATAACGCTACTAATGTTGTTATTAAAGTCTGTGAATTTCAATTTTGTAATGATCCATTTTTGGGT
GTTTACCACAAAAACAACAAAAGTTGGATGGAAAGTGAGTTCAGAGTTTATTCTAGTGCGAATAATTGCA
CTTTTGAATATGTCTCTCAGCCTTTTCTTATGGACCTTGAAGGAAAACAGGGTAATTTCAAAAATCTTAG
GGAATTTGTGTTTAAGAATATTGATGGTTATTTTAAAATATATTCTAAGCACACGCCTATTAATTTAGTG
CGTGATCTCCCTCAGGGTTTTTCGGCTTTAGAACCATTGGTAGATTTGCCAATAGGTATTAACATCACTC
GGTTTCAAACTTTACTTGCTTTACATAGAAGTTATTTGACTCCTGGTGATTCTTCTTCAGGTTGGACAGC
TGGTGCTGCAGCTTATTATGTGGGTTATCTTCAACCTAGGACTTTTCTATTAAAATATAATGAAAATGGA
ACCATTACAGATGCTGTAGACTGTGCACTTGACCCTCTCTCAGAAACAAAGTGTACGTTGAAATCCTTCA
CTGTAGAAAAAGGAATCTATCAAACTTCTAACTTTAGAGTCCAACCAACAGAATCTATTGTTAGATTTCC
TAATATTACAAACTTGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTTAACGCCACCAGATTTGCATCTGTTTATGCTTGG
AACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAATTCCGCATCATTTTCCACTT
TTAAGTGTTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGCAGATTCATT
TGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACTGGAAAGATTGCTGATTATAATTAT
AAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGGAATTCTAACAATCTTGATTCTAAGGTTGGTG
GTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAAC
TGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTTGAAGGTTTTAATTGTTACTTTCCTTTACAA
TCATATGGTTTCCAACCCACTTATGGTGTTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGTACTTTCTTTTGAAC
TTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTAATTTGGTTAAAAACAAATGTGTCAA
TTTCAACTTCAATGGTTTAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAGTCTAACAAAAAGTTTCTGCCTTTCCAA
CAATTTGGCAGAGACATTGATGACACTACTGATGCTGTCCGTGATCCACAGACACTTGAGATTCTTGACA
TTACACCATGTTCTTTTGGTGGTGTCAGTGTTATAACACCAGGAACAAATACTTCTAACCAGGTTGCTGT
TCTTTATCAGGGTGTTAACTGCACAGAAGTCCCTGTTGCTATTCATGCAGATCAACTTACTCCTACTTGG
CGTGTTTATTCTACAGGTTCTAATGTTTTTCAAACACGTGCAGGCTGTTTAATAGGGGCTGAACATGTCA
ACAACTCATATGAGTGTGACATACCCATTGGTGCAGGTATATGCGCTAGTTATCAGACTCAGACTAATTC
TCATCGGCGGGCACGTAGTGTAGCTAGTCAATCCATCATTGCCTACACTATGTCACTTGGTGCAGAAAAT
TCAGTTGCTTACTCTAATAACTCTATTGCCATACCCATAAATTTTACTATTAGTGTTACCACAGAAATTC
TACCAGTGTCTATGACCAAGACATCAGTAGATTGTACAATGTACATTTGTGGTGATTCAACTGAATGCAG
CAATCTTTTGTTGCAATATGGCAGTTTTTGTACACAATTAAACCGTGCTTTAACTGGAATAGCTGTTGAA
CAAGACAAAAACACCCAAGAAGTTTTTGCACAAGTCAAACAAATTTACAAAACACCACCAATTAAAGATT
TTGGTGGTTTTAATTTTTCACAAATATTACCAGATCCATCAAAACCAAGCAAGAGGTCATTTATTGAAGA
TCTACTTTTCAACAAAGTGACACTTGCAGATGCTGGCTTCATCAAACAATATGGTGATTGCCTTGGTGAT
ATTGCTGCTAGAGACCTCATTTGTGCACAAAAGTTTAACGGCCTTACTGTTTTGCCACCTTTGCTCACAG
ATGAAATGATTGCTCAATACACTTCTGCACTGTTAGCGGGTACAATCACTTCTGGTTGGACCTTTGGTGC
AGGTGCTGCATTACAAATACCATTTGCTATGCAAATGGCTTATAGGTTTAATGGTATTGGAGTTACACAG
AATGTTCTCTATGAGAACCAAAAATTGATTGCCAACCAATTTAATAGTGCTATTGGCAAAATTCAAGACT
CACTTTCTTCCACAGCAAGTGCACTTGGAAAACTTCAAGATGTGGTCAACCAAAATGCACAAGCTTTAAA
CACGCTTGTTAAACAACTTAGCTCCAATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTTTTAAATGATATCCTTGCACGT
CTTGACAAAGTTGAGGCTGAAGTGCAAATTGATAGGTTGATCACAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGACAT
ATGTGACTCAACAATTAATTAGAGCTGCAGAAATCAGAGCTTCTGCTAATCTTGCTGCTACTAAAATGTC
AGAGTGTGTACTTGGACAATCAAAAAGAGTTGATTTTTGTGGAAAGGGCTATCATCTTATGTCCTTCCCT
CAGTCAGCACCTCATGGTGTAGTCTTCTTGCATGTGACTTATGTCCCTGCACAAGAAAAGAACTTCACAA
CTGCTCCTGCCATTTGTCATGATGGAAAAGCACACTTTCCTCGTGAAGGTGTCTTTGTTTCAAATGGCAC
ACACTGGTTTGTAACACAAAGGAATTTTTATGAACCACAAATCATTACTACACACAACACATTTGTGTCT
GGTAACTGTGATGTTGTAATAGGAATTGTCAACAACACAGTTTATGATCCTTTGCAACCTGAATTAGACT
CATTCAAGGAGGAGTTAGATAAATATTTTAAGAATCATACATCACCAGATGTTGATTTAGGTGACATCTC
TGGCATTAATGCTTCAGTTGTAAACATTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTTA
AATGAATCTCTCATCGATCTCCAAGAACTTGGAAAGTATGAGCAGTATATAAAATGGCCATGGTACATTT
GGCTAGGTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAATGGTGACAATTATGCTTTGCTGTATGACCAGTTG
CTGTAGTTGTCTCAAGGGCTGTTGTTCTTGTGGATCCTGCTGCAAATTTGATGAAGACGACTCTGAGCCA
GTGCTCAAAGGAGTCAAATTACATTACACATAA
```



Bilderna ovan visar resultatfönstret med Spike-proteinet. Till vänster syns Spike-proteinets inaktiva form och till höger när det är bundet till en receptor. Färgade områden motsvarar platser i proteinet med mutationer som skiljer från referensen (ursprungsvarianten från Wuhan). På webbsidan, i texten under bilderna, anges skillnaden i antalet aminosyror mellan de två varianterna och hur många % av det totala antalet aminosyror som är identiska. OBS! **Bollarnas färg:** orange betyder att det kan påverka bindning till receptor. Övriga färger kan du bortse från. OBS! **Bollar i grupp** - för att lyfta fram förändrade aminosyror är de illustrerade med kulmodeller. En plats med flera blåa bollar motsvarar alltså **en** aminosyra som förändrats (den består av flera kolatomer som fått samma färg).

A. Hur många skillnader i aminosyrasekvenserna är det mellan patientens SARS-CoV-2-virus S-protein och det ursprungliga viruset? Stämmer det med antalet färgade bollar i bilden? Varför/Varför inte? (tips: läs figurtext på sida 1).

I tabellen under bilderna visas alla hittade variationer med beteckningar som är färgkodade på samma sätt som i figurerna, t ex turkosfärgade Y144del(143). Siffran i beteckningen motsvarar en position i S-proteinet. Prova att föra muspekaren över en turkosblå boll i bilden på proteinet (klicka inte, vänta någon sekund så dyker en informationsruta upp vilket nummer aminosyran har). I informationsrutan borde siffran 143 dyka upp (platsen för variationen). Förstora/zooma in så du ser bollarna ordentligt (två fingrar på en musplatta).

B. Studera proteinet nära platsen där det binder till receptorn (RBD). Vilken beteckning (se tabellen, jämför Y144del(143)) har den variation som ligger närmast RBD?

C. Skriv upp alla beteckningar för alla varianter som du fått fram för spikeproteinet.

D. Nu har du alla beteckningarna för variationerna i patientens virus. I tabellen här nedanför i denna instruktion finns en sammanställning av vilka variationer som är vanliga i den Brittiska, Sydafrikanska eller Norska virustypen (se tabell nedan). Vilken variant är patientens virus mest lik? Vilken kod har den?

Tabellen visar tre varianter av SARS-CoV-2 som ofta nämnts i mediarapporteringen under 2021. Virusvarianterna har olika koder. Några karaktäristiska variationer på aminosyranivå som förekommer hos de olika virusvarianterna bekrivs med beteckningar där siffrorna markerar en position i S-proteinet.

Namn	Kod	Karaktäristiska variationer på aminosyranivå
Brittiska varianten	B117	N501Y, 69–70del, P681H (* vissa med E484K?)
Sydafrikanska varianten	B1351	K417N, E484K, N501Y
Norska varianten	B1525	E484K, F888L

E. I webbsidans tabell är varianternas beteckningar klickbara i den högra kolumnen. Klicka på den variation som ligger närmast RBD. Du får upp en ruta med information. Klicka nu på (see map) för att se var denna specifika aminosyra-variation har uppkommit.

Var har denna aminosyra-variation uppkommit först enligt denna källa?

F. Hittills har analysen fokuserat helt på virusets arvsmassa för S-proteinet. Jämförelserna har gjorts mot det ursprungliga viruset från Wuhan.

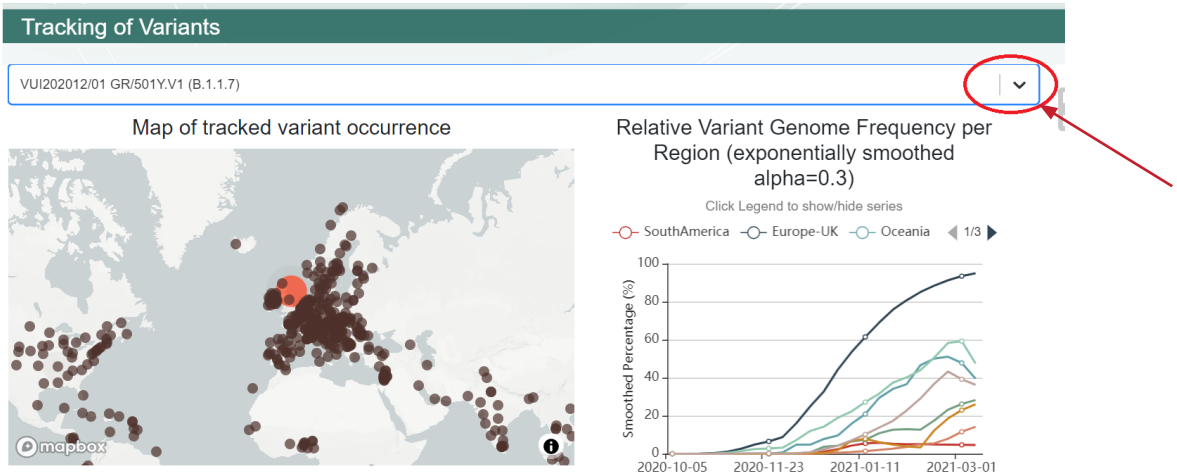
Kan det finnas fler mutationer i virusets arvsmassa som skiljer patientens virus från den ursprunliga varianten? Motivera ditt svar!

Tips!

Lista på aktuella varinater? Den engelska wikipediasidan uppdateras med nya virusvarianter efterhand. Länk: en.wikipedia.org/wiki/Variants_of_SARS-CoV-2#Overview_table

Uppgift 2 - Kommer smittan från Italien?

Patienten undrar om hen har blivit smittad av sin kollega som varit i Italien eller om smittan kommer från någon annan. Två olika verktyg ska användas: dels en geografisk databas via GISAID (se bild nedan) och dels genom att använda verktyget BLAST i en virusdatabas (se nästa sida). Kom ihåg att du i förra uppgiften kommit fram till vilken variant som patienten bär på. Den varianten ska du nu titta närmare på.



Metod I: Geografisk information om förekomst av kända virusvarianter

Starta om huvudsidan gisaid.org och dubbelklicka på kartan till höger som har rubriken *hCoV-19 Tracking of Variants*. Du får upp en karta. För att välja den virusvariant som patienten verkar ha: se pil och ring i bild ovan.

A. Hur många olika virus följer man just nu i denna databas?
Kartans bruna cirklar markerar länder och/eller delstater i länder. När man för musen över punkterna ser man hur många registrerade fynd man gjort av den virusvariant som man valt att titta på. Med + och - kan du zooma in och ut i kartan. Antalet registrerade för respektive land visas. Siffrorna är inte för olika varianter utan helt enkelt för antalet fynd av den varianten som du valt i rullgardinmenyn.

B. Välj den virusvariant (kod) som du kom fram till stämmer bäst på patientens sekvens och studera kartan. Hur vanlig är denna variant just nu i Sverige där du bor? (finns den alls? i delar av landet eller i hela landet?)

C. Kan man utifrån kartans information avgöra om patienten kan ha fått viruset av sin kollega som rest i Italien? Ja eller Nej? Motivera ditt svar!

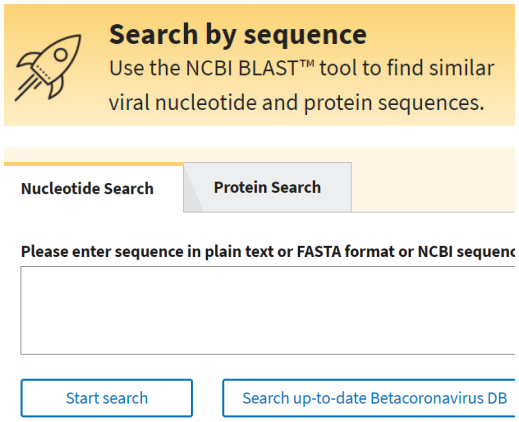
Metod II: Studera sekvensen i detalj med en virusdatabas

Den här metoden bygger på att jämföra virusets arvsmassa med den information som finns lagrad i NCBI´s virusdatabas med stöd av verktyget BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). I den här övningen använder du sekvensen för S-proteinet som består av 3813 bp (baspar, antalet kvävebaser). Virusets totala arvsmassa består av över 29000 bp.

Så här gör du

1. Öppna NCBI´s virusdatabas:

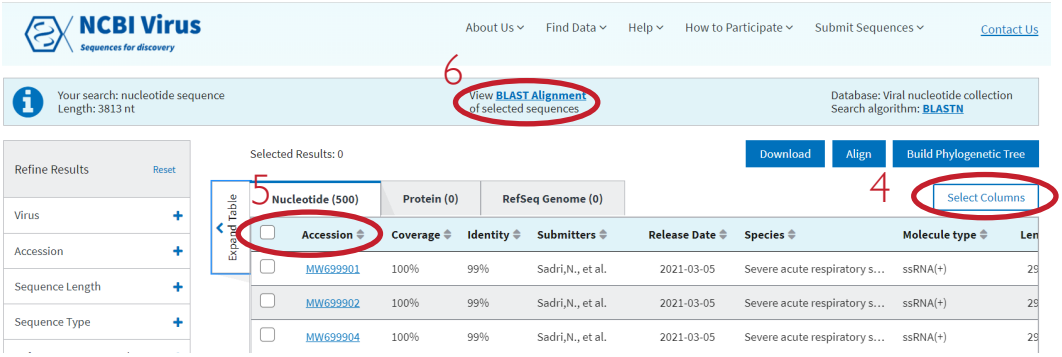
www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi



2. Klicka på gul ruta *Search by sequence*.

3. Kopiera sekvensen för patientens virus S-protein från tidigare sida (ctrl+C) och klistra in (ctrl+V) i rutan för Nucleotide search och klicka på *Start search*. Programmet jämför den inmatade sekvensen med det bibliotek av sekvenser som finns i databasen.

De träffar du får fram presenteras i en tabell-vy (se bild nedan). **Identity** visar med avrundat värde många % av den inmatade sekvensen som matchar mot databasens lagrade sekvenser. Genom att klicka på rubrikerna på flikarna sorteras träffarna i stigande eller fallande ordning.



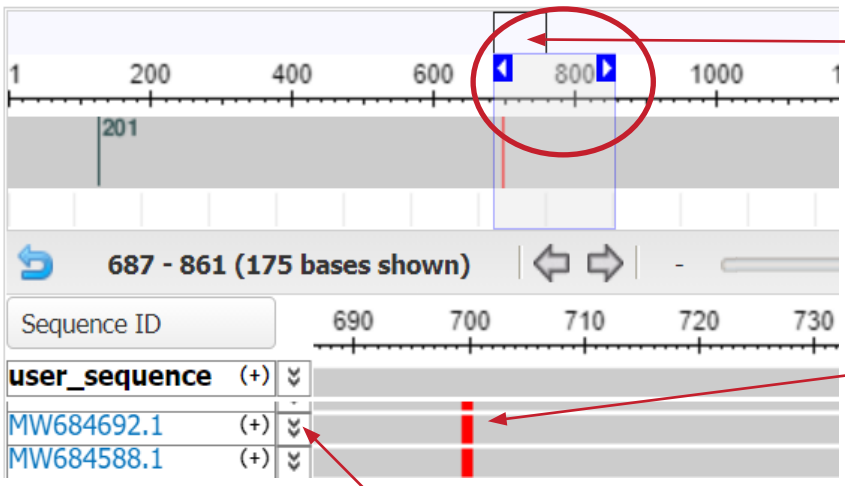
4. Via Select Columns (se röd ring till höger) kan du ta bort överflödiga kolumner så att tabellen blir mer lätthanterlig (OBS man måste bekräfta med Apply längst ned i dialogrutan). Ta exempelvis bort Coverage, Species, Molecule type, Length, USA. Spara rubriken Geo Location som talar om var i världen som träffarna registrerats.

D. Titta igenom - är alla träffar från samma geografiska område?

5. Välj alla sekvenser genom att markera rutan till vänster om Accession.

6. Klicka på View BLAST Alignment för att se hur den sekvens du sökt med matchar träffarna i databasen. På nästa sida får du hjälp att tolka det du ser.

Graphic view of selected Blast results



Flytta läsfönstret genom att peka och dra i rutan ovanför de blå pilarna.

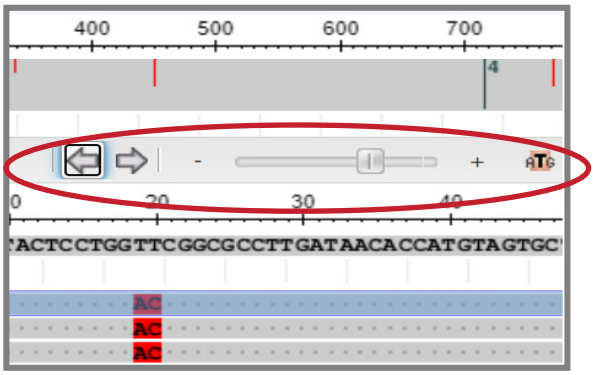
Den sekvens du matat in kallas "user_sequence"

Röda streck markerar att här finns en skillnad mellan din sekvens och träffarna i databasen.

Klicka på dubbelpilen på den översta sekvensen i databasen. Då ser du kodoner.

Resultatfönstret av BLAST-körning visas i bilden ovan. Skillnader mellan den sekvens du laddat upp (user_sequence) och träffar i databasen visas med röda streck.

E. Hur många skillnader finns det mellan patientens virus från träffarna i databasen?



Ringen i rött visar reglage för att flytta och förstora resultatet. Knappen ATG (till höger i bild i ringen) zoomar in enskilda nukleotider. Flytta fönstret till områden med röda streck och zooma in och flytta med piltangenter.

F. Se bildtexten till höger här ovanför hur du gör för att zooma in så du ser nukleotiderna. Vilken eller vilka nukleotider är muterade? Vilken position har de i sekvensen?

G. Klicka på nedåtriktade dubbelsymbolen bredvid första träffen i listan. Hur har mutationen påverkat kodonet jämfört med träffarna i listan?

H. Gav denna metod någon vägledning i varifrån patienten fått sin smitta? Varför/ Varför inte?

Uppgift 3 - Analys av hela virusgenomet

Som bioinformatiker har du ju tillgång till hela virussekvensen, inte bara sekvensen för Spikeproteinet som du hittills arbetat med. Du använder samma metod som du redan gjort i uppgift 2, men med hela patientens virussekvens (över 29000 bp). Då får du en nära 100%-ig matchning med accession nummer MW450666.

1. Öppna sidan https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
2. Skriv in accession nummer i sökrutan (bredvid står All databases).
3. Öppna upp träffen.
4. Leta fram TITLE på den forskningsrapport som ligger bakom denna datarapport.

A. Vad säger titeln på forskningartikeln?

B. Ger informationen svar på om patient X blivit smittad av sin kollega på Företaget som varit i Italien?

C. Hur ska man gå vidare om man vill smittspåra utifrån det vi vet nu?

Uppgift 4 - Värdering av resultat

Diskutera resultatens användbarhet genom att ta ställning till påståendena nedan. Stämmer de, ja eller nej? Motivera!

I. Stor likhet mellan en patients virus-sekvens och en träff i databasen pekar på att det är den som lämnat provet till databasen som smittat patienten.

II. Stor likhet mellan patientens virus-sekvens och en träff i databasen pekar på att den patienten blivit smittad av kommer från samma geografiska område som den som lämnat prov till databasen.

III. Flera virus-sekvenser från samma geografiska område som alla liknar patientens virus-sekvens stärker påstående II.

IV. Om det var möjligt att få in data för viruset hos den person som de facto har smittat patienten skulle man få 100 procent överensstämmelse mellan virus-sekvenserna.

Uppgift 5 - Mutationer och vacciner

A. Alla mutationer påverkar inte hur bra vacciner fungerar. Vad tror du krävs för att en mutation hos viruset ska påverka effekten av vacciner?

B. Vad kan öka sannolikheten för att en virusvariant som bär på vissa mutationer återfinns i databaserna? (och tvärtom: varför hittas vissa virusvarianter inte i databaserna?)

Uppgift 6 - Sammanfatta ett svar till läkaren

Vad kan du berätta för läkaren och patienten om vad du med bioinformatik kommit fram till angående det virus som smittat X?

Formulera ett kort e-postsvar där de tre frågorna du fick från början besvaras och skicka till lä(k/r)aren!

Uppgift 7 - Smittspårning och bioinformatik

Smittspårning går normalt ut på att en smittad person kontaktar alla dem som hen har varit i kontakt med. I artikeln intill menar man att smittspårningen av SARS-CoV-2 skulle bli mer effektiv om man använde bionformatik.

A. Varför gör man inte det redan?

B. Vilka kostnader kan finnas med smittspårning med bioinformatik?

C. Vad skulle motivera att samhället satsar pengar på detta?

nature

COMMENT · 01 MARCH 2021

Want to track pandemic variants faster? Fix the bioinformatics bottleneck

"Much of the analysis of these genome sequences is not done by public-health bodies. It rests on the initiative of academic researchers, many of them early in their careers, who cobble together software and analytical tools in their own time to find essential answers. Nextstrain1, an open-source project involving groups from Switzerland and the United States, is helping to coordinate these efforts."

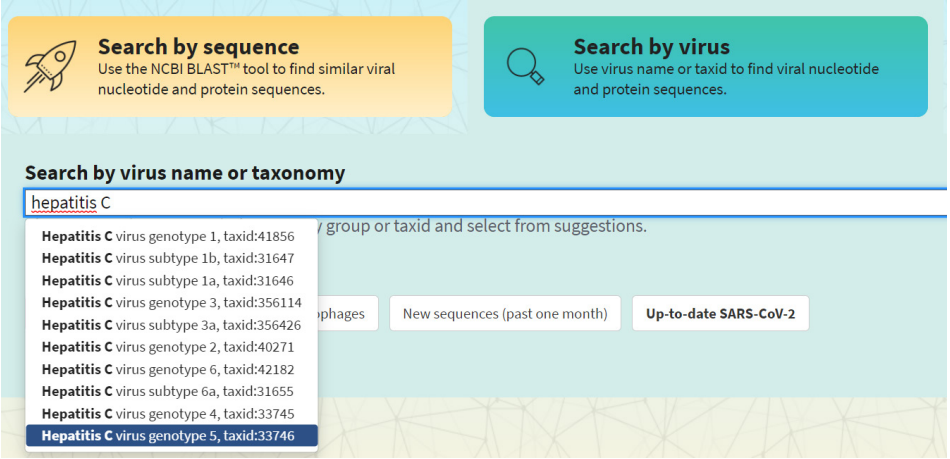
Uppgift 8 - Utvärdera övningen

A. I övningen har du mött några olika databaser och bioinformatiska verktyg. Vad var lätt och vad var svårt? Berätta!

B. Har arbetet väckt några frågor om biologi eller något annat? Berätta!

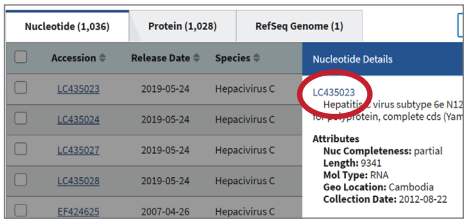
Gör ett eget case

När man förstått hur virusdatabasen fungerar så kan man konstruera egna ”case” med tillhörande historier och problemställningar. För att ta fram en sekvens att utgå från (Patientens virus-sekvens) letar man först fram en riktig sekvens i databasen från något land som är intressant att använda för det ”Case” man vill bygga. Sedan förändrar man sekvensen lite (”muterar”) i en textredigerare (word) och låter den bli Patientens virus-sekvens.



1. Från virusdatabasens startsida, välj ”Search by virus” (se bild ovan), blå ruta till höger.
2. Skriv in ”SARS-CoV-2” i sökrutan, vänta och välj den formulering som dyker upp.
3. Träffbilden i tabellen visar alla registrerade sekvenser. För att få fram exempelvis träffar från ett visst land, använd filtreringsverktygen som finns till vänster om tabellen. Klicka på ”Geographic region” för att välja träffar efter region/land.
4. Klicka på ID-beteckningen (Accession) för en träff. En ruta med detaljer visas. Klicka igen på numret för träffen (accession number) och du kommer till själva sekvensdatat (se bild nedan).
5. Klicka på FASTA (se bild nere till höger) och kopiera den sekvens du får fram och klistra in i ett textdokument.
6. Redigera sekvensen (mutera) på valfritt sätt så att den skiljer sig lite åt från den du vill att den ska vara lik.
7. Formulera ditt ”Case” med bakgrundsinformation och problem som ska lösas genom att utgå från den patientsekvens du tagit fram.

Samma metoder som beskrivits ovan fungerar för vilket virus som helst som finns i databasen. Det går att variera i det oändliga.



Skärmdump efter att du följt instruktionerna i punkt 4. Klicka på inringat ID-nummer för att komma vidare.

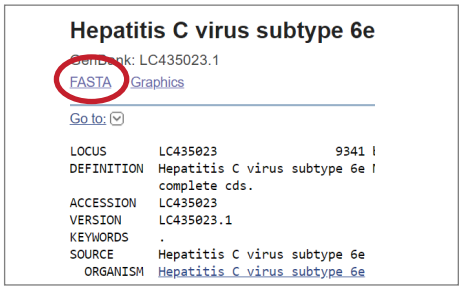


Bild som visar en sökträff för sekvensdata för en hepatit C av subtyp 6e. Ett klick på ”FASTA” tar dig till nukleotidsekvensen som sedan kan kopieras.