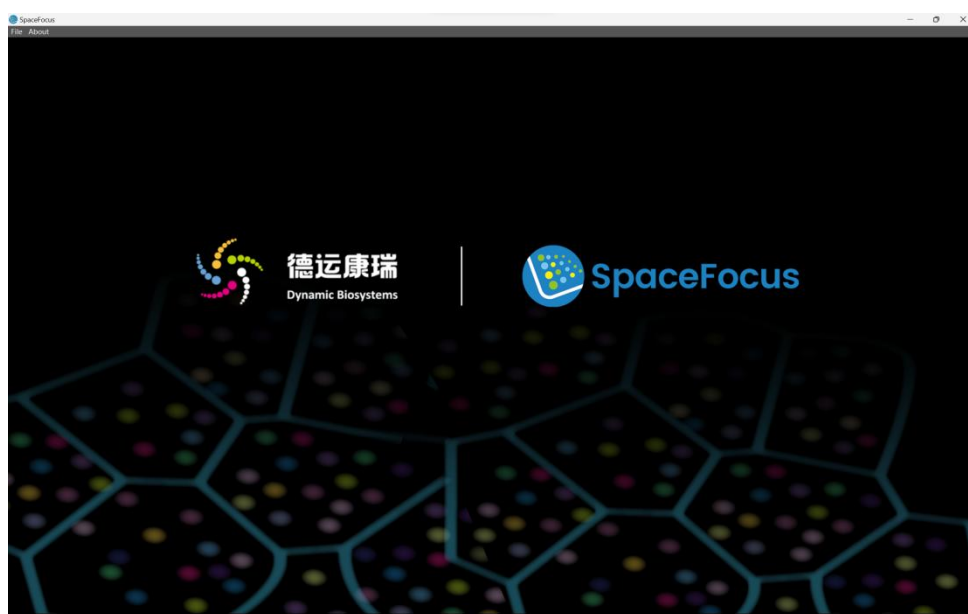


SpaceFocus 使用说明

1. 软件安装和项目启动

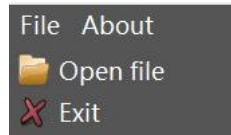
双击运行“SpaceFocus Installer.exe”文件即可安装软件，需要设置软件安装路径和选择是否创建桌面快捷方式。

安装完成后，双击快捷方式启动 SpaceFocus，启动后的界面如下：

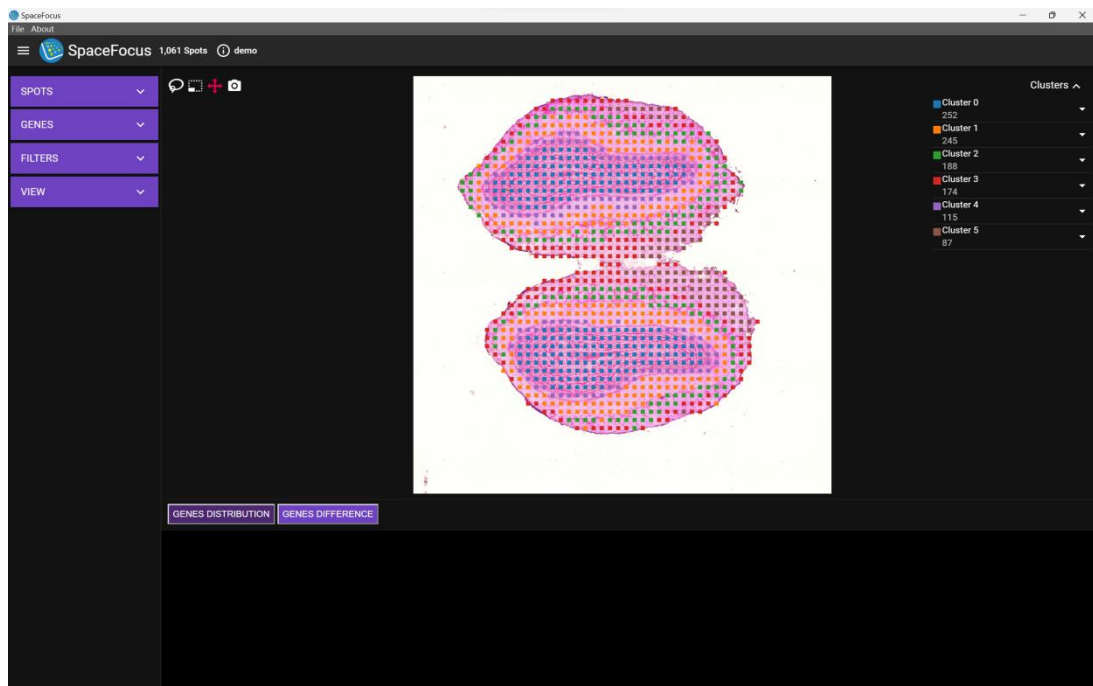


以我们提供的“SpaceFocus demo data”为例，一个 SpaceFocus 的项目由 h5ad 文件“demo.h5ad”和图像文件夹“spatial”组成。这些项目文件必须位于同一文件夹内，任何平台的空间转录组数据可以参考以下代码生成适配 SpaceFocus 的 h5ad 文件：

```
01. import scanpy as sc
02. import re
03. adata = sc.read_visium("./", count_file = "./filtered_feature_bc_matrix.h5")
04. adata = adata[:, ~adata.var_names.isin([gene for gene in adata.var_names if re.match("^MT-|^MT-|^RPL|^RPS|^MRPL|^MRPS|^Rpl|^Rps|^Mrpl|^Mrps", gene)])]
05. adata.var_names_make_unique()
06. sc.pp.calculate_qc_metrics(adata, inplace=True)
07. sc.pp.filter_genes(adata, min_cells=100)
08. sc.pp.normalize_total(adata, inplace=True)
09. sc.pp.log1p(adata)
10. sc.pp.highly_variable_genes(adata, flavor="seurat", n_top_genes=3000)
11. sc.pp.pca(adata)
12. sc.pp.neighbors(adata)
13. sc.tl.umap(adata)
14. sc.tl.leiden(adata, key_added="Clusters", resolution=0.7)
15. adata.obs["Clusters"] = adata.obs["Clusters"].apply(lambda x: "Cluster " + str(x))
16. sc.tl.rank_genes_groups(adata, "Clusters", method="wilcoxon")
17. adata.obs = adata.obs[["n_genes_by_counts", "log1p_n_genes_by_counts", "total_counts", "log1p_total_counts", "Clusters"]]
18. adata.obsm["PCA"] = adata.obsm["X_pca"]
19. adata.obsm["UMAP"] = adata.obsm["X_umap"]
20. del adata.obsm["X_pca"]
21. del adata.obsm["X_umap"]
22. adata.write("./demo.h5ad")
```

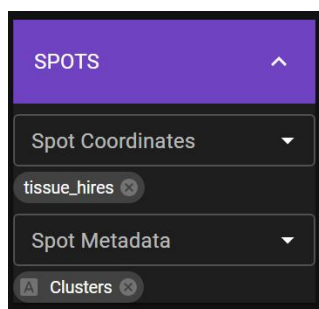


导入项目在菜单栏点击“File >> Open file”，然后选择项目文件中的“demo.h5ad”。项目启动后，默认显示 HE 图和 spot 聚类信息。



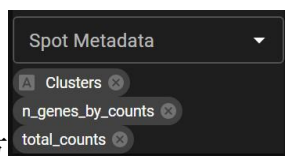
2. SPOTS 模块

SPOTS 模块用于展示 spots 的空间坐标和元数据，有两个选择框 Spots Coordinates 和 Spot Metadata。

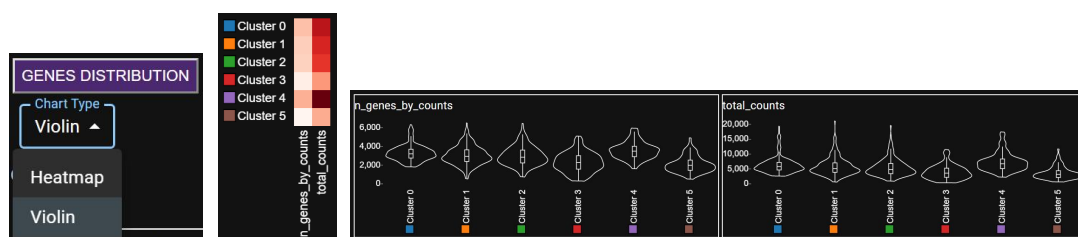


在 Spots Coordinates 选择框，用户可以选择 tissue_hires（在组织空间维度展示 spots 和 HE 图）、UMAP（展示 spot 降维图）、spatial（在组织空间维度仅展示 spots）。

在 Spots Metadata 选择框，用户可以选择 Clusters（展示 spots 聚类类别）、n_genes_by_counts（展示 spots 基因数量）、log1p_n_genes_by_counts（展示 spots 基因数量取 log1p）、total_counts（展示 spots 表达 UMI 总数）、log1p_total_counts（展示 spots 表达 UMI 总数取 log1p）。被选择的指标会以小标签的形式出现在 Spots

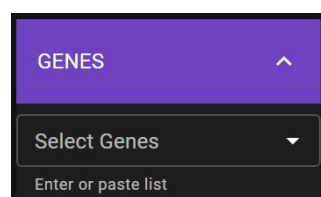


Metadata 选择框的下方，点击标签可进行切换展示。为了保证其他模块功能的完整，注意保证至少选择一个类似 Clusters 的 spots 类别指标。如果选择了 Clusters 和其他统计指标，单击 GENES DISTRIBUTION 按钮可以展示统计指标在各类别的热图和小提琴图。

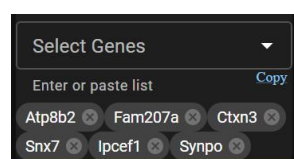


3. GENES 模块

GENES 模块用于展示基因的空间表达，有一个选择框 Select Genes。



在 Select Genes 选择框，用户可以选择基因或者输入基因名称检索，被选择的基因会以小标签的形式出现在 Select Genes 选择框的下方

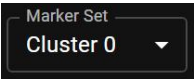



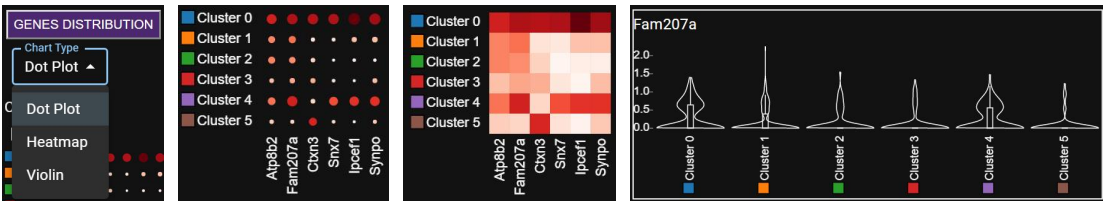
，点击标签可进行切换展示。

用户可以点击 GENES DIFFERENCE 按钮，展示 marker 基因的差异检验

表格。点击表头可对表格进行排序，点击基因名字可将表格中的基因加入 Select Genes 选择框下方的小标签，并展示基因空间表达。


Gene Symbol	Cluster 0:logfoldchanges	Cluster 0:pvals_adj	Cluster 1:logfoldchanges	Cluster 1:pvals_adj	Cluster 2:logfoldchanges ↑	Cluster 2:pvals_adj	Cluster 3:logfoldchanges	Cluster 3:pvals_adj	Cluster 4:logfoldchanges	Cluster 4:pvals_adj
Tmem88b	1.8	0	-1.45	0.43	-3.72	0.15	-0.26	0.63	0.71	0.44
Kcnib2	2.38	0	-0.68	0.52	-3.56	0	-3.24	0	1.05	0.02

在 Marker Set 选择框  选择某一类，展示该类 spots 的 marker 基因（pvals_adj<0.01 且 logfoldchanges>1）。点击  可以下载所有类的差异基因检验结果文件 Gene_Difference.tsv。如果选择了 Clusters 和基因，单击 GENES DISTRIBUTION 按钮可以展示基因在各类的气泡图、热图和小提琴图。





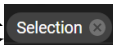
气泡图的气泡大小表示该类 spots 中表达此基因 spots 占该类 spots 的比例，气泡图和热图的颜色表示此基因在该类 spots 的平均表达量。用户可以在气泡图和热图的下方调节颜色条和颜色范围

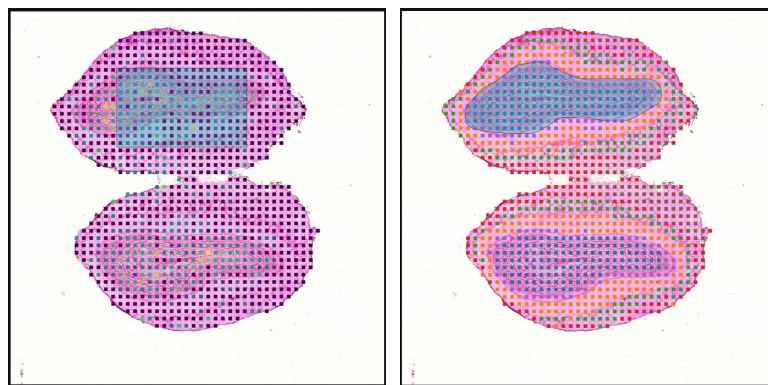



（None 不标准化，Feature 按基因标准化，Category 按类别标签标准化），在小提琴图的下方调节小提琴图标准化  （Width 标准化之后每个小提琴图具有相同的宽度，Area 标准化之后每个小提琴图具有相同面积）。

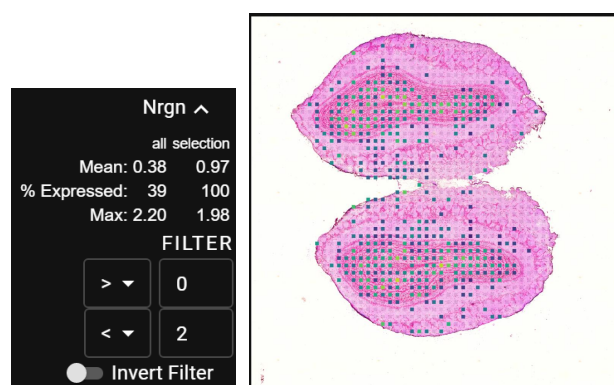
4. FILTERS 模块

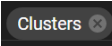
FILTERS 模块用于过滤 spot，过滤 spot 的方式有三种：手动圈选、基因表达范围过滤、选择类别。

手动圈选需要选择圈选工具，能圈选矩形区域，能圈选不规则区域，两种工具都可以多次圈选，圈选后在 FILTERS 模块会出现 Selection 标签 。



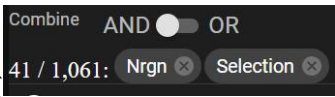
基因表达范围过滤 spots 需要设置基因表达上下限范围，被设置表达范围的基因会在 FILTERS 模块出现标签 。对 SPOTS 模块中的 total_counts 等统计指标也可以按照类似的方式进行过滤。





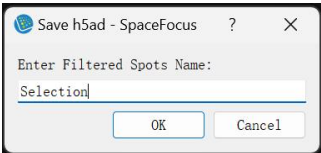
选择类别需要先点击 SPOTS 模块的 Clusters 标签，然后在类别视图选择类别（按住 Ctrl+Alt 可以多选），选择类别后在 FILTERS 模块会出现 Clusters 标签 。

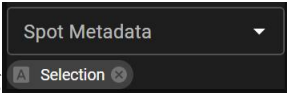


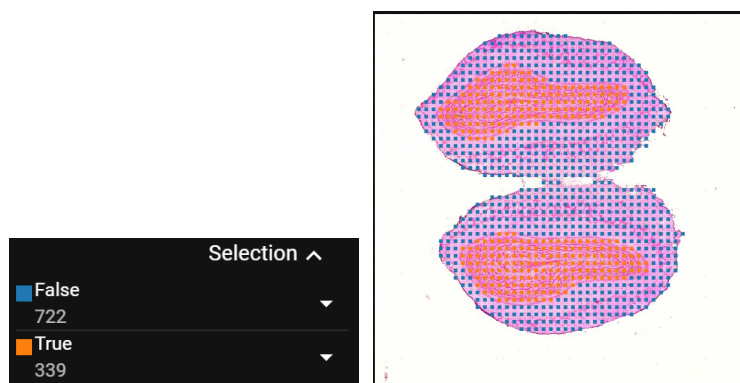
FILTERS 模块会对多个 spots 过滤标签进行逻辑连接（AND 或者 OR，默认是 AND，可通过 Combine 滑动按钮切换成 OR）并显示逻辑连接

过滤后的 spots 数量 ，在空间图中也只显示逻辑连接过滤之后的 spots。

用户可以删除  所有的过滤标签，也可以导出  过滤后的 spots 列表文件 Filtered_Spots.txt，导出时会询问是否将过滤后的 spots 保存到

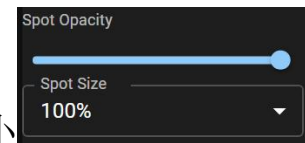
h5ad 文件中 ，如有需要可以输入类别名称（默认 Selection）并点击 OK，然后稍等片刻软件会自动重启项目，重启项目

后可以在 SPOTS 模块找到刚才定义类别指标 ，过滤后的 spots 在空间图中显示为 True。



5. VIEW 模块

VIEW 模块用于调节主视图中的 spots 透明度和大小



spots 的颜色条和颜色范围 (仅对 GENES 模块中的基因表达可视化和 SPOTS 模块中的 total_counts 等统计指标可视化有效)。

