

Loupe Browser 使用教程

1 简介

2 下载与安装

2.1 下载Loupe Browser

2.2 Windows安装

2.3 macOS安装

3 相关教程

3.1 导航Loupe Browser用户界面

3.1.1 接口组件

3.1.2 视图选择器和视图面板

3.1.3 模式选择器和模式面板

3.2 空间基因表达教程

3.2.1 评估已知的基因标记

3.2.2 在空间环境中探索集群

3.2.3 表征集群的子结构

3.3 手动比对

3.3.1 输入对齐信息

3.3.2 打开图像

3.3.3 输入切片信息

3.3.4 将斑点与图像对齐

3.3.5 调整基准点

3.3.6 识别组织

3.3.7 导出

3.4 CytAssist图像对齐

3.4.1 上传图片

3.4.2 固定地标

3.4.3 评估一致性

3.4.4 导出

Loupe Browser 使用教程

1 简介

Loupe Browser是一个桌面应用程序，它提供了交互式可视化功能，可以分析来自不同10x Genomics解决方案的数据。您可以通过Loupe Browser轻松地查询10x数据的不同视图，从而快速了解基础生物学。 Loupe是以珠宝商用来放大和检查珍贵宝石的放大镜来命名的。

Loupe Browser支持分析来自Visium空间基因表达方案的数据。它能够在组织图像的空间环境内执行以下分析功能：

- 查询重要基因

- 表征和细化细胞群

- 执行差异表达分析

使用Loupe Browser可打开Space Ranger分析软件生成的任何.cloupe文件。 Space Ranger 的.cloupe文件主要包括以下信息：

- 平铺版本的组织图像，作为Space Ranger的输入能够缩放

- 切片上所有斑点的基因表达信息

- 图像中斑点的比对信息

- 斑点的各种基于基因表达的聚类信息，包括t-SNE和UMAP聚类图

将数据导入Loupe Browser后，您无需进行任何编程即可快速浏览数据并从中获取相关信息。

Installing Loupe Browser

要使用Loupe Browser，请按照[安装页面](#)上的说明在macOS或Windows上下载并安装软件。

Loupe Browser用户界面导航

如果您不熟悉Loupe浏览器，则可以在此[导航教程](#)中了解有关用户界面的更多信息。

Loupe Browser空间基因表达教程

Loupe Browser提供了许多强大的分析功能。要了解如何使用Loupe Browser分析Visium空间基因表达数据，请查看[空间基因表达教程](#)。

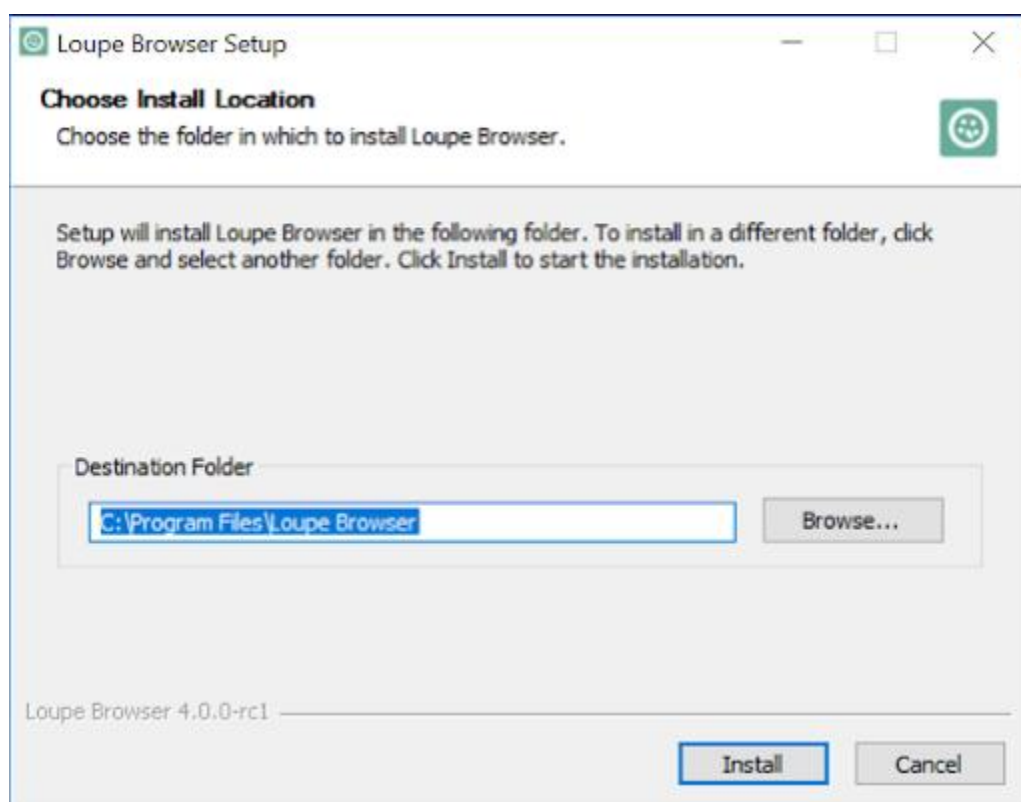
2 下载与安装

2.1 下载Loupe Browser

首先，从[下载页面](#)下载Loupe浏览器。本说明文档结合Loupe 6.4.1版本进行介绍，建议下载相同版本。

2.2 Windows安装

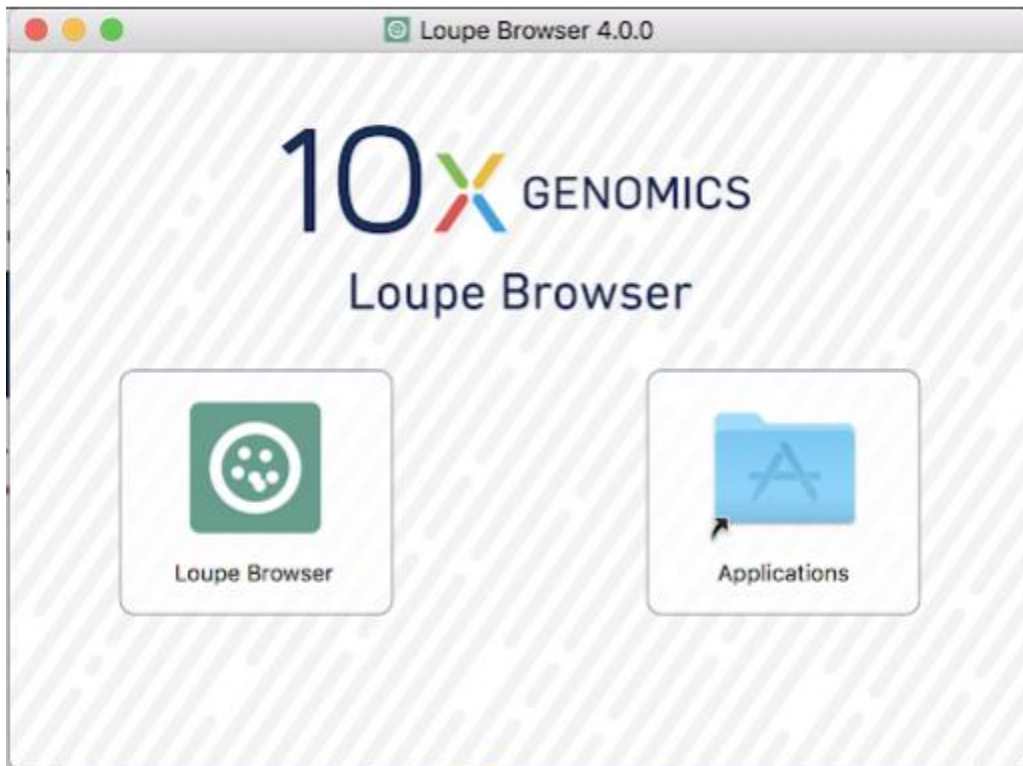
适用于Windows的Loupe Browser作为自动安装的.exe文件发布。双击下载文件进行安装。



按照提示选择安装文件夹。安装后，通过双击桌面图标或双击计算机上的.cloupe文件来打开Loupe Browser。

2.3 macOS安装

适用于macOS的Loupe Browser以.dmg文件发布。双击打开文件，然后将“Loupe Browser”图标拖到“应用程序”文件夹中，以安装Loupe Browser。双击应用程序图标，打开Loupe Browser。



在“应用程序”文件夹中可直接打开“Loupe Browser”，或者双击Finder中的任何.cloupe文件。

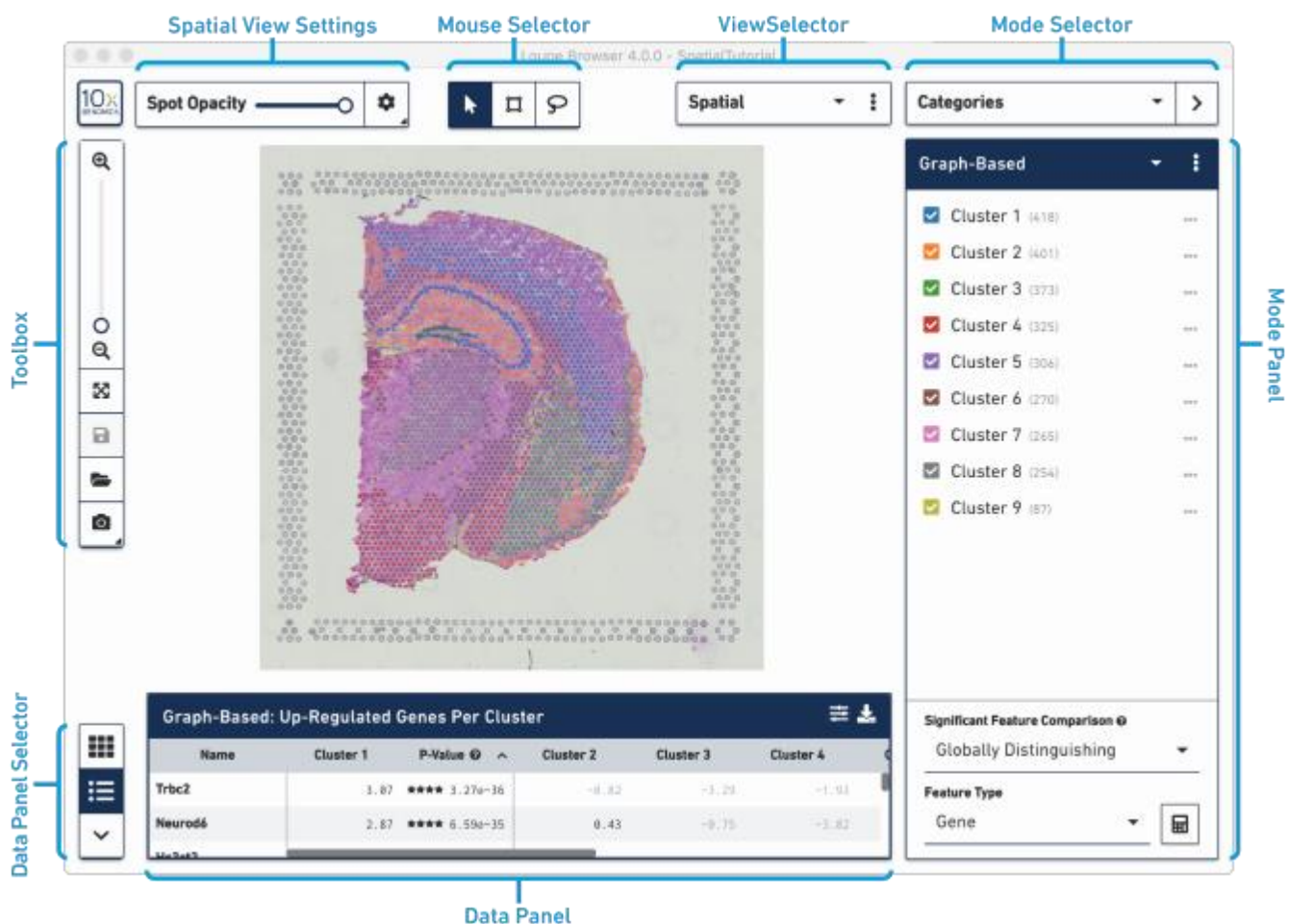
3 相关教程

3.1 导航Loupe Browser用户界面

为了学习如何浏览Loupe Browser界面，在此通过预加载的[小鼠大脑数据集](#)来演示交互功能。

3.1.1 接口组件

下图概述了Loupe Browser界面的关键组件，下面将对这些组件进行更详细地描述。



鼠标选择器

鼠标选择器从左到右有三个选项:

工具	描述
	平移 - 上下或左右移动图像。
	矩形选择框 - 选择并标记矩形图像区域。
	套索选择 - 选择并标记一个形状不规则的图像区域。

工具箱

工具箱在窗口左侧，将鼠标移到工具箱图标上可以查看每个工具的功能说明。工具箱中的工具执行的功能在下表列出。

工具	描述
	放大和缩小： 单击+进行放大，单击-进行缩小，或使用滑动条进行放大和缩小。
	自动定标： 缩放后，自动调整比例以适合屏幕。
	保存为： 在对.cloupe文件进行了更改之后，单击Save As，命名文件，并选择文件的位置。
	打开文件： 打开一个新的 .cloupe 文件
	导出图： 单击右下角的三角形，然后选择“Export Screenshot as PNG”。
	拆分视图： 分屏视图可以与t-SNE、 UMAP和Feature Plot一起用于查看模式面板中显示的cluster。
	标记设置： 标记设置可以与t-SNE、 UMAP和Feature Plot一起使用，以自动或按百分比缩放图像。取消选中“自动缩放”框以选择百分比。

要返回主屏幕和“最近的文件”列表，请单击左上角的10x Genomics按钮。

3.1.2 视图选择器和视图面板

视图选择器控制“视图面板”中显示的内容。可以选择四种不同类型的视图：

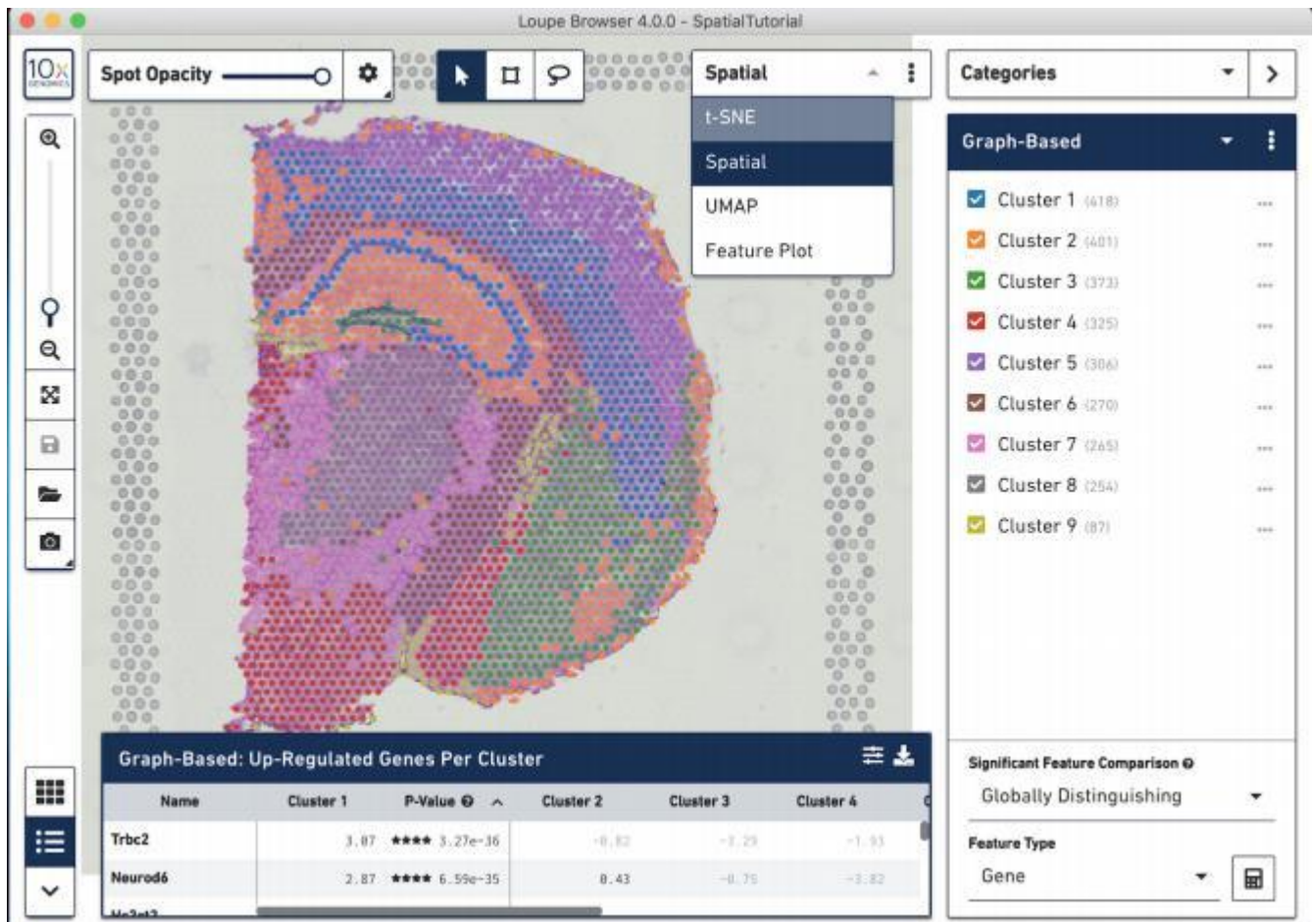
- t-SNE视图
- 空间视图
- UMAP视图
- Feature Plot 视图

所有视图中的通用组件

界面中的以下组件在所有视图中通用，并在单独的部分中定义：

- 鼠标选择器
- 工具箱
- 模式选择和模式面板
- 数据选择器和数据面板

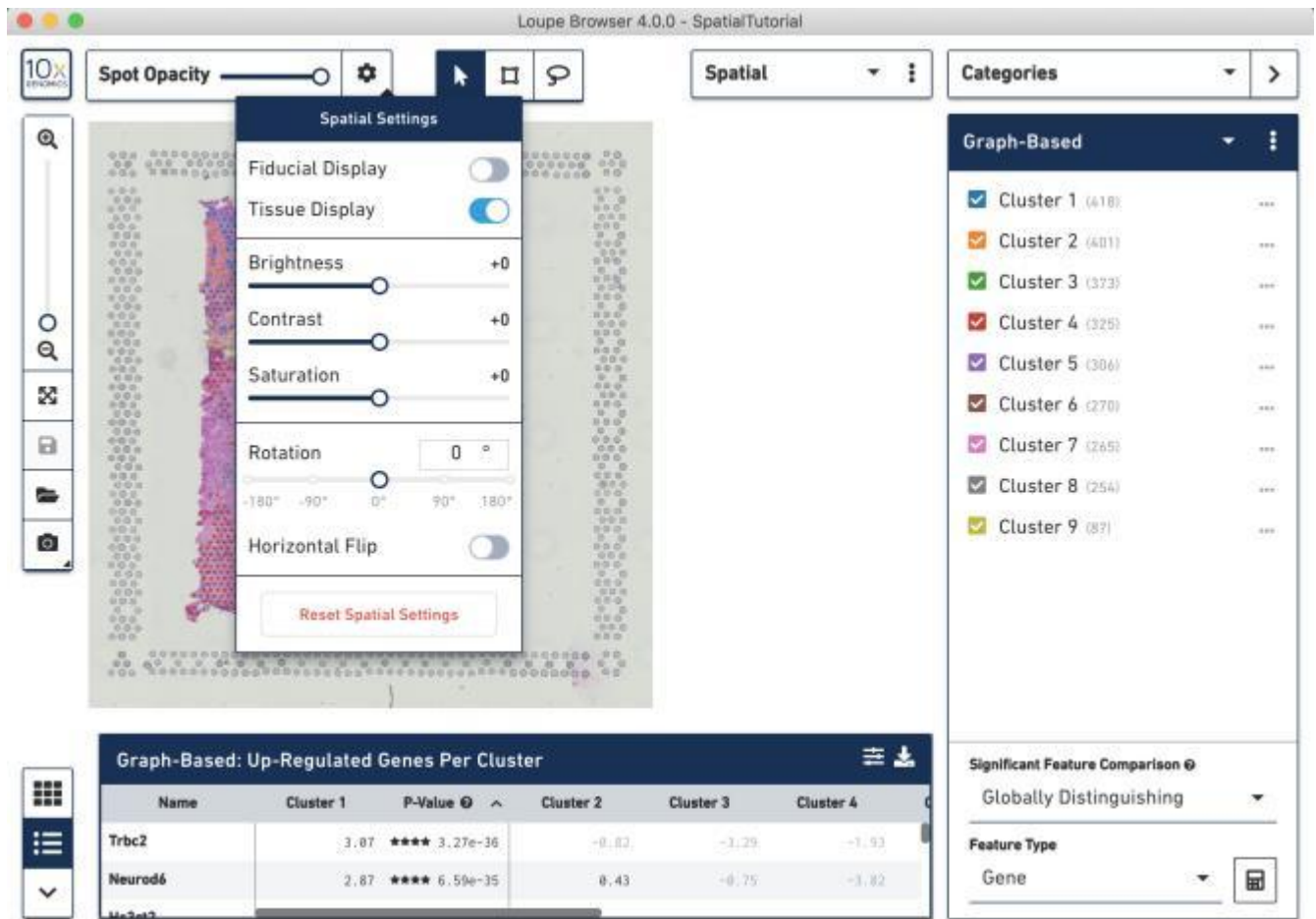
空间视图



当打开一个空间基因表达的.loupe文件时，初始工作空间以空间视图为中心，该视图显示了由载玻片上的组织覆盖点覆盖的组织图像。这些点已经与图像中的正确位置对齐。每个斑点均基于“模式面板”中的活动图例进行颜色编码。

在空间视图中，将鼠标拖动到图像上以重新定位，并使用鼠标滚轮或触控板平滑地放大和缩小。当您悬停在图像中的某个点上时，将显示与该点关联的cluster标签。

空间设定



位于左上角的SpatialSettings提供了许多查看图像和基因表达数据的选项，包括：

- 基准显示和组织显示可以通过按钮打开或关闭。
- 可以增加或减少图像颜色的亮度、对比度和饱和度。
- 可以通过将按钮滑动到特定程度，使用旋转字段中的向上和向下箭头或在旋转字段中输入数字来旋转图像。
- 通过切换按钮也可以水平翻转图像。

“空间设置”左侧是“斑点不透明度”栏，用于增加和减少斑点的不透明度。

UMAP和t-SNE视图

除了空间视图，Loupe Browser还提供了两种不同的数据投影视图:t-SNE和UMAP。在这些视图中，这些点是根据“Space Ranger”中的t-SNE或UMAP算法显示的。与空间视图类似，每个点都根据“模式面板”中的活动图例进行颜色编码。在这两个投影视图中，在显示区域上拖动鼠标可以重新定位投影，可以通过鼠标滚轮或触控板来平滑地放大和缩小。当您将鼠标悬停在图像中的某个点上时，将显示与该点关联的cluster标签。

Feature plot 视图

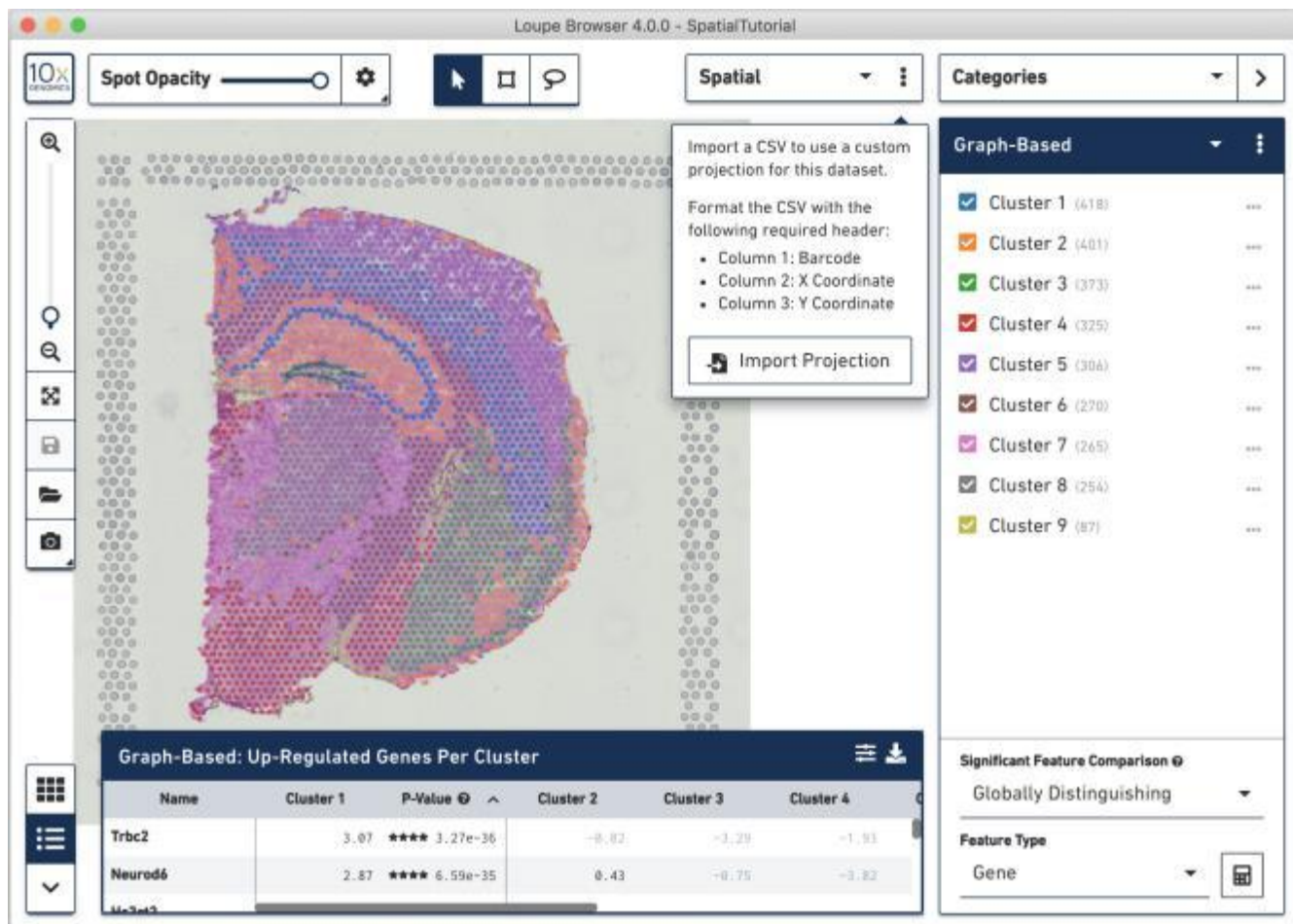
Feature Plot视图允许您可视化每个点的一个或两个基因的表达水平。此视图使根据一个或两个基因的表达水平来设置点集的阈值变得很容易。可以在Y轴顶部或X轴右侧的文本框中输入特征(在本例中为基因)。这些选择器还包含一个控件，用于在线性刻度和对数刻度之间切换轴的刻度。

导入投影

有许多脚本和第三方工具可用于生成数据的不同投影，包括但不限于以下内容：

- 备选的聚类 and 投影算法，例如：轨迹分析。
- 过滤数据以清除不想要的伪影，例如，死亡或濒死的细胞。

如果您通过客户分析生成备用投影坐标，则可以将该投影输入Loupe Browser中。为此，请在“视图选择器”中单击三个垂直点以导入一个csv文件，以对数据集使用自定义投影。



导入投影的csv格式如下：

- 表头是必需的。
- 第一列是条形码，至少是.cloupe文件中条形码的子集。
- 第二列是代表X坐标的数字。
- 第三列是代表Y坐标的数字。

要导入新的投影，请单击“导入投影”，选择csv文件，然后单击“导入投影”。自定义投影上传后，再次单击“导入投影”以编辑投影名称，或将其删除。

3.1.3 模式选择器和模式面板

使用工作区右上角的模式选择器可以在Loupe Browser的不同模式之间切换。在模式之间进行切换会将特定于模式的颜色应用于“视图面板”，并将模式特定的功能更改为“模式面板”。 Loupe Browser提供三种模式：

- 分类
- 基因/特征表达
- 筛选器

类别模式

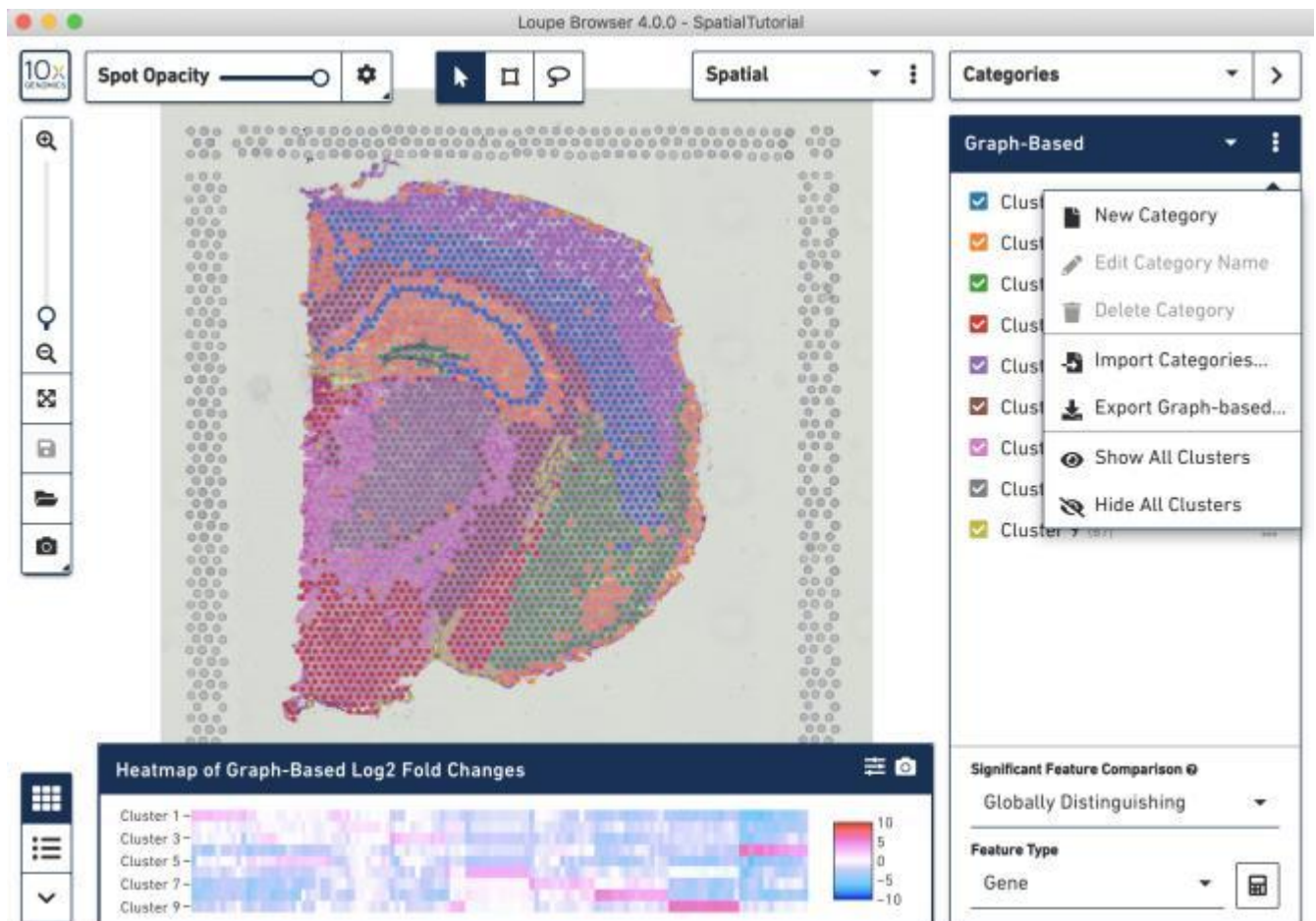
类别模式提供了三种显示数据cluster的方式，包括：

- 基于图的聚类
- 从k = 1-10开始的K均值聚类

- 任意数量的自定义创建类别及其对应的群集定义

控制类别模式

在类别模式下，可以通过单击下拉菜单旁边的三个垂直点来控制模式面板中的内容。



新类别

使用此选项可创建自定义类别和相关联的自定义cluster。

编辑类别名称

此选项仅适用于自定义类别。

删除类别

此选项仅适用于自定义类别。

导入类别

使用此选项可上传包含每个条形码基础上的客户cluster定义的csv文件。 csv文件的格式如下：

- 第一行必须是表头，如barcode、细胞类型等。
- 第一列必须是barcode，并且该列的内容必须至少匹配.cloupe文件中barcode的一个子集。
- 在barcode列之后，可能有任意数量的列对应不同类型的类别。
- 每个附加列必须有唯一的类别名称，该列的内容是cluster标签。

导出〔类别名称〕

对于此选项， [类别名称]反映了您正在查看的当前类别的名称。此选项导出当前类别的完整barcode列表以及与该类别相关联的cluster名称。例如，如果当前正在查看基于图形的类别，则下拉菜单中的此选项是基于导出图形的。选择此选项后，可以下载一个csv文件，其中第一列为包含所有barcode的列表，第二列中包含与之相关的基于图的cluster标签。参见下面的示例。

Graph-based

Barcode	Graph-based
AAACAAGTATCTCCCA-1	Cluster 5
AAACAATCTACTAGCA-1	Cluster 2
AAACACCAATAACTGC-1	Cluster 4
AAACAGAGCGACTCCT-1	Cluster 2

显示所有clusters

此选项自动选择模式面板中的所有集群。

隐藏所有clusters

此选项自动取消选择模式面板中的所有集群。

重要特征比较

重要特征比较功能确定数据集中哪些特征区分一个或多个聚类，并允许在聚类之间进行差异表达分析。此功能有两种控件。使用右下角的下拉菜单为这两个控件选择选项。选择选项后，单击计算器图标以执行比较分析。

重要特征比较方法

有两种不同的方法可以用来进行重要特征比较分析：

- 全局比较：对于“模式面板”中显示的每个选定集群，此选项确定将每个选定集群与数据集中其他细胞区分开的特征。
- 局部比较：对于“模式面板”中显示的每个选定集群，此选项确定将每个集群与该类别中其他选定集群区分开的特征。

重要特征比较法

使用此下拉菜单可以选择要在比较中使用的特征类型。对于空间基因表达数据集，这里唯一的选择是基因。但是，对于其他产品，可能有多个选择。

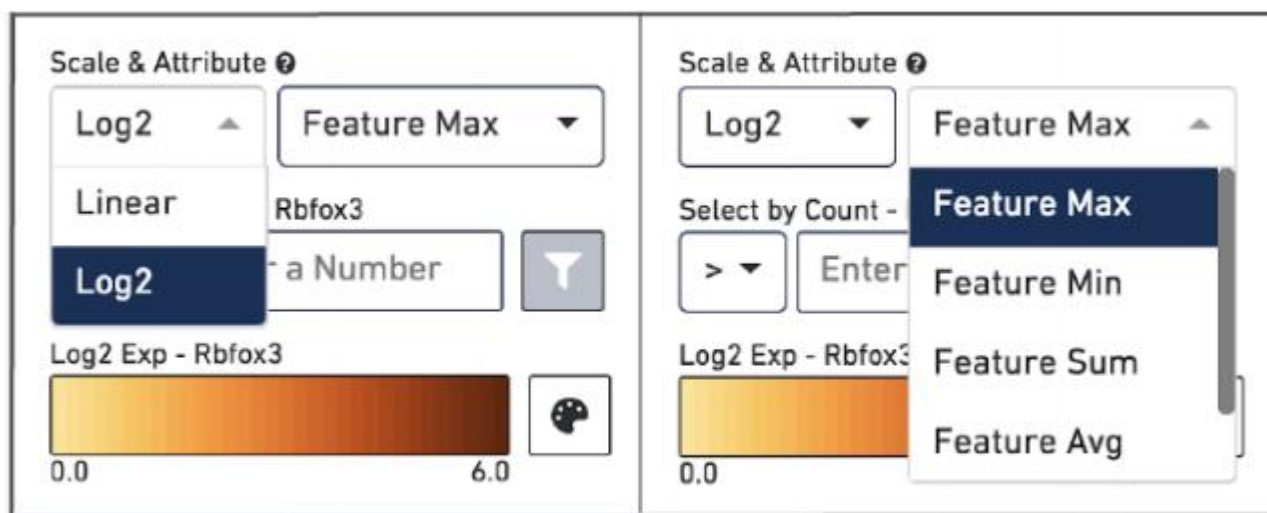
基因/特征表达模式

“基因/特征表达”模式提供了整个数据集中基因或特征表达的图形表示，一次可以查看一个或多个特征。您可以搜索感兴趣的特征，或者上载并保存特征列表。

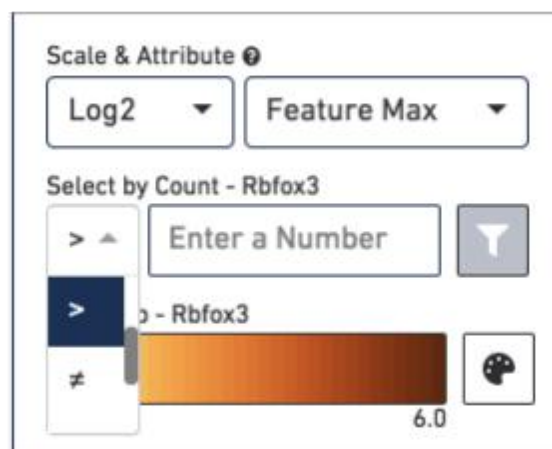
活动特征列表

活动特性列表包含您已搜索或上传的特征列表，在“视图面板”中可查看这些特征的表达模式。如果“活动特征列表”中有多个功能，则表达模式对应于所有特征的组合。如果“活动特征列表”中仅存在或选择一个特征，则表达模式对应于该特征。

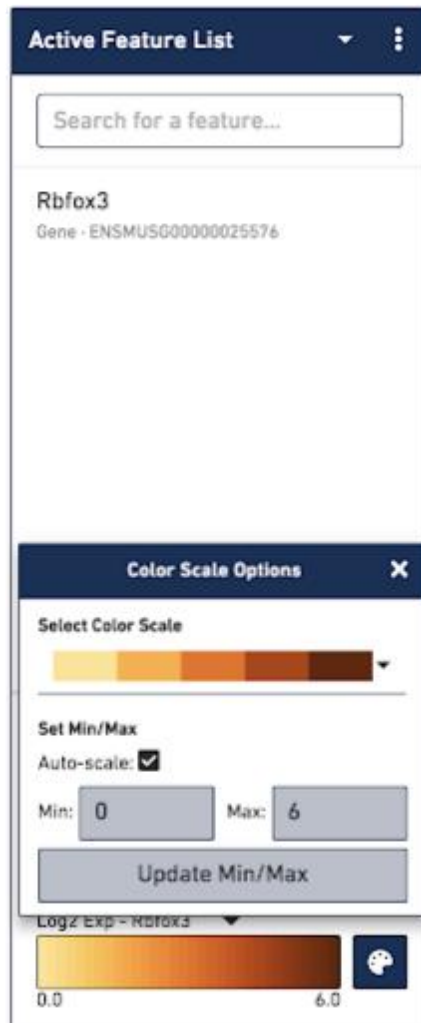
在活动特性列表的底部有许多选项，它们控制如何在视图面板中显示数据。“Scale & Attribute”参数控制如何在视图面板中呈现表达模式。左上角的菜单设置要显示的比例值。当活动特征列表中有多个特征时，右上角菜单设置如何组合值。



"Select by Count"控制如何筛选显示的表达值。



右下角的调色板控制颜色比例和值范围。您也可以选择手动设置颜色比例的最小值和最大值，方法是取消选中“自动比例”复选框，键入一个值，然后单击“更新最小/最大按钮”。设置手动最小值和最大值时，在范围之外(小于最小值或大于最大值)的barcodes将显示为灰色。如果基因有很多噪音或背景表达时，这将特别有用。增加刻度尺的最小值会滤除该噪音。配置比例以最佳地突出目标基因的表达也很有用。



控制活动特征列表

在“基因/特征表达模式”中，可以通过单击下拉菜单旁边的三个垂直点来控制“活动特征列表”下模式面板中的内容。如下所述，这提供了许多选项。

新清单

使用此选项可创建要可视化的特征的自定义列表。

编辑名称

编辑列表的名称。

删除清单

删除列表。

导入列表

使用此选项可以上传包含一组自定义标记的csv文件，从而生成一个或多个新列表。 csv文件的格式如下：

- 第一行必须是表头，例如列表名称，基因名称等。
- 第一行可以包含将要创建的一个或多个功能列表的名称。

- 第二列是特征名称的列表，例如与每个列表关联的基因名称。
- 您可以选择在第三列中包含Ensembl ID。

如果适用，特征名称和Ensembl ID必须与传递到Space Ranger的参考文件中的特征名称和Ensembl ID匹配。

导出清单

如果您已将特征手动添加到列表中，请使用此选项将特征列表导出为csv文件。如果要对在Loupe中可视化的其他样本重用列表，这将很有用。

过滤模式

在“过滤器”模式下，您可以组成复杂的布尔过滤器以查找符合条件的barcode。您可以基于特征计数或cluster成员关系创建规则，并使用布尔运算符组合这些规则。然后，您可以保存和加载过滤器，并在多个数据集中使用它们。有关使用“过滤器模式”的更多详细信息，请参阅[以下有关单细胞基因表达数据的教程](#)。

数据选择器和数据面板

工作区底部的数据面板显示有关造成各cluster之间差异的特征的信息。默认情况下，它枚举了造成在Categories侧栏中选择的当前预计算聚类之间差异的基因。它还显示 [重要特征](#) 分析的结果。数据面板左侧的迷你工具栏在表格和区分特征的分层热图之间切换。单击表视图中的特征名称，可以将特征添加到列表中以备将来参考，或在活动投影的整个数据集中显示该特征的数量。

3.2 空间基因表达教程

本教程回顾了Loupe浏览器提供的主要分析功能，这些功能可以分析Visium空间基因表达解决方案中的数据。本例中使用了在Loupe Browser中预先加载的小鼠大脑数据集。

安装 Loupe Browser

要使用Loupe Browser，请按照[“安装”](#)页面上的说明在macOS或Windows上下载并安装软件。

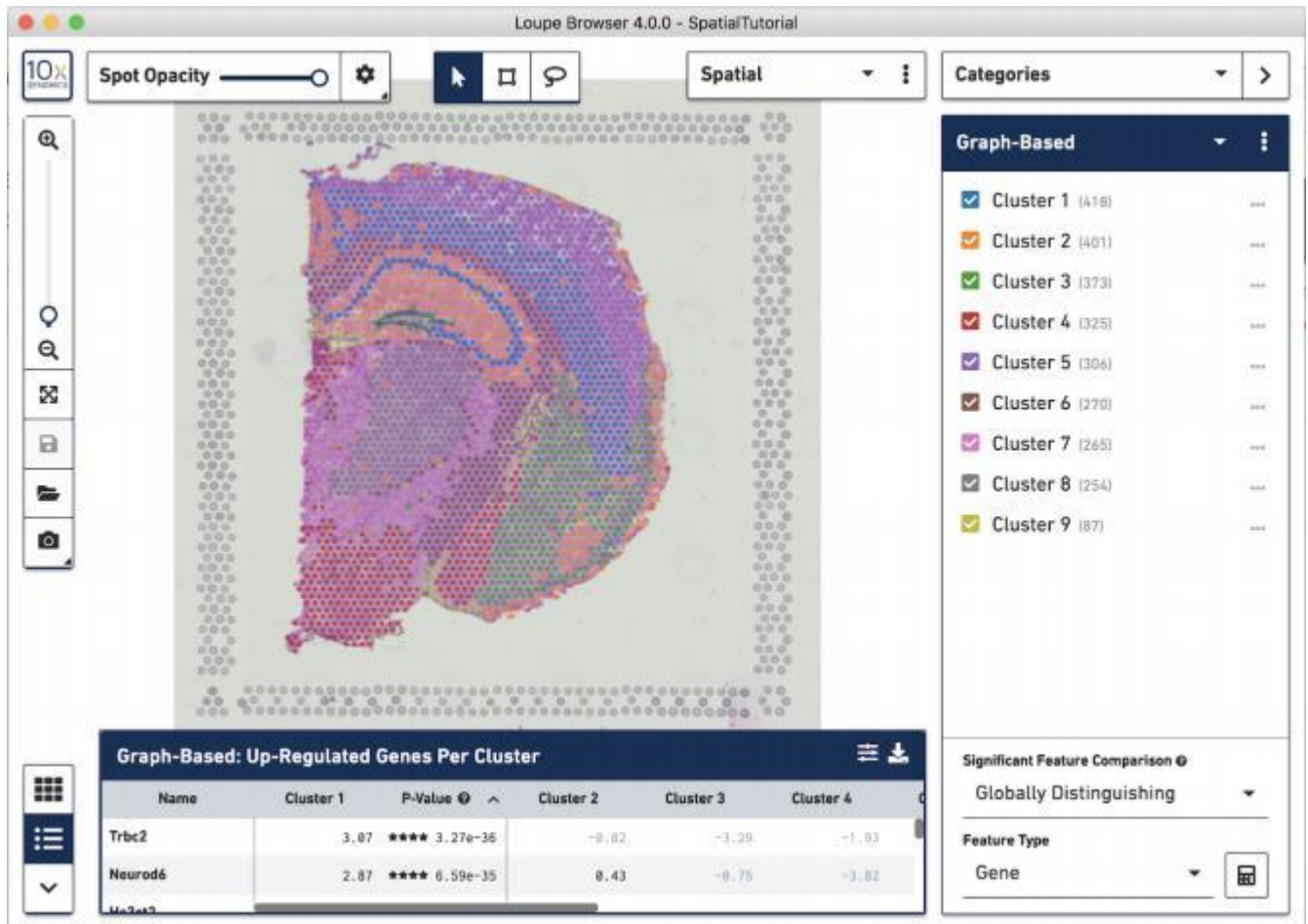
浏览 Loupe Browser 用户界面

如果您不熟悉Loupe浏览器，请在[导航教程中](#)了解有关功能的更多信息。

打开教程数据集

一旦安装了Loupe浏览器并熟悉基本的导航功能，就可以启动Spatial Gene Expression教程来学习如何分析数据。双击应用程序图标，打开Loupe Browser。然后从“最近的文件”列表中单击SpatialTutorial.cloupe文件。

完成此操作后，您将看到一个屏幕，上面有鼠标大脑图像，并且斑点覆盖在图像顶部。这些斑点由该斑点所分配到的群集进行颜色编码。



数据集说明

与Loupe浏览器预先捆绑在一起的空间基因表达数据集是来自E18鼠标的鼠标大脑样本。

有许多其他空间基因表达数据集可公开下载。这些数据集包括.cloupe文件，可用于可视化结果。访问空间基因表达[数据集页面](#)以获取数据集的完整列表。

空间基因表达教程

本分析教程向您展示如何使用Loupe浏览器中提供的功能执行以下分析。

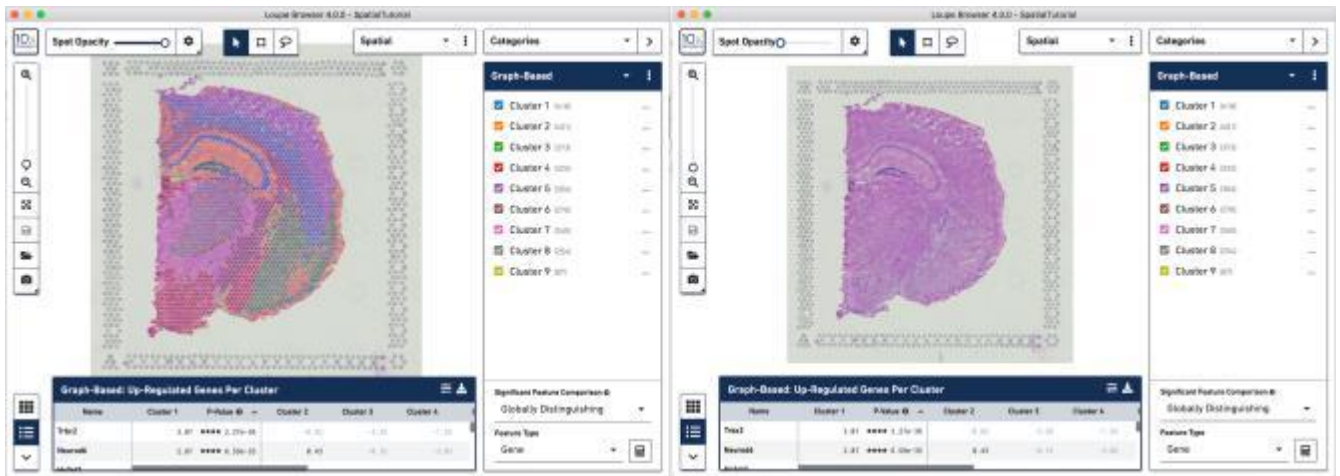
- [评估已知的基因标记](#)：使用基因列表和基因表达谱来表征簇和组织。
- [在空间环境中探索簇](#)：使用基因列表和基因表达谱来表征簇和组织。
- [表征集群的子结构](#)：利用高级过滤和差异表达分析来定义和表征集群中的子群体。

3.2.1 评估已知的基因标记

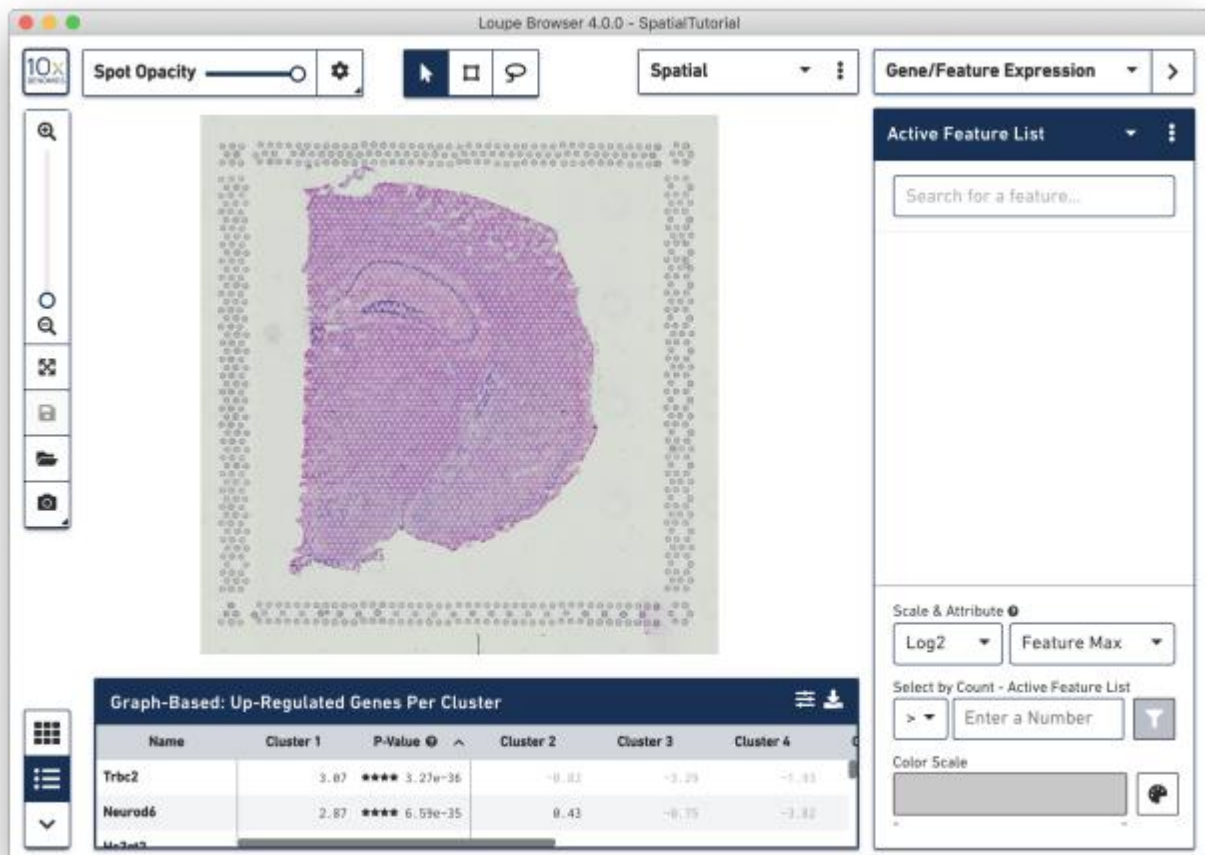
目标：在组织形态学背景下评估感兴趣的已知基因标记的表达谱。

探索组织图像

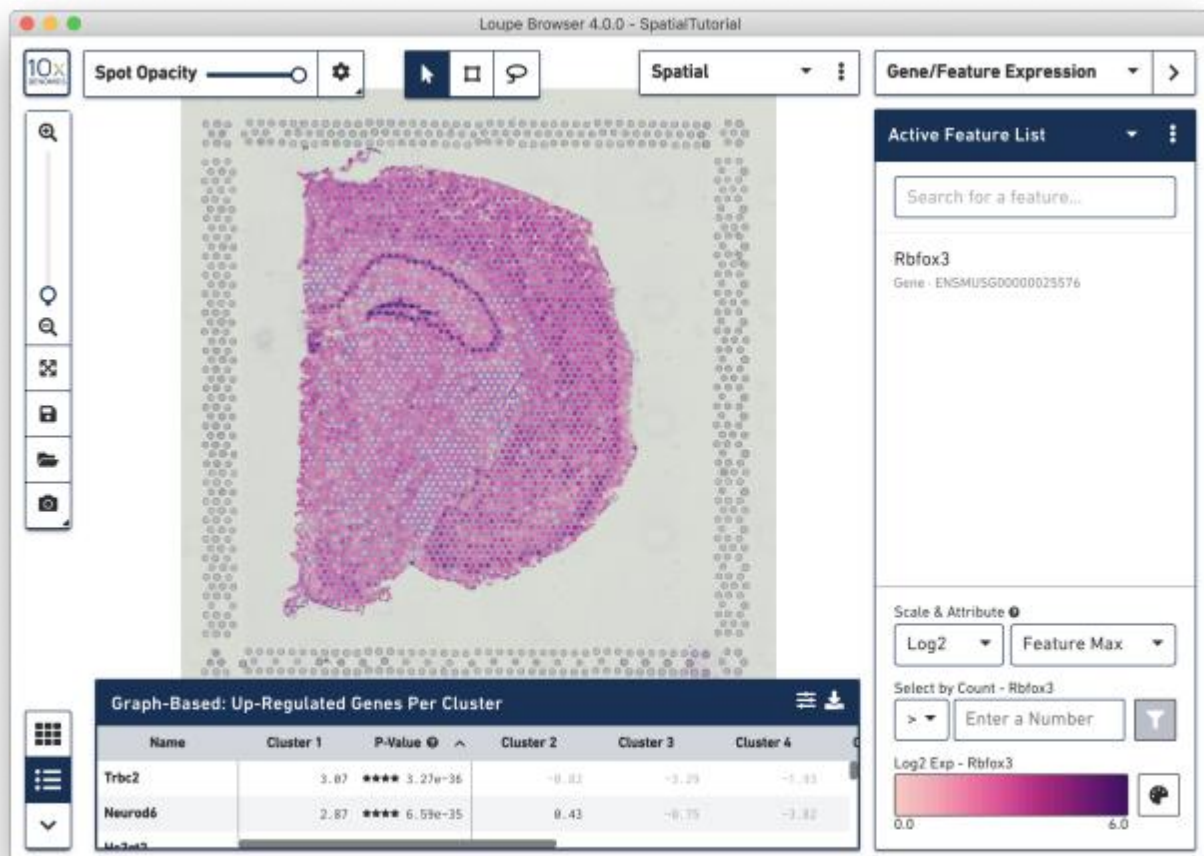
为了有效地评估组织图像中的基因表达数据，有助于理解组织图像中可能发现的形态和其他信息。为此，请使用位于左上角的“斑点不透明度”滑块一直到最左侧，以从图像中去除斑点。



从那里，您可以使用缩放和鼠标拖动功能来导航图像，评估形态并识别感兴趣的地标。例如，在此图像中，海马的曲率在蓝色中间可见。

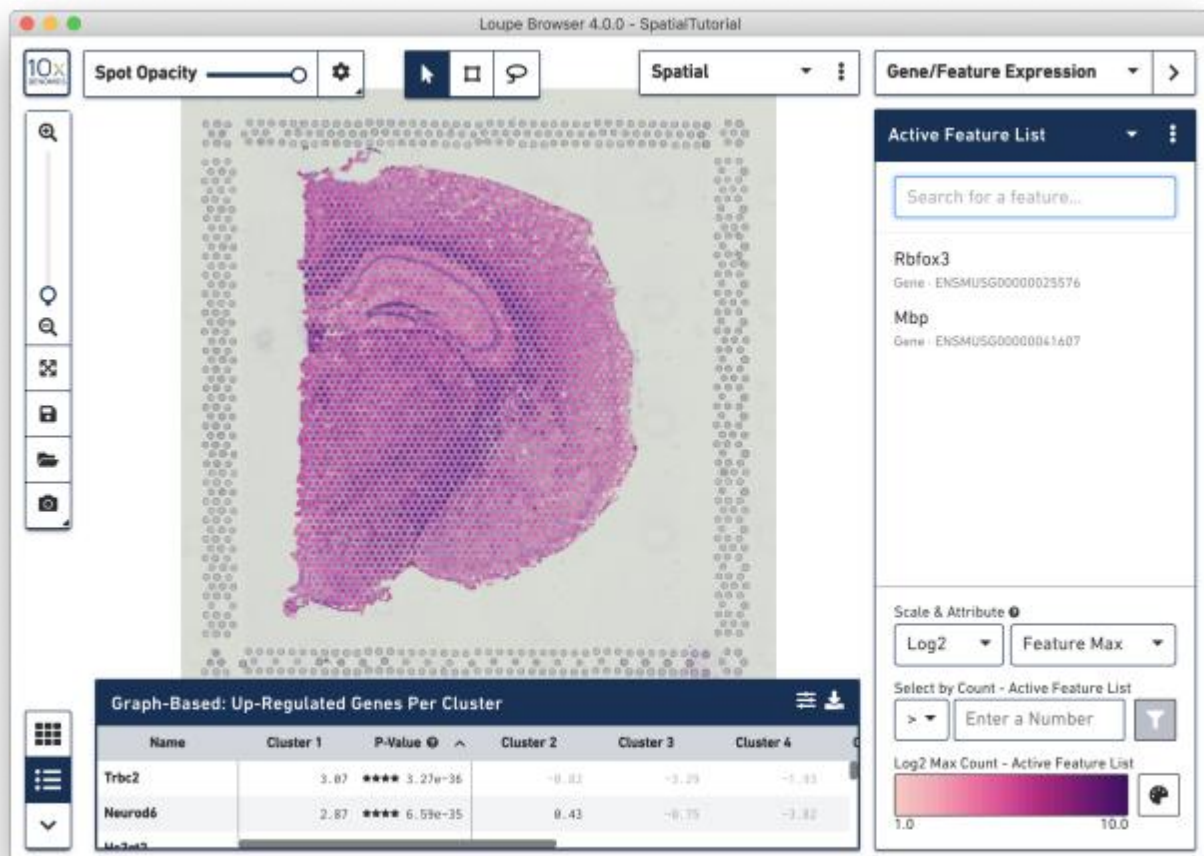


然后在文本框中键入Rbfox3。自动完成功能有助于更快地找到感兴趣的基因。按Tab或Enter键，将基因添加到“活动特征列表”中。然后根据该斑点内的Rbfox3的水平将组织图像更新为色点。该基因的高表达由暗点表示。在此示例中，Rbfox3在整个组织中表达，因为它是一般的神经元基因标记。在海马和皮层其他部位以及丘脑和下丘脑中也有较高水平的表达。

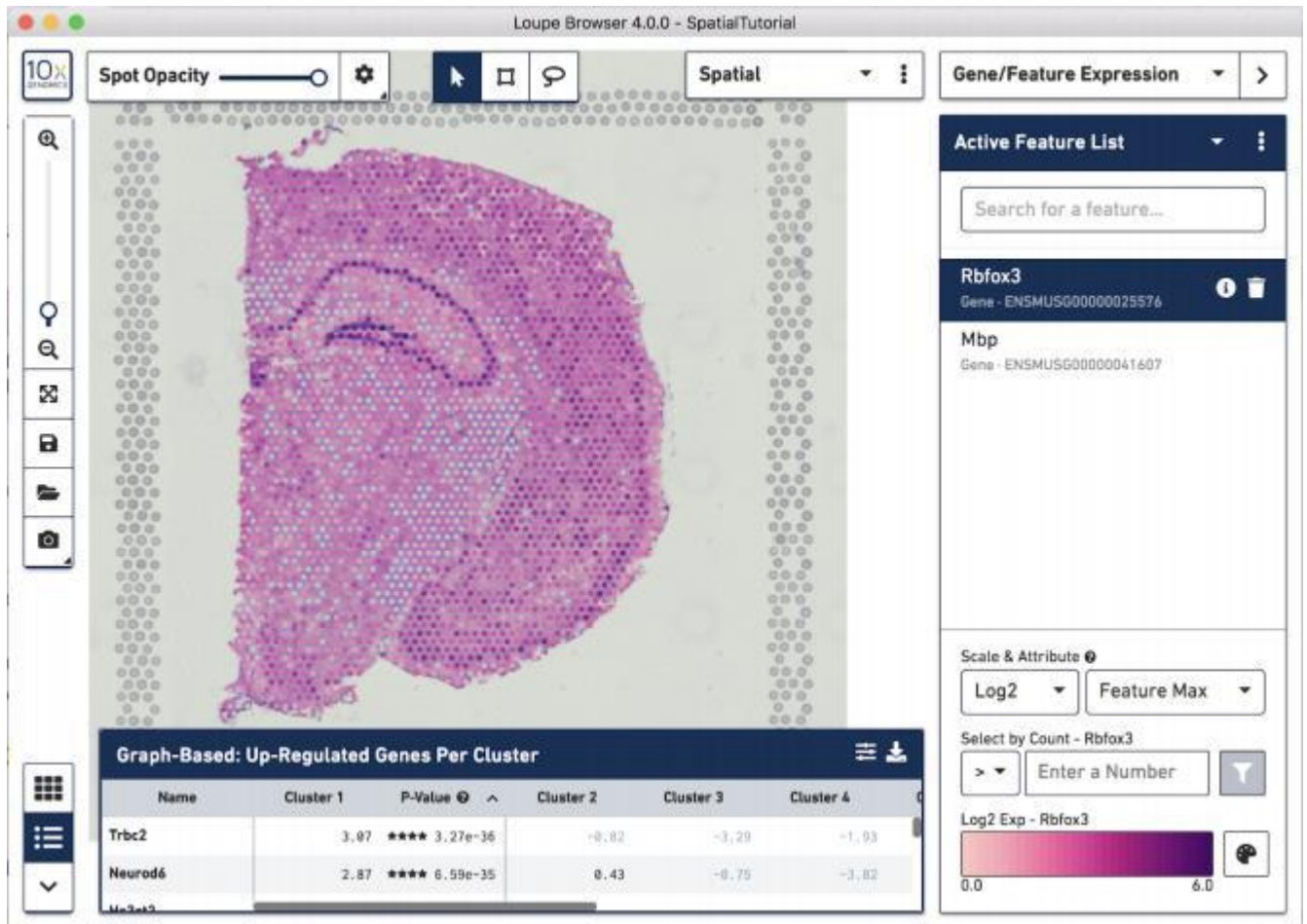


请注意，有些斑点出现在色标范围之外，在这种情况下为浅灰色。这些是不显示基因表达的斑点。浏览器右下角的调色板可用于调整色阶，以满足您的需求。

在下一个示例中，搜索编码髓磷脂中一种蛋白质的髓磷脂碱性蛋白(Mbp)基因，并将其添加到“活动功能列表”中。这是另一种细胞类型的标记物，少突胶质细胞，产生围绕神经元轴突的髓鞘。当将多个功能添加到列表中时，视图中的颜色标记表示列表中所有基因的表达水平的组合。



要查看“活动特征列表”中仅一个基因的表达模式，请单击基因名称将其选中。再次单击该基因名称以取消选择它，然后返回以可视化表达水平的组合。将鼠标悬停在基因名称上会显示两个图标，一个信息图标和一个垃圾桶图标。单击信息图标以在网络浏览器中加载该基因的Ensembl参考页面。单击垃圾桶图标以从当前列表中删除该基因。



通过这样做，您可以将已知的基因标记映射到斑点，将该信息叠加在组织图像的顶部，并使用该信息来验证预期的基因模式存在于它们各自的脑组织类型中。

3.2.2 在空间环境中探索集群

目标： 评估图像数据并在空间视图中进行聚类。

将簇映射到组织形态

出现在组织下方的斑点由Space Ranger分配到簇，并且仅使用基因表达信息确定，而没有来自图像的任何空间信息。由于组织下面的每个斑点都与一个簇相关联，因此可以在空间上下文中可视化该簇。在这个老鼠的大脑样本中，您可以看到聚类在组织中的遵循程度。

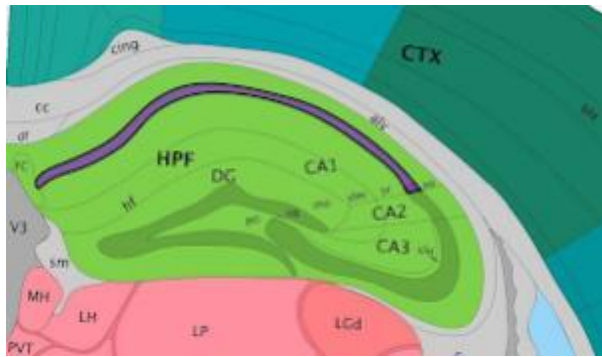
在此视图中，仔细查看蓝色的群集1。它由斑点的不连续选择组成。当点不透明度降低到0时，图像显示该簇包含海马体和等皮质的一部分。

导入基因标记列表

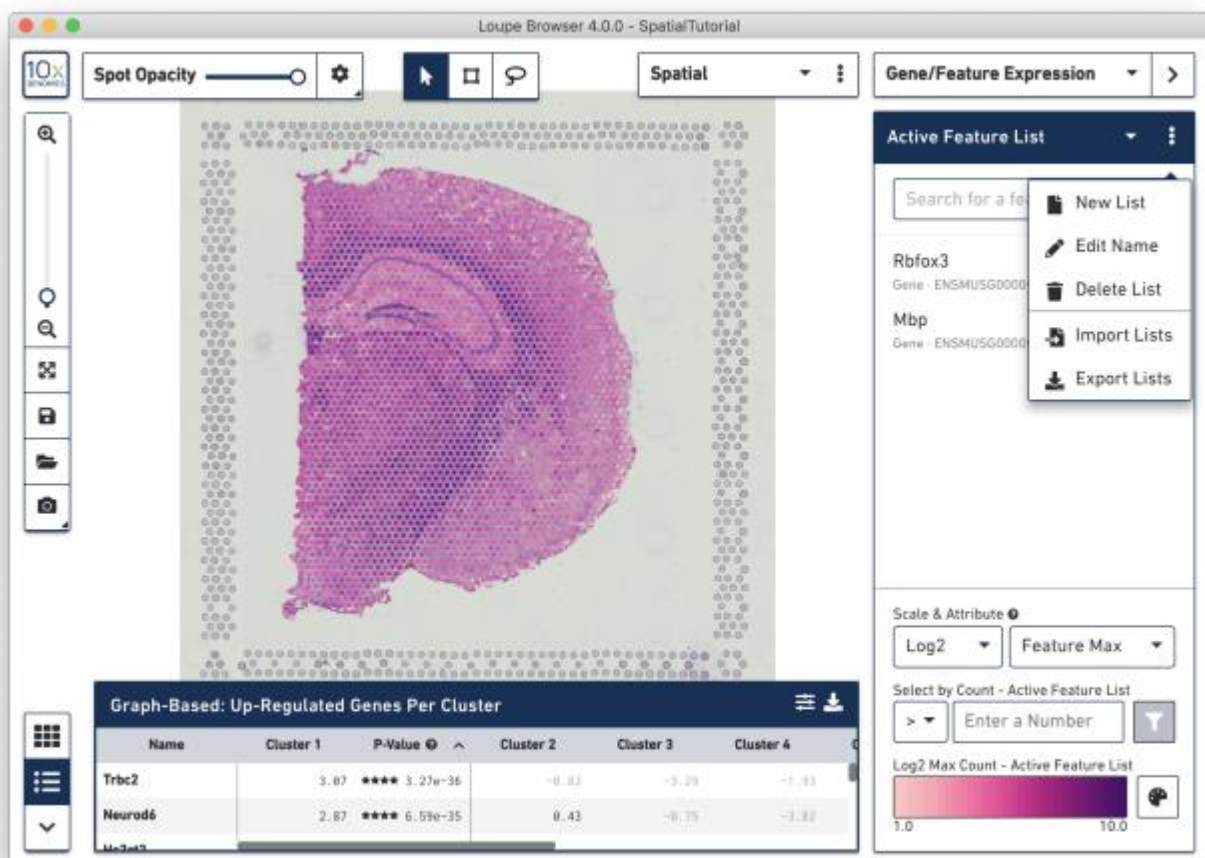
尽管Loupe Browser提供了由Space Ranger确定的聚类的可视化，但可以根据基因标记定义自己的聚类。在此示例中，使用导入列表功能执行此操作。 [单击此处](#)以下载与海马CA1，CA2和CA3区域相对应的基因列表。该文件包含以下基因：

- 光盘1
- ac
- Cldn22

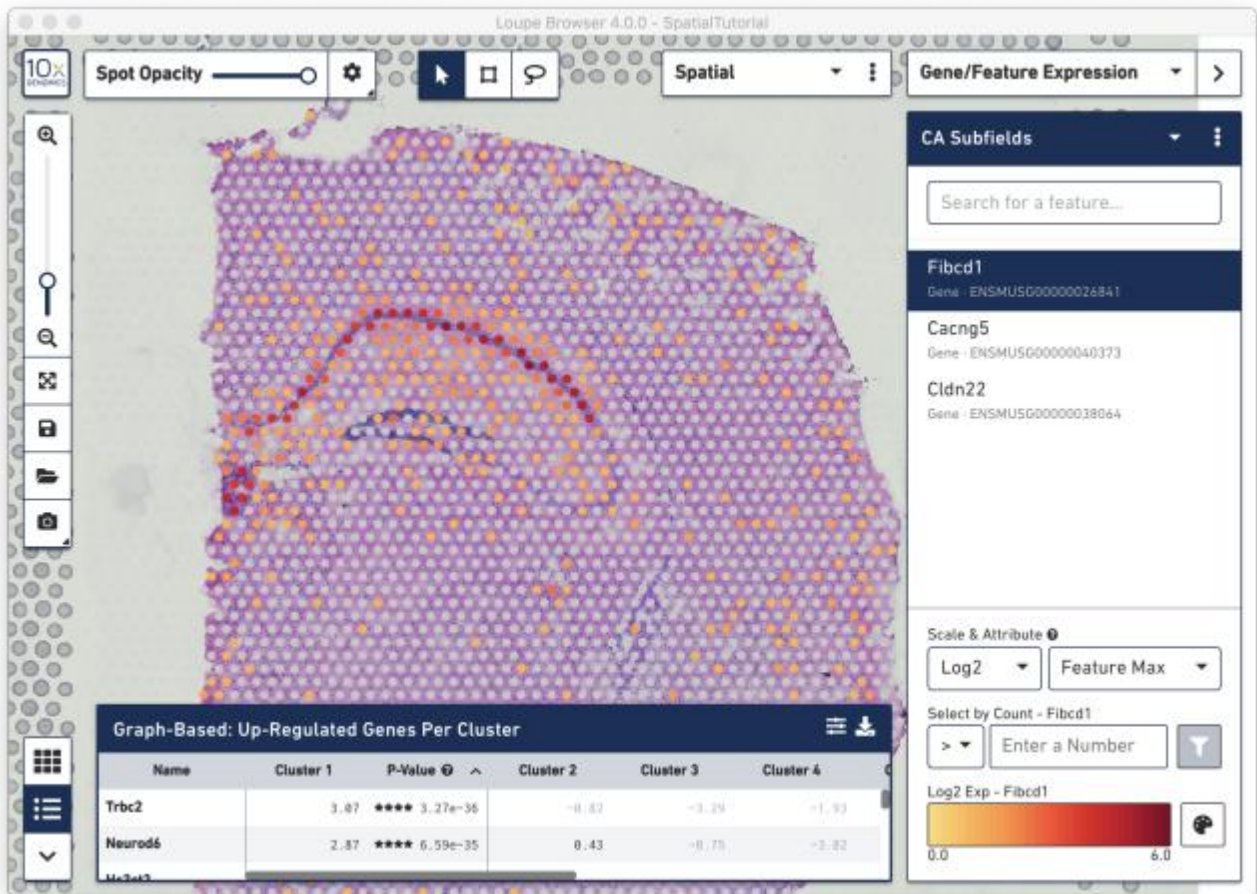
请注意，基因名称必须与提供给的注释参考中包含的基因名称匹配 `spaceranger count`。请参阅导航教程的 [导入列表](#) 部分，以了解有关如何构造自己的列表的更多信息。



要将csv文件导入到Loupe浏览器，您必须处于“基因/功能表达”模式。在此处，单击“活动功能列表”右侧的三个点，然后从下拉菜单中选择“导入列表”。



导入后，将显示一个名为**CA Subfields**的新基因列表，其中包含三个海马基因标记。在本部分教程中，我们将重点介绍海马的CA1子域。基因Fibcd1是该子域的标记；单击Fibcd1以查看该单个基因的表达。下图显示了最能表达该基因的斑点，显示为深红色。Fibcd1集中在海马和habenula的CA1区。

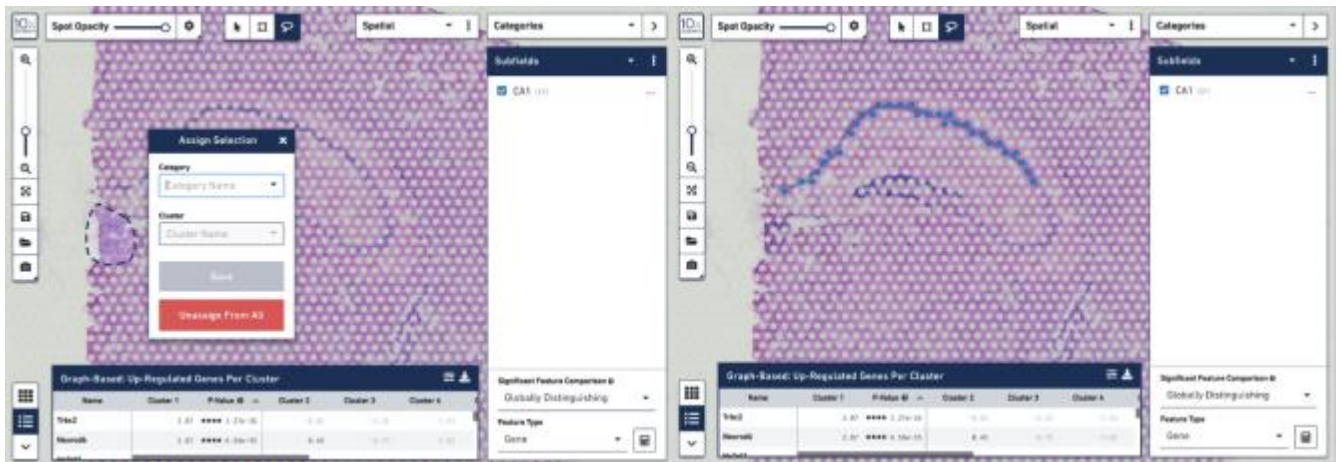


通过基因标记定义聚类

要创建自己的CA1簇，请先过滤斑点以仅选择高度表达Fibcd1基因的斑点。根据斑点的颜色和“基因表达”面板底部的Log2最大计数标度，我们将阈值设置为3。在Log2最大计数标度上方的“按计数选择”字段中输入3，然后单击过滤器按钮。这使我们选择创建仅包含这些斑点的新群集。过滤器选择的斑点在背景中以紫色突出显示。您可以创建一个名为“子字段”的新类别名称和一个名为CA1的新群集名称。保存后，您将进入类别模式。将显示“子字段”类别以及我们刚刚创建的新群集CA1。



我们知道，分配给群集的某些点实际上不属于大脑CA1区域的一部分。为了拥有一个纯集群，您可以删除与哈贝那相关的斑点。为此，请使用套索工具选择哈贝努拉中的斑点。然后，在弹出菜单中，单击“全部取消分配”。完成此操作后，只有落在海马CA1区的斑点才保留在簇中。

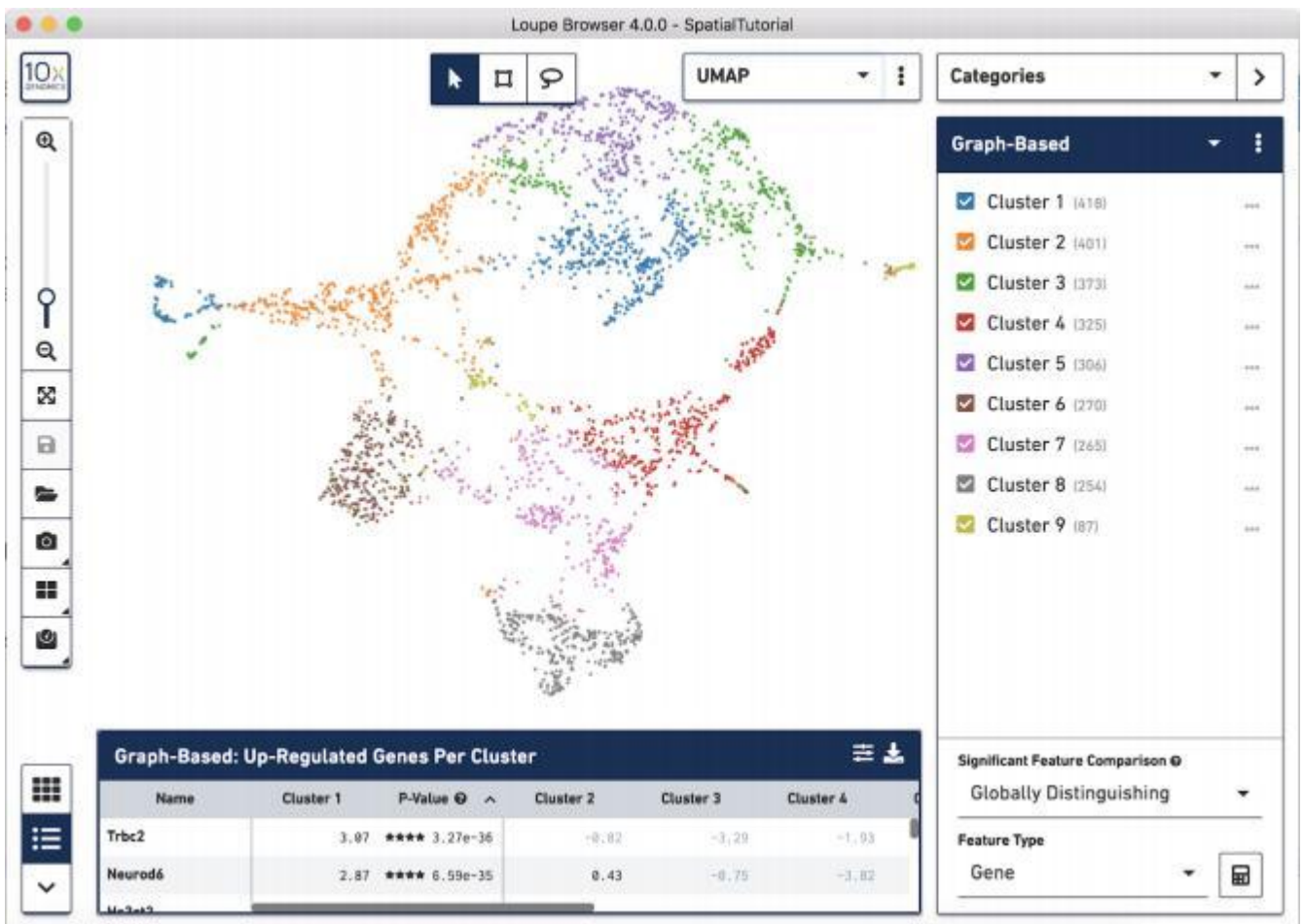


3.2.3 表征集群的子结构

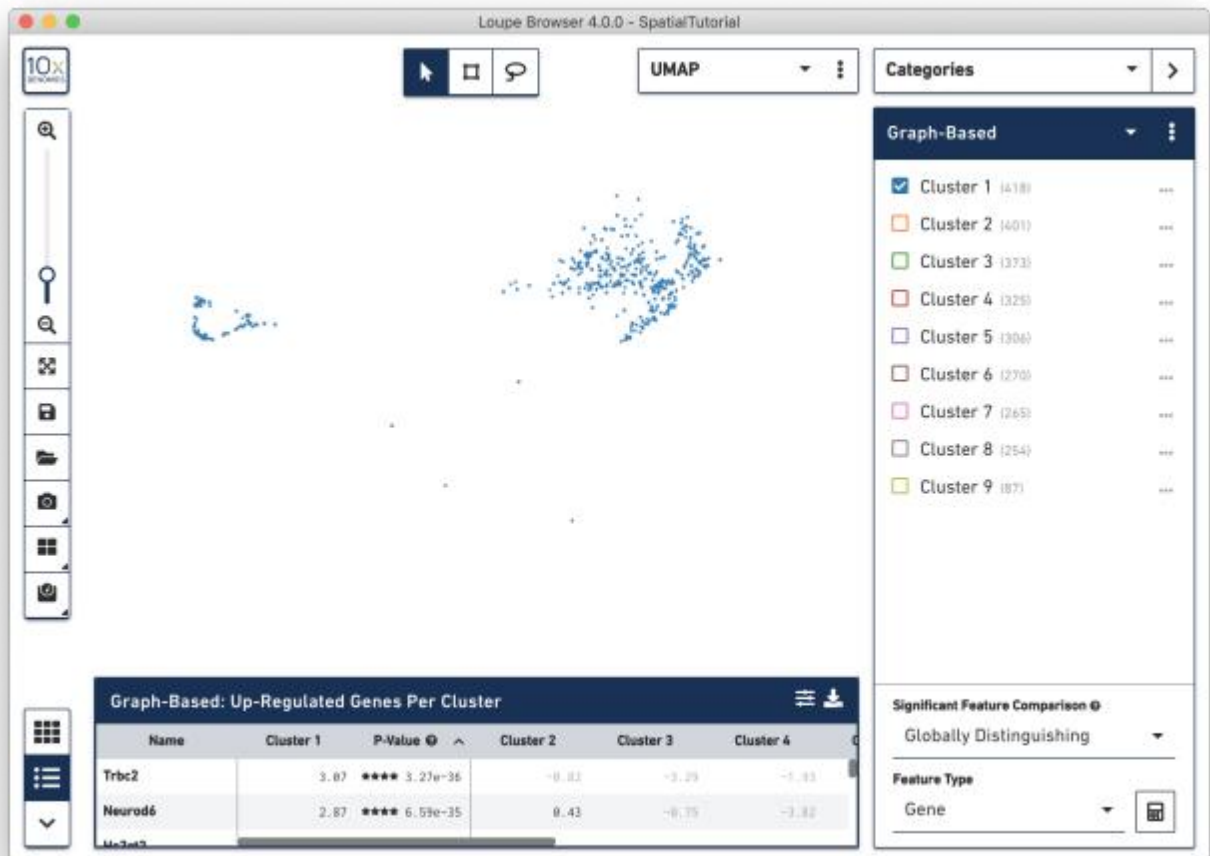
目标：寻找簇中的亚组并进行差异基因表达。

在投影视图中创建子集群

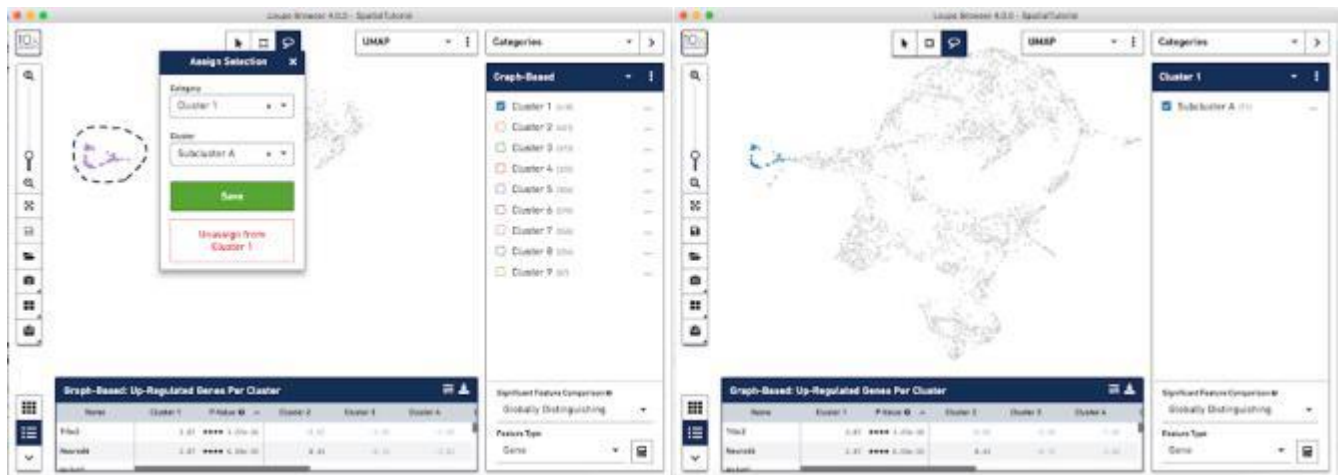
除了将斑点及其相关聚类投影到图像上之外，聚类还可以视为t-SNE或UMAP投影。在此示例中，通过使用视图选择器并切换到UMAP查看UMAP投影。此视图中使用的默认聚类结果来自基于图的聚类方法。可以调整斑点的大小，以使其更容易看到。请参阅导航教程中的[工具箱](#)描述。



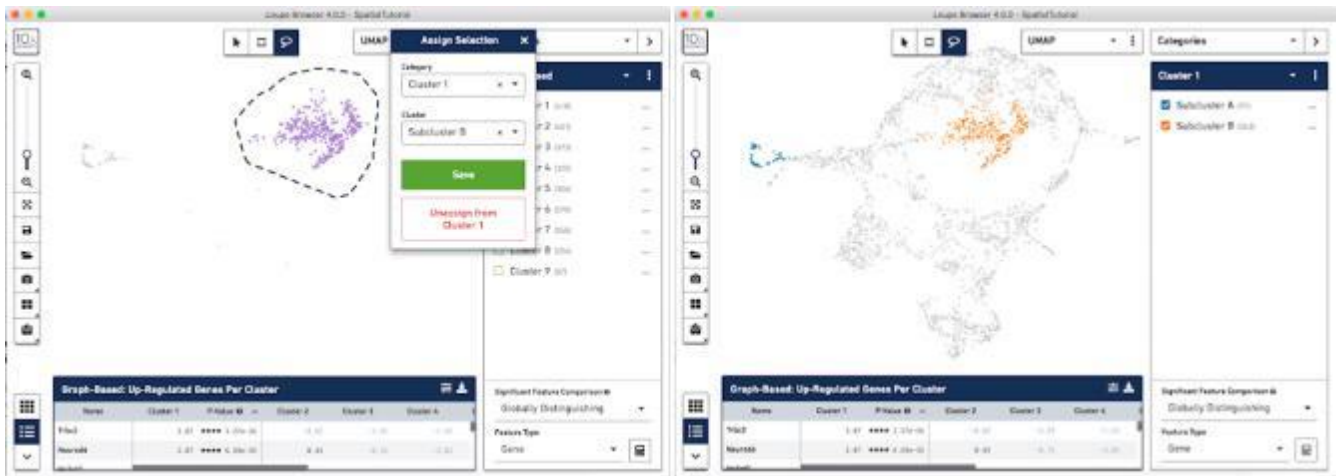
现在，重点关注群集1，可以看到有两个视觉上不同的子种群。为此，请取消选中所有其他集群。



为了进一步探索这两个子集群，请创建新的组，每个子集群一个。为此，请使用套索工具手动选择一组斑点，创建一个名为“群集1”的新类别和一个名为“子群集A”的新群集名称。

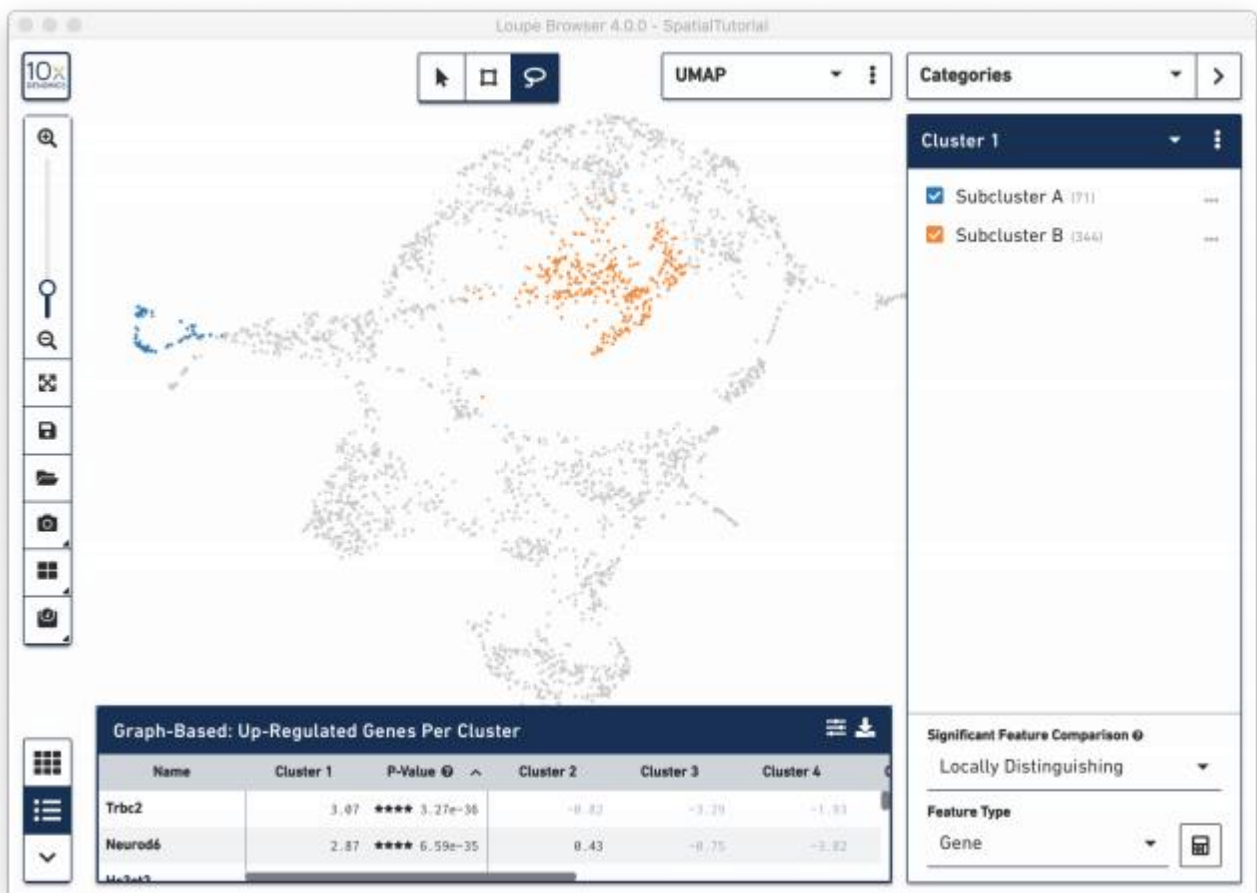


从此“群集1”视图返回到“基于图”视图，并对其他点子组执行相同的操作。首先，将它们与相同的类别(群集1)相关联，但将群集命名为SubclusterB。



局部差异表达

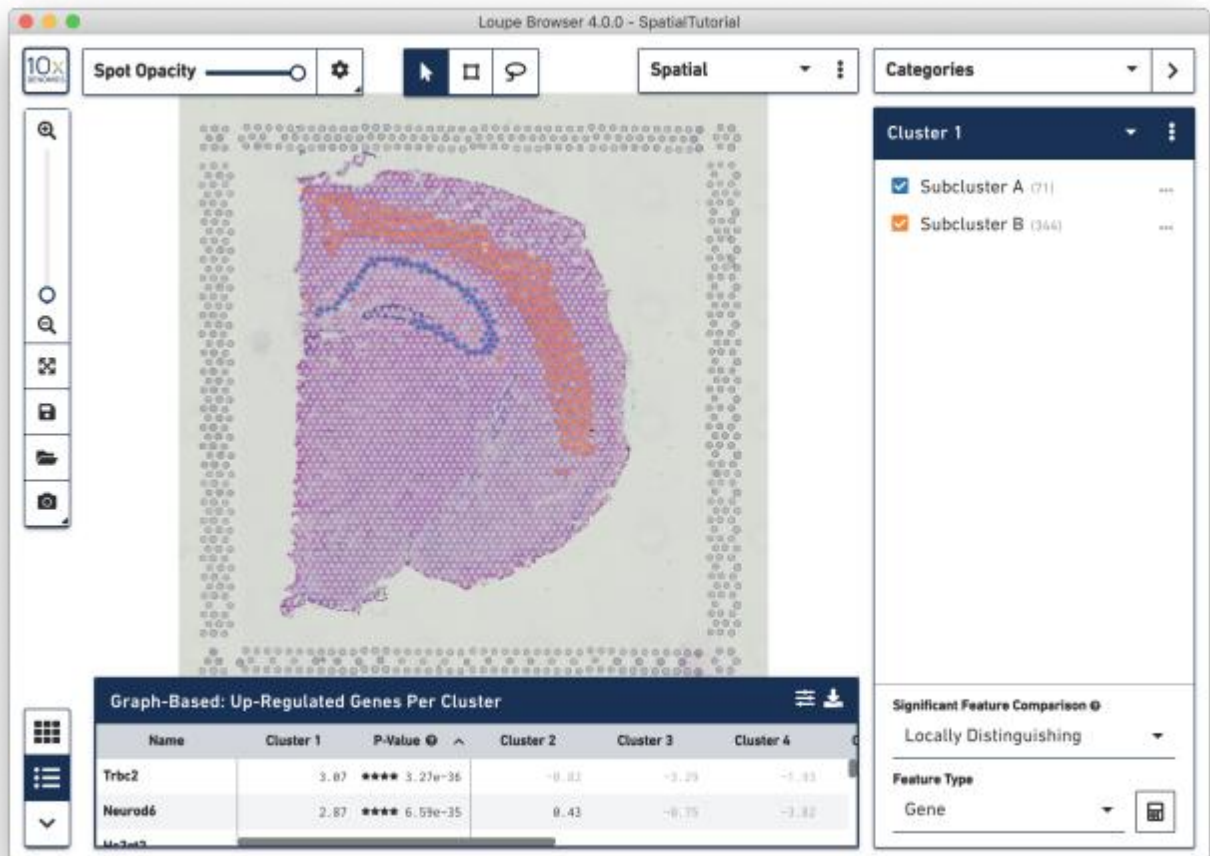
从这里开始，在两个子簇之间进行差异基因表达分析。为此，请从右下角的“重要特征比较”选择器中选择“本地可分辨”选项。有关更多详细信息，请参见导航教程中的[重要功能比较](#)说明。



查看底部的“[数据面板](#)”，以查看这两个子簇之间顶部差异表达的基因。使用表格右上角的设置图标可控制“数据面板”中显示的值。

在空间视图中评估子集群

任何手动定义的自定义类别和聚类也可以在“空间视图”中可视化。使用视图控制器从UMAP视图切换到空间视图。我们仍在查看称为集群1的自定义类别和手动定义的两个子集群。您可以很快看到这两个子集群与组织中的两个不同的界标很好地对齐。子集群A对应于海马，子集群B对应于等皮质。



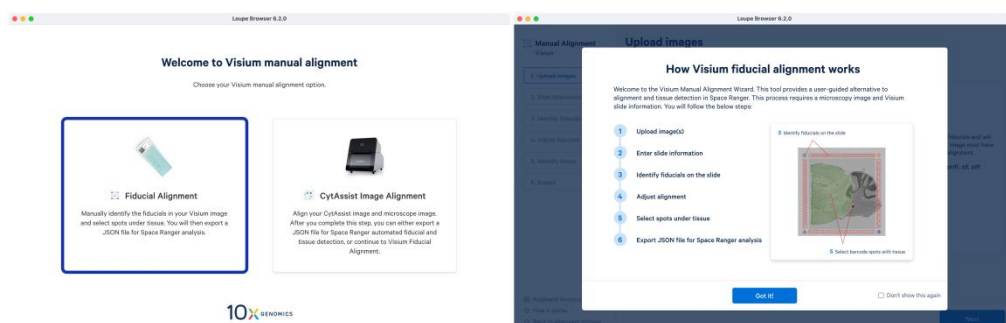
3.3 手动比对

Space Ranger管线使用[自动图像检测算法](#)来计算基准标记的位置，并找到组织的边界。10x Genomics在各种各样的图像，组织和样本上测试了该算法，并发现检测算法是可靠的。但是，在某些情况下，基准标记会被遮盖，或者检测到的轮廓并非组织边界所在的确切位置。同样，某些组织，尤其是具有孔或间隙的组织可能需要进行微调，以免在下游分析中包括背景斑点。

对于需要更多手动干预的情况，Loupe Browser4.0和更高版本提供了Visium手动对齐向导。该向导使交互式地将图像与切片的基准标记位置对齐，使用一组工具执行细粒度的组织选择以及将手动对齐导出到Space Ranger运行中成为可能。本教程将逐步介绍该过程。

3.3.1 输入对齐信息

Visium 手动对齐向导位于“放大镜浏览器”位于主面板底部。单击Start Visium Image Alignment 该链接将在新窗口中启动对齐向导。由于放大镜浏览器 6.2 引入了额外的图像对齐工作流程来支持 CytAssist 图像对齐，因此登录页面现在提供了两种工作流程选择。单击与基准对齐相对应的框,即下图的蓝框位置。



然后将打开一个弹出窗口，其中列出了完成所需的步骤。点击Got it! 退出弹出窗口。选中“不再显示此内容”框将在下次启动对齐向导时绕过弹出窗口。

本教程的其余部分假定使用以下资源：

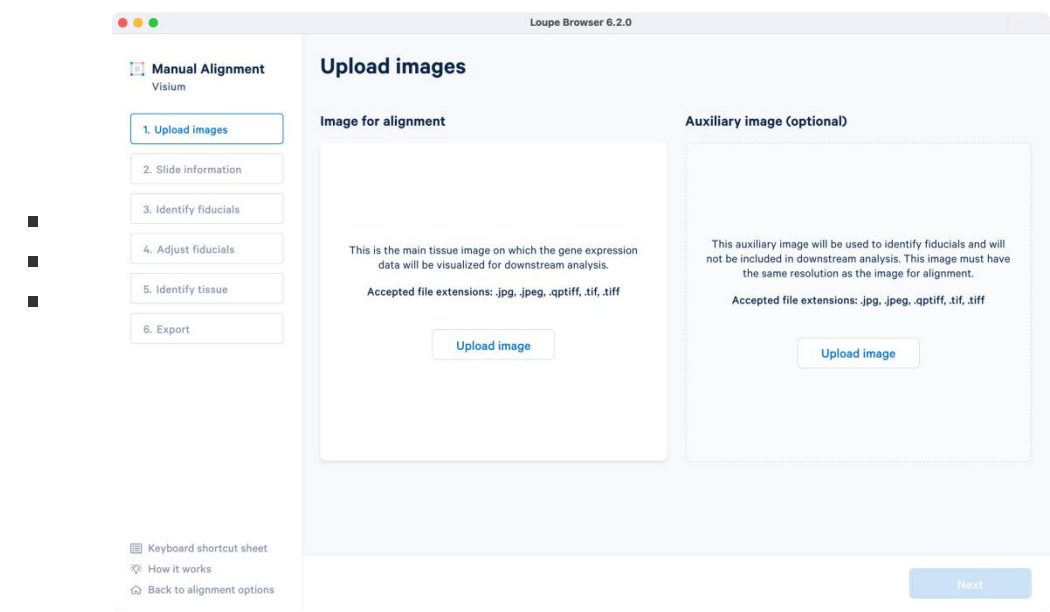
图片：[下载](#)
切片序列： **V19L29-035**
捕获区域： **A1**

3.3.2 打开图像

Visium手动对齐向导接受与Space Ranger相同类型的图像文件，包括：

Image Type	Image Format
Brightfield Image	24-bit color TIFF/BigTIFF or a JPEG
	16-bit grayscale TIFF/BigTIFF or a JPEG
Fluorescence Image	8 or 16-bit grayscale single, multi-page TIFF/BigTIFF
	8 or 16-bit grayscale multiple single-page TIFF/BigTIFF or a JPEG
	24-bit single colored image TIFF/BigTIFF or a JPEG
CytAssist Image	24-bit color TIFF

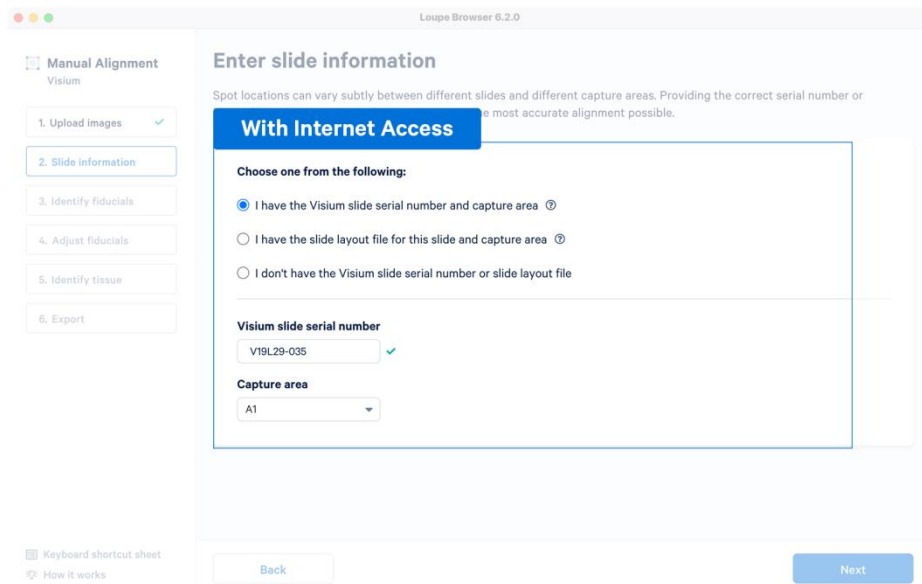
单击“上传图像”将打开一个文件对话框，该对话框将过滤当前文件系统中的兼容图像文件。选择文件会触发一个简短的加载过程。如果运行向导的计算机内存不足，无法有效加载映像，则向导需要确认才能继续。



3.3.3 输入切片信息

输入切片信息有三个选项。

1. 首选机制是默认机制，即直接输入切片序列号和从中获取图像的捕获区域。该选项需要Internet连接，因为最新的切片信息是从10x下载的。(有关脱机选项，请继续阅读。)在“切片序列号”文本框中输入序列号(本教程为V19L29-035)，然后按“下载”以验证序列号并加载切片信息。如果切片编号无效或机器没有互联网连接，向导将显示提示。成功输入后，捕获区域选择器可见。选择捕获区域将解锁“开始对齐过程”按钮，然后进行下一步。
2. 如果本地可以使用成像切片的点偏移文件，则第二个选项更适合脱机模式。单击“打开切片文件”会提示此类文件，其格式为**slide serial.gpr**，例如V19L29-035.gpr。加载并验证文件后，捕获区域选择器将可见。选择捕获区域将解锁“开始对齐过程”按钮，然后进行下一步。
3. 最后，如果图像的序列号和捕获区域未知，或者点偏移文件不可用，仍然可以使用第三个选项进行手动对齐。Visium手动对齐向导代替对齐切片的特定点偏移文件，在对齐步骤中使用理想化的网格布局。从理想栅格到实际滑动位置的每个点的增量可能在5到15微米之间，大大小于每个点的宽度。斑点精度有些损失，但是斑点与基础图像之间的关系仍然是连贯的。



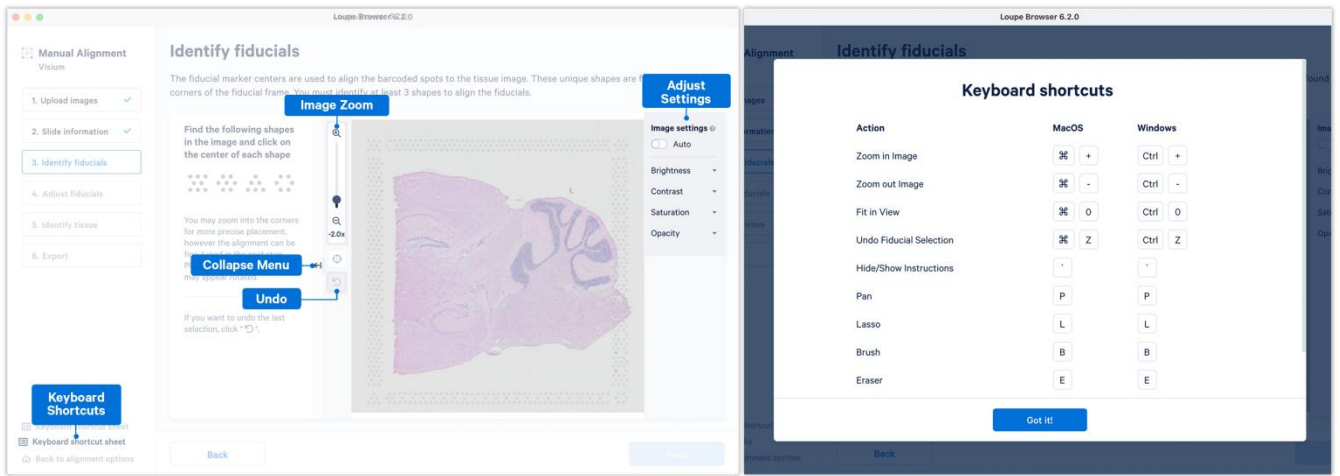
The screenshot shows the 'Manual Alignment' window in Loupe Browser 6.2.0. On the left is a sidebar with steps: 1. Upload images (checked), 2. Slide information (active), 3. Identify fiducials, 4. Adjust fiducials, 5. Identify tissue, and 6. Export. The main panel is titled 'Enter slide information' and includes a note: 'Spot locations can vary subtly between different slides and different capture areas. Providing the correct serial number or capture area will result in the most accurate alignment possible.' Under the 'With Internet Access' section, three radio buttons are present: 'I have the Visium slide serial number and capture area' (selected), 'I have the slide layout file for this slide and capture area', and 'I don't have the Visium slide serial number or slide layout file'. Below these, the 'Visium slide serial number' field contains 'V19L29-035' with a green checkmark, and the 'Capture area' dropdown is set to 'A1'. At the bottom, there are 'Back' and 'Next' buttons.

3.3.4 将斑点与图像对齐

“对齐图像”向导步骤使用基准标记作为可视指南，使用来自图像的斑点位置信息和上一步中加载的斑点偏移文件来启用交互式手动对齐。通过识别**基准标记**的中心，首先以粗粒度的方式将这些点与图像对齐。

Loupe Browser 6.1 及更高版本添加了**新的特性和功能**，增强了手动对齐体验。这些是：

- 能够使用任何三角基准标记手动对齐，也可以按任何顺序选择。
- 使用缩放滑块放大图像的功能
- 能够使用键盘快捷键进行按键操作
- 自动功能，用于对图像中的所有像素应用均匀的亮度缩放
- 折叠指令面板以展开图像窗口的功能



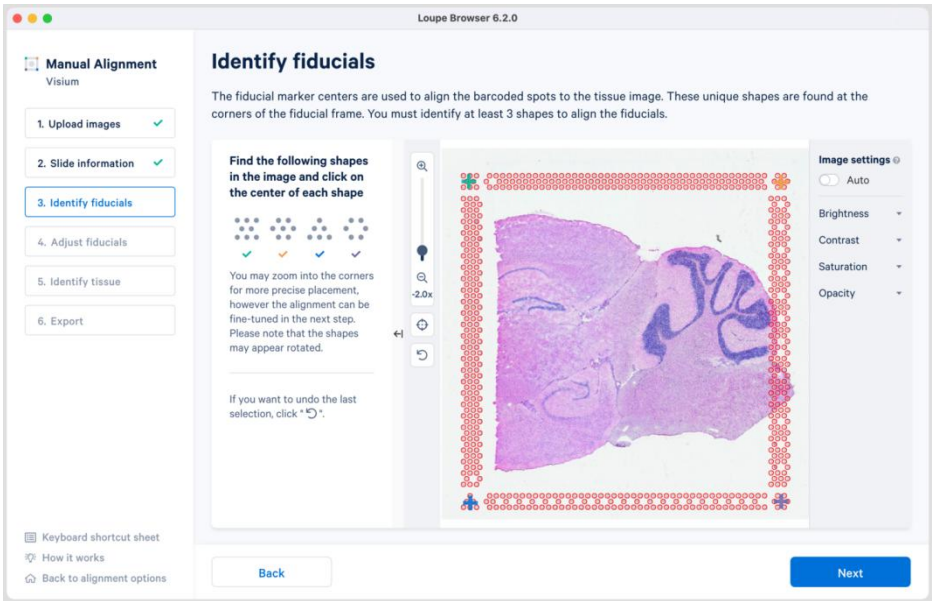
选择基准拐角

首先随机点击一个基准角，该基准角上会产生一个彩色的+。随后会跳出一个弹窗，在弹窗里选择与前面相同的基准角，指令面板上产生匹配的✓。相同的操作标记下一个基准角。成功标记至少三个角会导致在图像顶部叠加红色基准框。单击可随时还原所选内容。红色基准点的外观解锁了下一个以继续执行步骤 4，调整基准点。

Visium 滑轨有四种独特的基准角形状：

基准标记	形状
	滴漏
	实心六边形
	开六角形
	三角形

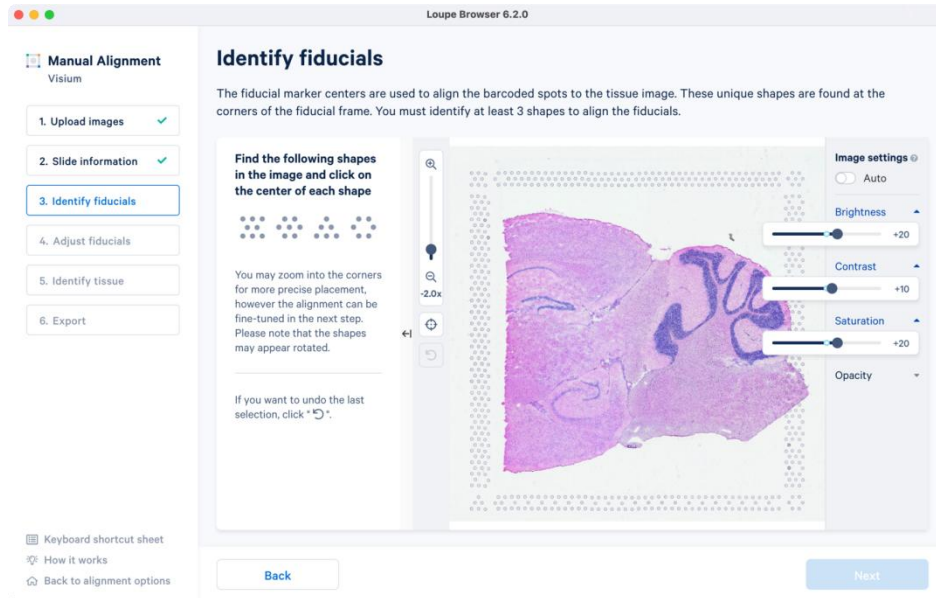
建议：通过拖动拐角 + 进行细粒度对齐可以在识别基准点和调整基准点步骤中执行。为了更好地控制微调，建议标记四个基准标记（如果可见）。



图像设置

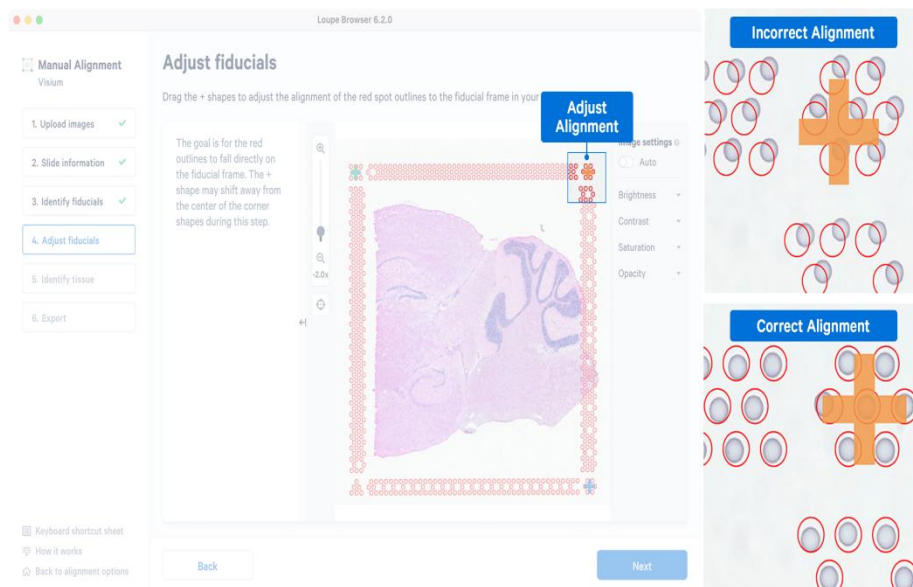
如果基准标记或组织边界较暗，则可以调整图像的亮度、对比度、饱和度和不透明度，从而更容易识别这些特征。

设置为开时，自动切换会调整所有像素的图像亮度，目的是增强暗像素和亮像素。它通过将原始图像亮度值 [min, max] 映射到新范围并将其重新缩放回完整亮度谱 [0, 255] 来实现。



3.3.5 调整基准点

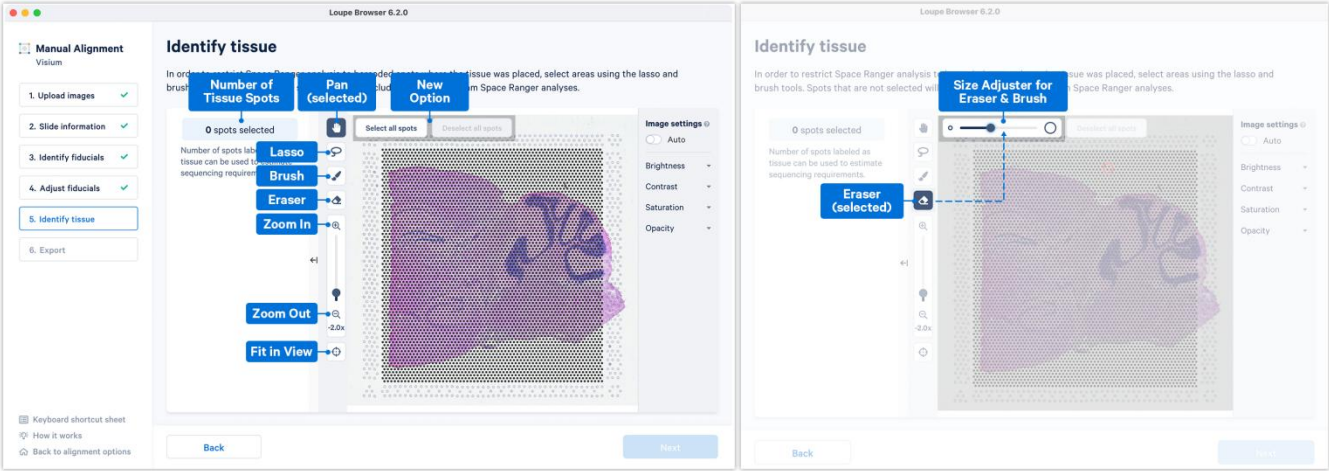
虽然红框的位置通常与图像上的基准帧相匹配，但在某些情况下可能需要细粒度的调整。您可以通过拖动角+形状来调整红点轮廓与图像中基准帧的对齐方式来实现此目的。可以使用鼠标滚轮、缩放滑块或新引入的键盘快捷键放大图像，以识别未对齐。然后通过单击并拖动 + 来更正。



单击继续以转到下一步，确定组织。

3.3.6 识别组织






准确的组织边界选择可产生更高质量的数据，降低背景驱动簇的可能性，并为微调测序参数提供准确的斑点计数。从“识别组织”页面开始时，条形码上的斑点以及从上一个对齐步骤推断出的位置将绘制在图像的顶部，如下所示。标记为组织的spots显示为绿色，标记为背景的spots保持灰色。



图像左侧的工具栏提供了多种工具来执行粗粒度和细粒度的组织选择。下表中描述了这些工具。

工具	描述
	放大
	缩小
	移动图像-左右或上下
	套索
	标签为组织刷(大小可调)
	标签为背景橡皮擦(大小可调)
	尺寸调整器

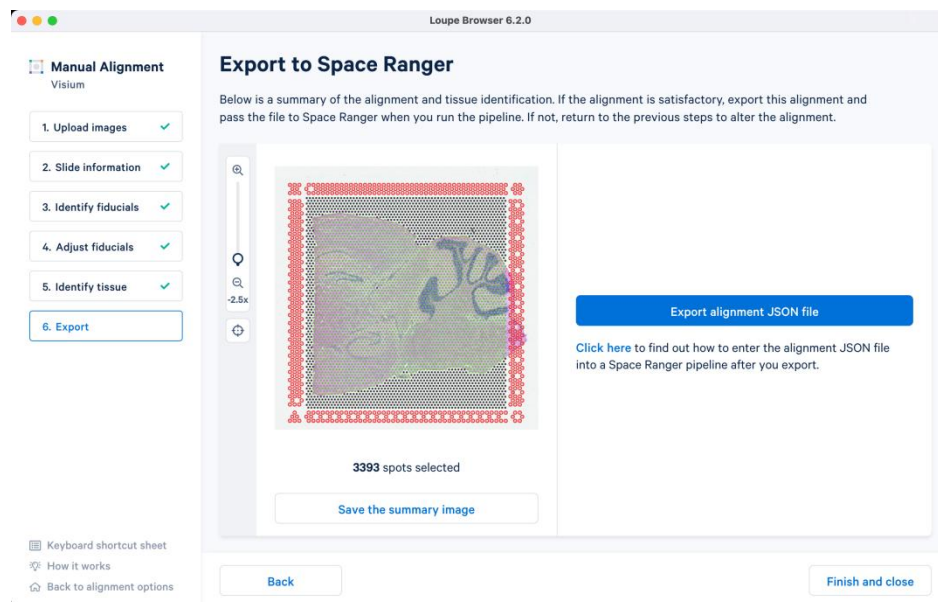
推荐的组织选择工作流程

- 当组织切片占据捕获区域的很大一部分时, 选择所有spots(可以点击Select all spots或使用套索全部选中), 然后组合使用套索和橡皮擦工具进行修剪。
- 在组织边界周围, 使用套索、画笔和橡皮擦工具的组合来选择组织区域。套索可用于选择大面积的组织, 而使用刷子和橡皮擦的组合可以实现精确选择。

返回向导中的先前步骤, 以进行微调, 进行调整, 重新开始对齐, 重新开始组织检测或输入其他数据。对齐满意后, 最后一步是将对齐文件导出到Space Ranger。

3.3.6 导出

最后一步， 导出到**Space Ranger**， 显示了完整的基准点对准和组织选择， 如下所示。



该图像大致反映了Space Ranger网站摘要中显示的路线预览。单击相机图标可生成路线的屏幕截图，以备保存记录之用。单击“导出”以生成一个JSON文件，如果在“输入数据”步骤中提供了该文件，则以切片和捕获区域命名。

该文件用于spaceranger管道中，以覆盖自动基准和组织检测。管道运算符需要使用loupe-alignment参数以及生成文件的路径来运行管道。有关更多信息，请查阅 Space Ranger文档中的[“手动对齐”](#)说明。

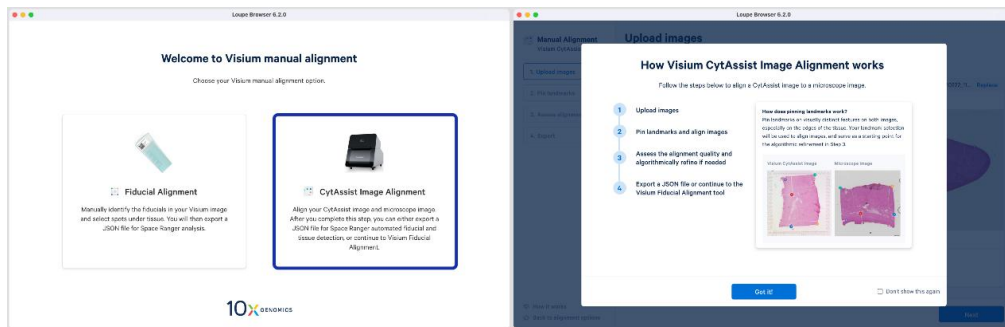
注意：使对齐文件可用于运行管道的计算环境和管道运算符，这一点很重要。

3.4 手动CytAssist图像对齐

Loupe Browser 6.2及以上版本提供了CytAssist图像对准向导，以实现手动图像配准。对齐向导使得用户可以交互式地上传两个图像输入，选择图像之间的关键地标点，并通过算法进行细微调整，以达到最佳的对准效果。对齐向导提供了将图像对准结果导出为独立对准文件的选项，或者继续进行手动基准对准流程，以生成组合对准文件。本教程逐步介绍了图像对准的工作流程。

Visium手动对准向导可以在Loupe浏览器的启动页面上找到，在主面板的底部。

单击链接将在新窗口中启动对准向导，并显示一个弹出窗口，列出了两个可用的工作流程。单击CytAssist图像对准框，打开一个弹出窗口，概述完成所需的步骤。单击Got it!以退出弹出窗口。选择“不再显示此窗口”框，将在下一次启动此对准向导时跳过弹出窗口。



3.4.1. 上传图片

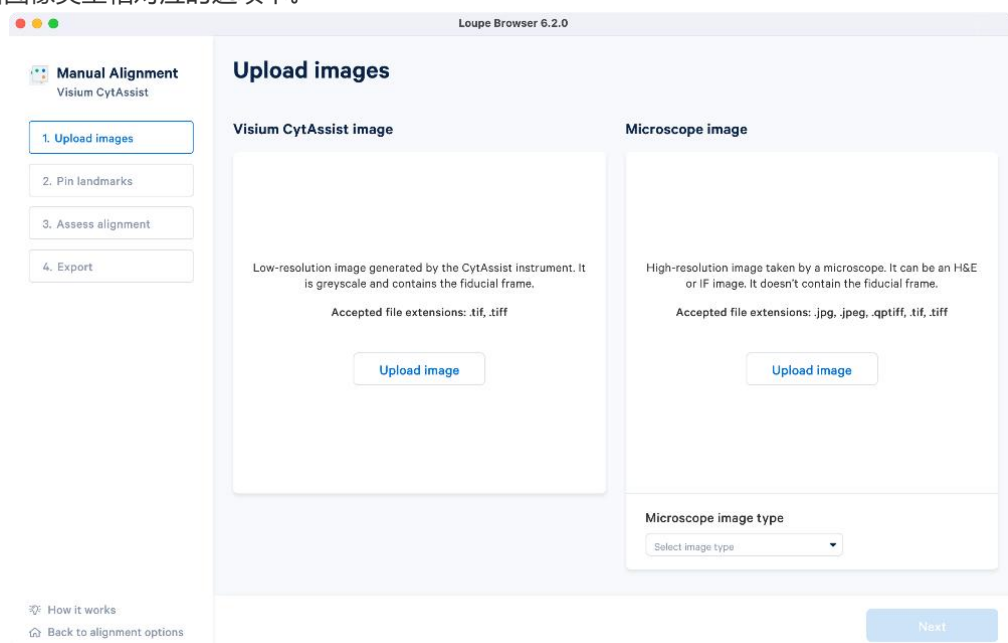
图片格式要求

有两个主要的图像输入：CytAssist仪器生成的图像和显微镜图像（亮场或荧光），遵循与Space Ranger相同的格式要求。CytAssist图像包含基准帧，具有固定的分辨率和大小规格，这些规格由Space Ranger和Loupe Browser用于验证图像类型。Loupe 6.2还添加了对.qptiff图像格式的支持。请参考输入图像建议页面以获取更多详细信息。

上传图像

单击“图像对准”面板下的“上传图像”会打开一个文件对话框，该对话框会过滤当前文件系统中的兼容图像文件。选择文件会触发一个简短的加载过程。请注意，单击左下角的“How it works”会弹出窗口。

选择与不同起始图像类型相对应的选项卡。



加载图像后，将显示预览图像，如下所示。成功上传图像后，从显微镜图像类型下拉菜单中选择图像类型（明场图像或多通道免疫荧光显微镜图像），下一步按钮才可点击。使用位于图像预览上方右上角的替换选项更改加载的图像。

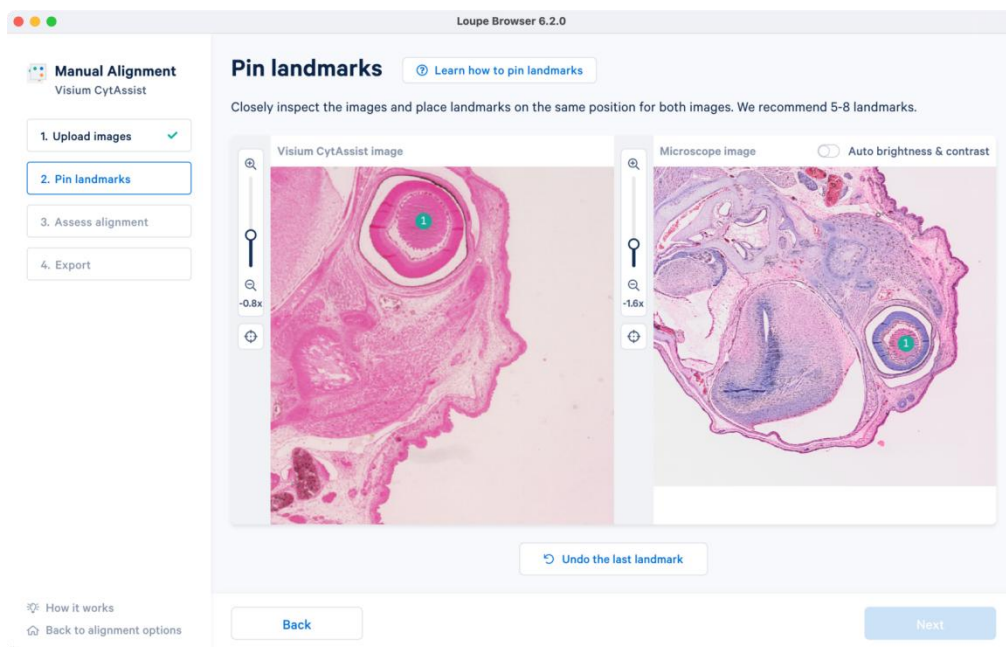
3.4.2 固定地标


手动图像配准的成功取决于两个图像之间的准确地标选择。由于两个图像的初始叠加派生自地标位置，因此选择地标时需要考虑一些关键因素：

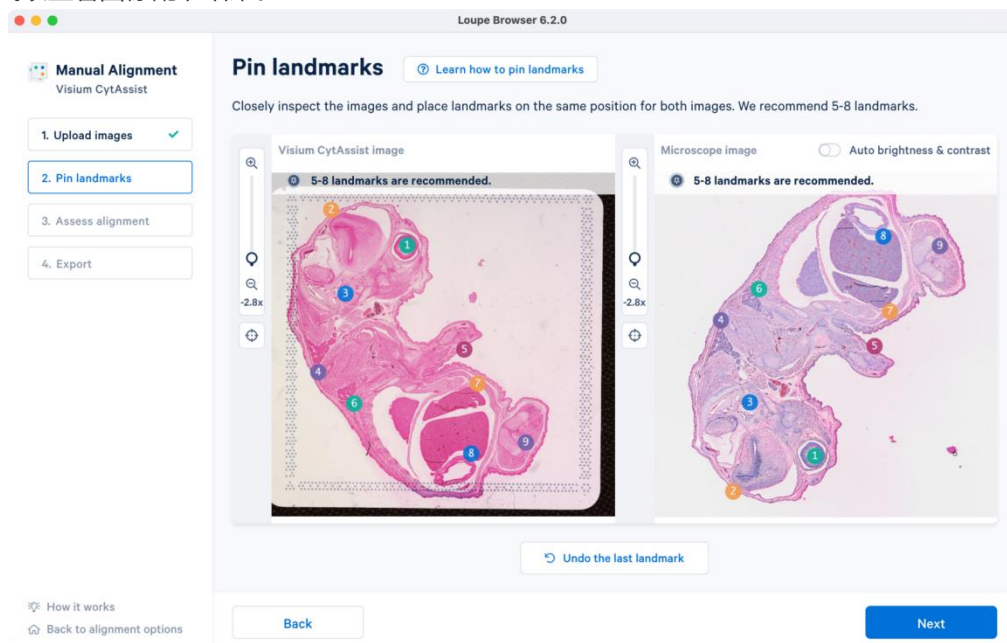
- 为获得最佳效果，建议每个图像的地标范围在 5 到 8 之间，但没有最大限制。请注意，如果放置的地标少于三个，或者两个图像输入之间的地标数量不匹配，下一步按钮则无法点击。
- 选择具有视觉上明显的边缘和特征作为关键点的位置。
- 关键点之间的间距很重要，以覆盖整个组织切片的区域。建议将关键点分散在覆盖四个象限的区域内。
- 避免将三个或更多的关键点放在一条直线上，因为这可能会干扰初始对准算法。
- 推荐在每个图像上使用缩放滑块进行更精确的关键点放置。当组织形状均匀且形态特征不明显时，这尤其有用。

单击  恢复默认缩放。

点击 Learn how to pin landmarks 了解如何固定地标以访问这些关键点的摘要以及示例图像。



地标是根据上述标准选择的。单击  可缩小并查看两个图像的最终地标位置。点击下一个以继续执行步骤 3 评估对齐方式以查看图像配准结果。

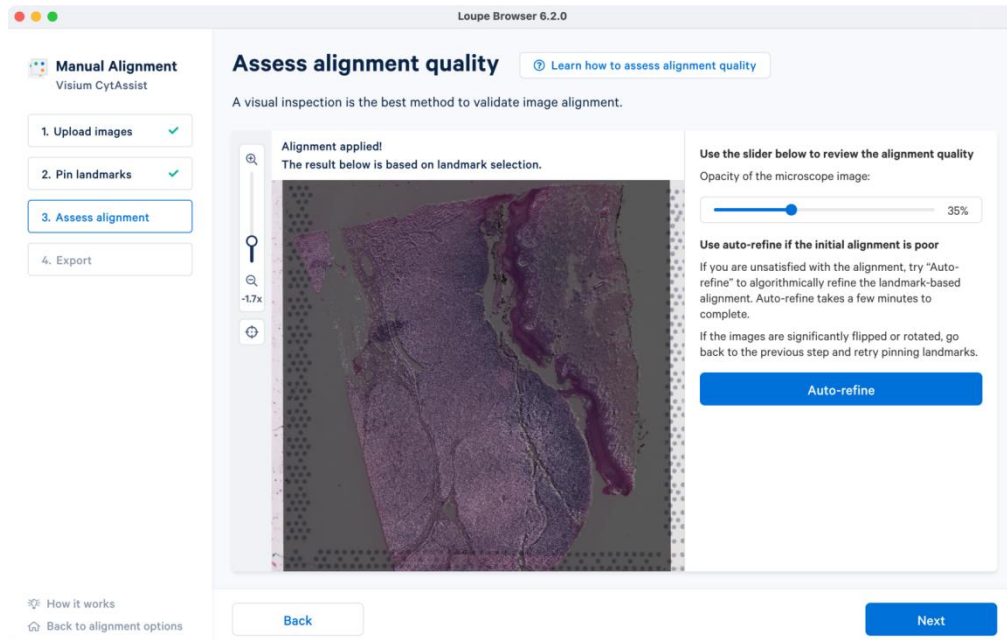


3.4.3 评估一致性

窗口中是两个图像输入的重叠。第一个对齐仅基于地标选择。

查看是否对齐的方法

右侧提供了一个不透明度滑块，默认设置为 50% 值。要评估套准的质量，请放大图像并使用不透明度滑块向任一方向滚动，以检查边缘之间的重叠以及两个图像之间的独特组织特征。当一个图像相对于另一个图像没有形状不连续性或偏移时，图像被视为已成功对齐。初始检查显示两个图像之间的对齐良好。在这种情况下，结果令人满意，可以进行下一步导出。



点击Learn how to assess alignment quality了解如何评估对齐质量以查看良好和不良对齐案例的一些示例图像。

两种方法可以优化对齐方式：

对于CytAssist + Brightfield图像对，初始对齐看起来很接近，边缘周围有一些改进的空间。有两种方法可以优化对齐方式：

- 使用自动优化以算法优化初始对齐（强烈推荐）。
- 返回到步骤 2。固定地标以重做地标位置。

注意：自动细化算法基于地标的初始状态优化图像配准。由于这是一个迭代过程，因此可以在同一图像对上多次应用。尽管可以选择退出自动优化弹出窗口，但强烈建议允许算法完成。如果算法运行时间超过指示时间，则表明初始对齐状态存在潜在问题。在这些情况下，建议退出并重做地标选择，以获得更准确的图像配准。通过在对齐向导中单击可能的原因和下一步操作，可以找到后续步骤的可能原因和指导。

3.4.4 导出

CytAssist图像对齐向导的最后一步提供了两个选项：

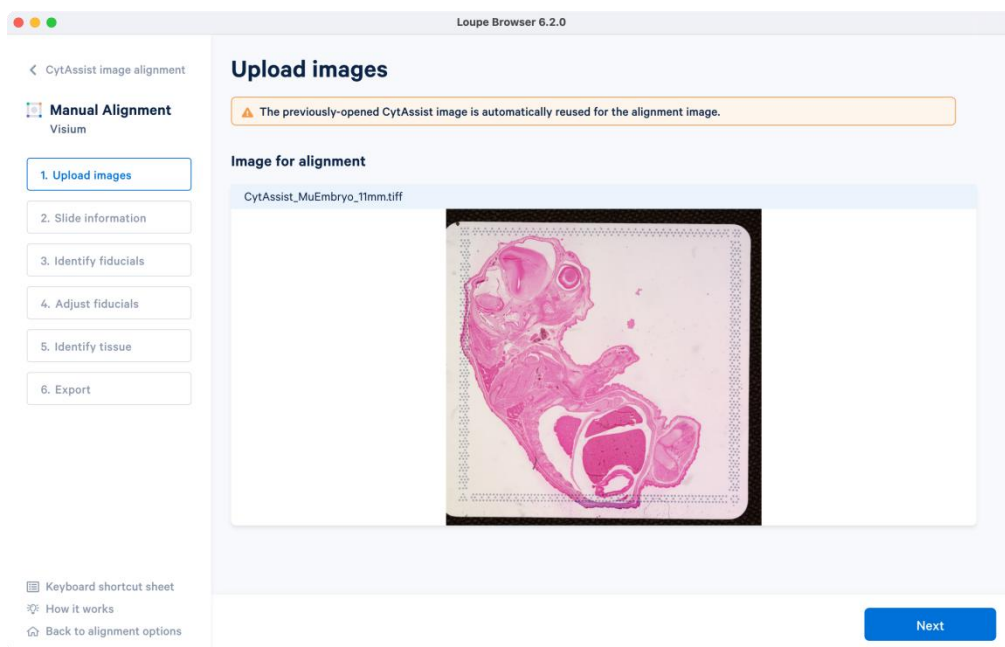
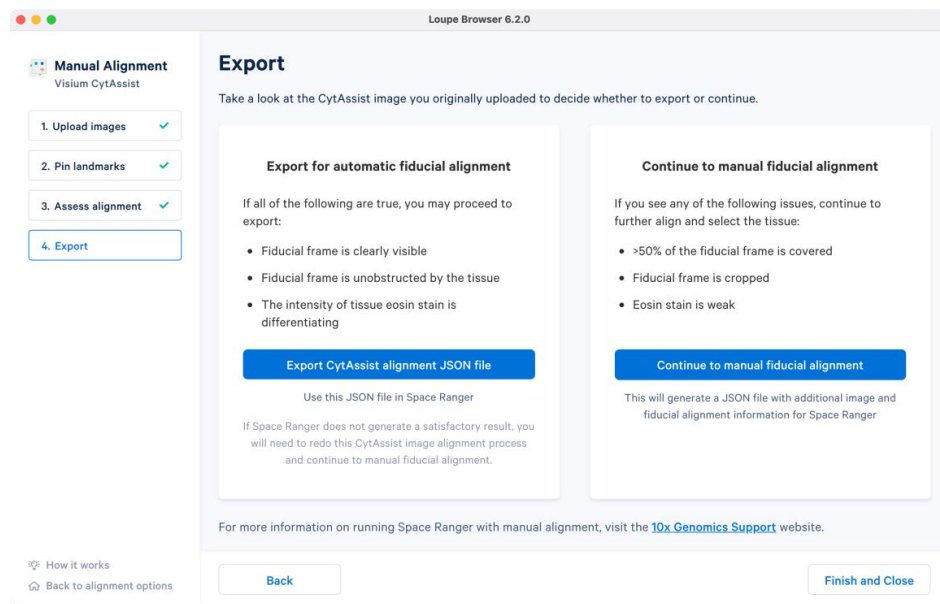
● 以文件格式导出图像配准结果

本教程中使用的CytAssist图像具有可见的基准框架，该基准框架基本上是无障碍的，并且组织染色的强度足以识别形态特征。在这些情况下，可以通过单击导出 CytAssist 对齐 JSON 文件以生成 JSON 文件。

● 继续手动基准对齐向导以手动对齐基准框架并分割组织切片并生成组合文件

如果 CytAssist 图像被组织切片部分基准帧阻塞或裁剪了多个边缘之一，则需要继续手动基准对齐工作流程。组织染色的一些问题子集（弱染色、不完全染色或过度染色导致组织切片外渗漏）也会干扰使用自动图像处理管道准确识别组织相关斑点。在这些情况下，建议完成手动基准点对齐工作流程。

点击继续手动基准点对齐这将自动加载上一步中的 CytAssist 图像。按照手动基准对齐教程中的说明完成对齐向导中的步骤(详见上述的3.3手动对齐说明)。最后生成的对齐文件现在包含有关图像配准以及基准检测和组织分割的信息。



生成的 JSON 文件的路径通过参数提供给管道。有关更多信息，请参阅Space Ranger文档中的手动对齐说明。