时空数据分析软件（SDAS）使用手册

版本：beta

作者：三箭齐发

更新日期：2025-03-05

目录

一、软件简介

时空组学 STOmics

StereoDataAnalysisSolution (SDAS)软件：一套空转数据分析的生信工具，囊括了空间组学数据解读的关键步骤。

- 功能模块： 9个功能模块，共14个算法；具体有数据处理，细胞类型注释，空间结构域识别，CNV分析，差异基因识别，基因集富集分析，空间基因共表达，细胞通讯分析，轨迹分析。
- 输入：SAW生成的h5ad文件（支持SAW count，SAW convert gef2h5ad两种方式的h5ad，固定binsize），SAW aggr生成的h5mu文件
- 输出：h5ad，rds，csv，txt文件，每个功能模块输出相应的图（png或pdf）

	功能模块	算法/方法	环境	核心包版本	必须输入文件	输出文件形式
1	数据处理	-	python 3.10； R 4.3.3	schard_0.0.1 seurat_5.1.0 scanpy 1.10.4	h5ad/csv	h5ad; rds; txt
2	细胞类型注释	Spotlight	R 4.3.3	spotlight 1.6.3	h5ad	h5ad; csv; png
		cell2location	python 3.10	cell2location 0.1.4	h5ad	
		RCTD	R 4.3.3	r-spacexr 2.2.1	h5ad	
3	空间结构域识别	GraphST	python 3.8	GraphST 1.1.1	h5ad	h5ad; png
4	CNV分析	inferCNV	R 4.2.3	infercnv 1.14.2	rds和h5ad	rds；csv; png
5	空间基因共表达	hotspot	python 3.10	nest-analysis 1.0.4	h5ad	h5ad；csv; png
		nest		hotspotsc 1.1.1	h5ad	
6	差异基因分析	scanpy	python 3.10	scanpy 1.10.4	h5ad 和 csv	csv; pdf
7	基因集富集分析	gsea	python 3.10	gseapy 1.1.5	h5ad 和 csv	csv; pdf
		enrichr			csv	csv; pdf
		prerank			csv	csv; pdf
		gsva			h5ad 和 csv	csv; pdf
8	细胞通讯分析	cellchat v2	R 4.3.3	CellChat 2.1.2	rds	rds; pdf
9	轨迹分析	monocle3	R 4.3.3	monocle3 1.3.1	rds	rds; png

二、安装指南

时空组学 STOmics

1. **系统配置要求**

   SDAS分析软件包在Linux系统上被解压和安装，计算环境需满足下列基本要求：

   - 8-core Intel or AMD processor (>24 cores recommended)
   - 128GB RAM (>256GB recommended)
   - 200G free disk space or higher
   - 64-bit CentOS/RedHat 7.8 or Ubuntu 20.04

2. **软件下载**

   华大网盘：https://bgipan.genomics.cn/#/link/29ateK2tAQYXGhetPYk7 提取密码 :vERA

   Github: git clone https://github.com/STOmics/SDAS.git（无tar.gz和测试数据）

3. **解压**

   ```
   tar -xzf SDAS_beta.tar.gz
   cd SDAS_beta/anno
   ./conda-unpack
   ```

4. **测试运行**

   ```
   ./SDAS -h
   ```

其他说明：

1. **软件压缩包共14G，解压后34G**
2. **关于GPU使用的说明：**请用户自行安装CUDA >= 11.7，参考https://docs.nvidia.com/cuda/cuda-installation-guide-linux/

三、快速入门

时空组学 STOmics

1. **获取SAW输出的文件：**

   方式一：直接下载SAW count的输出的h5ad文件

   方式二：从gef转h5ad，`saw convert gef2h5ad --gef=sample.tissue.gef --bin-size=100 --h5ad=sample_bin100.h5ad`

   方式三：直接下载SAW aggr(alpha ver.)的输出的h5mu文件

2. **进行格式处理得到SDAS的标准输入（必做），以测试数据为例：**

```
SDAS_beta/SDAS dataProcess input2h5ad -i Test_data/single_slice/sample.h5ad --mode single -o Test_data/single_slice
```

3. **进行细胞类型注释（cell2location、RCTD）：**

```
SDAS_beta/SDAS cellAnnotation cell2locationMakeRef --reference Test_data/single_slice/sample_ref.h5ad -o
output/cell2location_ref --label_key annotation2 --filter_rare_cell 0 --cell_percentage_cutoff2 0.05 --nonz_mean_cutoff 1.45
--gpu_id 0

SDAS_beta/SDAS cellAnnotation cell2location -i Test_data/single_slice/sample_standard.h5ad -o output/cell2location --
reference_csv output/cell2location_ref/sample_ref_inf_aver.csv --bin_size 100 --gpu_id 0

SDAS_beta/SDAS cellAnnotation rctd -i Test_data/single_slice/sample_standard.h5ad -o output/rctd --reference
Test_data/single_slice/sample_ref.h5ad --label_key annotation2 --filter_rare_cell 0 --bin_size 100
```

4. **进行空间结构域识别：**

```
mkdir -p output/graphST

SDAS_beta/SDAS spatialDomain graphst -i Test_data/single_slice/sample_standard.h5ad -o output/graphST --gpu_id 0 --tool
mclust --n_clusters 10 --n_hvg 3000 --bin_size 100
```

5. **CNV分析**

   - **使用细胞注释后的h5ad，准备rds文件：**

```
SDAS_beta/SDAS dataProcess h5ad2rds -i output/rctd/sample_standard_anno_rctd.h5ad -o output/rctd
```

   - **运行inferCNV：**

```
SDAS_beta/SDAS infercnv -i output/rctd/sample_standard_anno_rctd.rds --h5ad output/rctd/sample_standard_anno_rctd.h5ad -o
output/inferCNV --bin_size 100 --label_key anno_rctd --species human --cutoff 0.02 --ref_group_names CAF_CXCL14
```

三、快速入门

时空组学 STOmics

6. **空间基因共表达分析（NeST）：**

```
SDAS_beta/SDAS coexpress nest -i Test_data/single_slice/sample_standard.h5ad -o output/nest --bin_size 100 --selected_genes top5000
```

7. **差异基因分析：**

```
SDAS_beta/SDAS DEG -i output/graphST/sample_standard_graphst.h5ad -o output/DEG --diff_plan Test_data/single_slice/deg_plan.csv
```

8. **基因集富集分析（GSEA、Enrichr）：**

```
SDAS_beta/SDAS geneSetEnrichment gsea -i output/graphST/sample_standard_graphst.h5ad -o output/gsea --gsea_plan Test_data/single_slice/gsea_plan.csv --species human
```

```
SDAS_beta/SDAS geneSetEnrichment enrichr -i output/DEG/3.vs.8.deg_filtered.csv -o output/enrichr --species human --cut_off 0.05
```

9. **细胞通讯分析：**

- **使用注释后的h5ad，准备rds文件：**

```
SDAS_beta/SDAS dataProcess h5ad2rds -i output/cell2location/sample_standard_anno_cell2location.h5ad -o output/cell2location
```

- **运行cellchat：**

```
mkdir output/cellchat_nospatial
```

```
SDAS_beta/SDAS CCI cellchat -i "$(realpath output/cell2location/sample_standard_anno_cell2location.rds)" -o output/cellchat_nospatial --bin_size 100 --label_key anno_cell2location --species human --method truncatedMean
```

10. **轨迹分析：**

- **使用注释后h5ad，准备rds文件：**

```
SDAS_beta/SDAS dataProcess h5ad2rds -i output/rctd/sample_standard_anno_rctd.h5ad -o output/rctd
```

- **运行monocle3：**

```
mkdir output/monocle3
```

```
SDAS_beta/SDAS trajectory monocle3 -i "$(realpath output/rctd/sample_standard_anno_rctd.rds)" -o output/monocle3 --root_key anno_rctd --root CAF_CXCL14 --gene_color_label pseudotime
```

测试数据：./Test_data/single_slice　　脚本：./Scripts/quick_start

四、各功能模块使用说明

时空组学 STOmics

- 对9个功能模块进行详细介绍，包括用途，运行方式，输入参数说明（包含参数推荐）和输出结果说明；
- 9个功能模块介绍的顺序为：数据处理，细胞类型注释，空间结构域识别，CNV分析，空间基因共表达，差异基因识别，基因集富集分析，细胞通讯分析，轨迹分析

	功能模块	算法/方法	是否支持GPU	是否支持CPU并行运算	进程/线程是否可控	并行运算开放参数	是否支持多片	是否支持单细胞数据分析
1	数据处理	-	否	否	/	/	支持	支持
2	细胞类型注释	Spotlight	否	支持	不可控	/	支持	否
		cell2location	支持	支持	线程可控	n_threads	支持	否
		RCTD	否	支持	进程可控，每个进程使用线程不定	max_cores	支持	否
3	空间结构域识别	GraphST	支持	支持	不可控	/	支持	否
4	CNV分析	inferCNV	否	支持	线程可控	n_threads	支持	未来支持
5	空间基因共表达	hotspot	否	支持	进程可控，每个进程固定1个线程	n_cpus	否	否
		nest	否	支持	进程可控，每个进程固定1个线程	n_cpus	否	否
6	差异基因分析	scanpy	否	否	/	/	支持	支持
7	基因集富集分析	gsea	否	否	/	/	支持	支持
		enrichr	否	否	/	/	支持	支持
		prerank	否	否	/	/	支持	支持
		gsva	否	否	/	/	支持	支持
8	细胞通讯分析	cellchat v2	否	否	/	/	否	支持
9	轨迹分析	monocle3	否	支持	进程可控，每个进程固定1个线程	n_cpus	支持	支持

数据处理

时空组学 STOmics

用途：对SAW的h5ad进行格式处理，h5ad转rds， SAW aggr输出的h5mu转h5ad，检查h5ad信息，提取h5ad的子集

运行方式：

- input2h5ad: SDAS dataProcess input2h5ad -i st.h5ad --mode single -o outdir
- h5ad2rds: SDAS dataProcess h5ad2rds -i st.h5ad -o outdir
- h5mu2h5ad: SDAS dataProcess h5mu2h5ad -i st.h5mu -o outdir
- checkadata: SDAS dataProcess checkadata -i st.h5ad -o outdir
- subset: SDAS dataProcess subset -i st.h5ad --subset_key total_counts --min 100 --max 5000 -o outdir
- subset: SDAS dataProcess subset -i st.h5ad --subset_key anno_spotlight --list_include B,Fibroblast -o outdir

输入参数说明

dataProcess参数	是否必须	描述
-i / --input	是	输入为SAW生成的h5ad，SAW aggr输出的h5mu或者csv文件（ input2h5ad进行多片转换时，输入为csv文件（第一行#开头为表头））
-o / --output	是	输出文件夹
--mode	是(input2h5ad)	单片填single，多片填multi
--label_key	是(subset)	提取adata子集使用的obs的列名
--list_include	否(subset)	当label_key是列表时，需要提取的列表元素，比如Fibroblast,B,NK
--list_exclude	否(subset)	当label_key是列表时，不需要提取的列表元素，比如Fibroblast,B,NK
--min	否(subset)	当label_key是数值时，提取的最小值
--max	否(subset)	当label_key是数值时，提取的最大值

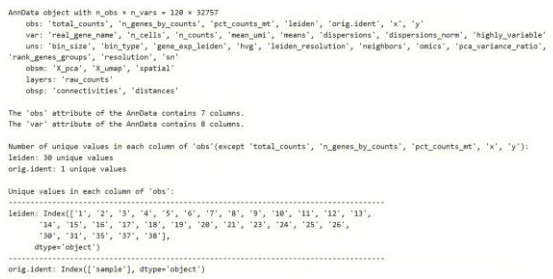
多片输入为csv文件示例，包含样本名，分组信息，样本的h5ad绝对路径，以逗号分隔（第一行#开头为表头）

```
#sample,group,h5adPath
sample1,control,sample1.h5ad.path
sample2,control,sample2.h5ad.path
sample3,test,sample3.h5ad.path
sample4,test,sample4.h5ad.path
```

输出结果说明

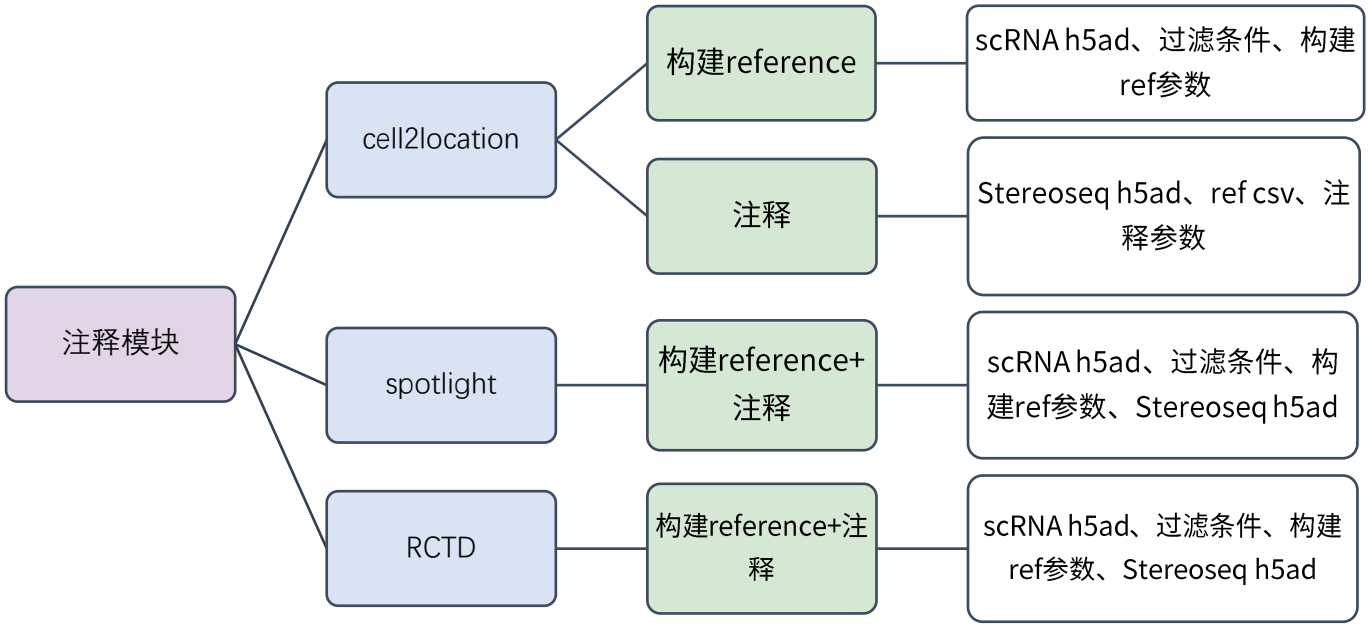
结果文件	描述
<input_name>_standard.h5ad	单片h5ad，h5mu转换的h5ad
<input_name>_subset.h5ad	subset的h5ad
combine_standard.h5ad	多片整合的h5ad
<input_name>_rds	由h5ad转换的rds
<input_name>_adata_info.txt	adata的详细信息

<input_name>_adata_info.txt实例



细胞注释模块：整体介绍

时空组学 STOmics




```
usage: main.py [-h] [--version] {cell2location,cell2locationMakeRef,spotlight,rctd} ...

annotate celltype of spatial transcriptomics data

positional arguments:
  {cell2location,cell2locationMakeRef,spotlight,rctd}
                        Select annotation method
    cell2location       cell2location
    cell2locationMakeRef
                        make cell2location reference
    spotlight           SPOTlight
    rctd                RCTD

options:
  -h, --help            show this help message and exit
  --version             show program's version number and exit
```

输入格式说明：

1. 空转和单细胞数据都是raw counts (Spotlight支持normalize后数据)；如果有layers['raw_counts']则用raw counts，否则用adata.X
2. 空转和单细胞数据的var中都要有基因名(gene symbol)，存在自定义的gene_symbol_key或者var.index中
3. 空转数据要有空间坐标，存在obs里的'x'和'y'列中；或存在obsm里的'spatial'表中（都不区分大小写）
4. 单细胞obs中要有注释信息，存在自定义的label_key中
5. 单细胞obs中可以有批次信息，存在自定义的batch_key中；如果没有，则会使用所有样本

细胞注释模块：cell2location 构建单细胞参考csv

时空组学 STOmics

用途：构建cell2location的单细胞参考inf_aver.csv文件

运行方式： SDAS cellAnnotation cell2locationMakeRef -o ./ref --reference sc.h5ad --label_key annotation --batch_key id --cell_percentage_cutoff2 0.05 --nonz_mean_cutoff 1.45 --gpu_id 3

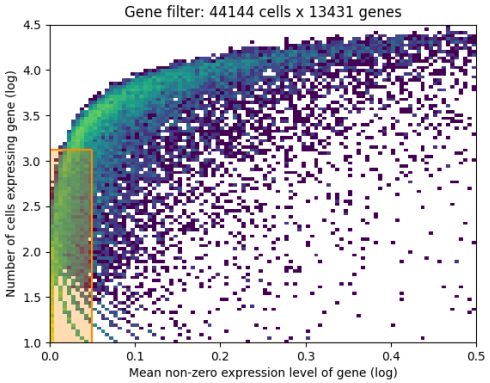
输入参数说明

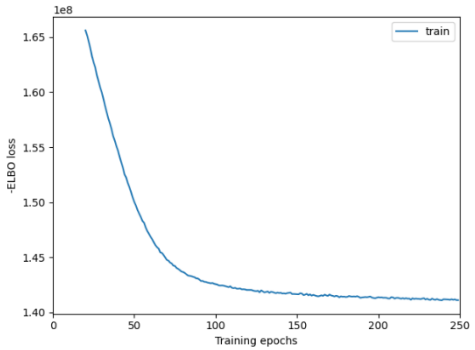
cell2locationMakeRef参数	是否必须	默认值	描述
-o / --output	是		输出文件夹
--reference	是		单细胞ref h5ad，要求原始矩阵
--label_key	是		单细胞ref h5ad.obs中表示细胞类型的列的名称
--ref_gene_symbol_key	否	_index	单细胞ref h5ad.var中表示基因名(symbol)的列的名称（_index 表示使用h5ad.var.index）
--batch_key	否		单细胞ref h5ad.obs中表示批次的列的名称，不输入则不考虑批次
--filter_rare_cell	否	100	如果某些细胞类型在单细胞ref中细胞数小于此值，则过滤掉这些细胞类型
--check_filter_genes	否		如果设置此参数，则只输出筛选基因的结果图filter_genes.png
--cell_count_cutoff	否	5	控制cell2location筛选基因的参数，一般不调整
--cell_percentage_cutoff2	否	0.03	控制cell2location筛选基因的参数，值越大筛选出的基因越少，基因数推荐控制在8k-16k
--nonz_mean_cutoff	否	1.12	控制cell2location筛选基因的参数，值越大筛选出的基因越少，基因数推荐控制在8k-16k
--max_epochs	否	250	模型训练epoch数
--gpu_id	否	-1	使用的GPU的编号，如果为-1，则使用CPU
--n_threads	否		CPU模式下使用的线程数，默认为全部CPU（不考虑超线程）

输出结果说明

cell2locationMakeRef结果文件	描述
<reference_name>_filter_genes.png	Cell2location筛选基因的结果图 （<reference_name>为单细胞ref h5ad文件名）
<reference_name>_train_history.png	训练Loss下降图
<reference_name>_inf_aver.csv	Cell2location构建的单细胞ref csv

***输出结果展示：**





	Fibroblast	B cells	Lymphatic	Squamous	Neutrophil
AL627309.1	0.000721	0.000315	0.002332	0.018779	0.003534
AP006222.2	0.047347	0.005848	0.057651	0.076984	0.005694
SAMD11	0.166152	0.003667	0.002706	0.000453	0.001062
NOC2L	0.060385	0.027762	0.056389	0.20657	0.004468
PLEKHN1	0.000367	0.000175	0.002783	0.036837	0.001424
HES4	0.28838	0.013985	0.885376	0.419497	0.023717
ISG15	0.746277	0.112931	1.634906	0.729634	0.485852
AGRN	0.044908	0.001752	0.162751	0.064732	0.002179
RNF223	0.000225	0.000142	0.003744	0.022773	0.001292
C1orf159	0.008118	0.000874	0.008737	0.023208	0.001796
TNFRSF18	0.010459	0.005404	0.018063	0.164901	0.00889

细胞注释模块：cell2location解卷积

时空组学 STOmics

用途：使用cell2location做解卷积细胞注释

运行方式： SDAS cellAnnotation cell2location -i st.h5ad -o outdir \

--reference_csv ./ref/inf_aver.csv --bin_size 20 --input_gene_symbol_key _index --gpu_id 3

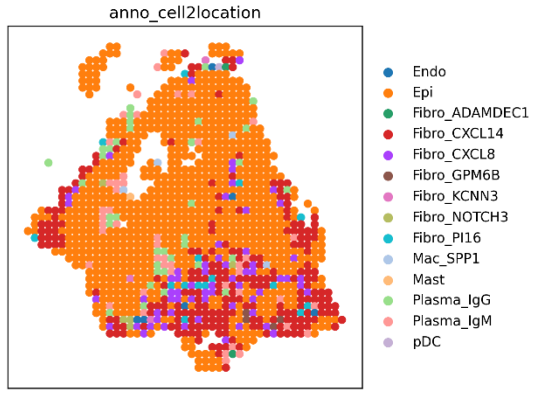
输入参数说明

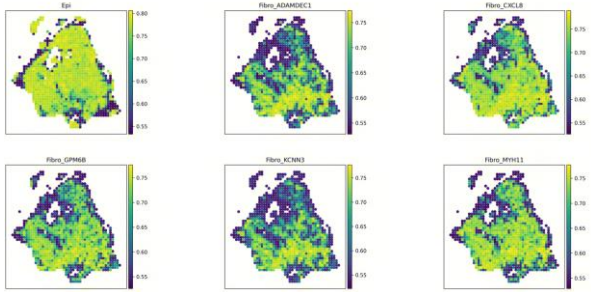
cell2location参数	是否必须	默认值	描述
-i / --input	是		Stereo-seq h5ad，要求原始矩阵。如果有layers['raw_counts']则用raw counts，否则用adata.X
-o / --output	是		输出文件夹
--reference_csv	是		单细胞ref csv文件
--bin_size	是		Bin大小，用于控制每个bin的细胞数和图中点的大小; 如20, 50, 100, cellbin
--input_gene_symbol_key	否	real_gene_name	Stereo-seq h5ad.var中表示基因名(symbol)的列的名称（_index 表示使用h5ad.var.index)
--slice_key	否	batch	多片h5ad.obs中表示片编号的列的名称，用于画图
--detection_alpha	否	20	规则化参数。空转数据的技术性变异越大，适合的detection_alpha越小，一般不调整
--batch_size	否	10000	模型训练batch大小，越大运行得越快，但所占显存也越大
--max_epochs	否	5000	模型训练epoch数
--gpu_id	否	-1	使用的GPU的编号，如果为-1，则使用CPU
--n_threads	否		CPU模式下使用的线程数，默认为全部CPU（不考虑超线程）

输出结果说明

cell2location结果文件	描述
<input_name>_anno_cell2location.csv	每个spot的注释结果，包括每种细胞类型的分数
<input_name>_anno_cell2location.h5ad	输入h5ad+注释结果。每个细胞类型的分数存在obsm['anno_score_cell2location']中，分数最高的类型存在obs['anno_cell2location']中
<input_name>_anno_cell2location.png	总体注释结果图，多片情况下每片画一张图
<input_name>_anno_score_cell2location.png	每个细胞类型的分数图，多片情况下每片画一张图

***输出结果展示：**





不同细胞类型分数和总体结果的表格

index	B_act	B_naive	CD4_CXCL	CD4_Tcm	CD4_Treg	CD4_act	CD8_Cyto
CRCP99_T_	0.537523	0.536948	0.533196	0.534602	0.534567	0.540949	0.530005
CRCP99_T_	0.534857	0.540527	0.552721	0.540647	0.54286	0.536034	0.537996
CRCP99_T_	0.53337	0.538663	0.535225	0.532017	0.534083	0.528293	0.538153
CRCP99_T_	0.538592	0.533116	0.533197	0.530321	0.526087	0.526096	0.534302
CRCP99_T_	0.531412	0.530635	0.530761	0.530957	0.533807	0.533881	0.523617
CRCP99_T_	0.538245	0.534404	0.549497	0.539566	0.539161	0.541039	0.530749
CRCP99_T_	0.536277	0.531047	0.542305	0.539332	0.535449	0.535668	0.533795
CRCP99_T_	0.531966	0.534707	0.530665	0.535111	0.531214	0.533513	0.537625
CRCP99_T_	0.538371	0.529251	0.536385	0.529158	0.53626	0.532688	0.528587
CRCP99_T_	0.534723	0.525861	0.537191	0.5304	0.531984	0.534209	0.527593
CRCP99_T_	0.533587	0.530908	0.540009	0.536223	0.5392	0.534765	0.529211
CRCP99_T_	0.538523	0.527799	0.53069	0.527776	0.534062	0.533603	0.529701
CRCP99_T	0.535306	0.535971	0.533804	0.528555	0.535749	0.53728	0.526181

细胞注释模块：spotlight解卷积

时空组学 STOmics

用途：使用SPOTlight做解卷积细胞注释

运行方式： SDAS cellAnnotation spotlight -i st.h5ad -o outdir --reference sc.h5ad --label_key annotation2 --filter_rare_cell 0 --input_gene_symbol_key _index

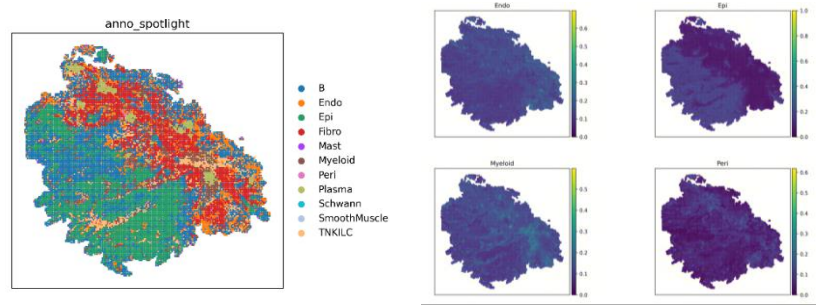
输入参数说明

spotlight参数	是否必须	默认值	描述
-i / --input	是		Stereo-seq h5ad，可以是原始矩阵或normalize后数据。如果有layers['raw_counts']则用raw counts，否则用adata.X
-o / --output	是		输出文件夹
--reference	是		单细胞ref h5ad
--label_key	是		单细胞ref h5ad.obs中表示细胞类型的列的名称
--bin_size	是		Bin大小，用于控制图中点的大小，不用于计算,比如20,50,100
--input_gene_symbol_key	否	real_gene_name	Stereo-seq h5ad.var中表示基因名(symbol)的列的名称
--ref_gene_symbol_key	否	_index	单细胞ref h5ad.var中表示基因名(symbol)的列的名称（_index 表示使用h5ad.var.index)
--batch_key	否		单细胞ref h5ad.obs中表示批次的列的名称，不输入则不考虑批次
--batch	否		如果指定，则只使用该批次的细胞做ref，否则使用所有细胞
--slice_key	否	batch	多片h5ad.obs中表示片编号的列的名称，用于画图
--filter_rare_cell	否	100	如果某些细胞类型在单细胞ref中细胞数小于此值，则过滤掉这些细胞类型
--n_cells	否	100	单细胞ref中每个细胞类型随机选取的细胞数，用于训练spotlight模型
--n_hvg	否	3000	单细胞ref中的高变基因个数，高变基因和marker基因共同作为基因集
--auc_threshold	否	0.5	用于过滤单细胞ref中每个细胞类型marker基因的AUC阈值，高变基因和marker基因共同作为基因集
--norm_sc	否	False	是否用logNormCounts函数处理单细胞ref数据
--norm_sp	否	False	是否用logNormCounts函数处理Stereo-seq数据

输出结果说明

spotlight结果文件	描述
<input_name>_anno_spotlight.csv	每个spot的注释结果，包括每种细胞类型的分数
<input_name>_anno_spotlight.h5ad	输入h5ad+注释结果。每个细胞类型的分数存在obsm['anno_score_spotlight']中，分数最高的类型存在obs['anno_spotlight']中
<input_name>_anno_spotlight.png	总体注释结果图，多片情况下每片画一张图
<input_name>_anno_score_spotlight.png	每个细胞类型的分数图，多片情况下每片画一张图

***输出结果展示：**



	B	Endo	Epi	Fibro	Mast	Myeloid	Peri	Plasma	Schwann	SmoothMu	TNKILC	annotation
8.58993E+12	0	0	0.01025	0	0	0	0.052508	0.937242	0	0	0	Plasma
8.58993E+12	0	0	0	0	0.045962	0	0	0	0	0	0.954038	TNKILC
8.58993E+12	0.179798	0	0	0.3483	0.099666	0.251518	0	0	0	0.120718	0	Fibro
8.58993E+12	0	0	0	0.174738	0	0.210587	0.340116	0	0	0	0.274559	Peri
8.58993E+12	0.981472	0	0	0	0	0	0	0.018528	0	0	0	B
8.58993E+12	0	0.632333	0.111709	0.255958	0	0	0	0	0	0	0	Endo
8.58993E+12	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	Epi
8.58993E+12	0.472084	0.165563	0	0	0.362353	0	0	0	0	0	0	B
8.58993E+12	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	Fibro
8.58993E+12	0.208053	0.131231	0.142165	0	0	0	0	0.518551	0	0	0	Plasma
9.01943E+12	0.471747	0.27728	0	0.09563	0	0.020249	0	0.135093	0	0	0	B
9.01943E+12	0.146929	0	0.183719	0.132369	0	0.179257	0.021408	0	0.092639	0	0.24368	TNKILC
9.01943E+12	0.274249	0.157071	0.127714	0.028633	0.038113	0.16677	0.022597	0.161067	0.023787	0	0	B
9.01943E+12	0.417643	0.169192	0.170355	0.012094	0	0.053112	0.095219	0.018558	0.063828	0	0	B
9.01943E+12	0.243905	0.011086	0.046158	0.011348	0.245423	0.112737	0.201529	0	0.023692	0.059106	0.045016	Mast
9.01943E+12	0.199443	0.068627	0.145071	0.041804	0	0.08515	0	0.011408	0.248971	0.199526	0	Schwann

细胞注释模块：RCTD解卷积

时空组学 STOmics

用途：使用RCTD做解卷积细胞注释

运行方式： SDAS cellAnnotation rctd -i st.h5ad -o outdir --reference sc.h5ad --label_key annotation2 --filter_rare_cell 0 --ref_gene_symbol_key real_gene_name

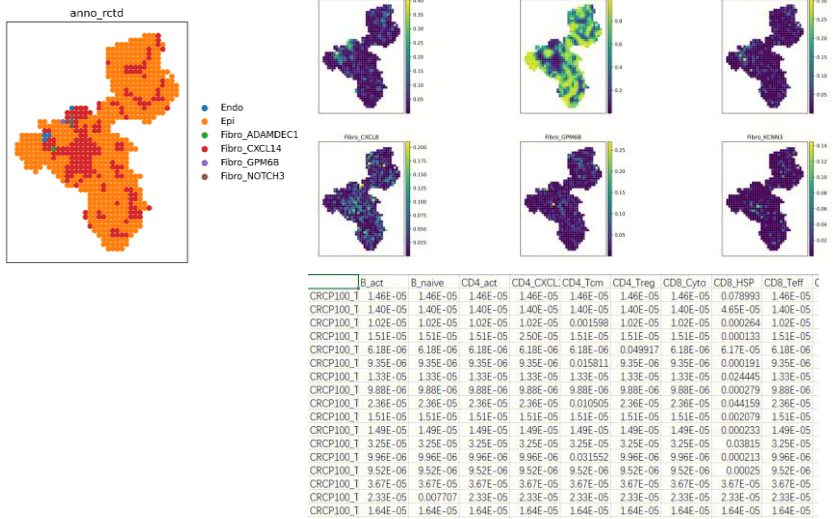
输入参数说明

rctd参数	是否必须	默认值	描述
-i / --input	是		Stereo-seq h5ad，要求原始矩阵。如果有layers['raw_counts']则用raw counts，否则用adata.X
-o / --output	是		输出文件夹
--reference	是		单细胞ref h5ad
--label_key	是		单细胞ref h5ad.obs中表示细胞类型的列的名称
--bin_size	是		Bin大小，用于控制图中点的大小，不用于计算,比如20,50,100
--input_gene_symbol_key	否	real_gene_name	Stereo-seq h5ad.var中表示基因名(symbol)的列的名称
--ref_gene_symbol_key	否	_index	单细胞ref h5ad.var中表示基因名(symbol)的列的名称（_index 表示使用h5ad.var.index)
--batch_key	否		单细胞ref h5ad.obs中表示批次的列的名称，不输入则不考虑批次
--batch	否		如果指定，则只使用该批次的细胞做ref，否则使用所有细胞
--slice_key	否	batch	多片h5ad.obs中表示片编号的列的名称，用于画图
--filter_rare_cell	否	100	如果某些细胞类型在单细胞ref中细胞数小于此值，则过滤掉这些细胞类型
--mode	否	full	RCTD模式。选项：doublet, multi, full
--max_cores	否	4	RCTD的max_cores参数，表示子任务数，每个子任务会使用多个线程

输出结果说明

rctd结果文件	描述
<input_name>_anno_rctd.csv	每个spot的注释结果，包括每种细胞类型的分数
<input_name>_anno_rctd.h5ad	输入h5ad+注释结果。每个细胞类型的分数存在obsm['anno_score_rctd']中，分数最高的类型存在obs['anno_rctd']中
<input_name>_anno_rctd.png	总体注释结果图，多片情况下每片画一张图
<input_name>_anno_score_rctd.png	每个细胞类型的分数图，多片情况下每片画一张图

***输出结果展示：**



空间结构域识别：GraphST

时空组学 STOmics

用途：使用graphST算法进行空间结构域识别

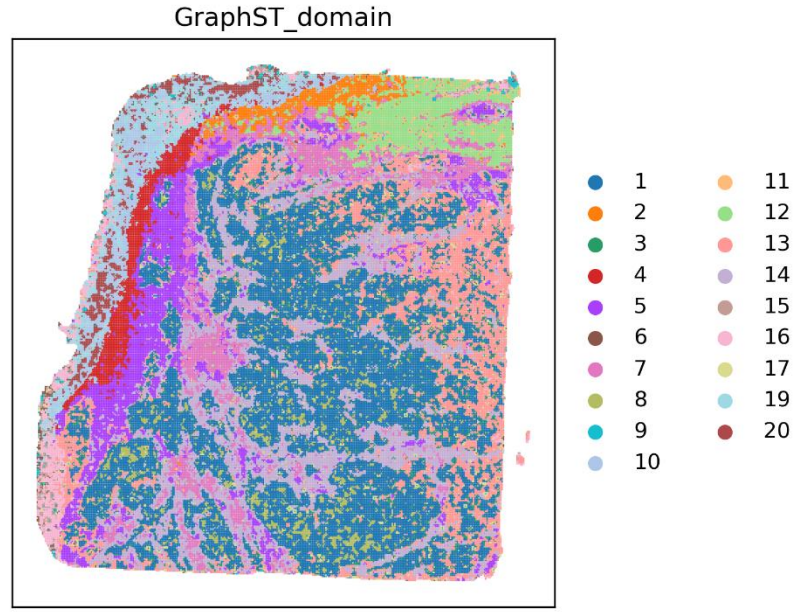
运行方式：

- **CPU模式：** SDAS spatialDomain graphst –i st.h5ad –o outdir --gpu_id -1 --tool ‘mclust’ --n_clusters 10 --n_hvg 3000
- **GPU模式：** SDAS spatialDomain graphst –i st.h5ad –o outdir --gpu_id 1 --tool ‘mclust’ --n_clusters 10 --n_hvg 3000

输入参数说明：

graphst参数	是否必须	默认值	描述
-i / --input	是		Stereo-seq h5ad，要求原始矩阵。如果有layers['raw_counts']则用raw counts，否则用adata.X
-o / --output	是		输出文件夹
--n_cluster	是		聚类数目
--tool	否	默认‘mclust’	Graphst所选的聚类方法，可选‘mclust’,’ leiden’,’ louvian’
--bin_size	否	默认20	Bin大小，用于控制图中点的大小，不用于计算,比如20,50,100
--gpu_id	否	-1	使用的GPU的编号，如果为-1，则使用CPU
--n_hvg	否	3000	当输入数据中有' highly_variable'字段时，会直接调用现有高变基因集，并选取--n_hvg参数设置的高变基因数量。反之，则GraphST会进行预处理并计算高变基因，并选取 --n_hvg参数设置的高变基因数量
--slice_key	否	None	多片h5ad.obs中表示片编号的列的名称，如果是多片，必须指定

***输出结果展示：**



输出结果说明

cell2location结果文件	描述
<input_name>_graphst.h5ad	输入h5ad+空间域聚类结果，聚类结果保存在obs[‘graphst_domain’]中
graphst_domain.png	空间域cluster类在组织上分布图

注：目前多片只支持坐标对齐后的多片，且坐标信息存在adata.obsm[‘spatial’]

CNV分析：infercnv

时空组学 STOmics

用途：使用infercnv做空间转录组CNV分析

运行方式： SDAS InferCNV -i st.rds --h5ad st.h5ad --bin_size 50 --slice_key batch -o outdir --label_key anno_cell2location --species human --ref_group_names B,T --min_counts_per_cell 200 --n_threads 16

输入参数说明

InferCNV参数	是否必须	默认值	描述
-i / --input	是		rds文件，要求有原始矩阵存在@assays$RNA@counts，否则报错
-o / --output	是		所有文件的输出目录
--h5ad	是		h5ad格式的sample.h5ad，用于画CNV score的空间热图
--label_key	是		rds对象中存在metadata中的注释信息，cluster信息或样本信息字段
--bin_size	是		Bin大小，用于控制图中点的大小，不用于计算,比如20,50,100
--ref_group_names	是		推断infercnv时当作reference的normal cell或normal sample的分组
--gene_order_file	否	None	指定用户自定义的所有基因的染色体位置信息的文本文件
--species	否	human	指定预先构建好的物种的*_pos.txt， ‘human’ 或者 ‘mouse’ ，默认 ‘human’ ，当指定- gene_order_file参数时，该参数不起作用
--slice_key	否	batch	多片h5ad.obs中表示片编号的列的名称，用于画图
--min_counts_per_cell	否	100	每个spots中包含的最小counts
--cutoff	否	0.1	每个参考细胞的基因的最小平均counts的阈值
--n_threads	否	4	Infercnv运行时的线程数

gene_order_file文件格式示例：
Gene_symbol chr start end

```
MIR1302-2HG     1       29554   31109
FAM138A 1       34554   36081
OR4F5   1       65419   71585
AL627309.1      1       89295   133723
AL627309.3      1       89551   91105
AL627309.2      1       139790  140339
AL627309.4      1       160446  161525
AL732372.1      1       358857  366052
OR4F29  1       450703  451697
AC114498.1      1       587629  594768
OR4F16  1       685679  686673
AL669831.2      1       760911  761989
AL669831.5      1       778770  810060
FAM87B  1       817371  819837
```

可由gtf_to_position_file.py生成，脚本链接如下：
https://github.com/broadinstitute/infercnv/blob/master/scripts/gtf_to_position_file.py

注：--species参数指定的human的gene_order_file来源于GRCh38.p12- NCBI:GCA_000001405.27。
mouse的gene_order_file来源于GRCm38.p6-NCBI:GCA_000001635.8

CNV分析：infercnv

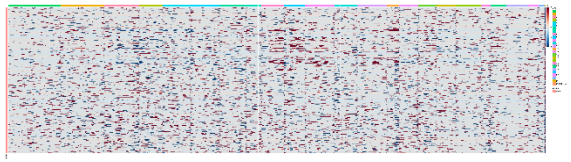
时空组学 STOmics

输出结果说明

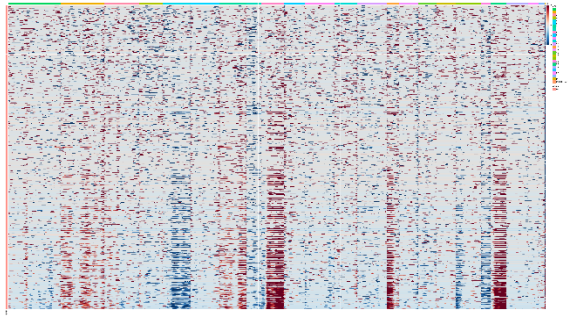
InferCNV结果文件	描述
<input_name>_run.final.infercnv_obj.rds	包含所有基因和spot的cnv矩阵的rds对象
<input_name>_CNV_score.csv	包含每个spot的cnv score
<input_name>_CNV_ref.png	参考细胞的cnv的表达热图
<input_name>_CNV_obs.png	用于观测的细胞的cnv的表达热图
<input_name>_CNV_score.png	cnv score的空间热图，多片情况下每片画一张图

***输出结果展示：**

CNV_ref.png



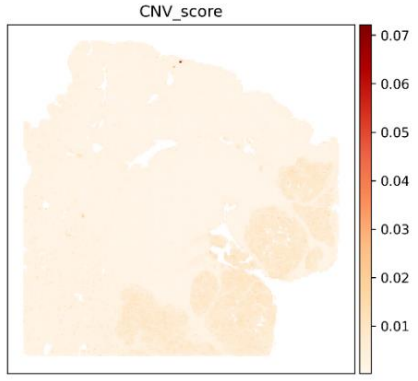
CNV_obs.png



CNV_score.csv

CNV_score	
429496737600_D03663C6	0.0018216
429496737700_D03663C6	0.0018385
429496738900_D03663C6	0.0009589
858993460800_D03663C6	0.0015203
858993460900_D03663C6	0.0031701
858993461000_D03663C6	0.0015783
858993461100_D03663C6	0.002563
858993461200_D03663C6	0.00436
858993461300_D03663C6	0.0094898
858993461400_D03663C6	0.0036031
858993461500_D03663C6	0.0034979
858993461600_D03663C6	0.00312
858993461700_D03663C6	0.0039391
858993461800_D03663C6	0.002287
858993461900_D03663C6	0.0019334
858993462000_D03663C6	0.0031127
858993462100_D03663C6	0.0025705
858993462200_D03663C6	0.0016642

CNV_score.png



空间基因共表达：NeST和Hotspot算法

时空组学 STOmics

用途：通过识别在空间上具有相似表达模式的基因模块，了解基因间相互作用脉络（高度协同变化的基因集），从而挖掘基因功能以及寻找核心基因的一类分析方法

运行方式：

- NeST: SDAS coexpress nest -i st.h5ad –o outdir --bin_size 100
- Hotspot：SDAS coexpress hotspot -i st.h5ad –o outdir --bin_size 100

输入参数说明：

coexpress参数	是否必须	默认值	描述
-i / --input	是		Stereo-seq h5ad，要求原始矩阵，存在layers[‘raw_counts’]，否则报错
-o / --output	是		输出文件夹
--bin_size	是	50	分辨率Bin大小（从20，50，100，200，cellbin中选择，与输入的h5ad一致）画图与计算均需要
--selected_genes	否	top5000	基因列表（topn 高变基因, full 全部基因, selected 自定义基因）
--moran_path	否	None	已经计算好的基因莫兰指数列表路径(包含了squidpy分析的Moran ‘s I 指数分析的结果，前2列为必需列：与h5ad一致的基因名称，和moranI)
--selected_genes_file	否	None	自定义的基因列表（gene symbol）路径(第一例与h5ad一致的基因名称)
--n_cpus	否	8	多线程的线程数
--fdr_cutoff	否（Hotspot）	0.05	统计检验空间高变基因与共表达基因集的FDR矫正阈值
--hotspot_min_size	否（NeST）	30	空间高变单基因的最少spot/细胞阈值
--min_cells	否（NeST）	30/100	共表达基因集的最少spot/细胞阈值

moran_path**示例**:

./moran.csv

```
$head ../paper44/topn/paper44.nest.moran.csv
,moranI,pval_norm,var_norm,pval_norm_fdr_bh
FABP5,0.8278901557899281,0.0,0.00010309821393974599,0.0
STX3,0.8216927634772123,0.0,0.00010309821393974599,0.0
HSPB1,0.8003361892240466,0.0,0.00010309821393974599,0.0
S100A9,0.7935840369344128,0.0,0.00010309821393974599,0.0
RPS27,0.7777698472439979,0.0,0.00010309821393974599,0.0
```

selected_genes_file **示例**:

./genelist

```
$head MP.genelist
A2ML1
ANXA1
ASF1B
ASPM
ATAD2
ATF3
```

***调参建议：**NeST算法：若样本Bin20/50基因数低于200，或特殊样本

- 识别的空间高变基因较少，建议降低hotspot_min_size到10
- 识别的空间共表达基因集较少，建议降低min_cells到10
- 空间共表达基因集识别pattern过于精细，NumPy Unable to allocate X GiB array，建议升高hotspot_min_size

空间基因共表达：NeST和Hotspot算法

时空组学 STOmics

输出结果说明：

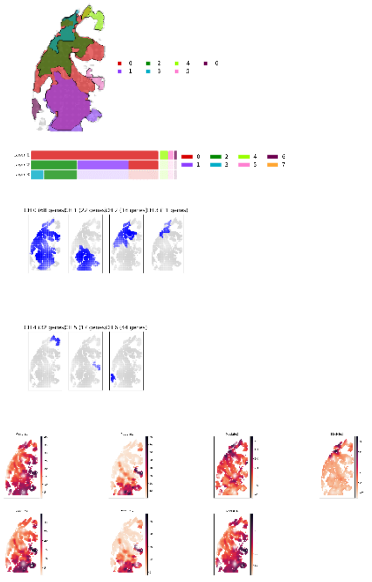
结果文件	描述
module.csv	空间高变基因（gene symbol+gene id）对应的共表达基因集（module）
h5ad	含有共表达基因集结果的h5ad文件（adata.obsm[‘module_scores’] ）
png	共表达基因集之间的关系图 共表达基因集单独modle score热图
moran.csv	如果使用topn计算，输出全部基因的莫兰指数以及P值

输出结果解读：

- NeST算法：共表达基因集从Module0开始，没有Module为不符合共表达基因集聚类要求的基因
- Hotspot算法：共表达基因集从Module1开始， Module-1/没有Module为不符合共表达基因集聚类要求的基因

***输出结果展示：**

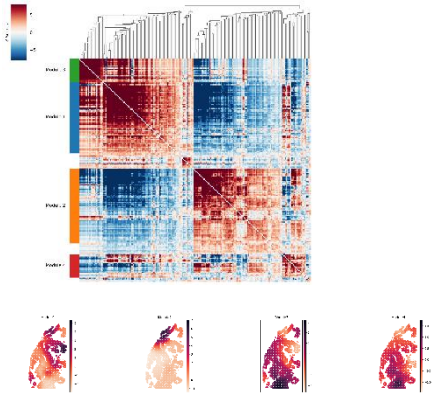
NeST



```
$head ../paper44/topn/paper44.nest.module.csv
Module,geneid,real_gene_name
Module0,EPAS1,EPAS1
Module0,CHCHD3,CHCHD3
Module0,MDGA2,MDGA2
```

```
$head ../paper44/topn/paper44.nest.moran.csv
,moranI,pval_norm,var_norm,pval_norm_fdr_bh
FABP5,0.8278901557899281,0.0,0.0,0.00010309821393974599,0.0
STX3,0.8216927634772123,0.0,0.0,0.00010309821393974599,0.0
HSPB1,0.8003361892240465,0.0,0.0,0.00010309821393974599,0.0
S100A9,0.7935840369344128,0.0,0.0,0.00010309821393974599,0.0
RPS27,0.7777698472439979,0.0,0.0,0.00010309821393974599,0.0
```

Hotspot



```
$head ../paper44/topn/paper44.hotspot.module.csv
index,geneid,real_gene_name,FDR,Module
4925,ZYG11B,ZYG11B,0.0,Module1
937,CD52,CD52,0.0,Module3
3717,RPL32,RPL32,0.0,Module1
```

差异基因分析

时空组学 STOmics

用途：进行基因差异表达分析

运行方式：SDAS DEG -i st.h5ad --diff_plan diff_plan.csv –o outdir

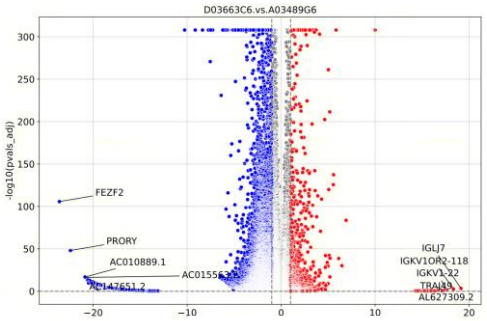
输入参数说明

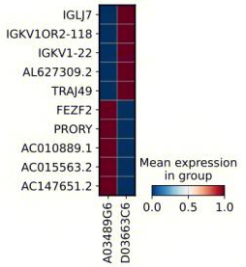
DEG参数	是否必须	默认值	描述
-i / --input	是		Stereo-seq h5ad，要求原始矩阵。如果有layers['raw_counts']则用raw counts，否则用adata.X
--diff_plan	是		差异分析方案，csv格式，每个方案一行，至少包含4列信息：obs对象,处理组,对照组,差异方法
--padj_threshold	否	0.01	padj值的阈值，用于筛选显著差异基因
--logfc_threshold	否	1	log2FC的绝对值阈值，用于筛选显著差异基因
--top_gene	否	10	指定用于画图的基因数，只对all vs rest方案有效
--genelist	否	5	在图中标出感兴趣的基因，多个基因时用逗号“,”分割，默认上下调最显著的5个基因，对all vs rest的方案无效
--add_label	否		对h5ad的obs对像增加感兴趣的标签，再基于增加的标签信息进行差异分析
--min_gene	否	0	某个细胞或spot允许的最少基因数
--max_gene	否	20000	某个细胞或spot允许的最多基因数
--min_cell	否	0	某个基因存在的最少细胞或spot数
-o / --output	否	当前文件夹	分析结果存放文件夹

输出结果说明

DEG结果文件	描述
{处理组}.vs.{对照组}.deg.csv	处理组/对照组所有差异基因
{处理组}.vs.{对照组}.deg_filtered.csv	处理组/对照组显著差异基因
matrixplot_{处理组}.vs.{对照组}.pdf	显著差异基因表达量热图
volcano_plot. {处理组}.vs.{对照组}.pdf	差异基因火山图（all vs rest方案不做火山图）

***输出结果展示：**





gene_ids	scores	logfoldch	pvals	pvals_adj	real_gene	treat_group
MTRNR2L	237.6234	5.849801	0	0	MTRNR2L	D03663C6
XIST	230.4059	10.01164	0	0	XIST	D03663C6
JCHAIN	115.5075	2.657836	0	0	JCHAIN	D03663C6
IGHA1	101.331	3.162789	0	0	IGHA1	D03663C6
EEF1A1	98.69592	2.471968	0	0	EEF1A1	D03663C6
MT-CO1	90.51968	1.116584	0	0	MT-CO1	D03663C6
IGKC	87.89241	2.113462	0	0	IGKC	D03663C6
MT-ND5	84.20027	1.048821	0	0	MT-ND5	D03663C6
PARP8	82.23981	1.817068	0	0	PARP8	D03663C6
B4GALNT:	82.01656	1.519611	0	0	B4GALNT:	D03663C6
FP671120.	80.31432	1.592818	0	0	FP671120.	D03663C6
RPL7	77.76428	3.313637	0	0	RPL7	D03663C6
AAMDC	74.7632	1.250964	0	0	AAMDC	D03663C6
WDR74	70.67052	2.254388	0	0	WDR74	D03663C6
MUC12	68.16598	1.189166	0	0	MUC12	D03663C6
IGHA2	65.82799	1.911193	0	0	IGHA2	D03663C6

差异分析模块

时空组学 STOmics

流程说明：

1. 只支持h5ad格式的文件输入，如果有layers['raw_counts']则用raw counts，否则用adata.X
2. 基因名称使用h5ad文件var的real_gene_name，否则用var的index
3. 做差异前，会对基因名称进行make_unique操作，但分析结果中会输出make_unique前后的基因名称
4. 作图都使用make_unique后的基因名称
5. 流程允许对细胞和gene进行过滤，如果输入的h5ad文件已经经过过滤，可以不用再设置相关过滤参数
6. 流程目前只支持sc.tl.rank_genes_groups函数进行差异分析，差异方法只支持't-test', 't-test_overestim_var', 'wilcoxon', 'logreg'
7. 差异分析方案以csv格式的文件提供，方案中需要指定obs的一个具体对象以及该对象下的2个元素做为处理组和对照组，第3列信息用于指定差异分析方法
8. 如果想先按obs的其他对象先做筛选在做差异，可以在差异方案的5、6列分布指定obs对象及该对象下进行细胞/bins筛选

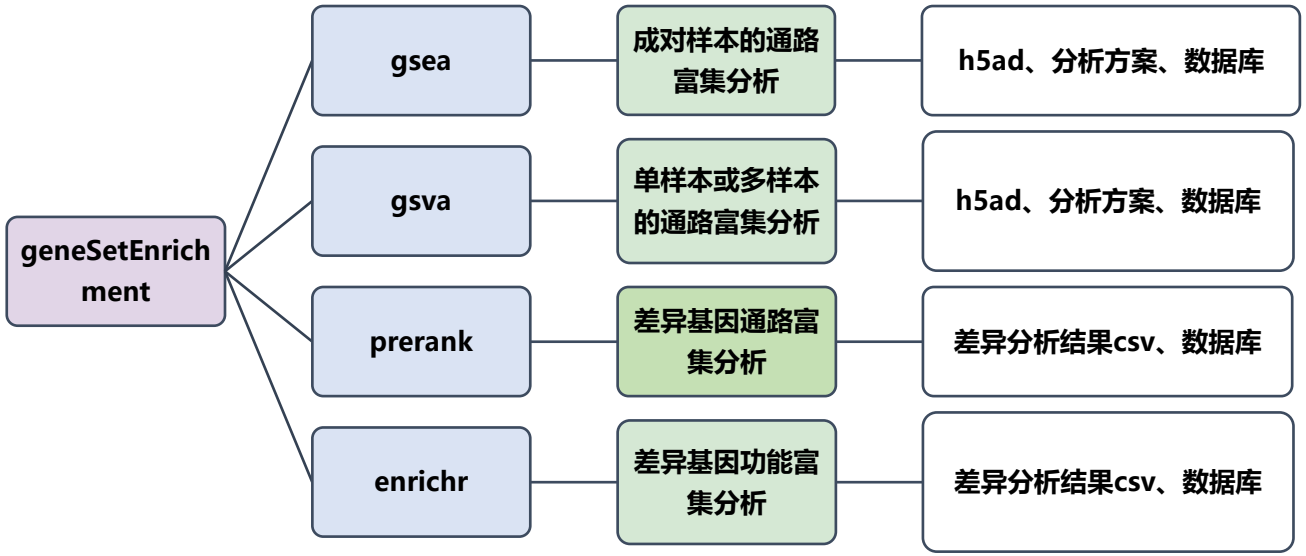
diff_plan的csv文件示例：

#object,treatment,control,method,1stObject,1stClass	
leiden_cluster,all,rest,t-test	单片差异基因示例
tumor_subregion,warm-up,cold,t-test	单片差异基因示例
Sample,S1,S2,t-test,bayes_cluster,1	多片差异基因示例

diff-plan.csv文件说明：
1、跳过'#'开头的行；
2、对h5ad文件obs中'leiden_cluster'列的每个cluster进行 all vs rest的差异基因分析；
3、对h5ad文件obs中'tumor_subregion'列指定的warm-up组和cold组进行差异基因分析；

基因集富集分析：整体介绍

时空组学 STOmics




```
$./SDAS geneSetEnrichment -h
usage: Gene_enrichment.pyc [-h] [--version] {gsea,prerank,gsva,enrichr} ...

Gene_enrichment.pyc -- Gene Set Enrichment Analysis in Python

positional arguments:
  {gsea,prerank,gsva,enrichr}
    gsea                Main GSEApy Function: run GSEApy instead of GSEA on spatial h5ad file.
    prerank             Run GSEApy Prerank tool on deg genes.
    gsva                Run GSVA on gene expression.
    enrichr             Run Enrichr on deg genes.

options:
  -h, --help            show this help message and exit
  --version             show program's version number and exit

For command line options of each command, type: COMMAND -h
```

流程说明：

1. 关于输入文件：
   - gsea和gsva 直接基于h5ad文件的原始表达量对样本进行通路富集分析，如果有layers[‘raw_counts’]则用raw counts，否则用adata.X，基因信息使用make_unique后的real_gene_name
   - prerank要求输入文件有real_gene_name和logfoldchange两列，分析结果与gsea类似，建议输入所有差异基因的结果列表
   - enrichr要求输入文件中有real_gene_name这一列，建议输入显著差异基因列表
2. 关于数据库：
   - 4个富集分析功能都支持gmt格式的数据库文件，且数据库中的gene name都为大写，SDAS中有预先构建好的人和小鼠数据库
   - 输入自定义的gmt数据库时，gene信息必须为大写，因为流程会将gene信息都改为大写再与数据库进行匹配
   - 软件预下载了human和mouse的Msigdb数据库，如果想选择性使用某个gmt，可以在SDAS软件路径sdas_deg_enrichment/lib/GSEADB下根据需求使用--gmt进行指定

基因集富集分析：gsea

时空组学 STOmics

用途：使用GSEAPY中的gsea模块进行基因通路富集分析

运行方式： SDAS geneSetEnrichment gsea -i st.h5ad --gsea_plan gsea_plan.csv --gmt h.all.v2024.1.Hs.symbols.gmt \
-o outdir --permutation_type gene_set

输入参数说明

gsea参数	是否必须	默认值	描述
-i / --input	是		Stereo-seq h5ad，要求原始矩阵。如果有layers['raw_counts']则用raw counts，否则用adata.X
--gsea_plan	是		csv格式的分析方案，每个方案一行，至少包含3列信息：obs对象,处理组,对照组
-o / --output	是		结果存放文件夹路径
--species	否	human	指定预先构建好的物种的数据库，‘human’ 或者 ‘mouse’，默认 ‘human’，当指定—gmt参数时，该参数不起作用。
--gmt	否		gmt格式的数据库文件其中gene_name信息必须转为大写，多个文件时用 ‘，’ 隔开，不提供时使用--species参数指定的物种数据库。
--graph	否	5	通路数量，用得分最高的top通路进行画图，默认’ 5 ‘。用了—pathways参数时，该参数不起作用
--pathways	否		通过txt文件指定1到多个感兴趣的通路进行画图，这些通路必须在gmt数据库中，不指定时使用--graph参数。
--permutation_type	否	‘phenotype’	小于1000个样本时用 ‘gene_set’，大于1000个样本时用 ‘phenotype’。默认 ‘phenotype’。

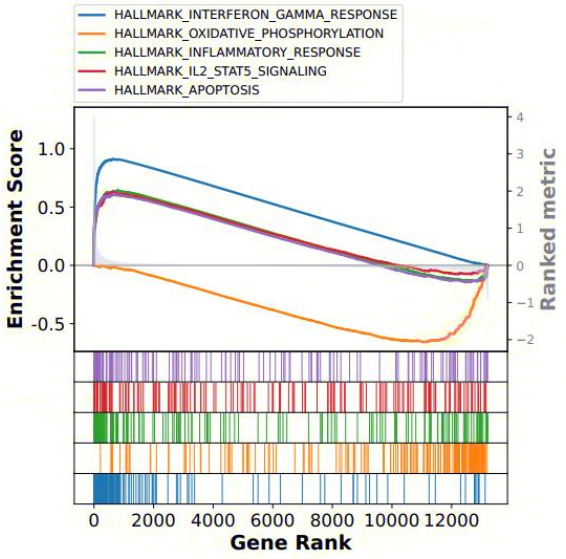
gsea_plan.csv示例：

#obs1,Treat_group,Control_group,obs2,obs2_info
stim,STIM,CTRL,seurat_annotations,CD14 Mono
stim,STIM,CTRL

输出结果说明

gsea结果文件	描述
GSEA.{database}.csv	csv格式的结果文件
GSEA.{database}.top5.pdf	pdf格式的图像文件

***输出结果展示：**



Name	Term	ES	NES	NOM p-v	FDR q-val	FWER p-v	Tag %	Gene %	Lead_genes
gsea	HALLMAR	0.474612	1.927943	0	0.007018	0.005	13/112	0.26%	KDM6A,ABCA8;N
gsea	HALLMAR	-0.53503	-1.59325	0.001034	0.038538	0.039	39/95	20.30%	ESRRG,SIPA1L3,B
gsea	HALLMAR	-0.51772	-1.57617	0	0.024704	0.049	90/149	29.73%	CLCA1,GRHL2;SC
gsea	HALLMAR	-0.50302	-1.55096	0	0.023057	0.068	117/198	34.12%	ESRRG,EEFSEC;F/
gsea	HALLMAR	-0.54526	-1.54026	0.005411	0.020257	0.077	40/57	33.45%	DOCK3,MGAM,L
gsea	HALLMAR	-0.49364	-1.5347	0	0.017787	0.084	118/195	32.99%	ATL1,KCNJ2;EEFS
gsea	HALLMAR	-0.54031	-1.5103	0.001076	0.022728	0.125	26/54	23.02%	MAGEB10,CPQ;N
gsea	HALLMAR	-0.48985	-1.47009	0.002039	0.032751	0.203	67/132	33.41%	FSIP2,GNG4;KL;C
gsea	HALLMAR	-0.48684	-1.46451	0.008239	0.031374	0.222	58/105	33.51%	AC092574.2;NRX
gsea	HALLMAR	-0.46261	-1.44876	0.001009	0.034586	0.268	91/196	24.90%	ADARB2;SCRN1;I
gsea	HALLMAR	-0.52968	-1.43143	0.034103	0.040218	0.333	24/36	34.68%	HOXA-AS2;AC13
gsea	HALLMAR	-0.54283	-1.43018	0.028857	0.03746	0.342	21/36	30.39%	LINC02008;AC13
gsea	HALLMAR	-0.45299	-1.40857	0	0.045373	0.434	94/196	30.88%	FKBP5,RORA-AS
gsea	HALLMAR	-0.44853	-1.39478	0.002024	0.048876	0.472	84/196	24.81%	SIPA1L3,LYPD8;LI
gsea	HALLMAR	-0.44765	-1.38325	0.004053	0.051737	0.524	87/198	33.85%	MT-ND6;AC0967
gsea	HALLMAR	-0.44058	-1.35885	0.004053	0.064889	0.624	101/200	32.89%	AUH,CRAMP1;RE
gsea	HALLMAR	0.345435	1.340552	0.081081	0.067368	0.089	8/104	0.23%	A2M;SPON1;MT-
gsea	HALLMAR	-0.42601	-1.30508	0.036923	0.116603	0.838	75/142	34.72%	HNF4A;NTRK3;M
gsea	HALLMAR	-0.41688	-1.30094	0.013211	0.114452	0.847	96/198	33.38%	CPQ;AC079385.1
gsea	HALLMAR	-0.43563	-1.30005	0.061602	0.109137	0.851	72/96	47.38%	Z98884.1;SLCO3/
gsea	HALLMAR	-0.41836	-1.2969	0.022335	0.107346	0.864	86/197	30.90%	CAMTA1;AREG;C
gsea	HALLMAR	-0.4173	-1.29012	0.025304	0.110279	0.882	98/195	33.86%	NTRK3,FAM135B

基因集富集分析：gsva

时空组学 STOmics

用途：使用GSEAPY中的gsva模块进行基因通路富集分析

运行方式： SDAS geneSetEnrichment gsva –i st.h5ad --gsva_plan gsva_plan.csv –gmt h.all.v2024.1.Hs.symbols.gmt -o outdir --kernel_cdf Poisson

输入参数说明

gsva参数	是否必须	默认值	描述
-i / --input	是		Stereo-seq h5ad，要求原始矩阵。如果有layers['raw_counts']则用raw counts，否则用adata.X
--gsva_plan	是		csv格式的分析方案，至少包含2列信息，多个样本用“;”隔开：obs对象,样本1;样本2;样本3
-o / --output	是		结果存放文件夹路径
--species	否	human	指定预先构建好的物种的数据库，‘human’ 或者 ‘mouse’，默认 ‘human’，当指定—gmt参数时，该参数不起作用。
--gmt	否		gmt格式的数据库文件其中gene_name信息必须转为大写，多个文件时用 ‘,’ 隔开，不提供时使用--species参数指定的物种数据库。
--kernel_cdf	否	Gaussian	输入的h5ad有原始表达量时选 ‘Poisson’，其他选 ‘Gaussian’

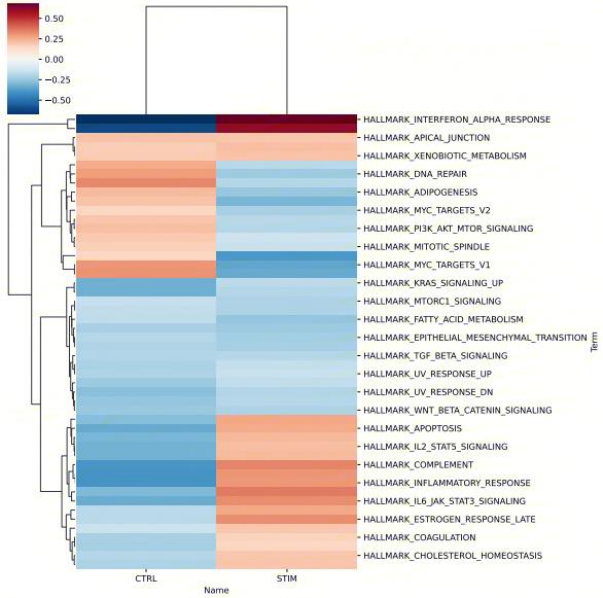
gsva_plan.csv示例：

#obs1,obs1_infos,obs2,obs2_info
stim,STIM;CTRL,seurat_annotations,CD14 Mono
stim,STIM

输出结果说明

gsva结果文件	描述
GSVA.{database}.csv	csv格式的结果文件
GSVA.{database}.pdf	pdf格式的图像文件

***输出结果展示：**



Term	A03489G6	D03663C6
HALLMARK_ADIPOGENESIS	-0.585921595	-0.58010288
HALLMARK_ALLOGRAFT_REJECTION	-0.456441325	-0.44022777
HALLMARK_ANDROGEN_RESPONSE	-0.639092435	-0.671114335
HALLMARK_ANGIOGENESIS	-0.499586231	-0.539279722
HALLMARK_APICAL_JUNCTION	-0.526470667	-0.546878344
HALLMARK_APICAL_SURFACE	-0.477814236	-0.504528357
HALLMARK_APOPTOSIS	-0.565404478	-0.573781697
HALLMARK_BILE_ACID_METABOLISM	-0.466687203	-0.478519795
HALLMARK_CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS	-0.59573537	-0.590166228
HALLMARK_COAGULATION	-0.391725864	-0.384757076
HALLMARK_COMPLEMENT	-0.51070563	-0.526563746
HALLMARK_DNA_REPAIR	-0.565980565	-0.561181619
HALLMARK_E2F_TARGETS	-0.596284547	-0.600694738
HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRA	-0.556293578	-0.555338388
HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_EARLY	-0.558211932	-0.582859387
HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_LATE	-0.521162417	-0.546434554
HALLMARK_FATTY_ACID_METABOLISM	-0.551373342	-0.564614081
HALLMARK_G2M_CHECKPOINT	-0.593441974	-0.615553283
HALLMARK_GLYCOLYSIS	-0.544694403	-0.557160524
HALLMARK_HEDGEHOG_SIGNALING	-0.555757612	-0.606071982
HALLMARK_HEME_METABOLISM	-0.531717139	-0.527456344
HALLMARK_HYPOXIA	-0.550757298	-0.55392465
HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING	-0.574251487	-0.579891378
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	-0.521303183	-0.496991027

基因集富集分析：enrichr

时空组学 STOmics

用途：使用GSEAPY中的enrichr模块进行基因通路富集分析

运行方式： SDAS geneSetEnrichment enrichr -i A.vs.B.deg_filtered.csv --gmt h.all.v2024.1.Hs.symbols.gmt -o outdir

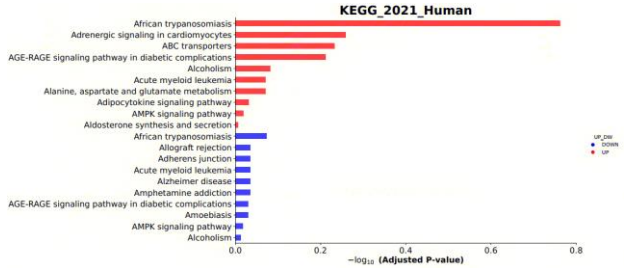
输入参数说明

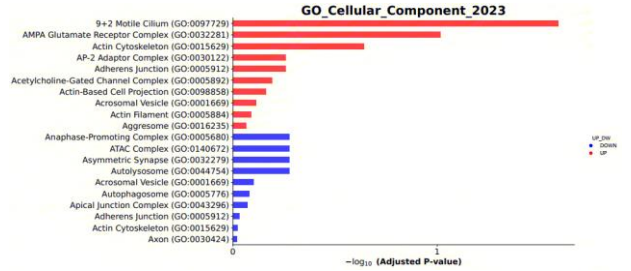
enrichr参数	是否必须	默认值	描述
-i / --input	是		SDAS软件输出的显著差异分析结果文件，格式为csv。(注意all vs rest方案的差异基因会作为一个列表进行富集，建议用户自行处理，如分别提取每个cluster的列表)
-o / --output	是		结果存放文件夹路径
--species	否		指定预先构建好的物种的数据库，‘human’ 或者 ‘mouse’，默认 ‘human’，当指定—gmt参数时，该参数不起作用。
--gmt	否		gmt格式的数据库文件其中gene_name信息必须转为大写，多个文件时用 ‘，’ 隔开，不提供时使用—species参数指定的物种数据库。
--cut_off	否	1	富集结果作图时过滤的pvalue阈值，默认值为1，设太小的阈值时可能会由于没有显著富集结果导致无法作图。
--background	否		设定富集分析时使用的background，默认为所用数据库的gene数。
--top_term	否	10	指定最富集的top通路进行作图，默认为10.

输出结果说明

enrichr结果文件	描述
enrichment_{database}.UP.csv	上调基因的富集分析结果
enrichment_{database}.DOWN.csv	下调基因的富集分析结果
enrichment_{database}.pdf	上调和下调基因显著富集通路图

***输出结果展示：**





Gene_set	Term	Overlap	P-value	Adjusted P	Odds Ratio	Combined	Genes
KEGG_202	ABC trans	3/45	0.118343	0.585341	3.016586	6.437902	ABCA3;ABCC9;ABCC8
KEGG_202	AGE-RAG	5/100	0.129335	0.613144	2.115097	4.326118	SELE;IL6;COL4A4;IL1B
KEGG_202	AMPK sig	3/120	0.627185	0.957882	1.080642	0.504134	PPARGC1A;PPP2R2C;
KEGG_202	Acute my	3/67	0.266066	0.848717	1.982082	2.624298	SPI1;BCL2A1;FLT3
KEGG_202	Adipocyto	2/69	0.554799	0.93119	1.346024	0.793009	PPARGC1A;ACSBG1
KEGG_202	Adrenergi	7/150	0.107005	0.55031	1.925815	4.30397	CREB3L3;PIK3R5;CAC
KEGG_202	African try	4/37	0.016463	0.172861	4.949289	20.32497	IL1B;IL6;SELE;IDO1
KEGG_202	Alanine, a	2/37	0.260216	0.848717	2.569848	3.459642	GAD1;CPS1
KEGG_202	Alcoholism	7/186	0.230093	0.828335	1.532399	2.251509	CREB3L3;GRIN3A;SHC
KEGG_202	Aldosteroi	2/98	0.742585	0.984483	0.938017	0.279171	CREB3L3;CACNA1I
KEGG_202	Allograft r	1/38	0.643822	0.971515	1.452529	0.639597	HLA-DRA
KEGG_202	Alzheimer	8/369	0.777429	0.985024	0.845966	0.212983	SNCA;MAPT;WNT11;I
KEGG_202	Amoebias	6/102	0.055257	0.386801	2.485188	7.196497	GNA14;LAMA2;IL6;CC
KEGG_202	Amphetar	5/69	0.036844	0.299503	3.144153	10.37908	CREB3L3;GRIN3A;GRI
KEGG_202	Amyotrop	11/364	0.38226	0.93119	1.188797	1.14321	HAP1;NUP210L;NRG3
KEGG_202	Antigen p	2/78	0.621844	0.957882	1.186297	0.563569	KLRD1;HLA-DRA
KEGG_202	Apelin sig	5/137	0.304193	0.881111	1.517204	1.805614	PIK3R5;PPARGC1A;RY
KEGG_202	Apoptosis	1/142	0.979414	0.997924	0.37983	0.007901	BCL2A1
KEGG_202	Arachidon	1/61	0.809777	0.989582	0.897682	0.189408	PLA2G4A
KEGG_202	Arginine a	1/50	0.743172	0.984483	1.098713	0.326129	DAO
KEGG_202	Arginine b	1月22日	0.449572	0.93119	2.538661	2.029555	CPS1
KEGG_202	Arrhythm	4/77	0.150403	0.631693	2.244274	4.251633	CACNB4;ACTN2;CAC

基因集富集分析：prerank

时空组学 STOmics

用途：使用GSEAPY中的prerank模块进行基因通路富集分析

运行方式： SDAS geneSetEnrichment prerank -i A.vs.B.deg.csv --gmt h.all.v2024.1.Hs.symbols.gmt -o outdir

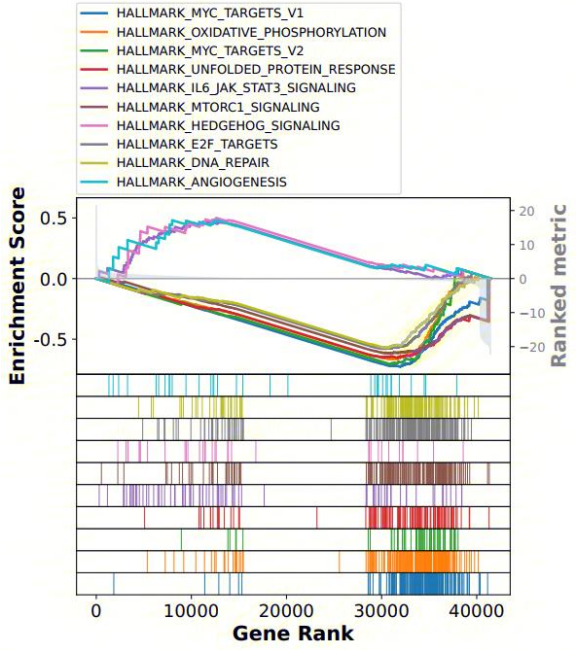
输入参数说明

prerank参数	是否必须	默认值	描述
-i / --input	是		SDAS软件输出的所有差异分析结果文件，格式为csv。(注意all vs rest方案的差异基因会作为一个列表进行富集，建议用户自行处理，如分别提取每个cluster的列表)
-o / --output	是		结果存放文件夹路径
--species	否		指定预先构建好的物种的数据库，‘human’ 或者 ‘mouse’，默认 ‘human’，当指定—gmt参数时，该参数不起作用。
--gmt	否		Gmt格式的数据库文件其中gene_name信息必须转为大写，多个文件时用 ‘，’ 隔开，不提供时使用—species参数指定的物种数据库。
--graph	否	5	通路数量，用得分最高的top通路进行画图，默认’ 5 ‘。用了--pathways参数时，该参数不起作用。
--pathways	否		通过txt文件指定1到多个感兴趣的通路进行画图，这些通路必须在gmt数据库中，不指定时使用--graph参数。

输出结果说明

prerank结果文件	描述
prerank_{database}.csv	csv格式的结果文件
prerank_{database}.top10.pdf	pdf格式的图像文件

***输出结果展示：**



Name	Term	ES	NES	NOM p-v	FDR q-val	FWER p-v	Tag %	Gene %	Lead_genes
prerank	Phospholi	0.485233	1.434222	0.018868	1	0.815	79/147	31.17%	GRM6,DGKK,CX
prerank	Ribosome	-0.74349	-1.418	0.007519	1	0.695	120/136	21.70%	RNASS9,RPS18,I
prerank	Cholinergi	0.503666	1.383584	0.014706	1	0.911	56/112	27.47%	KCNQ2,CAMK2
prerank	Olfactory	0.459646	1.379304	0.052632	1	0.918	42/267	16.05%	OR4D1,OR10R2
prerank	Serotoner	0.5158	1.348361	0.013699	1	0.956	50/112	25.41%	HTR4,CYP4X1,H
prerank	Circadian	0.520843	1.336239	0.085106	1	0.971	51/95	27.47%	MTNR1B,GRIA4,
prerank	Proteason	-0.7542	-1.29054	0.072306	1	1	32/45	19.82%	PSMC4,PSME2,I
prerank	Spliceosor	-0.65647	-1.27222	0.079484	1	1	105/143	25.73%	RNVU1-1,PCBP
prerank	Fatty acid	-0.77883	-1.26461	0.109635	1	1	2月27日	1.81%	ACOT1,THEM5
prerank	alpha-Lin	-0.80802	-1.26308	0.096429	1	1	3月25日	1.41%	PLA2G3,PLA2G1
prerank	Arrhythm	0.49947	1.244309	0.144	1	0.999	34/77	26.10%	ACTN3,CACNG
prerank	ECM-rece	0.480068	1.228121	0.134615	1	1	27/87	23.76%	IBSP,TNXB,COL
prerank	Salivary se	-0.65891	-1.22775	0.141563	1	1	9/87	5.54%	CST2,ADRB1,AD
prerank	Linoleic ac	-0.76817	-1.22733	0.147011	1	1	3月29日	1.41%	PLA2G3,PLA2G1
prerank	Starch an	-0.76264	-1.22526	0.146084	1	1	2/32	1.38%	GYS2,MGAM2
prerank	Carbohydi	-0.73774	-1.22324	0.136691	1	1	4/42	3.27%	SLC37A4,MGAM
prerank	Allograft r	-0.74605	-1.22308	0.143079	1	1	5/33	4.99%	IL12A,HLA-DOA
prerank	Antigen p	-0.66785	-1.21757	0.186667	1	1	13/65	9.29%	PSME2,HLA-DC
prerank	Maturity o	-0.77366	-1.21424	0.155979	1	1	2月26日	2.14%	MAFA,NEUROG
prerank	Arachidon	-0.68932	-1.20979	0.165432	1	1	3/59	1.41%	PLA2G3,PLA2G1
prerank	Ether lipid	-0.70125	-1.20473	0.177181	1	1	3/47	1.41%	PLA2G3,PLA2G1
prerank	One carbo	-0.77263	-1.19894	0.23475	1	1	1月20日	0.99%	FTCD
prerank	Nucleotid	-0.69018	-1.18247	0.218878	1	1	26/46	22.64%	GTF2H4,RPA4,R
prerank	Fat digest	-0.69203	-1.17106	0.252454	1	1	3/43	1.41%	PLA2G3,PLA2G1

细胞通讯分析：cellchat

时空组学 STOmics

用途：使用cellchat v2进行细胞通讯分析

运行方式： SDAS CCI cellchat -i st.rds --bin_size 100 --label_key anno_spotlight --add_spatial -o outdir

输入参数说明：

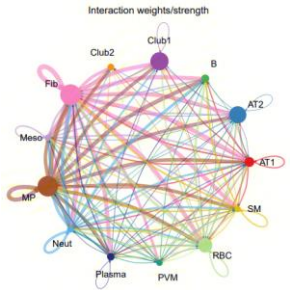
cellchat参数	是否必须	默认值	描述
-i / --input	是		rds文件，要求原始矩阵存在@assays$RNA@counts，否则报错
-o / --output	是		输出文件夹
--label_key	是		细胞类群的列名称
--bin_size	否		如果加空间信息分析，则需要提供bin_size, 如cellbin,10,20,50,100等
--species	否	human	cellchat内置的数据库，human或mouse；默认 ‘human’ ,当指定--database参数时，该参数不起作用。
--database	否		用户自定义的数据库
--method	否	triMean	computeCommunProb的计算方法，triMean或truncatedMean
--trim	否	0.1	当method为truncatedMean时，可调整trim，trim越小找到的交互越多，0.1表示截断上下各 10% 的数据
--add_spatial	否	false	要加空间信息分析则输入”--add_spatial”,只支持空转数据
--scale_distance	否	2	空间信息scale比例

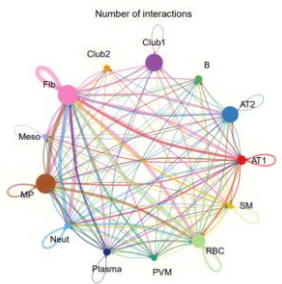
输出结果说明

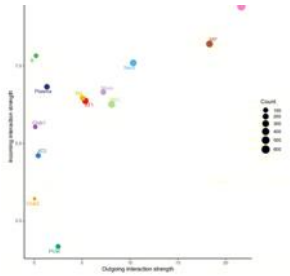
结果文件	描述
<input_name>_cellchat_LR.csv	互作的配受体结果(没有找到显著配受体时不输出)
<input_name>_cellchat_LR_pathway.csv	配受体富集的通路结果(没有找到显著配受体时不输出)
<input_name>_interaction_strength.pdf	细胞互作强度网络图
<input_name>_number_of_interactions.pdf	细胞互作数目网络图
<input_name>_signalingRole_scatter.pdf	细胞互作点图
<input_name>__cellchat.rds	包含细胞互作结果的rds文件

method参数建议：预测较强的细胞间通信，推荐使用默认的 triMean 方法。如果希望获得更多的交互，可以尝试使用 truncatedMean 方法，并根据需要调整 trim 参数，trim设置越小，找到的交互越多

***输出结果展示：**







sample_cellchat_LR.csv

source	target	ligand	receptor	prob	pval	interaction_name	interaction_name_2	pathway_name	annotation	evidence
MP	AT1	Spp1	Cd44	0.2031065	0	SPP1_CD44	Spp1 - Cd44	SPP1	Secreted Signaling	PMID: 21907263
MP	AT2	Spp1	Cd44	0.2017045	0	SPP1_CD44	Spp1 - Cd44	SPP1	Secreted Signaling	PMID: 21907263
MP	B	Spp1	Cd44	0.1982072	0	SPP1_CD44	Spp1 - Cd44	SPP1	Secreted Signaling	PMID: 21907263
MP	Club1	Spp1	Cd44	0.1875791	0	SPP1_CD44	Spp1 - Cd44	SPP1	Secreted Signaling	PMID: 21907263
MP	Club2	Spp1	Cd44	0.1754759	0	SPP1_CD44	Spp1 - Cd44	SPP1	Secreted Signaling	PMID: 21907263

sample_cellchat_LR_pathway.csv

source	target	pathway_name	prob	pval
AT1_AT2	AT1_AT2	PTPRM	0.038414675	0.000
Deuterosomal	IM	NRXN	0.015143084	0.000
IM	IM	NRXN	0.018496709	0.000
Mesothelial	IM	NRXN	0.008612413	0.010
Mesothelial	Mesothelial	NCAM	0.026620328	0.005
VEC	IM	NRXN	0.055055605	0.000

轨迹分析：monocle3

时空组学 STOmics

用途: 使用monocle3进行细胞轨迹分析

运行方式： SDAS trajectory monocle3 -i st.rds -o outdir --root_key annotation --root CAF_DES

输入参数说明：

monocle3参数	是否必须	默认值	描述
-i / --input	是		rds文件，要求原始矩阵存在@assays$RNA@counts，否则报错
-o / --output	是		输出文件夹
--root_key	是		meta.data中根节点所在的列名称
--root	是		设置为根节点的名称
--batch_key	否		进行批次校正的meta.data的列名称，不输入则不做去批次
--resolution	否		cluster的resolution
--umap	否		含有umap信息的csv文件(第一行为表头)
--n_cpus	否	8	多线程的线程数，默认8线程
--top_gene_num	否	5	显示随时间变化的差异基因的数目
--gene_color_label	否	pseudotime	基因图展示的列的名称
--pval_cutoff	否	0.05	差异基因筛选p值
--qval_cutoff	否	0.05	差异基因筛选q值

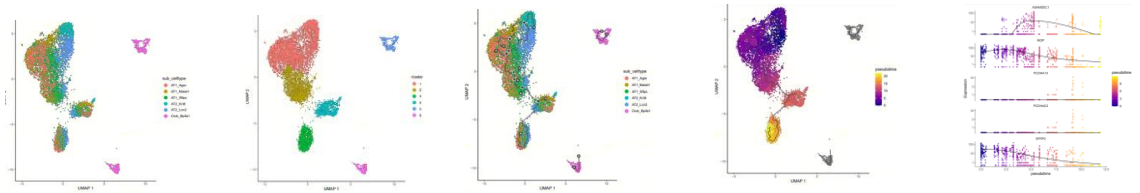
UMAP信息的csv文件示例（第一行为表头）

```
umap1,umap2
4.1020474,-2.499986
7.3356185,-0.98648024
6.684925,3.0859163
4.6454377,1.2971971
5.67162,-2.785658
7.810047,3.5703464
7.2461996,2.61418
4.5697656,1.214013
7.3370686,2.352965
```

输出结果说明

结果文件	描述
<input_name>_dimension.png	降维图
<input_name>_dimension_color_by_batch.png	以批次信息展示降维图（有做批次校正时输出）
<input_name>_cluster.png	聚类图
<input_name>_roots.png	root图
<input_name>_pseudotime.png	拟时序图
<input_name>_genes_in_pseudotime.png	随时间变化的top gene表达图
<input_name>_monocle3.rds	包含轨迹分析结果的rds文件

***输出结果展示：**



五、各功能模块性能测试

时空组学 STOmics

对功能模块进行性能测试，包括运行时间和使用内存峰值。

- 测试环境：研发内部集群（实际生产环境），CPU节点计算资源为112个CPU、1T内存，GPU节点为112个CPU, 2T内存，16G显存。
- 测试数据：研发内部数据，包括小鼠样本和病理样本，V1.3和FFPE各5例，每个模块测试使用样本为10例中的子集。

	Stereo-Seq FFPE数据				Stereo-Seq V1.3数据		
	Bin20	**Bin50**	**Bin100**	**Cellbin**	**Bin20**	**Bin50**	**Bin100**
Bins数	50w-70w	8w-12w	2w-3w	30w-40w	50w-70w	8w-12w	2w-3w
基因数	100-200	600-1k	2k-3k	300~1k	400-900	2k-4k	5k+

细胞注释：性能测试

时空组学 STOmics

描述：

- Cell2location在cpu模式通过torch控制线程数，但CPU运行时间过长，还未统计性能；此次测试使用GPU（显存为16G），因此cpu线程数为1；
- Spotlight支持并行运算，但无法控制线程数，默认线程数可能为32或56（通过在ztron上任务观察）；
- RCTD使用max_cores参数控制进程数，每个进程默认线程数不定。此次测试使用4个进程，在ztron上每个进程是27个线程，共108线程；
- 时间： bin50/bin100时三个算法都在10h以内，bin20时，cell2location-GPU时间显著增加。
- 内存：RCTD的内存在bin20/50/100，都比较一致30-40G。 Spotlight，cell2location随着bin数增加，内存会显著增加，300G+。

性能表现（内存和时间）：

		Stereo-Seq FFPE数据			Stereo-Seq V1.3数据			
算法	**性能(平均)**	**Bin20**	**Bin50**	**Bin100**	**Cellbin**	**Bin20**	**Bin50**	**Bin100**
	bins数	50w-70w	8w-12w	2w-3w	30w-40w	50w-70w	8w-12w	2w-3w
	基因数	100-200	600-1k	2k-3k	300~1k	400-900	2k-4k	5k+
Cell2location-GPU模式	运行时间	43.5h	8.2h	2.7h	14.3h	35.5h	10.8h	2.0h
	内存	377.1G	64.8G	21.2G	95.9G	426.5h	72.8G	23.5G
	显存	10G	8.8G	8.8G	9.5G	10.1G	9G	8.6G
Spotlight	运行时间	4.7h	1.7h	0.83h	11.0h	14.2h	8.9h	6.5h
	内存	490.1G	87.0G	33.8G	261.3G	433G	79.4G	27.3G
RCTD	运行时间	7.4h	1.0h	0.48h	10.9h	24.2h	2.9h	0.9h
	内存	46.8G	38.9G	37.3G	37.2G	48.0G	33.1G	30.9G

空间结构域：性能测试

时空组学 STOmics

描述：

- CPU模式： GraphST算法支持并行运算，但无法通过参数控制线程数，该性能测试是在测试节点计算资源112个CPU、1T内存的条件下进行的测试。运行时间和内存与细胞数量呈现正相关
- GPU模式：测试服务器显存为16G，若cell数量不超过4.9万个时，能够正常完成测试，且运行时间与细胞数量呈现正相关。
- Cellbin/Bin20时，CPU或者GPU模式下均不能完成测试，因需求内存过大，导致程序运行失败。

性能表现（CPU模式）（内存和时间）：

	Stereo-Seq FFPE数据				Stereo-Seq V1.3数据			
算法	**性能(平均)**	**Bin20**	**Bin50**	**Bin100**	**Cellbin**	**Bin20**	**Bin50**	**Bin100**
GraphST	bins数	50w-70w	8w-12w	2w-3w	30w-40w	50w-70w	8w-12w	2w-3w
	基因数	100-200	600-1k	2k-3k	300~1k	400-900	2k-4k	5k+
	运行时间	/	4h	1h	/	/	2h	1h
	内存	/	213G	15G	/	/	206G	17G

性能表现（GPU模式）（内存和时间）

	Stereo-Seq FFPE数据				Stereo-Seq V1.3数据			
算法	**性能(平均)**	**Bin20**	**Bin50 (cell<=4.9w)**	**Bin100**	**Cellbin**	**Bin20**	**Bin50 (cell<=4.9w)**	**Bin100**
GraphST	运行时间	/	12m	6m	/	/	11m	6m
	内存	/	63G	24G	/	/	56G	23G
	显存	/	11275M	6160M	/	/	11392M	5516M

备注：GPU模式下，16G显存时，细胞数量大于4.6w且小于等于4.9w时，可以通过设置export PYTORCH_CUDA_ALLOC_CONF=max_split_size_mb:512能够跑通，小于4.6w时，无需设置即能跑通

空间基因共表达：性能测试

时空组学 STOmics

描述：

- NeSt/hotspot算法使用ncpu控制并行线程数，该性能测试使用ncpu=8。
- 运行时间与细胞数和基因数有关，细胞数越多、基因数越多所需时间越长，内存越大。
- 时间：hotspot > nest
- 内存：nest > hotspot

性能表现（内存和时间）：

		Stereo-Seq FFPE数据				Stereo-Seq V1.3数据		
算法	**性能（平均）**	**Bin20**	**Bin50**	**Bin100**	**Cellbin**	**Bin20**	**Bin50**	**Bin100**
	bins数	50w-70w	8w-12w	2w-3w	30w-40w	50w-70w	8w-12w	2w-3w
	基因数	100-200	600-1k	2k-3k	300~1k	400-900	2k-4k	5k+
NeST	运行时间	4h	2h	1h	3.5h	6h	3h	3h
	内存	33G	20G	16G	57G	117G	68G	64G
Hotspot	运行时间	106h	32.5h	23.5h	94h	133h	35h	27h
	内存	34G	10G	6G	22G	38G	14G	9G

细胞通讯：性能测试

时空组学 STOmics

描述：

- 运行时间和内存与细胞数和细胞类群个数有关，细胞数和细胞类群个数越多所需时间越长，内存越大

性能表现（内存和时间）：

样本	细胞数目	细胞类群(个)	运行时间(h)	内存(G)
sample1_bin100	20629	34	0.3	13.2
sample2_bin100	21500	11	0.3	16.4
sample1_bin50	81843	34	0.6	38.9
sample2_bin50	84510	12	0.5	48.5
sample2_bin50_2	84510	25	0.9	49
sample1_cellbin	321856	35	1.6	137.1
sample2_cellbin	369313	12	2	218.4
sample2_cellbin_2	369313	17	2.7	173.9
sample1_bin20	508859	35	3.9	214.6
sample2_bin20	522051	12	3.6	240.8
sample2_bin20_2	522051	18	5.1	242.1

轨迹分析：性能测试

时空组学 STOmics

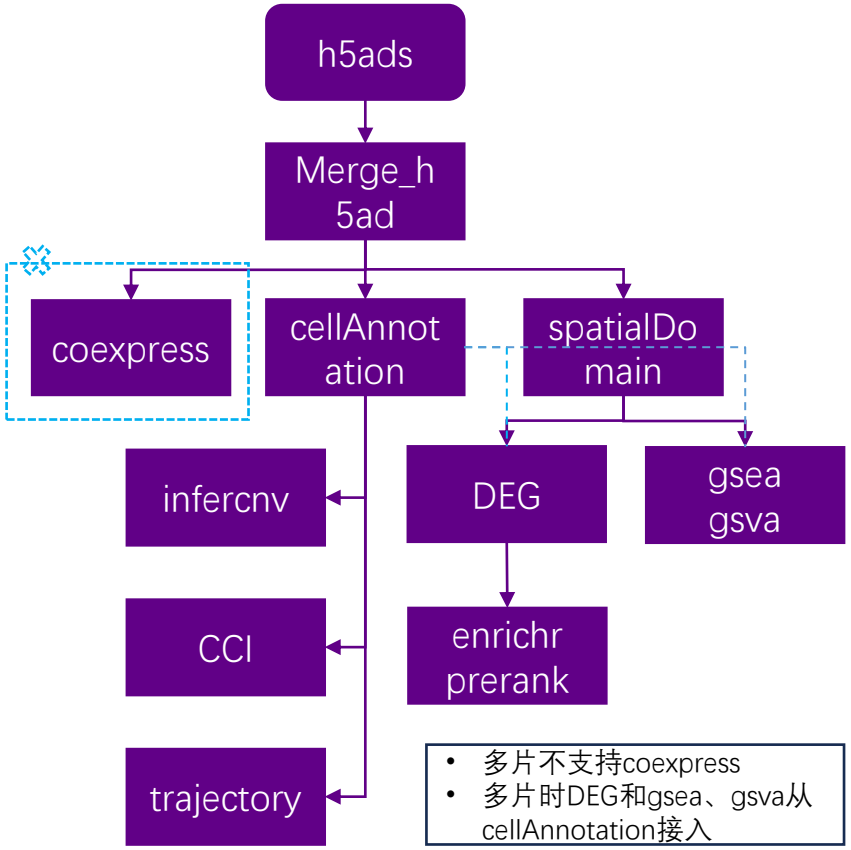
描述：

- monocle3使用ncpus控制并行进程数，每个进程固定1个线程，该性能测试使用ncpus=8，即8*1=8线程。
- 运行时间和内存与细胞数和细胞类群个数有关，细胞数和细胞类群个数越多所需时间越长，内存越大

性能表现（内存和时间）：

样本	细胞数目	细胞类群(个)	运行时间(h)	内存(G)
sample1_bin100	20629	34	0.4	8.5
sample2_bin100	21500	11	0.8	11.1
sample1_bin50	81843	34	0.9	13.3
sample2_bin50	84510	12	1.6	24.1
sample2_bin50_2	84510	25	2.2	21.8
sample1_cellbin	321856	35	3.6	208.1
sample2_cellbin	369313	12	4.8	252.6
sample2_cellbin_2	369313	17	5.6	236.1
sample2_bin20	522051	12	12.1	579.2

六、流程示例



Step1.按需求修改conf文件

```
################################################
#              SDAS pipeline                   #
################################################

SDAS_software = /path/SDAS_beta_1/SDAS

############## input h5ad ######################
## input h5ad files, use "," to split more than 1 files, example:
# h5ad_files = A.h5ad
# h5ad_files = S1,group1,A.h5ad;S2,group1,B.h5ad;S3,group2,C.h5ad
# or
# h5ad_files = S1,,A.h5ad;S2,,B.h5ad
# notice:

h5ad_files = /path/input.h5ad

## analysis process, chose 1 or more process, example:
# process = coexpress,spatialDomain,cellAnnotation,infercnv,CCI,trajectory
# notice: 1. infercnv or CCI or trajectory depend on cellAnnotation result
#         2. DEG and gene enrichment analysis depend on spatialDomain and input h5ad

process = coexpress,spatialDomain,cellAnnotation,infercnv,CCI,trajectory

############## coexpress #######################
```

Step2.运行SDAS_pipeline.py

```
usage: python3 SDAS_pipeline.py -c
pipeline_input.conf -o ./

positional arguments:
  {}                    Commands help.

options:
  -h, --help            show this help message and exit
  -c CONF, --conf CONF  input conf file
  -o OUTDIR, --outdir OUTDIR
                        output directory
```

Step3.按照all_shell.conf文件运行任务

```
/storeData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/input_file/shell/merge_h5ads.sh:cpu:3:mem:10G        /storeData/
USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/coexpress/shell/coexpress_hotspot.sh:cpu:8:mem:30G
/storeData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/input_file/shell/merge_h5ads.sh:cpu:3:mem:10G        /storeData/
USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/cellAnnotation/shell/cellAnnotation_rctd.sh:cpu:4:mem:20G
/storeData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/input_file/shell/merge_h5ads.sh:cpu:3:mem:10G        /storeData/
USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/spatialDomain/shell/spatialDomain_graphst.sh:cpu:3:mem:20G
/storeData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/cellAnnotation/shell/cellAnnotation_rctd.sh:cpu:4:mem:20G    /st
oreData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/infercnv/shell/infercnv.sh:cpu:3:mem:20G
/storeData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/cellAnnotation/shell/cellAnnotation_rctd.sh:cpu:4:mem:20G    /st
oreData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/cci/shell/cci_cellchat.sh:cpu:3:mem:20G
/storeData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/cellAnnotation/shell/cellAnnotation_rctd.sh:cpu:4:mem:20G    /st
oreData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/trajectory/shell/trajectory_monocle3.sh:cpu:3:mem:50G
/storeData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/spatialDomain/shell/spatialDomain_graphst.sh:cpu:3:mem:20G    /st
oreData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/deg/shell/deg.sh:cpu:1:mem:2G
/storeData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/deg/shell/deg.sh:cpu:1:mem:2G        /storeData/USER/data/02.Bio
informatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/geneEnrichment/shell/deg_enrich.sh:cpu:1:mem:2G
/storeData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/spatialDomain/shell/spatialDomain_graphst.sh:cpu:3:mem:20G    /st
oreData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/geneEnrichment/shell/gsea.sh:cpu:1:mem:2G
/storeData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/spatialDomain/shell/spatialDomain_graphst.sh:cpu:3:mem:20G    /st
oreData/USER/data/02.Bioinformatics_for_STOmics/01.user/xiehongqing/analysis_work/work_ST_DGE_and_Enrichment/test_pipeline/single_slice/geneEnrichment/shell/gsva.sh:cpu:1:mem:2G
```

测试数据：./Test_data/single_slice 和 ./Test_data/multiple_slices

脚本：./Scripts/pipelines

七、常见问题（FAQ）

1. 输入文件的格式是什么样的?

答：SDAS支持SAW count，SAW gef2h5ad (>=SAW V8)，SAW aggr(alpha ver.)的输出文件。在输入其他模块之前，请按照使用手册使用SDAS dataProcess转成标准h5ad文件。

2. 细胞注释模块有3种算法，均需要对应的scRNA-Seq数据，SDAS是否提供，如果不提供，用户应该如何准备?

答：SDAS软件暂时不提供细胞注释的单细胞数据，用户需要按照使用手册中的格式说明来准备h5ad文件。

3. SDAS中的各模块支持scRNA-Seq数据分析吗，如果支持，用户应该如何准备单细胞数据?

答： SDAS中的DEG, geneSetEnrichment, CCI, trajectory模块支持scRNA-Seq数据分析，用户按照使用手册准备h5ad文件即可，具体如下：h5ad中有原始表达矩阵，存在layers[‘raw_counts’] 或者adata.X，基因信息存在var[‘real_gene_name’]或者var.index

附录 SAW aggr(alpha ver.)流程介绍

时空组学 STOmics

1. **SAW aggr是什么**：包含数据整合、去批次、聚类、差异基因的多片分析和可视化流程
2. **如何与SDAS进行衔接**：SAW aggr生成的h5mu文件，通过SDAS dataProcess h5mu2h5ad即可转成SDAS的标准输入格式
3. **如何获取SAW aggr（alpha ver.）**：

获取软件和使用手册
http://116.6.21.110:8090/share/f89e1b9e-44cc-49a6-8f8d-e4ce40e944bc
获取测试数据
芯片1（C04042E2）：http://116.6.21.110:8090/share/d311a304-8715-47b3-8554-cfd3ee779d30 芯片2（C04042E3）：http://116.6.21.110:8090/share/7f5966d8-ca8c-482f-ac43-db5786414897
获取测试结果报告
http://116.6.21.110:8090/share/7556b9bf-cd07-485e-9f25-f9cf457ca3d1

其他说明

时空组学
STOmics

SDAS beta版本材料包的内容：

1. SDAS_beta.tar.gz
2. Documents: SDAS_beta_user_manual.pdf
3. Test_data：single_slice（单片）、multiple_slices（多片）
4. Scripts：quick_start（单模块运行脚本)，pipelines (串流程脚本)
5. Application_cases：
   - NC2024_paper_bioinformatics_analysis_withSDAS.pdf
   - Application_test_data: 包括单细胞和空转数据
   - Application_scripts: 包括R，python代码和notebook

Test data来源：

1. 单片和应用案例： Feng, Y., Ma, W., Zang, Y. et al. Spatially organized tumor-stroma boundary determines the efficacy of immunotherapy in colorectal cancer patients. *Nat Commun* 15, 10259 (2024). https://doi.org/10.1038/s41467-024-54710-3
2. 多片： Zhang R, Feng Y, Ma W, et al. Spatial transcriptome unveils a discontinuous inflammatory pattern in proficient mismatch repair colorectal adenocarcinoma. *Fundam Res*. 2022;3(4):640-646 (2022). https://doi.org/10.1016/j.fmre.2022.01.036