

空间转录组流程

上游分析

取样，实验设计，测序

Space ranger软件处理测序文件

处理步骤

- 基因组比对
- MAPQ调整
- 转录组比对
- UMI计数

使用命令

- mkfastq 将测序仪产生的bcl格式转换为fastq格式
- mkgtf/ref 构建参考基因组索引文件
- count 输入是mkfastq得到的fastq文件及组织切片的图像
输出结果是一个outs目录，里面储存spots gene的定量结果及初步的降维聚类结果
- mat2csv 进行格式转换

结果汇总

- web_summary.html
 - summary
 - analysis
- spatial
 - tissue_positions_lists.csv
 - spatial barcode 空间位置信息
- filtered_freature_bc_matrix
 - barcodes.tsv.gz 储存spatial barcode ID
 - features.tsv.gz 储存检测到的基因id和symbol
 - matrix.mtx.gz 关于基因，Spot表达矩阵
- analysis 数据降维，聚类及差异分析结果
- cloupe.cloupe
 - 用loupe browser打开
 - 查看基因的表达，辅助鉴定细胞类型，创建和修改子群，差异分析等操作

下游分析

Seurat v.3

读取数据

- 10x Visium Load10X_Spatial()
- Slide-seq LoadData()

数据预处理

- 归一化
 - LogNormalize() 强制每个数据点在标准化后具有相同的基础“大小”的标准方法（例如函数）可能会出现问题
 - sctransform() 推荐

基因表达可视化

- SpatialFeaturePlot()
 - pt.size.factor 将缩放点的大小，默认值为 1.6
 - alpha 最小和最大透明度。默认值为 c(1, 1)

降维、聚类和可视化

- RunPCA()
 - FindNeighbors()
 - FindClusters()
 - RunUMAP()
 - SpatialDimPlot() cells.highlight 对于区分单个集群的空间定位
- 与 scRNA-seq 分析相同的工作流程

空间变量特征基因的识别

- FindMarkers 基于组织内预先注释的解剖区域执行差异表达，这可以从无监督聚类或先验知识中确定
- FindSpatiallyVariables()
 - method = 'markvariogram'

子集解剖区域

- subset() 将对象子集化以关注数据的子集

与单细胞数据集成

- FindTransferAnchors()
- TransferData()
- SpatialFeaturePlot()

在 Seurat 中处理多个切片

其他步骤与scRNA-seq流程一致