



User Manual

Loupe Browser 4.0



< 목 차 >

1. Introduction	3
2. Software download	4
3. Component of the Loupe Browser user interface	7
4. Loupe Browser tutorial	12
1. Finding significant genes	13
2. Identifying cell types	14
3. Exploring substructure	15
4. Identifying cell subtypes	16
5. Sharing result	17

1. Introduction

Loupe Browser 란

Loupe Browser 는 서로 다른 10x Genomics 솔루션의 데이터를 분석할 수 있는 시각화 기능을 제공하는 데스크톱 응용 프로그램이다. Loupe Browser 를 사용하면 10x 데이터의 Cluster 정보를 시각적으로 손쉽게 조회하여 단일 세포의 유전자 발현 정보를 살펴볼 수 있다 (figure 1-1).

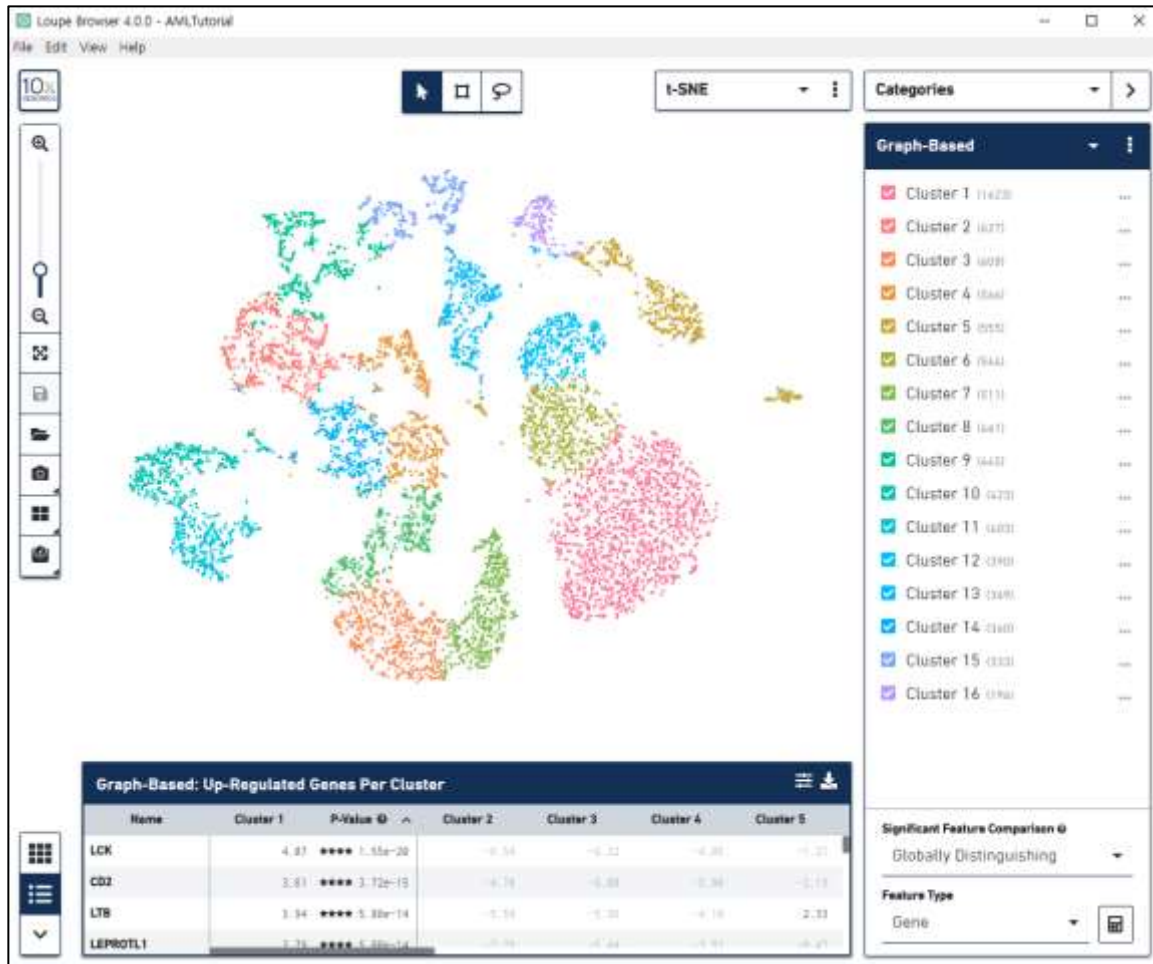


figure 1-1. Loupe Browser

Loupe Browser를 사용하려면 Cell Ranger 분석 소프트웨어에서 생성된 cloupe.cloupe 파일을 input하여 열어야 하는데, 해당 파일은 결과보고서 중 4. Loupe Browser Input 폴더에서 확인할 수 있다.

cloupe.cloupe 파일에는 다음과 같은 정보가 포함되어 있다.

- 샘플의 세포에 대한 유전자 발현 정보
- t-SNE, UMAP projection과 Differential gene expression을 포함한 세포들의 다양한 유전자 발현 기반 clustering 정보
- transcriptome reference의 유전자 annotation 정보

2. Software download

Loupe Browser 4.0 다운로드 및 설치


2-1. Loupe Browser 다운로드


아래 다운로드 링크로 접속하여, 내 컴퓨터 환경(Window/ macOS)에 맞는 Loupe Browser software를 다운로드 받는다 (figure 2-1).

Download Link :

<https://support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software/downloads/latest#loupe>

Software Downloads


 **Cell Ranger 3.1.0**
Single Cell Analysis Pipelines

 **Loupe Browser 4.0.0**
Interactive Analysis


Loupe Browser 4.0.0 (December 2, 2019)

Please follow the [install instructions](#) after downloading one of the installers below.

[Read about what's New in Loupe Browser 4.0](#)

 **Download for Windows**

filesize: 656 MB
md5sum: 3862fe52345e1eecd1149c3c08b49a4

 **Download for macOS**

filesize: 702 MB
md5sum: 539a29aa8d233ad03ef4ca6595ba5dae

figure 2-1. Loupe Browser download screen

[참고] 시스템 요구사항

Windows

- Windows 7 (64-bit) or later
- 4GB RAM
- SSD storage highly recommended
- Updated video/display drivers recommended

macOS

- macOS 10.12(Sierra) or later
- 4GB RAM
- SSD storage highly recommended

2-2. Loupe Browser 설치

2-2-1. Windows용 설치

Windows 용 Loupe Browser는 자체설치 .exe 실행 파일로 배포된다. 다운로드한 파일을 더블 클릭하여 설치한다.

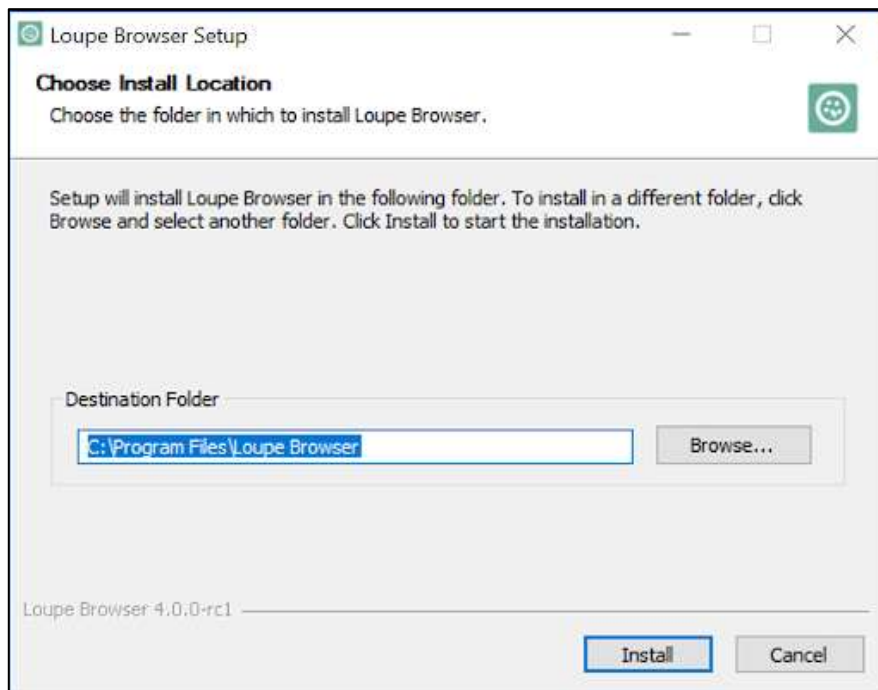


figure 2-2. Loupe Browser download screen for windows

프롬프트에 따라 설치 폴더를 선택한다 (figure 2-2). 설치 후 바탕 화면 아이콘을 더블 클릭하거나 컴퓨터의 .loupe 파일을 더블 클릭하여 Loupe Browser를 연다.

2-2-2. macOS용 설치

macOS용 Loupe Browser는 .dmg 파일로 배포된다. .dmg파일을 열어 Loupe 아이콘을 Applications 폴더로 드래그하여 Loupe를 설치한다 (figure 2-3).

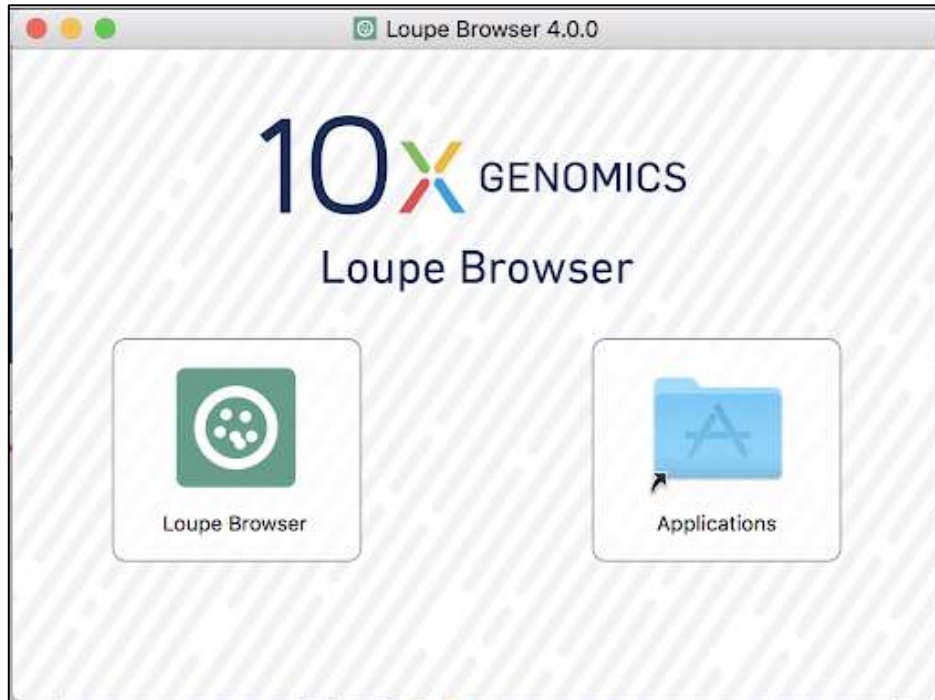


figure 2-4. Loupe Browser download screen for macOS

그런 다음 응용 프로그램 폴더를 사용하거나 바탕 화면에서 Loupe Browser 아이콘을 더블 클릭하여 열 수 있다.

3. Component of the Loupe Browser user interface

Loupe Browser에서 샘플 data를 열면 다음과 같은 화면을 확인할 수 있다. (figure 3-1)

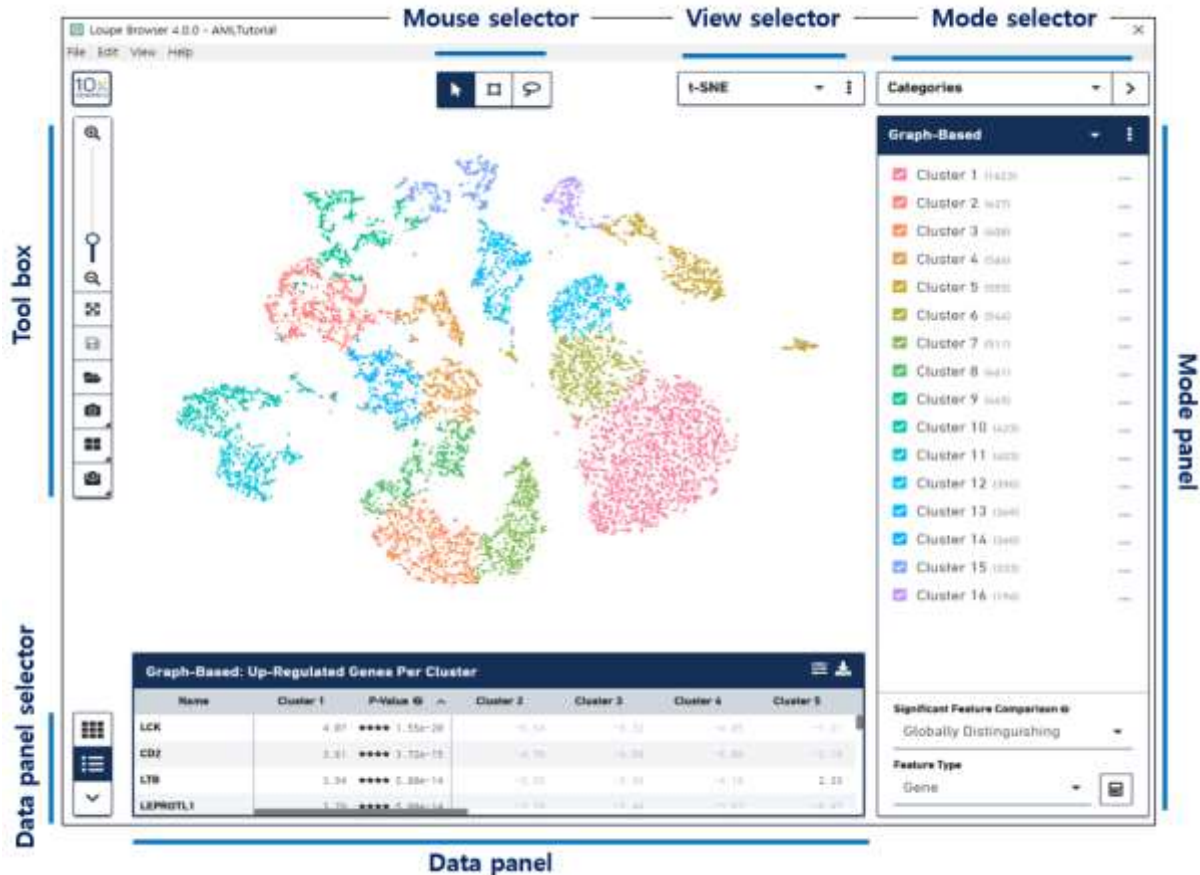


figure 3-1. Components of the interface

3-1. View panel

작업 공간은 View panel을 중심으로 하며, 여기에는 셀 바코드를 나타내는 단일 지점이 다양한 투영으로 표시된다. 각 점은 단일 바코드를 나타내며, 대부분은 단일 셀에 해당한다. 기본 투영 방식은 Cell Ranger pipeline에 의해 생성된 t-SNE plot이다. Cell Ranger는 주성분 분석을 사용하여 가장 중요한 특징 벡터를 식별한 다음 t-SNE 차원 축소를 적용하여 2차원 scatter plot을 생성하여 이미지를 생성한다. Barcode plot의 오른쪽 상단에 있는 View selector를 사용하면 UMAP을 포함하여 투영방식을 전환할 수 있다. 2차원 축에서 feature count를 나타내는 투영으로 전환할 수도 있다.

마우스를 드래그하여 plot의 위치를 조정하고 마우스 휠 또는 트랙 패드를 사용하여 부드럽게 확대 및 축소할 수 있다. plot 위로 마우스를 움직이면 cluster label이 표시되는데, 이는 구성된 cluster 수가 많은 데이터에 유용하다. cluster는 사이드 바의 활성 범례로 색상이 지정된다.

3-2. 세부 구성

3-2-1. Mouse selector




Tool	Description
	Pan - Move the image up and down, or left and right.
	Rectangular Selection - Select and label a rectangular image area.
	Lasso Selection - Select and label an image area with an irregular shape.

figure 3-2. Mouse selector

3-2-2. Toolbox








Tool	Description
	Zoom In and Zoom Out Click on + to Zoom In, click on - to Zoom Out, or use the slide bar to zoom in and out.
	Autoscale Autoscale to fit the screen after zooming in or out.
	Save As After changes have been made to a .cloupe file, click Save As, name the file, and select a location for the file.
	Open File Open a new .cloupe file
	Export Plot Click on the triangle in the bottom right corner and select Export Screenshot as PNG.
	Split View Split View can be used with t-SNE, UMAP and Feature Plot to view clusters displayed in the Mode Panel.
	Marker Settings Marker Settings can be used with t-SNE, UMAP and Feature Plot to scale the image automatically or by percentage. Uncheck the Auto-scale box to choose a percentage.

figure 3-3. Toolbox

홈 화면과 최근 파일 목록으로 돌아가려면 왼쪽 상단 모서리에 있는 10x Genomics 버튼을 클릭한다.

3-2-3. View Selector

View selector는 View panel에 표시되는 내용을 조정한다. 유전자 발현 datasets에 대해 다음의 세 가지 유형으로 선택할 수 있다.

- t-SNE View
- UMAP View
- Feature Plot View

3-2-3-1. UMAP 및 t-SNE Views

Loupe Browser는 t-SNE와 UMAP 두 가지 다른 투영 데이터를 제공한다. 이러한 view에서 cell은 space ranger의 t-SNE 또는 UMAP 알고리즘에 기반하여 표시된다. 각 cell은 모드 패널의 활성 범례를 기반한 색상으로 구분된다.

두가지 투영방식 모두에서 마우스를 디스플레이 영역 위로 끌면 투영이 재배치되며, 마우스 휠이나 트랙패드를 사용하여 확대 및 축소할 수 있다. 마우스를 해당 Cell 위로 가져가면 Cell과 연결된 Cluster label이 이 표시된다.

참고로 UMAP 투영은 Cell Ranger 3.1 이상에서만 지원된다.

3-2-3-2. Feature Plot View

Feature Plot View를 통해 각 세포에 대해 하나 또는 두 개의 유전자의 발현 수준을 시각화 할 수 있다 (figure 3-3). 이는 하나 또는 두개의 유전자의 발현 수준에 기초하여 세포 세트를 역치하기 쉽게 한다. 이 경우 유전자의 특징은 Y 축 상단 또는 X 축 오른쪽의 텍스트 상자에 입력할 수 있다. 이 선택기에는 축 눈금을 선형 눈금과 로그 눈금 간에 전환하는 탭도 포함되어 있다.

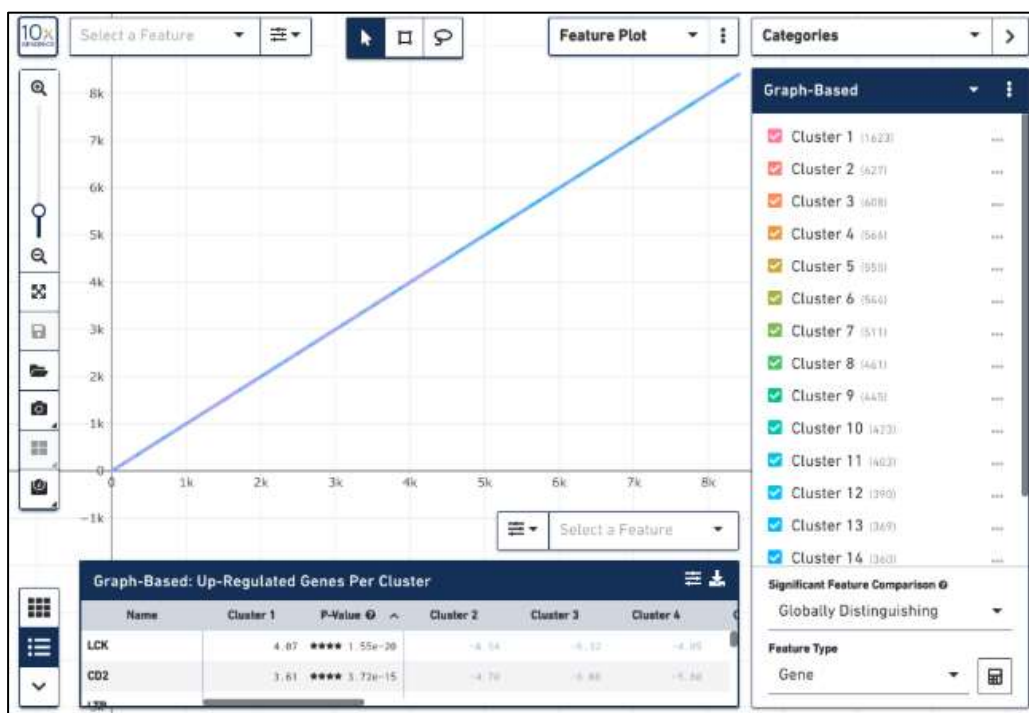


figure 3-3. Feature Plot View

3-2-4. Mode Selector, Mode Panel

Loupe Browser의 다른 모드 간에 전환하려면 작업 공간의 오른쪽 상단 모서리에 있는 Mode selector를 사용한다. (figure 3-4). 모드 간에 전환하면 모드 별 색상이 View panel에 적용되고 모드 별 기능이 Mode panel에 변경된다. Loupe Browser에는 다음과 같은 모드가 있다.

- Categories
- Gene/Feature Expression
- Filters
- V(D)J Clonotypes

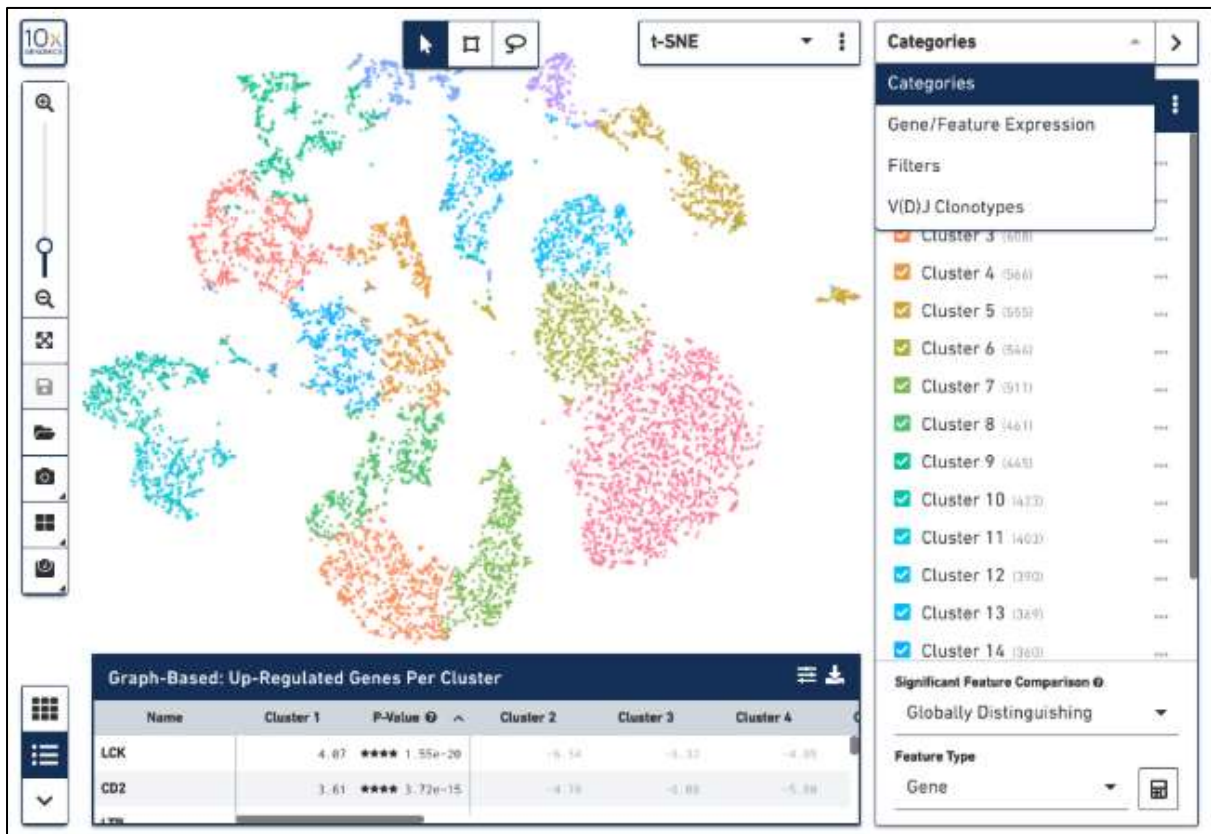


figure 3-4. Mode Selector,


3-2-4-1. Categories mode

category mode는 다음을 포함하여 데이터 클러스터를 표시하는 세가지 방법을 제공한다.

- Graph-based clustering
- K-means Clustering (k=1-10)
- 사용자 정의 category 및 해당 클러스터 정의

3-2-4-2. Significant Feature comparison

Significant Feature comparison은 데이터 세트의 어떤 feature가 하나 이상의 클러스터를 구분하는지 결정하며, 클러스터 간에 차등 표현식 분석을 한다. 이 기능은 오른쪽 하단에 있는 드롭 다

운 메뉴를 사용하여 하단의 두가지 유형에 대한 옵션을 선택할 수 있으며,  아이콘을 클릭하여 비교 분석을 실행할 수 있다.

- **Globally Distinguishing** : 모드 패널에 표시된 각 선택된 클러스터에 대해 옵션은 해당 셀이 선택되지 않은 클러스터에 있더라도 데이터 세트의 다른 모든 셀과 각 선택된 클러스터를 구별하는 기능을 결정한다.
- **Locally Distinguishing** : 모드 패널에 표시된 각 선택된 클러스터에 대해 옵션은 해당 범주에서 선택된 다른 클러스터의 셀과 각 클러스터를 구별하는 기능을 결정한다. 선택되지 않은 클러스터의 셀은 분석에서 제외된다. 모든 클러스터를 선택하면 로컬 구별의 결과는 글로벌 구별과 동일하다.

3-2-4-2. Gene/Feature Expression Mode

Gene / Feature Expression 모드는 데이터 세트에 걸쳐 유전자 또는 Feature를 그래픽으로 표현한다. 한 번에 하나 이상의 feature를 볼 수 있으며, 관심있는 feature를 검색하거나 feature 목록을 업로드하고 저장할 수 있다.

4. Loupe Browser tutorial

이 챕터에서는 Tutorial을 통해 Loupe Browser가 제공하는 주요 기능 중 single cell gene expression 분석 방법에 대해 살펴본다.

Loupe Browser를 이용하여 다음과 같은 기능을 이용할 수 있다.

- **Finding Significant genes**
cluster table을 기반으로 cluster를 고유하게 특징짓는 유전자를 결정한다.
- **Identifying cell types**
gene list와 gene expression view를 사용하여 다른 세포 타입과 functional 그룹을 찾을 수 있다.
- **Exploring substructure**
사용자 정의 cluster를 생성하고 차등표현식 도구를 이용하여 데이터에서 더 작은 subgroup을 식별할 수 있다.
- **Identifying cell subtypes**
필터 패널을 사용하여 복잡한 Boolean 필터를 생성하여, 데이터 집합에서 cell subtype을 찾아볼 수 있다.
- **Sharing results**
관심있는 유전자를 저장하고, 데이터 테이블을 내보내고 single cell 데이터의 스크린 샷을 찍는다.

분석 샘플 데이터 열기

Loupe Browser를 설치하였다면, 분석 진행을 위해 결과보고서 중 4. Loupe Browser Input 폴더에서 loupe.loupe 파일을 더블 클릭하여 파일을 연다. 그러면 Loupe Browser 상에서 선택한 샘플의 single cell들에 대한 t-SNE 투영(trajectory) 화면이 나타난다.

4-1. Finding Significant Genes

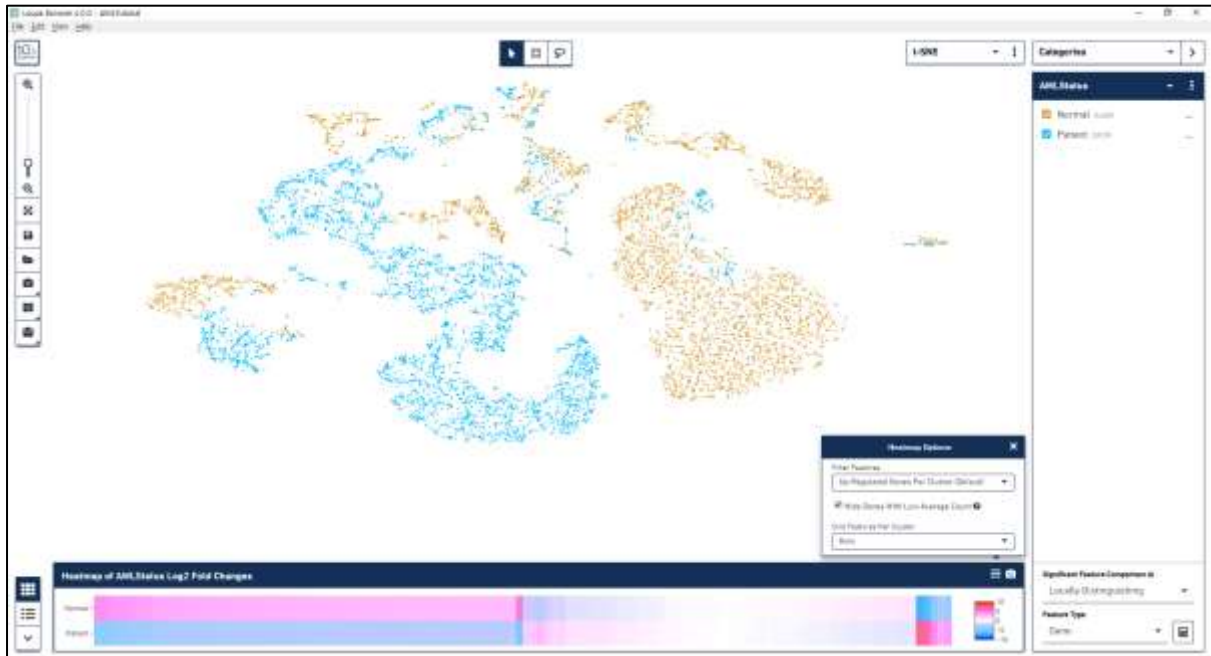


figure 4-1. Finding significant genes

Selecting a Category and Using Split View

.cloupe 포맷의 파일을 불러오면 해당 데이터의 클러스터 이미지를 확인할 수 있다. Categories 패널에서 클러스터 정보와 이미지 출력 여부를 확인할 수 있다. 클러스터를 구분하는 방식은 Graph-Based와 K-Means 중에서 선택할 수 있다. K-Means에서는 클러스터 개수를 수동으로 지정하여 시각화 할 수 있다. Split view를 클릭하면 그룹 별로 분리하여 클러스터를 시각화 할 수 있다.

Computing Significant Genes

Significant Genes는 크게 Globally와 Locally distinguishing으로 계산하여 확인할 수 있다. Globally 또는 Locally Distinguishing을 선택한 후 계산기 버튼을 클릭하면 유전자에 대한 Fold change와 P-value가 자동으로 계산된다. 해당 결과는 하단 패널에서 데이터 값 또는 Heatmap으로 확인할 수 있다. Table option에서 데이터 값의 표현, 필터링 방식, 상위에 표현되는 유전자 개수를 지정할 수 있다.

4-2. Identifying Cell Types

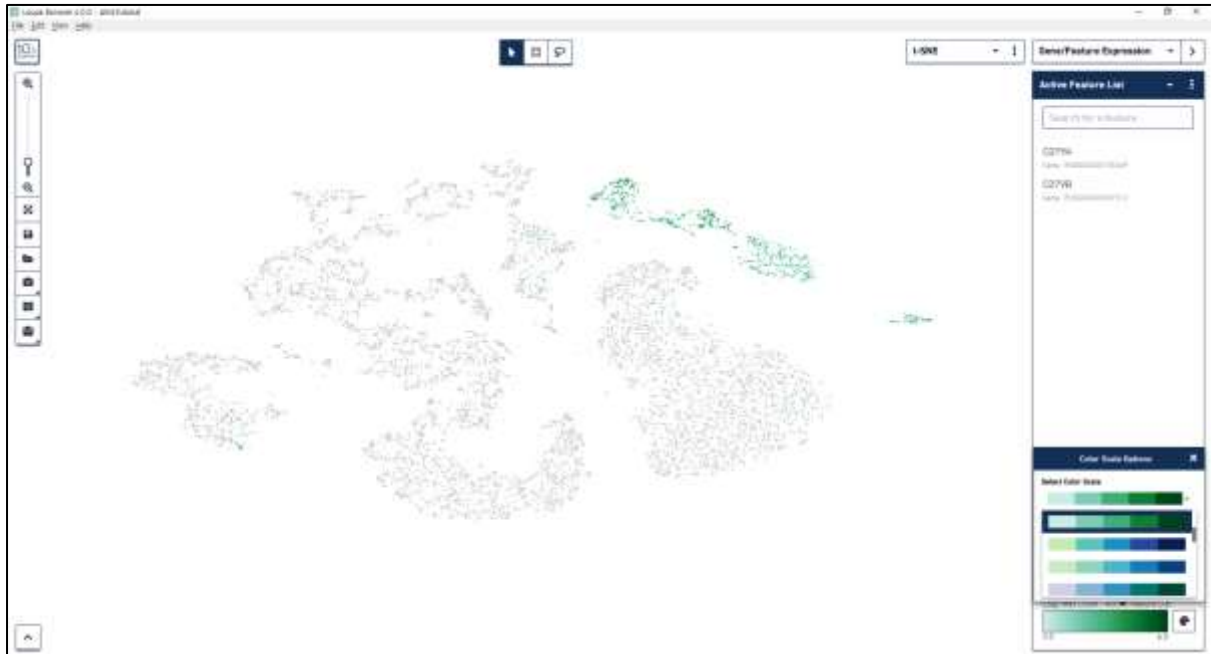


figure 4-2. Identifying cell types

Feature Search

Gene/Feature Expression을 클릭한 후 Search for a feature에 유전자 이름을 검색하면 해당 유전자의 발현 수준에 대한 정보를 확인할 수 있다. 여러 유전자를 검색한 경우에는 해당 유전자들의 발현 수준을 모두 확인할 수 있다. 여러 유전자가 선택된 경우에는 가장 큰 유전자 발현 수준, 가장 작은 유전자 발현 수준, 평균 발현 수준 등을 선택하여 시각화 할 수 있다.

Alternate Color scale and Manual Ranges

발현 수준에 대한 색 범위와 값의 범위를 수동으로 변경할 수 있다. Select Color Scale에서 원하는 색 범위로 변경할 수 있다. Set Min/Max에서 Auto-scale 버튼을 해제하면 사용자가 원하는 범위의 최소값/최대값을 입력할 수 있다. 최소값/최대값 범위 외에 해당하는 Cell은 회색으로 표시된다.

Importing and Exporting Feature Lists

기존에 알려진 세포 타입과 마커 유전자들에 대한 내용을 CSV 파일로 불러올 수 있고, 현재 작업 중인 내용에 대하여 CSV 파일로 저장할 수 있다.

4-3. Exploring Substructure

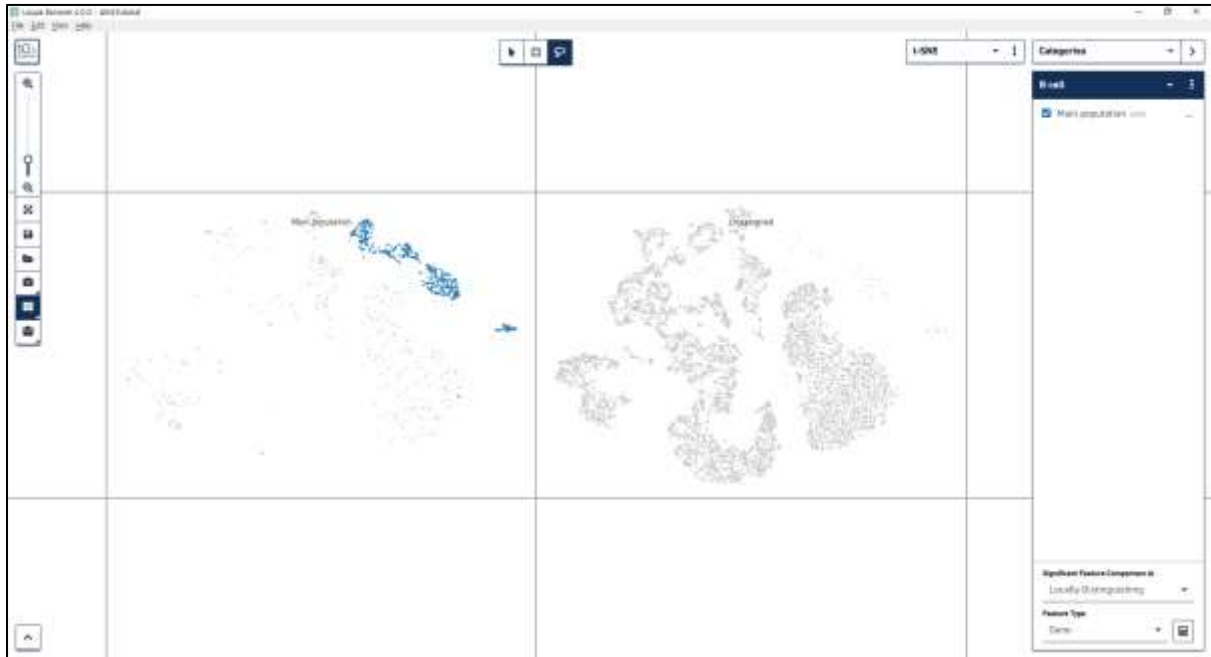


figure 4-3. Exploring substructure

Creating Subgroups by Expression Level

전체 클러스터 중에서 검색된 유전자가 발현되는 부분을 클러스터의 subgroup으로 지정할 수 있다. Select by Count – Active Feature List에서 Enter a Number에 Count 값을 입력하여 해당 발현 부분을 필터링한다. 카테고리명과 클러스터 이름을 입력하고 저장하면 해당 발현 부분을 저장할 수 있다. Split view를 통해 전체적인 발현 수준을 확인할 수 있다.

Modifying Subgroups with Manual Selection

Subgroup을 지정한 후 예상한 클러스터 범위를 벗어나서 원하지 않는 부분에서 발현 패턴이 보일 수 있다. 이러한 경우에는 올가미 도구를 이용하여 해당 발현 부분을 subgroup에서 제거할 수 있다.

4-4. Identifying Cell Subtypes

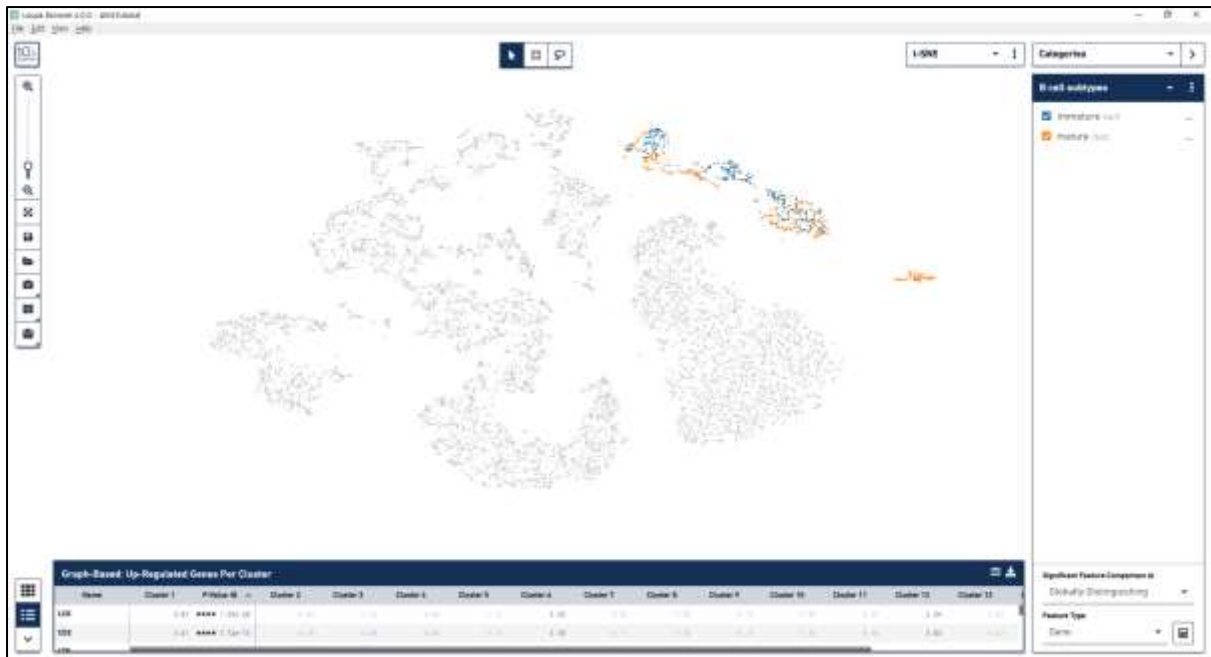


figure 4-4. Identifying cell subtypes

Subgroup 안에서 하위 클러스터를 지정할 수 있다. Create new rule 버튼을 클릭하고 하위 클러스터를 생성한다. Filter 항목을 클릭한 후 앞서 구축된 subgroup을 선택한다. Create new rule을 클릭한 후 subgroup 내에서 기준이 되는 옵션 (유전자와 Count)을 입력한다. Subgroup 내에서 해당 옵션에 따라 생성된 subgroup의 하위 클러스터 이미지를 시각화 할 수 있다.

4-5. Sharing Results

Saving .cloupe Files

Toolbar에서 Save 버튼 (또는 Ctrl+S)을 클릭하면 현재 상태를 .cloupe 포맷의 파일로 저장할 수 있다. 다른 이름으로 저장하려면 Save as 버튼 (디스크 모양 또는 Ctrl+Shift+S)을 클릭한 후 파일 이름을 입력하면 현재 상태를 .cloupe 포맷의 파일로 저장할 수 있다.

Exporting Data and Graphics

Loupe Browser에서는 다음과 같은 데이터를 해당 포맷으로 저장할 수 있다.

- 유의한 유전자 데이터 테이블을 CSV 파일로 저장
- 유의한 유전자 Heatmap 이미지를 PNG 파일로 저장
- 현재 작업중인 유전자 목록을 CSV 파일로 저장
- 현재 이미지를 PNG 또는 SVG로 저장

[Reference]

10x Genomics 홈페이지의 tutorial을 기반으로 제작이 되었으며, 좀 더 상세한 내용은 아래 링크를 통해 확인할 수 있다.

-10x Genomics Tutorial Link :

<https://support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software/visualization/latest/what-is-loupe-cell-browser>