

MS-DIAL、MetaboAnalyst の利用方法

1. MS-DIAL をダウンロード。

<https://systemsomicslab.github.io/compms/msdial/main.html>

Ver 4.9.221218 をダウンロード (Ver 4.9 のシリーズ)

Objective

MS-DIAL was launched as a universal program for untargeted metabolomics that supports multiple instruments (GC/MS, GC/MS/MS, LC/MS, and LC/MS/MS) and MS vendors (Agilent, Bruker, LECO, Sciex, Shimadzu).

Software

✓ SWATH-MS/MS and DIA-MS: MS-DIAL: data independent MS/MS deconvolution metabolome analysis. *Nature Methods*, 12, 523–526, 2015. [PubMed]

2. ダウンロードした圧縮ファイルを、適当な場所（デスクトップなど）へ解凍。

3. データ解析用フォルダーの作成。

適当な場所（マイドキュメントなど）にデータ解析用フォルダーを作成する。

フォルダー名は、メタボローム等わかりやすい名前が良い。

4. データ解析用フォルダーに、MS-DIAL用のライブラリをダウンロード。

<https://systemsomicslab.github.io/compms/msdial/main.html#MSP>

All records with Kovats RI (9062 unique compounds) EI-MS

All records with Kovats RI (9062 unique compounds)	⚡ EI-MS	28,220 records	<div style="width: 100%;"></div>	↓
Fiehn BinBase DB (Rtx5-Sil MS, predicted Kovats RI)	⚡ EI-MS	1,021 records	<div style="width: 100%;"></div>	↓
RIKEN DB (Rtx5-Sil MS, Kovats RI)	⚡ EI-MS	241 records	<div style="width: 100%;"></div>	↓

- netCDF データを直接読み込むため、下記サイトから netCDF-C 4.9.2 (以降最新版) をダウンロードし、オプションのパスを追加にチェックを入れてインストールする。

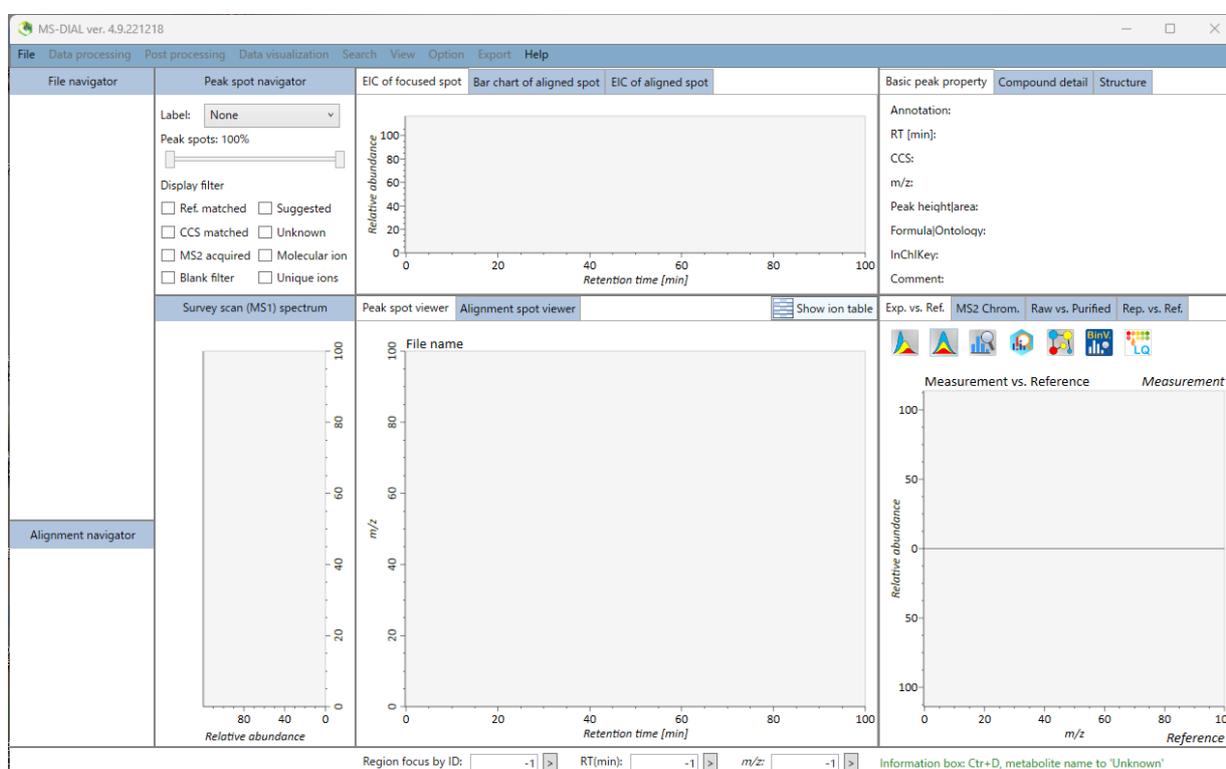
<https://docs.unidata.ucar.edu/netcdf-c/current/winbin.html>

- データ解析用フォルダーに、装置パラメータファイル T100GCv_35-600_5-32.med2 をコピー。

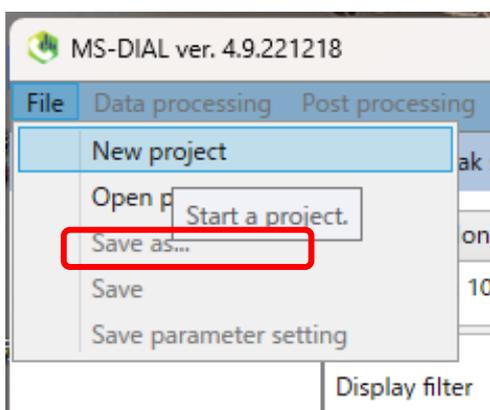
初回時、データと一緒に渡します。解析時に使用しますので、消さないでください。

- データ解析用フォルダーに、測定データ (.cdf) と RI 用 Alkanes データ (Alkanes.cdf) および RI 用テキストデータ (Alkane-Dictionary.txt) を収納するフォルダーを作成し、それらのデータを収納。フォルダー名は、測定日にしておくと、わかりやすい。

- 解凍したフォルダー内の MSDIAL.EXE をダブルクリックし、MS-DIAL を起動する。



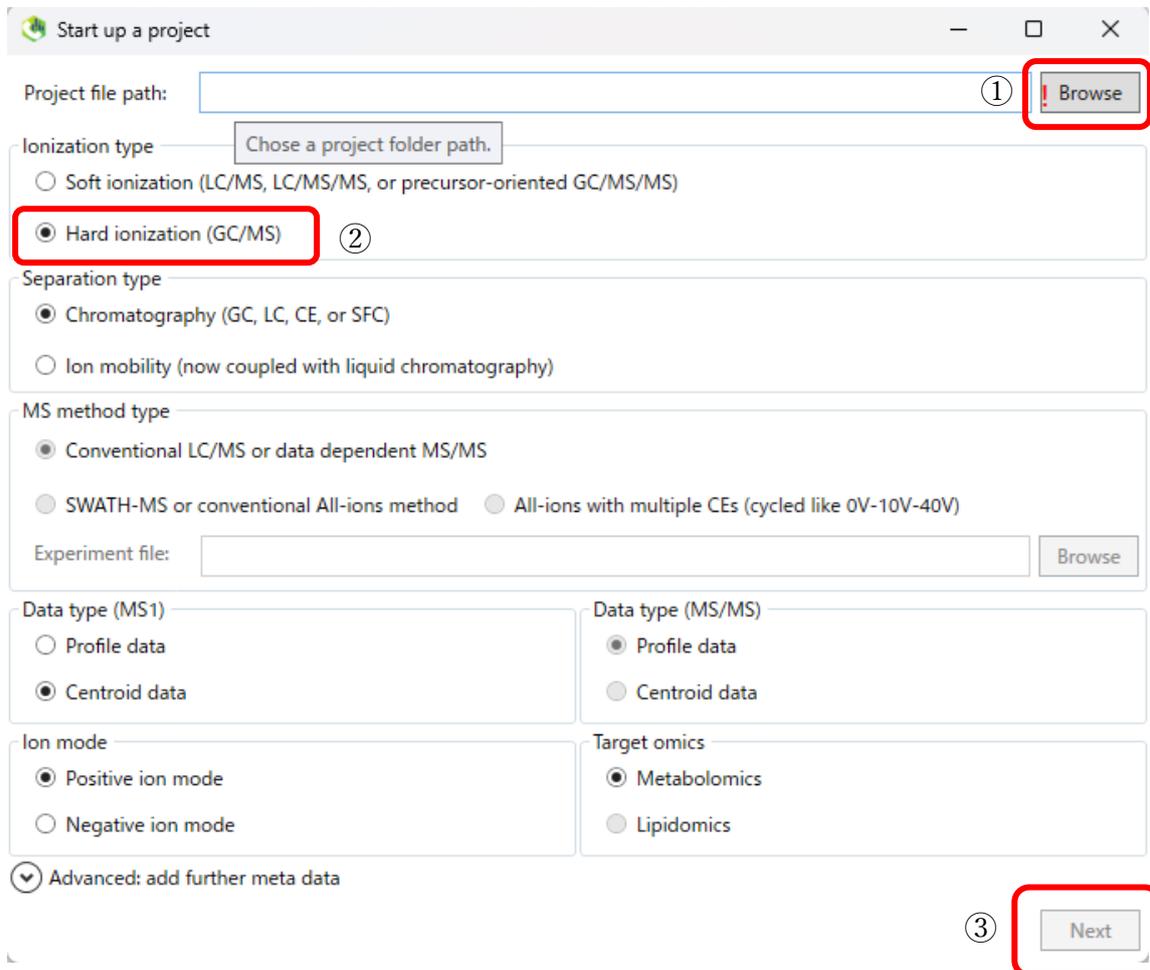
- メニュー File → New project (新規測定データの解析の場合)。



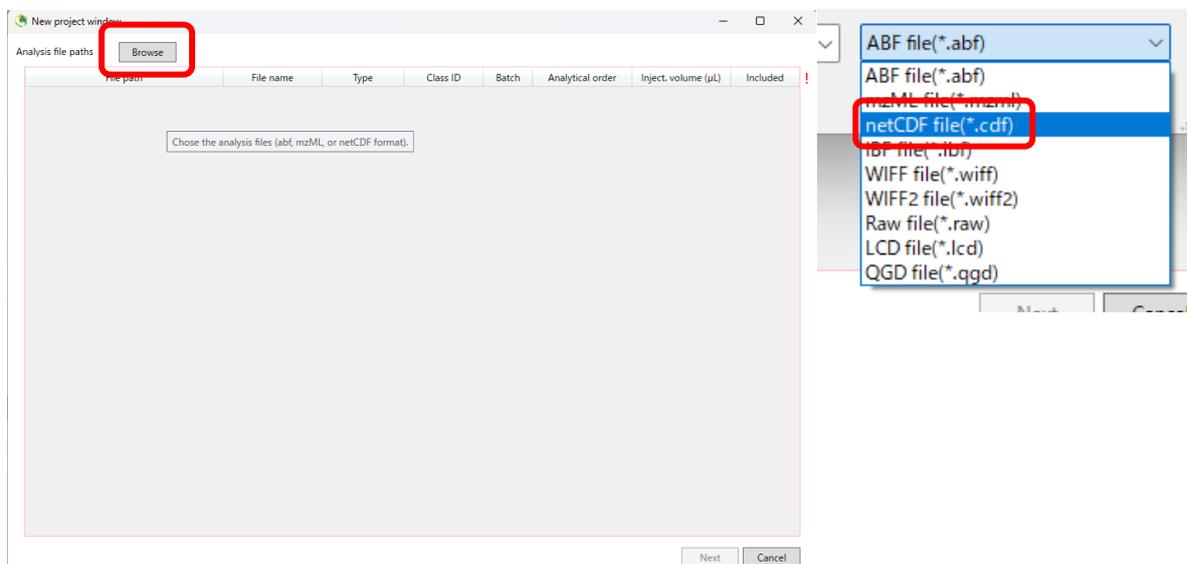
ポップアップした Start up a project ウィンドウ → Project file path の「Browse」をクリックし、6.で作成したフォルダーを指定する。

以前解析したデータは、Open project で開く。

10. 次に、Ionization type の Hard ionization(GC/MS)を選択し「Next」をクリック。

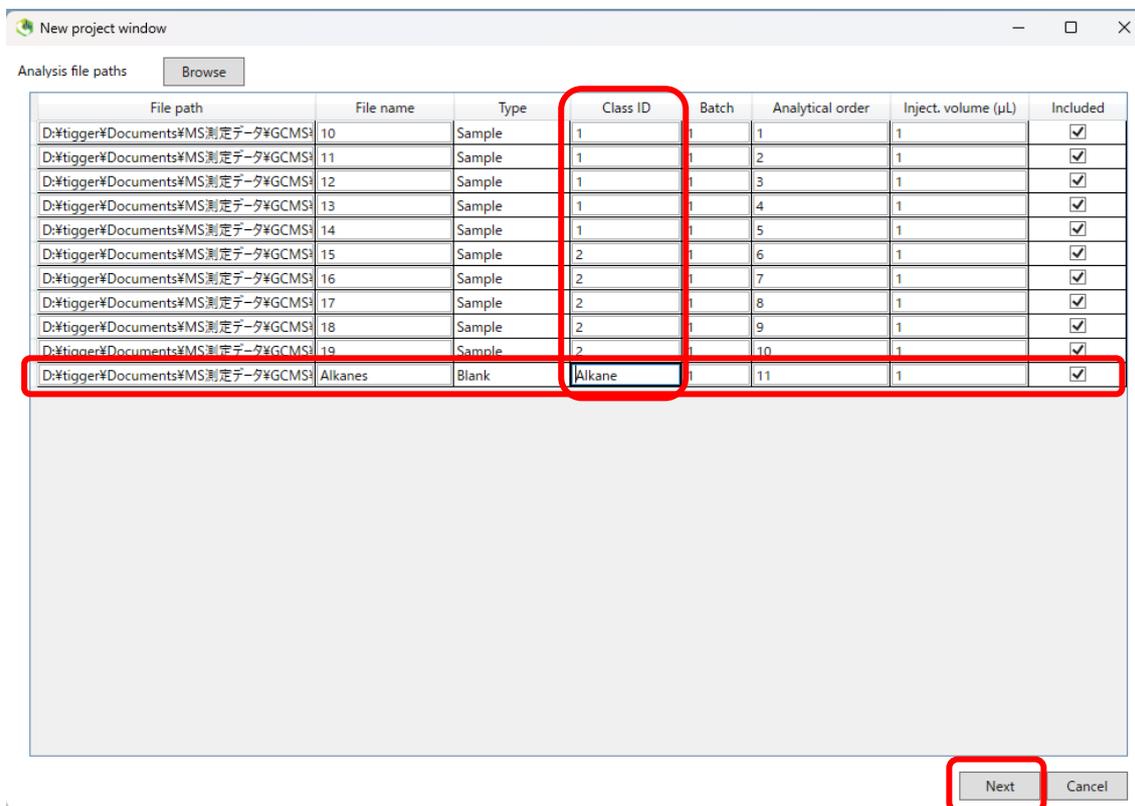


11. Analysis file paths→Browse をクリックし、ファイルの拡張子を netCDF file(*.cdf) に変更して、ファイルを選択し「開く」をクリック。Alkanes.cdf も忘れずに。Ctrl+A で全選択可能。



12. 読み込んだデータの各グループ（群）に対応した、Class ID に変更する。例えば、1, 2. あるいは WT、KO の様に。

Alkanes の Type を Sample から Blank へ変更。次いで、Class ID を Alkane に変更し、「Next」をクリックする。



13. ポップアップした Analysis parameter setting ウィンドウ→Data collection タブの最下部の「Load」をクリックし、T100GCv_35-600_5-32.med2 を選択。ひとつ上の階層に保存してある。

Analysis parameter setting

Data collection Peak detection MS1Dec Identification Alignment Filtering

Mass scan range

Mass range begin: 0 Da

Mass range end: 1000 Da

Advanced

Load Together with Alignment Finish Cancel

14. Identification タブの RI or RT:が Use retention index(RI)が選択されているのを確認し、Index file:の「Set」をクリックし、Carbon-RT(min) dictionary file path の「..」をクリックして、6.で指定したフォルダー内の Alkane-Dictionary.txt を選択。ファイル名の上でマウスの右ボタンをクリックし、プルダウンメニュー→「Auto fill」をクリック。すべてのファイルに指定し「Set」をクリック。
次に、MSP file:の「Browse」をクリックし、4.でダウンロードした GCMS DB-Public-KovatsRI-VS3.msp を選択。ひとつ上の階層に保存してある。

Analysis parameter setting

Data collection | Peak detection | MS1Dec | Identification | Alignment | Filtering

Retention time setting

RI or RT: Use retention index (RI) Use retention time (min)

Index file: Status: empty

Index type: Alkanes FAMEs

MSP file and identification setting

MSP file:

Retention index dictionary setting

File path	File name	Carbon-RT(min) dictionary file path
D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...	10	D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...
D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...	11	D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...
D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...	12	D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...
D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...	13	D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...
D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...	14	D:\tigger\Documents\MS測定データ\GCMS#2内\Merge_20220805\...
D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...	15	D:\tigger\Documents\MS測定データ\GCMS#2内\Merge_20220805\...
D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...	16	D:\tigger\Documents\MS測定データ\GCMS#2内\Merge_20220805\...
D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...	17	D:\tigger\Documents\MS測定データ\GCMS#2内\Merge_20220805\...
D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...	18	D:\tigger\Documents\MS測定データ\GCMS#2内\Merge_20220805\...
D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...	19	D:\tigger\Documents\MS測定データ\GCMS#2内\Merge_20220805\...
D:\tigger\Documents\MS測定データ\MSMS\MSMerge_20220805\...	Alkanes	D:\tigger\Documents\MS測定データ\GCMS#2内\Merge_20220805\...

15. Alignment タブの RI or RT:の Use retention index(RI)を選択し、「Finish」をクリックすると処理が始まる。

Analysis parameter setting

Data collection Peak detection MS1Dec Identification Alignment Filtering

Parameter setting

Result name: alignmentResult_2024_1_9_13_54_

Reference file: 10

RI or RT: Use retention index (RI) Use retention time (min)

Retention index tolerance: 20

Retention time tolerance: 0.075 min

El similarity tolerance: 70 %

Advanced

Load Together with Alignment **Finish** Cancel

16. Alignment navigator に表示されているファイルをダブルクリックし、ポップアップしたウィンドウの「OK」をクリックする。

17. Peak spot navigator→Display filter の Ref. matched にチェックを入れ、同定されたファイルのみを表示させる。「Show ion table」をクリックし、Alignment Table を開き、Metabolite Name Filter に 2-iso と入力すると、内部標準として加えた 2-Isopropylmalic acid のみが表示されるので、ID を控えておく。Alignment Table を閉じる。

Alignment Table

Num of rows: 1 Metabolite Name Filter: 2-isc Comment Filter: 38.02 Mz Range 558.34 5.1 RT Range 31.6

ID	RT(min)	RI	Quant mas	Fill %	Metabolite name	Comment	S/N	ANOVA P-value	Fold change (Max/Min)	BarChart
211	13.59	1568.2	147.0	0.91	2-Isopropylmalic acid; GC-EI-T		101.1	2.60E-01	1.21	

18. Option→file property setting を選択し、Alkanes の Included のチェックを外して「Finish」をクリック。

File property setting

File name	File type	Class ID	Batch	Analytical order	Injection volume (μL)	Y variable	Included
10	Sample	1	1	1	1	0	<input checked="" type="checkbox"/>
11	Sample	1	1	2	1	0	<input checked="" type="checkbox"/>
12	Sample	1	1	3	1	0	<input checked="" type="checkbox"/>
13	Sample	1	1	4	1	0	<input checked="" type="checkbox"/>
14	Sample	1	1	5	1	0	<input checked="" type="checkbox"/>
15	Sample	2	1	6	1	0	<input checked="" type="checkbox"/>
16	Sample	2	1	7	1	0	<input checked="" type="checkbox"/>
17	Sample	2	1	8	1	0	<input checked="" type="checkbox"/>
18	Sample	2	1	9	1	0	<input checked="" type="checkbox"/>
19	Sample	2	1	10	1	0	<input checked="" type="checkbox"/>
Alkanes	Blank	Alkane	1	11	1	0	<input type="checkbox"/>

19. Option→Alignment result property setting を選択し、Target ID の「-1」を内部標準の ID に変更し、その上でマウスの右ボタンをクリックしプルダウンメニューの「Auto fill」をクリック。すべてのファイルに指定し「Finish」をクリック。

Normalization property setting for alignmentResult_2024_1_9_13_54_36

Alignment ID	Retention index	RT [min]	Quant mass	Metabolite name	Target ID
0	976.4218	5.068	77.02301		211
1	980.5114	5.134	281.0531		-1
2	984.4051	5.197	221.0849		-1
3	985.0146	5.207	155.0938		-1
4	985.1142	5.209	147.0659		-1
5	988.8133	5.269	58	ETHYL-N-PROPYLAMINE; EI-B; MS	-1
6	994.4907	5.361	41.0406		-1
7	995.3861	5.375	57.08001	decane	-1
8	997.572	5.411	136.0365		-1
9	999.2925	5.439	117	Propylacetone	-1

20. Data visualization→Normalization を選択し、Internal standard を選択し「Done」をクリック。

Normalization for alignmentR...

Options

- None
- Internal standard
- LOWESS
- Internal standard + LOWESS
- SPLASH lipidomix
- Total ion chromatogram (TIC)
- mTIC: TIC of identified metabolites

Done

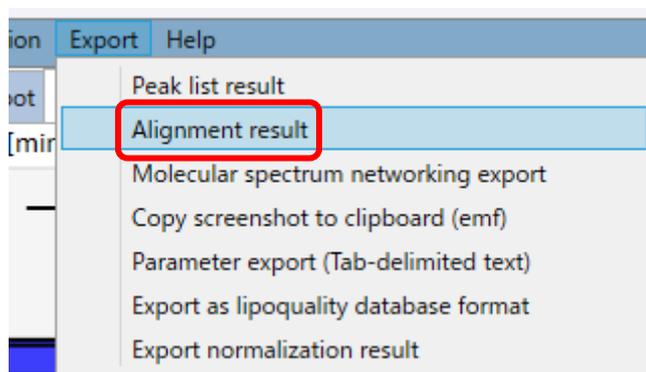
21. 「Show ion table」をクリックすると、簡易定量の結果が表示される。

ID	RT(min)	RI	Quant mas	Fill %	Metabolite name	Comment	S/N	ANOVA P-value	Fold change (Max/Min)	BarChart
5	5.27	988.8	58.0	0.91	ETHYL-N-PROPYLAMINE; EI-E		103.8	3.87E-02	2.67	
7	5.38	995.4	57.1	0.82	decane		11.2	5.54E-01	1.09	
9	5.44	999.3	117.0	0.91	Propyleneglycol		19.6	8.39E-01	1.12	
17	6.01	1034.2	152.0	0.91	2-Hydroxypyridine; GC-EI-TO		632.8	8.76E-02	1.31	
19	6.14	1042.4	93.0	0.91	BIS(2-CHLOROETHOXY)METH		173.2	6.71E-01	1.07	
20	6.24	1048.7	174.0	0.91	pyruvic acid		17.2	1.34E-02	2.13	
23	6.35	1055.0	147.0	0.91	propane-1,3-diol NIST		11.7	8.09E-01	1.04	
24	6.40	1058.5	73.0	0.91	2-Hydroxyisobutyric acid; GC		93.9	1.66E-01	1.43	
25	6.40	1058.5	147.0	0.91	lactic acid		410.2	1.70E-01	1.43	
29	6.67	1074.9	73.0	0.91	Glycolic acid; GC-EI-TOF; MS;		5.7	5.44E-01	1.27	
32	6.88	1088.0	72.0	0.82	DI-N-PROPYLAMINE; EI-B; M;		39.9	2.79E-01	1.43	
33	6.93	1090.7	154.0	0.91	maleimide		31.2	7.20E-01	1.32	
34	7.08	1100.0	131.0	0.91	2-hydroxybutanoic acid		46.2	4.23E-02	1.69	
35	7.08	1100.0	57.1	0.55	undecane		11.9	7.93E-01	1.05	
36	7.09	1100.4	116.0	0.91	L-Alanine; GC-EI-TOF; MS; 3 T		804.3	6.02E-01	1.29	

22. MetaboAnalyst を用いた解析のためのデータエクスポート。

Export→Alignment result を選択し、ポップアップした Alignment result export の「Browse」をクリック。エクスポート先のフォルダを選択する。

Raw data matrix(Height) と Normalized data matrix にチェックを入れ「Export」をクリックし、テキストファイルを出力する。



23. MetaboAnalyst で読み込ませるための、データフォーマット修正。

エクスポートしたテキストファイル(Normalized)を、Excel に読み込ませる。

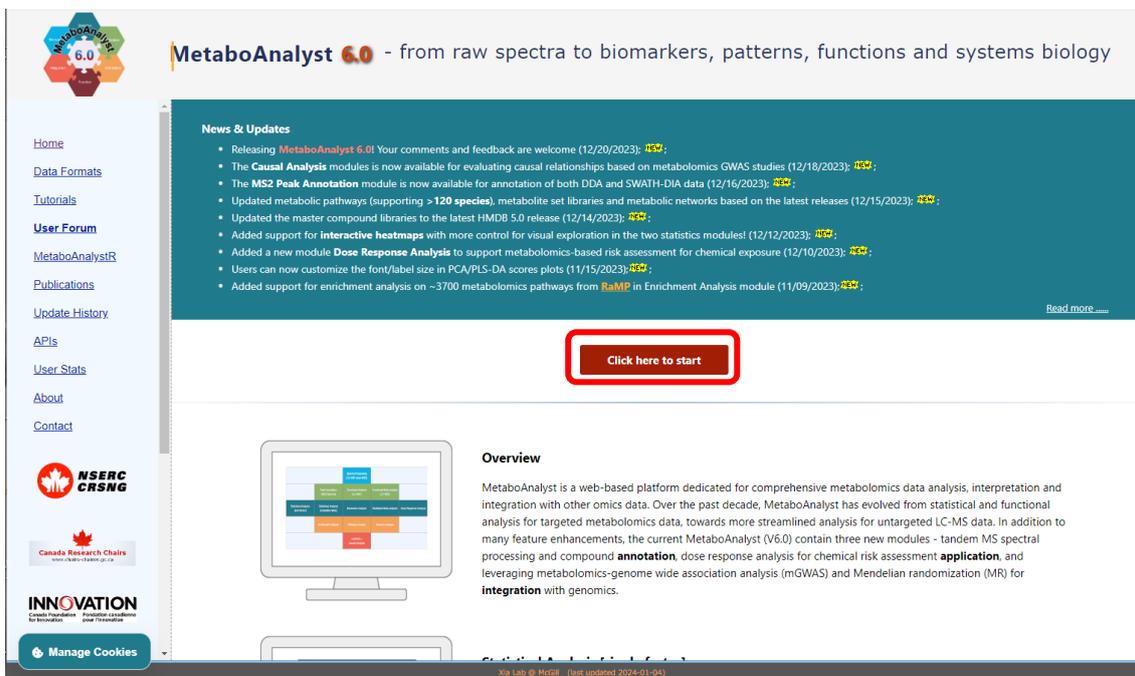
Metabolite、Sample 以外の column を消す (A-D、F-AB、AM-AS)。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z													
5	Alignment	Average	R	Average	R	Quant	ma	Metabolite	Fill	%	Reference	Reference	Formula	Ontology	INCHIKEY	SMILES	Annotatio	RT/Ri	mat	EI-MS	ma	Comment	Manually	Manually	Total	score	RT	similar	Ri	similar	Total	spec	Dot	produ	Reverse	di	Fragment	S/N	avea
6	0	5.068	976.42	77.02301	Unknown	0.909	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	4	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	31.08	
7	1	5.134	980.51	281.0531	Unknown	0.545	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	4	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	5.25	
8	2	5.197	984.41	221.0849	Unknown	0.909	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	4	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	122.02		
9	3	5.207	985.01	155.0938	Unknown	0.818	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	4	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	6.65		
10	4	5.209	985.11	147.0659	Unknown	0.909	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	4	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	9.35			
11	5	5.269	988.81	58	ETHYL-N	0.909	-1	988.18	C5H13N	Dialkylam	XCVNDBI	CCCCNC	440	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	85.8	null	100	76.4	74.3	67.6	100	103.77											
12	6	5.361	994.49	41.0406	Unknown	0.182	null	null	null	null	null	null	4	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	5.2				
13	7	5.375	995.39	67.08001	decane	0.818	-1	987	C10H22	Alkanes	DIOQZVSI	CCCCCCCC	440	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	88.6	null	81.4	93.5	94	89.4	100	11.21											
14	8	5.411	997.57	136.0365	Unknown	0.364	null	null	null	null	null	null	4	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	88.4	null	81.5	93.5	94	89.4	100	9.28											
15	9	5.439	999.29	117	Propylene	0.909	4.286	1002.01	C3H8O2	1,2-diols	DNIAPMS	CC(O)CO	440	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	88.4	7.3	98.8	81.5	70.6	88.5	100	19.6											

27. Web ブラウザーで、MetaboAnalyst を開く。

URL <https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/home.xhtml>

28. トップページ「Click here start」をクリックして「Module Overview」の「Statistical Analysis [one factor]」をクリック。



Module Overview

Input Data Type	Available Modules (click on a module to proceed, or scroll down to explore a total of 18 modules including utilities)				
LC-MS Spectra (mzML, mzXML or mzData)			Spectra Processing [LC-MS1 w/wo MS2]		
MS Peaks (peak list or intensity table)		Peak Annotation [MS2-DDA/DIA]	Functional Analysis [LC-MS1]	Functional Meta-analysis [LC-MS1]	
Generic Format (.csv or .txt table files)	Statistical Analysis [one factor]	Statistical Analysis [metadata table]	Biomarker Analysis	Statistical Meta-analysis	Dose Response Analysis
Annotated Features (metabolite list or table)		Enrichment Analysis	Pathway Analysis	Network Analysis	
Link to Genomics & Diseases (metabolite list)			Causal Analysis via mGWAS		

29. 「A plain text file (.txt or .csv) の「Data Type:」を Concentrations、「Format:」を Samples in columns (unpaired) を選択。「Data File:」の「+ Choose」をクリックし、保存した.csv を選択し、「Submit」をクリックし処理を進める。

Please upload your data

A plain text file (.txt or .csv): ?

Data Type: ① Concentrations Spectral bins Peak intensities

Format: ② ④

Data File: ③ Normalized_0_20240105.csv 18.3 KB

30. 「Data Integrity Check:」の画面でエラーが表示されなければ、「Proceed」をクリックし、先に進む。
エラーが表示された場合は、エラーの対応を行う。

Data Integrity Check:

1. Checking the class labels - at least three replicates are required in each class.
2. If the samples are paired, the pair labels must conform to the specified format.
3. The data (except class labels) must not contain non-numeric values.
4. The presence of missing values or features with constant values (i.e. all zeros).

Data processing information:

Checking data content ...passed.

Samples are in columns and features in rows.

The uploaded file is in comma separated values (.csv) format.

The uploaded data file contains 10 (samples) by 135 (compounds) data matrix.

Samples are not paired.

2 groups were detected in samples.

Only English letters, numbers, underscore, hyphen and forward slash (/) are allowed.

Other special characters or punctuations (if any) will be stripped off.

All data values are numeric.

2 features with a constant or single value across samples were found and deleted.

A total of 0 (0%) missing values were detected.

By default, missing values will be replaced by 1/5 of min positive values of their corresponding variables

Click the **Proceed** button if you accept the default practice;

Or click the **Missing Values** button to use other methods.

31. 「Normalization Overview:」の画面の「Data transformation」の Log transformation (base 10)を選択。「Data scaling」の Auto scaling を選択し、「Normalize」をクリック。

Quantile normalization (suggested only for > 1000 features)

Data transformation

None

Log transformation (base 10)

Square root transformation (square root of data values)

Cube root transformation (cube root of data values)

Data scaling

None

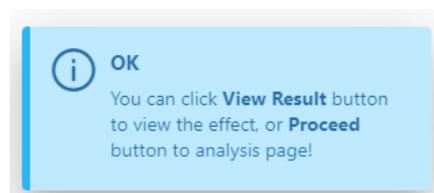
Mean centering (mean-centered only)

Auto scaling (mean-centered and divided by the standard deviation of each variable)

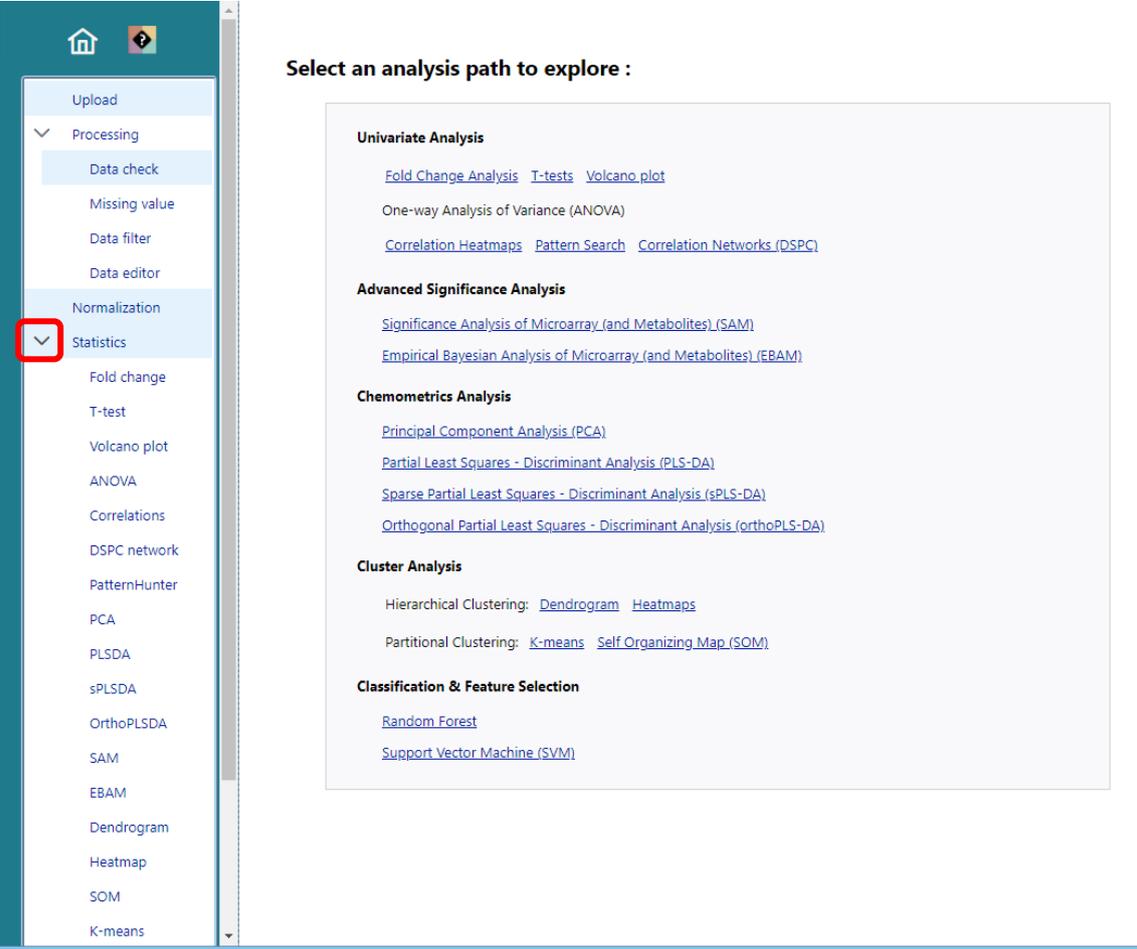
Pareto scaling (mean-centered and divided by the square root of the standard deviation of each variable)

Range scaling (mean-centered and divided by the range of each variable)

32. OK の表示が出たら、「Proceed」をクリックし、結果画面に移る。



33. 「Select an analysis path to explore:」の T-tests、Volcano plot や PCA などをクリックして結果を表示させる。あるいは、左のメニューの「> Statistics」の「>」をクリックするとメニューが展開するので、確認したい項目をクリックして表示する。



The image shows a web application interface. On the left is a vertical sidebar menu with a teal background. At the top of the sidebar are icons for home and help. Below are menu items: Upload, Processing (with a dropdown arrow), Data check, Missing value, Data filter, Data editor, Normalization, and Statistics (with a dropdown arrow highlighted by a red box). Under Statistics, there is a list of analysis methods: Fold change, T-test, Volcano plot, ANOVA, Correlations, DSPC network, PatternHunter, PCA, PLSDA, sPLSDA, OrthoPLSDA, SAM, EBAM, Dendrogram, Heatmap, SOM, and K-means. The main content area on the right is titled "Select an analysis path to explore:". It contains several sections of analysis methods:

- Univariate Analysis**
 - [Fold Change Analysis](#) [T-tests](#) [Volcano plot](#)
 - One-way Analysis of Variance (ANOVA)
 - [Correlation Heatmaps](#) [Pattern Search](#) [Correlation Networks \(DSPC\)](#)
- Advanced Significance Analysis**
 - [Significance Analysis of Microarray \(and Metabolites\) \(SAM\)](#)
 - [Empirical Bayesian Analysis of Microarray \(and Metabolites\) \(EBAM\)](#)
- Chemometrics Analysis**
 - [Principal Component Analysis \(PCA\)](#)
 - [Partial Least Squares - Discriminant Analysis \(PLS-DA\)](#)
 - [Sparse Partial Least Squares - Discriminant Analysis \(sPLS-DA\)](#)
 - [Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis \(orthoPLS-DA\)](#)
- Cluster Analysis**
 - Hierarchical Clustering: [Dendrogram](#) [Heatmaps](#)
 - Partitional Clustering: [K-means](#) [Self Organizing Map \(SOM\)](#)
- Classification & Feature Selection**
 - [Random Forest](#)
 - [Support Vector Machine \(SVM\)](#)