



Laboratório Ronsein de Proteômica
Instituto de Química
Universidade de São Paulo

Título: Roteiro para Análise de Dados de Proteômica DDA no Software MaxQuant	Ref.: MAXQUANT_DDA_002	Versão: 2
---	----------------------------------	------------------

Preparado por: Mariana P. Massafera	Data: 05/09/2025
-------------------------------------	------------------

OBJETIVOS

Workflow específico para identificação e quantificação de proteínas no software MaxQuant, para amostras processadas por nanoLC-MS/MS em abordagem **bottom-up¹**, **label-free**, e com aquisição de espectros em modo **Data-dependent acquisition**.

REFERÊNCIAS

- Cox, J. & Mann, M. [MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification](#). *Nature Biotechnology* 26, 1367–1372 (2008).
- Cox, J. et al. [Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ](#). *Molecular & Cellular Proteomics* 13, 2513–2526 (2014).
- Tyanova, S., Temu, T. & Cox, J. [The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics](#). *Nature Protocols* 11, 2301–2319 (2016).
- Tyanova, S. et al. [Visualization of LC-MS/MS proteomics data in MaxQuant](#). *PROTEOMICS* 15, 1453–1456 (2015).
- Schaab, C., Geiger, T., Stoeck, G., Cox, J. & Mann, M. [Analysis of High Accuracy, Quantitative Proteomics Data in the MaxQB Database](#). *Molecular & Cellular Proteomics* 11, M111.014068 (2012).
- Sinitcyn, P. et al. [MaxQuant goes Linux](#). *Nature Methods* 15, 401–401 (2018).
- Tutoriais online sobre o MaxQuant oferecidos nas várias edições da MaxQuant Summer School. Disponíveis em:
<<https://www.youtube.com/channel/UCKYzYTm1cnmc0CFAMhxDO8w/videos>>

¹ Digestão das proteínas com a enzima tripsina, alquilação dos resíduos de cisteínas livres com iodoacetamida.



OBSERVAÇÕES

As imagens apresentadas aqui referem-se à versão 2.6.3.0 do MaxQuant.

Os valores *default* da maioria dos parâmetros do software serão mantidos, e você só precisará ajustar poucos deles.

Na interface gráfica do software, ao passar o ponteiro do mouse sobre o nome do parâmetro, mostra-se uma caixa de texto explicando a função/detalhes do mesmo.

Antes de iniciar a busca/quantificação das proteínas, certifique-se de que você tem no PC: a) os arquivos brutos (ex: formatos ABSciex: *.wiff; MzXml: *.mzxml; Thermo: *.raw; Uimf: *.uimf; Agilent: *.d; Bruker: *.d) oriundos da análise das amostras no espectrômetro de massas; b) o arquivo fasta (formato *.fasta, descomprimido) contendo todas as proteínas do organismo em estudo (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, etc). Esse banco de dados pode ser baixado, por exemplo, do site Uniprot: <https://www.uniprot.org/>

Informações adicionais sobre a configuração da análise no MaxQuant podem ser encontradas em: https://cox-labs.github.io/coxdocs/MQ_FirstSteps.html

PROTOCOLO

1) Download do software MaxQuant

- a) Siga as instruções descritas em: <https://www.maxquant.org/>

2) Carregamento dos dados brutos

- a) Na parte superior do software, há seis guias. A primeira delas é “Raw data”. Nela, clique em “Load”² e selecione os arquivos que contém seus dados brutos. Você pode selecionar qualquer número de arquivos.

² Ou “Load folder” no caso de arquivos Agilent (*.d) e Bruker (*.d).

session1 - MaxQuant

File Tools Window Help

Raw data Group-specific parameters Global parameters Performance Visualization Configuration

Load Remove Write template Set experiment No fractions Set PTM

Load folder Change folder Read from file Set fractions Set parameter group Set reference channels

Experimental design file Edit experimental design

	File	Exists	Size	Data format	Parameter group	Experiment	Fraction	PTM	Reference channels
1	D:\DATA\MARIANA\240814_Testes curso analise dados BrProt\Dados sobre mouse liver RT e cold\Cold-Liver_LDLRKO1-01.raw	True	1 GB	Thermo raw...	Group 0	Cold-Liver_LDLRKO1-01		False	
2	D:\DATA\MARIANA\240814_Testes curso analise dados BrProt\Dados sobre mouse liver RT e cold\Cold-Liver_LDLRKO1-02.raw	True	1 GB	Thermo raw...	Group 0	Cold-Liver_LDLRKO1-02		False	
3	D:\DATA\MARIANA\240814_Testes curso analise dados BrProt\Dados sobre mouse liver RT e cold\Cold-Liver_LDLRKO2-01.raw	True	1 GB	Thermo raw...	Group 0	Cold-Liver_LDLRKO2-01		False	
4	D:\DATA\MARIANA\240814_Testes curso analise dados BrProt\Dados sobre mouse liver RT e cold\Cold-Liver_LDLRKO2-02.raw	True	1 GB	Thermo raw...	Group 0	Cold-Liver_LDLRKO2-02		False	
5	D:\DATA\MARIANA\240814_Testes curso analise dados BrProt\Dados sobre mouse liver RT e cold\Cold-Liver_LDLRKO3-01.raw	True	1 GB	Thermo raw...	Group 0	Cold-Liver_LDLRKO3-01		False	
6	D:\DATA\MARIANA\240814_Testes curso analise dados BrProt\Dados sobre mouse liver RT e cold\Cold-Liver_LDLRKO3-02.raw	True	1 GB	Thermo raw...	Group 0	Cold-Liver_LDLRKO3-02		False	
7	D:\DATA\MARIANA\240814_Testes curso analise dados BrProt\Dados sobre mouse liver RT e cold\RT-Liver_LDLRKO1-01.raw	True	1 GB	Thermo raw...	Group 0	RT-Liver_LDLRKO1-01		False	
8	D:\DATA\MARIANA\240814_Testes curso analise dados BrProt\Dados sobre mouse liver RT e cold\RT-Liver_LDLRKO1-02.raw	True	1 GB	Thermo raw...	Group 0	RT-Liver_LDLRKO1-02		False	
9	D:\DATA\MARIANA\240814_Testes curso analise dados BrProt\Dados sobre mouse liver RT e cold\RT-Liver_LDLRKO2-01.raw	True	1 GB	Thermo raw...	Group 0	RT-Liver_LDLRKO2-01		False	
10	D:\DATA\MARIANA\240814_Testes curso analise dados BrProt\Dados sobre mouse liver RT e cold\RT-Liver_LDLRKO2-02.raw	True	1 GB	Thermo raw...	Group 0	RT-Liver_LDLRKO2-02		False	
11	D:\DATA\MARIANA\240814_Testes curso analise dados BrProt\Dados sobre mouse liver RT e cold\RT-Liver_LDLRKO3-01.raw	True	1 GB	Thermo raw...	Group 0	RT-Liver_LDLRKO3-01		False	
12	D:\DATA\MARIANA\240814_Testes curso analise dados BrProt\Dados sobre mouse liver RT e cold\RT-Liver_LDLRKO3-02.raw	True	1 GB	Thermo raw...	Group 0	RT-Liver_LDLRKO3-02		False	

- b) Selecione todos os arquivos carregados, e clique em “No fractions”³ para preencher a coluna “Experiment” automaticamente com os nomes das amostras (alternativamente, você pode preencher os nomes um a um, selecionando a amostra respectiva e clicando em “Set experiment”).

3) Aba “Group-specific parameters”

- Type: aqui especifica-se o tipo de experimento realizado (Standard, DIA, TMT, SILAC, etc). No nosso caso, manter “Standard” (que refere-se a experimento de tipo DDA).
- Digestion: especificar a(s) protease(s) empregada(s).
- Modifications: manter as seleções default caso tenha feito alquilação das cisteínas livres com iodoacetamida. Caso tenha interesse em analisar modificações pós-translacionais (PTMs) específicas, incluir as modificações desejadas em “variable modifications”.
- Label-free quantification: alterar de “None” para “LFQ”, mantendo os demais parâmetros inalterados.⁴

³ Válido no caso de as amostras não terem sido fracionadas (bandas de gel, HPLC *offline*, etc).

⁴ São necessários pelo menos dois arquivos brutos para o processamento da quantificação relativa LFQ.



session1 - MaxQuant

File Tools Window Help

Raw data Group-specific parameters Global parameters Performance Visualization Configuration

Group 0 Type Digestion Cross links Instrument First search

Andromeda Modifications Label-free quantification Misc.

Parameter group: Parameter section

Label-free quantification

LFQ

LFQ min. ratio count 2

LFQ min. ratio count DIA 3

LFQ prioritize MS1 DIA ☒

Normalization type Classic

Classic LFQ for single shots ☒

Fast LFQ ☒

LFQ min. number of neighbors 3

LFQ average number of neighbors 6

Use peptide correlation ☒

Top N correlating peptides 100

Peptide correlation 0

4) Aba "Global parameters"

- Sequences: clicar em "Add" para selecionar o banco de dados (arquivo *.fasta, descomprimido). Clicar sequencialmente em "Identifier rule", "Description rule", "Taxonomy rule", "Taxonomy ID" e "Variation rule", selecionando/indicando os parâmetros adequados (quando houver). Por fim, clique em "Test" para verificar se o banco de dados foi corretamente cadastrado (as 100 primeiras proteínas do banco serão mostradas – atente-se para que o nome das proteínas esteja aparecendo na última coluna – isso indica que o software está realizando a leitura do banco de forma correta).



session1 - MaxQuant

File Tools Window Help

Raw data Group-specific parameters Global parameters Performance Visualization Configuration

Sequences Protein quantification Tables MS/MS analyzer Advanced

Identification Label free quantification Folder locations MS/MS fragmentation

Parameter section

Fasta files

Add Remove Change folder Identifier rule Description rule Taxonomy rule Taxonomy ID

Variation rule Test

	Fasta file path	Exists	Identifier rule	Description rule	Taxonomy rule	Taxonomy ID	Organism	Variation rule
1	D:\DATABASE\240814_uniprofkb_mus_musc...	True	%T%T%T%	%T%		10090	Mus musculus	%T%T%T%T%T%

1 item 1 selected

Include contaminants ☒

Min. peptide length 7

Max. peptide mass [Da] 6000

Min. peptide length for unspecific search 8

Max. peptide length for unspecific search 25

Variation mode None

Testing parse rules

Min. entry 1 Max. entry 100

	Header	Sequence	Identifier	Description	Taxonomy ID	Variation
1	>sp A0A087VVF7 AUTS2_MOUSE Autism s...	MDGPTRGHGL...	A0A087VVF7	sp A0A087VVF7...		Autism suscept...
2	>sp A0A088MLT8 IQIP1_MOUSE IQCJ-SCH...	MRLEELKRLQ...	A0A088MLT8	sp A0A088MLT...		IQCJ-SCHIP1 r...
3	>sp A0A084J1F4 ARRD4_MOUSE Arrestin d...	MGGEAGADG...	A0A084J1F4	sp A0A084J1F...		Arrestin domain...
4	>sp A0A084J1G0 FCG3A_MOUSE Low affin...	MHVQLLFTAL...	A0A084J1G0	sp A0A084J1G...		Low affinity imm...
5	>sp A0A084J1N3 GPI5L_MOUSE Protein G...	MRLALSLGLLC...	A0A084J1N3	sp A0A084J1N...		Protein GPI5...
6	>sp A0A0G2JDV3 GBP6_MOUSE Guanylate...	MTQPQMAPIC...	A0A0G2JDV3	sp A0A0G2JDV...		Guanylate-bind...
7	>sp A0A0U1RPR8 GUC2D_MOUSE Guanya...	MAGLQQGCHF...	A0A0U1RPR8	sp A0A0U1RPR...		Guanylate cycl...
8	>sp A0A140L88 ANKR31_MOUSE Ankyrin rep...	MENGAEASDC...	A0A140L88	sp A0A140L88...		Ankyrin repeat d...
9	>sp A0A140LIF8 IRGM2_MOUSE Immunity-r...	MEEAVESPEV...	A0A140LIF8	sp A0A140LIF...		Immunity-relate...
10	>sp A0A1D9BZF0 GICNA_MOUSE Germ cell...	MDSGSSSSSS...	A0A1D9BZF0	sp A0A1D9BZF...		Germ cell nucle...
11	>sp A0A1H2P872 INOVA2_MOUSE RNA-bin...	MEPEAPDSRK...	A0A1H2P872	sp A0A1H2P87...		RNA-binding pr...
12	>sp A0A2R8VHR8 DDIT3_MOUSE DDIT3 u...	MLKMSGVHQR...	A0A2R8VHR8	sp A0A2R8VHR...		DDIT3 upstream...
13	>sp A0A494BA31 E3A4_MOUSE Anion exch...	MKLPQGQDDE...	A0A494BA31	sp A0A494BA3...		Anion exchange...
14	>sp A0A5F8MPU3 CTSR1_MOUSE Cation c...	MELPPGNRR...	A0A5F8MPU3	sp A0A5F8MPU...		Cation channel...
15	>sp A0A5K7RLP0 MEIOS_MOUSE Meiosis i...	MLGSDKFSCF...	A0A5K7RLP0	sp A0A5K7RLP...		Meiosis initiat...
16	>sp A0JNT9BICL1_MOUSE BICD family-like...	MSAFCLGLAG...	A0JNT9	sp A0JNT9BIC...		BICD family-like...
17	>sp A0JNU3ILPP60_MOUSE 60 kDa lysopho...	MARAMGPERR...	A0JNU3	sp A0JNU3ILP...		60 kDa lysopho...
18	>sp A1A546ISX_MOUSE Intestine-specific h...	MAGPTIHRDM...	A1A546	sp A1A546ISX...		Intestine-specif...
19	>sp A1A547IPCRP1_MOUSE Pesticidin r...	MI VSHIDHPKM...	A1A547	sp A1A547IPCR...		Pesticidin r...

0 items 100%

b) Identification: em “Min. peptides” alterar para 2, e em “Min. unique peptides” alterar para 1. Ativar a opção “Match between runs” para transferência de identificações entre amostras (opção válida apenas quando se tem amostra semelhantes entre si: mesmo organismo, mesmo método de preparo, mesmo compartimento celular, e etc).



session1 - MaxQuant

File Tools Window Help

Raw data Group-specific parameters Global parameters Performance Visualization Configuration

Sequences Protein quantification Tables MS/MS analyzer Advanced

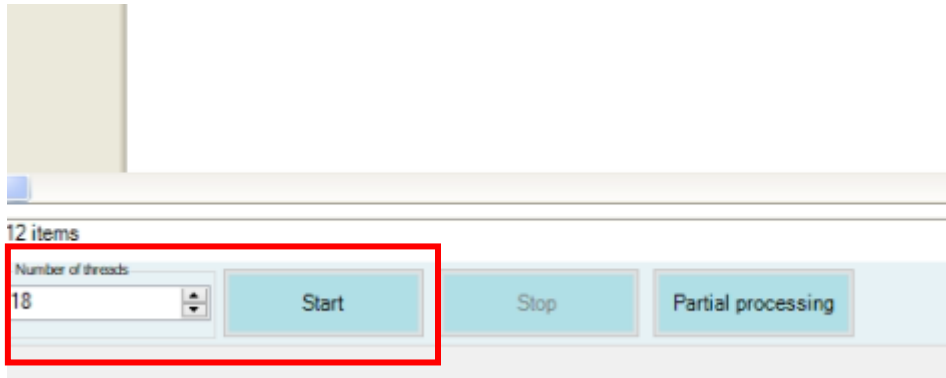
Identification Label free quantification Folder locations MS/MS fragmentation

Parameter section

PSM FDR	0.01
Protein FDR	0.01
Site decoy fraction	0.01
Min. peptides	2
Min. razor + unique peptides	1
Min. unique peptides	1
Min. score for unmodified peptides	0
Min. score for modified peptides	40
Min. delta score for unmodified peptides	0
Min. delta score for modified peptides	6
Main search max. combinations	200
Base FDR calculations on delta score	☐
Razor protein FDR	☒
Split protein groups by taxonomy ID	☒
	Level Species
PSM FDR Crosslink	0.01
Second peptides	☒
Match between runs	☒
	Match time window [min] 0.4
	Match ion mobility window [ir] 0.05
	Alignment time window [min] 20
	Alignment ion mobility window 1
	Match unidentified features ☐
Dependent peptides	☐

5) Iniciar a análise

- Na parte inferior esquerda da tela, indicar o número de processadores do computador a serem utilizados, e clicar em "Start". Em seguida, você poderá monitorar o progresso da análise na guia "Performance". Uma janela pop-up dizendo "Done" aparecerá quando o MaxQuant terminar o processamento.



6) Resultados

- a) Todos os arquivos de resultados aparecerão na pasta ...\\combined\\txt como arquivos de texto delimitados por tabulações. Um documento pdf com uma descrição de todas as colunas em todas as tabelas será gravado em...\\combined\\txt\\tables.pdf.

» USUARIOS RONSEIN LAB (D:) » DATA » MARIANA » 240814_Testes curso analise dados BrProt » Dados sobre mouse liver RT e cold » combined » txt

Nome	Data de modificação	Tipo	Tamanho
 evidence.txt	8/16/2024 6:24 PM	Arquivo TXT	60,823 KB
 matchedFeatures.txt	8/16/2024 6:24 PM	Arquivo TXT	0 KB
 modificationSpecificPeptides.txt	8/16/2024 6:24 PM	Arquivo TXT	7,361 KB
 ms3Scans.txt	8/16/2024 6:24 PM	Arquivo TXT	0 KB
 msms.txt	8/16/2024 6:24 PM	Arquivo TXT	211,587 KB
 msmsScans.txt	8/16/2024 6:25 PM	Arquivo TXT	184,627 KB
 mzRange.txt	8/16/2024 6:25 PM	Arquivo TXT	1,748 KB
 Oxidation (M)Sites.txt	8/16/2024 6:24 PM	Arquivo TXT	118 KB
 parameters.txt	8/16/2024 6:24 PM	Arquivo TXT	4 KB
 peptides.txt	8/16/2024 6:24 PM	Arquivo TXT	8,056 KB
 proteinGroups.txt	8/16/2024 6:24 PM	Arquivo TXT	3,107 KB
 summary.txt	8/16/2024 6:24 PM	Arquivo TXT	6 KB
 tables.pdf	8/16/2024 6:24 PM	Documento do A...	52 KB

- b) Na aba “Visualization” é possível inspecionar cromatogramas, espectros MS1, MS2, modificações, etc.

