
基于GraphPad Prism软件实现非线性拟合

作者：周支瑞 来源：解说国自然

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/statistics/5863.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

基于GraphPadPrism软件实现非线性拟合。本文详细讲解了基础实验数据中非线性拟合的实现方法。这里“非线性拟合”或许名词太过于专业，对于很多读者来说可能有些陌生，但我想很多读者有过制作标准曲线的经历，这也是一种“曲线拟合”，举一个略显复杂的例子，我们需要根据下面的方程来拟合曲线并计算某化学药物的半数抑制浓度(IC50)，方程如下： $Y=Bottom+(Top-Bottom)/(1+10^{((LogIC50-X)*HillSlope)})$ ，该方程已不再是简单的线性关系，其中有四个参数：Top、Bottom、IC50和HillSlope，如果要确定方程中的这四个参数，我们首先需要在二维坐标系中获得适量的坐标点，然后找到一条最佳的曲线，让这条曲线尽可能通过所有的点，曲线一旦确定那么这几个参数就确定了，则可得到IC50的值。读者朋友们面临的问题可能比这更复杂，但处理原则是类似的。下面我们就以案例的形式为大家演示曲线拟合的过程，本案例的数据来自笔者本人的研究数据[1]，为了便于读者阅读和理解，笔者对数据进行了简化处理。

【案例1】计算药物IC50。乳腺癌细胞接种于96孔板中，每孔接种数量一致。待细胞贴壁后我们使用不同浓度梯度的药物A(0~800 $\mu\text{mol/L}$)处理乳腺癌细胞24小时，然后通过CCK-8法测定各接种细胞孔的吸光度值，吸光度值越大表示存活细胞越多。我们的实验目的是拟合剂量-存活曲线并计算药物的IC50值。以0

$\mu\text{mol/L}$ 药物处理孔的细胞的存活率为1，其他各浓度的吸光度值与0 $\mu\text{mol/L}$ 药物孔的比值即为相对存活率。根据药物浓度与对应的相对存活率在二维坐标系中描点，按照 $Y=Bottom+(Top-Bottom)/(1+10^{((LogIC50-X)*HillSlope)})$ 方程拟合剂量存活曲线，计算方程中的参数。该实验在相同的条件下进行了三次独立的重复实验，假定每次独立重复实验设有3个复孔，那每个药物浓度应该有9个测量数据，本案例中我们对数据进行了简化处理，仅选择了三次独立重复实验的单个培养孔的吸光度值并计算相对存活率。试剂空白对照设置等实验操作细节可参考CCK-8试剂盒的说明书，本案例重点讲解数据处理与统计分析过程。数据整理如下表1所示。

表1.不同药物A浓度梯度处理乳腺癌细胞的相对存活率

A浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	相对存活率		
	S1	S2	S3
0.00	1.0000	1.0000	1.0000
0.02	1.0696	1.0037	0.9676
0.04	1.2205	1.0293	1.0466
0.10	0.8201	0.9354	0.9449
0.20	0.8158	0.8401	0.8886
0.40	0.9156	0.9549	0.9711
0.60	1.0326	0.9819	0.9245
1.00	0.8324	0.8647	0.8038
10.00	0.4240	0.4259	0.4717
100.00	0.1739	0.1298	0.1027
200.00	0.0064	0.0113	0.0055
400.00	0.0199	0.0192	0.0121
800.00	0.0014	0.0013	0.0048

接下来我们将表1中的数据按照如下图1~图3所示操作步骤录入Graphpad Prism 7.0 软件(San Diego, CA, USA)并绘制散点图，初步判断曲线形状。接下来的分析策略是通过绘制的散点图进行曲线拟合。第一步，我们首先对A的浓度进行对数转换，生成新的数据集，如图4~图6所示。使用新生成的数据集拟合曲线并计算IC50，如图7~图11所示。

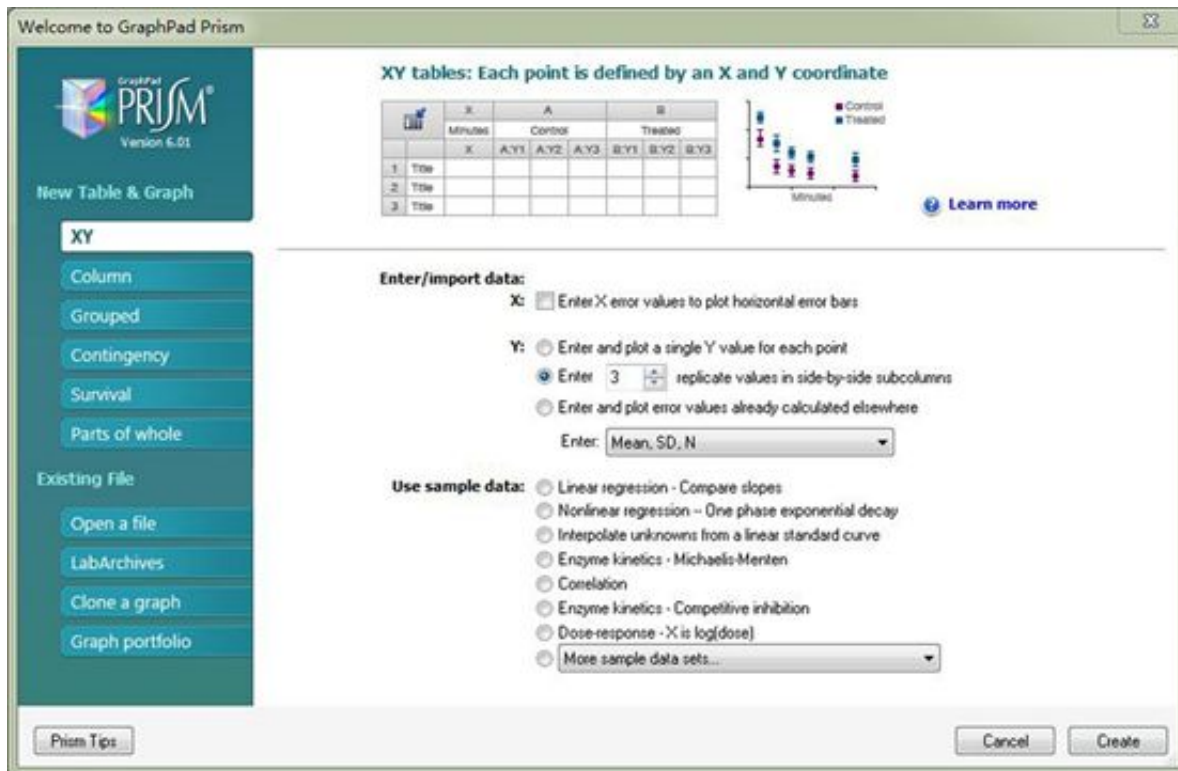


图1. 新建数据框。依次选择“XY” - “Enter/importdata”选择第二行填入数字“3”，表示每组有3个独立样本或3次独立重复实验数据。

Table format		X	Group A			
XY		药物A (μM)	相对存活率			
		X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	B:Y1
1	Title	0.00	1.0000	1.0000	1.0000	
2	Title	0.02	1.0696	1.0037	0.9676	
3	Title	0.04	1.2205	1.0293	1.0466	
4	Title	0.10	0.8201	0.9354	0.9449	
5	Title	0.20	0.8158	0.8401	0.8886	
6	Title	0.40	0.9156	0.9549	0.9711	
7	Title	0.60	1.0326	0.9819	0.9245	
8	Title	1.00	0.8324	0.8647	0.8038	
9	Title	10.00	0.4240	0.4259	0.4717	
10	Title	100.00	0.1739	0.1298	0.1027	
11	Title	200.00	0.0064	0.0113	0.0055	
12	Title	400.00	0.0199	0.0192	0.0121	
13	Title	800.00	0.0014	0.0013	0.0048	

图2. 录入数据。

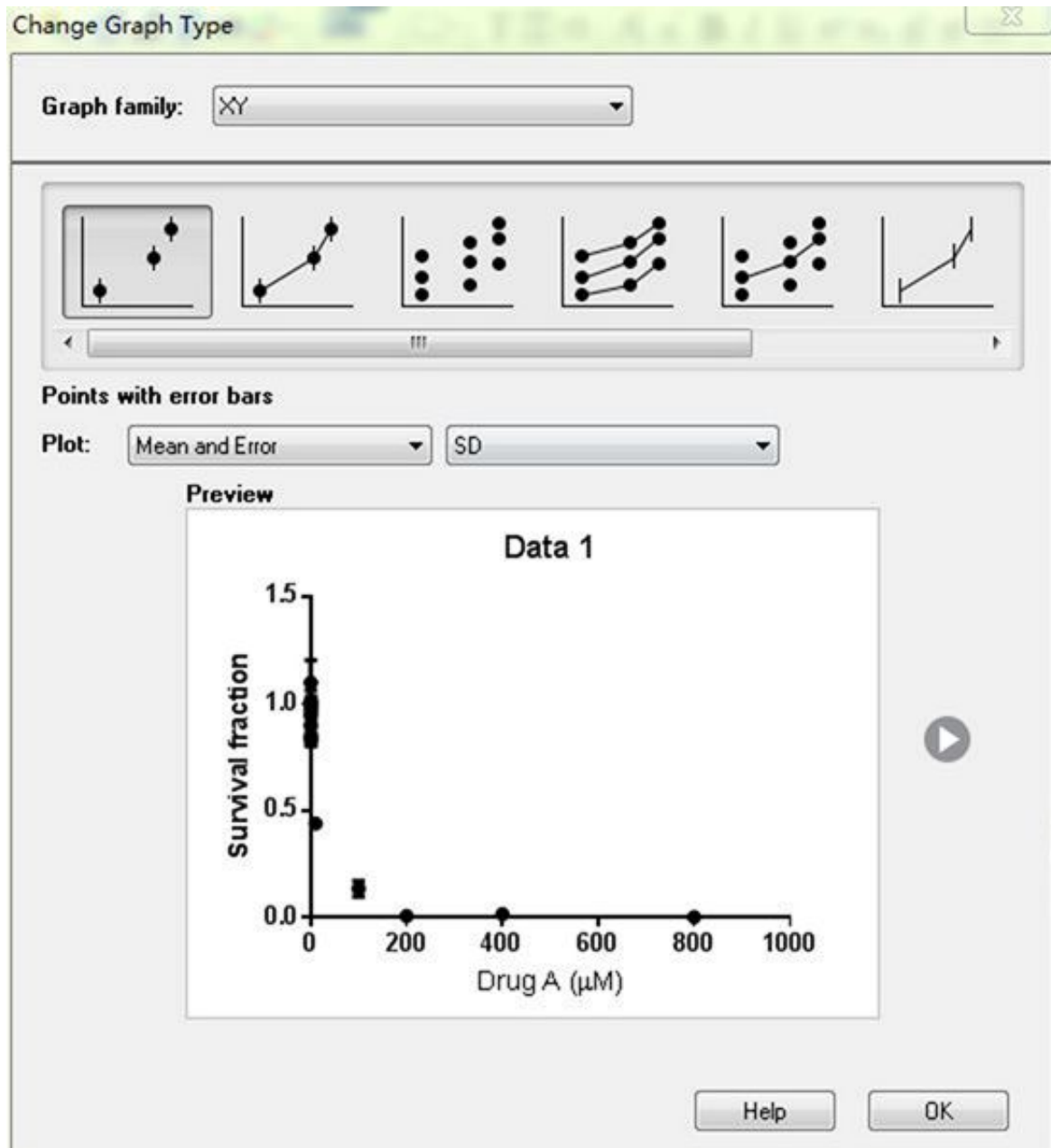


图3. 选择绘制散点图。如图示选择绘制图形类型设置误差线表示标准差(SD)点击“OK”

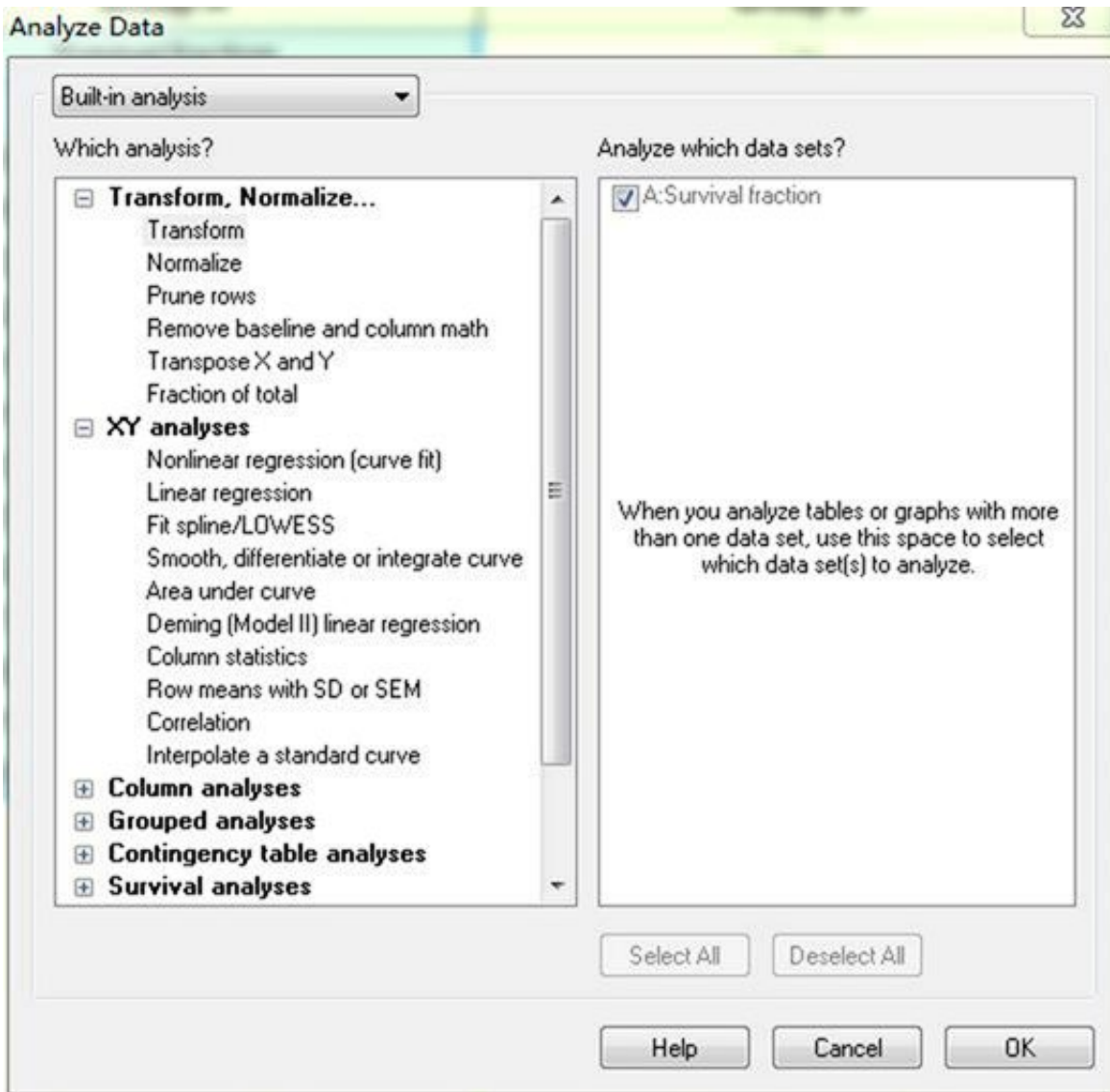


图4. 对药物浓度进行对数转换。如图示依次选择“Analyze” - “Transform” 点击“OK”。

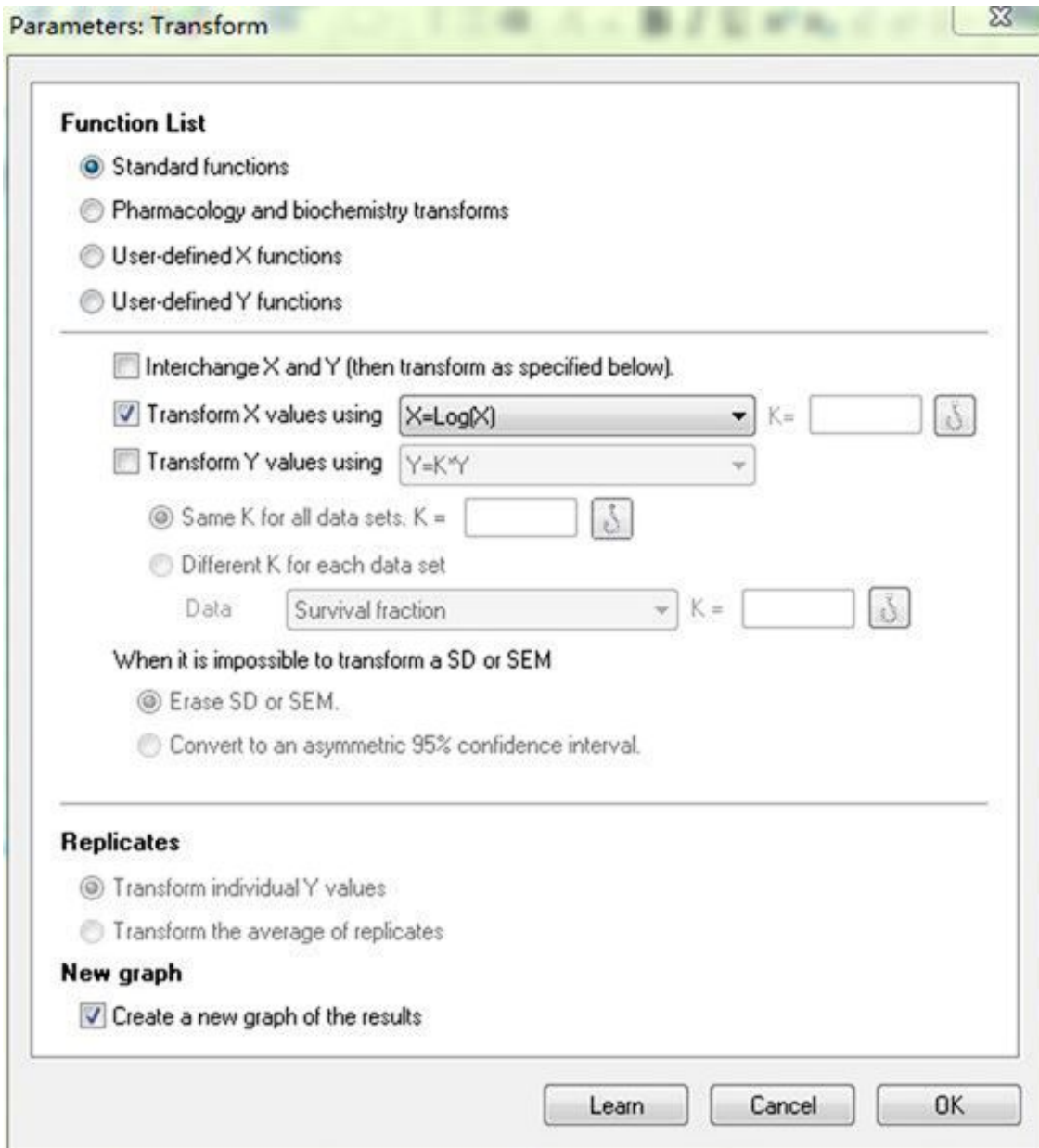


图5. 对药物浓度进行对数转换。如图示操作，勾选“Standardfunction”-“TransformX values using”选择对数转换公式勾选“Newgraph”复选框点击“OK”。

	X	A			
	药物A (μM)	存活率			
	X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	B:Y1
1		1.000	1.000	1.000	
2	-1.699	1.070	1.004	0.968	
3	-1.398	1.221	1.029	1.047	
4	-1.000	0.820	0.935	0.945	
5	-0.699	0.816	0.840	0.889	
6	-0.398	0.916	0.955	0.971	
7	-0.222	1.033	0.982	0.925	
8	0.000	0.832	0.865	0.804	
9	1.000	0.424	0.426	0.472	
10	2.000	0.174	0.130	0.103	
11	2.301	0.006	0.011	0.005	
12	2.602	0.020	0.019	0.012	
13	2.903	0.001	0.001	0.005	
14					

图6. 对药物浓度进行对数转换后新生成的数据集。

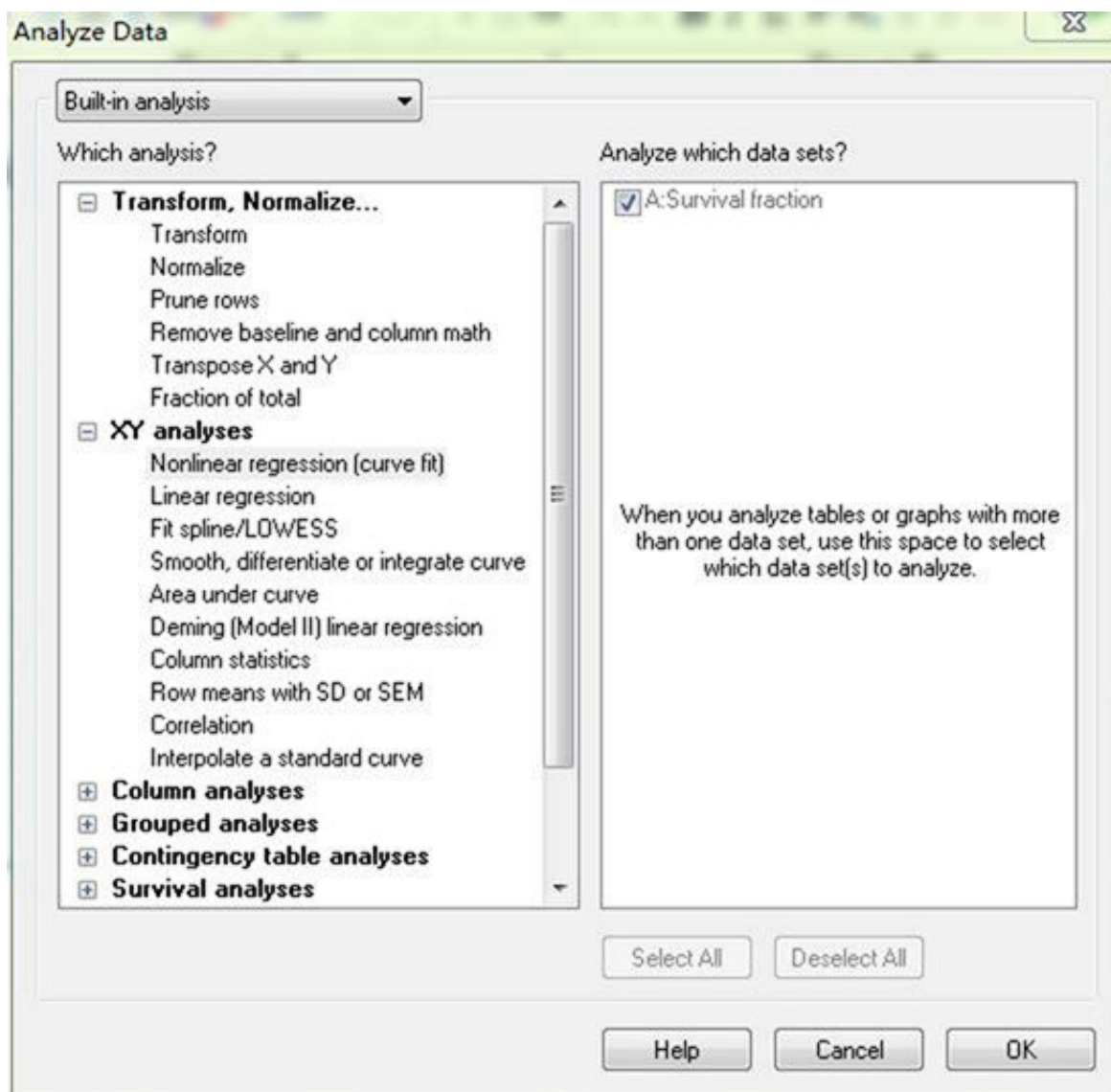


图7. 非线性拟合。如图示依次选择“Analyze” “XYanalyses” “Nonlinear regression (curvefit)” 点击“OK”。

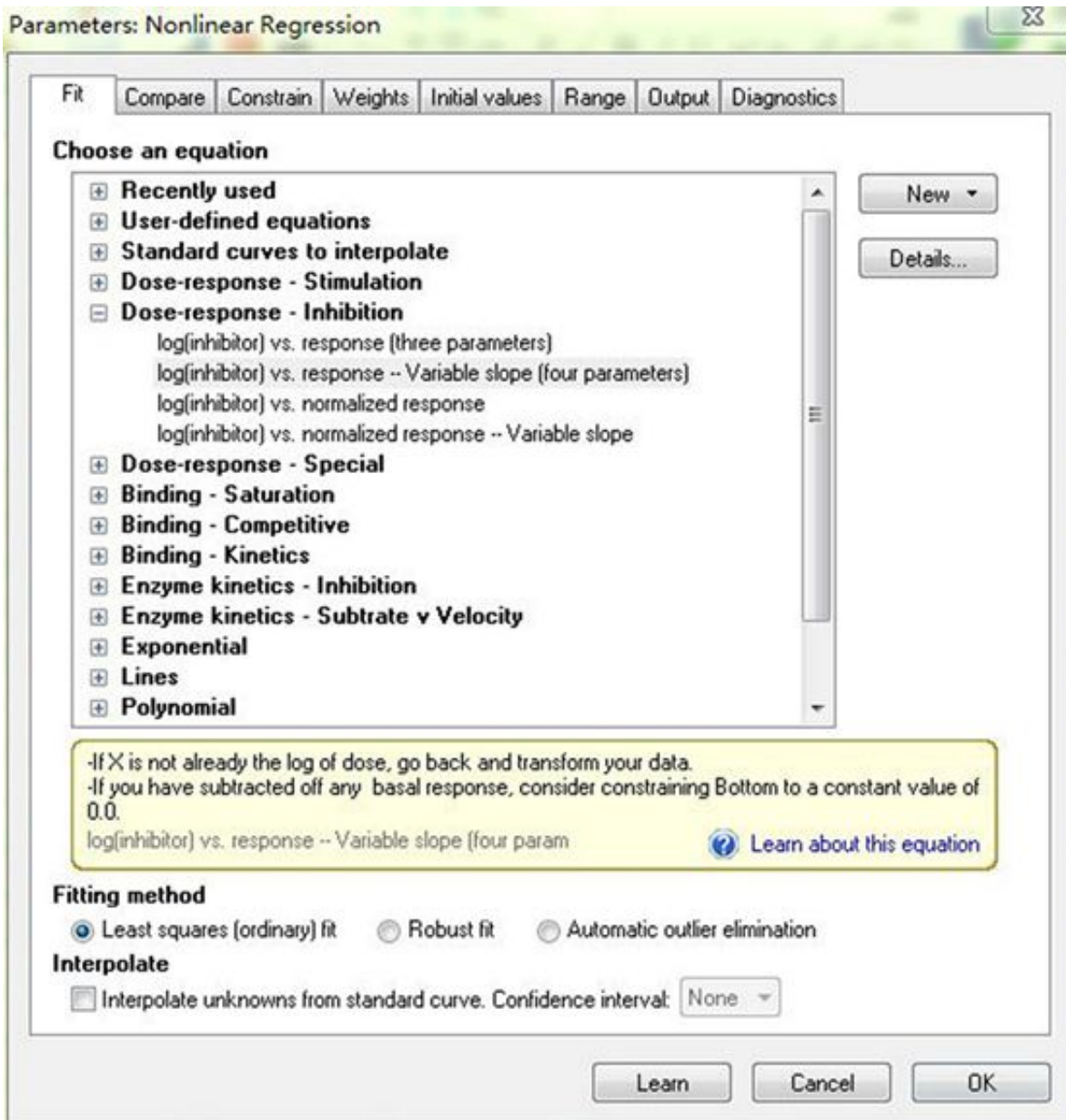


图8. 非线性拟合。如图示依次选择“Fit” “Choose an equation” “Dose-response-Inhibition” “log(inhibitor) vs. response--Variable slope (four parameters)” 点击“OK”。其他选项默认。假定如果读者想通过某一药物浓度计算存活率，可以勾选“Interpolate”。

注意：此处软件提供了四个公式，笔者推荐选择第二个公式，即“log(inhibitor) vs. response--Variable slope (four parameters)”。选择第一个公式的操作与本例类似，选择其他公式与本例操作不同，读者可自行尝试。

Built-in Equation

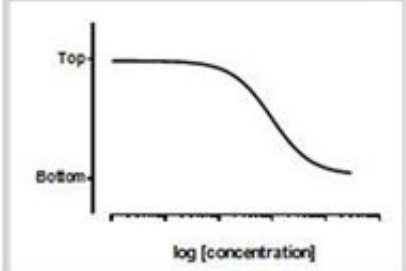
Equation Rules for Initial Values Default Constraints Transforms to Report

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)

Tip: -If X is not already the log of dose, go back and transform your data.
-If you have subtracted off any basal response, consider constraining Bottom to a constant value of 0.0.

X: log of dose or concentration
Y: Response, decreasing as X increases
Top and Bottom: Plateaus in same units as Y.
logIC50: same log units as X
HillSlope: Slope factor or Hill slope, unitless.

$$Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{((\text{LogIC50} - X) \cdot \text{HillSlope})}}$$



Clone this equation Learn about this equation Close

图9. 计算IC50公式的细节。假定读者想了解关于拟合方程的细节可以点击图8右侧的“Details”，可以了解公式中每个参数的具体含义。软件自带的非线性拟合方程是有限的，假定读者有特殊要求，有时需要自己定义公式，可点击上图8右侧“New”新建公式，并给公式的参数设定初始值，在下一篇中笔者将进行详细讲解。

Nonlin fit		A	B
		存活率	Title
		Y	Y
1	log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)		
2	Best-fit values		
3	Bottom	-0.03710	
4	Top	1.016	
5	LogIC50	0.9274	
6	HillSlope	-0.7694	
7	IC50	8.461	
8	Span	1.053	
9	Std. Error		
10	Bottom	0.04648	
11	Top	0.03255	
12	LogIC50	0.1084	
13	HillSlope	0.1324	
14	Span	0.06824	
15	95% Confidence Intervals		
16	Bottom	-0.1318 to 0.05761	
17	Top	0.9499 to 1.0	

图10. 曲线拟合计算结果。软件会根据坐标系中的描点计算公式中的参数。

图11. 最后绘制的剂量存活率曲线。笔者通过在软件中设置坐标系和图形参数获得上图，读者可以自行按照前述章节方法尝试。

3.总结

本文详细讲解了基础实验数据中非线性拟合的实现方法。

更多 统计方法 请访问 <https://www.iikx.com/news/statistics/>

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](http://www.iikx.com)转发