

334766

酶标记免疫技术的原理、 方法和应用

(上册)

刘锦海 夏裕珍 编著

余贻 审阅



宁波市免疫测试研究室

酶标记免疫技术的原理、 方法和应用

(上 册)

刘锦海 夏裕珍 编著
余贻 审阅

宁波市免疫测试研究室

目 录 (上册)

第一章 绪 言	(1)
第二章 酶的基本知识	(8)
一、酶的发现	(8)
二、酶的作用特点	(9)
三、酶的作用原理及动力学	(11)
(一) 酶的作用原理	(11)
(二) 酶的活性部位(活化中心)	(12)
(三) 影响酶促反应的因素	(13)
第三章 酶免疫微量分析技术原理	(23)
一、均一性酶免疫测定法(HEI)	(23)
(一) HEI 的基本原理	(24)
(二) 常用的几种 HEI 方法	(25)
二、非均一性酶免疫测定法	(34)
(一) 竞争性 ELISA	(35)
(二) 非竞争性 ELISA	(40)
(三) 葡萄球菌 A 蛋白 ELISA(PPA-ELISA)	(45)
(四) 酶标记抗原抗体定位技术	(53)
第四章 免疫血清及纯化抗体、抗原的制备	(57)
一、免疫血清的制备	(57)
(一) 免疫动物所用的抗原	(57)
(二) 佐 剂	(58)
(三) 免疫动物的选择	(59)
(四) 免疫方法	(60)
二、抗体的纯化	(63)
(一) 盐析法(盐)	(63)
(二) 凝胶过滤(分子筛层析)	(66)

(三) 离子交换层析·····	(76)
(四) 亲和层析·····	(84)
(五) 抗体纯化实例—IgG 型抗体的纯化·····	(88)
三、可溶性抗原的制备和纯化·····	(88)
(一) 可溶性抗原的制备·····	(88)
(二) 可溶性抗原的纯化·····	(89)
四、葡萄球菌 A 蛋白的提取和纯化·····	(90)
(一) 粗提 SPA 的制备·····	(91)
(二) SPA 的纯化·····	(95)
五、纯化抗体或抗原蛋白质含量的测定·····	(96)
(一) 紫外光吸收法·····	(96)
(二) Folin—酚试剂反应法·····	(98)
第五章 酶标记物的制备·····	(100)
一、酚标试验中常用的酶·····	(100)
(一) 均一性酶标试验常用的酶·····	(100)
(二) 非均一性酶标试验常用的酶·····	(101)
二、酶标记物的制备·····	(104)
(一) 戊二醛交联法·····	(104)
(二) 过碘酸钠(NaIO_4) 氧化法·····	(108)
(三) 二马来酰亚胺键法·····	(110)
(四) 酶标记半抗原的制备·····	(111)
三、酶结合物质量检查指标·····	(112)
(一) 标记效果及酶结合物活性测定·····	(112)
(二) 酶结合物产率测定·····	(113)
(三) 定量指标·····	(113)
(四) 酶结合物质量评定·····	(113)
第六章 酶联免疫吸附试验(ELISA)·····	(115)
一、材料、溶液和仪器·····	(115)

(一) 固相载体.....	(115)
(二) 溶液配制.....	(119)
(三) 国产酶标测定仪.....	(121)
二、ELISA 技术.....	(122)
(一) 包被.....	(122)
(二) 洗涤.....	(125)
(三) 加待检标本.....	(126)
(四) 洗涤.....	(127)
(五) 加酶标记物.....	(127)
(六) 洗涤.....	(128)
(七) 加底物.....	(128)
(八) 终止反应.....	(128)
(九) 结果判断.....	(129)
(十) 特异性考核.....	(130)

第一章 绪 言

进入本世纪以来，生物科学的各个分支学科均开始迅速发展，实验技术和检测手段也随之不断创新与改进，由于生物学的发展，就必然要求有先进的实验技术和检测手段与之相适应，对分析方法的特异性和敏感性的要求越来越严格。在医学上，对疾病的早期诊断，疗效考核及预后判断等，微量分析方法起着极为重要的作用。例如，原发性肝癌的主要诊断指标之一是血清甲胎蛋白(AFP)的增高；正常情况下AFP仅在胎儿血清中检出，出生后血清中AFP含量迅速下降，成年后仅仅残存极其微量的AFP，其含量 $<20\text{ ng/ml}$ ，因此AFP在毫微克水平的变化，即有相当重要的临床意义；而传统的一些血清学方法，如琼脂单扩散、火箭电泳、血凝技术等，检出界域只能达到微克($\mu\text{g/ml}$)水平，当用这些方法在患者血清中检出AFP时，其含量已达微克水平，即已比正常的含量(毫微克水平)升高了一千倍以上，因此对原发性肝癌早期诊断意义不大。要使原发性肝癌的早期诊断成为可能，就必须要建立更为敏感的、检出界域能达到毫微克水平的微量分析方法。又如糖尿病，长期以来实验室检查主要是依靠血糖及尿糖等间接指标来帮助临床进行诊断和指导胰岛素的用量等，但目前已发现，临床上有一部分糖尿病患者，按血糖及尿糖检测结果，使用胰岛素治疗并不能取得预期的疗效，更有些患者在应用胰岛素治疗后症状反而加重。所以会出现这种情况，是由于这些糖尿病患者体内胰岛素含量并不比常人低，(正常胰岛素性糖尿病)或甚至高于正常人水平(高胰岛素性糖尿病)，在他们体内，出现糖代谢紊乱主要是因为缺乏胰岛素的相应受体，所以

胰岛素无法发挥对糖代谢调节的作用,盲目使用胰岛素去治疗,不但不能缓解病情,与之相反,由于胰岛素含量的增高,势必加重了体内原先工作负担已极重的胰岛素受体的工作负担,而使糖尿病症状更加严重。因而,唯有建立能够正确反映机体胰岛素实际含量的微量分析方法,而不是依靠血糖或尿糖等间接指标,才能指导临床医师及时制订正确的治疗方案。又譬如,临床应用洋地黄制剂治疗心力衰竭时,无论是洋地黄化与否以及洋地黄中毒能否及时发现及时处理,主要凭藉医务人员的临床经验,特别是洋地黄中毒,必须在中毒症状出现之后才能明确,而如果掌握了可以精确测定患者血清中洋地黄制剂浓度的微量分析方法,就可使洋地黄化有更为客观的定量指标,对洋地黄中毒也有可能尽早预防。不仅是临床医学各科迫切需要理想的微量分析方法,基础医学理论研究也同样如此,例如遗传工程及单克隆抗体工程,均需要有检出界域至少达到毫微克水平的微量分析方法,才能进行菌种的选择或单克隆杂交瘤细胞的克隆化。在农林畜牧业的发展中,对微量分析方法的要求也十分迫切,如目前对许多农作物的病毒病的检测、诊断,往往需要一个相当长(几天甚至一个月以上)的时间才能得出结论,再据此采取相应措施已为时太晚,大田作物遭受的危害已相当严重,要解决这一矛盾,也有赖于微量分析方法的建立。微量分析方法,不仅要有极高的敏感性和特异性,其操作方法还应力求简便易掌握,否则难以适应实际应用的需要,如对人类或牲畜、家禽痢疾及植物病的普查、流行病学调查等,待检的标本量极大,如检测方法操作烦琐费时,则其实用价值不会很大,例如要进行乙型肝炎病毒在人群中感染率的普查,目前临床检验中普遍使用的反相间接血凝法(RPHA)就因其操作烦琐而不适应;又如对奶牛结核菌感染的普查,现在仍在应用皮肤试验,实际操作十分麻烦,操作人员还常因之被牛碰伤,急需有更简便有效的方法取代之。

经过将近一个世纪的努力，新的微量分析方法不断被建立、改进和逐步完善，尤其是自 60 年代初以来的 20 余年里，在生物化学、生物物理以及免疫学发展的基础上，免疫微量分析方法的进展进入了迅速而多面发展的阶段，在实验技术的方法学上取得许多令人兴奋的新成果，其中具有代表性的一个突破，就是免疫标记技术的建立。在免疫学原理的基础上发展起来的一些经典的血清学方法，如环状沉淀试验、絮状沉淀试验、琼脂扩散试验、电泳技术以及直接凝集试验、间接凝集试验等，均是利用抗原和相应抗体在一定条件下能形成肉眼可见的沉淀或凝集现象，并据此判断免疫反应是否发生以及根据反应的程度来进行抗原或抗体的定性和定量测定。但若被检测的抗原或抗体的量太少，在毫微克(ng , $1 \text{ ng} = 10^{-9}$ 克)甚至在微微克(pg , $1 \text{ pg} = 10^{-12}$ 克)水平，则即使发生了抗原和相应抗体(或抗体和相应抗原)间的免疫反应，由于其量极微，不可能形成沉淀或凝集等肉眼可见的现象；因此，在试验中，是否发生了免疫反应、以及反应的程度如何，都不得而知。如果我们事先使用某种标记物，(所谓标记物是指某些即使只有微量存在，但通过一定的方法，人们很容易将它们辨认、追踪、定量的物质)和反应系统中某一免疫反应物(抗原或者抗体)相结合，当反应完成后，这种标记物就随着和它相结合的抗原或抗体进入反应产物——免疫复合物中，因此我们可以通过对标记物的追踪、测定来间接地检测出免疫反应是否发生以及测定反应的程度，进而对被检的抗体或抗原性物质进行定性或定量的测定。这就是所谓的标记技术。

作为标记技术中理想的标记物质，应该是容易被辨认、追踪，本身性质较稳定容易通过生物化学或免疫学的方法和免疫反应物相结合，但又不会影响免疫反应物的免疫学活性，考虑到实际应用，还必须价格低廉，来源丰富，制备方便。对于免疫标记技术，

设想虽然是由来已久，但为了寻找合适的标记物质，人们经历了一个相当漫长的过程，早在 30 年代，就有人注意到荧光素在紫外光激发下能发生荧光的性质，可以应用于标记技术。他们设想，将荧光素结合到抗体上，形成所谓的荧光抗体，使之与被检标本混合，如被检标本中存在着相应的抗原成份，就会形成免疫复合物，结合在已知抗体上的荧光素也会随之结合于免疫复合物中，经用紫外线激发后检测反应产物中是否发生荧光，就可推断出免疫反应的发生与否，不幸的是，当时使用的一些荧光素，对免疫反应物的免疫活性有明显的影响，当时把这些荧光素结合到抗体上以后，会大大减弱抗体和相应抗原结合的活性，一直到 50 年代，Riggs 用人工方法合成了新一代的荧光素——异硫氰酸 (FITC)，将 FITC 结合到抗体上去以后，仍然能保留抗体大部份的免疫学活性，终于使把荧光素作为免疫标记技术的标记物的设想得以实现，这就是第一代免疫标记技术——荧光抗体法或荧光免疫法 (FIA)。FIA 的建立，引起了人们极大的兴趣，短短的几年里 FIA 发展极快，但是，在此同时，FIA 也暴露了许多缺点：FIA 的检出界域仍停留在微克水平，达不到实际需要的毫微克水平，并且正常组织中非特异荧光的干扰也影响了其特异性，FIA 只能用于定性，而不适用于精确定量，因为虽然从理论上讲，根据反应产物中荧光的强弱不同可以推算出被检抗原的含量，但由于荧光本身的光亮度很低，对如此微弱的荧光再去分辨其强弱，是十分困难的，而且荧光的强弱判断缺乏客观指标，受操作者的经验、视力是否疲劳等主观因素的影响很大，因此 FIA 难以用于定量检测。由于荧光十分微弱，是肉眼所不可见的，观察时必须借助于特殊的仪器——荧光显微镜，荧光显微镜价格昂贵，这也使 FIA 的推广受到限制。荧光素被激发出荧光的性能，是会随时间而逐渐减弱的，最终会发生所谓的荧光淬灭，因此 FIA 的标本

难以较长时期的保存，淬灭对需要进行对照试验的实验带来了困难。60年代末期，建立了第二代标记技术放射免疫法(RIA)，它的标记物是核素(同位素)，核素具有放射性，并可利用特殊仪器进行精确的定量测定。RIA的敏感性和特异性较之FIA有了明显的提高，其检出界域达到 $\text{ng} \sim \text{pg}$ 水平，即比FIA的敏感性提高了一千倍至一百万倍；同时由于正常组织不存在放射性，因此没有非特异放射性的干扰，测定结果凭藉特殊的记录仪器，不受主观因素的影响，因此RIA有比较理想的特异性。根据测定反应产物的放射性强弱，可以精确地推算出被检抗原或抗体的含量，因此RIA不仅可用于定性检测，而且也可用于定量检测。但是，RIA仍存在一些不足之处，首先，用于测定放射性粒子的记录仪器十分昂贵，而且因放射性对操作人员有一定的危害性，所以尚需配备防护设施，这就限制了RIA的广泛应用；同时，RIA和FIA相似，标本也无法较长时期的保存，这是因为核素的放射性会逐渐减弱，而应用于RIA的一些核素，如 ^{131}I ， ^{125}I ， ^3H ， ^{14}C 和 ^{32}P 等的半衰期都很短的缘故。也正因为如此，所以RIA的试剂有效期都比较短，这也给实际应用带来许多不便。第三代标记技术，即酶标记免疫技术(EIA)，是七十年代初建立起来的一种免疫学新技术，它兼有FIA和RIA的优点，又克服了二者的缺点，其酶感性达到RIA同样的水平，即检出界域达到 $\text{ng} \sim \text{pg}$ 水平，特异性也可与RIA比美，标本可以长期保存，酶标记制剂性质稳定，有效期长，不需要特殊的、昂贵的测定仪器，操作也更为简便容易掌握，因此EIA问世以后，旋即引起了广泛的兴趣和重视，短短几年间就有了迅猛的发展，国外已有EIA替代FIA和RIA之势，国内更是如此。

本世纪六十年代中期，Nakane和Avrameas等人开始在荧光标记抗体技术的基础上，探索用酶代替荧光素结合到抗体分子上，

用于生物组织中抗原的定位研究，并获得了成功，建立了免疫酶染色法。七十年代初，Sternberger 等首先使酶标记技术检测抗体获得成功。在此基础上，Eugvall 等及 Weeman 等几乎同时在瑞典和荷兰建立了使用固相载体进行试验的酶免疫试验 (Enzyme Immuno assay EIA)。到七十年代中期(1974 年)，Voller 在 EIA 基础上发展了一种用微量反应板作为固相载体的 EIA，即所谓的酶联免疫吸附试验 (Enzyme Linkea Immuws-Sorbent assay ELISA)。1978 年由 WHO 在我国上海和北京分别举办了 ELISA 技术培训班，将 ELISA 技术介绍给了我国。由于酶标记免疫技术具有简便、快速、灵敏、特异性高等优点，因此在我国很快被推广。自从 1978 年以来，我国已举办各种类型的酶标免疫技术培训班几十期，EIA 技术在我国迅速普及、推广。1980 年，由中科院上海生化研究所工程师章尉娟等研究成功第一台国产酶标测定仪，并很快由吉林省四平无线电厂定型生产出我国第一批酶标测定仪，目前我国已能生产至少五种不同类型的酶标测定仪。1984 年，我国建立了第一座生产酶标记制剂的专业化工厂——浙江省宁波市免疫试剂厂。就这样，自 1978 年以来短短的几年间，EIA 技术在我国被迅速普及，酶标测定仪和酶标制剂也已配套生产和商品化；因此，EIA 技术在我国广泛应用，现在已具备充分的条件。事实上，尽管我国的 EIA 技术的起步较国外晚了几年，但目前我国 EIA 技术发展极快，某些方面，如对新的酶交联技术的探讨，广谱酶标制剂的研究和应用等，已达到国际先进水平。

由于 EIA 是一种七十年代建立起来的免疫学新技术，因此其方法本身还在不断改进和完善之中，近二年发展起来的生物素一亲和素系统酶联免疫吸附试验 (Biotin-Avitin System ELISA, BAS-ELISA)，进一步提高了 EIA 的敏感性和稳定性；单克隆抗体 (McAb) 在 EIA 中的应用，则又进一步提高了 EIA 的特异性；

在固相载体，底物等诸方面，也有许多改进；EIA 已经成为有着广泛前途的生物学基础理论研究和免疫微量分析方法的一种极为重要的测试手段，目前正被广泛应用于生物学科的各领域中，包括医学中的寄生虫学、微生物学、免疫学、肿瘤学、内分泌学、临床医学各科、法医学以及农村植保、畜牧兽医、卫生防疫和食品检验等。

第二章 酶的基本知识

一、酶的发现

对于酶的作用，人们很早就已感觉到它的存在，酶促反应也在有史以前即已被人类所利用，我国早在周朝，已有利用麦芽粉制饴的记载；但是在一个很长的时期里，人们无法对它进行研究，因此不可能真正地认识它的本质。一直到十九世纪，才有人通过发酵过程对酶开始了初步的探索，1878年 W. Riihne 首先提到了酶(Enzyme)这个名称，其原文来自希腊文，本来的字义是“在酵母中”的意思。但在此以前，1833年 Payen 和 Persoz 已用酒精沉淀的方法从麦芽的水抽提物中得到了一种物质，他们指出这种物质同麦芽发酵生成糖的过程密切有关，后来人们证实，他们所提取到的这种物质，是一种淀粉酶的粗制剂，这是人类第一次通过抽提、沉淀等化学方法得到了酶，所以大多数人认为酶是由 Payen 和 Persoz 首先发现的。到二十世纪初，人们已积累了大量的有关酶的知识，1926年 J.B. Sumner 用生化方法获得了第一个酶的结晶——脲酶，并提出酶的化学本质是蛋白质，然而这在当时并未引起足够的重视，甚至被受到许多怀疑。从1930年以后的数年中，Northrop 等人相继获得了胃蛋白酶、胰蛋白酶等多种酶的结晶，并进一步证实了这些酶都属于蛋白质，直到此时，Sumner 当初提出的关于酶的化学本质是蛋白质的观点才普遍地被接受。关于酶作用的机理方面，早在1902年 Brown 及 Henri 就先后提出，酶和底物的作用是通过酶和底物先形成某种络合物而进行的。1913年 Michaelis 和 Menten 提出了著名的 Michaelis-

Mchten 方程，对酶作用的动力学，作了进一步的阐明，1925 年 Briggs-Haldane 对 Michaelis 方程作了重要的修正，使该方程更具普遍性。在此后的几十年里，许多酶学工作者，如 Cleland、Lineweaver、Eadie、Woolf、Eisenthal、Cornish、Dowd、Riggs 以及 Eigen 和 Chance 等人，均对酶研究的进展作出了重要贡献。至今，人们已经发现生物体内存在的酶至少在一千种以上，其中有几百种已被纯化，150 余种已可获得结晶。目前，对酶的本质及其作用正在更加广泛、深入地进行研究，每年都有不少新的发现，特别是在酶的利用方面，近年来发展极快，酶在免疫微量分析方法中的应用，就是其中一项突破性的进展，这项成果已经而还将继续对整个生物学的发展产生巨大影响。国外对此评价极高，誉为是一项带有革命性的成果。

二、酶的作用特点

酶是由生物体产生的，具有催化功能的蛋白质，是一种生物催化剂。酶所作用的物质称为酶的底物（或称之为基质）。酶具有一般化学催化剂的一些共性，即可以加速某一化学反应过程，使之更快地达到化学反应的平衡，而酶本身在反应前后并没有发生结构上和性质上的改变。由于酶可缩短化学反应达到平衡的时间，所以极小量的酶，可以促进大量反应物的转变。但作为一种生物催化剂，酶的作用尚有不同于一般化学催化剂，只属于酶本身所特有的一些物质，主要表现在两个方面：1. 特别高的催化效率。催化效率一般可以用单位时间内每克分子催化剂所能转换底物的克分子数来表示，而酶的催化底物转换的克分子数可高达 10^4 到 10^6 ，这比一般化学催化剂要高 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍。例如碳酸酐酶的每个酶分子，在一秒钟内可以使 10^5 个二氧化碳分子发生水合反应

产生碳酸；又如在 EIA 中广泛应用的过氧化物酶，0℃时每个酶分子每一分钟可以催化分解 5×10^5 个 H_2O_2 分子。正是由于酶的这种极高的催化效率，保证了 EIA 的高度敏感性。在进行酶标记免疫微量分析时，反应产物(免疫复合物)中的酶，发挥了这种极高的催化效率，在短时间内促使大量的底物分子转换，而终于发生了肉眼可见的效应。

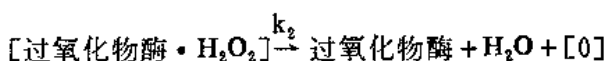
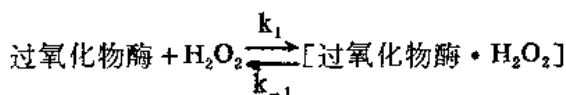
2. 酶的作用具有高度选择性。这是指酶对底物的作用有专一性，一种酶往往只能催化某一种底物的某一类化学反应，最后生成一定的终产物，这称为酶的绝对特异性，例如尿素酶，只能催化尿素的水解反应。也有一些酶，可以作用于某一类结构相似的化合物的某种化学键，催化它们进行某一类的化学反应，这种特异性不如上面所述及的绝对特异性那么严格，称为酶的相对特异性。例如 D-氨基酸氧化酶，可以催化各种 D-氨基酸的氧化反应，但对不同 D-氨基酸的催化效率不同。还有一些酶，对底物的选择性不强，但对于被它催化的化学反应却是专一的，称为反应特异性。例如脂肪水解酶，它对水解反应是专一的，但其底物可以是酯类，也可以是脂肪。酶还具有立体异构特异性，例如酵母多糖酶，它的相应底物是糖，但是它仅能作用于 D-型糖，却不能影响 L-型糖的发酵过程。一般来说，一种酶通常只能作用于底物立体异构物中的某一类型。酶对底物的选择，主要取决于酶的空间构型和底物空间构型之间是否互补、契合。需要说明的是，这种构型间的契合，有一个相互诱导的过程，当酶和相应物趋近时，底物可以诱导酶发生相应的构型变化，经过这种调整使二者的构型形成十分精确的互补。由于酶对底物及化学反应的类型均有高度选择性，因此酶的催化作用有很强的特异性，酶作用的这种特异性，和抗原、抗体之间反应的特异性，共同保证了 EIA 的高度特异性。

三、酶的作用原理及动力学

(一) 酶的作用原理

物质分子要参与化学反应，必须先从常态转变成反应状态，在这一转变中所需要消耗的能量称为活化能。不同物质的活化能高低不同，活化能越高，反应速度越慢。催化剂之所以能加速化学反应，是由于催化剂能降低那些在无催化剂存在时也能自发进行的反应的活化能。酶的催化作用也同样如此。例如，过氧化氢(H_2O_2)分解时的活化能为 18,000 卡/克分子，有催化剂(如胶态铂)存在时活化能降低到 11,700 卡/克分子，而如果有过氧化物酶作用时，则下降到 $<2,000$ 卡/克分子。因此，在有酶催化的情况下，仅需很小的活化能反应即可进行，大大缩短了达到化学反应平衡所需要的时间，反应可以极快的速度进行。

对酶降低化学反应的活化能的机理，现在也已了解得比较清楚了：酶先和底物结合形成酶—底物中间复合物，然后酶—底物复合物再生成终产物并释放出酶。而无论是酶和底物形成中间复合物所需要的活化能以及酶—底物复合物生成终产物所需要的活化能，都远远小于在自然状态下底物直接反应生成终产物所需要的活化能。以过氧化物酶催化分解过氧化氢的过程为例，酶促反应的过程如下：



酶首先和底物形成酶—底物中间复合物，从而降低了反应活化能

的概念，首先由 Michaelis 和 Menten 提示，并据此提出了有名的 Michaelis-Menten 方程式（米—曼氏方程式），1937 年 Keilin 和 Mann 通过光吸收的研究，得到了直接的证据：当他们把过氧化物酶加入过氧化氢后通过分光镜观察发现，光吸收带立即有明显移位。这说明过氧化物酶和过氧化氢确实形成了新的化合物。

在酶和底物形成中间复合物的过程中，主要的结合力是疏水键，但离子键和氢键在酶—底物间的相互作用中也起着重要的作用。

（二）酶的活性部位（活化中心）

在酶分子中，真正起催化作用的仅仅是其中某些区域的某些化学基团，这些基团形成一定的空间构型，能和底物分子的几何形状十分精确地契合。酶分子中真正起催化作用的这部份区域，称为酶的活性部位或酶的活化中心。如上所述，在活性部位起催化作用的这些化学基团，并不是简单地由酶蛋白分子一级结构中顺序排列的某几个相邻氨基酸所组成的，而是通过二级结构、三级结构的一些次级键，将分散在一级结构各段的这些化学基团维系成某种几何形状的空间构型，在酶分子表面组成了活性部位。酶的活性部位按作用机制不同可人为地分为结合部位和催化部位二部份，前者作用是和相应底物结合，后者则起催化作用；但是实际上这二个部位包含在整个活性部位中，是不能截然分开的。另外，酶分子表面的活性部位在底物未靠近之前，其空间几何形状并不以和底物分子的几何形状完全契合的形式预先存在的，而是当底物分子接近酶分子时引起了分子的构象变化，同时酶分子也引起底物分子的构象变化，通过这种相互诱导作用，酶分子活性部位和底物分子的三维结构都发生了某种程度的改变，最后二者的几何形状可以十分精确地契合。这也就是所谓的“诱导契合”。