



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109884294 A

(43)申请公布日 2019.06.14

(21)申请号 201910267977.2

(22)申请日 2019.04.03

(71)申请人 深圳无微华斯生物科技有限公司

地址 518122 广东省深圳市坪山新区金辉
路14号深圳市生物医药创新产业园区
1号楼505

(72)发明人 王国新 廖滔

(74)专利代理机构 深圳正和天下专利代理事务
所(普通合伙) 44581

代理人 杨波

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种具有高精密度的荧光免疫试纸条制备
方法

(57)摘要

本发明首次将生物素-链霉亲和素体系做为质控线引入免疫层析体系,提供一种具有高精密度的免疫荧光试纸条制备方法,包括以下步骤S1:预备用于进行免疫试纸条制备的PVC底板;S2:制备用于与PVC底板相衔接于一体的样品垫;所述样品垫的制备步骤为:将样品垫置于样品垫处理液中浸泡约30-120分钟,取出后置于37℃鼓风干燥箱中烘干至少10小时以上;S3:制备用于与样品垫相衔接于一体的结合垫;所述结合垫的制备步骤为:在浸渍槽中,将50mL结合垫处理液浸渍一张200*300mm玻璃纤维素膜10min,送入鼓风干燥箱干燥,实际应用过程中,不仅可以制备得到高精密度的荧光免疫试纸,且能作为解决目前免疫荧光法灵敏度和精密度较低问题的解决方法。

CN 109884294 A



1. 一种具有高精密度的荧光免疫试纸条制备方法,其特征在于:包括以下步骤,

S1:预备用于进行免疫试纸条制备的PVC底板;

S2:制备用于与PVC底板相衔接于一体的样品垫;所述样品垫的制备步骤为:将样品垫置于样品垫处理液中浸泡约30-120分钟,取出后置于37℃鼓风干燥箱中烘干至少10小时以上;

S3:制备用于与样品垫相衔接于一体的结合垫;所述结合垫的制备步骤为:在浸渍槽中,将50mL结合垫处理液浸渍一张200*300mm玻璃纤维素膜10min,送入鼓风干燥箱干燥,设置干燥温度37℃干燥网干燥时间为不少于10个小时;干燥处理后获得预处理结合垫;将裁切好预处理结合垫置于喷金仪上,用浓缩的荧光抗体偶联产物稀释到工作浓度配成工作液(每条荧光垫所需工作液130μL:标记好的荧光微球7.5μL加入122.5μL的结合垫处理液,按照此比例配制工作液),气压0.2MPa,包被量3μL/cm,完毕后在37℃干燥温度下干燥时间不少于10小时;

S4:制备用于与结合垫相衔接于一体的NC膜;所述NC膜的制备步骤为:用事先配好的包被液分别将质控线和检测线的抗体、链酶亲和素或者生物素稀释到合适的浓度进行包被,检测线与NC膜的上端,质控线在NC膜的下端;最后将包被后的NC膜转入鼓风干燥箱干燥,干燥温度控制在37±1℃,干燥时间为不少于10个小时;

S5:将样品垫、结合垫、NC膜以及吸水纸依次与PVC底板进行衔接,制备得到最终的荧光免疫试纸条。

2. 如权利要求1所述的一种具有高精密度的荧光免疫试纸条制备方法,其特征在于:所述步骤S3中,浓缩的荧光抗体偶联产物的制备步骤为:

A1:荧光微球的初洗与活化:吸取荧光微球100μL(1%浓度W/V),加1mL的初洗液并用超声清洗仪充分混匀,离心10min,用移液器吸弃上清,沉淀物用1mL的初洗液重悬并用超声清洗仪充分混匀,重复洗3次,最后一次洗涤后用1mL的初洗液重悬并用超声清洗仪充分混匀,确保微球呈单分散态;加入10mg/mL LEDC 25μL、10mg/mL NHS 75μL(加入体积按微球体积现配现用)活化30min;离心10min,用移液器吸弃上清,用1mL偶联液重悬;

A2:抗体、链酶亲和素或生物素的偶联:对于抗体或者链酶亲和素的偶联,其步骤为,在1mL偶联液重悬好的微球溶液中,超声混匀,离心10min,弃上清,重复3次,加入400μL偶联液重悬,按浓度加入抗体或者链酶亲和素旋涡混匀5h,对于生物素的偶联,其步骤为,在1mL偶联液重悬好的微球溶液中,超声混匀,离心10min,弃上清,重复3次,然后加入400μL偶联液重悬,按浓度加入牛血清白蛋白(BSA)旋涡混匀5h,然后用1×PBS离心(15000rpm,10min)洗涤3次,然后分散在1mL 1×PB中,再加入0.1mg/mL的NHS-biotin,继续反应2h;

A3:封闭:偶联完成后加入乙醇胺3μL,加入封闭液800μL,旋转混匀仪封闭2h;

A4:终洗:封闭完成后,离心10min,去掉上清;用1mL终洗液重悬,超声混匀,离心10min,用移液器尽量吸弃上清,重复3次;沉淀溶于100μL终洗液中,即为浓缩的荧光标记抗体。

3. 如权利要求1所述的一种具有高精密度的荧光免疫试纸条制备方法,其特征在于:所述荧光免疫试纸所对应的应用方式为:

B1:试剂测试前,用样本缓冲液按一定倍数稀释要测试的样本;

B2:测试时,去除荧光免疫试纸的外包装,取出荧光免疫试纸,按水平放置,精确吸取稀释后的样本75μL,加入到荧光免疫试纸的加样孔中,同时开始计时;

B3:待室温反应10min后,将荧光免疫试纸放入到仪器的卡槽中;点击对应检测仪器屏幕上的检测按键,仪器开始检测,并显示检测结果;

B4:点击打印,可打印出之前所检测的结果。

一种具有高精密度的荧光免疫试纸条制备方法

[技术领域]

[0001] 本发明涉及荧光免疫试纸条制备方法技术领域,尤其涉及一种稳定性和重现性优良的具有高精密度的荧光免疫试纸条制备方法。

[背景技术]

[0002] 免疫层析技术是20世纪末发展起来的结合免疫技术和色谱层析技术的一种分析方法,该方法结合了标记示踪技术的高度灵敏性、抗原抗体反应的高度特异性以及层析技术的简易快速性,省去了繁琐的加样、洗涤步骤,因而操作简单,短时间内便可得到检测结果等特点,广泛应用于临床诊断、环境监测、食品安全等重要领域。而当前免疫层析技术以胶体金免疫层析应用的范围最为广泛,它通过条带显色对目标物定性检测或半定量分析。该方法虽然简单快速,但精密度较差,难以准确定量。因此如何提高检测试剂的精密度成为当前免疫层析方法的迫切问题。

[0003] 生物素(Biotin)发现于20世纪60年代初,由咪唑酮环和噻吩环及其侧链构成。链霉亲和素是目前实验室中最常用的一类亲和素,稳定性强,其通过结构中的色氨酸残基与生物素中的咪唑酮环反应结合,二者以1:4的比例共价结合,其解离常数为10-15mol/L,是抗原抗体结合能力的100万倍,且不受酸、碱、变性剂、高温、蛋白溶解酶和有机溶剂的干扰,并且生物素和亲和素容易获取,所以在实验研究和临床中具有广泛的应用前景。

[0004] 目前已有大量的文献证明荧光免疫层析技术具有特异性强、简便快速、无需特殊昂贵仪器等优点,并且早在2013年就有相关专利CN104237517A公开了一种检测有关蛋白的荧光免疫层析试纸条,但仍存在精密度较低的问题,而生物素-链霉亲和素体系具有以下优点:①生物素和链霉亲和素是以1:4的比例结合,具有逐级放大效应,可以极大的提高其灵敏度,这也是生物素-链霉亲和素体系在免疫层析中最突出的优点。②生物素和链霉亲和素的特异结合能力强,是抗原抗体的100万倍,其反应高度专一,不会受反应试剂浓度高低的影响,因此该组合应用在免疫荧光层析中具有良好的稳定性和重现性。③该体系的应用范围广,适用于所有的抗原抗体的检测。因此,将生物素-链霉亲和素体系应用到此方法上能够大大的改善目前荧光免疫技术存在的问题。

[0005] 而在2016年也有相关的专利CN105652008A公开了生物素-链霉亲和素体系应用于荧光免疫层析试纸条来检测脂蛋白相关磷脂酶A2,它能够提高其灵敏度和精密度的问题,说明该体系应用在荧光免疫层析试纸条是可行的,但该专利是把该体系用在检测线上,并且有两条标记垫,而本发明仅用一条结合垫,并且把该体系应用于质控线的检测,以保证质控线的稳定又不干扰目标抗原的检测(检测线的值),并且操作简便,但目前为止还没有这方面相关的专利。

[发明内容]

[0006] 为克服现有技术所存在的问题,本发明提供一种稳定性和重现性优良的具有高精密度的荧光免疫试纸条制备方法。

[0007] 本发明解决技术问题的方案是提供一种具有高精密度的荧光免疫试纸条制备方法,包括以下步骤,

[0008] S1:预备用于进行免疫试纸条制备的PVC底板;

[0009] S2:制备用于与PVC底板相衔接于一体的样品垫;所述样品垫的制备步骤为:将样品垫置于样品垫处理液中浸泡约30-120分钟,取出后置于37℃鼓风干燥箱中烘干至少10小时以上;

[0010] S3:制备用于与样品垫相衔接于一体的结合垫;所述结合垫的制备步骤为:在浸渍槽中,将50mL结合垫处理液浸渍一张200*300mm玻璃纤维素膜10min,送入鼓风干燥箱干燥,设置干燥温度37℃干燥网干燥时间为不少于10个小时;干燥处理后获得预处理结合垫;将裁切好预处理结合垫置于喷金仪上,用浓缩的荧光抗体、链酶亲和素或者生物素偶联产物稀释到工作浓度配成工作液(每条荧光垫所需工作液130μL:标记好的荧光微球7.5μL加入122.5μL的结合垫处理液,按照此比例配制工作液),气压0.2MPa,包被量3μL/cm,完毕后在37℃干燥温度下干燥时间不少于10小时;

[0011] S4:制备用于与结合垫相衔接于一体的NC膜;所述NC膜的制备步骤为:用事先配好的包被液分别将质控线和检测线的抗体、链酶亲和素或者生物素稀释到合适的浓度进行包被,检测线与NC膜的上端,质控线在NC膜的下端;最后将包被后的NC膜转入鼓风干燥箱干燥,干燥温度控制在37±1℃,干燥时间为不少于10个小时;

[0012] S5:将样品垫、结合垫、NC膜以及吸水纸依次与PVC底板进行衔接,制备得到最终的荧光免疫试纸条。

[0013] 优选地,所述步骤S3中,浓缩的荧光抗体偶联产物的制备步骤为:

[0014] A1:荧光微球的初洗与活化:吸取荧光微球100μL(1%浓度W/V),加1mL的初洗液并用超声清洗仪充分混匀,离心10min,用移液器吸弃上清,沉淀物用1mL的初洗液重悬并用超声清洗仪充分混匀,重复洗3次,最后一次洗涤后用1mL的初洗液重悬并用超声清洗仪充分混匀,确保微球呈单分散态;加入10mg/mL LEDC 25μL、10mg/mL NHS 75μL(加入体积按微球体积现配现用)活化30min;离心10min,用移液器吸弃上清,用1mL偶联液重悬;

[0015] A2:抗体、链酶亲和素或生物素的偶联:对于抗体或者链酶亲和素的偶联,其步骤为,在1mL偶联液重悬好的微球溶液中,超声混匀,离心10min,弃上清,重复3次,加入400μL偶联液重悬,按浓度加入抗体或者链酶亲和素旋涡混匀5h。对于生物素的偶联,其步骤为,在1mL偶联液重悬好的微球溶液中,超声混匀,离心10min,弃上清,重复3次,然后加入400μL偶联液重悬,按浓度加入牛血清白蛋白(BSA)旋涡混匀5h,然后用1×PBS离心(15000rpm,10min)洗涤3次,然后分散在1mL 1×PB中,再加入0.1mg/mL的NHS-biotin,继续反应2h;

[0016] A3:封闭:偶联完成后加入乙醇胺3μL,加入封闭液800μL,旋转混匀仪封闭2h;

[0017] A4:终洗:封闭完成后,离心10min,去掉上清;用1mL终洗液重悬,超声混匀,离心10min,用移液器尽量吸弃上清,重复3次;沉淀溶于100μL终洗液中,即为浓缩的荧光标记抗体。

[0018] 优选地,所述荧光免疫试纸所对应的应用方式为:

[0019] B1:试剂测试前,用样本缓冲液按一定倍数稀释要测试的样本;

[0020] B2:测试时,去除荧光免疫试纸的外包装,取出荧光免疫试纸,按水平放置,精确吸取稀释后的样本75μL,加入到荧光免疫试纸的加样孔中,同时开始计时;

[0021] B3:待室温反应10min后,将荧光免疫试纸放入到仪器的卡槽中;点击对应检测仪器屏幕上的检测按键,仪器开始检测,并显示检测结果;

[0022] B4:点击打印,可打印出之前所检测的结果。

[0023] 与现有技术相比,本发明一种具有高精密度的荧光免疫试纸条制备方法通过采用在PVC底板上依次衔接样品垫、结合垫、NC膜和吸水纸结构,其中结合垫上为偶联有荧光微球的抗人PCT单克隆抗体和偶联有荧光微球的链霉亲和素蛋白,NC膜上为BSA连接的生物素检测C线和PCT抗体检测T线,或者结合垫上为偶联有荧光微球的抗人PCT单克隆抗体和偶联有荧光微球的生物素,NC膜上为链酶亲和素检测C线和PCT抗体检测T线两条线平行排列,具有提高精密度等作用,能作为解决目前免疫荧光法精密度较低的问题,实际应用过程中,不仅可以制备得到高精密度的荧光免疫试纸,且能作为解决目前免疫荧光法精密度较低问题的解决方法。

[附图说明]

[0024] 图1是本发明一种具有高精密度的荧光免疫试纸条制备方法的流程示意图。

[具体实施方式]

[0025] 为使本发明的目的,技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用于解释本发明,并不用于限定此发明。

[0026] 请参阅图1,本发明一种具有高精密度的荧光免疫试纸条制备方法1包括以下步骤,

[0027] S1:预备用于进行免疫试纸条制备的PVC底板;

[0028] S2:制备用于与PVC底板相衔接于一体的样品垫;所述样品垫的制备步骤为:将样品垫置于样品垫处理液中浸泡约30-120分钟,取出后置于37℃鼓风干燥箱中烘干至少10小时以上;

[0029] S3:制备用于与样品垫相衔接于一体的结合垫;所述结合垫的制备步骤为:在浸渍槽中,将50mL结合垫处理液浸渍一张200*300mm玻璃纤维素膜10min,送入鼓风干燥箱干燥,设置干燥温度37℃干燥网干燥时间为不少于10个小时;干燥处理后获得预处理结合垫;将裁切好预处理结合垫置于喷金仪上,用浓缩的荧光抗体、链酶亲和素或者生物素偶联产物稀释到工作浓度配成工作液(每条荧光垫所需工作液130μL:标记好的荧光微球7.5μL加入122.5μL的结合垫处理液,按照此比例配制工作液),气压0.2MPa,包被量3μL/cm,完毕后在37℃干燥温度下干燥时间不少于10小时;

[0030] S4:制备用于与结合垫相衔接于一体的NC膜;所述NC膜的制备步骤为:用事先配好的包被液分别将质控线和检测线的抗体稀释到合适的浓度进行包被,检测线与NC膜的上端,质控线在NC膜的下端;最后将包被后的NC膜转入鼓风干燥箱干燥,干燥温度控制在37±1℃,干燥时间为不少于10个小时;

[0031] S5:将样品垫、结合垫、NC膜以及吸水纸依次与PVC底板进行衔接,制备得到最终的荧光免疫试纸条。

[0032] 本申请通过采用在PVC底板上依次衔接样品垫、结合垫、NC膜和吸水纸结构,其中

结合垫上为偶联有荧光微球的抗人PCT单克隆抗体和偶联有荧光微球的链霉亲和素蛋白,NC膜上为BSA连接的生物素检测C线和PCT抗体检测T线,或者结合垫上为偶联有荧光微球的抗人PCT单克隆抗体和偶联有荧光微球的生物素,NC膜上为链酶亲和素检测C线和PCT抗体检测T线两条线平行排列,具有提高精密度等作用,能作为解决目前免疫荧光法精密度较低的问题,实际应用过程中,不仅可以制备得到高精密度的荧光免疫试纸,且能作为解决目前免疫荧光法精密度较低问题的解决方法。

[0033] 优选地,所述步骤S3中,浓缩的荧光抗体偶联产物的制备步骤为:

[0034] A1:荧光微球的初洗与活化:吸取荧光微球100 μ L (1%浓度W/V),加1mL的初洗液并用超声清洗仪充分混匀,离心10min,用移液器吸弃上清,沉淀物用1mL的初洗液重悬并用超声清洗仪充分混匀,重复洗3次,最后一次洗涤后用1mL的初洗液重悬并用超声清洗仪充分混匀,确保微球呈单分散态;加入10mg/mL LEDC 25 μ L、10mg/mL NHS 75 μ L (加入体积按微球体积现配现用)活化30min;离心10min,用移液器吸弃上清,用1mL偶联液重悬;

[0035] A2:抗体、链酶亲和素或生物素的偶联:对于抗体或者链酶亲和素的偶联,其步骤为,在1mL偶联液重悬好的微球溶液中,超声混匀,离心10min,弃上清,重复3次,加入400 μ L偶联液重悬,按浓度加入抗体或者链酶亲和素旋涡混匀5h。对于生物素的偶联,其步骤为,在1mL偶联液重悬好的微球溶液中,超声混匀,离心10min,弃上清,重复3次,然后加入400 μ L偶联液重悬,按浓度加入牛血清白蛋白(BSA)旋涡混匀5h,然后用1×PBS离心(15000rpm,10min)洗涤3次,然后分散在1mL 1×PB中,再加入0.1mg/mL的NHS-biotin,继续反应2h;

[0036] A3:封闭:偶联完成后加入乙醇胺3 μ L,加入封闭液800 μ L,旋转混匀仪封闭2h;

[0037] A4:终洗:封闭完成后,离心10min,去掉上清;用1mL终洗液重悬,超声混匀,离心10min,用移液器尽量吸弃上清,重复3次;沉淀溶于100 μ L终洗液中,即为浓缩的荧光标记抗体。

[0038] 优选地,所述荧光免疫试纸所对应的应用方式为:

[0039] B1:试剂测试前,用样本缓冲液按一定倍数稀释要测试的样本;

[0040] B2:测试时,去除荧光免疫试纸的外包装,取出荧光免疫试纸,按水平放置,精确吸取稀释后的样本75 μ L,加入到荧光免疫试纸的加样孔中,同时开始计时;

[0041] B3:待室温反应10min后,将荧光免疫试纸放入到仪器的卡槽中;点击对应检测仪器屏幕上的检测按键,仪器开始检测,并显示检测结果;

[0042] B4:点击打印,可打印出之前所检测的结果。

[0043] 由于生物素-链霉亲和素体系的应用范围广,所以本发明仅以检测人体血清、血浆和全血中降钙素原(PCT)为例,来实现本发明目的的技术方案的论述:

[0044] 为了更好的说明生物素-链霉亲和素体系作为C线的优势,下面给出该体系与羊抗鼠、羊抗鸡体系作为C线,其余条件均相同,每个PCT样本检测6次的结果对比实验。

样本浓度 (ng/mL)	生物素-链霉亲和素体系				羊抗鸡体系		羊抗鼠体系		
	质控线 (生物素)	Dr 值 精密度%	质控线 (链 霉亲和素)	Dr 值 精密度	质控线 精密度	质控线 精密度	质控线 精密度	Dr 值 精密度	
	精密度(%)		精密度(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
[0045]	0.15	3.0	3.7	4.2	4.8	9.2	33.7	13.1	15.8
	0.34	3.9	5.7	3.5	6.3	10.1	16.8	14.6	21.1
	0.5	3.5	7.5	2.6	5.7	12.6	36.7	8.2	10.6
	0.6	4.6	5.6	5.6	7.7	15.6	7.7	7.8	9.6
	0.8	2.5	4.4	3.8	3.9	7.9	8.3	11.0	18.3
	1.3	2.9	6.1	7.4	8.0	13.2	32.3	10.0	13.1
	5.2	5.4	6.9	3.5	3.3	18.3	34.7	11.7	13.8
	13	6.1	6.3	1.6	2.8	12.4	12.2	9.9	10.9
	30	4.6	5.1	4.8	6.2	7.3	5.8	9.6	13.8
	62.8	4.1	3.9	3.9	4.4	8.9	6.7	6.3	11.7

[0046] 综上所述,本发明提供的体系与其他体系相比,C值和Dr值的精密度大幅度提高,所以具有更好的稳定性和重现性。

[0047] 与现有技术相比,本发明一种具有高精密度的荧光免疫试纸条制备方法1通过采用在PVC底板上依次衔接样品垫、结合垫、NC膜和吸水纸结构,其中结合垫上为偶联有荧光微球的抗人PCT单克隆抗体和偶联有荧光微球的链霉亲和素蛋白,NC膜上为BSA连接的生物素检测C线和PCT抗体检测T线,或者结合垫上为偶联有荧光微球的抗人PCT单克隆抗体和偶联有荧光微球的生物素,NC膜上为链酶亲和素检测C线和PCT抗体检测T线两条线平行排列,具有提高精密度等作用,能作为解决目前免疫荧光法精密度较低的问题,实际应用过程中,不仅可以制备得到高精密度的荧光免疫试纸,且能作为解决目前免疫荧光法精密度较低问题的解决方法。

[0048] 以上所述的本发明实施方式,并不构成对本发明保护范围的限定。任何在本发明的精神和原则之内所作的修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的权利要求保护范围之内。

1

预备用于进行免疫试纸条制备的PVC底板

制备用于与PVC底板相衔接于一体的样品垫；所述样品垫的制备步骤为：将样品垫置于样品垫处理液中浸泡约30-120分钟，取出后置于37℃鼓风干燥箱中烘干至少10小时以上

制备用于与样品垫相衔接于一体的结合垫；所述结合垫的制备步骤为：在浸渍槽中，将50mL结合垫处理液浸渍一张200*300mm玻璃纤维素膜10min，送入鼓风干燥箱干燥，设置干燥温度37℃干燥网干燥时间为不少于10个小时；干燥处理后获得预处理结合垫；将裁切好预处理结合垫置于喷金仪上，用浓缩的荧光抗体偶联产物稀释到工作浓度配成工作液（每条荧光垫所需工作液130 μL：标记好的荧光微球7.5 μL加入122.5 μL的结合垫处理液，按照此比例配制工作液），气压0.2MPa，包被量3 μL/cm，完毕后在37℃干燥温度下干燥时间不少于10小时

制备用于与结合垫相衔接于一体的NC膜；所述NC膜的制备步骤为：用事先配好的包被液分别将质控线和检测线的抗体、链酶亲和素或者生物素稀释到合适的浓度进行包被，检测线与NC膜的上端，质控线在NC膜的下端；最后将包被后的NC膜转入鼓风干燥箱干燥，干燥温度控制在37±1℃，干燥时间为不少于10个小时

将样品垫、结合垫、NC膜以及吸水纸依次与PVC底板进行衔接，制备得到最终的荧光免疫试纸条

图1

专利名称(译)	一种具有高精密度的荧光免疫试纸条制备方法		
公开(公告)号	CN109884294A	公开(公告)日	2019-06-14
申请号	CN201910267977.2	申请日	2019-04-03
[标]申请(专利权)人(译)	深圳无微华斯生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳无微华斯生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳无微华斯生物科技有限公司		
[标]发明人	王国新 廖滔		
发明人	王国新 廖滔		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/58		
代理人(译)	杨波		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明首次将生物素-链霉亲和素体系做为质控线引入免疫层析体系，提供一种具有高精密度的免疫荧光试纸条制备方法，包括以下步骤S1：制备用于与PVC底板相衔接于一体的样品垫；S2：制备用于与PVC底板相衔接于一体的结合垫；所述样品垫的制备步骤为：将样品垫置于样品垫处理液中浸泡约30-120分钟，取出后置于37℃鼓风干燥箱中烘干至少10小时以上；S3：制备用于与样品垫相衔接于一体的结合垫；所述结合垫的制备步骤为：在浸渍槽中，将50mL结合垫处理液浸渍一张200*300mm玻璃纤维素膜10min，送入鼓风干燥箱干燥，实际应用过程中，不仅可以制备得到高精密度的荧光免疫试纸，且能作为解决目前免疫荧光法灵敏度和精密度较低问题的解决方法。

1. 预备用于进行免疫试纸条制备的PVC底板

制备用于与PVC底板相衔接于一体的样品垫；所述样品垫的制备步骤为：将样品垫置于样品垫处理液中浸泡约30-120分钟，取出后置于37℃鼓风干燥箱中烘干至少10小时以上

制备用于与样品垫相衔接于一体的结合垫；所述结合垫的制备步骤为：在浸渍槽中，将50mL结合垫处理液浸渍一张200*300mm玻璃纤维素膜10min，送入鼓风干燥箱干燥，设置干燥温度37℃干燥网干燥时间为不少于10个小时；干燥处理后获得预处理结合垫；将裁切好预处理结合垫置于喷金仪上，用浓缩的荧光抗体偶联产物稀释到工作浓度配成工作液（每条发光垫所需工作液130μL；标记好的发光微球7.5μL加入122.5μL的结合垫处理液，按照此比例配制工作液），气压0.2MPa，包被量3μL/cm，完毕后在37℃干燥温度下干燥时间不少于10小时

制备用于与结合垫相衔接于一体的NC膜；所述NC膜的制备步骤为：用事先配好的包被液分别将质控线和检测线的抗体、链霉亲和素或者生物素稀释到合适的浓度进行包被，检测线与NC膜的上端，质控线在NC膜的下端；最后将包被后的NC膜转入鼓风干燥箱干燥，干燥温度控制在37±1℃，干燥时间为不少于10个小时

将样品垫、结合垫、NC膜以及吸水纸依次与PVC底板进行衔接，制备得到最终的荧光免疫试纸条