

使用基于Xevo™ G3的工作流程对合成寡核苷酸中检出的杂质进行纯度测定、完整质量数测定和MS/MS测序

Catalin E. Doneanu, Jonathan Fox, Brad J. Williams, Chris Knowles, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

本研究评估了UPLC™-QToF-MS搭配一体化信息学软件在协助合成寡核苷酸及其杂质表征方面的作用。将寡核苷酸完整质量数测量与基于MS/MS碎裂的测序相结合，可以非常有效地确认全长产物(FLP)的预期序列和鉴定可能代表潜在杂质的修饰变体。Xevo G3 QToF系统是一款台式高分辨率质谱仪，在合规的信息学平台waters_connect™上运行，支持一体化数据采集和处理操作。利用非数据依赖性(MS^E)和靶向MS/MS采集方法表征经过修饰的寡核苷酸。受管制和非管制实验室都可以使用这套整体的分析和信息学工作流程进行寡核苷酸的表征和常规质量评估。

优势

- INTACT™ Mass应用程序可以对全长产物完成快速、自动化的质量数分配，并对寡核苷酸杂质进行推断性鉴定
 - CONFIRM™ Sequence应用程序能够简化对DIA (MS^E)和靶向MS/MS数据中寡核苷酸碎片离子的注释
 - 查找序列遗漏和插入，或鉴定序列修饰和干扰位点
 - Xevo G3 QToF MS与ACQUITY™ Premier UPLC配合使用，为合成寡核苷酸分析提供了一个灵敏、稳定且灵活的分析平台，且管制和非管制实验室均能部署
-

简介

许多寡核苷酸治疗药物(ONT)是采用化学合成方法制备的，同时存在合成副产物和降解产物，这些物质被统一归类为产品相关杂质。热门的ONT分子类别包括用于调节基因和蛋白质表达的反义寡核苷酸(ASO)和干扰RNA (siRNA 寡核苷酸)，以及调节蛋白质和大分子功能的适体RNA¹⁻²。随着合成寡核苷酸作为治疗药物受到越来越多的关注，且其结构有日益复杂的趋势，拥有先进的杂质表征分析方法对于确保产品安全性和有效性至关重要。

沃特世公司最近推出了多个用于寡核苷酸分析的LC-MS工作流程³⁻⁶。这些工作流程使用符合GMP要求的UPLC-Tof MS系统进行了优化，通过提供稳定、可重现的LC-MS平台，让非质谱专家也可以轻松上手，并由精简的信息学应用程序提供支持，可减少手动数据解析的需求。之前的研究表明，采用MaxPeak的ACQUITY Premier技术可以从回收率和重现性方面改善合成寡核苷酸的色谱分离^{7,8}。此外，用于数据处理的信息学平台能够对寡核苷酸谱图进行自动峰提取和快速去卷积，从而快速完成杂质分配，得到的质量精度和定量能力足以支持杂质分析⁵⁻⁶。

沃特世推出了CONFIRM Sequence waters_connect应用程序，用于自动处理MS/MS和MS^E（非数据依赖性）碎片离子谱图，以进行序列确证⁶。可以使用“点图”查看序列覆盖率，以便轻松评估序列覆盖率和定位修饰位点。

本文所述的研究介绍了Xevo G3 QTof系统（图1）和两款waters_connect应用程序（INTACT Mass和CONFIRM Sequence）分析合成核苷酸杂质的方法，并评估了该方法检测和确认微量杂质的能力。

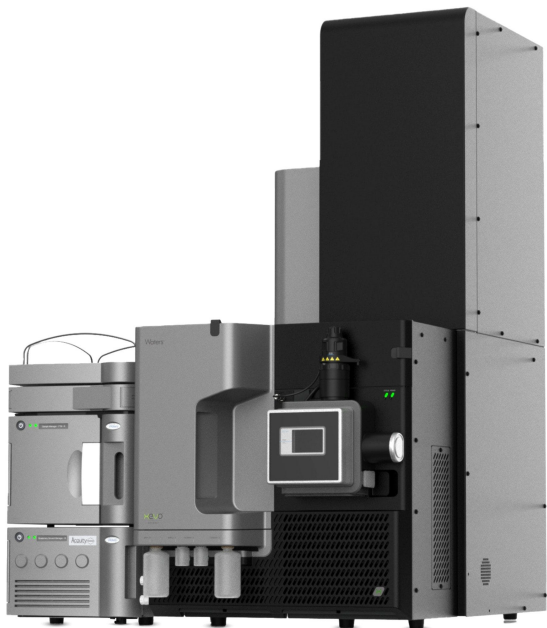


图1.Xevo G3 QToF质谱仪，搭配ACQUITY Premier UPLC系统和waters_connect信息学软件

。

实验

含13个修饰核苷酸的21 mer合成siRNA寡核苷酸（序列：GCC UCA GTC TGC TTC GCA CCT）购自ATDBio（英国南安普敦）。寡核苷酸序列用彩色字母表示修饰核苷酸，用黑色字母表示普通（未修饰）核苷酸。两个鸟苷(G)和一个腺苷(A)上连接了2'-O-(2-甲氧基乙基) (2'-MOE)修饰。此外，除了在一个尿苷(U)和六个胞苷(C)上连接2'-MOE官能团外，还通过连接5-甲基(5-Me)基团进一步修饰了这两种核苷酸的核碱基，从而生成一个2'-MOE 5-Me尿苷(U)和六个2'-MOE 5-Me胞苷(C)。在21 mer序列中存在的九个胞苷残基中，有三个胞苷(C)仅在核碱基上通过添加5-Me官能基团进行了修饰。最后，还有八个核苷酸未经过修饰：1个腺苷(A)、2个鸟苷(G)和5个脱氧胸苷(T)。用去离子水配制浓度为1 μM （或2.4 $\mu\text{g/mL}$ ）的储备液，进样体积10 μL ，相当于柱上进样10 pmol的21 mer寡核苷酸。图2显示了合成寡核苷酸(21 mer)的结构。

使用waters_connect信息学平台采集和处理数据。使用INTACT Mass应用程序自动处理完整寡核苷酸的ESI-MS

谱图。作为自动化处理工作流程的一部分，根据UV响应计算寡核苷酸纯度评估结果。使用CONFIRM Sequence应用程序处理单个MS/MS谱图和MS^E数据集，使用最佳碰撞能量碎裂每种寡核苷酸母离子，以对全长产物和产品杂质进行测序。

GCC UCA GTC TGC TTC GCA CCT – 21-mer

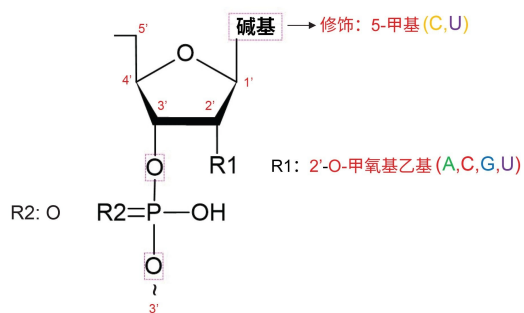


图2.21 *mer siRNA*寡核苷酸序列中掺入的化学修饰。对各种核苷酸使用两种类型的修饰，包括胞苷(C)和尿苷(U)的碱基修饰，以及所有四种核苷酸（A、C、G、U）的2'-O-(2-甲氧基乙基) (2'-MOE)修饰。在21个核苷酸中，有8个（以黑色突出显示）不含化学修饰。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLCPremier BSM
色谱柱：	ACQUITY Premier OST 2.1 x 150 mm，装填1.7 μm CSH™ C ₁₈ 颗粒（P/N：186009486）
柱温：	60 °C
流速：	300 μL/min

流动相：	7 mM三乙胺(TEA)和40 mM六氟异丙醇(HFIP)，溶于Milli-Q水中(pH 8.6)
溶剂A：	
溶剂B：	3.5 mM TEA和20 mM HFIP，溶于50%甲醇溶液
梯度表：	插入表II
进样体积：	10 μ L
清洗溶剂：	灌注溶剂：50%甲醇
样品管理器清洗溶剂：	50%甲醇

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	溶剂A含量 (%)	溶剂B含量 (%)	曲线图
0.00	0.3	87	13	初始
25.00	0.3	77	23	6
30.00	0.3	77	23	6
30.50	0.3	15	85	6
32.50	0.3	15	85	6
33.00	0.3	87	13	6
40.00	0.3	87	13	6

质谱条件

质谱系统：	Xevo G3 QToF质谱仪
电离模式：	ESI(-)
毛细管电压：	2.8 kV
锥孔电压：	25 V

离子源补偿:	60 V
离子源温度:	120 °C
脱溶剂气温度:	450 °C
锥孔气流速:	50 L/h
脱溶剂气流速:	500 L/h
TOF质量范围:	400~2000 (MS ^E 采集)
采集速率:	0.5 s
低能量CE:	6 V
高能量CE梯度:	15~45 V
数据采集:	waters_connect 3.6.0.21
数据处理:	waters_connect 3.6.0.21
INTACT Mass应用程序:	版本1.8.0.10
CONFIRM Sequence应用程序:	版本1.4.0.13

结果与讨论

使用搭载Max Peak技术的ACQUITY Premier UPLC系统与Xevo G3 QTof MS系统进行数据采集

本研究中使用的siRNA样品(21 mer)采用典型的固相方法合成。我们之前的研究表明，与传统不锈钢色谱柱相比

，采用高性能表面技术的ACQUITY Premier UPLC色谱柱能够提高寡核苷酸杂质分析的色谱性能，减少色谱柱活化需求，改善峰形，并提高低丰度杂质的回收率⁴。如图3的LC-UV色谱图所示，本研究从该siRNA寡聚物中分离出16种合成相关杂质。根据UV数据，丰度最低的杂质是第一个洗脱峰，其丰度相对于FLP峰面积为0.05%。此杂质分析方法使用的ACQUITY UPLC Premier系统是一款惰性非常强的系统，能够稳定分离痕量寡核苷酸杂质。

Xevo G3 QToF MS系统专为生物制药应用进行了优化，具备以下功能：1)改善低质量数不稳定物质的离子传输；2)提高定量能力，谱图间和谱图内动态范围宽，支持全面的定量/定性分析；3)采用新型离子光学元件，具有更高的稳定性和重现性。与waters_connect信息学软件结合使用时，该平台非常适用于开发过程中的产品表征，也非常适合受管制的开发、生产和质控组织用于常规分析。

最低丰度杂质（图3中的峰1，6 mer磷酸化杂质）的ESI-MS合并谱图见图4。谱图中突出显示了相应的双电荷和三电荷母离子，证明了Xevo G3仪器检测痕量杂质的能力。

在靶向MS/MS或DIA (MS^E)采集模式下，低丰度寡核苷酸杂质产生的母离子的灵敏传输最终会通过碰撞诱导解离改善碎裂。如图5所示，使用CONFIRM Sequence应用程序分析数据时，5'-磷酸化6 mer（图3中鉴定为峰1）的双电荷母离子($m/z=1120.7$)的MS/MS碎裂获得了较高的序列覆盖率(83%)。完整质量数测量与MS/MS测序数据相结合，协同提供半定量数据，并提高杂质分配的可信度。

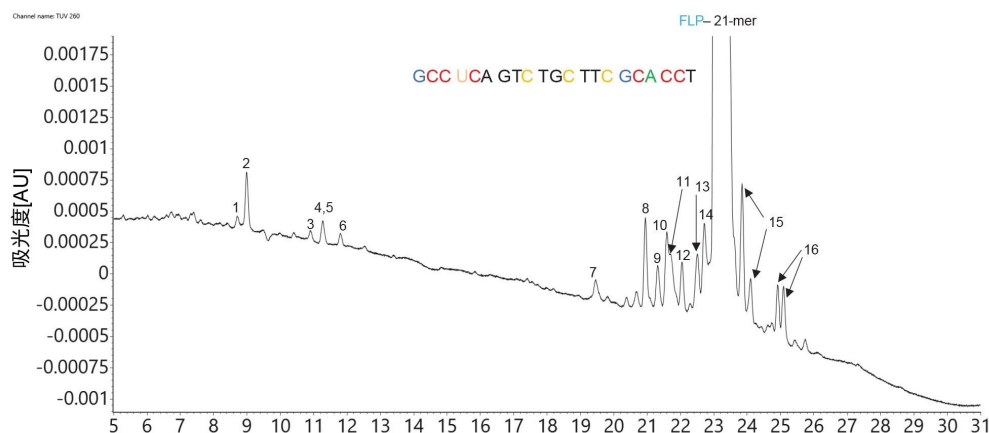


图3.ACQUITY UPLC Premier系统分离21 mer siRNA寡核苷酸及其杂质所得到的LC-UV色谱图放大图。检出16种微量杂质，丰度最低的杂质标记为峰1，相对于FLP的含量为0.05%。

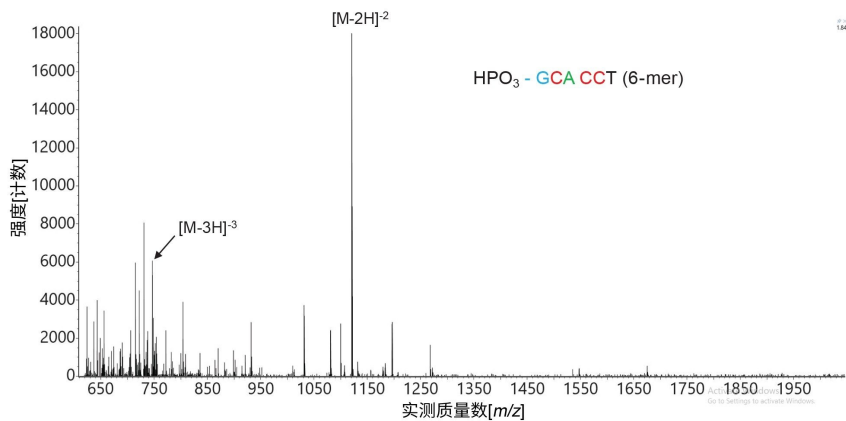


图4.6 *mer* 5'-磷酸化寡核苷酸杂质的ESI-MS合并谱图，该杂质是21 *mer* FLP中丰度最低的寡核苷酸杂质（根据UV峰面积计算的相对丰度为0.05%），在图3的色谱图中标记为峰1。

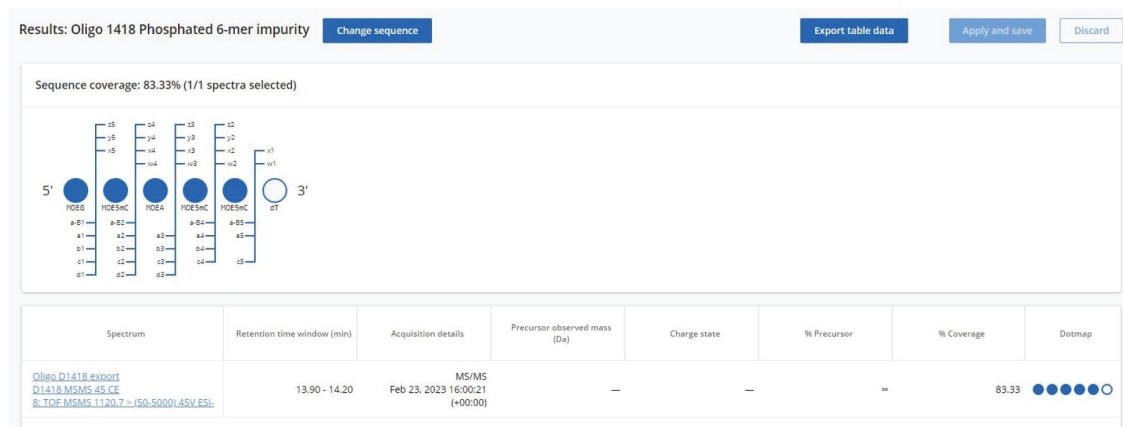


图5.5'-磷酸化6-*mer*最低丰度寡核苷酸杂质的 $[M-2H]^{-2}$ 母离子($m/z=1120.7$)的MS/MS碎裂得到的点图序列覆盖率(83%)，在图3中标记为峰1。在Xevo G3 QTof质谱仪的碰撞室内使用最佳固定碰撞能量(45 V)对母离子进行碎裂。

使用INTACT Mass应用程序自动完成质量数分配

对于每种检出量高于指定阈值的寡核苷酸杂质，计算分子量和杂质相较于FLP峰面积的相对丰度（基于TUV和/或

TIC迹线)。使用INTACT Mass应用程序软件以非靶向方式处理IP-RP UPLC-UV-MS色谱图,使用BayesSpray™通过自动去卷积计算符合数据处理方法(RT窗口和离子计数阈值)中设定标准的所有组分的中性单同位素质量数。

只需在处理方法中更新目标物列表,加入寡核苷酸鉴定和预期的准确单同位素质量数(中性质量数),即可将非靶向质量数分析转换为靶向分析。图6所示的INTACT Mass结果有三张图,分别是去卷积谱图(图A - 上图)、显示了各种电荷态的ESI-MS原始谱图(图B - 中图)和用于评估去卷积过程保真度的模拟谱图(图C - 下图)。图7显示了包含INTACT Mass处理结果的部分表格。在16种杂质(在该样品中检测到的杂质总数)中,对这张表格中显示的九种杂质以及FLP进行了推断性鉴定,质量精度优于10 ppm。

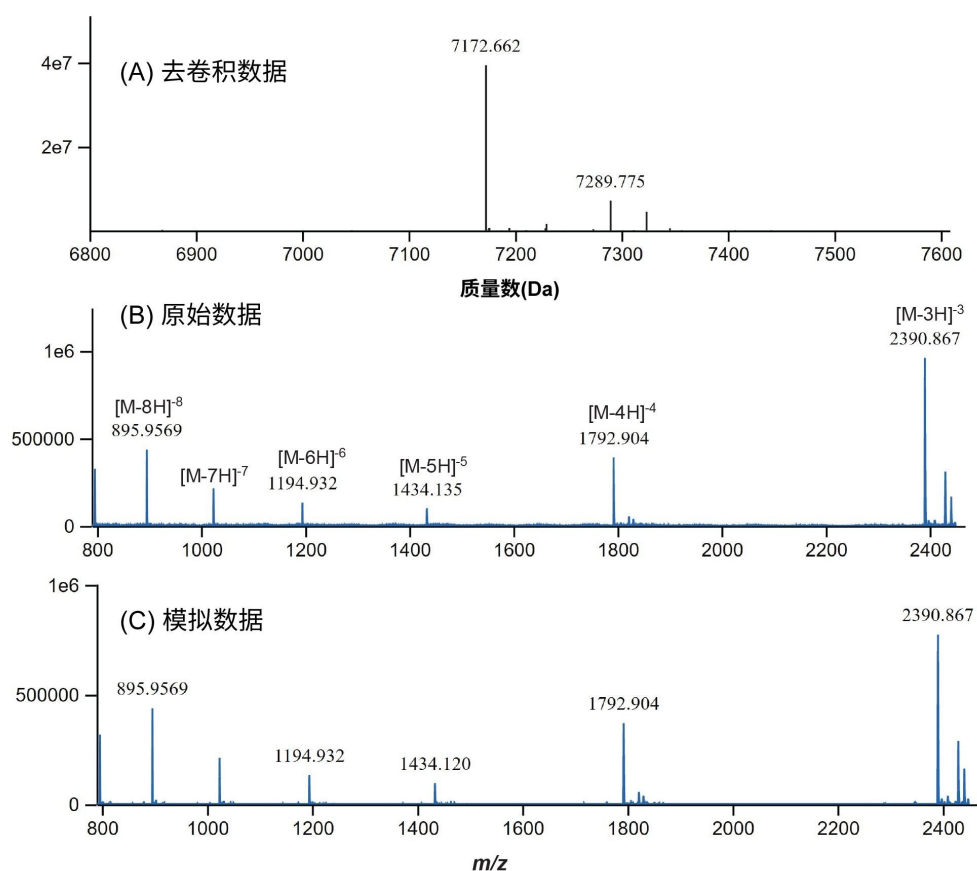


图6.21 *mer*高度修饰的siRNA寡核苷酸的INTACT Mass ESI-MS谱图: (A): 使用BayesSpray去卷积算法得到的中性物质的去卷积谱图; (B)原始MS谱图; (C)用于评估去卷积过程保真度的模拟MS谱图。

峰编号:	Type	Molecule ID	Component	Observed mass (Da)	Expected mass (Da)	Mass error (ppm)	Identity result
7	Impurity	7,172.57	7172.57 2'-MOE-5Me Cytidine,n-dT	6,491.427	6,491.425	0.2	Pass
8	Impurity	7,172.57	7172.57 2'-MOE-5Me Cytidine,5Me-Cytidine	6,492.316	6,492.409	-14.4	Warning
11	Impurity	7,172.57	7172.57 2'-MOE Guanosine	6,769.459	6,769.481	-3.2	Pass
9	Impurity	7,172.57	7172.57 2'-MOE Adenosine	6,785.440	6,785.476	-5.3	Pass
13	Impurity	7,172.57	7172.57 2'-MOE-5Me Uridine	6,794.473	6,794.487	-2.1	Pass
10	Impurity	7,172.57	7172.57 2'-MOE-5Me Cytidine	6,795.455	6,795.471	-2.4	Pass
15	Impurity	7,172.57	7172.57 n-dG	6,843.526	6,843.517	1.3	Pass
12	Impurity	7,172.57	7172.57 n-dT	6,868.558	6,868.524	4.9	Pass
11	Impurity	7,172.57	7172.57 5Me-Cytidine	6,869.450	6,869.508	-8.5	Pass
FLP	Product	7,172.57	7,172.57	7,172.549	7,172.570	-2.9	Pass

图7. *INTACT Mass*应用程序生成的21 mer寡核苷酸及其杂质部分处理结果表的屏幕截图。使用*BayesSpray*电荷去卷积算法对数据集进行去卷积处理，鉴定出16种寡核苷酸杂质，质量精度优于10 ppm。

使用CONFIRM Sequence应用程序确认寡核苷酸杂质的序列

使用waters_connect CONFIRM Sequence应用程序自动注释非数据依赖性碎片离子谱图（高能量MS^E）以及靶向MS/MS谱图。可针对一个或多个寡核苷酸序列分析多张MS/MS和/或MS^E谱图。

SYNTHETIC Library中存储了寡核苷酸序列，库中填充的是经过大量修饰的21 mer siRNA寡核苷酸（图8）。选择[M-4H]⁻⁴母离子，使用四极杆进行MS/MS碎裂，并在Xevo G3 QToF MS的碰撞室中使用最佳固定碰撞电压(40 V)进行碎裂。使用CONFIRM Sequence应用程序进行数据处理后获得的结果（图9）显示FLP的序列完全覆盖（100%）。该“点图”覆盖率视图显示了21 mer序列从5'-端到3'-端的内容，点（单个核苷酸）的上方和下方显示了指配的碎片离子。

除FLP以外，还对16种寡核苷酸杂质中的6种进行了靶向MS/MS分析，这些杂质的TUV峰面积大于等于FLP峰面积的0.05%。表I汇总了这些分析的数据，包括核苷酸序列、元素成分、中性单同位素质量数、最高丰度母离子、优化的碰撞能量、序列覆盖率（来自单张MS/MS谱图以及两张MS/MS合并谱图）和杂质相对于FLP的丰度（以TUV峰面积百分比表示）。根据图4和图5所示的ESI-MS和MS/MS谱图，丰度最低的杂质（实测为0.05%）鉴定为5'-磷酸化GCA CCT。分析该杂质的双电荷和三电荷母离子的MS/MS碎片离子谱图得到的总体组合序列覆盖率为89.5%，如表I所示。

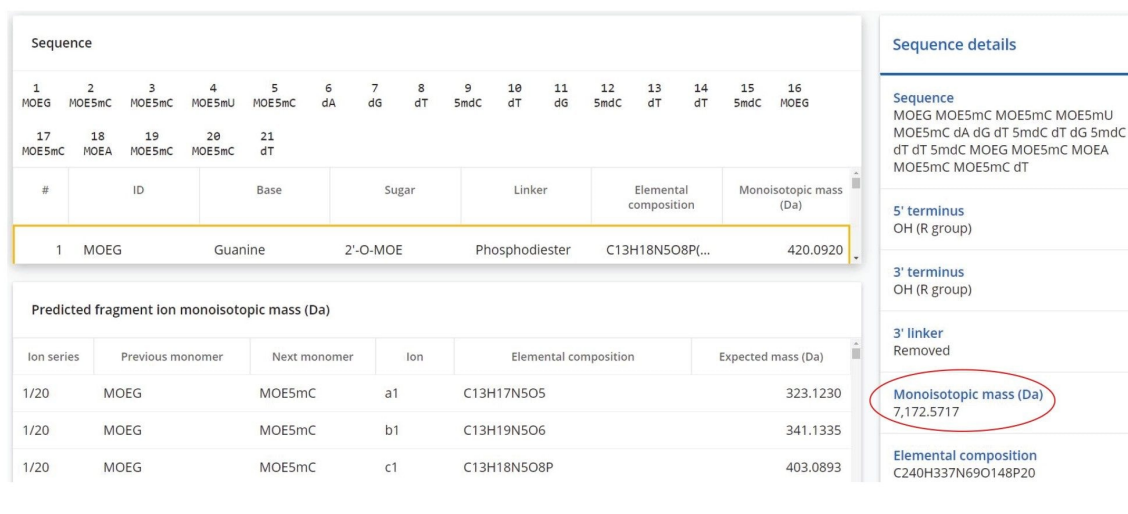


图8.CONFIRM Sequence应用程序屏幕截图，显示了输入SYNTHETIC Library中的经过大量修饰的21 mer siRNA寡核苷酸序列。



图9.MS/MS碎裂21 mer siRNA寡核苷酸的 $[M-4H]^{-4}$ 母离子($m/z=1792.14$)获得了100%序列覆盖率。在Xevo G3 QToF质谱仪的碰撞室内使用最佳固定碰撞能量(40 V)对母离子进行碎裂。

峰标签	保留时间 (min)	寡核苷酸序列	元素组成	Δ质量数 (与FLP的质量数差异)	MW (中性单同位素质量数)	丰度最高的母离子 单同位素质量数/电荷	第二个母离子/电荷	最佳CE (V)	MS/MS序列 覆盖率(%)	组合序列 覆盖率(%)	TUV峰面积 百分比(%)
1	8.7	5'-磷酸化 GCA CCT	C75 H111 N21 O47 P6	- 4929 Da (GCCUCAGTCTGCTTC丢失)	2243.5367	1120.7611 (-2)	746.8383 (-3)	45 / 26	83.3	89.5	0.05
2	9.0	CA CCT	C ₂ H92 N16 O36 P4	- 5412 Da (GCCUCAGTCTGCTTCG丢失)	1760.4811	879.2332 (-2)	1759.4738 (-1)	36 / 70	100.0	100.0	0.27
3	10.9	GCA CCT	C75 H110 N21 O44 P5	- 5009 Da (GCCUCAGTCTGCTTC丢失)	2163.5704	1080.7779 (-2)	720.1828 (-3)	40 / 28	74.2	82.4	0.06
4	11.2	C GCA CCT	C ₅ H124 N24 O50 P6	- 4706 Da (GCCUCAGTCTGCTTC丢失)	2466.6324	1232.3089 (-2)	821.2053 (-3)	38 / 28	65.1	76.8	0.09
5	11.3	TC GCA CCT	C95 H137 N26 O57 P7	- 4402 Da (GCCUCAGTCTGCTTC丢失)	2770.6784	1384.3319 (-2)	922.5522 (-3)	38 / 30	65.7	75.2	0.07
6	11.8	TTG GCA CCT	C105 H150 N28 O64 P8	- 4098 Da (GCCUCAGTCTGCTTC丢失)	3074.7245	1536.3496 (-2)	1023.8825 (-3)	38 / 32	68.6	78.3	0.08
7	19.5	GC*UCA G*CTG*TTG GCA CCT	C217 H304 N64 O133 P18	- 681 Da (2'-MOE-5Me C & dT)	6491.4269	2162.8017 (-3)	1621.8495 (-4)	-	-	-	0.14
8	20.9	GC*UCA GT*CTG*TT*GCA CCT	C217 H303 N63 O134 P18	- 680 Da (2'-MOE-5Me C & 5MeC)	6492.4109	2163.1297 (-3)	1622.0955 (-4)	-	-	-	0.45
9	21.3	CC*UCA GT*CTG*TT*GC* CCT	C227 H319 N64 O141 P19	- 387 Da (2'-MOE A)	6785.4774	2260.8119 (-3)	1695.3621 (-4)	-	-	-	0.29
10	21.6	GC*UCA GT*CTG*TTG GCA CCT	C229 H321 N64 O140 P19	- 377 Da (2'-MOE-5Me C)	6795.4981	2264.1588 (-3)	1697.8673 (-4)	-	-	-	0.58
11	21.7	*CC*UCA GT*CTG*TTG GCA CCT	C227 H319 N64 O140 P19	- 403 Da (2'-MOE G)	6769.4824	2255.4869 (-3)	1691.3633 (-4)	-	-	-	0.25
12	22.0	GCC UCA G*CTG*TTG GCA CCT	C230 H324 N67 O141 P19	-304 Da (dT)	6868.5257	2288.5013 (-3)	1716.1242 (-4)	-	-	-	0.32
13	22.5	GCC*CA GT*CTG*TT*GCA CCT	C227 H318 N67 O139 P19	- 378 Da (2'-MOE-5Me U)	6794.4889	2263.8227 (-3)	1697.6149 (-4)	-	-	-	0.45
14	22.7	GCC UCA GT*CTG*TT*GCA CCT	C230 H323 N66 O142 P19	-303 Da (5Me C)	6869.5097	2288.8293 (-3)	1716.3702 (-4)	-	-	-	0.65
15	23.1	GCC UCA GT*CTG*TTG GCA CCT	C240 H337 N69 O148 P20	-	7172.5717	1792.1357 (-4)	2389.8500 (-3)	40 / 55	100.0	100.0	94.51
16	23.8 / 24.1	GCC UCA *TC*TG*TTG GCA CCT	C230 H325 N64 O142 P19	-329 Da (dG)	6843.5192	2280.1658 (-3)	1709.8725 (-4)	-	-	-	1.17
17	24.9 / 25.1	GCC UCA GT*CTG*TTG GCA CCT	C240 H342 N69 O151 P20	+53 Da (H5O3)	7225.5956	2407.5246 (-3)	1805.3916 (-4)	-	-	-	0.57
										总计	100.00

表I. 在经修饰的21 mer siRNA寡核苷酸中鉴定出的16种寡核苷酸杂质。使用Xevo G3质谱仪对六种杂质及全长产物 (FLP)进行测序，使用CONFIRM Sequence应用程序处理以最佳碰撞能量碎裂的单个MS/MS谱图，获得了能够确认 FLP (100%)及其杂质(> 75%)鉴定结果的高序列覆盖率。丰度最低的杂质（相对丰度为0.05%）是一种6 mer 5'-磷酸化寡核苷酸，测序得到的序列覆盖率为83%。表中列出的总序列覆盖率对应于每种寡核苷酸杂质的两个母离子的MS/MS碎裂获得的组合序列。

结论

- 鉴定和确认微量杂质的能力对于有效表征寡核苷酸治疗药物和监测产品批次质量至关重要。
- 完整质量数分析与基于碎裂的测序相结合，能够进行全面的杂质分析和靶向确认杂质分配，从而对这类重要治疗药物的合成生产过程充满信心。
- 使用waters_connect INTACT Mass应用程序，结合UV数据和Xevo G3 QTof MS检测器，自动分配在合成寡核苷酸中检出的推定杂质，典型质量数误差低于10 ppm。
- 使用同一套系统采集了六种寡核苷酸杂质的MS/MS谱图以及经过大量修饰的21 mer FLP的MS/MS谱图，并使用CONFIRM Sequence应用程序处理，以验证其预期序列。
- CONFIRM Sequenc应用程序能够对丰度较低的杂质（相对丰度约为0.05%）实现高序列覆盖率(83.3%)。

参考资料

1. Sharma VK, Watts JK Oligonucleotide therapeutics: chemistry, delivery and clinical progress, *Future Med Chem*, 2015, 7(16), 2221–2242.
2. Roberts TK, Langer R, Wood MJA Advances in oligonucleotide drug delivery, *Nat Reviews*, 2020, 19, 673–694.
3. Catalin E. Doneanu, Jonathan Fox, Emma Harry, Chris Knowles, Ying Qing Yu, Joseph Fredette, Weibin Chen, 利用符合法规要求的自动化LC-MS工作流程对寡聚核苷酸进行完整质量数确认和纯度分析, 沃特世应用纪要, [720006820ZH](#), 2020年.
4. Catalin E. Doneanu, Chris Knowles, Jonathan Fox, Emma Harry, Ying Qing Yu, Joseph Fredette, Weibin Chen, 使用装配ACQUITY Premier产品的BioAccord LC-MS系统分析寡核苷酸杂质, 沃特世应用纪要, [720007301ZH](#), 2021年.
5. Catalin E. Doneanu, Patrick Boyce, Henry Shion, Joseph Fredette, Scott J. Berger, Heidi Gastall, Ying Qing Yu, 使用搭载ACQUITY Premier的BioAccord系统和全新的自动化INTACT Mass应用程序对siRNA、单向导RNA和杂质进行LC-MS分析, 沃特世应用纪要, [720007546ZH](#), 2022年.
6. Catalin E. Doneanu, Chris Knowles, Matt Gorton, Henry Shion, Joseph Fredette, Ying Qing Yu, CONFIRM Sequence: 一款用于合成寡核苷酸及其杂质测序的waters_connect应用程序, 沃特世应用纪要, [720007677ZH](#), 2022年.
7. DeLano M, Walter TH, Lauber MA, Gilar M, Jung MC, Nguyen J, Boissel C, Patel AV, Bates-Harrison A, Wyndham K Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC, *Anal Chem*, 2021, 93, 5773–5781.
8. Gilar M, DeLano M, Gritti F Mitigation of Analyte Loss on Metal Surfaces in liquid chromatography, *J Chrom A*, 2021, 1650, 5773–5781.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/acquity-premier-system.html>>

Xevo G3 QTof <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry-systems/xevo-g3-qtof.html>>

waters_connect软件解决方案 <https://www.waters.com/nextgen/global/products/informatics-and-software/waters_connect.html>

720008480ZH, 2024年8月



© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie 设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)