



All about Sephadex resin

Sephadex resin에 관한 모든 것.



목차

1. Introduction	04	- 2.2.3. Packing 순서	16
- 1.1. 성질	05	- 2.3. 컬럼 별 packing 방법	18
- 1.2. 특징	06	- 2.3.1. XK Column	18
- 1.3. 제품	07	- 2.3.2. BPG Column	19
- 1.4. 선택 가이드	08	- 2.4. Packing Evaluation	20
2. Packing & Running	10	- 2.5. Running	21
- 2.1. Swelling 방법, 준비, 순서	11	- 2.5.1. Desalting	21
- 2.1.1. Swelling 방법	11	- 2.5.2. Group Separation	22
- 2.1.2. Swelling 순서	12	- 2.6. CIP (Cleaning In Place)	23
- 2.2. Packing 방법	14		
- 2.2.1. 중력을 이용한 packing 방법	14		
- 2.2.2. Flow adapter 를 이용한 packing 방법	15		

목차

3. Applications	24		
- 3.1. Sephadex Grade	25		
- 3.2. Sephadex LH-20	26		
4. FAQ	27		
- 4.1. Swelling	28		
- 4.2. 압력 Limit	29		
- 4.3. Fractionation Range	30		
- 4.4. Particle Size	31		
- 4.5. PD Gravity columns관련	32		
- 4.5.1. PD 10 Desalting 컬럼의 충전제는 무엇이며 활용 가능한 범위는 어떻게 되나요?	32		
		- 4.5.2. PD 10 Column 을 재사용 할 수 있습니까	33
		- 4.5.3. PD 10 Column 보다 더 작은 column 도 있나요?	34
		- 4.5.4. Desalting 할 수 있는 sample 의 최대 부피는 얼마인가요	35

1

Introduction

1.1. 성질

Sephadex (SEparation PHArmacia DEXtran)의 약자입니다. 1957년 Jerker Porath (Uppsala University, 스웨덴) 교수가 발견하였으며 사이즈에 의해서 분리된다는 것을 밝혔습니다. Cross-linked Dextran은 [Sephadex]로 출시되었으며 gel filtration (GF) 또는 size exclusion chromatography (SEC) 기술에 사용됩니다.







G-numbers 는 무슨 의미를 가지고 있을까요? Sephadex G-10, G-15, G-25, G-50, G-75, 그리고 G-100에서 숫자는 서로 다른 fractionation 범위의 dextran을 의미합니다. 낮은 G-numbers resin은 저 분자량을 가지는 분자들을 fractionation할 수 있도록 높은 수준의 고분자 dextran이 cross-link된 형태로 제조되어 있어서 Desalting, Buffer 교환, 샘플 Clean-up 등에 사용하기에 적합합니다..

Cytiva의 Sephadex resin은 Gel Filtration 타입과 Ion Exchange 타입이 있으며, 연구와 생산 스케일에서 모두 사용 가능합니다.

1.2. 특징

- 분리 가능한 범위가 넓어서 Salts, Dyes, Radioactive labels 등 저 분자 chemical 제거로부터 거대분자 분리까지 사용할 수 있습니다.
- Desalting, Buffer 교환 시에 회수율과 그룹 분리의 효율이 높습니다.
- 다양한 Pre-packed format이 준비되어있어서 편리하고 재현성있는 실험을 진행할 수 있습니다.
- 연구실과 산업체에서 50년이상 광범위하게 사용하고 있는 입증된 제품입니다.

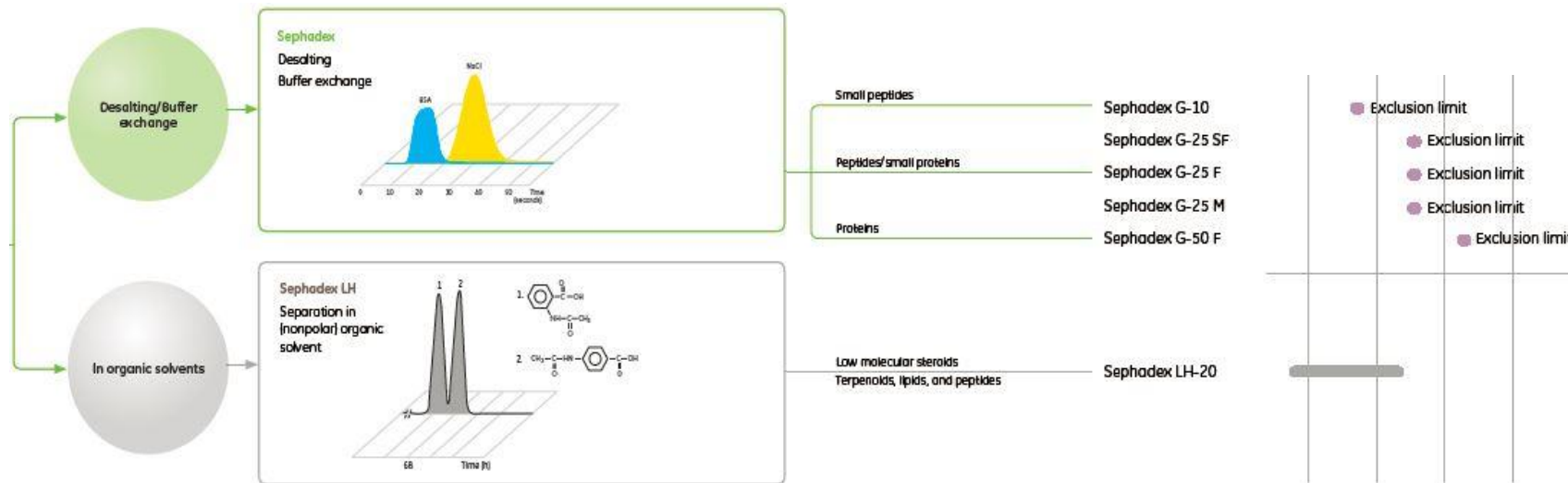
1.3. 제품 형태

제품의 형태	제품	제품사진	설명
Resin	Sephadex Chromatography Resin		Desalting, Buffer 교환, Clean-up용 gel filtration chromatography resin으로 분말형태여서 swelling이 필요합니다.
Pre-packed column	HiTrap Desalting Columns		Swelling후에 5 ml resin을 packing해서 QC를 진행한 한 column으로 소량의 sample (~1.5 ml)을 desalting하는 데 사용합니다.
	HiPrep Desalting Columns		53ml 의 resin이 packing되어있는 pre-packed column으로 한번에 약 16 ml의 sample을 desalting할 수 있습니다.
Disposable	PD-10 Desalting Columns		8.3 ml의 resin이 packing되어있는 pre-packed column으로 중력으로 running합니다. Empty PD10 column을 구입해서 packing할 수도 있습니다.
	PD MultiTrap G-25		많은 sample을 빠르게 desalting할 수 있도록 96 well Plate의 well마다 Sephadex G-25를 packing해 두었으며, 원심분리로 진행합니다.
	PD SpinTrap G-25		약 0.6 ml의 Sephadex G-25가 Microspin column에 packing되어있으며, 0.1~0.18 ml의 sample을 원심분리로 desalting합니다.

1.4. Resin 선택 가이드

주로는 수용액에서 Desalting, Buffer 교환, Group separation 분리를 수행하지만, 유기용매를 사용할 수 있는 제품이 있습니다. 아래의 그림 1과 table 2를 참고하시기 바랍니다.

그림 1. Sephadex resin 선택하기



1.4. Resin 선택 가이드

Table 2. Sephadex 제품들의 specification

Product Prepacked column/Bulk media	Ordering information			Fractionation range globular proteins M _r (relative molecular weight)	Fractionation range dextrans M _r (relative molecular weight, Daltons)	Exclusion limit DNA (base pairs)	Average particle size (µm)	Column efficiency (N/m)	pH stability ^{††} (long term)	Maximum or typical pressure drop over the packed bed ^{†††} (MPa/psi)	Maximum operating flow rate [†]	Recommended operational flow rate	Recommended sample volume	Approx. bed volume (ml)	Applications
	Code number	Column dim. id × bed height (mm)	Pack size												
Group separation															
HiTrap™ Desalting HiTrap Desalting [†]	17-1408-01 11-0003-29	16 × 25 16 × 25	5 100	1000 – 5000	100 – 5000	10	15–90	Not specified	2 to 13	0.3/44	15 ml/min		0.25 to 1.5 ml	5	Fast and convenient group separation between high and low molecular weight substances
HiPrep 26/10 Desalting HiPrep 26/10 Desalting	17-5087-01 17-5087-02	26 × 100 26 × 100	1 4	1000 – 5000	100 – 5000	10	20–80 (dry)	Not specified	2 to 13	0.15/22	40 ml/min		2.5 to 15 ml	53	Fast and convenient group separation between high and low molecular weight substances
PD-10 Desalting Columns ^{††}	17-0851-01	14.7 × 50	1	1000 – 5000	100 – 5000	10	86–258	Not specified	2 to 13	-	-		1.5 to 2.5 ml	8.3	Disposable column for group separation and buffer exchange
Sephadex G-10 [†]	17-0010-01 17-0010-02	- -	100 g 500 g	> 700	> 700	2	40–120 (dry)	-	2 to 13		40 cm/h [†]		-	-	Fast and convenient group separation between peptides and low molecular weight substances
Sephadex G-25 Superfine [†]	17-0031-01	-	100 g	1000 – 5000	100 – 5000	10	20–50 (dry)	-	2 to 13	Can be calculated using Darcy's Law	20 cm/h [†]		-	-	Fast and convenient group separation between high and low molecular weight substances
Sephadex G-25 Fine [†]	17-0032-01 17-0032-02	- -	100 g 500 g	1000 – 5000	100 – 5000	10	20–80 (dry)	-	2 to 13		60 cm/h [†]		-	-	
Sephadex G-25 Medium [†]	17-0033-01 17-0033-02	- -	100 g 500 g	1000 – 5000	100 – 5000	10	50–150 (dry)	-	2 to 13		150 cm/h [†]		-	-	
Sephadex G-50 Fine [†]	17-0042-01 17-0042-02	- -	100 g 500 g	1000 – 30 000	500 – 10 000	No data	20–80 (dry)	-	2 to 10		60 cm/h [†]		-	-	
Sephadex LH-20 [†]	17-0090-10 17-0090-01 17-0090-02	- - -	25 g 100 g 500 g	< 5000	No data	-	27–163 (dry)	-	2 to 11	0.15/22	30 cm/h [†]		-	-	Separation of natural products, such as steroids, terpenoids and lipids, in organic solvents

2

Packing & Running

2.1. Swelling

2.1.1. Swelling 방법

Sephadex resin은 건조 분말상태로 공급되며 사용 전에 swell이 필요합니다.

Swelling 후에는 Vacuum을 사용하여 공기 버블을 제거해야 합니다. 약 75% slurry농도가 적당하며 사용하는 모든 버퍼들을 0.22 μm filter로 필터하여 Particles뿐 아니라 미생물도 제거해야 합니다.

2.1. Swelling

2.1.2. Swelling 순서

- Column에 필요한 양만큼 Sephadex resin의 무게를 측정합니다 (Table 2. 참조). 그룹 분리를 위해서는 최대 10 cm의 베드 높이를 사용합니다.
- 예를 들어 직경 26 mm의 컬럼에 10 cm의 베드 높이로 column을 packing하려면 53 ml의 resin을 사용해야 합니다. 샘플 볼륨은 컬럼 볼륨의 최대 30 %까지만 사용해서 desalting을 수행합니다.
- 최대 압력으로 컬럼을 packing 할 경우에는 Sephadex의 양은 최대한 적은 양으로 선택해야 합니다.
- 컬럼의 총 볼륨을 계산하고 sephadex에 1.3 배 볼륨의 Swelling 버퍼를 추가합니다. Swelling 시간은 온도에 따라 Table 2와 같이 각기 상이합니다.
- 끓는 물을 사용하면 시간을 절약할 수 있습니다.
- 마그네틱 Stirrer는 Bead가 부서질 수 있기 때문에 사용하면 안됩니다.
- Swelling이 완료되면 상등액은 버립니다.

2.1. Swelling

2.1.2. Swelling 순서

- 75 % Suspension과 25 %의 Buffer 조성으로 Buffer를 추가 합니다.
- Packing 전에 De-gas 과정을 거칩니다

Table 3. Sephadex resin의 swelling 조건

Medium	Grade	Approx. ml of bed volume/1 g medium*	Swelling time, 20 ° C (h)	Swelling time, 90 ° C (h)
Sephadex G-10	All	2-3	3	1
Sephadex G-15	All	2.5-3.5	3	1
Sephadex G-25	All	4-6	3	1
Sephadex G-50	All	9-11	3	1
Sephadex G-75	All	12-15	24	3
Sephadex G-100	All	15-20	72	5

* in distilled water

2.2. Packing 방법

2.2.1. 중력을 이용한 packing 방법

- Slurry 전부를 공기방울이 생기지 않도록 조심하며 컬럼에 붓습니다.
- 중력을 이용하여 가라앉히며 packing 을 진행합니다.

2.2. Packing 방법

2.2.2. Flow adapter를 이용한 packing 방법

Packing의 중요한 평가 요소는 좋은 Resolution 입니다. 이상적으로는 Bead의 변형을 조심하며 최대 압력으로 컬럼을 packing 합니다. Sephadex G-10에서 G-50까지의 Beads는 딱딱한 구형입니다. Beads가 단단하기 때문에 컬럼의 압력 저항성이 제한요소가 됩니다. 컬럼이 견딜 수 있는 최대압력으로 packing 이 가능합니다. 부드러운 gel인 Sephadex G-75와 G-100은 gel에 압력을 가하는데 있어서 조금 더 주의를 해야 합니다.

폭이 넓은 컬럼의 경우에는 최대 압력 값 보다 약간 약한 압력을 사용해야 합니다. 유속은 컬럼의 Bed 높이에 반비례합니다. Bed의 높이를 높이면 유속은 감소 되어야 합니다만 이것이 packing 하는 최대 압력 값에 영향을 주지는 않습니다.

2.2. Packing 방법

2.2.3. Packing 순서

- 필요하다면 Reservoir를 사용합니다. Slurry 전부를 컬럼에 한번에 붓습니다.
- Pump를 사용해서 packing 을 시작합니다.
- Resin이 모두 컬럼 안에서 가라 앉으면 reservoir를 제거합니다.
- Adaptor를 장착하고 resin의 최대의 압력으로 packing 합니다.
- Resin이 컬럼 안에서 완벽히 packing되면 유속을 조절하여 adaptor를 bed의 표면에 위치하도록 합니다.
- 버퍼를 이용하여 컬럼 볼륨의 2~3 배 이상을 세척해서 packing된 resin이 컬럼 안에서 안정화되고 buffer로 평형에 이르도록 해 줍니다.
- 유속을 다시 조정해서 bed의 표면에 Adapter의 위치를 고정합니다.

2.2. Packing 방법

2.2.3. Packing 순서

Table 4. Sephadex resin의 압력한계

Chromatography medium	Grade	Approx. maximum operating pressure (bar)
Sephadex G-10	All	*
Sephadex G-15	All	*
Sephadex G-25	All	*
Sephadex G-50	All	*
Sephadex G-75	All	0.16
Sephadex G-100	All	0.096

* Beads가 단단한 구형이기 때문에 Darcy's Law를 따릅니다. 유속은 bed 압력에 비례하며 bed 높이에 반비례합니다.

2.3. 컬럼 별 packing 방법

2.3.1. XK Column

각 XK 컬럼에 추천하는 packing 방법이 있으며, 각 단계별로 일정 유속으로 진행하는 두 스텝의 packing 방법을 주로 사용합니다. Packing 버퍼는 물이나 0.15 M NaCl 용액을 사용합니다.

https://www.cytivalifesciences.co.kr/wp-content/uploads/2017/01/XK-column-packing_narration.pdf

Table 5. XK 컬럼에 추천하는 net

XK 16/40	10 µm nets (5 pieces/pack) Code no: 18-8761-01
XK 26/40	10 µm nets (5 pieces/pack) Code no: 18-8760-01
XK 50/30	10 µm nets (5 pieces/pack) Code no: 18-8759-01

Table 6. compression factor, slurry 농도, 추천 bed 높이

Column	Compression factor	Slurry concentration (%)	Bed height (cm)
XK 16	1.2	50 - 70	40 - 50
XK 26	1.2	50 - 70	40 - 50
XK 50	1.2	50 - 70	40 - 50

2.3. 컬럼 별 packing 방법

2.3.2. BPG Column

BPG 컬럼에 sephadex resin을 packing할 때에는 정 유속을 이용한 packing 방법으로 진행하는데 GE의 Sepharose resin을 packing하는 방법과 동일합니다.

<https://www.cytivalifesciences.co.kr/wp-content/uploads/2020/04/User-manual-BPG-column.pdf>

2.4. Packing Evaluation

Packing을 진행한 후에는 컬럼 효율성 평가 (Column Efficiency Test :

https://www.cytivalifesciences.co.kr/wp-content/uploads/2020/07/Cytiva_Column_Efficiency_Test.pdf)를

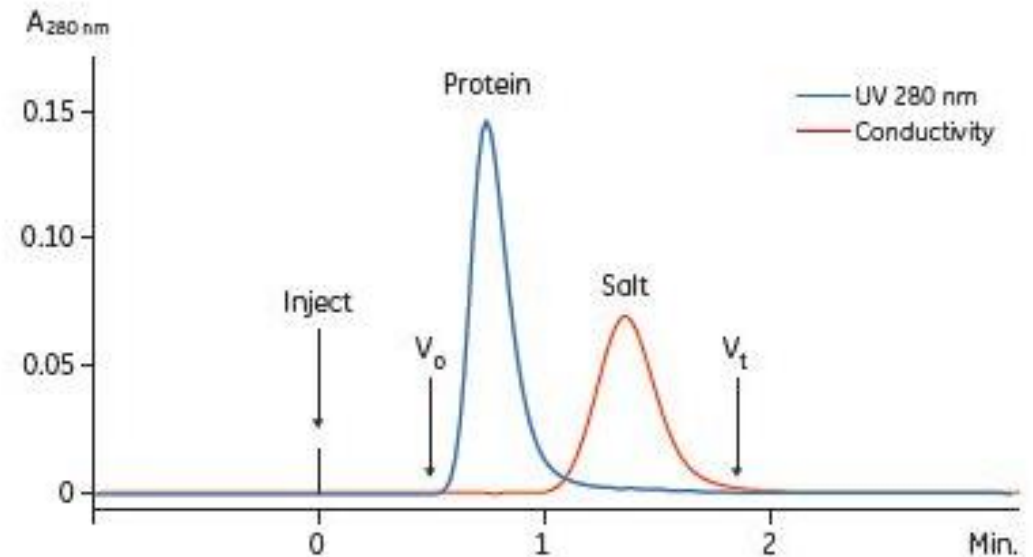
진행해서 평가에 통과한 column을 사용하는 것을 추천합니다.

2.5. Running

2.5.1. Desalting

Elution sample에서 salt를 제거하거나 cell culture fluid에서 phenol red 지시약을 제거하는 desalting에 사용하거나, column에 sample을 loading하기 위해서 buffer 교환을 할 때 사용하며, 아래와 같은 chromatogram을 얻을 수 있습니다.

그림 2. 전형적인 **Desalting Chromatogram**

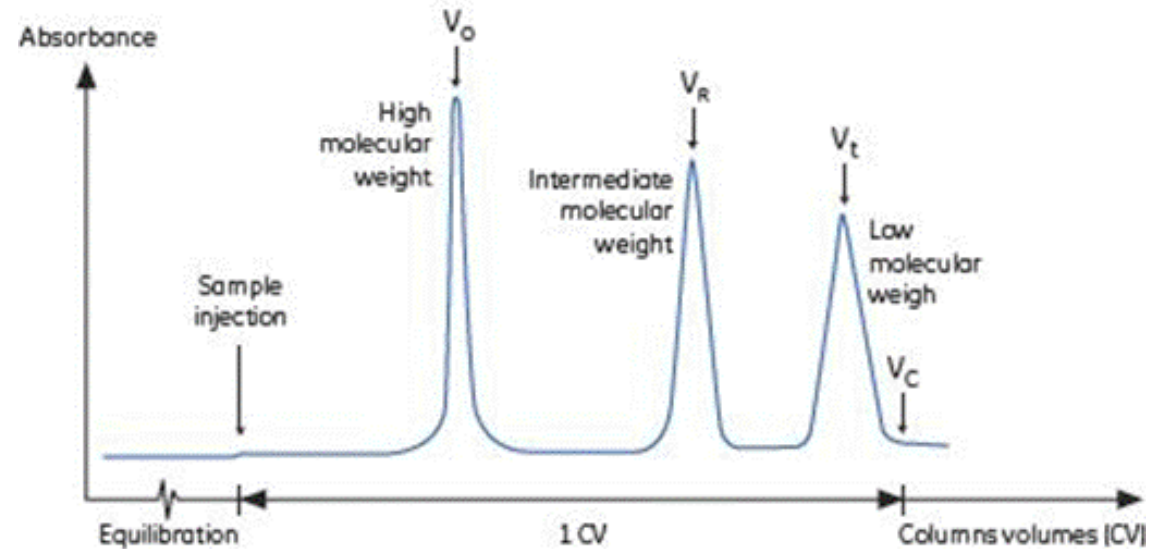


2.5. Running

2.5.2. Group Separation

샘플 내의 다양한 생체분자들을 분자 사이즈에 따라 분리하는 것이 가능합니다. 하나 또는 그 이상의 거대 분자들의 혼합물을 분리하거나 단일 분자의 isomer들이 존재할 때 Oligo-mers에서 monomer만을 분리하는 경우에 사용합니다. 분자량에 따른 distribution 분석도 가능합니다.

그림 3. 전형적인 **Group Separation**



2.6. CIP (Cleaning In Place)

- 0.2~0.5 M NaOH를 이용하여 1~2 컬럼 볼륨으로 washing하는데, 역방향으로 유로를 설정하기도 합니다. 또는 non-ionic detergent 세척합니다 (0.5M NaOH, 10~40cm/h). 1-2시간 정도면 단백질 침전물을 가용화 하는데 충분합니다.
- 다음 cycle을 진행하기 전에 버퍼를 이용하여 2-3 컬럼 볼륨으로 재평형화 합니다.

3

Applications

3.1. Sephadex Grade

Coarse, Medium Grade의 sephadex resin은 높은 유속과 낮은 압력을 요구하는 Process scale Group separation에 사용됩니다.

Fine, Superfine Grade Sephadex resin은 연구용과 작은 scale의 group separation에 이용합니다
(HiPrep 26/10 Desalting ► Fine Grade, HiTrap Desalting ► Superfine Grade)

Fine Grade resin과 Superfine Grade resin은 짧은 분산 거리를 나타내며 빠른 유속에서 높은 효율을 나타냅니다. DNA Grade resin은 non-specific binding 없이 DNA를 높은 회수율로 분리할 수 있으며 재현성도 검증되어 있습니다.

3.2. Sephadex LH-20

Lipids, steroids, fatty acids, hormones, vitamins 등의 분리는 유기용매를 사용하기 때문에 이에 적합하도록 Hydroxypropylated cross-linked dextran matrix인 Sephadex LG-20을 사용합니다.

Sephadex LH-20 resin은 sephadex G-25 resin을 Hydroxypropylation한 것으로 분석용뿐 아니라 산업용 스케일에서도 사용합니다.

<https://www.cytivalifesciences.co.kr/wp-content/uploads/2021/01/Sephadex-LH-20-Instruction.pdf>

4

FAQ

4.1. DEAD Sephadex A-25/50 (IEX용 Sephadex resin)의 Swelling 방법은 어떻게 다른가요?

Swelling을 시작할 때 반드시 salt용액을 사용해야 합니다. <https://www.cytivalifesciences.co.kr/wp-content/uploads/2021/01/DEAE-sephadex-A25-A50-QAE.pdf>

아래의 간단한 방법을 참고하시기 바랍니다

- 분말 resin을 0.2 M NaCl 용액에 적어도 5 분간 둡니다.
- 20 C 버퍼에 1~2일 간 두거나 끓는 물에 2 시간 둡니다.
- 상등액은 버리고 새로운 버퍼로 갈아주는 것을 수차례 반복해서 swelling을 완료합니다.

4.2. Sephadex resin들의 압력 limit는 어떻게 다른가요?

Sephadex G-50 까지는 Bead의 평균 사이즈가 작고 단단한 구형이기 때문에 사용하는 Column Hardware의 압력만 고려하시면 됩니다.

Chromatography medium	Grade	Approx. maximum operating pressure (bar)
Sephadex G-10	All	*
Sephadex G-15	All	*
Sephadex G-25	All	*
Sephadex G-50	All	*
Sephadex G-75	All	0.16
Sephadex G-100	All	0.096

* Beads가 단단한 구형이기 때문에 Darcy's Law를 따릅니다. 유속은 bed 압력에 비례하며 bed 높이에 반비례합니다.

* Darcy's Law : Pores(다공의) 관을 통과하는 유량에 대한 법칙. 단위면적당 단위시간당 흐르는 유량은 압력 구배에 비례한다.

4.3. Sephadex 제품별 Particle size와 Fractionation range는 어떻게 다른가요?

Table을 참고하시고, Grade 별 (Superfine, Fine, Medium, Coarse) 차이는 Applications 3.1.을 참고하시기 바랍니다.

Resin	Grade	Particle size (wet beads, μm)	Fractionation range (peptides and globular proteins, MW)
Sephadex G-10	-	55-165	-700
Sephadex G-15	-	60-180	- 1,500
Sephadex G-25	Superfine	15-88	1,000 – 5,000
	Fine	17-132	
	Medium	38-235	
	Coarse	87-510	
Sephadex G-50	Superfine	17-114	1,000 – 30,000
	Fine	34-208	
	Medium	105-310	
	Coarse	210-625	
Sephadex G-75	-	90-280	3,000 – 80,000
	Superfine	22-143	3,000 – 70,000
Sephadex G-100	-	100-310	4,000 – 150,000
	Superfine	25-100	4,000 – 100,000

* in distilled water

4.4. Sephadex resin의 chemical compatibility는 어떻게 되나요?

Sephadex resin은 pH 2~13의 용액의 모든 버퍼를 사용할 수 있습니다.

8M Urea, 6M guanidine hydrochloride, 모든 non-ionic & ionic detergents도 사용 가능합니다.

버퍼에 methanol, ethanol, propanol이 25 v/v% 이하로 포함된 경우에는 문제가 없으나, 산화제의 사용은 피해야 합니다.

4.5. PD Gravity columns 관련

4.5.1. PD-10 Desalting 컬럼의 충전제는 무엇이며 활용 가능한 범위는 어떻게 되나요?

PD-10 Desalting 컬럼에는 Sephadex G-25 resin이 충전 되어 있으며, Desalting, Buffer 교환, 샘플 Clean-up 등에 사용할 수 있습니다.

4.5. PD Gravity columns 관련

4.5.2. PD-10 Column 을 재사용 할 수 있습니까?

재이용은 원리상으로는 가능하지만 1회용 Column으로 설계되어 있기 때문에 분리능 등 품질을 보증할 수 없습니다.

PD-10 Empty Column과 PD-10 Spin Adapter를 구입해서 Sephadex G-25를 packing해서 사용할 수 있습니다.

4.5. PD Gravity columns 관련

4.5.3. PD-10 Column 보다 더 작은 column도 있나요?

PD MidiTrap (5.3 ml & 3.5 ml), PD MiniTrap (2.1 ml),
PD SpinTrap (~0.6 ml)등이 있습니다.

Clean-Up product	Bed volume (ml)	Exclusion limit (MW)
PD-10 Desalting Columns	8.3	
PD MidiTrap G-25	3.5	
PD MiniTrap G-25	2.1	5,000
PD SpinTrap G-25	0.5	
PD MultiTrap G-25	0.5	
PD MidiTrap G-10	5.3	
PD MiniTrap G-10	2.1	700

4.5. PD Gravity columns 관련

4.5.4. Desalting할 수 있는 sample의 최대 부피는 얼마인가요?

	PD MultiTrap G-25	PD SpinTrap G-25	PD MiniTrap G-25	PD MidiTrap G-25	PD-10 Desalting Columns
Volume of pre-packed resin	500 µl/well	~600 µl/column	2.1 ml	3.5 ml	8.3 ml
Packed bed dimensions	N/A	N/A	0.97 × 2.8 cm	1.3 × 2.6 cm	1.45 × 5.0 cm
Well/column volume	800 µl	1000 µl	5 ml	8.5 ml	13.5 ml
Void volume	~ 150 µl	~ 150 µl	~ 0.5 ml	~ 1.0 ml	2.5 ml
Maximum sample volume	130 µl	180 µl	0.5 ml	1.0 ml	2.5 ml
Volume of eluted sample (gravity)	-	-	1.0 ml	1.5 ml	3.5 ml
Volume of eluted sample (spin)¹	130 µl	180 µl	0.5 ml	1.0 ml	2.5 ml
Recovery²	70% to 90%	70% to 90%	70% to 95%	70% to 95%	70% to > 95%
Desalting capacity	> 85%	> 85%	> 90%	> 90%	> 90%
Plate/column material	polypropylene and polyethylene	polypropylene and polyethylene	polypropylene and polyethylene	polypropylene and polyethylene	polypropylene and polyethylene
Storage solution	20% ethanol	0.15% Kathon™	0.15% Kathon	0.15% Kathon	0.15% Kathon
Storage temperature	4 °C to 30 °C	4 °C to 30 °C	4 °C to 30 °C	4 °C to 30 °C	4 °C to 30 °C

¹ Applied volume = eluted volume ² Biomolecule depend



Thank you