

# All about Sephadex resin



# Table of Contents

## 목차

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	
1.1	성질	3
1.2	특징	3
1.3	제품 형태	4
1.4	Resin 선택 가이드	5
<b>2</b>	<b>Packing &amp; Running</b>	
2.1	Swelling	7
2.2	Packing 방법	8
2.3	Packing Evaluation	12
2.4	Running	12
2.5	CIP (Cleaning In Place)	13
<b>3</b>	<b>Applications</b>	
3.1	Sephadex Grade	14
3.2	Sephadex LH-20	14
<b>4</b>	<b>FAQ</b>	
4.1	Swelling	15
4.2	압력 Limit	15
4.3	Particle Size & Fractionation Range	16
4.4	Chemical Compatibility	16
4.5	PD Gravity columns 관련	17

## 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 Dextran 은 [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.

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

### 1.2 특징

- ① 분리 가능한 범위가 넓어서 Salts, Dyes, Radioactive labels 등 저분자 chemical 제거로부터 거대분자 분리까지 사용할 수 있습니다.
- ② Desalting, Buffer 교환 시에 회수율과 그룹 분리의 효율이 높습니다.
- ③ 다양한 Pre-packed format 이 준비되어 있어서 편리하고 재현성 있는 실험을 진행할 수 있습니다.
- ④ 연구실과 산업체에서 50년 이상 광범위하게 사용하고 있는 입증된 제품입니다.

### 1.3 제품 형태

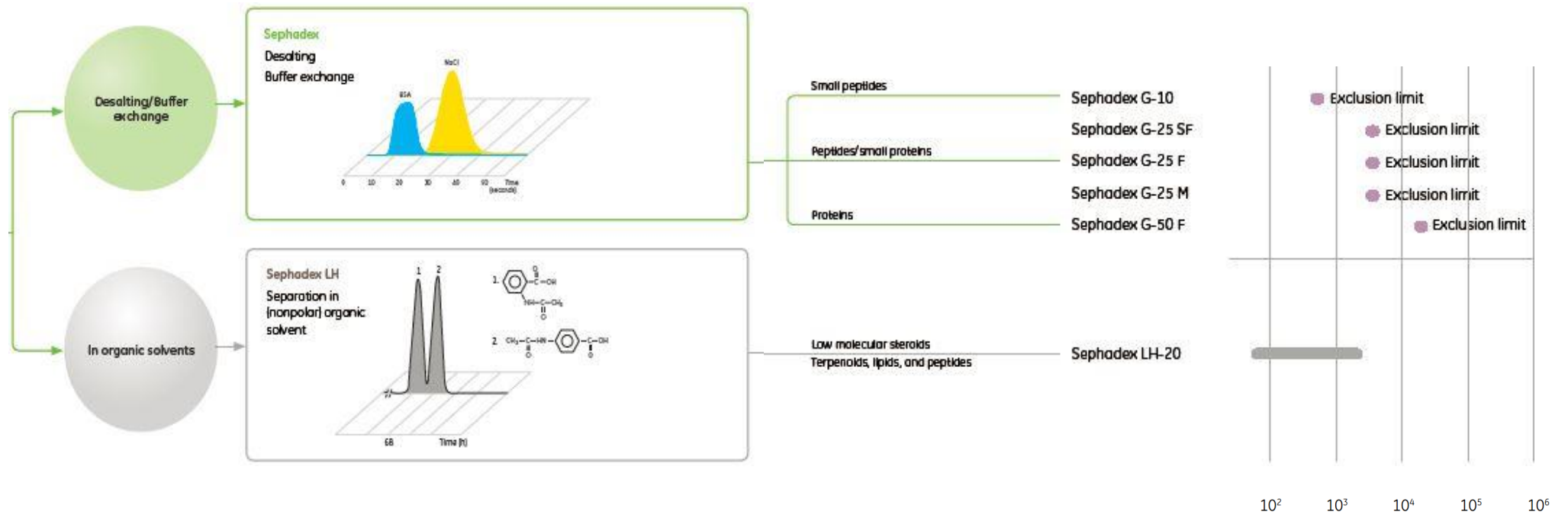
제품의 형태	제품	제품사진	설명
Resin	Sephadex Resin		Desalting, Buffer 교환, Clean-up 용 gel filtration chromatography resin 으로 분말형태여서 swelling 이 필요합니다.
Pre-packed column	HiTrap Desalting Columns		Swelling 후에 5 ml resin 을 packing 해서 QC 를 진행한 column 으로 소량의 sample (~1.5 ml)을 desalting 하는데 사용합니다.
	HiPrep Desalting Columns		53ml 의 resin 이 packing 되어있는 pre-packed column 으로 한번에 약 16 ml 의 sample 을 desalting 할 수 있습니다.
Disposable	PD-10 Desalting Columns		8.3 ml 의 resin 이 packing 되어있는 pre-packed column 으로 중력으로 running 합니다. Empty PD10 column 을 구입해서 packing 할 수 도 있습니다.
	PD MultiTrap G-25		많은 sample 을 빠르게 desalting 할 수 있도록 96 well Plate 의 well 마다 Sephadex G-25 를 packing 해 두었으며, 원심분리로 진행합니다.
	PD SpinTrap G-25		약 0.6 ml 의 Sephadex G-25 가 Microspin column 에 packing 되어있으며, 0.1~0.18 ml 의 sample 을 원심분리로 desalting 합니다.

[Table1. 다양한 format의 Sephadex 제품]

## 1.4 Resin 선택 가이드

주로는 수용액에서 Desalting, Buffer 교환, Group separation 분리를 수행하지만, 유기용매를 사용할 수 있는 제품이 있습니다.

[그림 1. globular proteins]과 [Table 2]를 참고하시기 바랍니다.



[그림 1. Sephadex resin 선택하기]

Product	Ordering information			Fractionation range globular proteins M <sub>r</sub> (relative molecular weight)	Fractionation range dextrans M <sub>r</sub> (relative molecular weight, Daltons)	Exclusion limit DNA (base pairs)	Average particle size (µm)	Column efficiency (N/m)	pH stability <sup>††</sup> (long term)	Maximum or typical pressure drop over the packed bed <sup>††</sup> (MPa/psi)	Maximum operating flow rate <sup>†</sup>	Recommended operational flow rate	Recommended sample volume	Approx. bed volume (ml)	Applications
	Prepacked column/Bulk media	Code number	Column dim. id × bed height (mm)												
HiTrap™ Desalting	17-1408-01	16 × 25	5	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
HiTrap Desalting <sup>†</sup>	11-0003-29	16 × 25	100												
HiPrep 26/10 Desalting	17-5087-01	26 × 100	1	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
HiPrep 26/10 Desalting	17-5087-02	26 × 100	4												
PD-10 Desalting Columns <sup>††</sup>	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 <sup>†</sup>	17-0010-01	-	100 g	> 700	> 700	2	40-120 (dry)	-	2 to 13		40 cm/h <sup>§</sup>		-	-	Fast and convenient group separation between peptides and low molecular weight substances
Sephadex G-10 <sup>†</sup>	17-0010-02	-	500 g												
Sephadex G-25 Superfine <sup>†</sup>	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 <sup>§</sup>		-	-	Fast and convenient group separation between high and low molecular weight substances
Sephadex G-25 Fine <sup>†</sup>	17-0032-01	-	100 g	1000 - 5000	100 - 5000	10	20-80 (dry)	-	2 to 13		60 cm/h <sup>§</sup>		-	-	
Sephadex G-25 Fine <sup>†</sup>	17-0032-02	-	500 g												
Sephadex G-25 Medium <sup>†</sup>	17-0033-01	-	100 g	1000 - 5000	100 - 5000	10	50-150 (dry)	-	2 to 13		150 cm/h <sup>§</sup>		-	-	
Sephadex G-25 Medium <sup>†</sup>	17-0033-02	-	500 g												
Sephadex G-50 Fine <sup>†</sup>	17-0042-01	-	100 g	1000 - 30 000	500 - 10 000	No data	20-80 (dry)	-	2 to 10		60 cm/h <sup>§</sup>		-	-	
Sephadex G-50 Fine <sup>†</sup>	17-0042-02	-	500 g												
Sephadex LH-20 <sup>†</sup>	17-0090-10	-	25 g	< 5000	No data	-	27-163 (dry)	-	2 to 11	0.15/22	30 cm/h <sup>§</sup>		-	-	Separation of natural products, such as steroids, terpenoids and lipids, in organic solvents
Sephadex LH-20 <sup>†</sup>	17-0090-01	-	100 g												
Sephadex LH-20 <sup>†</sup>	17-0090-02	-	500 g												

[Table 2. Sephadex 제품들의 specifications]

## 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  $\mu\text{m}$  filter로 필터 하여 Particles뿐 아니라 미생물도 제거해야 합니다.

#### 2.1.2. Swelling 순서

- ① Column에 필요한 양만큼 Sephadex resin의 무게를 측정합니다 (Table 3. 참조). 그룹 분리를 위해서는 최대 10 cm의 베드 높이를 사용합니다.
- ② 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.
- ③ 최대 압력으로 컬럼을 packing 할 경우에는 Sephadex의 양은 최대한 적은 양으로 선택해야 합니다.
- ④ 컬럼의 총 볼륨을 계산하고 Sephadex에 1.3 배 볼륨의 Swelling 버퍼를 추가합니다. Swelling 시간은 온도에 따라 (Table 3)과 같이 각기 상이합니다.
- ⑤ 끓는 물을 사용하면 시간을 절약할 수 있습니다.
- ⑥ 마그네틱 Stirrer는 Bead가 부서질 수 있기 때문에 사용하면 안됩니다.
- ⑦ Swelling이 완료되면 상등액은 버립니다.
- ⑧ 75 % Suspension과 25 %의 Buffer 조성으로 Buffer를 추가 합니다.
- ⑨ packing 전에 De-gas 과정을 거칩니다

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

\* in distilled water

[Table 3. Sephadex resin의 swelling 조건]

## 2.2 Packing 방법

### 2.2.1. 중력을 이용한 packing 방법

- ① Slurry 전부를 공기방울이 생기지 않도록 조심하며 컬럼에 붓습니다.
- ② 중력을 이용하여 가라앉히며 packing 을 진행합니다.



## 2.2.2. 압력을 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 packing이 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.

- ① 필요하다면 Reservoir를 사용합니다. Slurry 전부를 컬럼에 한번에 붓습니다.
- ② Pump를 사용해서 packing을 시작합니다.
- ③ Resin이 모두 컬럼 안에서 가라 앉으면 reservoir를 제거합니다.
- ④ Adaptor를 장착하고 resin의 최대의 압력으로 packing 합니다.
- ⑤ Resin이 컬럼 안에서 완벽히 packing되면 유속을 조절하여 adaptor를 bed의 표면에 위치하도록 합니다.
- ⑥ 버퍼를 이용하여 컬럼 볼륨의 2~3 배 이상을 세척해서 packing된 resin이 컬럼 안에서 안정화되고 buffer로 평형에 이르도록 해 줍니다.
- ⑦ 유속을 다시 조정해서 bed의 표면에 Adapter의 위치를 고정합니다.

Chromatography resin	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

\* Beads 가 단단한 구형이기 때문에 Darcy's Law 를 따릅니다. 유속은 bed 압력에 비례하며 bed 높이에 반비례합니다.

[Table 4. Sephadex resin 의 압력한계]

### 2.2.2.1. 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. <http://ap.gelifesciences.com/kor/esupport/main/column/model/labcolumn>

Column	Net	Slurry Concentration (%)	Bed Height (cm)
XK 16/40	10 µm nets (5 pieces/pack) Code no: 18-8761-01	50 - 70	40 - 50
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 5. XK 컬럼에 추천하는 net, slurry 농도, 추천 bed 높이]

2.2.2.2. BPG Column

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

<http://ap.gelifesciences.com/kor/esupport/main/column/model/processcolumn>

Column	Net	Bed Height (cm)	Slurry Concentration (%)
BPG 100/500	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	0-26	50 - 70
BPG 100/750	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	25-41	
BPG 100/950	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	45-54	
BPG 140/500	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	0-26	
BPG 140/500	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	25-41	
BPG 140/950	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	45-54	
BPG 200/500	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	0-26	
BPG 200/750	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	25-41	
BPG 200/950	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	45-54	
BPG 300/500	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	0-26	
BPG 300/750	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	25-41	
BPG 300/950	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	45-54	
BPG 450/500	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	11-22	
BPG 450/750	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	36-38	
BPG 450/950	10, 12, 23, 54 µm nets (2 pieces/pack)	61-64	

\* 추천 bed 높이는 Extension을 사용하지 않은 경우임

[Table 6. BPG컬럼에 추천하는 net, slurry 농도, 추천 bed 높이]

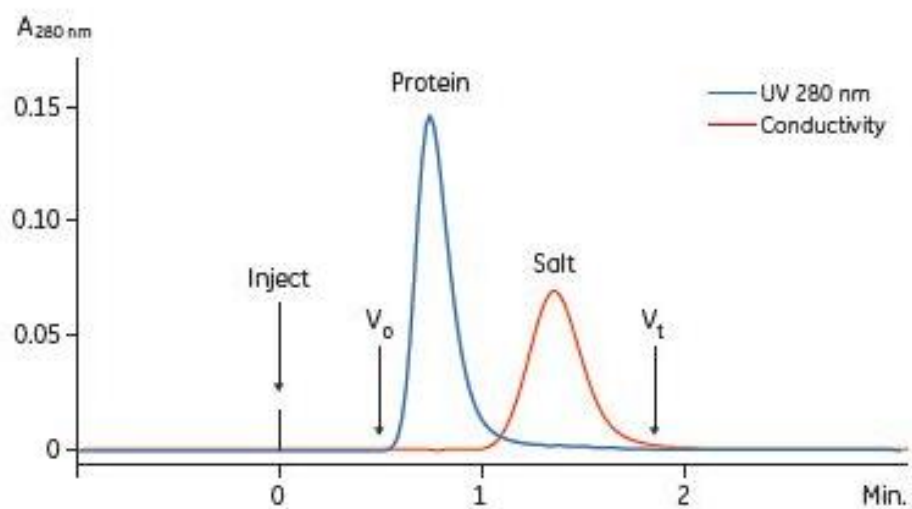
## 2.3 Packing Evaluation

Packing을 진행한 후에는 컬럼 효율성 평가 (Column Efficiency Test : <http://ap.gelifesciences.com/kor/esupport/main/column/theory/columnefficiency>)를 진행해서 평가에 통과한 column을 사용하는 것을 추천합니다.

## 2.4 Running

### 2.4.1. Desalting

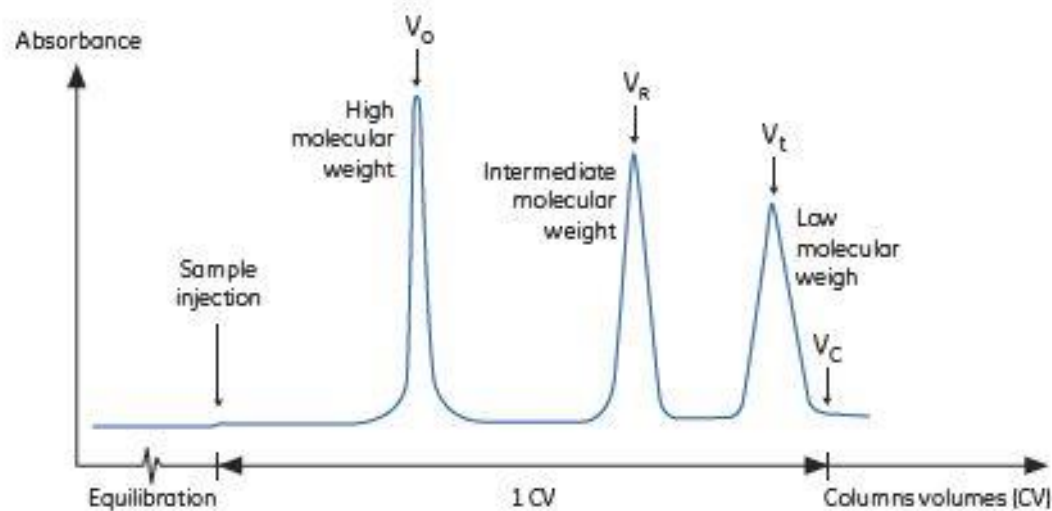
Elution sample에서 salt를 제거하거나 cell culture fluid에서 phenol red 지시약을 제거하는 desalting에 사용하거나, column에 sample을 loading하기 위해서 buffer 교환을 할 때 사용하며, 아래와 같은 chromatogram을 얻을 수 있습니다.



[그림 2. 전형적인 Desalting Chromatogram]

## 2.4.2. Group Separation

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



[그림 3. 전형적인 Group Separation]

## 2.5 CIP (Cleaning In Place)

- ① 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 가용화하는데 충분합니다.
- ② 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 LH-20를 사용합니다. Sephadex LH-20 resin은 Sephadex G-25 resin을 Hydroxypropylation한 것으로 분석용뿐 아니라 산업용 스케일에서도 사용됩니다.

<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/en/GELifeSciences-kr/17009010>

## 4. FAQ

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

→ Swelling을 시작할 때 반드시 salt 용액 사용해야 합니다. <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/en/GELifeSciences-kr/17018002>

아래의 간단한 방법을 참고하시기 바랍니다

- ① 분말 resin을 0.2 M NaCl 용액에 적어도 5 분간 둡니다.
- ② 20°C 버퍼에 1~2일 간 두거나 끓는 물에 2 시간 둡니다.
- ③ 상등액은 버리고 새로운 버퍼로 갈아주는 것을 수 차례 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 resin	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

\* Beads 가 단단한 구형이기 때문에 Darcy's Law 를 따릅니다. 유속은 bed 압력에 비례하며 bed 높이에 반비례합니다.

\* Darcy's Law : Pores 관을 통과하는 유량에 대한 법칙으로, "단위면적 당 단위시간 당 흐르는 유량은 압력에 비례한다"는 것입니다.

### 4.3 Sephadex 제품별 Particle size와 Fractionation range는 어떻게 다른가요?

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

Resin	Grade	Particle size (wet beads, $\mu\text{m}$ )	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 컬럼 안의 sephadex는 무엇이며, 어떤 application이 가능한가요?

PD-10 Desalting 컬럼은 Sephadex G-25 resin을 충전 해서 제공합니다.

PD-10 컬럼을 사용해서 desalting, buffer교환, 샘플clean-up 등을 진행할 수 있습니다.

### 4.5.2 PD-10 Column을 재사용 할 수 있나요?

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

PD-10 Spin Adapter를 사용해서 PD-10 Empty Column에 Sephadex G-25를 packing해서 사용할 수 있습니다.

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

PD MidiTrap (3.5 ml & 5.3ml), PD MiniTrap (2.1 ml), PD SpinTrap (0.5 ml) 등이 있습니다.

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

#### 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
<b>Maximum sample volume</b>	<b>130 µl</b>	<b>180 µl</b>	<b>0.5 ml</b>	<b>1.0 ml</b>	<b>2.5 ml</b>
Volume of eluted sample (gravity)	-	-	1.0 ml	1.5 ml	3.5 ml
Volume of eluted sample (spin) <sup>1</sup>	130 µl	180 µl	0.5 ml	1.0 ml	2.5 ml
Recovery <sup>2</sup>	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

<sup>1</sup> Applied volume = eluted volume

<sup>2</sup> Biomolecule depend