

# Cell Counting Kit-8 (WST-8)

## Cell Viability Assay Reagent

### 제품 설명

Cell Counting Kit-8은 WST-8을 주성분으로 사용하여 살아있는 세포의 양을 측정할 수 있는 Colorimetric assay 방식의 제품으로, Cell Viability, Proliferation Assay, Cytotoxicity Assay 등에 사용할 수 있습니다. 본 제품은 높은 안정성과 낮은 세포독성을 지니고 있어, 세포에 24~48시간 동안 처리해도 생존에 큰 영향을 주지 않으며, 처리 후에도 후속 실험을 원활하게 진행할 수 있습니다.

WST-8은 수용성 테트라졸륨 염(Water Soluble Tetrazolium Salt)으로, 살아있는 세포의 미토콘드리아 전자전달계에 존재하는 Dehydrogenase 효소에 의해 환원되어 수용성의 주황색 formazan을 생성합니다. 생성된 formazan은 배양액에 쉽게 용해되므로, 별도의 과정 없이 450 nm에서 마이크로플레이트 리더기로 흡광도를 측정하여 결과를 확인할 수 있습니다.

### 보관 및 안정성

- 본 제품은 갈색 튜브에 담겨 있어 빛으로부터 차단되어 있으며, 2~8 °C 냉장 보관할 경우 제조일로부터 1년 간 안정적인 성능을 유지합니다.
- 또한, -20 °C 이하에서 냉동 보관할 경우 제조일로부터 최대 2년 까지 사용이 가능하지만, 냉동과 해동을 반복하면 제품의 활성이 떨어질 수 있습니다.

### Blank (Background)

- 실험에 사용된 동일한 배양 배지 100  $\mu$ L에 Cell Counting Kit-8 10  $\mu$ L를 섞어 blank로 사용합니다.
- 배지의 종류, incubation 시간 등의 조건에 따라 흡광도 값이 영향을 받을 수 있으므로, blank를 설정해 주시기 바랍니다.

## 실험 방법 (Protocol)

- ① **[Cells Seeding]** 96 well plate에 세포 현탁액(세포 + 배양액)을 well당 100  $\mu$ L씩 분주하고, 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양합니다.
- ② **[Treatment]** 각 well에 실험할 물질을 적정 농도로 처리합니다.
- ③ **[Incubation]** CO<sub>2</sub> incubator에서 설정한 조건에 따라 적절한 시간 동안 배양합니다.
- ④ **[Cell Counting Kit-8 treat]** 각 well에 Cell Counting Kit-8 10  $\mu$ L (배양 배지의 10%)를 첨가합니다.
- ⑤ **[Incubation]** 30분 ~ 4시간 정도 incubation  
  
※ 세포주 및 상태에 따라 발색 시간은 달라질 수 있습니다. 발색 정도를 육안으로 확인하여 최적의 반응 시간을 설정하십시오.
- ⑥ **[shaking]** 측정 전 plate를 1분 정도 부드럽게 흔들어줍니다.
- ⑦ **[Measurement]** Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정합니다.

## ※ 참고 사항

1. 실험 물질에 reducing agent가 포함되어 있는 경우, Cell Counting Kit-8내의 WST-8과 반응하여 formazan이 형성될 수 있습니다. 이 경우, 실험 전에 흡광도를 미리 측정하여 간섭 여부를 확인하시기 바랍니다.
2. Cell Counting Kit-8 첨가 전 washing이 필요한 경우, PBS로 2~3회 washing한 뒤 각 well에 fresh 배양배지 100  $\mu$ L를 넣고 protocol 4번부터 진행하시면 됩니다.

## Viability 계산

이 식은 실험군의 세포 생존율을 백분율로 계산할 때 사용되며, Blank를 보정한 후, 대조군 (Control) 대비 상대적인 생존율을 나타냅니다.

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{Exp.} - \text{Blank}}{\text{Control} - \text{Blank}} \times 100$$

**Blank:** 세포가 없는 상태에서 배양액 + Cell Counting Kit-8만 처리한 well의 흡광도 (배경값)

**Control:** 실험 물질을 처리하지 않은 상태에서 세포 + 배양액 + Cell Counting Kit-8을 포함한 well의 흡광도 (100% 생존 기준)

**Exp.:** 실험 물질을 처리한 상태에서 세포 + 배양액 + Cell Counting Kit-8을 포함한 well의 흡광도 (실험군)

## Troubleshooting guide

| 문제 상황               | 원인                 | 해결 방법                                                                                                                         |
|---------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 흡광도 값이 너무 낮음        | 세포 수 부족 / 반응 시간 부족 | 세포 수를 늘리거나 incubation 시간을 늘리세요.                                                                                               |
| 모든 well에서 유사한 값이 나옴 | 시약 오염 / 처리 물질의 오류  | 새로운 시약으로 다시 실험하거나 처리 물질의 농도를 재확인하세요.                                                                                          |
| 배경 흡광도가 높음          | 배양액 또는 시약의 자발적 반응  | blank well을 설정하고 배경 값을 보정하세요. 배양액 조성을 확인하세요.                                                                                  |
| 발색이 너무 빠르거나 진함      | 세포 수 과다 / 반응 시간 과다 | 세포 수를 줄이거나 incubation 시간을 단축하세요. 시약의 사용량을 줄여보세요. 최적의 세포수에 적절한 흡광도 값은 0.5~1.5 사이입니다. 2.0 이상은 포화되어 상대적 viability 값이 달라질 수 있습니다. |
| 발색 반응이 없음           | 세포 사멸 / 시약 불안정     | 세포 상태를 확인하고, 시약 보관 조건을 점검하세요. 필요 시 새 시약으로 교체하세요.                                                                              |

## Q & A

### Q1. 다양한 종류의 well plate 및 dish 사용 가능 여부

Cell Counting Kit-8은 96 well 뿐만 아니라 6, 12, 24, 48 well plate 및 다양한 크기의 dish에서도 사용 가능합니다. 처리 시, 전체 부피(배양 배지+실험 물질)의 10%에 해당하는 Cell Counting Kit-8을 첨가하시면 됩니다.

### Q2. 현미경 관찰 결과와 Cell Counting Kit-8 결과가 다르게 나오는 경우

현미경 상으로는 세포가 많이 죽어 보이는데, Cell Counting Kit-8 실험 결과에서는 viability가 높게 나옵니다. 왜 그런가요?

A. 다음 두 가지 가능성을 고려해 보십시오.

#### a. Damaged Cell의 반응

시각적으로 죽은 것으로 보이는 세포들이 실제로는 damaged cell일 수 있습니다. 이들은 NADH dehydrogenase 활성이 일부 남아 있어 Cell Counting Kit-8내의 WST-8과 반응하여 formazan을 생성할 수 있습니다.

→ 실험 목적상 이러한 세포를 죽은 세포로 간주해야 하는 경우, 측정 전 washing 또는 제거 후 재 측정하는 것이 좋습니다.

#### b. 실험 물질에 의한 비특이적 환원 반응

일부 실험 물질이 Cell Counting Kit-8내의 WST-8을 직접 환원시켜 formazan을 생성할 수 있습니다.

→ 이 경우에도 washing 후 처리 및 측정을 권장합니다. (참고사항 1번)

### Q3. WST-8 실험 후 다른 실험 가능 여부

Cell Counting Kit-8은 세포 독성이 매우 낮고, 세포에 영향을 거의 주지 않기 때문에, 실험 후에도 후속 실험을 진행할 수 있습니다. (RNA extraction, western blot 등 기타 세포 실험)

### Q4. 실험 물질의 색이 실험에 미치는 영향

실험 물질이 색이 있는데 실험에 영향을 줄까요?

A. 네, 흡광도 측정에 간섭을 줄 수 있습니다. 이러한 경우에는 대조군 설정 및 배경 보정이 반드시 필요합니다.