

CONGEN

SureCC Color Compensation Kit IV

Art. No. F4012
3 calibration runs

User Manual



December 2025

Inhalt

1	Allgemeines	4
1.1	Beschreibung	4
1.2	Kit-Inhalt und Lagerung	4
1.3	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	4
1.4	Vorsichtsmaßnahmen	4
2	Protokoll	5
2.1	Ansatz der Farbstoffkalibrierungsplatte	5
2.2	Geräteeinstellungen	6
2.2.1	Programmierung des Detektionsformates	6
2.2.2	Neues Experiment einrichten	7
2.2.3	Programmieren des PCR-Layouts – Subset einrichten	8
2.2.4	Programmieren des PCR-Layouts – Samples einrichten	9
2.3	Starten des Experimentes.....	9
2.4	Auswertung und Erstellung eines CC-Files	10
3	Weitere Informationen	10
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	10
3.2	Technischer Support	10

SureCC Color Compensation Kit IV

(3 Kalibrierungsläufe)

Art. Nr. F4012

Dezember 2025



Content

1	General Information.....	11
1.1	Description.....	11
1.2	Kit components and storage	11
1.3	Additionally required equipment and materials	11
1.4	Precautions for users	11
2	Protocol	12
2.1	Preparation of the color compensation plate	12
2.2	Setup	13
2.2.1	program the detection format.....	13
2.2.2	Set a new experiment	14
2.2.3	Program the PCR layout – Subset Editor	15
2.2.4	Program the PCR layout – Sample Editor	16
2.3	Start of the experiment	16
2.4	Evaluation and creation of a CC-File.....	17
3	Further Information	17
3.1	Product Information.....	17
3.2	Technical Support.....	17

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

Dieses Kit ist für die Erstellung von Farbstoffkalibrierungsdateien (Color Compensation File) für 5plex-realtime-Experimente auf dem Roche LightCycler® 480 II konzipiert. Mit den fünf enthaltenen Lösungen lässt sich ein Color Compensation Experiment durchführen. Die dabei gewonnenen Fluoreszenzdaten werden genutzt, um eine Farbstoffkalibrierungsdatei zu generieren, die Informationen zur Korrektur von Überstrahlen (crosstalk) zwischen den Detektionskanälen in 5plex-realtime-PCR-Läufen enthält. Das erzeugte Color Compensation File kann anschließend zur Analyse von 5plex-realtime-PCR-Experimenten auf dem Roche LightCycler® 480 II verwendet werden.

1.2 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Blank	1 x 400 µl	White
2	Dye 1	1 x 400 µl	Blue
3	Dye 2	1 x 400 µl	Green
4	Dye 3	1 x 400 µl	Yellow
5	Dye 4	1 x 400 µl	Orange
6	Dye 5	1 x 400 µl	Red

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei **-28 bis -16°C** zu lagern.

1.3 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- real-time PCR Gerät: Roche LightCycler® 480 II
- real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Folien)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.4 Vorsichtsmaßnahmen

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

2 Protokoll

2.1 Ansatz der Farbstoffkalibrierungsplatte

Für einen Kalibrierungslauf müssen je Farbstoff, inklusive dem Farbstoffhintergrund (Blank), 5 Reaktionen mit je 20 µl wie folgt in eine real-time PCR Platte pipettiert werden. Siehe Abbildung 1:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	Blank		Dye 1		Dye 2		Dye 3		Dye 4		Dye 5	
E												
F												
G												
H												

Abbildung 1: Plattenlayout

Vor der Verwendung bitte die Lösungen auftauen, vortexen und zentrifugieren.

Kit Code	Reagenz	Menge pro Reaktion	Je 20 µl pipettieren in die folgenden Wells
1	Blank	20 µl	B1, C1, D1, E1, F1
2	Dye 1	20 µl	B3, C3, D3, E3, F3
3	Dye 2	20 µl	B5, C5, D5, E5, F5
4	Dye 3	20 µl	B7, C7, D7, E7, F7
5	Dye 4	20 µl	B9, C9, D9, E9, F9
6	Dye 5	20 µl	B11, C11, D11, E11, F11

Die komplette Platte nach dem Verteilen der Lösungen mit einer optischen Folie verschließen.

2.2 Geräteeinstellungen

2.2.1 Programmierung des Detektionsformates

Nach der Anmeldung in die Software ist es erforderlich, unter dem Button „**Einstellungen**“, das benötigte Detektionsformat zu programmieren (siehe Abbildung 2):

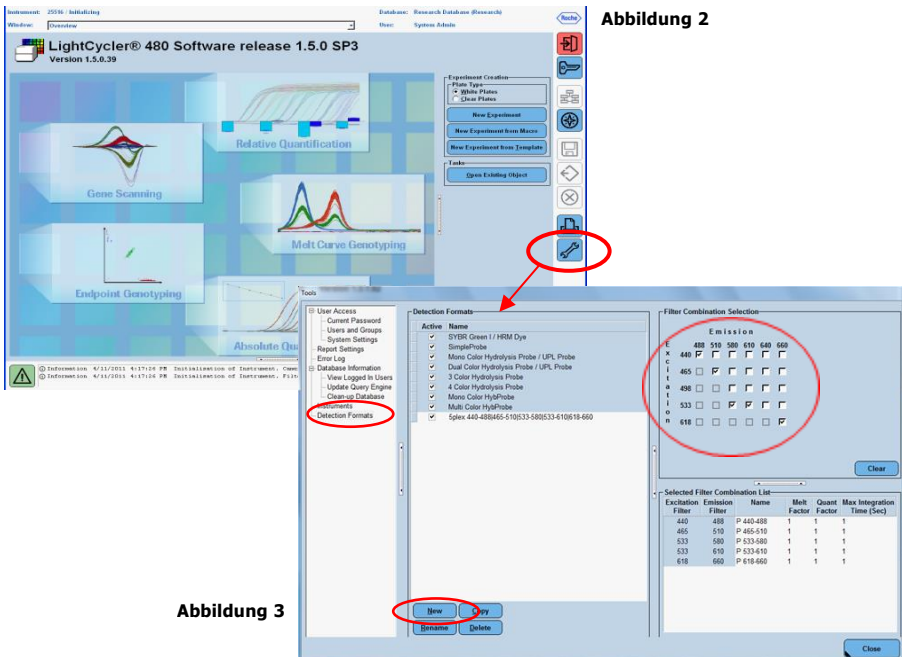


Abbildung 3

Im Tools Fenster „**Detection Formats**“ auswählen. Durch Anklicken des Buttons „**New**“ ein neues Detektionsformat anlegen (siehe Tabelle unten). Das Detektionsformat unter z.B. folgendem Namen „5plex 440-488 | 465-510 | 533-580 | 533-610 | 618-660“ abspeichern (siehe Abbildung 3):

Farbstoff-Name	Filter Kombination Roche LightCycler® 480 II
ATTO	440 - 488
FAM	465 - 510
VIC	533 - 580
ROX	533 - 610
Cy5	618 - 660

Quant- und Melfaktoren sowie Integration Time jeweils auf 1 setzen (siehe Abbildung 3).

Das Tools Fenster durch Drücken des Buttons „**Close**“ schließen.

2.2.2 Neues Experiment einrichten

Nach der Programmierung des Detektionsformates in der Abbildung 2 den Button „New Experiment“ anwählen. Folgendes Fenster öffnet sich (siehe Abbildung 4):

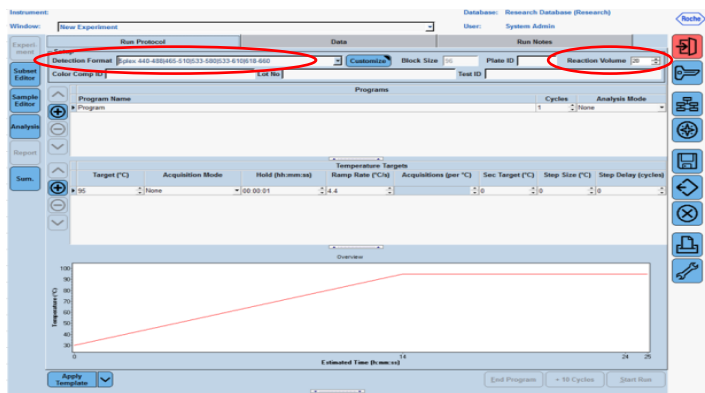


Abbildung 4

Als erster Schritt sollte hier das richtige Detektionsformat (siehe Vorgehen in der Abbildung 2 und 3) und das Reaktionsvolumen von 20 µl gewählt werden.

Anschließend sind folgende Programmschritte einzustellen (siehe Abbildung 5):

(Bitte auch auf die richtige Einstellung der Anzahl der Cycles und des Analysis Mode achten.)

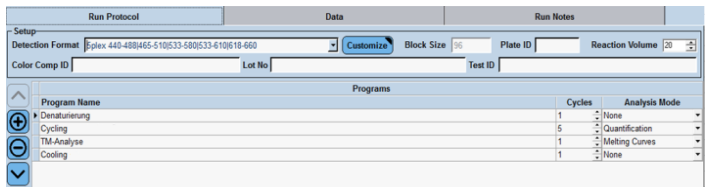


Abbildung 5

Folgende Temperatur- und Messpunkte programmieren:

Programm	Zyklen / Analysis Mode	Temperature targets			
		Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp rate [°C/s]
Initial Denat.	1 / none	95	none	00:00:30	4.4
Cycling	5 / Quantification	95	none	00:00:15	4.4
		60	single	00:00:30	2.2
TM-Analyse	1 / Melting Curves	95	none	00:00:01	4.4
		50	none	00:00:30	2.2
		70	continuous		0.14 (Acquisitions per °C = 1)
Cooling	1 / none	50	none	00:00:01	2.2

SureCC Color Compensation Kit IV (3 Kalibrierungsläufe)

Art. Nr. F4012

Dezember 2025

Nach Abschluss der Programmierung ergibt sich folgende Abbildung des Experimentes (siehe Abbildung 6):

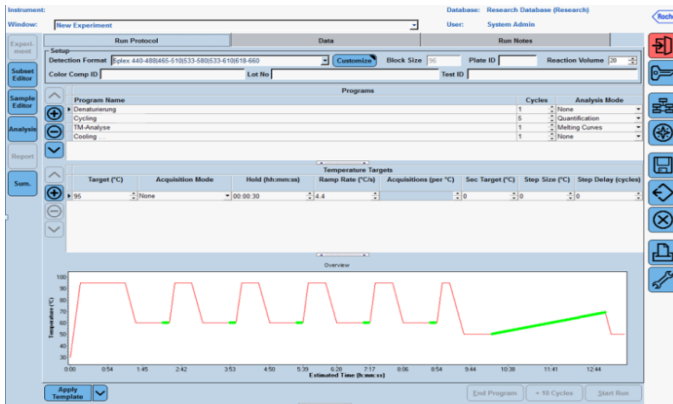


Abbildung 6

2.2.3 Programmieren des PCR-Layouts – Subset einrichten

Für das Programmieren des Layouts der PCR Platte, links den Button „Subset Editor“ auswählen.

Hier nun ein Subset durch Klicken auf den „Plus“-Button erstellen und dem Layout eine Bezeichnung z.B. CC Layout geben. Mit gedrückter Strg-Taste und der linken Maustaste alle Wells auswählen, in denen sich die Lösungen in der Platte befinden. Zur Fertigstellung des Subset den „Apply“ Button klicken.

Es sollte sich folgendes Bild ergeben (siehe Abbildung 7):

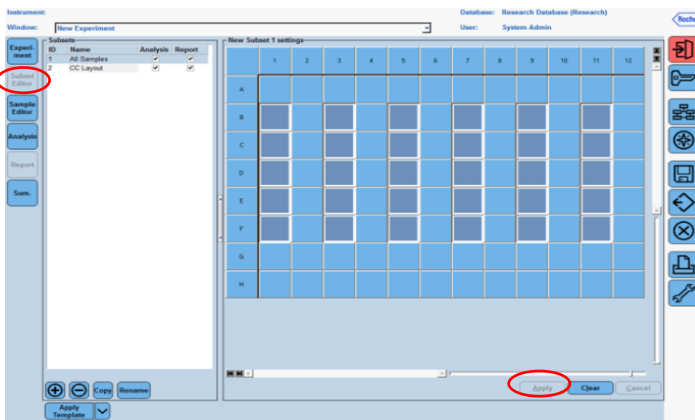


Abbildung 7

2.2.4 Programmieren des PCR-Layouts – Samples einrichten

Anschließend links den Button für „**Sample Editor**“ klicken. Hier nun bei Step 1 **Select Workflow** die Auswahl „**Color Comp**“ markieren. Dann im Step 2 **Select Samples** das vorher erstellte Subset, z B. CC, auswählen. Zum fertigen Programmieren des Layouts den jeweiligen Farbstoff (ATTO, FAM, VIC, ROX, Cy5) im Dominant Channel auswählen. Für die Reaktionen mit dem Farbstoffhintergrund (Blank) bitte „Water“ wählen. Es ist nicht nötig, einen „Sample Name“ für die Dye´s anzugeben (siehe Abbildung 8).

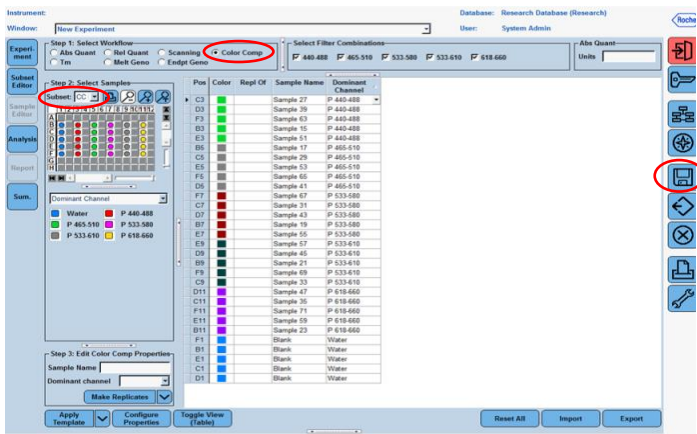


Abbildung 8

Reagenz	Dominant Channel	Farbstoff
Blank	Wasser	Blank
Dye 1	440 - 488	ATTO
Dye 2	465 - 510	FAM
Dye 3	533 - 580	VIC
Dye 4	533 - 610	ROX
Dye 5	618 - 660	CY5

Bitte die Änderungen und damit das Experiment mit einem Klick auf das Diskettensymbol speichern (siehe Abbildung 8).

2.3 Starten des Experimentes

Die Platte mit den vorbereiteten Reaktionen in den LightCycler® 480 II einsetzen.

Im Experiment Fenster (auf der linken Seite Button „**Experiment**“ klicken) den Lauf durch Klick auf den Button „**Start Run**“ (unten rechts) starten.

2.4 Auswertung und Erstellung eines CC-Files

Nach Abschluss des Experimentes auf den Button „**Analysis**“ an der linken Seite klicken und hier in der Dialog Box „**Create New Analysis**“ auf „**Color Compensation**“ gehen sowie die Auswahl bestätigen.

In der sich nun öffnenden Box das entsprechende Subset auswählen und die Auswahl bestätigen. In der sich öffnenden Analyse den Button „**Calculate**“ durch klicken auswählen. Durch Klicken auf den Button „**Save CC Object**“ am rechten unteren Rand diesen Lauf als ein CC Objekt unter dem Ordner „CC“ abspeichern. Damit ist die Generierung einer Farbstoff-Kalibrierungsdatei abgeschlossen.

Zur Anwendung der Farbstoffkalibrierung den jeweiligen multiplex Lauf öffnen und unter „**Analyse**“ den jeweiligen Kanal auswählen. Unter „**Color Comp (Off)**“ im Drop-Down-Menü die abgespeicherte Farbstoff-Kalibrierungsdatei aus der Datenbank auswählen (siehe Abbildung 9). Durch Wechseln des Buttons „**Color Comp (Off)**“ in „**Color Comp (On)**“ wird angezeigt, dass eine Farbstoffkalibrierung angewählt ist. Der multiplex PCR Lauf kann nun ausgewertet werden.

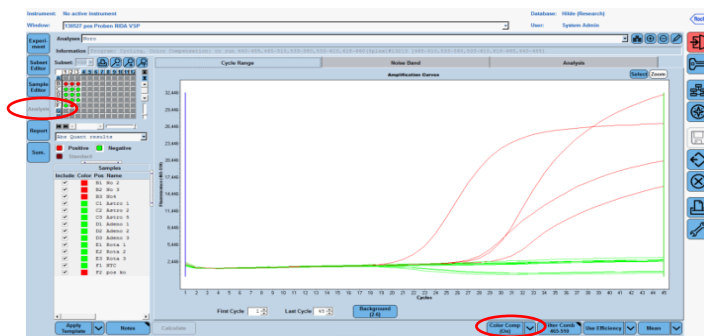


Abbildung 9

Hinweis: Die Farbstoffkalibrierungsdatei ist spezifisch für das jeweilige Gerät, d.h. bei einem Wechsel des Gerätes (oder auch bei Reparatur der optischen Einheit) ist eine neue Farbstoffkalibrierung nötig.

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/download)
- Produktbegleitende Unterlagen (Download: www.congen.de/eifu/)

3.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte per E-Mail an info@congen.de.

SureCC Color Compensation Kit IV

(3 calibration runs)

Art. No. F4012

December 2025

1 General Information

1.1 Description

This kit is designed for generating color compensation objects specifically for 5plex real-time experiments on the Roche LightCycler® 480 II instrument. Using the five included solutions, users can perform a color compensation experiment. The resulting fluorescence data are processed to create a color compensation file, which corrects crosstalk between detection channels during 5plex real-time PCR runs. The generated color compensation object can thereafter be applied to analyze 5plex real-time PCR experiments on the Roche LightCycler® 480 II.

1.2 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Blank	1 x 400 µl	White
2	Dye 1	1 x 400 µl	Blue
3	Dye 2	1 x 400 µl	Green
4	Dye 3	1 x 400 µl	Yellow
5	Dye 4	1 x 400 µl	Orange
6	Dye 5	1 x 400 µl	Red

Store all reagents at –28 to -16°C and protected from light.

1.3 Additionally required equipment and materials

- real-time PCR instrument: LightCycler® 480 II
- real-time PCR consumable (plates, foils)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

1.4 Precautions for users

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- This test must only be performed by laboratory personnel trained in molecular biology methods.
- Strictly follow the working instructions.
- When handling samples, wear disposable gloves. After finishing the test, wash your hands.
- Do not smoke, eat or drink in areas where samples or test reagents are being used.
- Do not use the kit after the expiration date.
- All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulation for disposal.

2 Protocol

2.1 Preparation of the color compensation plate

For a color compensation experiment it is necessary to pipette 5 reactions with 20 µl for each dye and 5 reactions with 20 µl for the fluorescence background (blank). See Figure 1:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	Blank		Dye 1		Dye 2		Dye 3		Dye 4		Dye 5	
E												
F												
G												
H												

Figure 1: pipetting scheme

Allow the reagents to thaw, mix by vortexing and centrifuge before opening and use.

Kit Code	Solution	Amount per reaction	Pipetting of 20 µl in following wells
1	Blank	20.0 µl	B1, C1, D1, E1, F1
2	Dye 1	20.0 µl	B3, C3, D3, E3, F3
3	Dye 2	20.0 µl	B5, C5, D5, E5, F5
4	Dye 3	20.0 µl	B7, C7, D7, E7, F7
5	Dye 4	20.0 µl	B9, C9, D9, E9, F9
6	Dye 5	20.0 µl	B11, C11, D11, E11, F11

Close the plate with an optical sealing foil after pipetting the solutions.

2.2 Setup

2.2.1 Program the detection format

Open the LightCycler® 480 II software. Please program under the icon for “tools” the necessary detection format (see Figure 2):

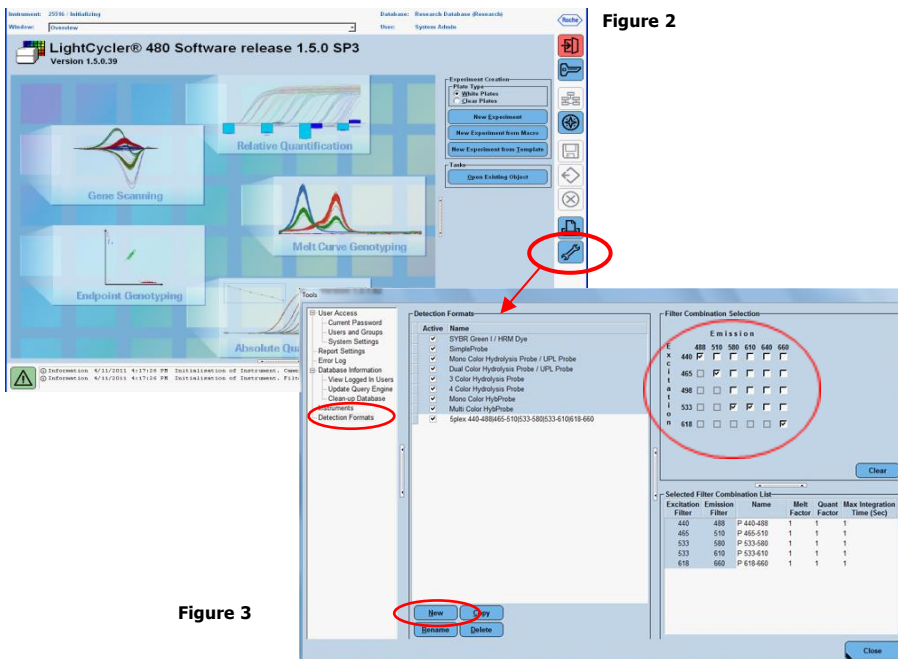


Figure 3

In the Tool window select “Detection Formats”. Click the “New” button to create a new detection format (see table below). Save it, for example as „Splex 440-488 | 465-510 | 533-580 | 533-610 | 618-660 “(see Figure 3).

Dye name	Filter Combination	Roche LightCycler® 480 II
ATTO		440-488
FAM		465 - 510
VIC		533 - 580
ROX		533 - 610
Cy5		618 - 660

Set the value for Quant- and Melt Factors as well as the Integration Time to 1 (see Figure 3).

Choose the “Close” button to exit the Tools window.

SureCC Color Compensation Kit IV (3 calibration runs)

Art. No. F4012

December 2025

2.2.2 Set a new experiment

After the programming of the detection format please choose the button „**New Experiment**“. The following window will open (see Figure 4):

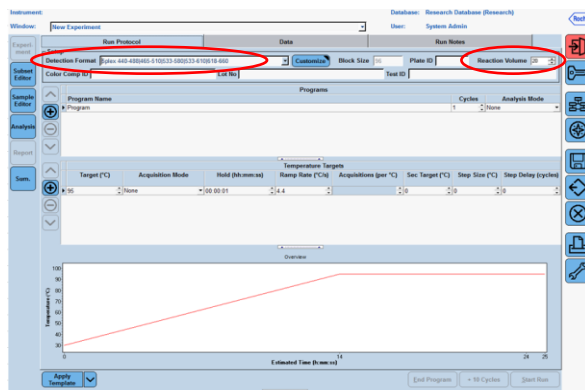


Figure 4

As the first step select the correct detection format (please choose the correct name – see procedure in figures 2 and 3) and correct reaction volume (20 µl).

The following protocol steps are to program (see Figure 5):

(Please pay attention to the correct Cycle number und Analysis Mode.)

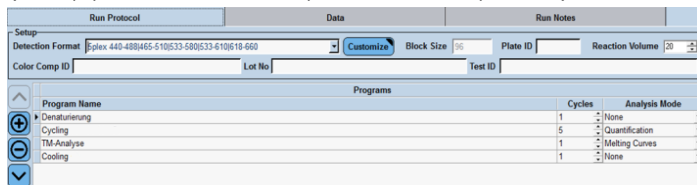


Figure 5

Please program following protocol steps, temperature targets and measurement points:

Program	Cycles / Analysis Mode	Temperature targets			
		Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp rate [°C/s]
Initial Denat.	1 / none	95	none	00:00:30	4.4
Cycling	5 / Quantification	95	none	00:00:15	4.4
		60	single	00:00:30	2.2
TM-Analyse	1 / Melting Curves	95	none	00:00:01	4.4
		50	none	00:00:30	2.2
		70	continuous		0.14 (Acquisitions per °C = 1)
Cooling	1 / none	50	none	00:00:01	2.2

The final screen should look like the screenshot below (see Figure 6):

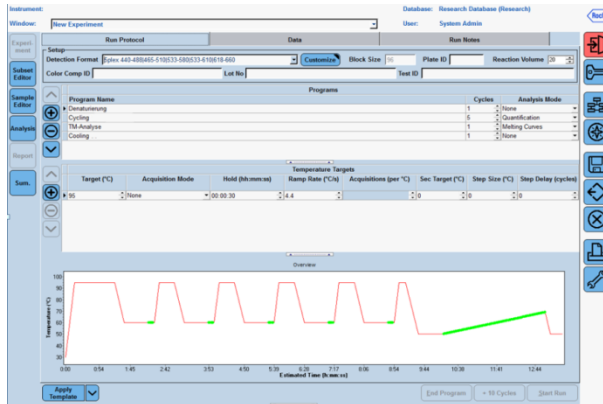


Figure 6

2.2.3 Program the PCR layout – Subset Editor

In order to select the correct PCR layout please click on the **“Subset Editor”** button on the left side.

Please create a subset through a click on the **“Plus”**-button and give the subset a name for example **“CC Layout”**. Now please press the Strg-key and the left mouse button simultaneously. Mark all wells with the solution inside the plate. Then click on the **“Apply”** button and the subset is ready.

The final screen should look like the screenshot below (see Figure 7):

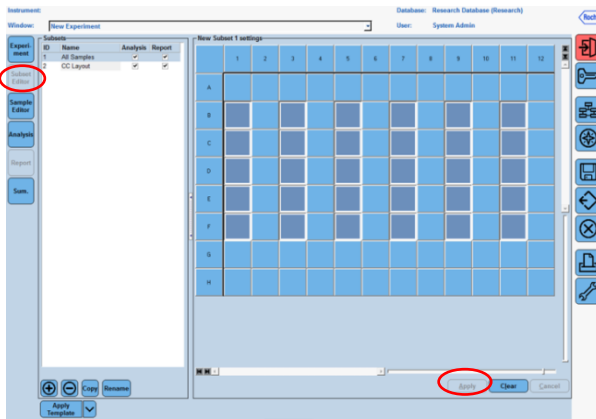


Figure 7

SureCC Color Compensation Kit IV

(3 calibration runs)

Art. No. F4012

December 2025

2.2.4 Program the PCR layout – Sample Editor

In the next step please select the “**Sample Editor**” button on the left side. Here please choose in the Step 1 **Select Workflow** the “**Color Comp**” tab. Now please select in Step 2 “**Select Samples**” dialog box the subset of the programming step before, e.g. “CC”. In the Dominant Channel dialog fields select the corresponding dyes (ATTO, FAM, VIC, ROX, CY5) in the different wells. For the reaction with the dye background (Blank), select “Water”. It is not necessary to give a “Sample Name” for the Dye’s (see Figure 8).

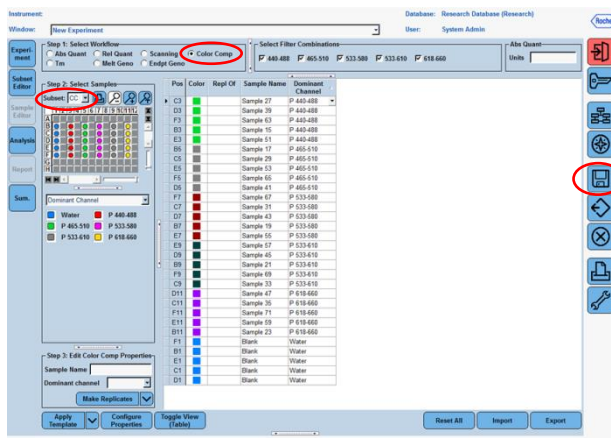


Figure 8

Reagent	Dominant Channel	Color
Blank	Water	Blank
Dye 1	440 - 488	ATTO
Dye 2	465 - 510	FAM
Dye 3	533 - 580	VIC
Dye 4	533 - 610	ROX
Dye 5	618 - 660	CY5

Please save your changes and the experiment by clicking on the disc icon (see Figure 8).

2.3 Start of the experiment

Place the PCR plate, which contains the reactions prepared before, into the LightCycler® 480 II.

Click the “**Start run**” button in the **Experiment** window (on the left side) to start the experiment.

2.4 Evaluation and creation of a CC-File

After the experiment ends, click the **"Analysis"** button in the left side of the window to open the **"Create New Analysis"** dialog box. Select **"Color Compensation"** and confirm your choice.

In the next dialog-box please select the subset und confirm your selection. Click now the button **"Calculate"** in the analysis window to perform color compensation analysis. Click **"Save CC Object"** button to save the Color Compensation file in the "CC" folder. The Color Compensation file is now ready to use.

To apply a Color Compensation file for data analysis, open under **"Analyse"** the respective multiplex assay and choose in **"Color Comb"** the needed filter combination. In the **"Color Comp"** drop-down menu (see figure 9) select "in Database" and choose the stored Color Compensation file you want to apply to the assay. The "Color Comp" button switches to **"Color Comp (On)"** to confirm that a Color Compensation is applied. The multiplex run can now evaluated.

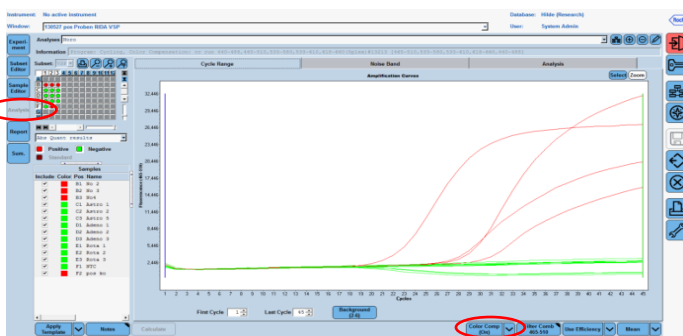


Figure 9

Note: As the Color Compensation is instrument-specific, it is necessary to generate a Color Compensation object for every LightCycler® 480 II. A new object also has to be created after the optical system has been repaired.

3 Further Information

3.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices (Download: www.congen.de/en/downloads)
- Product-related documents (Download: www.congen.de/en/eifu/)

3.2 Technical Support

For further questions please send an e-mail to info@congen.de.