

TYTUS BERNAŚ

*Pracownia Obrazowania Struktury i Funkcji Tkanek  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN  
Pasteura 3, 02-093 Warszawa  
e-mail: tbernas@nencki.gov.pl*

## MIKROSKOPOWE TECHNIKI KORELACJI FLUORESCENCJI

### WSTĘP

Ruchliwość molekularna i procesy transportu mają fundamentalne znaczenie w wielu procesach fizycznych, chemicznych oraz biologicznych. Przykładem jest mobilność białek w komórkach, która może być badana przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej techniki odzysku fluorescencji po fotobłaknięciu (ang. fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) lub utraty fluorescencji w fotobłaknięciu (ang. fluorescence loss in photobleaching, FLIP) (REITS i NEEFJES 2001, KLONIS i współaut. 2002, BANTING 2004, SPRAGUE i MCNALLY 2005, ISHIKAWA-ANKERHOLD i współaut. 2012). Pozwalają one wyznaczyć odpowiednie współczynniki dyfuzji, stałe wiązania oraz nie mobilną frakcję molekuł (CARRERO i współaut. 2003, 2004; SPRAGUE i współaut. 2004; SPRAGUE i MCNALLY 2005). Należy jednak zauważyć, że skala czasowa dostępna przy użyciu FRAP oraz FLIP jest ograniczona przez szybkość rejestracji obrazów mikroskopowych. Inną wadą wspomnianych metod jest konieczność użycia intensywnego światła do wywołania blaknięcia fluoroforów w żywych komórkach, co może indukować efekty fototoksyczne (DOBRUCKI i współaut. 2007, WOTZLAW i współaut. 2007, NISSIM-RAFINIA i MESHORER 2011). Alternatywę stanowi bezpośredni pomiar ruchu pojedynczych (izolowanych) cząsteczek (ang. single particle tracking, SPT) lub wykorzystanie spektroskopii korelacji fluorescencji (ang. fluorescence correlation spectroscopy, FCS). Technika ta została wprowadzona we wczesnych latach 70. XX w. przez Magde i

współaut. (MAGDE i współaut. 1974, patrz też TIAN i współaut. 2011), którzy wykorzystali ją do badania dynamiki interkalacji bromku etydyny do DNA. W pracy tej fluktuacje intensywności fluorescencji były generowane przez różnicę wydajności kwantowej (ang. quantum efficiency, QE) barwnika związanego z DNA (wysoka) i wolnego (niska). W późniejszych pracach zbadano wpływ dyfuzji na fluktuacje fluorescencji, rozwijając równocześnie technologię niezbędną do ich rejestracji i analizy (KOPPEL 1974). Znaczny stopień komplikacji technicznej oraz niewielka czułość przeszkadzały jednak w popularyzacji tej metody. Swój renesans FCS zawdzięcza zastosowaniu konfokalnego schematu detekcji (EIGEN i RIGLER 1994). Pozwoliło to na implementację FCS w mikroskopii biologicznej, przynosząc w rezultacie szereg instrumentów dostępnych komercyjnie (Zeiss Confocor, Picoquant, Becker and Hickl i in.). FCS dostarcza informacji o zachowaniu pojedynczych molekuł poprzez uśrednianie pomiarów dużego ich zbioru, osiągając dzięki temu znaczną precyzję (DIGMAN i GRATTON 2011, TIAN i współaut. 2011). Z drugiej strony, pomiar FCS jest z natury punktowy, co utrudnia mapowanie ruchliwości molekuł w środowiskach o złożonej strukturze przestrzennej, takich jak komórki.

Niniejszy artykuł opisuje zasady oraz ograniczenia klasycznego pomiaru FCS, a także pochodne techniki, które, dzięki wykorzystaniu korelacji przestrzennej pozwalają na obejście tych ograniczeń.

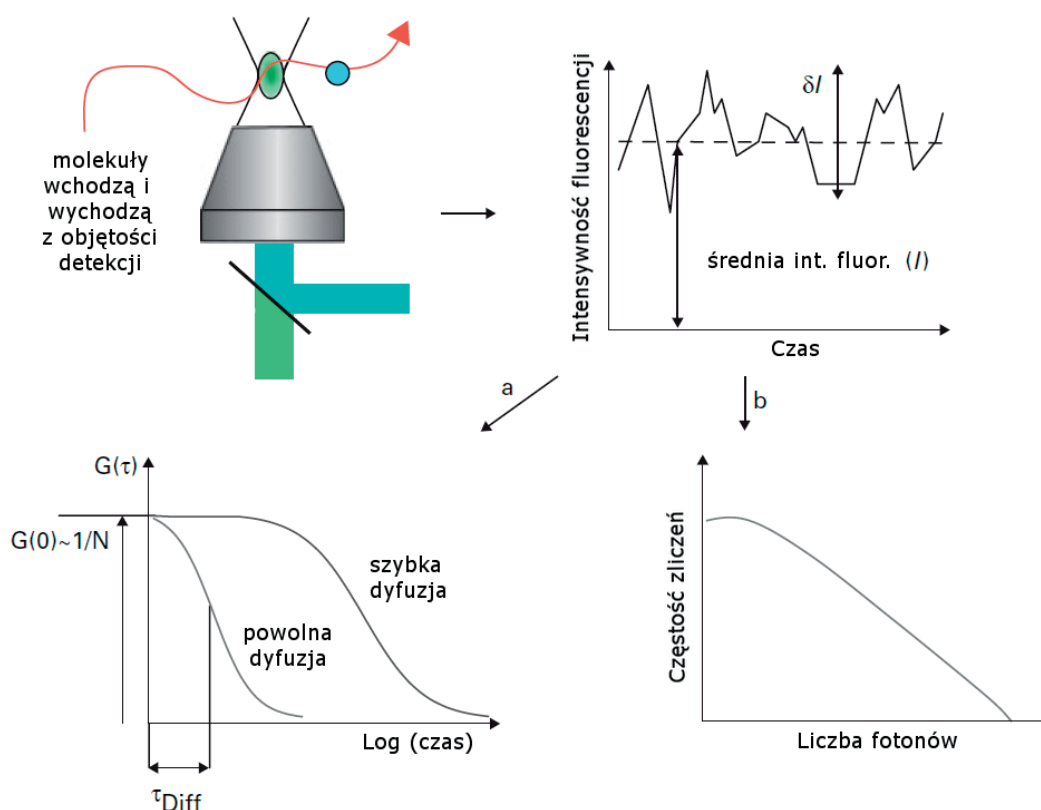
### PODSTAWY PUNKTOWEGO FCS

Współcześnie podstawę FCS stanowi analiza statystycznej zmienności sygnału fluorescencji generowanego przez niewielką liczbę molekuł znajdujących się w objętości konfokalnej (TIAN i współaut. 2011, pozostałe artykuły w tym numerze KOSMOSU). Pomiar FCS wymaga zatem czułości pozwalającej na rejestrację sygnału pochodzącego od pojedynczych molekuł, jednak jego rezultaty opisują uśrednione parametry dużej ich liczby (współczynniki dyfuzji, stężenia, stanu agregacji). Schemat typowego pomiaru FCS jest przedstawiony na Ryc. 1. Wiązka wzbudzenia (laser) jest ogniskowana w preparacie przy użyciu obiektywu o wysokiej aperturze numerycznej ( $NA > 1.1$ ), który w połączeniu z przysłoną konfokalną (inne artykuły w tym numerze KOSMOSU) tworzy sub-femtolitrową ( $< 10^{-15}$  l) objętość detekcji, z której rejestrowana jest fluorescencja pochodząca od zawartych tam molekuł. Jeżeli stężenie fluoroforu nie przekracza

10 nM w tej objętości znajduje się średnio nie więcej niż jedna molekula. W następnym ruchu (dyfuzji) molekula wchodzi i opuszcza objętość detekcji, czemu towarzyszą rozkłaski fluorescencji (fluktuacje jej intensywności). Charakterystyczna długość rozkłasków jest zależna od współczynnika dyfuzji (mobilności) fluoroforu, podczas gdy wariancja (amplituda fluktuacji) zawiera informację o średniej liczbie molekuł w objętości detekcji. Zazwyczaj oba te parametry wyznacza się wykorzystując funkcję autokorelacji intensywności fluorescencji w czasie:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}, \quad \delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle \quad (1)$$

gdzie:  $\langle I \rangle$  jest (czasową) średnią ( $\langle \rangle$ ) intensywności fluorescencji,  $\delta I(t)$  odchyleniem od średniej intensywności w czasie  $t$ , zaś  $\tau$  czasową skalą korelacji.



Ryc. 1. Zasada pomiaru FCS. Panele górne: schemat detekcji konfokalnej (lewo); zmiany intensywności fluorescencji w czasie, w roztworze dyfundujących molekuł (prawo).

Panele dolne: analiza autokorelacji pozwala (ścieżka a, lewo) wyznaczyć liczbę molekuł ( $N$ ) i charakterystyczny czas dyfuzji ( $\tau_{\text{Diff}}$ ); schematyczny wykres histogramu zliczeń fotonów (PCH, ścieżka b, prawo) (wg BREUSEGEM i współaut. 2006, zmieniona).

Charakterystyczny czas zaniku ( $\tau_D$ ) funkcji autokorelacji odpowiada średniej długości rozbłysków fluorescencji (czasowi potrzebnemu na przebycie objętości detekcji). Znając rozmiary i kształt, można, dopasowując funkcję modelową do  $G(\tau)$  obliczyć współczynnik dyfuzji  $D$  (odwrotnie proporcjonalny do  $\tau_D$ ) oraz średnią liczbę molekuł  $N$  (odwrotnie proporcjonalną do  $G(0)$ ). W najprostszym przypadku gdy objętość detekcji jest przybliżona rozkładem normalnym (funkcją Gaussa) w 3D, a pomiar dokonywany jest w roztworze mamy:

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D} \right)^{-1/2}, \quad \tau_D = \frac{w_y}{4D} \quad (2)$$

gdzie:  $\tau_D$  jest charakterystycznym czasem korelacji,  $S$  stosunkiem promieni charakteryzujących objętość detekcji w 3D ( $w_z/w_{xy}$ ),  $D$  współczynnikiem dyfuzji.

#### METODY SPEKTROSKOPII KORELACYJNEJ

Czasowe widma fluktuacji (analizowanego przy pomocy ACF), to jeden z dwóch aspektów tego zjawiska. Drugim jest widmo amplitudowe, które jest analizowane przy użyciu PCH (ang. photon counting histogram) i FIDA (ang. fluorescence intensity distribution analysis). Obie techniki wykorzystują histogram zliczeń fotonów (CHEN i współaut. 1999, KASK i współaut. 1999, MULLER 2004). Nie ma on postaci rozkładu Poissona (której można by oczekiwać gdyby objętość detekcji była oświetlona równomiernie), lecz jest w stosunku do niego poszerzony przez: nierównomierność profilu wzbudzenia, fluktuacje liczby fluoryzujących molekuł oraz szum detektora. Dopasowanie odpowiedniego modelu (superpozycji wielu rozkładów Poissona) do histogramu zliczeń pozwala określić molekularną jasność ( $\epsilon$ ) jednej lub kilku klas fluoroforów oraz odpowiednie średnie liczby (stężenia) w objętości detekcji (CHEN i współaut. 1999, MULLER 2004, DIGMAN i GRATTON 2011). PCH/FIDA umożliwia rozróżnienie monomerów, dimerów oraz większych agregatów w populacji mobilnych molekuł. Na przykład, można ustalić, że w próbce znajduje się 35% monomerów o średniej jasności 2000 zliczeń na molekułę (cpm) oraz 65% dimerów jasności 4000 cpm. Agregacja zmienia także współczynnik dyfuzji ( $D$ ), jednakże (dla dyfuzji w 3D) jego zależność od masy molekularnej wyraża się proporcjonalnością do  $M^{-1/3}$ . Tak

Bardziej rozbudowane modele uwzględniają fluktuacje wywołane przechodzeniem molekuł w (tripletowy) stan ciemny, dyfuzję anomalną oraz wielokomponentową (LAKOWICZ 1999). Należy zauważyć, że choć analiza mobilności molekuł pozostaje głównym biologicznym zastosowaniem FCS, to inne procesy (takie jak wygaszanie w reakcjach chemicznych), które prowadzą do zmian intensywności fluorescencji w czasie także mogą być badane tą metodą. Krzywa autokorelacji pozwala wówczas obliczyć odpowiednie stałe kinetyczne (SPRAGUE i MCNALLY 2005, BREUSEGEM i współaut. 2006). Warto też wspomnieć o alternatywnych w stosunku do funkcji autokorelacji metodach analizy dynamiki molekuł w spektroskopii korelacyjnej (PALMER i THOMPSON 1987a, b).

więc, jakkolwiek przy użyciu FCS można rozróżnić molekuły związane (np. w kompleksie makromolekularnym) od mobilnych, to PCH/FIDA nadaje się lepiej do analizy równowagi monomer-oligomer.

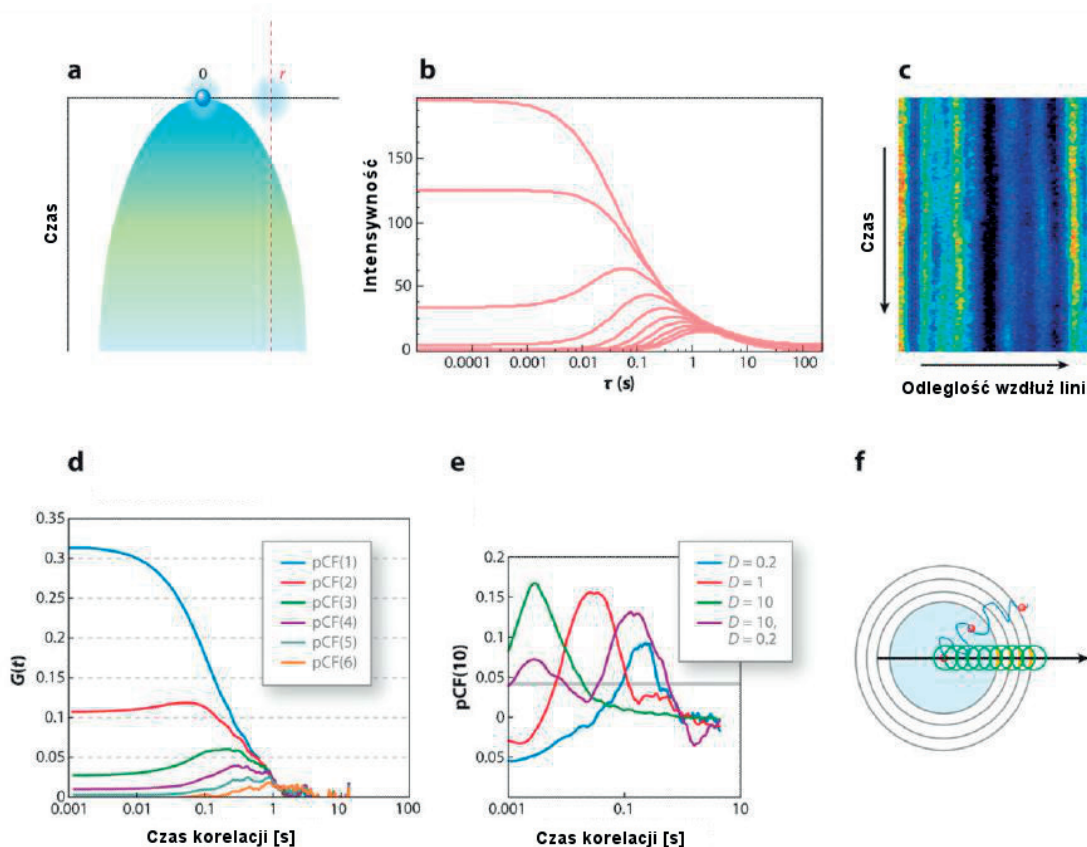
Istotnym ograniczeniem FCS jest brak informacji o fluktuacjach obecnych w pobliżu badanego punktu (objętości). Trzeba bowiem pamiętać, że wiele procesów fizycznych, chemicznych i biologicznych cechuje się skalą przestrzenną. Przykładem dostarcza zależność charakterystycznego czasu dyfuzji ( $\tau_D$ ) od wzbudzonej objętości. Skala innych procesów, takich jak wiązanie do statycznych struktur, migotanie (ang. blinking) oraz ruchy rotacyjne są niezależne od tego parametru. Efekt ten może zostać wykorzystany do rozróżnienia tych dwóch klas zjawisk. Obrotowa symetria objętości wzbudzenia nie pozwala jednak na wykrycie przestrzennych niejednorodności.

Fluktuacje intensywności można uzyskać także poruszając ogniskiem (wiązką) wzbudzenia w próbce w sposób periodyczny. Jeżeli szybkość ruchu jest znacznie większa od tej, z którą poruszają się badane molekuły to fluktuacje niosą informację o lokalizacji przestrzennej wzdłuż skanowanego toru (WEISSMAN i współaut. 1976, KOPPEL i współaut. 1994). Wykorzystuje się tu wiązkę poruszającą się orbicie kołowej lub linii prostej (DIGMAN i GRATTON 2011). Analiza fluktuacji pomiędzy kolejnymi okresami (skanami) ujawnia

informację o czasowym przebiegu fluktuacji wzdłuż skanowanego toru. Funkcje korelacji obliczane są tu zatem dla każdego punktu z osobna oraz dla par punktów leżących na orbicie lub torze (DIGMAN i GRATTON 2011). Szczególnym przypadkiem takiego podejścia jest zastosowanie korelacji par (ang. pair correlation function, pCF) do statystycznego śledzenia molekulej poruszającej się w komórce (DIGMAN i współaut. 2009; CARDARELLI i GRATTON 2010; HINDE i współaut. 2010, 2011). Fluorescencja jest próbkowana (z szybkością porównywalną do ruchu molekulej) w wielu punktach. Jeżeli molekulej w czasie  $t=0$  znajduje się w danym punkcie, to prawdopodobieństwo jej znalezienia w innym punkcie spada wraz z kwadratem odległości pomiędzy punktami (Ryc. 2a). Ponadto, dla każdego z punktów leżących w danej odległości  $r$  od pozycji początkowej oczekiwana intensywność zmienia się w funkcji czasu (Ryc. 2b), dzięki czemu skanując po linii prostej otrzymuje się

charakterystyczny wzór (ang. carpet) (Ryc. 2c). Fluktuacje intensywności pomiędzy dwoma punktami są skorelowane, jeśli w danym czasie molekulej pojawi się kolejno w tych punktach, przy czym amplituda korelacji spada wraz z odległością (Ryc. 2d), a położenie maksimum zależy od szybkości migracji. Wydłużenie charakterystycznego czasu korelacji świadczy o występowaniu barier swobodnej dyfuzji, których położenie można oszacować badając różne pary punktów.

Podejście korelacyjne może być także wykorzystane do analizy dystrybucji fluorescencji w całym polu widzenia mikroskopu (kamery), przy użyciu spektroskopii korelacji obrazu (ICS). Jeżeli obrazowane obiekty (takie jak kompleksy białkowe) mają rozmiar porównywalny lub większy niż PSF (ang. point spread function) mikroskopu, to korelacja pomiędzy pikselami dostarcza informacji o ich średniej wielkości oraz rozmieszczeniu (PETERSEN 1986, KOLIN i WISEMAN 2007). Z kolei rejestracja se-



Ryc. 2. Zasada pomiaru pCF.

Prawdopodobieństwo znalezienia molekulej w odległości  $r$  od jej początkowego położenia i po czasie  $t$  (a). Intensywność (amplituda) funkcji autokorelacji w różnych odległościach od punktu początkowego (b i c). Funkcja korelacji wzajemnej dla różnych odległości dzielących dwa punkty (d) i różnych współczynników dyfuzji przy odległości 10 pikseli (e). Zależność prawdopodobieństwa (wykres a) od stosunku powierzchni detekcji do oczekiwanej odległości dyfuzji (f), dla procesu 2D (wg DIGMAN i GRATTON 2009, zmieniona).



rii czasowej obrazów całego obiektu pozwala na obliczenie czasowej korelacji sygnału poszczególnych pikseli i oszacowanie dyfuzji oraz przepływu kierunkowego (BREUSEGEM i współaut. 2006, KOLIN i współaut. 2006). Szereg wariantów tej techniki, takich jak STICS (ang. spatio-temporal ICS) oraz kICS (ang. k-space ICS) zostało rozwiniętych w ostatnich latach (KOLIN i współaut. 2006, KOLIN i WISEMAN 2007), podobnie jak rastrowa korelacja obrazu (RICS), która operuje na skali rozdzielczości czasowej pośredniej pomiędzy FCS a ICS. RICS wykorzystuje skanowanie obrazu w mikroskopie konfokalnym, dzięki czemu sygnały pochodzące z sąsiednich pikseli są skorelowane zarówno w przestrzeni, jak i w czasie (jaki upływa na rejestrację piksela, całej linii lub ramki), podobnie jak w skaningowym FCS. Pozwala to na badanie mobilności molekuł w szerokim zakresie skali czasowych (DIGMAN i GRATTON 2009, 2011). Atrakcyjność RICS zwiększa fakt, że technikę tę można stosować w połączeniu ze standardowym mikroskopem konfokalnym (DIGMAN i współaut. 2005, DIGMAN i GRATTON 2009). Tego rodzaju urządzenie może także zostać wykorzystane w technice N&B (ang. number and brightness) do wykrywania agregacji molekuł, jako prostsza alternatywa PCH/FIDA (DIGMAN i współaut. 2008).

Większość pomiarów FCS wykorzystuje mikroskop konfokalny i nieruchomą (zaparkowaną) wiązkę światła wzbudzającego. W miejsce standardowych detektorów mikroskopowych (fotopowielaczy pracujących w trybie integracji sygnału) stosuje się urządzenia do zliczania fotonów: fotodiody lawinowe (APD), płytki (fotopowielacze) mikrokanalowe (MCP) oraz detektory hybrydowe (HyD) (BECKER i współaut. 2011). Odpowiedni osprzęt do pomiarów TCSPC jest produkowany przez wiele firm i oferowany w połączeniu z niemal wszystkimi dostępnymi obecnie mikroskopami konfokalnymi (DIGMAN i GRATTON 2011). Oprogramowanie pozwalające na wykorzystanie złożonych modeli analitycznych (obejmujących dyfuzję wielokomponentową, agregację, procesy

fotofizyczne) jest rutynowo wykorzystywane w komercyjnych systemach. FCS może też zostać użyty w połączeniu z mikroskopem dwufotonowym, który realizuje tomografię optyczną przez ograniczenie objętości wzbudzenia do ogniska obiektywu (PAWLEY 2006). Pozwala to ograniczyć fotobłaknięcie występujące poza rejestrowaną płaszczyzną optyczną. Dodatkowo, fluorescencja różnych barwników może być wzbudzona tą samą długością fali świetlnej, jeżeli odbywa się to przez równoczesną absorpcję dwóch fotonów (PAWLEY 2006). Ułatwia to pomiary techniką korelacji wzajemnej (FCCS), w której dwie badane molekuly są znakowane różnymi fluoroforami, rejestrowanymi przez osobne detektory. Jeżeli molekuly poruszają się niezależnie to fluktuacje fluorescencji wywoływane przez ich dyfuzję nie są skorelowane (amplituda odpowiedniej funkcji  $G$  wynosi 0). W przeciwnym wypadku, gdy molekuly znajdują się w objętości detekcji jako kompleks, rozbłyski fluorescencji ich znaczników występują razem ( $G > 0$ ). FCCS może więc stanowić alternatywną do FRET technikę wykrywania oddziaływań molekularnych.

Niedawne wprowadzenie szybkich kamer EMCCD oraz sCMOS pozwoliło na równoczesny pomiar korelacji czasowej w całym polu widzenia mikroskopu, co stanowi alternatywę pomiaru punktowego dla wolniejszych procesów. Połączenie tego schematu detekcji ze wzbudzeniem typu „light sheet” pozwoliło na dokonanie pomiaru mobilności molekuł równocześnie w wielu regionach grubych preparatów (np. embrionów) (LAM i współaut. 2012, SANKARAN i współaut. 2013, SINGH i współaut. 2013).

Zastosowanie szybkich detektorów (MCP, SPAD, HyD) oraz impulsowych źródeł światła umożliwiła (w trybie TCSPC) na równoczesny pomiar czasu zaniku fluorescencji (FLIM) i FCS. Dzięki temu (stosując technikę FCLS) można wyeliminować impulsy pasożytnicze (np. detector afterpulsing, rozproszenie Ramana) z pomiarów korelacji (BREUSEGEM i współaut. 2006).

## MIKROSKOPOWE TECHNIKI KORELACJI FLUORESCENCJI

### Streszczenie

Ruchliwość molekuł ma fundamentalne znaczenie w wielu procesach fizycznych, chemicznych oraz biologicznych. Mikroskopowe pomiary z użyciem korelacji zmian (fluktuacji) fluorescencji pozwalają wyznaczyć współczynniki dyfuzji, stałe wiązania oraz stężenia znakowanych mole-

kuł. Niniejszy artykuł opisuje podstawy pomiarów punktowych przy użyciu korelacji fluorescencji w czasie (FCS) oraz pochodnych metod wykorzystujących przestrzenną korelację fluorescencyjnego obrazu mikroskopowego i korelację czasowo-przestrzenną.

## FLUORESCENCE CORRELATION MICROSCOPY

## Summary

Molecular mobility is crucial in numerous physical, chemical and biological processes. Microscopy measurements of fluorescence changes (fluctuations) can be used to estimate diffusion coefficients, binding constants and concentrations of labeled molecules. This short review describes

the principles of point-wise microscopic measurements with fluorescence correlation spectroscopy. Furthermore, basics of its derivatives using spatial and spatio-temporal correlation of fluorescence microscopy data are given.

## LITERATURA

- BANTING G., 2004. *Photobleaching (FRAP/FLIP) and dynamic imaging. Encyclopedia of genetics, genomics, proteomics and bioinformatics.* John Wiley & Sons, Ltd.
- BECKER W., SU B., HOLUB O., WEISSHART K., 2011. *FLIM and FCS Detection in Laser-Scanning Microscopes: Increased Efficiency by GaAsP Hybrid Detectors.* *Micr. Res. Techn.* 74, 804–811.
- BREUSEGEM S. Y., LEVI M., BARRY N. P., 2006. *Fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy.* *Nephron Exp. Nephrol.* 103, e41–e49.
- CARDARELLI F., GRATTON E., 2010. *In vivo imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes by pair correlation functions.* *PLoS One* 5.
- CARRERO G., CRAWFORD E., TH'NG J., DE VRIES G., HENDZEL M. J., 2004. *Quantification of protein-protein and protein-DNA interactions in vivo, using fluorescence recovery after photobleaching.* *Meth. Enzymol.* 375, 415–42.
- CARRERO G., McDONALD D., CRAWFORD E., DE VRIES G., HENDZEL M. J., 2003. *Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins.* *Methods* 29, 14–28.
- CHEN Y., MÜLLER J. D., SO P. T. C., GRATTON E., 1999. *The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy.* *Biophys. J.* 77, 553–567.
- DIGMAN M. A., BROWN C. M., SENGUPTA P., WISEMAN P. W., HORWITZ A. R., GRATTON E., 2005. *Measuring fast dynamics in solutions and cells with a laser scanning microscope.* *Biophys. J.* 89, 1317–1327.
- DIGMAN M. A., DALAL R., HORWITZ A. R., GRATTON E., 2008. *Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope.* *Biophys. J.* 94, 2320–2332.
- DIGMAN M. A., GRATTON E., 2009. *Analysis of diffusion and binding in cells using the RICS approach.* *Microsc. Res. Tech.* 72, 323–332.
- DIGMAN M. A., GRATTON E., 2011. *Lessons in fluctuation correlation spectroscopy.* *Annu. Rev. Phys. Chem.* 62, 645–68.
- DIGMAN M. A., WISEMAN P. W., CHOI C., HORWITZ A. R., GRATTON E., 2009. *Stoichiometry of molecular complexes at adhesions in living cells.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 2170–2175.
- DOBROUCKI J., FERET D., NOATYNSKA A., 2007. *Scattering of exciting light by live cells in fluorescence confocal imaging: phototoxic effects and relevance for FRAP studies.* *Biophys. J.* 93, 1778–1786.
- EIGEN M., RIGLER R., 1994. *Sorting single molecules - application to diagnostics and evolutionary biotechnology.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5740–5747.
- HINDE E., CARDARELLI F., DIGMAN M. A., GRATTON E., 2010. *In vivo pair correlation analysis of EGFP intranuclear diffusion reveals DNA-dependent molecular flow.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 16560–16565.
- HINDE E., CARDARELLI F., DIGMAN M. A., KERSHNER A., KIMBLE J., GRATTON E., 2011. *The impact of mitotic versus interphase chromatin architecture on the molecular flow of EGFP by pair correlation analysis.* *Biophys. J.* 100, 1829–1836.
- ISHIKAWA-ANKERHOLD H. C., ANKERHOLD R., DRUMMEN G. P., 2012. *Advanced fluorescence microscopy techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM.* *Molecules* 17, 4047–40132.
- KASK P., PALO K., ULLMANN D., GALL K., 1999. *Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 13756–13761.
- KLONIS N., RUG M., HARPER L., WICKHAM M., COWMAN A., TILLEY L., 2002. *Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics.* *Eur. Biophys. J.* 31, 36–51.
- KOLIN D. L., RONIS D., WISEMAN P. W., 2006. *k-Space image correlation spectroscopy: a method for accurate transport measurements independent of fluorophore photophysics.* *Biophys. J.* 91, 3061–3075.
- KOLIN D. L., WISEMAN P. W., 2007. *Advances in image correlation spectroscopy: measuring number densities, aggregation states, and dynamics of fluorescently labeled macromolecules in cells.* *Cell Biochem. Biophys.* 49, 141–164.
- KOPPEL D. E., 1974. *Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy.* *Physical Review A* 10, 1938–1945.
- KOPPEL D. E., MORGAN F., COWAN A. E., CARSON J. H., 1994. *Scanning concentration correlation spectroscopy using the confocal laser microscope.* *Biophys. J.* 66, 502–507.
- LAKOWICZ J., 1999. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- LAM C. S., MISTRI T. K., FOO Y. H., SUDHAHARAN T., GAN H. T., RODDA D., LIM L. H., CHOU C., ROBSON P., WOHLAND T. i współaut., 2012. *DNA-dependent Oct4-Sox2 interaction and diffusion properties characteristic of the pluripotent cell state revealed by fluorescence spectroscopy.* *Biochem. J.* 448, 21–33.
- MAGDE D., ELSON E. L., WEBB W. W., 1974. *Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization.* *Biopolymers.* 13, 29–61.
- MULLER J.D., 2004. *Cumulant analysis in fluorescence fluctuation spectroscopy.* *Biophys. J.* 86, 3981–3992.
- NISSIM-RAFANIA M., MESHORER E., 2011. *Photobleaching assays (FRAP & FLIP) to measure chromatin protein dynamics in living embryonic stem cells.* *J. Vis. Exp.* 52, e2696.
- PALMER A. G., 3rd, THOMPSON N. L., 1987a. *Theory of sample translation in fluorescence correlation spectroscopy.* *Biophys. J.* 51, 339–343.
- PALMER A. G., 3rd, THOMPSON N. L., 1987b. *Molecular aggregation characterized by high order auto-*

- correlation in fluorescence correlation spectroscopy*. Biophys. J. 52, 257–270.
- PAWLEY J., 2006. *Handbook of biological confocal microscopy*: Springer London, Limited.
- PETERSEN N. O., 1986. *Scanning fluorescence correlation spectroscopy. I. Theory and simulation of aggregation measurements*. Biophys. J. 49, 809–815.
- REITS E. A., NEEFJES J. J., 2001. *From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells*. Nat. Cell Biol. 3, E145–E147.
- SANKARAN J., BAG N., KRAUT R. S., WOHLAND T., 2013. *Accuracy and Precision in Camera-Based Fluorescence Correlation Spectroscopy Measurements*. Anal. Chem. 85, 3948–3954.
- SINGH A. P., KRIEGER J. W., BUCHHOLZ J., CHARBON E., LANGOWSKI J., WOHLAND T., 2013. *The performance of 2D array detectors for light sheet based fluorescence correlation spectroscopy*. Opt. Express 21, 8652–8668.
- SPRAGUE B. L., McNALLY J. G., 2005. *FRAP analysis of binding: proper and fitting*. Trends Cell Biol. 15, 84–91.
- SPRAGUE B. L., PEGO R. L., STAVREVA D. A., McNALLY J.G., 2004. *Analysis of Binding Reactions by Fluorescence Recovery after Photobleaching*. Biophys. J. 86, 3473–3495.
- TIAN Y., MARTINEZ M. M., PAPPAS D., 2011. *Fluorescence correlation spectroscopy: a review of biochemical and microfluidic applications*. Appl. Spectrosc. 65, 115A–124A.
- WEISSMAN M., SCHINDLER H., FEHER G., 1976. *Determination of molecular weights by fluctuation spectroscopy: application to DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2776–2780.
- WOTZLAW C., OTTO T., BERCHNER-PFANNSCHMIDT U., METZEN E., ACKER H., FANDREY J., 2007. *Optical analysis of the HIF-1 complex in living cells by FRET and FRAP*. FASEB J. 21, 700–707.