

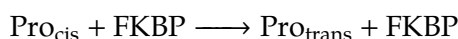
Tentamen i KFKF01 Molekylära drivkrafter 2: Växelverkan och dynamik, 30 maj 2017

Tillåtna hjälpmedel: Miniräknare (med tillhörande handbok), utdelat formelblad med tabellsamling samt SI Chemical Data och TEFYMA eller motsvarande.

Alla beräkningar skall utföras så noggrant som möjligt utifrån de förutsättningar som ges i uppgiften och tillgängliga data i tabellsamling. Slutsatser skall motiveras samt approximationer och beräkningar redovisas. Tag för vana att alltid göra en rimlighetsbedömning.

För godkänt krävs att totala poängantalet på tentamen och eventuell inlämningsuppgift är minst 30.

1. Enzymet FKBP katalyserar cis→trans-isomerisering av aminosyran prolin. Reaktionen kan skrivas



FKBPs radie är ca 2 nm. Låt prolin befinna sig i en kort peptid med radien 0,75 nm.

Uppskatta flödet av peptid till en FKBP-molekyl. Ange svaret i antal molekyler per sekund. Peptidkoncentrationen är 16 μM, viskositeten $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ kg s}^{-1} \text{ m}^{-1}$ och temperaturen 298 K.

Du får anta att peptiden diffunderar mycket snabbare än FKBP. (6p)

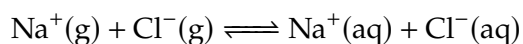
2. På en proteinyta (i planet $x = 4$ så att proteinet breder ut sig i området $x \geq 4$) finns en positivt laddad grupp (+1e) i koordinaten (4, 0, 0) Å och en negativt laddad grupp (laddning -2e) i koordinaten (4, 4, 0) Å.

(a) Beräkna vilket arbete som krävs för att föra en kloridjon från ett mycket stort avstånd i omgivande vattenfas till punkten (0, 2, 0) Å. Du får negligera eventuella effekter av ytan i beräkningarna.

(b) Proteinets har en betydligt lägre relativ permittivitet än vattnet. Om du tar hänsyn till detta, skulle arbetet bli större eller mindre än det du beräknade i uppgift (a)? Motivera! (6p)

3. Låt oss beskriva ett protein med totalladdningen -7e som en sfär med radien 19 Å där laddningen är placerad i mitten. Proteinets är löst i en vattenlösning med 40 mM NaCl vid 298 K. Beräkna den elektriska potentialen samt både Na^+ - och Cl^- -koncentrationerna vid avståndet 5 Å från proteinets yta. (6p)

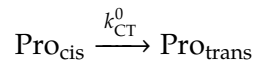
4. (a) Beräkna, med Bornekvationen, den fria energiändringen det innebär att föra 1 mol Na^+ -joner och 1 mol Cl^- -joner från gasfas till vattenlösning vid 298 K och oändlig utspädning. Alltså, beräkna $\Delta G^\ominus$ för reaktionen



Jonradien kan sättas till 1,7 Å för Na^+ och 2,2 Å för Cl^- .

- (b) Skulle ändringen i fri energi för ovanstående process bli högre eller lägre om en mängd (t.ex. 100 mM) av saltet redan fanns i i vattenlösningen? Förklara varför med ord och visa vilket samband du skulle använda för att utföra beräkningen för den processen. (6p)

5. α -helixar i proteiner har ett dipolmoment på ca $3,5n$ Debye (n är antalet aminosyror i helixen). Den elektriska potentialen från dessa helixdipoler har ibland antagits vara av betydelse för både proteinstabilitet och interaktion med olika typer av ligander. Dipolens riktning är parallell med den axel genom helixen som pekar från C- till N-terminalen. Du får anta att dipolmomentet är placerat precis mitt på axeln samt att relativa permittiviteten är 6.
- (a) Beräkna interaktionsenergin mellan två helixdipoler med längden 15 aminosyror om dessa är placerade antiparallellt med varandra på avståndet 7 Å (ett typiskt avstånd mellan två α -helixar i ett protein). Ange energin i kJ/mol.
- (b) Beräkningen av interaktionen i uppgift (a) är mycket approximativ. Man skulle rentav kunna hävda att den är felaktig. Varför? (6p)
6. Den okatalyserade hastighetskonstanten k_{CT}^0 för reaktionen

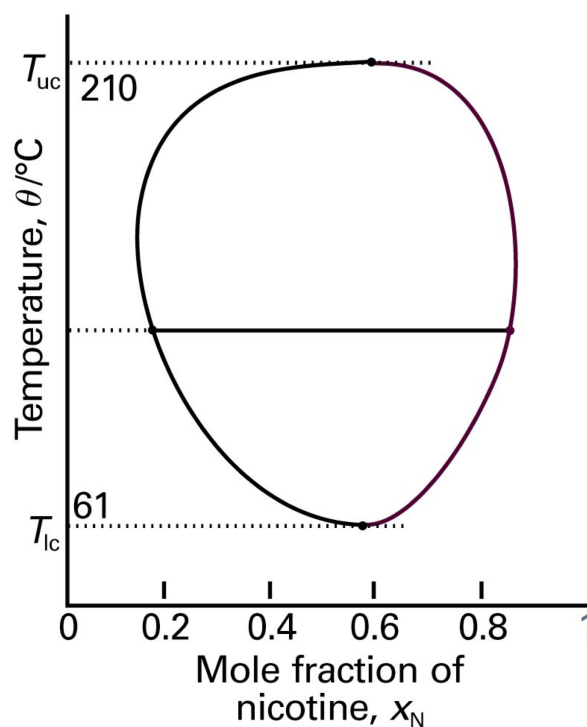


för prolin i en peptid har bestämts till ca $0,04 \text{ s}^{-1}$ vid 298 K. När enzymet FKBP katalyserar denna reaktion vid samma temperatur (se uppgift 1) har hastighetskonstanten av andra ordningen för den katalyserade reaktionen bestämts till $k_{CT}^{\text{cat}} = 3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

- (a) Beräkna $\Delta G^\ddagger$ för både den okatalyserade och katalyserade reaktionen under antagandet att $\kappa = 1$.
- (b) Beräkna inbindningskonstanten $\overline{K_B}$ för inbindningen av FKBP till transition state.
- (c) Utnyttja uppgift 1 för att avgöra om den katalyserade reaktionen är diffusionsbegränsad (beroende på hur du löste uppgift 1 kan du behöva göra ytterligare någon beräkning). (6p)
7. En väl designad Monte Carlosimulering (MC) kan potentiellt utforska ett systems energilandskap mer utförligt än en molekylodynamiksimulering (MD), givet att de två simuleringarna körs under lika lång processortid (t.ex. en vecka) på likadana datorer. Varför är det så?
- Ledning:* Det finns två huvudsakliga skäl. Det första beror på grundprinciperna bakom metoderna och det andra på antalet beräkningar som behöver utföras i varje simuleringssteg. (6p)

8. Nedanstående figur visar fasdiagrammet för nikotin–vatten under tryck (så att systemet är flytande även vid höga temperaturer).

Beskriv vad som händer om du värmer ett system som med $x_{\text{nikotin}} \approx 0,58$ från 50°C till 220°C . Var noga med att beskriva hur systemet förändras, vilka faser som eventuellt uppstår och vid vilka temperaturer ändringarna sker. För full poäng skall även systemets sammansättning vid den temperatur som ges av den vågräta linjen specificeras: Vilka faser finns där, vilka sammansättningar har de och hur stor andel av systemet befinner sig i respektive fas?



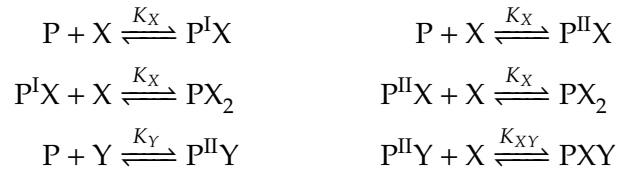
(6p)

9. Som ni väl känner till är det inte möjligt att förutsäga fasdiagrammet i uppgift 8 med Bragg–Williamsmodellen eftersom denna inte ger rätt temperaturberoende. Istället får vi nöja oss med att beskriva systemet termodynamiskt med den hydrofoba effekten.

- (a) Skissa i ett och samma diagram hur $\Delta\mu^\ominus$, $\Delta h^\ominus$ och $T\Delta s^\ominus$ för processen att föra över nikotin från ren nikotin till vattenfas beror av temperaturen för att ett fasdiagram av denna typ skall kunna uppkomma. Det räcker med det principiella utseendet av kurvorna. De behöver alltså inte vara kvantitativt korrekta.
- (b) Från ~~figuren~~ fasdiagrammet är det faktiskt möjligt att avgöra ungefär vid vilken temperatur $\Delta h^\ominus = 0$. Gör det och motivera ditt svar.

(6p)

10. Ett protein kan binda liganden X i två olika säten. Det kan dessutom binda liganden Y till ett av sätena (men inte det andra). När Y binder minskar affiniteten av X till det andra sätet. Detta kan beskrivas med följande jämvikter (där I och II markerar det första och andra sätet):



$$K_X = K_Y = 1,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ och } K_{XY} = 1,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}.$$

- Teckna bindningspolynomet Q (du kommer att kunna teckna två identiska bindingspolynom eftersom det finns två reaktionsvägar, så bli inte förvirrad av det).
- Bestäm den fria ligandkoncentration $[X]$ som krävs för att, vid $[Y] = 0 \text{ M}$, det genomsnittliga antalet bundna X-ligander skall vara $v_X = 1,00$.
- Bestäm det genomsnittliga antalet bundna X och Y om $[X]$ är lika med ditt resultat i (b) och om $[Y] = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

(6p)

Lösningar Tentamen i KFKF01, 30 maj 2017

1. Stoke–Einsteins ekvation ger peptidens diffusionskonstant $D = 2,91 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$. Flödet är $4\pi Da \cdot C$ där C är koncentrationen peptid och a är FKBP's radie. Med partikelkoncentrationen $C = N_A \cdot 15 \cdot 10^{-6} \cdot 1000 = 9,6 \cdot 10^{21} \text{ m}^{-3}$ fås flödet $7,0 \cdot 10^4$ molekyler per sekund.

För uppgift 6 behöver vi även $k_a = 4\pi Da \cdot 1000 N_A = 4,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ($1000 N_A$ enhetsomvandlar från m^3s^{-1} till $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

2. (a) Avståndet mellan de bägge laddningarna och punkten $(0, 2, 0)$ är $4,47 \text{ Å}$. Alltså är elektriska potentialen i denna punkt

$$\psi = \frac{1}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0} \left(\frac{1e}{4,47 \cdot 10^{-10}} - \frac{2e}{4,47 \cdot 10^{-10}} \right) = (0,0413 - 0,0826) \text{ V} \\ = -41,3 \text{ mV}$$

Arbetet ges helt enkelt av (fria) energin för kloridjonen då den placeras i denna potential, dvs $w = q\psi = -1e \cdot (-0,0413) = 6,61 \cdot 10^{-21} \text{ J} = 3,98 \text{ kJ/mol}$.

Några studenter försökte sig på att använda $\Delta G = (1/2) \sum_i q_i \psi_i$. Detta fungerar tyvärr inte om man endast räknar över kloridjonen. Faktorn $1/2$ i uttrycket kommer ju av att summan räknar varje interaktion två gånger.

- (b) Kloridjonen kommer att repelleras av gränssytan, eftersom det uppstår en negativ polarisationsyt-laddning där (som om det uppstod en negativ spegelladdning inuti proteinet). Därför kommer det att krävas ett större arbete (w blir mer positivt).
3. Denna löses med lösningen till LPB för en laddad sfär samt Nernsts ekvation. $1/\kappa = 15,2 \text{ Å}$ ger $\psi_a = -30,1 \text{ mV}$ och $\psi(24 \text{ Å}) = -17,1 \text{ mV}$. Nernsts ekvation ge sedan koncentrationerna (endast värdena vid 24 Å söktes i uppgiften):

r	$[\text{Na}^+] / \text{mM}$	$[\text{Cl}^-] / \text{mM}$
(a)	128,9	12,4
24 Å	78,0	20,5

4. (a) Bornekvationen uppskattar växelverkan mellan jonerna och omgivande lösningsmedel. För natriumjonen fås

$$\Delta G_{\text{Na}}^{\ominus} = \frac{N_A e^2}{8\pi\epsilon_0 \cdot a_{\text{Na}}} \left(\frac{1}{78,5} - 1 \right) = -403 \text{ kJ mol}^{-1}$$

För kloridjonen fås på samma sätt $\Delta G_{\text{Cl}}^{\ominus} = -312 \text{ kJ mol}^{-1}$. Den totala ändringen i fri energi är -715 kJ mol^{-1} .

Observera att vi missar två bidrag på detta sätt (men frågan gällde endast Bornbidraget). Det ena kommer från fria energin att öppna kaviteter i lösningsmedlet. Det andra kommer från kostnaden i fri energi (entropi) att byta koncentration mellan standardtillståndet i gasfas (1 bar) och standardtillståndet i vattenlösning

(1 M). Det första kommer att bli signifikant men det andra kan nästan helt försummas här: $-RT \ln(p^\ominus/p(1\text{ M})) \approx 8\text{ kJ mol}^{-1}$ per jon.

- (b) Den skulle bli lägre (mer negativ, dvs mer gynnsam) eftersom jonerna skulle växelverka attraktivt med det "jonmoln" av motsatt laddade joner som bildas kring varje jon. Jonerna får alltså aktivitetsfaktorer som är mindre än 1. Detta bidrag kan beräknas med Debye-Hückelekvationen.

Denna uppgift var lite olyckligt formulerad. Det borde stått "av ett annat salt, t.ex. KBr" eftersom avsikten var att processen även i (b) skulle ske vid oändlig utspädning. Därför har ganska många börjat tänka på koncentrationens betydelse för ΔG . Den som resonerade rätt här, dvs att ΔG (nu inte med $^\ominus$) skulle bli högre än $\Delta G^\ominus$ (alltså mindre negativ), fick poäng för det (vattnet har ju redan löst en del salt och drivkraften för att lösa mer är alltså lägre än vid oändlig utspädning). Med andra ord ökar lösningens blandningsentropi mer vid en tillsats av joner då man är vid oändlig utspädning än då man är vid en högre koncentration.

För att klargöra vad jag menar ovan kan vi t.ex. se på natriumjonerna

$$\mu(\text{aq}) = \mu^\ominus(\text{aq}) + RT \ln \gamma + RT \ln ([\text{Na}]/(1\text{ M}))$$

Jag önskade att få ett svar kring $RT \ln \gamma$ -termen (som blir < 0) men flera valde att resonera kring $RT \ln ([\text{Na}]/(1\text{ M}))$ -termen, som kommer att vara högre (mindre negativ) vid 100 mM NaCl än vid oändlig utspädning.

5. (a) Det jobbigaste med denna uppgift är nog att fundera ut vinklarna som behövs för att räkna ut interaktionen mellan de bägge dipolmomenten, som bägge är $\mu = 15 \cdot 3,5 = 52,5\text{ D} = 1,75 \cdot 10^{-28}\text{ C m}^{-1}$. Kom ihåg att z-axeln är definierad som att gå igenom centrum av dipolerna. Eftersom dipolerna är antiparallella (tänk er två motriktade blyertspennor som ligger bredvid varandra) måste därför $\varphi_1 - \varphi_2 = \pi$ och $\theta_1 = \theta_2 = \pi/2$. Vi får

$$\begin{aligned} u_{\mu\mu} &= \frac{\mu_1 \mu_2}{4\pi \epsilon_r \epsilon_0 r^3} \cdot (\sin \theta_1 \sin \theta_2 \cdot \cos(\varphi_1 - \varphi_2) - 2 \cos \theta_1 \cos \theta_2) \\ &= \frac{\mu^2}{4\pi \epsilon_r \epsilon_0 r^3} \cdot \left(\sin^2 \left(\frac{\pi}{2} \right) \cdot \cos \pi - 2 \cos^2 \left(\frac{\pi}{2} \right) \right) \\ &= \frac{\mu^2}{4\pi \epsilon_r \epsilon_0 r^3} \cdot (1^2 \cdot (-1) - 0) = -1,34 \cdot 10^{-19}\text{ J} = -80,7\text{ kJ mol}^{-1} \end{aligned}$$

Detta är alltså en ganska stor energi, vilket beror på att det är så stora dipolmoment.

- (b) Problemet är att vi bara kan approximera en laddningsfördelning som en ideal dipol (placerad i en enda punkt utan utbredning) på stora avstånd. 7 Å är ett litet avstånd jämfört med de bägge helixarnas längd. En bättre beskrivning vore att placera ut realistiska partialladdningar i helixarna och sedan beräkna totala interaktionen mellan de bägge helixarnas partialladdningar.

6. (a) Eyringekvationen, $k = (k_B T/h) \cdot \overline{K}^\ddagger$, ger $\overline{K}^\ddagger_0 = 6,44 \cdot 10^{-15}$ för den okatalyserade reaktionen och $\overline{K}^\ddagger_{\text{cat}} = 4,83 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ för den katalyserade.

Med hjälp av $\Delta G^\ddagger = -RT \ln \overline{K}^\ddagger$ beräknas sedan $\Delta G^\ddagger_0 = 81,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ och $\Delta G^\ddagger_{\text{cat}} = 36,0 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Kommentar om enheterna: Flera skrivande på tentamen undrade över enheten på $k_{\text{CT}}^{\text{cat}}$. Kom ihåg att jämviktskonstanten $\overline{K}^\ddagger_{\text{cat}}$ är associationsjämvikten mellan transition state och reaktanterna, dvs

$$\overline{K}^\ddagger_{\text{cat}} = \frac{[\text{EP}^\ddagger]}{[\text{E}][\text{P}]}$$

där $[\text{EP}^\ddagger]$ är koncentrationen transition state-komplex, $[\text{E}]$ är koncentrationen FKBP och $[\text{P}]$ är koncentrationen peptid. Enheten M^{-1} i hastighetskonstanten uppkommer alltså från enheten för jämviktskonstanten $\overline{K}^\ddagger_{\text{cat}}$. Som ni förhoppningsvis minns från termodynamikkursen bör egentligen alla jämviktskonstanter definieras så att de blir enhetslösa, t.ex.

$$\overline{K}^\ddagger_{\text{cat}} = \frac{[\text{EP}^\ddagger]/(1 \text{ M})}{[\text{E}]/(1 \text{ M}) \cdot [\text{P}]/(1 \text{ M})}$$

Gör man det försvinner M^{-1} från både jämvikts- och hastighetskonstanterna. Nackdelen med detta är dock att man då inte längre, genom att kika på enheten för K , enkelt kan se vilket standardtillstånd som är valt.

- (b) Paulings princip ger direkt $\overline{K}_B = k_{\text{CT}}^{\text{cat}}/k_{\text{CT}}^0 = 7,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$.

Om man misslyckats att hitta denna i formelsamlingen eller rent allmänt vill förstå varför den blir som den blir kan man göra

$$\overline{K}_B = \frac{[\text{EP}^\ddagger]}{[\text{P}^\ddagger][\text{E}]} = \frac{[\text{EP}^\ddagger]}{[\text{E}][\text{P}]} \cdot \frac{[\text{P}]}{[\text{P}^\ddagger]} = \overline{K}^\ddagger_{\text{cat}} \cdot \frac{1}{\overline{K}^\ddagger_0} = \frac{k_{\text{CT}}^{\text{cat}}}{k_{\text{CT}}^0}$$

där andra likheten fås genom att förlänga med $[\text{P}]$ och den fjärde med hjälp av Eyringekvationen.

- (c) I uppgift 1 uppskattades $k_a = 4,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Eftersom den experimentella hastighetskonstanten ($k_{\text{CT}}^{\text{cat}}$) är mycket mindre än k_a är det något annat som begränsar hastigheten än diffusionen. Alltså är den katalyserade reaktionen inte diffusionsbegränsad.

7. Eftersom ledningen var ganska rejäl behöver svaret ges med viss detaljrikedom.

För full poäng bör man skriva något om att man i en MC kan tvinga systemet att ta ofysikaliska språng i energilandskapet. Exempelvis kommer en MC-förflyttning att accepteras om den nya energin blir lägre än den gamla även om steget involverar ett hopp över en hög energibarriär. I en MD-simulering skulle simuleringen behöva "runda" barriären, vilket kan ta väldigt lång tid.

Det andra skälet är att man i en MD behöver beräkna både *energin* och *kraften* (så att nya hastigheter för molekylerna kan beräknas) i varje simuleringssteg. Kraften är ju dessutom en tredimensionell vektor, så i princip behöver tre derivator av energin beräknas för varje atom. I en MC beräknas endast energin i varje steg. Givet att man har exakt samma system (lika många atomer och likadant kraftfält) behövs alltså nästan fyra gånger fler beräkningar i varje steg i en MD.

8. För full poäng måste det framgå att

- vid temperaturen 50°C befinner sig systemet i en enda vätskefas.
- vid 61°C delar systemet sig i två olika faser. Det är mer av den nikotinrika fasen än av den vattenrika (molbråket 0,58 befinner sig närmare höger kant av tvåfasområdet än vänster).
- då temperaturen fortsätter öka minskar halten nikotin i den vattenrika fasen och halten vatten i den nikotinrika fasen (ämnena löser varandra sämre och sämre).
- vid ungefär 155°C börjar ämnena lösa varandra bättre igen, dvs halten nikotin i den vattenrika fasen och halten vatten i den nikotinrika fasen börjar öka.
- över 210°C återgår systemet till endast en vätskefas.
- vid den vågräta lingen är det en fas med $x_{\text{nikotin}} = 0,16$ och en med $x_{\text{nikotin}} = 0,85$. Hävstångsregeln ger därför att kvoten mellan hur stor del av systemet som är i den nikotinrika fasen och den vattenrika fasen är $(0,58 - 0,16)/(0,85 - 0,58) = 1,56$, dvs 61% av systemet (det totala antalet mol) befinner sig i den nikotinrika fasen.

Parentesisk information: Vid rättningen visade det sig att en några (kanske 10 stycken) tror att hävstångsregeln ger hur mycket av t.ex. nikotinet som befinner sig i respektive fas. Detta är alltså inte rätt tolkning men om man vill veta kan det enkelt beräknas ur ovanstående (ges utan härledning men gör gärna det själva. Man vet ju aldrig vad som dyker upp på kommande tentamen):

$$\text{andel av nikotinet i vattenrik fas} = \frac{0,16 \cdot (1 - 0,61)}{0,58} = 0,11$$

$$\text{andel av nikotinet i nikotinrik fas} = \frac{0,85 \cdot 0,61}{0,58} = 1 - 0,11 = 0,89$$

9. (a) Bilden du behöver rita är i princip identisk med bokens figur 31.1b (med ett annat temperaturintervall på x -axeln, förstås).
- (b) van't Hoffs ekvation säger att $\Delta h^\circ = 0$ då $d \ln K/dT = 0$. Det är temperaturen där systemet "vänder" från att ämnena löser sig sämre i varandra då temperaturen ökar (dvs $d \ln K/dT < 0$ om K t.ex. definieras som $x_{\text{nik i w}}/x_{\text{nik i nik}}$) till att de börjar lösa sig bättre i varandra igen ($d \ln K/dT > 0$), dvs löslighetsminimum vid ca 155°C. Detta är temperaturen T_h .

10. (a) Totalkoncentrationen protein är

$$c_P = [P] + [P^I X] + [P^{II} X] + [PX_2] + [P^{II} Y] + [PXY]$$

Eftersom det finns två sätt att teckna $[PX_2]$ (den bildas antingen från $[P^I X]$ eller från $[P^{II} X]$) går det nu att få två bindningspolynom. Dessa kommer dock att bli exakt lika eftersom det är samma jämviktskonstant K_X för bägge reaktionsvägarna.¹

$$\begin{aligned} c_P &= [P] + 2[P][X]K_X + [P^I X][X]K_X + [P][Y]K_Y + [P^{II} Y][X]K_{XY} \\ &= [P] + 2[P][X]K_X + [P][X]^2 K_X^2 + [P][Y]K_Y + [P][X][Y]K_Y K_{XY} \\ &= [P] (1 + 2K_X[X] + K_X^2[X]^2 + K_Y[Y] + K_Y K_{XY}[X][Y]) \end{aligned}$$

så att

$$Q = 1 + 2K_X[X] + K_X^2[X]^2 + K_Y[Y] + K_Y K_{XY}[X][Y]$$

- (b)

$$v_X = \frac{[X]}{Q} \cdot \frac{dQ}{d[X]} = \frac{2K_X[X] + 2K_X^2[X]^2 + K_Y K_{XY}[X][Y]}{1 + 2K_X[X] + K_X^2[X]^2 + K_Y[Y] + K_Y K_{XY}[X][Y]}$$

Vi pluggar in detta i Solver, med $[Y] = 0$ och $v_X = 1,00$ och finner $[X] = 6,67 \mu\text{M}$.

- (c) Här behöver vi dessutom

$$v_Y = \frac{[Y]}{Q} \cdot \frac{dQ}{d[Y]} = \frac{K_Y[Y] + K_Y K_{XY}[X][Y]}{1 + 2K_X[X] + K_X^2[X]^2 + K_Y[Y] + K_Y K_{XY}[X][Y]}$$

Insättning av $[X] = 6,67 \mu\text{M}$ och $[Y] = 30 \mu\text{M}$ ger $v_X = 0,50$ och $v_Y = 0,55$.

¹Hade man haft olika bindningskonstanter för de bägge reaktionsvägarna hade man kunnat teckna bägge polynomen för att finna relationer mellan de olika jämviktskonstanterna (se t.ex. tentamen från 2016). Säg t.ex. att det finns fyra jämviktskonstanter för inbindning av en X, beroende på vilket säte som binder först: $K_X^I, K_X^{II}, K_X^{I,II}$ och $K_X^{II,I}$. Detta är jämviktskonstanterna för de fyra första jämvikterna. Då fås bindningspolynomen

$$Q = 1 + (K_X^I + K_X^{II})[X] + K_X^I K_X^{I,II}[X]^2 + K_Y[Y] + K_Y K_{XY}[X][Y]$$

och

$$Q = 1 + (K_X^I + K_X^{II})[X] + K_X^{II} K_X^{II,I}[X]^2 + K_Y[Y] + K_Y K_{XY}[X][Y]$$

vilket visar att det är omöjligt att bestämma K_X^I och K_X^{II} separat om man har ett experiment som endast mäter antal bundna ligander (det är summan av dem som uppträder som koefficient för $[X]$). För att separera dem behöver man ett experiment som specifikt kan mäta förekomsten av ligand i varje säte. Vi har även visat att $K_X^I K_X^{I,II} = K_X^{II} K_X^{II,I}$.