



LUND UNIVERSITY

Calcium-ion (Ca²⁺) Enhanced Electroporation

Compilation of the results of the experiment performed Oct.-Nov. 1996

Persson, Bertil R

Published in:
Acta Scientiarum Lundensia

2020

Document Version:
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):
Persson, B. R. (2020). Calcium-ion (Ca²⁺) Enhanced Electroporation: Compilation of the results of the experiment performed Oct.-Nov. 1996 . *Acta Scientiarum Lundensia*, 2020(003), 1.

Total number of authors:
1

Creative Commons License:
Unspecified

General rights

Unless other specific re-use rights are stated the following general rights apply:
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Read more about Creative commons licenses: <https://creativecommons.org/licenses/>

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

LUND UNIVERSITY

PO Box 117
221 00 Lund
+46 46-222 00 00



Volym ASL 2020-003

Citation: (Acta Scientiarum Lundensia):

Persson, B. R. R. (2020). Calcium-ion (Ca^{2+}) Enhanced Electroporation. Compilation of the results of the experiment performed Oct.-Nov. 1996

Acta Scientiarum Lundensia, Vol. 2020-003, pp. 1-6, ISSN 1651-5013

Corresponding author:

Bertil R.R. Persson,
Lund University, Dept. of medical radiation physics,
Barnngatan 4, Skånes Universitetssjukhus
22185 Lund Sweden
E-mail: bertil_r.persson@med.lu.se

Lund 2020

Calcium-ion (Ca²⁺) Enhanced Electroporation

Compilation of the results of the experiment performed Oct.-Nov. 1996

Bertil R.R. Persson, PhD Professor
Medical Radiation Physics, Lund University, SE 22185 LUND

Abstract

The result experiments performed during October-November 1996 with electroporation of mustard seeds in the different pretreating medium. The germination of the seeds deteriorates with increased concentration of Calcium ions of the pre-treatment medium. The higher the level of CaCl₂, the higher the sensitivity to electroporation.

Main Hypothesis

Biological cells are sensitive to pulsed electric fields (electroporation). The electric field affects the cell membrane in which a created electrical potential which, when it exceeds a critical value, causes irreparable damage to the cell membrane. In many species, this damage occurs when the transmembrane potential exceeds approximately 1 V.

During October- November 1996, a series of experiments investigated the possibility of using mustard seeds as an experimental model to study the effect of electroporation on cell survival. The results showed that 50% of survival occurred at 1500 V/cm when pretreating the seeds in distilled water. However, when pretreating the seeds in 50 mM CaCl₂ solution, 50 % of survival occurred at 750 V/cm. Thus, the effect of Ca²⁺ ions appears to decrease the threshold voltage for electroporation to occur (Persson 1997).

Experiments carried out

Pulse Number

Hypothesis: With an increased number of high voltage pulses per cell, the possibility of destroying the cell membrane increases.

Experiment: White mustard seeds were plunged into tap water until seed swelling occurred. The swollen seeds placed in cuvettes filled with tap-water and exposed to different numbers of exponentially decaying electrical pulses with varying amplitude of the field applied. After treating the seeds with electrical pulses, the seeds placed on moist filter paper in Petri-dishes and stored in a climate chamber to grow.

Result: Figure 1 shows that the cell damage increases with increased pulse count up to 15 pulses. Upon further increasing the number of pulses, no change in the degree of cell damage occurs.

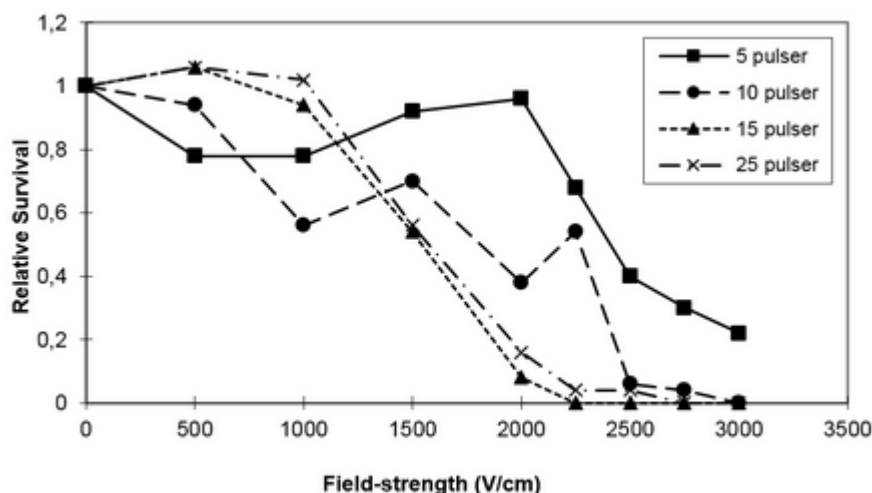


Figure 1.

Relative survival of mustard seeds after electroporation with different field strengths and pulse counts.

The shape and length of the pulse

Hypothesis: The shape and length of the pulse are essential for how the cell membranes respond to pulsating high voltage fields.

Experiment: White mustard seeds were pre-treated in tap water until seed swelling occurred. The swollen seeds were placed in cuvettes filled with tap water and exposed to 10 electrical pulses of different field strengths. The pulses were either of exponentially decaying characters with a pulse decay time of 0.6-2 ms or square-shaped with pulse length between 0.02-0.08 ms. Unfortunately, it was not possible to generate the same pulse time for the two pulse forms. The energy content of the pulses applies as an equivalent parameter for comparing the effect of the two pulse forms. After the treatment of the seeds with electrical pulses, the seeds were placed on moist filter paper in Petri-dishes and stored in a climate chamber to grow.

Results: Figures 2 and 3 show the results of the experiment with the shape and length of the pulse. Pulses with exponentially decaying character give the best results in terms of energy input per pulse and fraction of destroyed seeds.

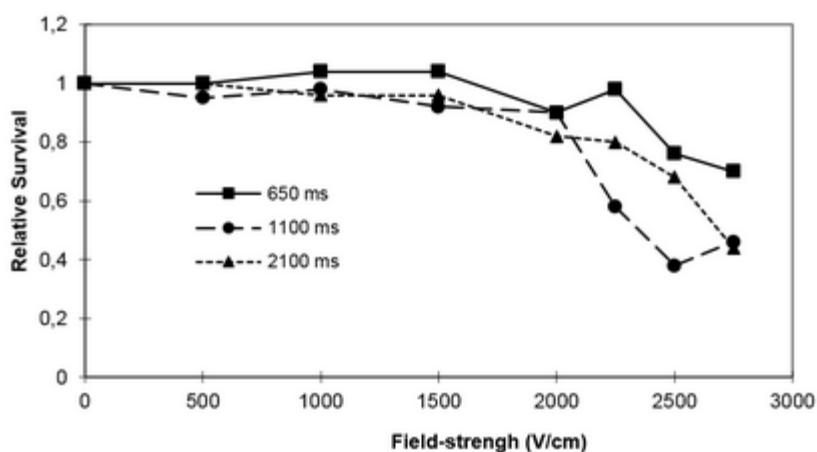


Figure 2.

Relative survival of mustard seeds after electroporation with exponential pulses with different field strengths and pulse times.

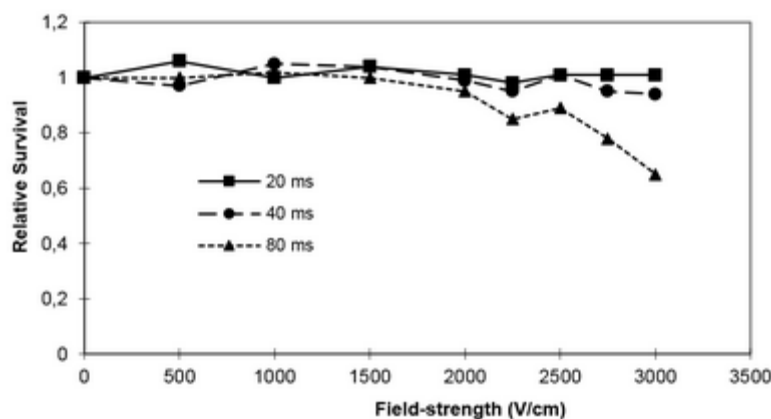


Figure 3.

Relative survival of mustard seeds after electroporation with square pulses with different field strengths and pulse times.

Pre-treatment and exposing medium

Hypothesis: With the increased concentration of ions in the seeds during electroporation, the number of cells destroyed increases. When there is a high concentration of ions adjacent to the cell membrane, there is a higher chance that toxic effects will occur in the cell if there are transmembrane pores. Then the balance of chemical substances, pH, etc. relevant to the biological cell is disturbed.

Experiment Nov. 1996: White mustard seeds were pre-treated in deionized water, tap water and two different concentrations of calcium chloride until seed swelling occurred. The pre-treated seeds placed in cuvettes with water or CaCl₂ solution and exposed to 20 pulses of varying field strengths. The pulses had an exponentially decaying character with a pulse time of 1 ms. The treated seeds were placed on moist filter paper in Petri dishes and stored in a climate chamber to grow.

Results: Figure 4 shows the result of the experiment with the different pretreating medium. The germination of the seeds deteriorates with increased concentration of ions of the pre-treatment medium. The higher the level of CaCl₂, the higher the sensitivity to electroporation.

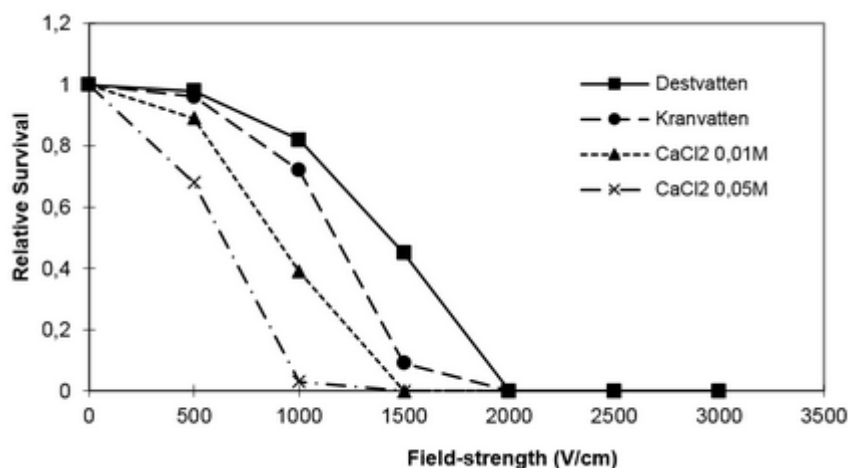


Figure 4.

Relative survival after electroporation of mustard seeds cast in different mediums.

- Distilled water
- Tap water and
- CaCl₂ 10 and 50 mM solutions

Referenses

Persson BRR (1997) Sammanställning av Högspänningsprojektet, Rapport 1997-05-22 Bertil R.R. Persson, Medicinsk radiofysik, Lunds Universitet, SE 22185 LUND (in Swedish APPENDIX)

Persson BRR (1997) Compilation of the High Voltage Project, Report 1997-05-22 Bertil R.R. Persson, Medical Radiation Physics, Lund University, SE 22185 LUND (in Swedish APPENDIX)

APPENDIX

Sammanställning av Högspänningsprojektet 1997-05-22

Bertil R.R. Persson

Medicinsk radiofysik, Lunds Universitet, SE 22185 LUND

Huvudhypotes

Biologiska celler är känsliga mot pulserande elektriska fält (elektroporation). Det elektriska fältet påverkar cellens membran, som är dielektriskt, genom att laddade molekyler i cellen attraheras mot sin motpol, varmed ett fysiskt tryck utövas mot cellmembranet. När trycket överstiger ett kritiskt värde uppstår en irreparabel skada på membranet. Hos många arter uppstår denna skada när transmembranpotentialen överstiger 1 V. I högspänningsprojektet har en serie försök genomförts med syfte att utreda möjligheten att använda elektroporation som en ogräsbekämpningsmetod. Strategin är här att förstöra celler i frön, alternativt unga ogräsplantor.

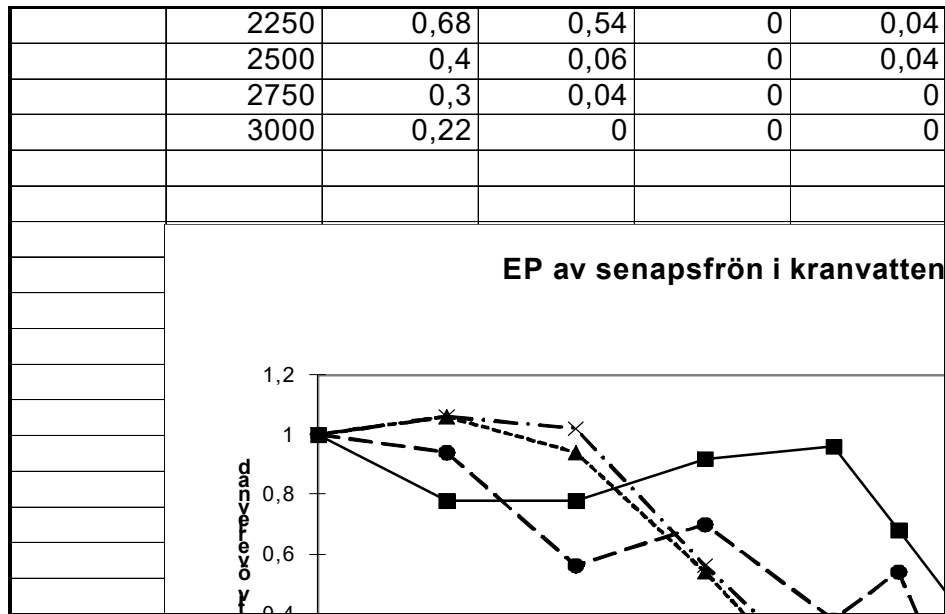
Genomförda försök

Pulsantal

Hypotes: Vid ökat antal högspänningspulser per cell ökar möjligheten att förstöra cellmembranet.

Experiment: Vitsenapsfrön stöptes i vatten, tills frösvällning inträffat. De svällda fröna placerades i kyvetter fyllda med vatten, i vilka olika antal pulser med olika fältstyrkor applicerades. Pulserna hade exponentiellt avklingande karaktär med en pulstid på 1 ms. De behandlade fröna placerades på fuktigt filterpapper i petriskålar. Petriskålarna placerades i klimatkammare

Resultat: Resultatet framgår av figur 1. Cellskadorna ökar med ökat pulsantal upp till 15 pulser. Vid ytterligare ökning av pulsantalet sker ingen förändring i antalet cellskador.



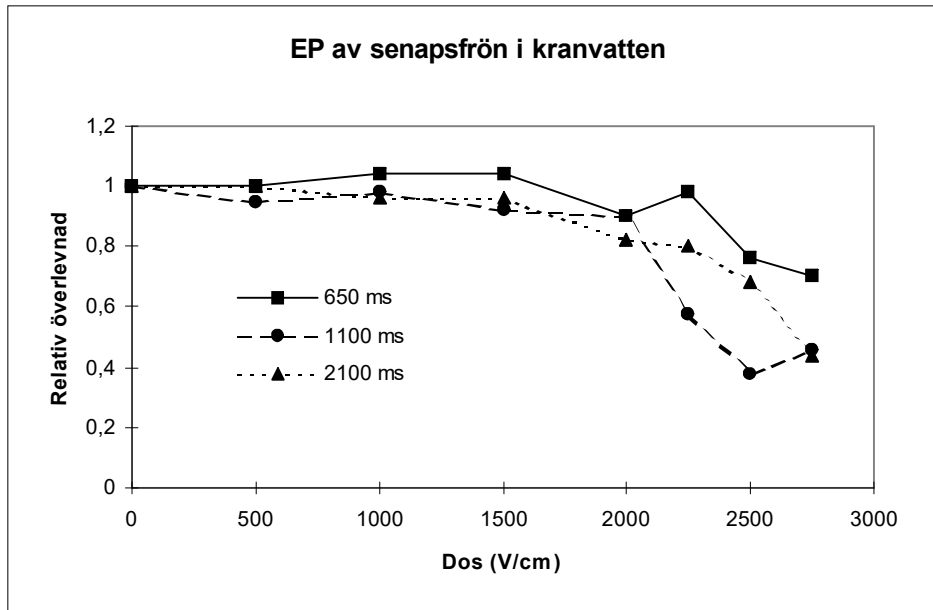
Figur 1. Relativ överlevnad hos senapsfrön efter elektroporation med olika fältstyrkor och pulsantal.

Pulsform och pulstid

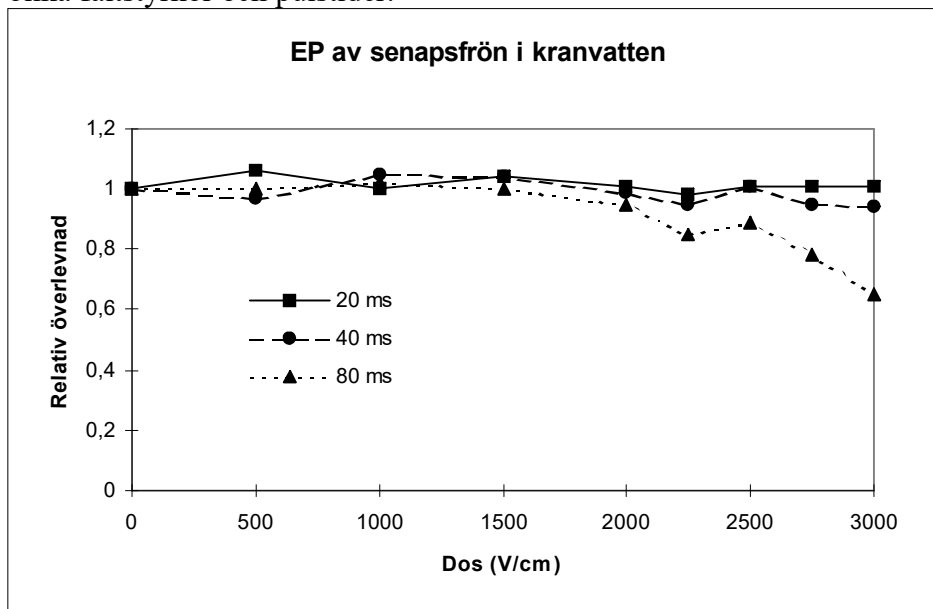
Hypotes: Form och tid på pulsen har betydelse för hur cellmembranen reagerar på pulserande högspänningsfält.

Experiment: Vitsenapsfrön stöptes i vatten, tills frösvällning inträffat. De svällda fröna placerades i kyvetter fyllda med vatten, i vilka 10 pulser med olika fältstyrkor applicerades. Pulserna hade i en serie exponentiellt avklingande karaktär med en pulstid på 0,6-2 ms och i en serie var pulserna fyrkantiga med pulstider mellan 0,02-0,08 ms. Tyvärr var det inte möjligt att generera samma pulstid till de båda pulsformerna. Istället valdes energiinnehållet i varje puls som likvärdig parameter för de båda pulsformerna. De behandlade fröna placerades på fuktigt filterpapper i petriskålar. Petriskålarna placerades i klimatkammare

Resultat: I figur 2 och 3 framgår resultatet av detta experiment. Pulser med exponentiellt avklingande karaktär ger bäst resultat med avseende på energiinsats per puls och förstörda frön.



Figur 2. Relativ överlevnad hos senapsfrön efter elektroporation med exponentialpulser med olika fältstyrkor och pulstider.



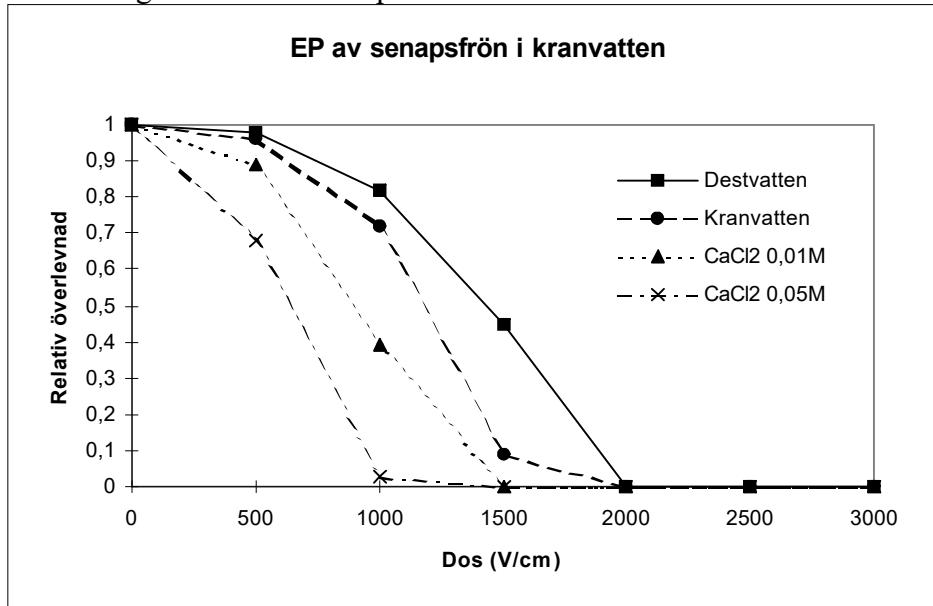
Figur 3. Relativ överlevnad hos senapsfrön efter elektroporation med fyrkantpulser med olika fältstyrkor och pulstider.

Stöpningsmedium

Hypotes: Vid ökad koncentration av joner i fröna vid elektroporation, ökar antalet förstörda celler. När det är hög koncentration av joner i anslutning till cellmembranet, är det större chans att det uppstår toxiska effekter i cellen om det finns transmembrana porer. Då rubbas den för cellen så viktiga balansen av kemiska ämnen, pH m.m.

Experiment: Vitsenapsfrön stöptes i avjoniserat vatten, kranvatten och två olika koncentrationer av kalciumklorid, tills frösvällning inträffat. De svällda fröna placerades i kyvetter fyllda med vatten, i vilka 20 pulser med olika fältstyrkor applicerades. Pulserna hade exponentiellt avklingande karaktär med en pulstid på 1 ms. De behandlade fröna placerades på fuktigt filterpapper i petriskålar. Petriskålarna placerades i klimatkammare

Resultat: Resultatet av detta experiment framgår av figur 4. Grobarheten hos fröna försämras med ökad koncentration av joner i stöpningsmediet. Ju högre koncentrationen är desto högre blir känsligheten mot elektroporation.



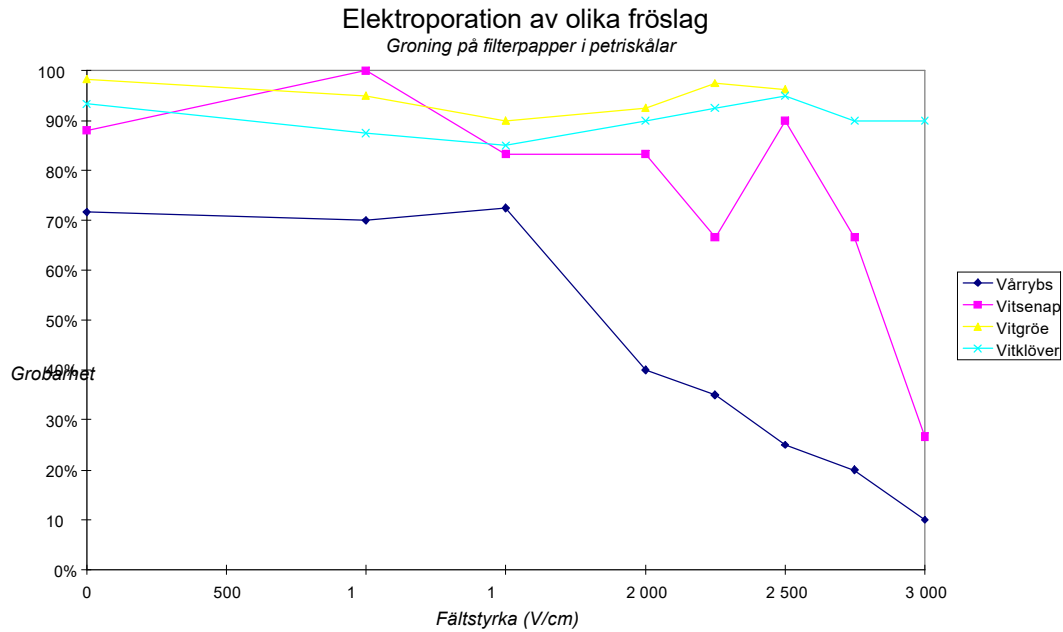
Figur 4. Relativ överlevnad efter elektroporation hos senapsfrön stöpta i olika medium.

Olika arter

Hypotes: Olika växtarter är olika känsliga mot elektroporation. Förmodligen är känsligheten korrelerad med fysiska storleken hos cellerna. Troligtvis är det storleken hos de embryonala cellerna som avgör känsligheten. Små celler är mindre känsliga än stora celler.

Experiment: Vitsenapsfrön, vârrybsfrön, vitklöverfrön och vitgröefrön stöptes i vatten, tills frösvällning inträffat. De svullda fröna placerades i kyvetter fyllda med vatten, i vilka 20 pulser med olika fältstyrkor applicerades. Pulserna hade exponentiellt avklingande karaktär med en pulstid på 1 ms. De behandlade fröna placerades på fuktigt filterpapper i petriskålar. Petriskålarna placerades i klimatkammare

Resultat: I figur 5 framgår resultatet av detta experiment. Det är olika känslighet mot elektroporation hos de olika arterna. Känsligheten hos Vârrybs och vitsenap (oljevâxter) är större än hos klöver och gräs.



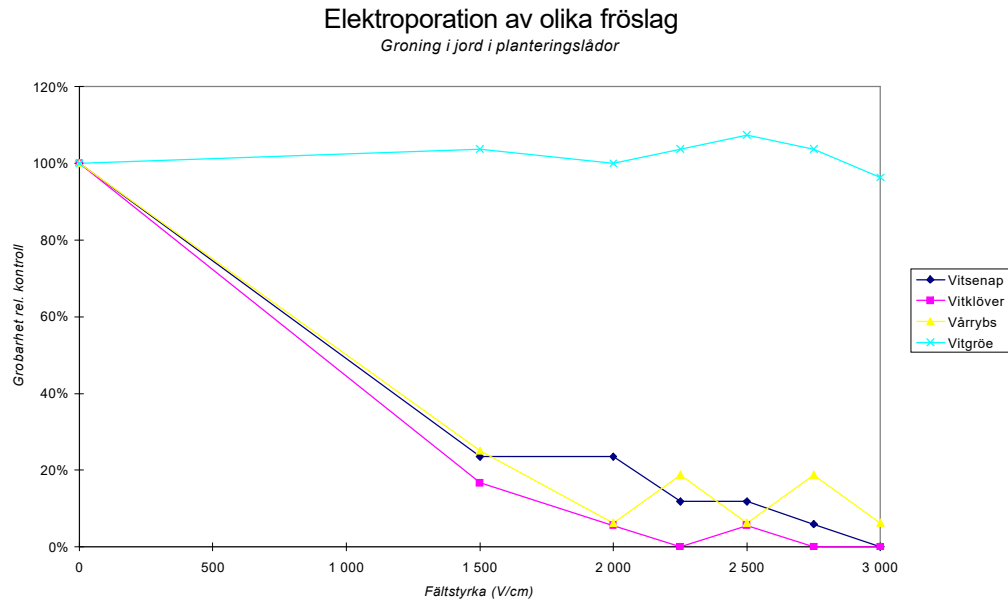
Figur 5. Relativ överlevnad hos olika arter efter elektroporation.

Olika arter - sådd i torv

Hypotes: Koncentrationen av joner högre i marken än i kranvatten. Olika växtarter är olika känsliga mot elektroporation. Därför är känsligheten mot elektroporation större hos frön som är stöpta i markvatten än i kranvatten.

Experiment: Vitsenapsfrön, vårrybsfrön, vitklöverfrön och vitgröefrön stöptes i markvatten, tills frösvällning inträffat. De svällda fröna placerades i torv i ett dygn. Fröna plockades sedan upp ur jorden och placerades i kyvetter fyllda med vatten, i vilka 20 pulser med olika fältstyrkor applicerades. Pulserna hade exponentiellt avklingande karaktär med en pulstid på 1 ms. De behandlade fröna såddes i jord i plastlådor som placerades i klimatkammare.

Resultat: I figur 6 framgår resultatet av detta experiment. Vid en jämförelse med föregående experiment känsligheten mot elektroporation större när fröna är stöpta i markvatten än när de är stöpta i kranvatten.



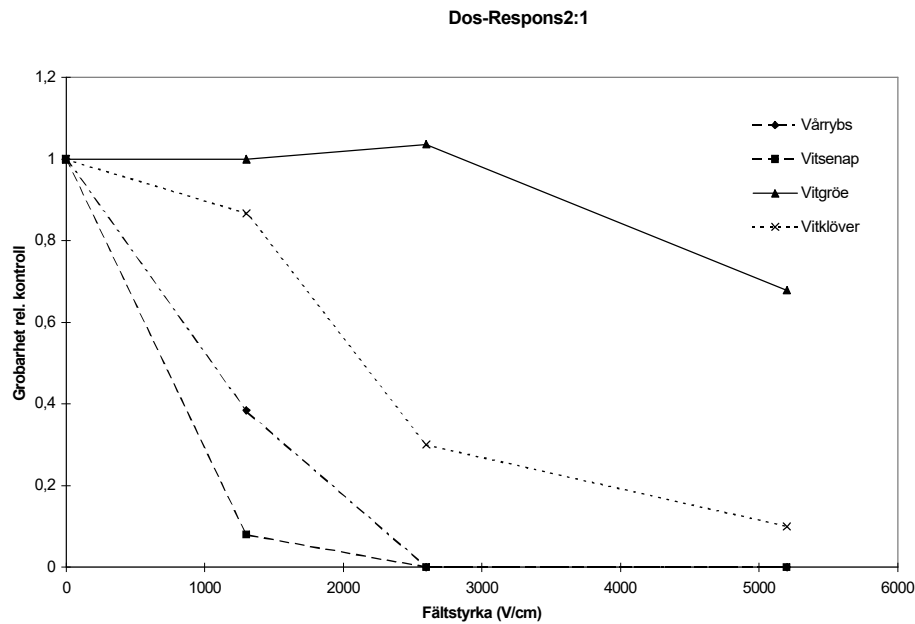
Figur 6. Relativ överlevnad hos olika arter efter elektroporation.

Dos-respons 2:1

Hypotes: De relativt okänsliga arterna påvisar känslighet vid fältstyrkor som överstiger 3 kV/cm.

Experiment: Vitsenapsfrön, vårrybsfrön, vitklöverfrön och vitgröefrön stöptes i vatten, tills frösvällning inträffat. De svällda fröna placerades mellan filterpapper i torv i ett dygn. Fröna plockades sedan upp ur jorden och placerades i kyvetter fyllda med vatten, i vilka 20 pulser med olika fältstyrkor upp till 5200 V/cm applicerades. Pulserna hade exponentiellt avklingande karaktär med en pulstid på 1 ms. De behandlade fröna såddes i jord i plastlådor som placerades i klimatkammare.

Resultat: I figur 7 framgår resultatet av detta experiment. Vid en jämförelse med föregående experiment uppträder känslighet mot elektroporation hos de relativt okänsliga arterna vid höga fältstyrkor.



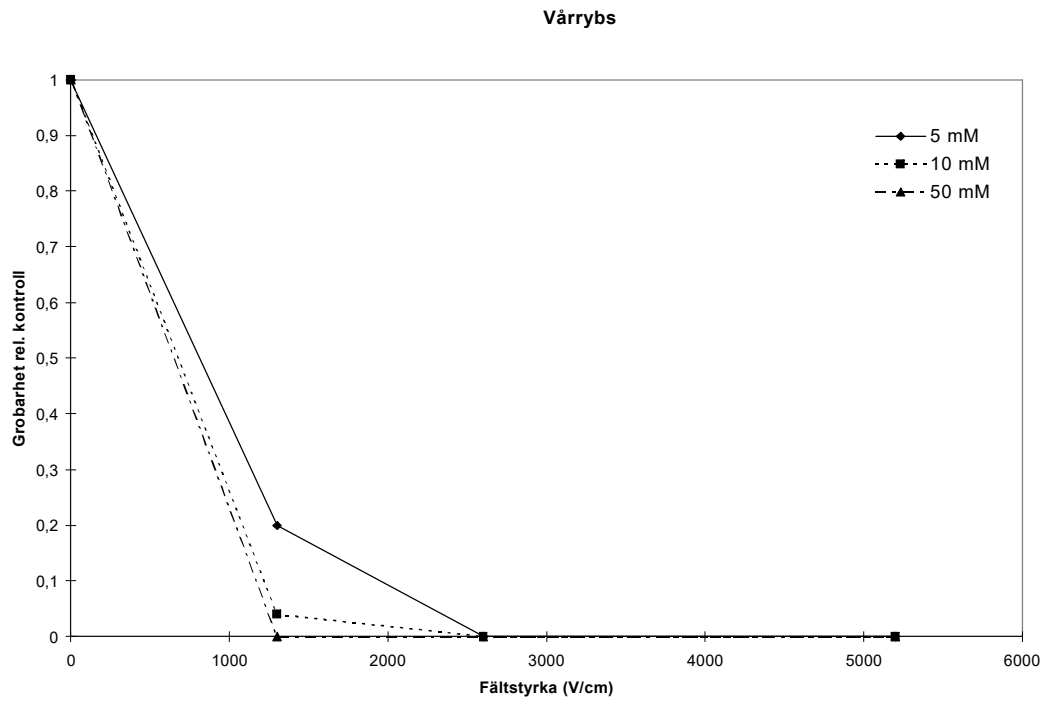
Figur 7. Relativ överlevnad hos olika arter efter elektroporation.

Dos-respons 2:2

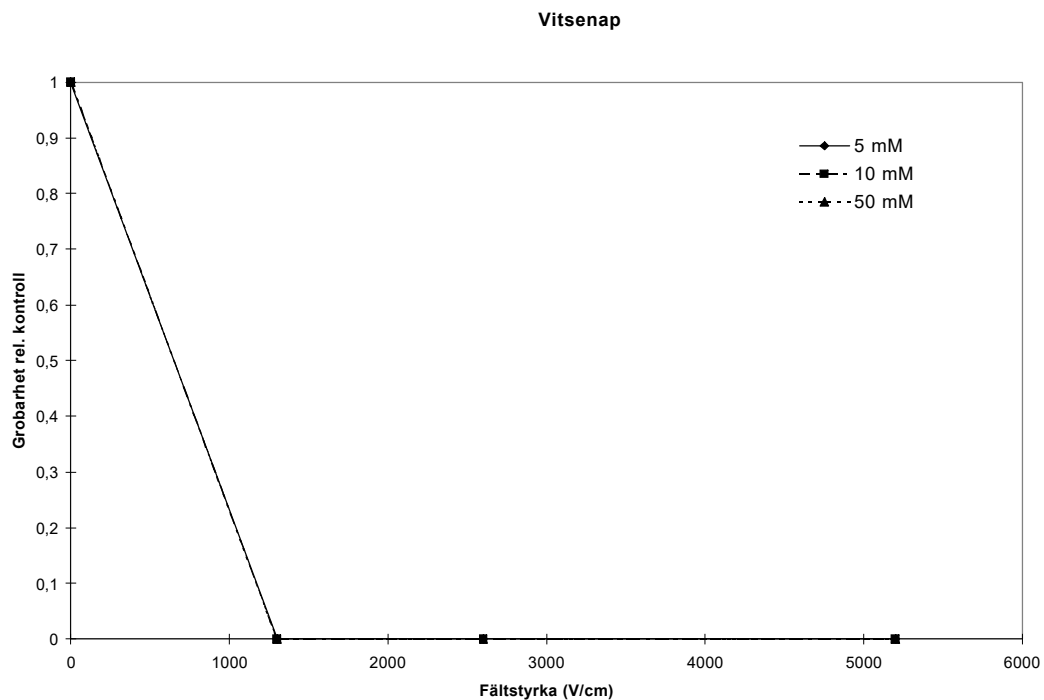
Hypotes: Känslighet mot elektroporation hos olika arter ökar när fröna är stöpta i kalciumnitrat. Kalciumnitrat är naturligt förekommande i mark.

Experiment: Vitsenapsfrön, vårrybsfrön, vitklöverfrön och vitgröefrön stöptes i olika koncentrationer av kalciumnitrat. Efter ett dygn placerades fröna i kyvetter fyllda med vatten, i vilka 20 pulser med olika fältstyrkor upp till 5200 V/cm applicerades. Pulserna hade exponentiellt avklingande karaktär med en pulstid på 1 ms. De behandlade fröna såddes i jord i plastlådor som placerades i klimatkammare.

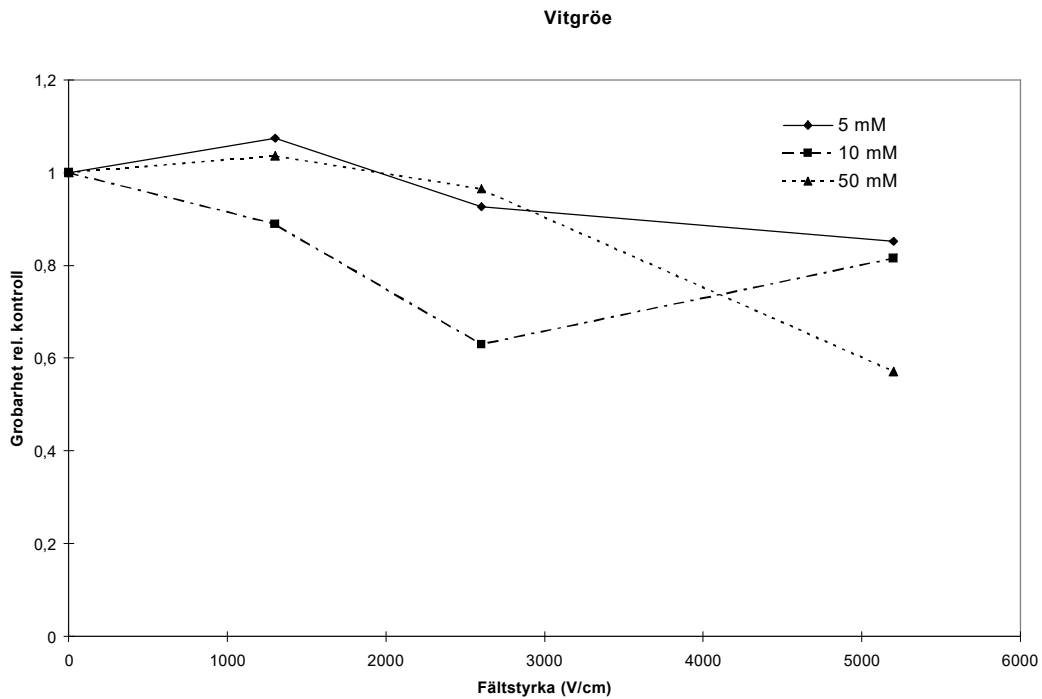
Resultat: I figur 8 framgår resultatet av detta experiment. Vid höga fältstyrkor och vid höga koncentrationer av kalciumnitrat är fröna känsligare mot elektroporation, jämfört med vid låga fältstyrkor och låga koncentrationer.



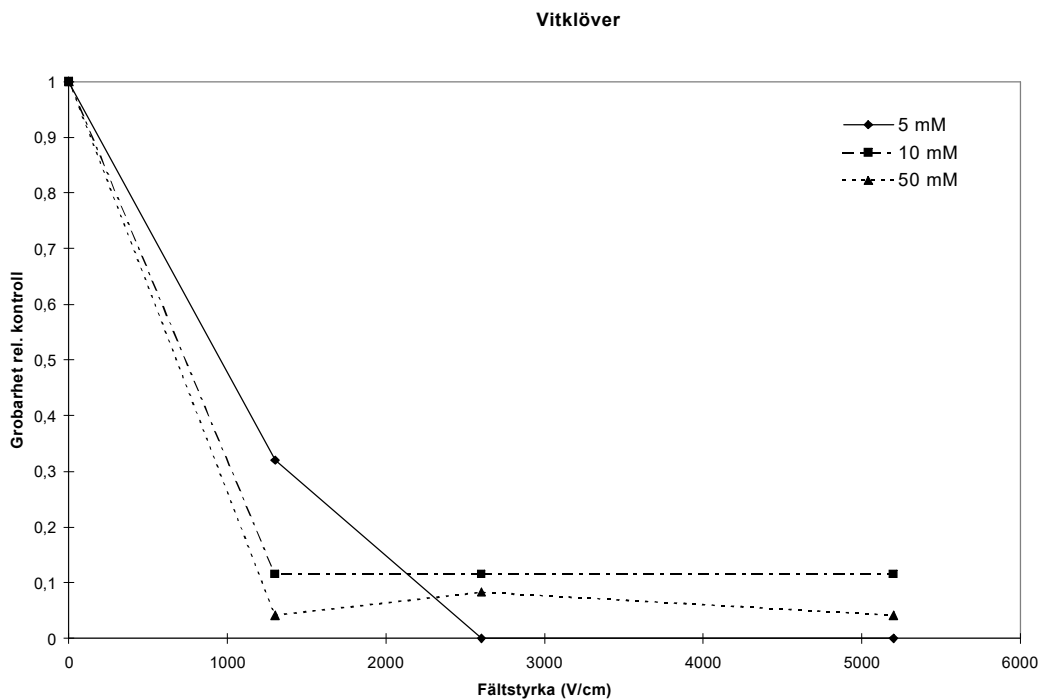
Figur 8. Relativ överlevnad hos vårrybs stöpt i olika koncentration av kalciumnitrat efter elektroperation.



Figur 9. Relativ överlevnad hos vitsenap stöpt i olika koncentration av kalciumnitrat efter elektroperation.



Figur 10. Relativ överlevnad hos vitgröe stöpt i olika koncentration av kalciumnitrat efter elektroperation.



Figur 11. Relativ överlevnad hos vitklöver stöpt i olika koncentration av kalciumnitrat efter elektroperation.

Naturlig ogräsflora

Hypotes: Vid behandling av jord med förekomst av ogräsflora minskar antalet groende frön.

Experiment: Jord med förekomst av naturlig ogräsförekomstplacerade i lådor. Jordytan behandlades med elektroporation. 20 högspänningspulser med olika fältstyrkor applicerades. Pulstiden var 1 ms. Elektroden bestod av parallella plåtar som flyttades längs ytan. Utrustningen medgav emellertid inte högre fältstyrkor än 2 kV/cm.

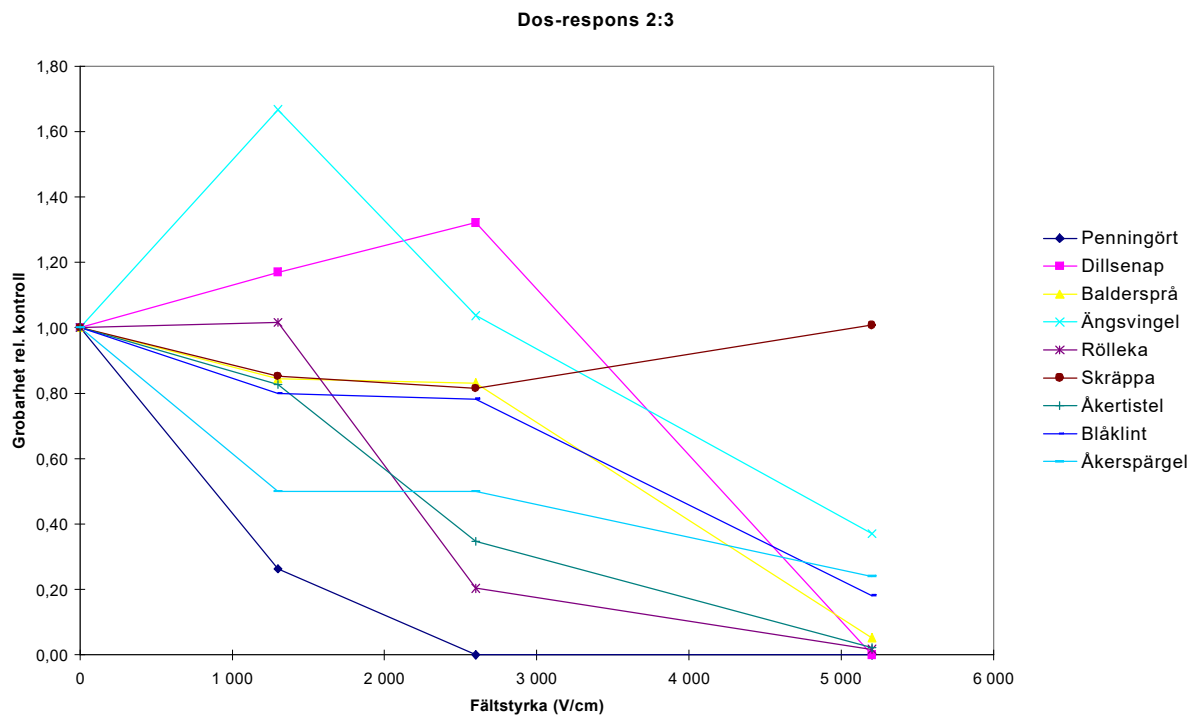
Resultat: I detta försök fanns inga säkra skillnader mellan de behandlade och de obehandlade ytorna. Fältstyrkorna var troligtvis inte tillräckliga. Utrustningen var dessutom inte riktigt anpassad till den aktuella jordarten, varför resultaten inte kan betraktas som tillförlitliga.

Dos-respons 2:3

Hypotes: Arter som normalt betraktas som ogräs är känsliga mot elektroporation, trots resultatet i föregående experiment.

Experiment: Frön från ett antal olika ogräsarter stöptes i kranvatten i ett dygn. Fröna placerades därefter i kyvetter fyllda med vatten. I varje kyvett applicerades 20 exponentialpulser, vilka genererade fältstyrkor mellan 1300 och 5200 V/cm.. Dosererna var lika inom varje kyvett. Efter behandlingen placerades fröna i torv.

Resultat: Tendensen i detta experiment är att alla behandlade arter utom Skräppa uppvisar känslighet mot elektroporation, när fältstyrkorna är uppemot 5000 V/cm. Resultatet framgår i figur 12.



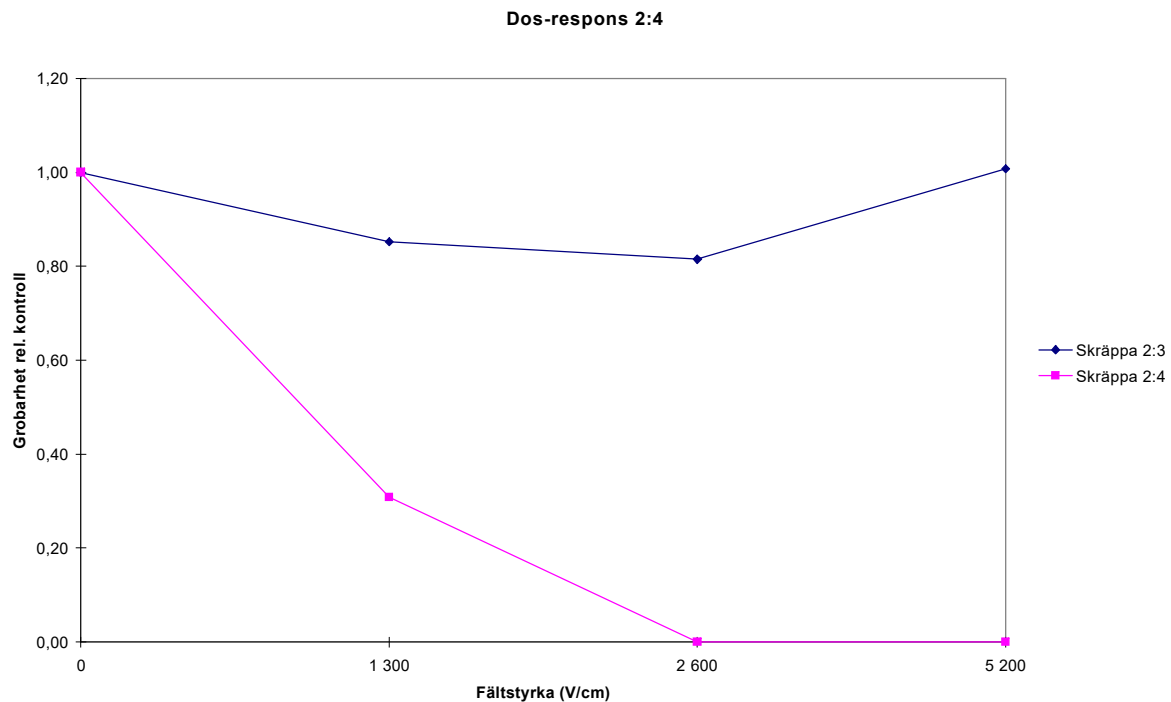
Figur 12. Relativ överlevnad hos olika arter efter elektroporation.

Dos-respons 2:4

Hypotes: Skräppa är känslig mot elektroporation när groningen pågått en längre tid än i föregående experiment.

Experiment: Frön från Skräppa stöptes i vatten. Stöpsningen pågick tills att synliga groddar fanns på fröna. Fröna med groddar placerades i kyvetter fyllda med vatten. I dessa kyvetter applicerades 20 exponentialpulser med olika fältstyrkor. Efter behandling med elektroporation planterades fröna i torv.

Resultat: I detta experiment visade sig Skräppa vara känsligare mot elektroporation än i föregående experiment. Redan vid 2 600 V/cm är samtliga behandlade frön avdödade. Resultatet finns i figur 13. Detta stärker teorin om att groningen måste ha kommit igång för att cellerna skall påverkas i tillräcklig grad för att kunna påverka dess levnadsduglighet.



Figur 13. Relativ överlevnad hos skräppa efter elektroporation, där stöpsningen pågått olika lång tid.

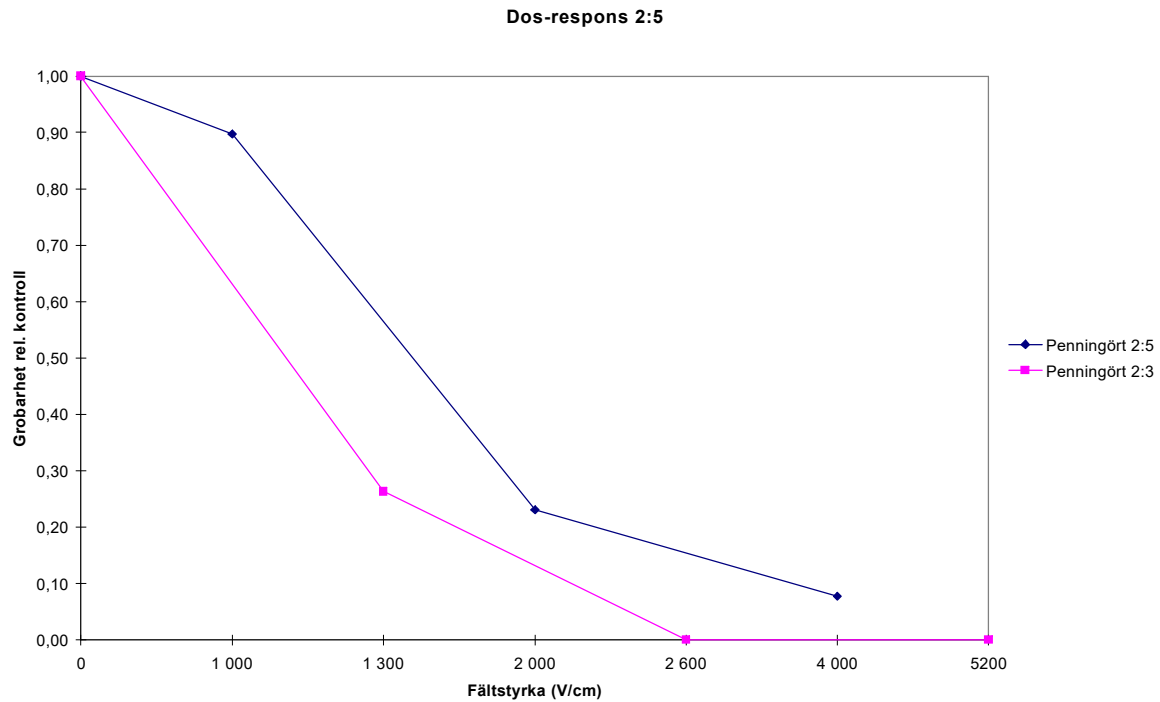
Dos-respons 2:5

Hypotes: Frön är känsliga mot elektroporation med olika appliceringsteknik.

Experiment: Frön från arten Penningört såddes i fuktig torv. Ett dygn efter sådd behandlades fröna med elektroporation. Det pulserande elektriska fältet applicerades i markytan med ett elektrodpar som pressades ner i markytan. Elektroden bestod av metallplattor i vilka sågade skåror gjorts för att minska jordmotståndet. Olika fältstyrkor prövades. Samma procedur som tidigare användes för genererande av pulserna.

Resultat: I figur 14 framgår resultatet av detta experiment. Fröna är känsliga mot elektroporation även om pulserna applicerats direkt i jorden med elektroder som sticks ner i marken. De elektriska fälten som uppstår mellan elektroden blir inte lika homogena som de

som uppstår i kyvetterna. Detta kan förklara varför det krävs högre fältstyrkor när fälten appliceras i marken.



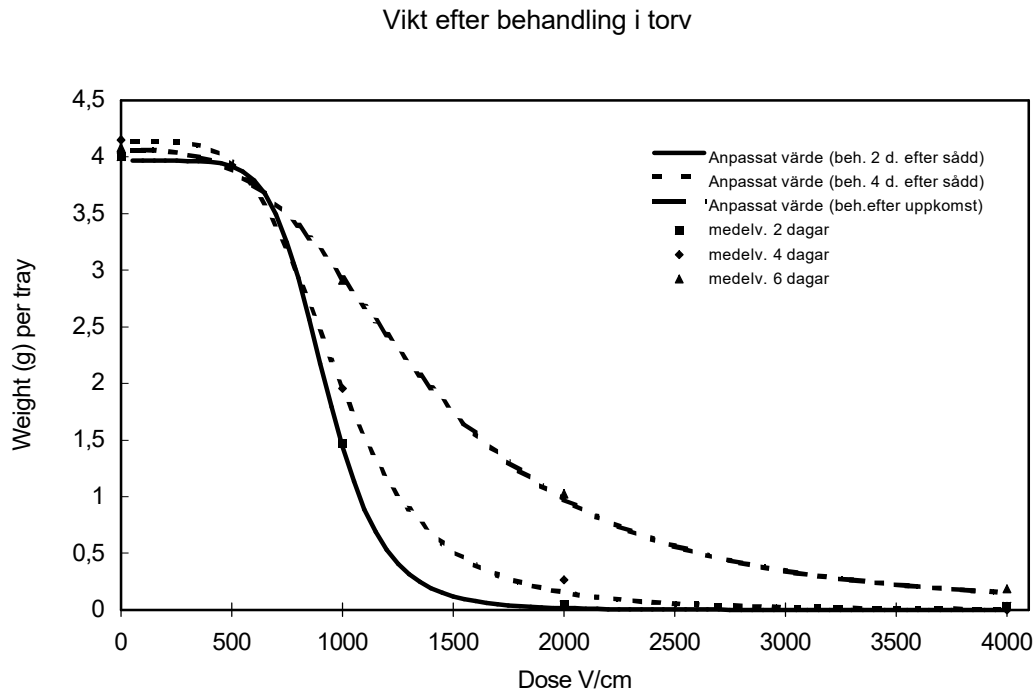
Figur 14. Relativ överlevnad hos Penningört efter elektroporation, där behandlingen skett i jord respektive i en kyvett.

Behandlingstidpunkt

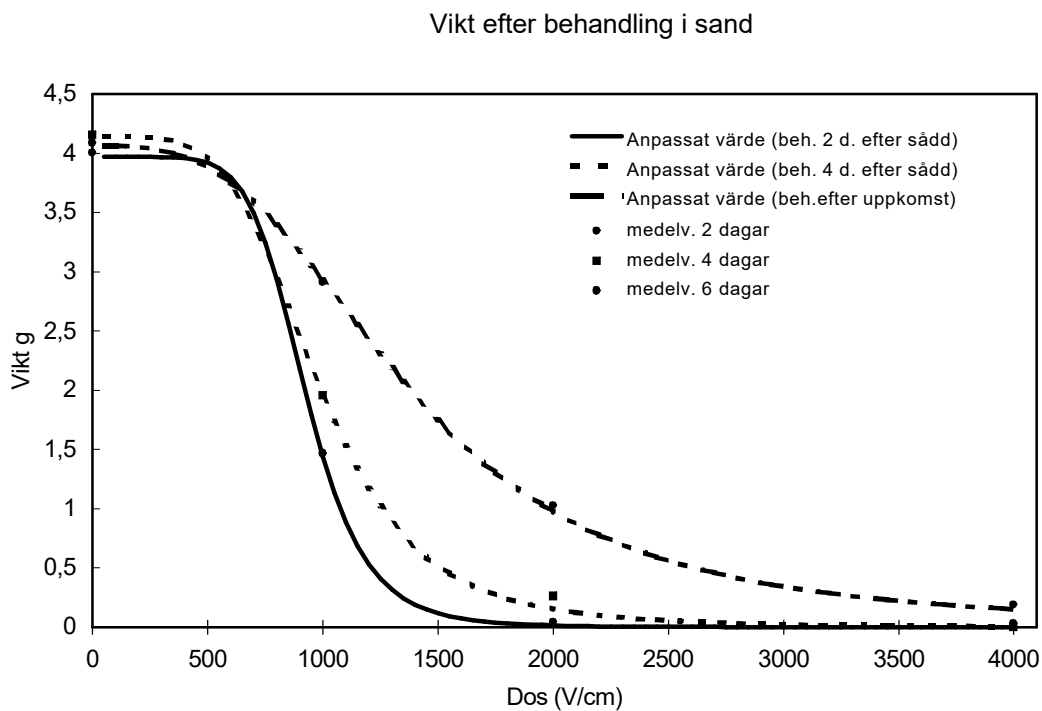
Hypotes: Känsligheten mot elektroporation är olika beroende på frönas utvecklingsstadium. Torra frön är okänsliga beroende på att det inte finns några lösta joner i dessa. Väl utvecklade plantor är också okänsliga för i dessa har stabila cellmembran och cellväggar etablerats. Mellan dessa två stadier är känsligheten varierande och troligtvis finns ett maximum någonstans.

Experiment: Vitsenapsfrön såddes i sand och i torv. Elektroporation i marken genomfördes vid sådd, 2 dagar efter sådd, 4 dagar efter sådd och vid 6 dagar efter sådd.

Resultat: Tillväxthastigheten var högre hos de frön som placerades i torv än hos de som placerades i sand. Detta medförde att groddarna hade olika utvecklingsstadium, vid samma tidpunkt, i de två olika jordarna. Vikt hos biomassa samt plantantal uppmättes. Resultaten framgår av figur 15 och 16. I diagrammet anges medelvärden samt en logistisk anpassning av dos-responsförhållandet. Det fanns ingen effekt av elektroporation när behandlingen genomfördes i samband med sådd. I torv var känsligheten som störst vid behandling två dagar efter sådd. Vid detta tillfälle fanns 0-2 mm grodd. Därefter avtog känsligheten. I sand var känsligheten störst när behandlingen skedde 4 dagar efter sådd. Även här fanns 0-2 mm grodd på fröna.



Figur 15. Vikt på överlevande plantor 25 dagar efter elektroporation på frön/groddar sådda i fuktig torv, vid olika tidsperiod mellan sådd och behandling



Figur 16. Vikt på överlevande plantor 25 dagar efter elektroporation på frön/groddar sådda i fuktig sand, vid olika tidsperiod mellan sådd och behandling

Pågående försök

Optimal behandlingstidpunkt

Hypotes: En optimal behandlingstidpunkt för bästa avdödning infaller någonstans mellan frösvällning och uppkomst.

Experiment: Vitsenapsfrön såddes i sand. Sanden elektroporerades vid frösvällning, begynnande grodd, 0-2mm grodd, 2-5mm grodd, begynnande uppkomst. I detta experiment applicerades 20 exponentialpulser med fältstyrkan 1500 V/cm.

Resultat: Pågående

Kommande försök

Elektroavståndets betydelse

Hypotes: Samma behandlingseffekt av elektroporation uppnås oberoende av elektroavståndet, så länge fältstyrkan är konstant.

Experiment: Vitsenapsfrön sås i raka rader i en rälsbana. Ett elektrodpar med ställbart inbördes avstånd monteras på en rälsgående vagn. Elektroden framdrages på båda sidor om såraden med olika elektroavstånd.

Resultat: Experimentet ännu ej påbörjat.

Fältförsök

Under säsongen -97 kommer fältförsök att genomföras. Behandling kommer att ske på fält med sådd vitsenap och på obesådda ytor. Tyngdpunkt kommer att läggas på att undersöka behandlingstidpunktens betydelse, vattenhaltens betydelse och dosering av fältstyrka.