

## Ohjaajan ohje:

# Pysäytä sairaalainfektio!

**Työn tavoite** Työssä sovelletaan geenitekniikan perusmenetelmiä lääketieteellisessä diagnostiikassa tutkien, onko kuvitteellisella potilaalla mutatoituneen bakteerikannan aiheuttama infektio. Tavoitteena on polymeerasiketjureaktion ja elektroforeesin periaatteiden ja sovelsuhmahdollisuuksien ymmärtäminen. Lisäksi työssä opetellaan aseptista työskentelyä sekä erilaisten laboratoriomenetelmien käyttöä.

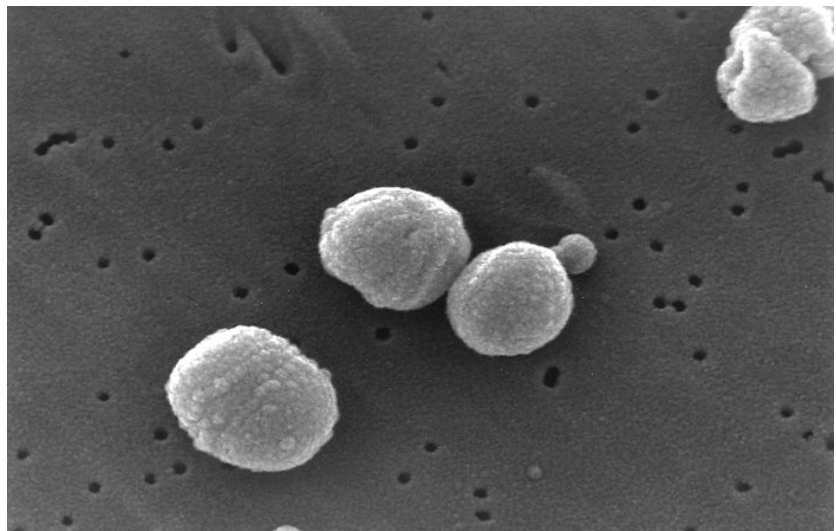
**Kohderyhmä** Lukio.

**Opetussuunnitelman sisällöt** Lukio: Biologian sovellukset (BI5).

**Työn kesto** 3 h + esivalmistelut 45 min.

### Johdanto

Viikin yliopistollisessa keskussairaalassa (VYKS) on havaittu vakavaa keuhkokuumetta aiheuttava sairaalabakteeri. Tämä sairaalabakteeri on tavallisesta, yleisinfektioita aiheuttavasta villityypin pneumokokista (*Streptococcus pneumoniae*) kehittynyt erittäin vaarallinen muoto. Uuden sairaalabakteerin on havaittu aiheuttavan ankaraa hengenahdistusta ja nopeaa yleiskunnan heikkenemistä.

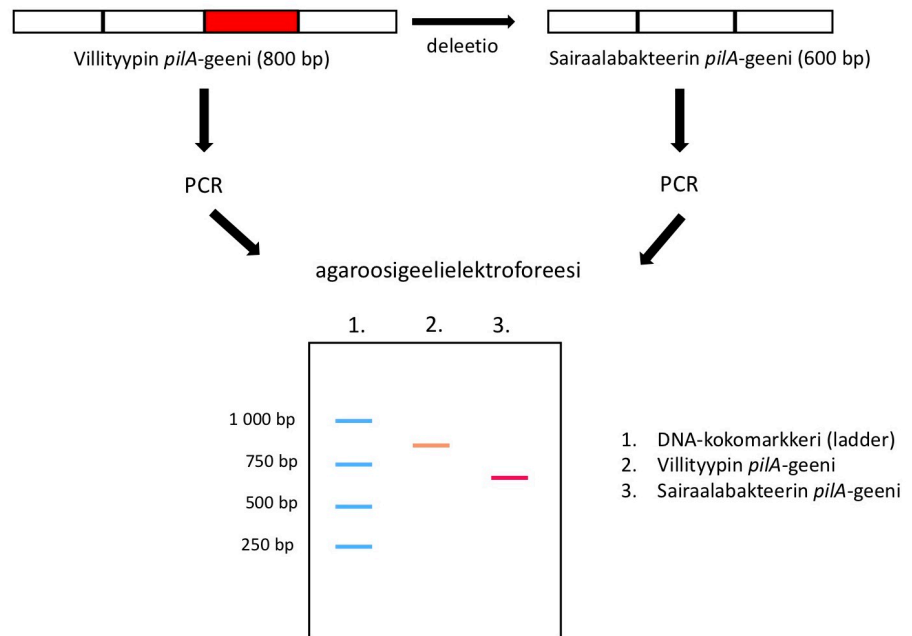


Kuva 1. *Streptococcus pneumoniae* -bakteereita elektronimikroskooppikuvassa (Janice Carr & Richard Facklam, Wikimedia Commons, CC0)

Sairaalabakteeria on onneksi onnistuttu viljelemään ja sen DNA:ta on saatu eristettyä.

Sairalamikrobiologeista ja -geneetikoista koostuva ryhmä on tutkinut sairaalabakteerin genomia ja havainnut, että sen genomissa on tapahtunut noin 200 emäsparin deleetio eli häviämä bakteerin piluksia koodaavan geenin (*pilA*) kohdalla. Uuden sairaalabakteerin pilukset eli värekarvat ovat tämän vuoksi eri muotoisia kuin villityypin pneumokokilla. Uudenlaisen pilustensa ansiosta sairaalabakteeri tarttuu hanakammin ihmisen hengitysteihin, mikä lisää sen taudinaiheuttamiskykyä. Deleetion vuoksi sairaalabakteeri pääsee tunkeutumaan kehoon, kiinnittymään hengitysteihin ja lisääntymään tehokkaasti.

Deleetion tunnistamisen ansiosta ryhmä on pystynyt kehittämään PCR-perusteisen testin sairaalabakteerin havaitsemiseen potilailla, joiden epäillään kärsivän uuden sairaalabakteerin aiheuttamasta infektiosta. Testissä potilaasta eristetyyn bakteerin DNA:ta monistetaan PCR:ssa, mikä edellyttää tietoa patogeeneilla esiintyvistä geenisekvensseistä. Testi perustuu siihen, että sairaalabakteerin *pilA*-geenissä tapahtuneen deleetion vuoksi sairaalabakteeri ja alkuperäinen villityyppi tuottavat PCR-reaktiossa erimittaisia lopputuotteita, kun niiden *pilA*-geeniä monistetaan. PCR-tuotteiden pituudet arvioidaan geielektroforeesin avulla. Mikäli elektroforeesissa havaitaan tutkitulle sairaalabakteerille tyypillisen pituinen geenipala, potilaalle voidaan diagnosoida sairaalabakteerin aiheuttama infektio.



Kuva 2. Työn periaate. Työssä monistetaan bakteeri-DNA:ta ja monistetut palat ajetaan geielektroforeesissa. Palojen koosta voidaan päätellä, onko näytteessä sairaalabakteerin vai villityypin *pilA*-geeniä, sillä tämä geeni on sairaalabakteerilla 200 emäsparia (base pairs, bp) lyhyempi deleetion vuoksi.

VYKS:iin on edellisellä viikolla saapunut neljä potilasta, jotka nyt kärsivät vakavista keuhkokuumeen oireista. Heillä epäillään uuden sairaalabakteerin aiheuttamaa infektiota. Jokaiselta on otettu nieluviiljely ja kasvatettujen bakteerien DNA:ta on eristetty. Pelkän viljelyn perusteella ei eroteta, onko kyseessä uusi sairaalabakteeri vai alkuperäinen villityyppi, sillä kyseessä on sama bakteerilaji, jossa on vain tapahtunut n. 200 emäsparin deleetio *pilA*-geenissä.

**Tehtävänäsi on selvittää, onko jollakin potilaista sairaalabakteerin aiheuttama infektio**, jotta sairaalainfektiosta kärsiville potilaille voidaan antaa suonensisäistä laajakirjoista antibioottia ja jotta nämä potilaat voidaan pikaisesti eristää ja siten estää sairaalabakteerin leviäminen.

*Huom! Opiskelijoille kerrotaan, että työssä käytetään yhtä alukeparia eli yhtä FWD-aluketta ja yhtä REV-aluketta. Tutkimustulosten erot perustuvat tällöin siihen, että kuvitteellisen "sairaalabakteerin" yhdessä geenissä on tapahtunut noin 200 emäsparin deleetio, jolloin sairaalabakteerista peräisin oleva PCR-tuote on lyhyempi kuin villityypistä peräisin oleva PCR-tuote.*

*Todellisuudessa työssä käytettävä "potilaasta eristetty bakteeri-DNA" on kaikissa näytteissä täysin sama näyte (pQ10-plasmidi). Työssä saadaan kuitenkin kahta eripituista PCR-tuotetta, sillä työssä käytetään kahta erilaista reverse-aluketta (mikroputkiin merkitty REV ja*

*rev*). Opiskelija ottaa näytteeseensä reverse-alukkeen sattumanvaraisesti jommasta kummasta putkesta. Käytettäessä REV636-aluketta (REV) saadaan noin 600 nukleotidin pituinen lopputuote ("sairaalabakteerin" geeni) ja käytettäessä REV837-aluketta (*rev*) saadaan noin 800 nukleotidin pituinen lopputuote ("villityypin" geeni). Työn todellinen mekanismi voidaan paljastaa opiskelijoille työn jälkeen.

## Taustatietoa

**Sairaalainfektioiksi** kutsutaan infektioita, jonka potilas on saanut sairaalahoidon tai muun hoidon aikana, ja näiden tautien aiheuttajia kutsutaan kansanomaisesti "sairaalabakteereiksi". Sairaalainfektion voi aiheuttaa tavallinen, ihmiselle luontainen bakteeri, mutta sairaalaympäristössä tämä viaton bakteeri voi aiheuttaa infektion etenkin silloin, kun potilaan vastustuskyky on heikentynyt. Riski saada sairaalainfektio on suurin vakavasti sairailta sekä leikkaushoitoa tarvitsevilla potilailla. Sairaalainfektion saa keskimäärin 5 % osastohoidon potilaista. Suomessa sairaalakeuhkokuume on yleisin vakava sairaalainfektio, ja sen saa keskimäärin 1 % sairaalaan tulevista potilaista. Antibioottiresistenssi ei ole sairaalabakteerille välttämätön ominaisuus. Joillekin sairaalainfektioita aiheuttaville bakteereille on kehittynyt antibioottiresistenssejä, mikä tekee niistä hankalampia hoitaa. Tällainen on esimerkiksi metisilliinille resistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA), joka on yksi sairaalakeuhkokuumetta aiheuttavista mikrobeista.

**PCR eli polymeraasiketjureaktio** on menetelmä, jonka avulla haluttua DNA-palaa voidaan monistaa eksponentiaalisesti. PCR-reaktiossa tarvitaan monistettavan DNA:n lisäksi alukkeita, DNA-polymeraasientsyymiä ja nukleotidejä. DNA-polymeraasi on entsyymi, joka pystyy syntetisoimaan uutta DNA-juostetta vapaista nukleotideista käyttäen mallinaan jo olemassa olevaa DNA-juostetta. Alukkeet ovat lyhyitä, n. 15-25 nukleotidin mittaisia yksijuosteisia synteettisiä oligonukleotideja. PCR-reaktiossa tarvitaan kaksi eri aluketta. Toinen alukkeista on sekvenssiltään komplementaarinen monistettavan DNA-alueen alkupään kanssa ja toinen vastaavasti monistettavan DNA-alueen loppupään kanssa. Molempien alukkeiden 3' -päässä on vapaa OH-ryhmä, johon DNA-polymeraasi pystyy kiinnittämään uusia nukleotideja.

PCR-reaktiossa käytettävät polymeraasientsyymit ovat peräisin kuumista lähteistä eristetyistä bakteereista ja siksi nämä entsyymit sietävät luonnostaan korkeita lämpötiloja. Korkean lämpötilan sietokyky on edellytys PCR:ssa käytettäville polymeraaseille, sillä PCR:n toiminta perustuu lämpötilan avulla kontrolloituun DNA-juosteiden erottamiseen, alukkeiden pariutumiseen ja DNA-synteesiin. PCR-reaktio koostuu kolmesta eri vaiheesta (Taulukko 1), joita toistetaan sykleinä. Syklejä toistetaan tyypillisesti noin 20-30 kertaa, jotta haluttua DNA:ta saadaan monistettua riittävästi. Jokaisen syklin aikana DNA:n määrä kaksinkertaistuu.

## Taulukko 1. PCR:n vaiheet

| Vaihe                         | Lämpötila                                | Kuvaus   |
|-------------------------------|--|--|
| 1. DNA-juosteiden denaturatio | 95 °C                                    | Korkea lämpötila saa aikaan kaksijuosteisen DNA:n denaturaation, jolloin juosteiden väliset vetysidokset katkeavat ja syntyy kaksi yksijuosteista DNA-templaattia. |
| 2. Alukkeiden pariutuminen    | 55-60 °C                                 | Alukkeet pariutuvat yksijuosteiseen templaattiin emäsjärjestyksen mukaisesti.  |
| 3. Uusien juosteiden synteesi | 72 °C (DNA-polymeraasin optimilämpötila) | Polymeraasi kiinnittyy alukkeeseen ja alkaa liittää vapaita nukleotideja alukseen 3' -päähän.  |

**Agaroosigeelielektroforeesin** avulla voidaan määrittää PCR-reaktiossa tuotettujen DNA-palojen koko. Elektroforeesissa luodaan sähkökenttä elektroforeesikammioon, jolloin sähköisesti varautuneet aineet alkavat kulkeutua sähkökentässä vastakkaismerkkistä varausta kohti. DNA-molekyylit ovat fosfaattiryhmiensä johdosta negatiivisesti varautuneita molekyylejä, joten ne kulkeutuvat elektroforeesissa kohti laitteen positiivista elektroodia.

DNA-molekyylin kulkeutumisenopeus riippuu sen pituudesta. Elektroforeesissa DNA-molekyylejä ajetaan agarosigeelissä, ja geelin verkkomainen rakenne hidastaa suurikokoisten molekyyliden kulkua. Tämän vuoksi lyhyet DNA-molekyylit kulkeutuvat elektroforeesin aikana nopeammin kuin pitkät DNA-molekyylit. Geelijaon jälkeen DNA-palaset erottuvat UV-valossa niihin kiinnitetyn väriaineen ansiosta.

### Pohdittavaksi ennen työtä

1. Kuinka monta DNA-palaa yhdestä DNA-palasta syntyy, jos palaa monistetaan PCR:ssa 20 syklin ajan?

*Yhdestä DNA-palasta saadaan 20 syklissä 1 048 576 kopiota ( $2^{20}$ ). On kuitenkin huomattava, että jo PCR:n ensimmäisessä syklissä näytteessä on todennäköisesti useita DNA-paloja, joten todellisuudessa 20 syklin jälkeen DNA-palojen määrä näytteessä on useita miljoonia.*

2. Mihin elektroforeesia voidaan käyttää?

*Biologisessa tutkimuksessa elektroforeesia hyödynnetään useimmiten erikokoisten DNA-molekyyliden erotteluun. Sen avulla voidaan esimerkiksi arvioida restriktioentsyymeillä katkaistujen DNA-palojen kokoa, erotella erikokoisia DNA-paloja puhdistusta varten tai analysoida PCR-tuotteita esimerkiksi osana geneettistä diagnosointia.*

3. Kumman bakteerin *pilA*-geenipala ajautuu elektroforeesissa pidemmälle, villityypin vai sairaalabakteerin? Perustele vastauksesi.

*Sairaalabakteerin *pilA*-geeni ajautuu pidemmälle, koska sairaalabakteerin *pilA*-geeni on deleetion vuoksi villityypin *pilA*-geeniä lyhyempi. Elektroforeesissa pienet DNA-palat etenevät nopeammin kuin isot.*

4. Käsittelet työssä bakteerista eristettyä DNA-näytettä, joka sisältää *pilA*-geenin. Pohdi, miten tämä näyte voitu valmistaa.

*Aluksi potilaasta on otettu nieluviiljely, ja bakteereja on kasvatettu. Keuhkokuumetta aiheuttava pneumokokki on pystytty tunnistamaan esimerkiksi entsyymiaktiivisuustestien ja gram-värijäyksen tai kaupallisen koettimen perusteella. Pneumokokista on tehty puhdasviiljelämä. Viiljelmästä on otettu bakteereita ja niistä on eristetty DNA:ta. DNA:ta on voitu pilkkoa katkaisuentesyymien avulla ja sieltä on voitu fluoresoivien alukkeiden avulla eristää haluttu geenipala.*

### Työssä tarvittavat välineet

- Pakastimessa säilytettävät reagenssit
  - o **dNTP mix** -nukleotidiseos (1 mM)
  - o **10 x buffer** -polymeraasipuskuriliuos
  - o Forward-aluke (**FWD**)
  - o Reverse-aluke (**REV**)
  - o potilaasta eristetty bakteeri-DNA (potilaat **A-E**)
  - o Dream**Taq** -polymeraasientsyymi
  - o **6xLD**-latauspuskuri
  - o DNA-kokomarkkeri (**M+DYE**)
- Steriiliä MQ-vettä
- Mikropipettejä ja kärkiä
- jäähaude
- 500 µl PCR-mikroputkia ja Eppendorf-telineitä
- Sentrifugi PCR-mikroputkille
- PCR-laite
- agarosijauhe
- tarkka vaaka agarosin punnitsemiseen
- 1 x TAE -puskuriliuosta (geelipuskuri)
- 0,25 x TAE -puskuriliuosta (elektroforeesipuskuri)
- Etidiumbromidia (vain ohjaaja käyttää)
- 100 ml mittalasi
- erlenmayer-pullo
- mikroaaltouuni
- agarosielektroforeesilaitteisto, virtalähde, geelikelkka ja -kamat
- Permanent-tusseja
- maalarinteippiä

### Esivalmisteluissa tarvittavat välineet

- 50 x TAE-puskuriliuos (kantaliuos)
- Steriiliä MQ-vettä
- 1 l lasipulloja
- 1 l ja 100 ml mittalasi
- Reagenssien tiedot:
  - o dNTP mix -nukleotidiseos (1 mM)
  - o 10 x buffer -polymeraasipuskuriliuos

- FWD-alue: 6133 forward.
- REV-alueet 636 reverse ja 837 reverse.
- ”potilaasta eristetty bakteeri-DNA” eli pQ10-plasmidi-DNA (25 ng/  $\mu$ l)
- DreamTaq -polymeraasientsyymi
- 6xLD-latauspuskuri: 6xLD Panreac ApplicemDNA-Dye NonTox
- DNA-kokomarkkeri: Thermo Fisher 1 kb DNA ladder

## Esivalmistelut

### 1. Reagenssien esivalmistelut:

- *Nukleotidit toimitetaan valmistajalta 10 mM vahvuisina ja laimennetaan 1 mM vahvuisiksi sekoittamalla 1 osa nukleotideja ja 9 osaa MQ-vettä.*
- 10 x buffer -polymeraasipuskuriliuosta käytetään sellaisenaan.
- *Alukkeet toimitetaan valmistajalta kuivina ja ne laimennetaan MQ-veteen valmistajan ohjeen mukaisesti niin, että saadaan 10 pmol/  $\mu$ l.*
- Valmista FWD-alue (FWD) pipetoimalla eppariin 6133 forward -aluketta.
- Valmista REV-alue (**REV** isoilla kirjaimilla) pipetoimalla eppariin 636 reverse -aluketta.
- Valmista rev-alue (**rev** pienillä kirjaimilla) pipetoimalla eppariin 837 reverse -aluketta.
- Valmista potilaasta eristetty bakteeri-DNA-näyte pipetoimalla viiteen eri eppariin (A, B, C, D ja E) pQ10-plasmidi DNA:ta.
- DreamTaq-polymeraasientsyymiä käytetään sellaisenaan.
- 6xLD-latauspuskuria käytetään sellaisenaan.
- Valmista DNA-kokomarkkeri (**M+DYE**) pipetoimalla eppariin 10  $\mu$ l DNA-ladderia ja 2  $\mu$ l 6xDL-latauspuskuria.

### 2. Valmista geeliä varten 1 x TAE -puskuri sekoittamalla 10 ml 50 x TAE -kantaliuosta ja 490 ml tislattua vettä.

### 3. Valmista 0,25 x TAE -elektroforeesipuskuria sekoittamalla 250 ml 1 x TAE -puskuri ja 750 ml tislattua vettä.

### 4. (Ohjelmoi PCR:aan ohjelma valmiiksi.)

### 5. Reagenssit jaetaan kahdelle pisteelle (tällä varmistetaan, että saman potilaan saaneet opiskelijat käyttävät samaa reverse-aluketta ja siten tulokset ovat yhteneviä):

- REV-alue ja potilaat A ja B yhdelle pisteelle.
- rev-alue ja potilaat C ja D toiselle pistelle.

## Työturvallisuus

- Laboratoriotilassa ei saa syödä eikä juoda.
- Käytä suojahanskoja ja -takkaa koko työn ajan.
- Mikäli geelin valmistuksessa käytetään etidiumbromidia, ohjaaja pipetoi sen geeli-seokseen. Käsittele etidiumbromidilla värjättyä geeliä sekä geelijossa käytettäviä välineitä vain suojahanskat kädessä. EthBr-geeli hävitetään vaarallisena jätteenä.
- PCR-tekniikka on hyvin herkkä menetelmä. Näytteet kontaminoituvat helposti esimerkiksi käsissä olevasta DNA:sta. Käytä suojahanskoja käsitellessäsi reagensseja ja mikroputkia estääksesi näytteiden kontaminaation.
- Käytä PCR-laitetta ja elektroforeesin virtalähdettä vain ohjaajan avustuksella.

## Työohje

*Tutustu ohjaajan opastuksella mikropipetin käyttöön ennen työn aloittamista.*

### Potilaasta eristetyn bakteeri-DNA:n monistaminen PCR:lla

1. Ota esille DNA-näytteet, alukkeet, nukleotidit, entsyymi ja puskuriliuos. Pidä näitä liuoksia jäähauteessa koko työn ajan.
2. Ohjaaja kertoo sinulle, mistä potilaasta eristetyn bakteeri-DNA-näytteen valmistat. Nimeä PCR-mikroputki potilaan nimen alkukirjaimen mukaan.
3. Pipetoi PCR-mikroputkeen aineita alla olevan taulukon mukaisesti. Huolehdi, että pipetoit mikroputkeen sinulle nimetystä potilaasta eristettyä bakteeri-DNA:ta. Pipetoi putkeen ensin vesi ja sitten muut aineet siten, että ne jäävät vesimäärän ”sisään”.

| MQ-<br>vesi | dNTP-<br>nukleotidit | 10x<br>-puskuri | FWD-<br>aluke | REV-<br>aluke | DNA-näyte<br>potilas A-D | Taq-poly-<br>meraasi | Yhteistila-<br>vuus |
|-------------|----------------------|-----------------|---------------|---------------|--------------------------|----------------------|---------------------|
| 32 $\mu$ l  | 5 $\mu$ l            | 5 $\mu$ l       | 2,5 $\mu$ l   | 2,5 $\mu$ l   | 2 $\mu$ l                | 1 $\mu$ l            | 50 $\mu$ l          |

4. Kun olet pipetoinut aineet taulukon mukaan, sekoita sisältöä napauttamalla ja sentrifugoi neste pohjalle. Muista tasapainottaa sentrifugi!
5. Ohjelmoi PCR-laitteeseen seuraava ohjelma:
  - i. 94 °C 1 min (esidenaturaatio)
  - ii. 94 °C 45 s (denaturaatio)
  - iii. 55 °C 30 s (pariutuminen)
  - iv. 72 °C 1 min (synteesi)
  - v. Go to step 2, 15 more times ( yhteensä 16 sykliä)
  - vi. 72 °C 1 min (loppuekstensio)
  - vii. 10 °C (jäähdytys)
6. Aseta mikroputket PCR-laitteeseen ja käynnistä PCR-ajo. Kirjaa ylös laitteen ajo-aika. Valmista agarosigeeli ajon aikana.

### Agarosigeelin (1 %) valmistaminen (2 kpl geelejä)

1. Punnitse 1 g agarosia erlenmayerin pohjalle.
2. Lisää joukkoon 100 ml 1 x TAE -puskuria. Sekoita kevyesti.
3. Kuumenna seosta varovasti mikroaaltouunissa välillä sekoitellen, kunnes seos on kirkasta. Seos ei saa kiehua. Anna seoksen hieman jäähtyä kuumennuksen jälkeen.
4. **Ohjaaja** lisää seokseen 3 tippaa etidiumbromidia.
5. Kaada hieman jäähtynyt neste kelkkaan. Aseta kammat paikoilleen ja anna geelin jähmettyä.

## PCR-tuotteiden analysointi agarosigeelielektroforeesin avulla

1. Kasaa elektroforeesilaitteisto ohjaajan avustuksella. Aseta geeli kelkassaan ajokammioon ja lisää elektroforeesipuskuriliuosta, kunnes geeli peittyy.
2. PRC-ajon valmistuttua ota mikroputket laitteesta ja siirrä ne työpöydälle.
3. Pipetoi uuteen mikroputkeen 10  $\mu$ l valmistettua PCR-näytettä ja 2  $\mu$ l **6x LD**-latauspuskuriliuosta. Sekoita sisältöä napauttamalla ja sentrifugoi neste pohjalle.
4. **Ohjaaja** pipetoi geelin ensimmäiseen kuoppaan 10  $\mu$ l DNA-kokomarkkeria (**M+DYE**).
5. Pipetoi 12  $\mu$ l PCR-seosta agarosigeelin kuoppaan. Pipetoi vain yhtä reaktiota yhteen kuoppaan. Kirjaa ylös, mihin kuoppaan mikäkin näyte pipetoitiin, jotta pystyt tulkitsemaan tuloksia geelijaion jälkeen.
6. Aja geeliä 200 V jännitteellä 20-30 minuutin ajan. Tarkkaile näytteiden ajautumista ajon aikana.
7. Tarkastele geeliä UV-lampun alla.

## Pohdittavaksi työn jälkeen

1. Oliko potilaasi sairastunut sairaalabakteerin aiheuttamaan infektiin? Perustele vastauksesi.

*Vertaa geelillä olevaa näytettäsi ajautuneeseen DNA-kokomarkkeriin, niin voit päätellä, kuinka monen emäsparin mittainen geenipala näytteessäsi oli. Sairaalabakteerin geenipala on n. 600 bp ja villityypin geenipala n. 800 bp.*

2. Mitä olisi tapahtunut, jos näytteitten testaja olisi unohtanut näytteet ajautumaan geelielektroforeesissa 200 V jännitteellä kahden tunnin ajaksi?

*Jos näytteet unohtuvat elektroforeesiin liian pitkäksi aikaa, DNA-palat kulkeutuvat koko geelin läpi ja päätyvät puskuriliuokseen. Jos näin pääsee tapahtumaan, geelikuvauksesta ei saada tuloksia ja näytteet on valmistettava uudestaan. Siksi näytteiden kulkeutumista on tarkkailtava geelijaion aikana.*

3. Pohdi, mikä työssä oli faktaa ja mikä fiktiota.

*Työn ympärille kehitetty tarina keuhkokuumetta aiheuttavasta sairaalabakteerista, jonka geenissä oli tapahtunut deletio, oli fiktiota – vaikkakin teoriassa tällainen olisi mahdollista. VYKS on fiktiivinen paikka. Sairalasyntyinen keuhkokuume on todellinen sairaus: sitä aiheuttaa monta eri bakteerilajia, esim. Staphylococcus aureus, mutta usein aiheuttajabakteeria ei pystytä tunnistamaan. Työssä käytettävät menetelmät ovat faktaa ja menetelmiä käytettiin tieteellisten periaatteiden mukaisesti. Infektiotautien diagnosoinnissa PCR-perusteisia testejä käytetään patogeenisten ja ei-patogeenisten kantojen erottamisessa etenkin silloin, kun taudinaiheuttajaa ei pystytä viljelemään.*