

## 52. Preparação de bactérias competentes

1. Semear uma colônia de bactéria em 5mL de meio líquido, incubar sob agitação *overnight* à 37°C,
2. Na manhã seguinte, inocular 100µL da cultura em 50mL de meio líquido e incubar novamente sob agitação à 37°C por 4 horas,
3. Transferir a cultura para tubos de ensaio de vidro (10mL cada),
4. Centrifugar à 2.500 rpm durante 15 minutos,
5. Desprezar o sobrenadante e transferir os tubos imediatamente para o gelo,
6. Adicionar 7,5mL de 50mM CaCl<sub>2</sub>,
7. Ressuspender o *pellet* com auxílio do vórtex,
8. Incubar no gelo durante 15 minutos,
9. Centrifugar à 2.500 rpm por 15 minutos,
10. Descartar o sobrenadante,
11. Ressuspender o *pellet* em 1mL de 50mM de CaCl<sub>2</sub> + 20% de glicerina estéril,
12. Misturar com auxílio de um pipetador. Não usar vórtex
13. Distribuir em alíquotas de 100-150µL em microtubos estéril e identificado (nome da bactéria, data e iniciais do nome). Validade +/- 6 meses.
14. Congelar à -80°C.