

Preparação das Bactérias Competentes Utilizando Cloreto de Cálcio

Semear as bactérias em meio LB sólido e incubar a 37°C por aproximadamente 20 horas.

Isolar uma colônia e crescer em 3 ml de meio LB por aproximadamente 24 horas.

Após esse período transferir 1ml do meio rico em bactérias em 100ml de meio LB. Incubar a cultura por aproximadamente 3 horas à 37°C sob forte agitação (300 ciclos/minutos). O crescimento da cultura deve ser monitorado espectrofotometricamente (D.O.₆₀₀ ideal 0,3).

Transferir o volume em dois tubos de 50ml, mantendo-os em gelo por 15 minutos.

Centrifugar as células a 4000rpm por 10 minutos a 4°C

Descartar o sobrenadante. Os tubos contendo o pellets deve ser invertidos por aproximadamente 1 minuto.

Ressuspender o pellet em 10 ml da solução gelada de CaCl₂ (0,1M) em banho de gelo.

Centrifugar novamente as células a 4000rpm por 10 minutos a 4°C

Descartar o sobrenadante. Os tubos contendo o pellets deve ser invertidos por aproximadamente 1 minuto.

Ressuspender o pellet em 2ml da solução de CaCl₂ (0,1M) + 15% de glicerol.

Aliquotar (200µl/tubo) e congelar rapidamente no nitrogênio líquido

Solução Mãe de CaCl₂ (0,1M)

147,02g	1 litro	1000mM
73,51g	500ml	500mM

**** Todo processo deve ser feito em banho de gelo ****