

## 小檗碱对金黄色葡萄球菌生物被膜的抑制作用

师志海<sup>1</sup>, 王亚州<sup>1</sup>, 谢楠<sup>2</sup>, 王文佳<sup>2</sup>

(1. 河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 郑州 450002; 2. 河南牧业经济学院 制药工程学院, 郑州 450046)

**摘要:**本实验以中药提取物小檗碱为研究对象,探究其对金黄色葡萄球菌生物被膜形成的抑制作用。实验采用常量肉汤稀释法测定小檗碱对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC);随后分别选取2 MIC、1 MIC、0.5 MIC浓度小檗碱,采用结晶紫染色法测定其对金黄色葡萄球菌生物被膜生长的抑制率,同时采用实时荧光定量PCR测定2 MIC、1 MIC、0.5 MIC小檗碱对金黄色葡萄球菌Nuc基因的表达情况。结果显示,小檗碱对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)为62.5  $\mu\text{g/mL}$ ,2 MIC、1 MIC、0.5 MIC浓度小檗碱对金黄色葡萄球菌生物被膜的抑制率分别为77.14%、66.91%和55.55%,荧光定量PCR测得各组金葡萄Nuc基因的Ct值大小为Ct值(0.5 MIC) > Ct值(1.0 MIC) > Ct值(2 MIC),说明随着小檗碱浓度的增大,对金黄色葡萄球菌生物被膜的抑制作用增强,呈现明显的浓度依赖性。本研究为小檗碱对金黄色葡萄球菌感染的防治提供数据支持。

**关键词:**金黄色葡萄球菌;细菌生物被膜;小檗碱;实时荧光定量PCR

**中图分类号:**S823 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-9111(2023)04-0016-06

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)(简称:金葡萄)是一种重要的人兽共患病病原,呈革兰氏染色阳性,极易引起人和动物罹患多种慢性感染性疾病<sup>[1]</sup>。近年来,金葡萄对人及畜禽的感染率逐年升高,难以治愈且容易反复感染,已成为威胁人类健康和畜牧业发展的重要病原菌之一。金葡萄在动物体内外均可形成生物被膜(Bacterial biofilm, BBF),生物被膜是复杂的、固着的微生物群落<sup>[2]</sup>,以细菌自身分泌的水化聚合物为载体,黏附在生物体或非生物体表面,从而抵御环境对细菌的清除作用。研究表明,金葡萄包裹在其生物被膜内,可以躲避抗菌药物对其的杀灭作用<sup>[3]</sup>,且同时能够逃逸宿主免疫系统与免疫细胞的吞噬作用<sup>[4]</sup>,从而进一步增强金葡萄对抗生素的耐药能力,使得临床上对金葡萄的防控更加困难。因此,找寻有效抑制金葡萄生物被膜形成的药物已成为防控金葡萄感染的又一方向。

我国应用中草药治疗细菌感染性疾病已有千年

历史,近年来,中草药提取物的抗菌作用研究已成为国内外医药领域研究热点。小檗碱又称黄连素,是从黄芩、黄连、黄柏等中药植物中提取的一种异喹啉生物碱,对多种革兰氏阳性菌和阴性菌均有一定的抑制或杀灭作用。研究发现小檗碱可通过改变MR-SA菌株细胞膜脂肪酸的种类及含量,显著破坏菌株细胞膜的完整性<sup>[5]</sup>,且有助于增强常用抗生素对引起奶牛乳房炎的多重耐药金葡萄的抗菌活性<sup>[6]</sup>。此外,小檗碱在兽医临床能够有效治疗金葡萄引起的大鼠乳房炎<sup>[7]</sup>。

金葡萄生物被膜作为金葡萄抵御逆境的一种有效生长模式,研究显示,一些中药提取物对金葡萄生物被膜都有一定抑制作用,如穿心莲内酯<sup>[8]</sup>、黄芩苷<sup>[9]</sup>和大黄水提物<sup>[10]</sup>等。小檗碱对金葡萄的抑制作用是否能够通过抑制其生物被膜的生长而起作用,是本研究的重点内容。本研究以金葡萄为研究对象,探讨小檗碱对金葡萄生物被膜的体外抑制作用,为小檗碱应用于金葡萄感染疾病的预防及临床

收稿日期:2023-01-01 修回日期:2023-03-28

基金项目:河南省农业科学院自主创新项目资助(2023ZC057)

作者简介:师志海(1982—),男,博士,副研究员,主要从事牛羊疾病研究和健康养殖。

治疗提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

小檗碱(HPLC ≥98%,CAS 号:2086-83-1)购自上海源叶生物科技有限公司。金黄色葡萄球菌(ATCC25923)为本实验室保存。胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)购自广东环凯微生物科技有限公司。结晶紫染料购自碧云天生物技术公司。Tip Green qPCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司。光吸收酶标仪(ReadMax 500F)购自上海闪谱生物科技有限公司。荧光定量 PCR 仪(ABI 7500 Fast Real-Time PCR System)购自美国 ABI 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小檗碱药液制备 准确称取小檗碱药物 2.0 mg,用无菌蒸馏水定容至 2mL,混匀,超声,使用 0.22μm 无菌针头过滤器过滤除菌,制浓度为 1.0 mg/mL 的小檗碱溶液,2~8℃保存备用。

1.2.2 结晶紫染色液的配制 准确称取结晶紫 2.0 g 溶于 20 mL 95%乙醇中制得结晶紫乙醇饱和溶液 20mL;称取 1.0g 草酸铵溶于 100 mL 无菌蒸馏水中,充分混匀后制得 1%草酸铵水溶液 100 mL;取 20 mL 结晶紫乙醇饱和溶液和 80 mL 1%草酸铵水溶液混匀,静置 24 h 后过滤,制得 100 mL 2%结晶紫染色液,2-8℃保存备用。

1.2.3 金葡萄菌悬液制备 将冷冻保存的金葡萄菌种划线接种到血琼脂平板上,37℃培养 24 h,后制作细菌抹片并进行革兰氏染色,观察细菌性质及形态结构。将形态结构鉴定正确的菌落接种到营养琼脂上,待琼脂板上长出单菌落后,挑取单菌落接种到 TSB 培养基中,37℃培养 48 h。将培养菌液进行平板计数,根据平板计数结果计算菌液浓度,后使用普通肉汤将菌液稀释成 1×10<sup>7</sup> CFU/mL。

1.2.4 最小抑菌浓度测定 采用肉汤稀释法测定小檗碱对金葡萄的最小抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration,MIC)。用无菌蒸馏水倍比稀释小檗

碱药液并分装试管,之后将活化后的金葡萄菌液加入试管,使小檗碱的终质量浓度分别为:第 1 支试管 250 μg/mL,第 2 支试管 125 μg/mL,第 3 支试管 62.5 μg/mL,第 4 支试管 31.25 μg/mL,以此类推。同时设仅含菌液的试管为阴性对照,仅含药液的试管为阳性对照,仅含肉汤的试管为空白对照,将试管放入 37℃恒温培养箱中静置培养 48 h,观察试管中是否有沉淀产生,无沉淀产生的最低药物浓度为小檗碱对金葡萄菌液的 MIC。

1.2.5 小檗碱对金葡萄生物被膜抑制率的测定 将不同浓度的小檗碱溶液与金葡萄菌液混匀至试管中,使小檗碱终浓度分别为 2 MIC、1 MIC 和 0.5 MIC,向试管中加入剪裁好的 0.5 cm×0.5 cm 无菌输液管片,实验设仅含菌液的试管为阴性对照,仅含药液的试管为阳性对照,仅含肉汤的试管为空白对照,将试管放入 37℃恒温培养箱中静置培养 48 h。采取结晶紫染色法<sup>[11]</sup>测定小檗碱对金葡萄生物被膜的抑制情况。取出输液管片,冲去浮菌,移至洁净无菌的 96 孔板中,每孔添加 220 μL 甲醇固定输液管片<sup>[12]</sup>,3min 后弃去,室温干燥。加入 200μL 2%的结晶紫染液染色 5min,弃去染色液,再用无菌蒸馏水清洗 1-2 次除去浮色,室温干燥。每孔用 200 μL 无水乙醇脱色 3 min,除去输液管片,570 nm 下测定各孔吸光度,按照下列公式计算抑制率<sup>[11]</sup>。

细菌生物被膜抑制率 = (A<sub>阴性</sub> - A<sub>实验</sub>) ÷ (A<sub>阴性</sub>) × 100%

1.2.6 小檗碱对金葡萄的抑制作用 将“1.2.5”中 2 MIC、1 MIC、0.5 MIC 实验组试管中的菌液进行菌落计数,观察各实验组中金葡萄的生长状况。

1.2.7 荧光定量测定金葡萄生物被膜 Nuc 基因的转录表达

1.2.7.1 引物设计与合成

根据 GenBank 中金葡萄 Nuc 基因的保守序列,使用 Primer Premier 5.0 设计一对特异性引物,引物序列如表 1 所示,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 引物序列

| 引物名称  | 序列(5'-3')                | 产物长度/bp |
|-------|--------------------------|---------|
| Nuc-F | GCGACCGATTATGATCGCGGTT   | 259     |
| Nuc-R | AGTAAAGCGATGACCTACTAGAGC |         |

1.2.7.2 细菌 DNA 提取

各实验分组及处理同“1.2.5”,分别取 2 MIC、1 MIC、0.5 MIC 实验组试管中的菌液 1.5 mL,4℃

12000 r/min 离心 1 min,弃去上清液,向菌泥中加入 100 μL DEPC 处理水,采取水煮法<sup>[13]</sup>提取金葡萄模板 DNA。

1.2.7.3 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 检测金葡菌 Nuc 基因的转录水平。以提取的 DNA 为模板,按照 Tip Green qPCR 试剂盒的反应体系进行扩增,即 SuperMix (2 ×)10 μL,ROX Reference Dye(50 ×)0.2 μL,上、下游引物各 0.4 μL(10 μmL),模板 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 8.0 μL。扩增条件为预变性 94 ℃ 30 s;94 ℃ 10s,60 ℃ 30 s,共 40 个循环。反应结束后得到扩增曲线、熔解曲线及 Ct 值。每个样品作 3 个重复。

2 结果

2.1 小檗碱对金葡萄的 MIC

本实验采用常量肉汤稀释法测定小檗碱对金葡萄的最小抑制浓度 MIC。阴性对照组试管中有肉眼可见沉淀且液体浑浊,阳性对照组和空白对照组试管无肉眼可见沉淀且液体清亮。可见第 3 根试管中出现沉淀(图 1),小檗碱对金葡萄的 MIC 为 62.5 μg/mL。



图 1 小檗碱对金葡萄的 MIC

2.2 小檗碱对金葡萄生物被膜抑制率

阴性对照组即仅含金葡萄组,结晶紫染色后,颜色较深,阳性和空白对照组经结晶紫染色后基本为透明色(图 2)。2 MIC、1 MIC 和 0.5 MIC 小檗碱组,染色后颜色呈逐渐加深趋势,表明小檗碱浓度越高,其对金葡萄生物被膜的生长抑制作用越强。570 nm 处测得各孔吸光度见表 2。实验组吸光度远小于金葡萄菌液组,且随着小檗碱浓度的不断增大,吸光度逐渐减小(图 3),表明小檗碱对金葡萄生物被膜的生长有明显的抑制作用;2 MIC、1 MIC 和 0.5 MIC 浓度的小檗碱对金葡萄生物被膜的抑制率分别为 77.14%、66.91% 和 55.55%,且随着小檗碱浓度不断升高,抑制率不断增大,表明小檗碱对金葡萄生物被膜的抑制作用,呈现浓度依赖性。

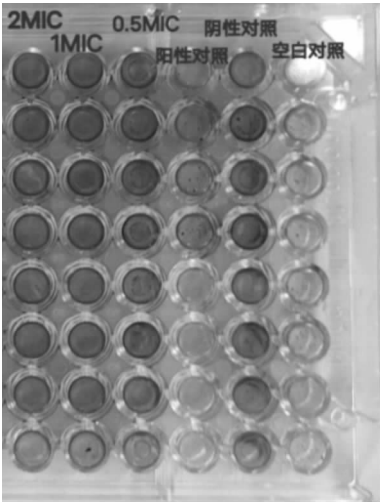


图 2 各实验组结晶紫染色情况

表 2 OD<sub>570nm</sub>吸光度值

|   | 实验组   |       |         | 药物对照  | 阴性对照  | 空白对照  |
|---|-------|-------|---------|-------|-------|-------|
|   | 2 MIC | 1 MIC | 0.5 MIC | 小檗碱药液 | 金葡萄菌液 | 营养肉汤  |
| 1 | 0.117 | 0.187 | 0.289   | 0.056 | 0.610 | 0.066 |
| 2 | 0.146 | 0.195 | 0.272   | 0.054 | 0.666 | 0.100 |
| 3 | 0.154 | 0.193 | 0.288   | 0.058 | 0.637 | 0.071 |
| 4 | 0.156 | 0.220 | 0.271   | 0.058 | 0.621 | 0.097 |
| 5 | 0.157 | 0.230 | 0.275   | 0.060 | 0.634 | 0.074 |
| 6 | 0.146 | 0.203 | 0.262   | 0.054 | 0.624 | 0.079 |
| 7 | 0.138 | 0.221 | 0.299   | 0.058 | 0.640 | 0.123 |
| 8 | 0.140 | 0.220 | 0.286   | 0.076 | 0.616 | 0.112 |

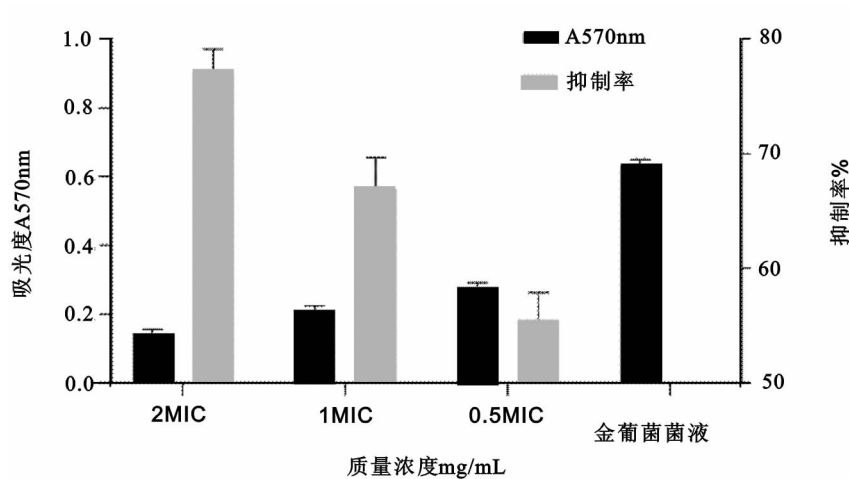


图 3 小檗碱对金葡萄菌生物被膜的抑制作用

2.3 小檗碱对金葡萄菌的抑制作用

对 2 MIC、1 MIC、0.5 MIC 实验组试管中的金葡萄菌进行涂板计数,肉眼观察可见 1 MIC 和 0.5 MIC 实验组金葡萄菌数量多不可数,2 MIC 实验组金葡萄菌

数量较前 2 组减少(图 4),表明随着小檗碱浓度的不断增大,金葡萄菌数量逐渐减小,说明小檗碱对金葡萄菌增殖的抑制作用,呈现浓度依赖性,与“2.2”结果相一致。

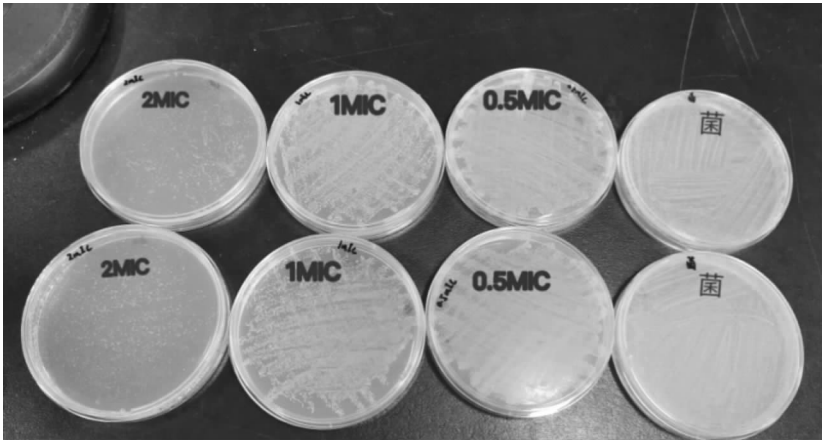


图 4 不同 MIC 浓度小檗碱对 SA 抑制作用

2.4 金葡萄菌生物被膜 Nuc 基因的转录表达

荧光定量 PCR 扩增金葡萄菌的 Nuc 基因,扩增产物在 Tm 值为 79℃ 处出现单一波峰,无引物二聚体和非特异性扩增峰(图 5)。扩增曲线呈“S”形,基线期平整,指数期明显,平台期基本平整(图 6)。各实验组 Nuc 基因的 Ct 值见图 7。

由图 6 和图 7 分析可知 Ct (2 MIC) > Ct (1 MIC) > Ct (0.5 MIC) > Ct (金葡萄菌组),即较之于金葡萄菌组模板,0.5 MIC 组所含模板量减少,1 MIC 组次之,2 MIC 组最少,说明小檗碱干预下金葡萄菌生物被膜 Nuc 基因转录水平有所降低,小檗碱浓度越高,Nuc 基因转录水平越低,表明小檗碱对金葡萄菌的生长有明显的抑制效果。

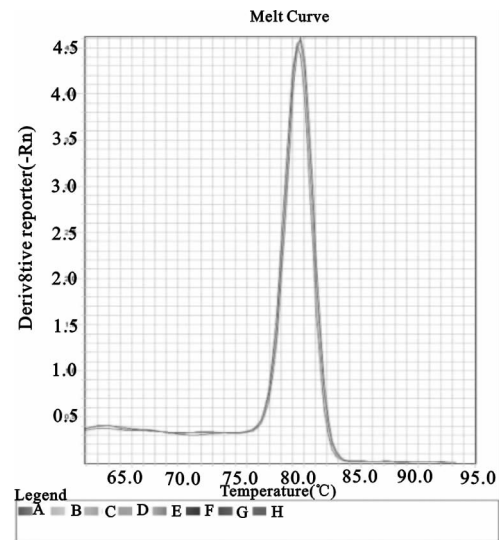


图 5 Nuc 基因熔解曲线

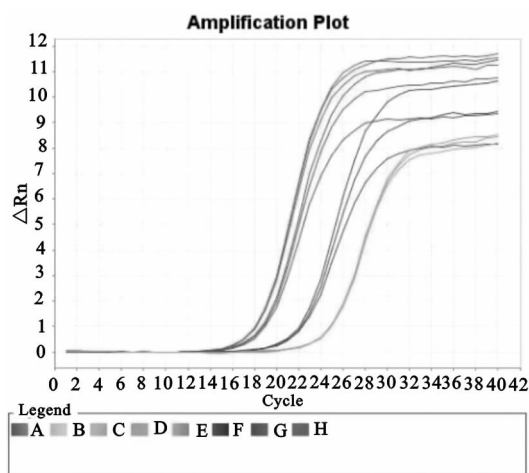


图 6 Nuc 基因扩增曲线

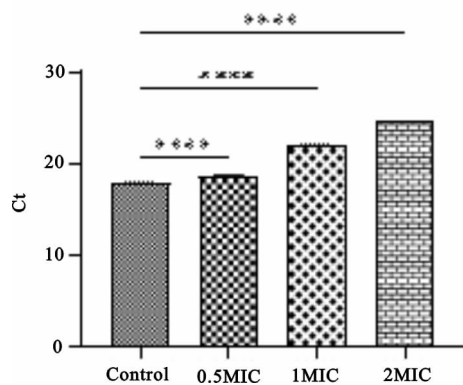


图 7 各实验组 Nuc 基因的 Ct 值

### 3 讨论

细菌生物被膜是一群复杂的、固着的微生物群落,它们能够附着在细胞表面,也可作为聚集体牢固地埋在细胞外基质中。生物被膜通过编码耐药基因、阻止抗生素进入、降低生长速度和对宿主免疫系统过程而引起抗生素耐药性,产生生物被膜的细菌分离株往往表现出比非生物膜产生株更大的多重耐药性<sup>[14]</sup>。研究显示,190 个革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌分离株中,有 68.9% 的分离株能够形成生物被膜<sup>[4]</sup>;另外,40% 的革兰氏阳性分离株是能够产生生物被膜<sup>[15]</sup>。生物被膜的形成是多种超级细菌发展的原因,如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌<sup>[16]</sup>、耐万古霉素金黄色葡萄球菌<sup>[17]</sup>、耐药克雷伯菌<sup>[18]</sup>和产生金属  $\beta$ -内酰胺酶的铜绿假单胞菌<sup>[19]</sup>。金黄色葡萄球菌感染常呈持续性和顽固性,其中金葡菌形成的生物被膜与抗生素耐药性相互依赖相互作用是导致疾病慢性发展的原因之一。临床分离株检测显示,161 株金黄色葡萄球菌中,131 株 (81.4%) 为耐甲氧西林金葡菌 (MRSA), 30 株 (18.6%) 为对甲氧西林敏感的金葡菌 (MSSA), 其中,MRSA 菌株的生物膜产量较 MSSA 菌株更多,且

生物膜厚度更厚<sup>[20]</sup>。

鉴于生物被膜在金葡菌感染疾病发展历程中的重要角色,开发能够抑制生物被膜形成或根除或分散预先已形成的生物被膜的治疗策略已成为防控金葡菌感染的又一方向。近年来,启发于中国传统中药防治金葡菌感染的应用史,使用中草药提取物抑制金葡菌生物被膜形成、增殖及发展的研究已成为医药研究领域的热点,如中药复方三黄汤<sup>[21]</sup>、何首乌水提物<sup>[22]</sup>、酸枣提取物<sup>[23]</sup>和银杏果皮提取物<sup>[24]</sup>等均能通过破坏 MRSA 生物被膜的形成,从而抑制耐药金葡菌感染。本研究发现,小檗碱对金葡菌生物被膜形成的抑制作用呈现剂量依赖性,浓度越高对生物被膜的抑制效果越好,其中 2 MIC 的小檗碱对金葡菌生物被膜的抑制率可达 77.14%;另外,实时荧光定量检测小檗碱对金葡菌 Nuc 基因的表达情况显示,不同浓度小檗碱作用金葡菌后,小檗碱浓度越高,金葡菌 Nuc 基因的表达越低。小檗碱对金葡菌生物被膜的抑制作用与其对金葡菌增殖的抑制作用相一致,说明小檗碱对金葡菌的抑制作用与抑制金葡菌生物被膜的形成直接相关。有报道指出,小檗碱体外对耐甲氧西林金葡菌有较好的抗菌作用,能够有效减少金葡菌生物被膜的形成<sup>[25]</sup>。加之小檗碱毒副作用小、价格廉价且易提取等优点,因此小檗碱可作为抗金葡菌感染,尤其是耐药金葡菌感染的新型抗菌药物,市场应用前景很大。

### 参考文献:

- [1] CHEUNG G Y C, BAE J S, OTTO M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus* [J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 547-69.
- [2] FLEMMING H C, WINGENDER J, SZEZYK U, et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life [J]. *Nature reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 563-75.
- [3] CASCIOFERRO S, CARBONE D, PARRINO B, et al. Therapeutic Strategies To Counteract Antibiotic Resistance in MRSA Biofilm-Associated Infections [J]. *ChemMedChem*, 2021, 16(1): 65-80.
- [4] POKHAREL K, DAWADI B R, SHRESTHA L B. Role of Biofilm in Bacterial Infection and Antimicrobial Resistance [J]. *Journal of the Nepal Medical Association*, 2022, 60(253): 836-40.
- [5] ZHANG X, SUN X, WU J, et al. Berberine Damages the Cell Surface of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 621.
- [6] ZHOU X, YANG C, LI Y, et al. Potential of berberine to enhance antimicrobial activity of commonly used antibiotics for dairy cow mastitis caused by multiple drug-resistant *Staphylococcus epidermidis* infection [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(3): 9683-9692.
- [7] TONG J, HOU X, CUI D, et al. A berberine hydrochloride-carboxymethyl chitosan hydrogel protects against *Staphylococcus au-*

- reus infection in a rat mastitis model [J]. Carbohydrate polymers, 2022, 278: 118910.
- [8] 祝司霞. 穿心莲内酯对金黄色葡萄球菌生物膜的体外抑制作用[J]. 广东医学, 2016, 37(11): 1598-601.
- [9] ZHANG S, HU B, XU J, et al. Baicalin suppress growth and virulence-related factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and vivo [J]. Microbial pathogenesis, 2020, 139: 103 899.
- [10] 元炼, 张姣, 刘兰妹, 等. 中药提取物对金黄色葡萄球菌生物膜作用的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(08): 1273-80.
- [11] 基国红, 张佳怡, 杨志萍, 等. 茶多酚对金黄色葡萄球菌生物膜产生的影响[J]. 食品工业, 2021, 42(02): 48-50.
- [12] 尤理想, 赵青, 周敏, 等. 细菌生物膜检测方法改进与应用[J]. 实验技术与管理, 2015, 32(03): 72-76.
- [13] 闻子钰, 梁昊, 顾一心, 等. 细菌核酸提取方法对荧光定量PCR检测差异分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(06): 621-624.
- [14] SHRESTHA L B, BHATTARAI N R, RAI K, et al. Antibiotic Resistance and *mecA* Gene Characterization of Coagulase-negative *Staphylococci* Isolated from Clinical Samples in Nepal [J]. Infection and drug resistance, 2020, 13: 3163-3169.
- [15] GUNARDI W D, KARUNIAWATI A, UMBAS R, et al. Biofilm-Producing Bacteria and Risk Factors (Gender and Duration of Catheterization) Characterized as Catheter-Associated Biofilm Formation [J]. International journal of microbiology, 2021, 2021: 8 869 275.
- [16] SHRESTHA L B, SYANGTAN G, BASNET A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Nepal [J]. Journal of the Nepal Medical Association, 2021, 59(237): 518-522.
- [17] SELIM S, FARIED O A, ALMUHAYAWI M S, et al. Incidence of Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains among Patients with Urinary Tract Infections [J]. Antibiotics (Basel, Switzerland), 2022, 11(3).
- [18] WANG G, ZHAO G, CHAO X, et al. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* [J]. International journal of environmental research and public health, 2020, 17(17).
- [19] SHRESTHA M, BARAL R, SHRESTHA L B. Metallo- $\beta$  Lactamase Producing Non-Fermentative Gram-Negative Bacilli from Various Clinical Isolates in a Tertiary Care Hospital: A Descriptive Cross-sectional Study [J]. Journal of the Nepal Medical Association, 2021, 59(241): 875-880.
- [20] MANANDHAR S, SINGH A, VARMA A, et al. Biofilm Producing Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates Augmented Prevalence of Antibiotic Resistant Cases in Tertiary Care Hospitals of Nepal [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2749.
- [21] ZHANG S, WANG P, SHI X, et al. Inhibitory properties of Chinese Herbal Formula SanHuang decoction on biofilm formation by antibiotic-resistant *Staphylococcal* strains [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 7134.
- [22] ZENG J, CHEN D, LV C, et al. Antimicrobial and anti-biofilm activity of *Polygonum chinense* L. aqueous extract against *Staphylococcus aureus* [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 21 988.
- [23] MIAO W, SHENG L, YANG T, et al. The impact of flavonoids-rich *Ziziphus jujuba* Mill. Extract on *Staphylococcus aureus* biofilm formation [J]. BMC complementary medicine and therapies, 2020, 20(1): 187.
- [24] WANG B, WEI P W, WAN S, et al. Ginkgo biloba exocarp extracts inhibit *S. aureus* and MRSA by disrupting biofilms and affecting gene expression [J]. Journal of ethnopharmacology, 2021, 271: 113 895.
- [25] GUO N, ZHAO X, LI W, et al. The synergy of berberine chloride and totarol against *Staphylococcus aureus* grown in planktonic and biofilm cultures [J]. Journal of medical microbiology, 2015, 64(8): 891-900.

## Inhibitory Effect of Berberine on the Biofilm of *Staphylococcus Aureus*

SHI Zhi-hai<sup>1</sup>, WANG Ya-Zhou<sup>1</sup>, XIE Nan<sup>2</sup>, WANG Wen-jia<sup>2</sup>

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450002;

2. College of Pharmaceutical Engineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou, Henan 450046)

**Abstract:** This experiment takes berberine, a traditional Chinese medicine extract, as the research object to explore its inhibitory effect on the formation of biofilm of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). The minimum inhibitory concentration (MIC) of berberine against *Staphylococcus aureus* was determined by broth dilution method. Subsequently, 2 MIC, 1 MIC and 0.5 MIC concentrations of berberine were selected respectively, and the inhibition rate of berberine on the growth of *Staphylococcus aureus* biofilm was determined by crystal violet staining. At the same time, the expression of *Nuc* gene of *Staphylococcus aureus* was determined by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) of berberine on *Staphylococcus aureus* was 62.5  $\mu\text{g/mL}$ . The inhibition rates of berberine at 2 MIC, 1 MIC and 0.5 MIC on *Staphylococcus aureus* biofilm were 77.14%, 66.91% and 55.55%, respectively. The Ct value (0.5 MIC) > Ct value (1.0 MIC) > Ct value (2 MIC) of each group was measured by fluorescence quantitative PCR, indicating that the inhibition effect on the biofilm of *Staphylococcus aureus* increased with the increase of berberine concentration, showing a significant concentration dependence. This study provides data support for the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* infection with berberine.

**Key words:** *staphylococcus aureus*; bacterial biofilm; berberine; quantitative real-time PCR