



靶向细菌肽聚糖的肽尾类似物标记探针研究进展

谈芝滢, 赵国屏*, 王伟*

复旦大学生命科学学院微生物学与免疫学系, 复旦微生物组中心, 上海 200438

* 联系人, E-mail: microbiome@fudan.edu.cn; w_w@fudan.edu.cn

收稿日期: 2025-08-15; 接受日期: 2026-01-29; 网络版发表日期: 2026-03-26

国家自然科学基金(批准号: 22477015)资助项目

摘要 细菌肽聚糖(peptidoglycan, PGN)是存在于绝大部分细菌中的保守结构, 也是抗生素开发的最重要靶点, 其分子结构与生物合成过程长期以来受到微生物学界的广泛关注. 肽聚糖结构中包含由D,D-转肽酶(D,D-transpeptidase, Ddt)、L,D-转肽酶(L,D-transpeptidase, Ldt)这两类酶介导的肽尾交联, 但这一反应过程的时空特征仍然难以进行直接解析, 限制了研究者对细菌细胞壁合成与修饰过程的进一步理解. 近年来, 通过模拟肽聚糖的肽尾结构所设计的短肽探针为肽聚糖交联的时空研究提供新的研究工具. 本综述梳理各类通过D,D-转肽酶及L,D-转肽酶介导的交联过程实现肽聚糖标记的肽尾类似物探针, 介绍了其设计原理、作用机制及研究应用. 该类探针结构的灵活性赋予其在肽聚糖特异性标记、抗生素开发和复杂菌群分析等多种微生物学研究场景中广泛的应用潜力.

关键词 肽聚糖转肽酶, 代谢标记, 肽尾类似物探针, 荧光成像, 肽聚糖交联

肽聚糖(peptidoglycan, PGN)是细菌细胞壁的主要成分, 在细菌胞外构成一层坚硬包膜, 能够抵御细胞质的膨胀压力, 并保护细菌免受外界不利环境的影响. 由于在真核生物中并不存在肽聚糖的生物合成, 结合此独特性与PGN在细菌生存中的不可或缺性, 使得肽聚糖成为最重要的抗生素开发靶点. 也因此, 肽聚糖的分子结构及相应的生物合成机制一直是微生物学研究中的最核心的科学问题之一^[1-4].

肽聚糖的基本结构在细菌中高度保守, 包括由重复的二糖单位连接成的聚糖链及连接于其上并互相交联的短肽链(肽尾), 从而呈现出包围细胞质膜的网状三维聚合物结构. 其二糖单元由N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine, GlcNAc)和N-乙酰胞壁酸(N-acetyl-

muramic acid, MurNAc)通过 β -(1,4)糖苷键连接组成, 多个二糖单元进一步通过 β -(1,4)连接方式首尾连接, 构成糖链. 肽尾N端与MurNAc通过酰胺键连接, 其序列一般为L-Ala-D-iGlx-(L-Lys/*m*-DAP)-D-Ala-D-Ala, 共5个氨基酸残基(Ala为丙氨酸, iGlx代表异谷氨酸或异谷氨酰胺, Lys为赖氨酸, *m*-DAP为内消旋二氨基庚二酸)^[3]. 其中三号位氨基酸残基在不同菌种间存在一定差异, 一般认为在革兰氏染色阳性菌是L-Lys, 而阴性菌是*m*-DAP. 但结合本课题组近期的研究发现, 大量肠道革兰氏阳性菌的主肽链三号位也是与阴性菌相同的*m*-DAP, 包括厚壁菌门的芽孢杆菌属、梭菌属和乳杆菌属等^[5,6].

肽聚糖的合成需要糖基转移酶催化多糖链的延

引用格式: 谈芝滢, 赵国屏, 王伟. 靶向细菌肽聚糖的肽尾类似物标记探针研究进展. 中国科学: 生命科学, 2026, 56: 912-923

Tan Z Y, Zhao G P, Wang W. Recent advances in the peptidoglycan-targeting bacterial labeling with stem peptide-mimicking probes (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2026, 56: 912-923, doi: [10.1360/SSV-2025-0269](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0269)

伸, 以及转肽酶催化邻近肽链之间的交联, 以此形成的坚固三维交联网络, 赋予细菌细胞壁一定的结构强度^[7]. 常见的肽聚糖肽链交联形式包括由D,D-转肽酶催化形成的4-3交联(图1A), 和由L,D-转肽酶(L,D-transpeptidase, Ldt)催化形成的3-3交联(图1B). 此外, 在少量细菌中也存在3-1, 2-4等其他类型的交联方式^[8]. 肽链的交联可以是直接连接两条肽尾, 也可以通过三号位上的肽桥连接. 肽桥的结构在不同细菌种类中存在很大差异, 例如, 肠球菌属的屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)肽桥是D-iAsx(D-异天冬氨酸或D-异天冬酰胺), 但粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的肽桥则是L-Ala-L-Ala^[9]. 肽链交联的程度决定细胞壁的刚性, 例如, 缺乏非必需转肽酶PBP4的金黄色葡萄球菌(金葡菌)会出现细胞壁刚性的减弱^[10].

传统上, 研究肽聚糖的构成和结构的方法常用核磁共振和质谱分析. 研究中经常结合同位素标记的肽

聚糖前体实现菌体标记^[11~13], 或者利用遗传敲除等手段确定肽聚糖相关酶的生物学功能^[14,15]. 近十年来, 根据相关酶催化反应特点开发的一系列新型分子探针为在活细菌中研究肽聚糖带来新的可能性. 其中, 受肽聚糖的交联过程启发而设计的寡肽探针提供全新的研究视角, 为进一步理解肽聚糖乃至细菌代谢、抗生素靶点等其他科学问题提供重要突破. 本综述将概括过去十年在该方向的研究进展, 涵盖各类探针的功能原理及其在探究细菌肽聚糖结构、生物合成和其他细胞功能中的应用.

1 转肽酶介导的肽聚糖交联反应

为形成坚固的细胞壁, 在细菌肽聚糖合成的最后阶段会发生聚合与交联. 其中, 由转肽酶催化邻近肽尾的交联使细胞壁具有良好的拉伸强度和抗膨胀能

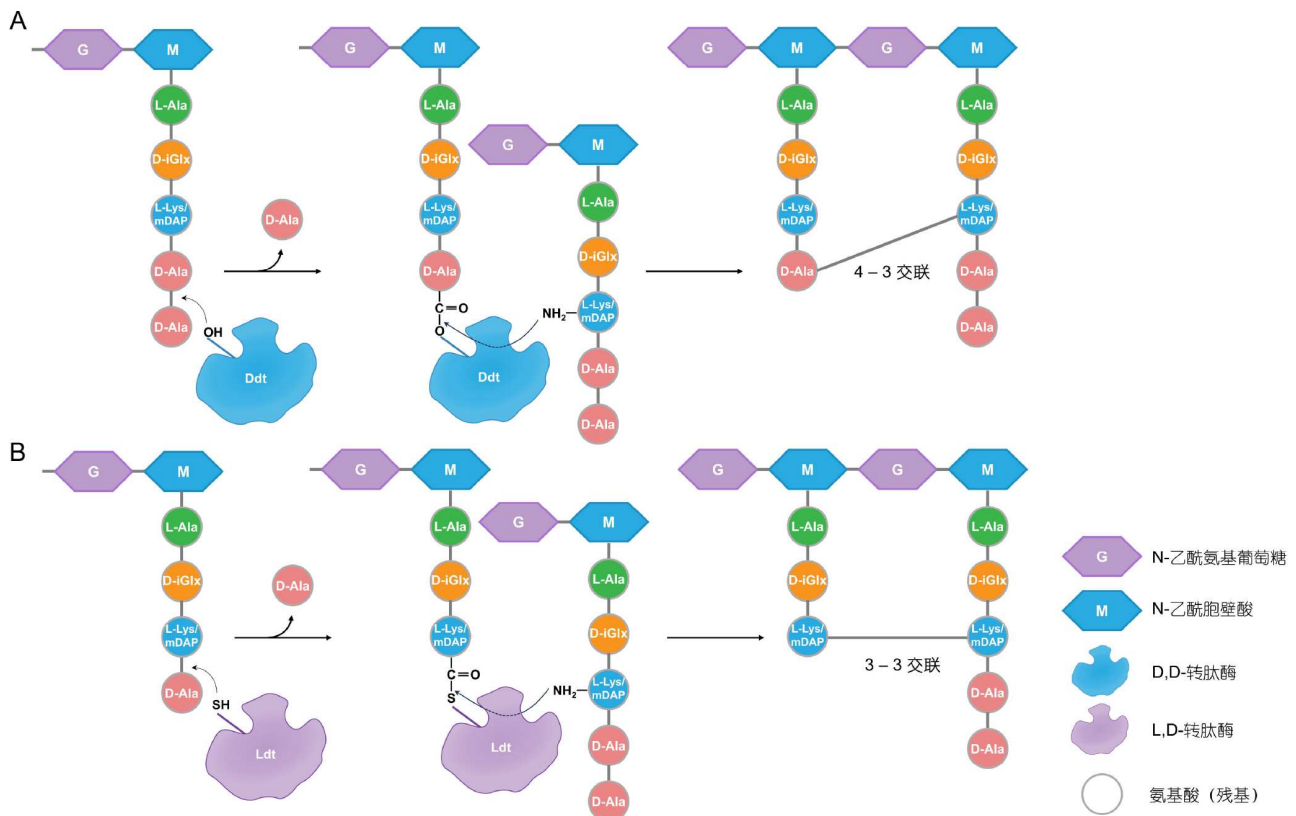


图 1 细菌肽聚糖生物合成的转肽过程示意图. A: 部分PBPs可通过其D,D-转肽酶活性催化相邻肽尾间形成4-3交联; B: L,D-转肽酶可以利用被PBPs切除D-Ala残基后的四肽肽链作为底物, 催化相邻肽尾间形成3-3交联

Figure 1 Schematic illustration of the transpeptidation process in bacterial peptidoglycan biosynthesis. A: Most PBPs can form 4-3 cross-links between adjacent stem peptide strands through Ddt; B: Ldt utilizes the tetrapeptide chain formed after the removal of the D-Ala residue by PBPs as a substrate to form 3-3 cross-links between adjacent stem peptide strands

力。作为 β -内酰胺类抗生素的作用靶点, 青霉素结合蛋白(penicillin-binding proteins, PBPs)的主要功能是参与细菌肽聚糖的合成与修饰。PBP可分为高分子量PBP和低分子量PBP。其中, 高分子量PBP参与肽聚糖链的延伸与交联, 其中一部分具备转糖基化活性, 另一部分负责肽尾交联的转肽反应。低分子量PBP多具有D,D-羧肽酶(切除肽尾末端5号位D-Ala)或D,D-内肽酶(切断已形成的肽桥交联)活性, 负责调节交联程度和成熟肽聚糖的重塑^[16,17]。具有D,D-转肽酶活性的PBP所催化的交联步骤包括两步: 切除C端5号位的D-Ala, 并将4号位D-Ala连接到邻近肽尾的3号位上(转肽反应, transpeptidation)^[18]。

肽聚糖交联的形成对细菌形态维持和生长不可或缺, 因此其合成过程是抗生素(如 β -内酰胺类、糖肽类)开发的重要靶点。 β -内酰胺类抗生素是D-Ala-D-Ala二肽的结构类似物, 以自杀底物的形式结合并抑制PBP的转肽酶活性^[19]。 β -内酰胺类抗生素的广泛使用导致多种耐药机制的出现和传播, 包括 β -内酰胺酶介导的抗生素修饰或降解^[20]、细胞通透性降低、外排泵高表达^[21]和低亲和性的肽聚糖转肽酶代偿等^[22]。PBP家族的成员在蛋白结构、结构域组成及酶活性方面展现高度多样性。其中部分对 β -内酰胺类抗生素低亲和力的PBP能在传统抗生素作用下维持细胞壁的合成功能, 成为细菌获得耐药性的关键因素之一。例如, 临床常见耐药病原菌, 耐甲氧西林金葡菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)可在普通甲氧西林敏感菌株(methicillin-sensitive *S. aureus*, MSSA)中表达的PBP1-4外, 额外表达PBP2a这一对 β 内酰胺抗生素亲和力低的转肽酶, 导致其可在其他PBP被抑制时仍完成肽聚糖交联, 因此在金葡菌耐药性中发挥非常关键的作用^[17]。

部分细菌除产生4-3的肽聚糖交联外, 还具备合成3-3交联肽聚糖的能力。对体外筛选得到的屎肠球菌氨苄西林耐药株M512进行肽聚糖分析, 发现氨苄西林存在时, PBP介导的D-Ala $\rightarrow$ D-Asx-L-Lys的交联完全被L-Lys $\rightarrow$ D-Asx-L-Lys所取代, 明确细菌可通过Ldt介导的交联机制替代传统的PBP交联路径, 从而规避 β -内酰胺类抗生素对转肽过程的抑制, 体现Ldt在细菌耐药机制中的重要作用^[9]。此后, Ldt家族的成员在革兰氏染色阳性和阴性细菌中被广泛鉴定和研究, 包括枯草芽孢杆菌^[23]、结核分枝杆菌^[24]、艰难梭菌^[25]等。作为

耐药机制的一种, Ldt与Ddt蛋白结构上的差异使Ldt对除碳青霉烯类抗生素外的绝大部分 β -内酰胺类抗生素天然抵抗。以结核分枝杆菌Ldt_{Mt2}为例, 其活性位点腔体较小, 阻碍头孢和青霉素类抗生素进入催化腔体, 从而获得其天然耐药的特性^[24,26]。

从催化原理上看, PBP催化4-3交联的过程包括两步: 首先, PBP催化中心的丝氨酸侧链上的羟基亲核攻击五肽肽尾链4号位D-Ala的羰基, 生成一个酯键并释放5号位D-Ala, 形成肽聚糖-转肽酶酰化中间体。之后, 酰化中间体的酯键被其临近肽尾上的3号位氨基酸(或连接于其上的肽桥)侧链上的氨基攻击, 形成4-3交联并释放PBP(图1A)。在这一过程中, 提供酰基的肽尾链被称为供体肽链, 而提供氨基的肽链则被称为受体肽链^[27]。PBP属于结构保守的SxxK酰基转移酶超家族(SxxK superfamily of acyltransferases), 该家族的成员携带三组特征性催化基序: SxxK, SxN与KTG(或类似物), 在三维结构中协同构成催化中心。其中, SxxK基序中的Ser-Lys构成催化活性位点的核心。与之相比, Ldt蛋白已报道的常见催化结构域是YkuD, 通常位于C端。与PBP介导的Ddt活性位点SxxK不同, Ldt的催化活性位点是半胱氨酸-组氨酸-丝氨酸三联体^[28]。其中, 半胱氨酸残基担任类似于Ddt中丝氨酸的功能, 但区别在于丝氨酸残基亲核攻击的肽链是四肽, 而非五肽^[28,29]。丝氨酸残基侧链上的巯基与三号位上L-Lys/*m*-DAP的羰基结合, 形成带有硫酯键的酶-底物中间体, 其后该中间体被临近肽尾3号位上的氨基进攻, 最终形成肽尾的3-3交联(图1B)。

尽管转肽酶的催化过程在细菌中高度保守, 但不同Ldt家族成员之间蛋白结构差异带来对应的底物识别偏好^[8]。此外, 不同细菌产生的肽聚糖肽链的氨基酸残基组成也存在差异, 主要变异出现在肽尾三号位及其连接的肽桥组成上。例如, 同样作为革兰氏阳性菌, 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的3号位为*m*-DAP, 屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)的L-Lys侧链上连接有肽桥D-iAsx, 而粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)三号为L-Lys上肽桥则是L-Ala-L-Ala^[5]。上述细菌的Ldt在催化自身的肽链结构完成交联外, 对于底物结构变化可能展现出不同的容忍度。例如, 关于供体肽链底物, 屎肠球菌的Ldt可以容忍肽桥的改变, 枯草芽孢杆菌的Ldt则对L-Lys的替换和肽桥氨基酸的增加都展现出高度的灵活性, 但粪肠球菌Ldt对于供体底物的L-Ala-L-

Ala侧链则具有高度选择性^[30]。探究Ldt与底物的互作关系是理解细菌细胞壁合成机制和未来选择性抗生素开发的重要基础。由于不同种类Ddt和Ldt转肽酶的复杂性,研究者目前对于肽聚糖交联发生的时空特征的了解仍然比较局限,而通过模拟肽尾结构而设计的寡肽代谢标记探针为研究这些复杂过程提供非常好的新工具。

2 酰基供体探针的作用原理和应用

2015年, Spiegel团队^[31]首次报道了通过模拟PBP底物开发的荧光代谢标记探针FI-KAA。参考金葡萄的肽尾结构, FI-KAA的C端包含PBP的酰基供体识别基序L-Lys-D-Ala-D-Ala(KAA), N端通过一个连接子(linker)L-Lys-Gly-Gly与荧光分子相连(图2A), 可通过模拟PBP底物进而形成4-3交联被共价整合入肽聚糖(图2B)。探针整合情况可通过流式细胞术和荧光成像等手段进行定量和成像检测。经缺失突变菌株实验证明, PBP4介导该探针的标记过程^[31]。之前有研究报道, 金葡萄的壁磷壁酸(wall teichoic acid, WTA)可将PBP4招募到正在分裂细胞的隔膜(septum)处^[32]。利用FI-KAA进行短时标记可以通过荧光信号定位直观地展示这一招募现象。WTA缺乏突变菌株, 荧光信号在侧壁和隔膜位置均匀分布, 失去隔膜特异性(图2C)。综合以上结果, 他们得出PBP4的催化活性在金葡萄分裂过程中以WTA介导的方式局限于隔膜的结论^[31]。

在后续研究中, Spiegel团队^[33]通过更改FI-KAA的荧光基团并使用序贯标记策略, 发现在非分裂的金葡萄中, PBP4在隔膜外同样发挥作用。首先, 使用A647-KAA(修饰有Alexa Fluor 647的FI-KAA探针)标记金葡萄2 h, 使肽聚糖带上A647荧光。洗去探针并等待金葡萄菌生长超过一代(1 h)后, 再使用A568-KAA短时标记7.5 min使新合成的肽聚糖带上A568荧光(图2D)。A568与A647荧光信号存在重叠, 表明PBP4在隔膜外同样发挥其转肽酶活性。FI-KAA探针展现了基于肽尾结构的短肽探针在转肽过程时空特性方面研究的价值, 推动肽聚糖生物合成机制的研究。随着FI-KAA探针的成功开发和应用, 研究者们进一步探索其他短肽探针的设计策略, 以及各类探针在肽聚糖合成转肽反应时空动态研究中的应用。

除根据Ddt设计的探针外, 有研究者同样对可反映

Ldt活性的探针进行设计开发探索。2019年, Pires研究团队^[34]通过模拟转肽酶的底物, 设计了通过Ldt或Ddt特异性标记肽聚糖的四肽(fluorescent tetrapeptide, TetraFI)和五肽(fluorescent pentapeptide, PentaFI)荧光探针。以PentaFI为例, 与Spiegel的设计不同之处在于它完整模拟肽聚糖肽尾结构(图2E), 但同样是作为酰基供体被Ddt识别并共价整合入肽聚糖中(图2F)^[34]。Ddt的活性位点羟基亲核攻击三号位L-Lys的羰基形成酰基酶中间体, 并与肽聚糖中的肽尾链发生4-3交联(图2A)。TetraFI则由Ldt识别整合入肽聚糖(图3A)。由于缺少PBP识别基序(图3B), TetraFI的荧光信号特异性地指示Ldt的催化活性。类似地, PentaFI也无法作为Ldt的识别底物, 因此可以特异性地指示PBP/Ddt的催化活性。

Pires研究团队^[34]对上述TetraFI和PentaFI系列的荧光探针在多种细菌中的标记效果进行详细的测试和对比。在正常生长状态下, 与TetraFI共孵育的屎肠球菌的荧光信号强度是PentaFI共孵育组强度的5倍(图3C), 说明屎肠球菌中Ldt介导的标记比Ddt的更为高效。此外, 该研究还利用两类探针探究抗生素处理对3-3和4-3交联形成的影响。在使用高浓度青霉素类抗生素处理时, TetraFI标记增加而PentaFI标记减少。相比之下, 使用碳青霉烯类抗生素(美罗培南和亚胺培南)处理则导致TetraFI和PentaFI标记均减少。作用靶点非转肽反应的抗生素(万古霉素和红霉素)在非致死浓度下均无法引起荧光信号强度的变化。以上抗生素处理导致的探针信号强度变化均与各个抗生素对应的靶点一致, 因此体现了TetraFI和PentaFI标记的特异性。

在应用方面, Pires研究团队^[35]后续成功地将TetraFI系列探针应用于分枝杆菌研究之中, 验证了二号位D-Gln的酰胺化在Ldt介导的3-3交联及细胞壁稳定性中的重要作用。研究中使用两条TetraFI探针, 区别在于其二号位D-iGlu是否存在 α -羧基的酰胺化修饰。结果显示未酰胺化的TetraFI-2探针孵育后, 分枝杆菌细胞壁上无荧光信号, 而酰胺化的TetraFI探针则被有效整合入细胞壁。以上结果说明D-iGln的酰胺化是分枝杆菌Ldt识别肽尾并进行肽聚糖交联的必要条件。后续研究进一步利用分子遗传学手段, 验证了MurT-GatD, 即Mur类连接酶T(Mur ligase T, MurT)和谷氨酰胺酰胺转移酶D(glutamine amidotransferase D, GatD)介导肽聚糖前体的D-iGlu酰胺化, 以及交联异常所激活的下游PknB信号通路在细胞壁合成中的调控功能。Tet-

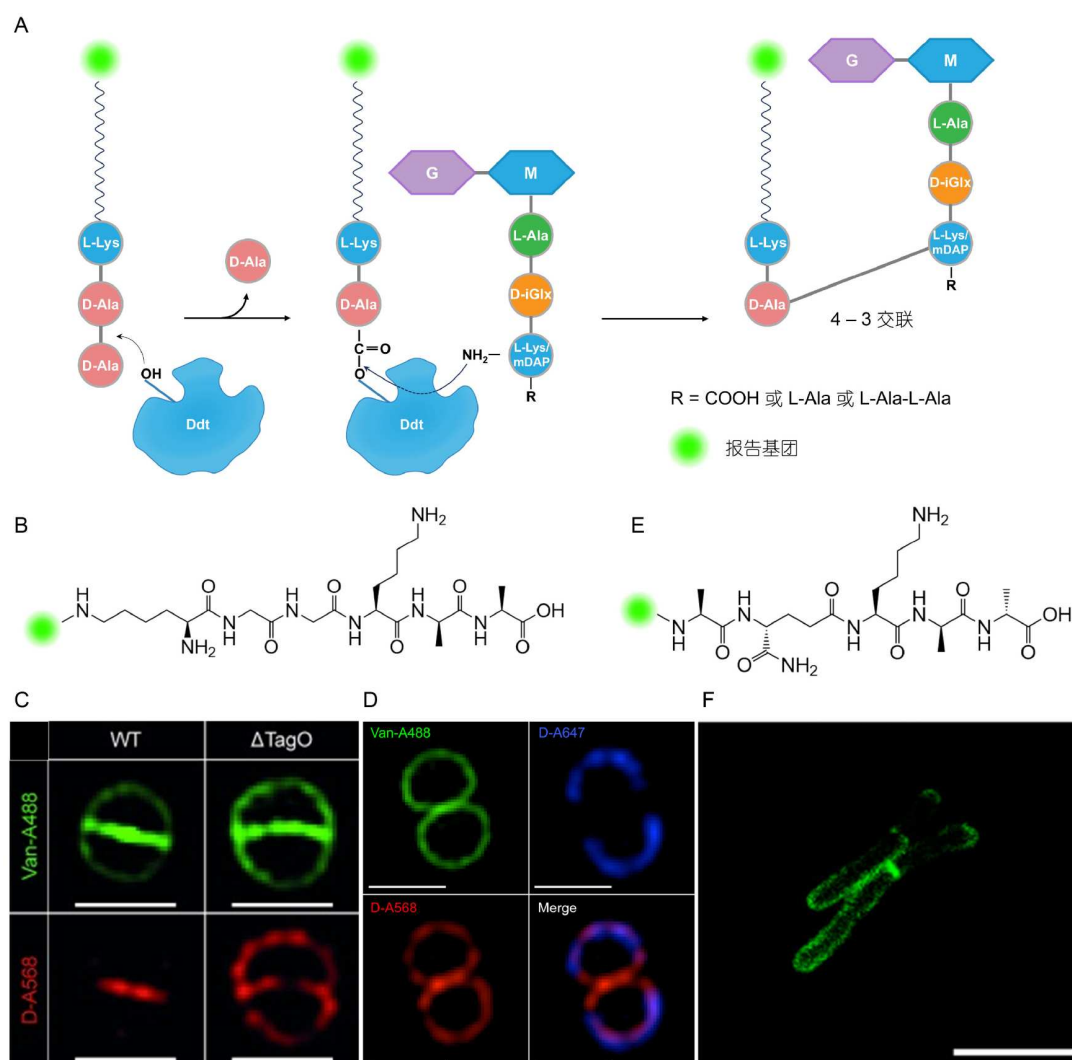


图 2 荧光探针基于Ddt催化的转肽反应标记肽聚糖。A: 基于Ddt的探针标记机制示意图; B和C: FI-KAA探针结构: 荧光基团-L-Lys-Gly-Gly-L-Lys-D-Ala-D-Ala; C: 野生型(WT)与WTA合成缺陷的(Δ TagO)金黄色葡萄球菌分别用Alexa Fluor 568标记的FI-KAA(简称D-A568, 红色)标记, 并用Alexa Fluor 488标记的万古霉素(Van-A488, 绿色)对整体细胞壁染色。比例尺: 1 μ m^[31]; D: 金葡菌经Alexa Fluor 647标记的FI-KAA(D-A647, 蓝色)标记2 h后, 洗去游离探针继续培养1 h, 再用D-A568(红色)短时标记7.5 min, 同时用Van-A488(绿色)标记整个细胞壁。比例尺: 1 μ m^[31]; E: PentaFl 探针结构: 荧光基团-L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala; F: 耻垢分枝杆菌经PentaFl短时标记30 min的共聚焦显微镜图像。比例尺: 2 μ m^[34]

Figure 2 Peptidoglycan labeling by fluorescent probes through Ddt-catalyzed transpeptidation reaction. A: Schematic illustration of the functioning mechanism of the Ddt-based probes; B and C: structure of the FI-KAA probe (fluorophore-L-Lys-Gly-Gly-L-Lys-D-Ala-D-Ala); C: *S. aureus* WT and Δ TagO mutant strains, which are defective in WTA synthesis, were labeled with Alexa Fluor 568-conjugated FI-KAA (D-A568, red) and Alexa Fluor 488-conjugated vancomycin (Van-A488, green) for cell wall staining. Scale bar: 1 μ m^[31]; D: *S. aureus* was incubated with Alexa Fluor 647-conjugated FI-KAA (D-A647, blue) for 2 h. After removing free probe through washing, the cells were further cultured for 1 h, followed by a 7.5 min labeling with D-A568 (red) and cell wall, then stained with Van-A488 (green). Scale bar: 1 μ m^[31]; E: structure of the PentaFl probe (fluorophore-L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala); F: fluorescence imaging of *Mycobacterium smegmatis* labeled with PentaFl for 30 min. Scale bar: 2 μ m^[34]

raFl探针作为肽聚糖模拟物, 可以原位地指示Ldt介导的肽聚糖交联的发生, 因此为研究肽聚糖的生物合成及调控机制提供可视化工具。

除用于细菌新合成肽聚糖的成像外, 四肽探针具

有良好的结构可变性。通过将N端的荧光基团替换为免疫识别标签, 可以实现细菌特异性靶向的免疫激活。人类免疫系统通过识别病原体相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)来辨别感染性病

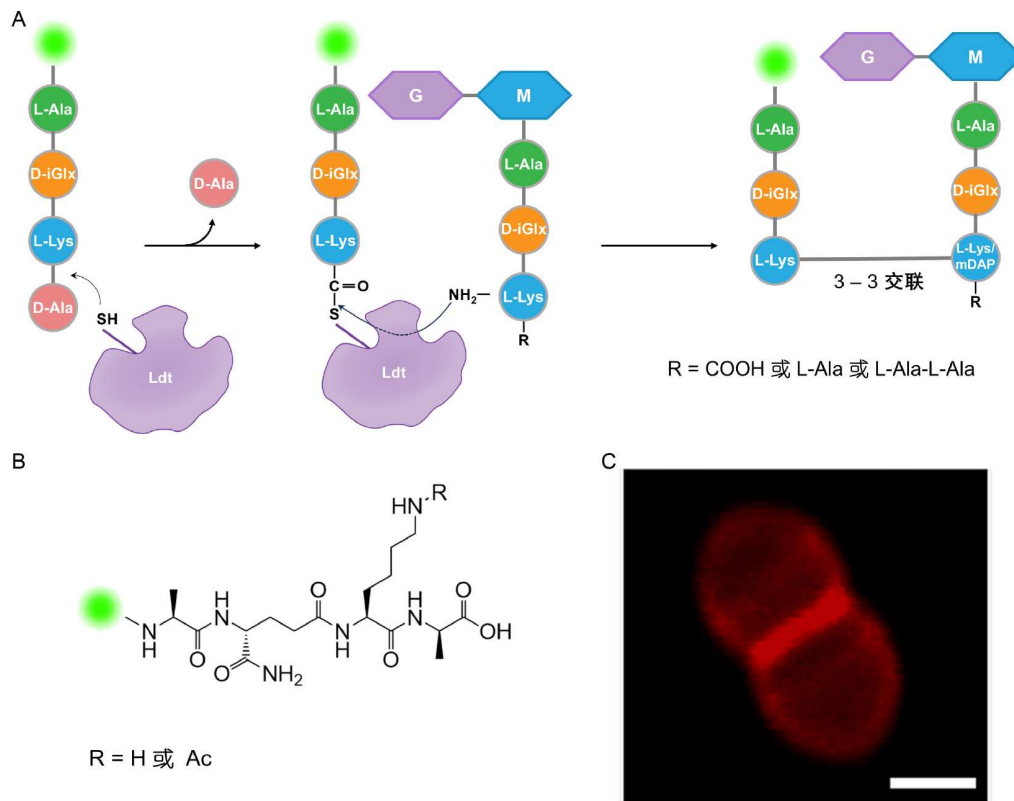


图 3 四肽探针TetraFl 通过Ldt催化的转肽反应标记肽聚糖。A: TetraFl作为酰基供体由Ldt介导的标记机制示意图; B: TetraFl和TetraFl-LysAc结构式。TetraFl结构为荧光基团-L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala(B); TetraFl-LysAc结构为荧光基团-L-Ala-D-iGln-L-Lys(Ac)-D-Ala; C: 屎肠球菌经TetraFl标记的荧光图像。比例尺: 1 μm ^[34]

Figure 3 Peptidoglycan labeling by TetraFl via Ldt-catalyzed transpeptidation reaction. A: Schematic illustration of the Ldt-mediated labeling mechanism, with TetraFl functioning as the acyl donor; B: structures of TetraFl and TetraFl-LysAc. TetraFl: fluorophore-L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala; TetraFl-LysAc: fluorophore-L-Ala-D-iGln-L-Lys(Ac)-D-Ala; C: fluorescence imaging of *Enterococcus faecium* labeled with TetraFl (red). Scale bar: 1 μm ^[34]

原体, 激活免疫反应阻止细菌感染。一些病原体通过化学修饰其PAMP的分子结构以达成免疫逃逸^[36]。有研究发现, 通过将原本四肽探针的荧光报告基团更换为小分子抗原二硝基苯酚, 可对屎肠球菌的肽聚糖进行化学重编程, 使肽聚糖携带抗原, 进而有效募集人血清内源性抗体, 增加巨噬细胞对屎肠球菌的吞噬作用^[37]。在这一策略中, 作者还探讨四肽探针主链与免疫标签之间的linker长度在掺入效率与免疫标签的空间暴露程度之间的平衡问题, 提出过短的linker长度可能降低抗体结合效率, 而过长的linker长度则可能降低探针标记效率。

得益于其结构可变性, 四肽探针不仅可用于肽聚糖成像与免疫激活, 也被进一步应用于构建评估药物分子穿透细菌外膜能力的筛选方法。分枝杆菌最外层的膜结构可阻碍小分子(包括抗生素)渗透, 被认为与

分枝杆菌耐药性相关^[38]。2023年, Pires研究团队^[39]结合点击化学反应和四肽探针, 开发了PACMAN(Peptidoglycan Accessibility Click-Mediated AssessmeNt)平台, 在分枝杆菌中利用Ldt, 将携带二苯并环辛炔(dibenzocyclooctyne, DBCO)的四肽探针整合入肽聚糖结构中。DBCO可以在无金属催化的条件下, 和叠氮基团发生应变促进的叠氮-炔烃环加成反应(strain promoted alkyne-azide cycloaddition, SPAAC)形成稳定的三唑键^[40]。在PACMAN平台中, 若带有叠氮的小分子具备良好的分枝杆菌外膜穿透能力, 则可以与肽聚糖上的DBCO发生点击反应, 导致DBCO与后续加入的带有叠氮标记的荧光基团反应减少, 从而荧光信号降低^[39]。PACMAN平台体现四肽探针在结构上可变性高的优势, 为抗分枝杆菌小分子药物的发现提供一种高通量、活细胞环境下的评估平台。

从原理上考虑, 上述探针3号位的L-Lys也可以利用其侧链氨基作为酰基受体从而被整合入肽聚糖。为了避免这一情况, Pires团队^[34]在2019年开发了仅具有酰基供体功能的四肽探针(图3B)。通过对TetraFl的L-Lys侧链进行乙酰化修饰, 即可避免四肽探针作为酰基受体整合入肽聚糖。相较于原来的TetraFl, TetraFl-Ac的荧光信号下降约57%, 但仍可以检测到明显荧光标记, 展现了单供体功能探针的可行性。

已有数项体外研究表明, Ldt催化的3-3交联与一些病原菌的 β -内酰胺类抗生素耐药性相关。然而, 关于Ldt在哺乳动物肠道菌群中的表达情况, 以及其在体内是否同样介导 β -内酰胺的耐药仍然未被阐明。考虑到肽聚糖肽尾氨基酸组成的特殊性(由D型和L型交替)有可能在肠道内较好地抵抗各类蛋白酶水解, 本课题组尝试将这类探针用在体内的肠道菌群标记之中。将四肽供体探针TetraFl-AcLys直接对小鼠进行灌胃, 来研究小鼠肠道菌群中的Ldt活性分布情况(图4A)^[41]。灌胃后, 该探针可标记约18%的肠道细菌, 提示在小鼠肠道菌群中Ldt和3-3交联十分常见。进一步结合原位荧光杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 探针, 确定多种细菌(包括部分尚未能体外培养的细菌)上3-3交联的细胞定位(图4B)。进一步地, 在体内对比两种 β -内酰胺类抗生素美罗培南和氨苄西林对肠道菌群的Ldt酶活的影响, 发现分别口服给药后, 与预期一致, 只有美罗培南显著抑制肠道菌群的Ldt标记率。这些结果提示, 口服某些 β -内酰胺类抗生素可能导致表达Ldt的细菌优势生长(例如艰难梭菌), 进而导致肠道菌群失衡。该体内标记策略可以高效解析大量菌种的肽聚糖结构, 并深化对哺乳动物肠道菌群的认识, 展现化学工具在复杂菌群研究中的价值。

在几乎所有革兰氏阴性菌及小部分革兰氏阳性菌中, 肽聚糖肽尾链的第三位氨基酸是*m*-DAP。相较于L-Lys, *m*-DAP在结构上多出的羧基对固有免疫中NOD1/2识别所介导的免疫激活具有重要意义。作为经典的PAMP识别受体, NOD1特异性识别含有*m*-DAP的肽聚糖片段, NOD2则识别普遍存在于肽聚糖的胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP)^[42]。因此, 针对*m*-DAP型肽聚糖细菌标记策略的开发, 可以推动对其肽聚糖片段和NOD1相互作用的深入研究。最近, 本课题组合成3号位为*m*-DAP的四肽酰基供体探针TetraFl-DAP, 使用体内标记策略研究小鼠肠道菌群中*m*-DAP型细菌

的分布(图4A)^[43]。根据体外单菌标记结果, 细菌通常是对和自身肽聚糖结构对应的探针标记效果更佳, 即探针标记结果可以一定程度上反映细菌本身肽聚糖结构。进一步的体内标记实验发现, 约13.7%的小鼠肠道菌群(主要是革兰氏阳性)显示出对*m*-DAP探针的标记选择性, 其中的革兰氏阳性菌(如*Oscillibacter*属)中大多数之前并未被标注为*m*-DAP型细菌(图4C)。后续功能实验验证*Oscillibacter*的肽聚糖成分确实可以激活NOD1, 证明其确实为*m*-DAP型细菌。TetraFl-DAP探针的开发和应用为探索肠道微生物的肽聚糖结构多样性提供新的有效工具。

考虑到四肽供体探针在体内的稳定性和较高的标记覆盖率, 以及其工作原理的特殊性, 本课题组进一步对其在菌群活体成像中的应用进行探索。肠道菌移位, 即肠道细菌穿过肠道屏障向血管和远端器官的迁移, 在多种严重的急慢性疾病的发生发展中都起到重要作用。然而, 目前在活体中对菌群移位的检测缺乏可靠手段, 限制了对这一动态过程的理解^[44]。为解决这一问题, 本课题组利用四肽探针设计了激活型荧光(fluorogenic)探针TetraFl-BHQ。其原理是: 利用Ldt结合供体探针时会切除C端4号位氨基酸的特点, 将D-Ala替换为侧链上连接荧光淬灭基团的D型氨基酸, 可以使探针仅在Ldt识别切除淬灭基团后才可发出荧光信号^[45], 因此可实现无需清洗即可成像。利用这一优点, 本课题组将其运用于活体小鼠肠道菌群的原位成像之中(图4A)。利用活体双光子显微成像技术, 在给肥胖小鼠灌胃TetraFl-BHQ后, 成功观察到活体小鼠中的肠道细菌向肠道血管和肝脏迁移的过程(图4D)。这一技术大大推动肠道菌群在体时空活动研究的进展, 并有望在未来用于深入研究细菌移位在各类疾病中起到的功能和影响。

3 酰基受体探针的作用机制和研究应用

除酰基供体探针外, 针对酰基受体肽链结构特点设计的短肽探针也被用于解析肽尾交联反应中的底物识别特征。Pires团队^[46]开发一种仅能被识别为酰基受体的三肽探针。在这类探针中, 他们在3号位Lys侧链偶联了D-iAsn肽桥作为酰基受体, 并去除能被Ddt/Ldt识别为酰基供体位点的四、五号位氨基酸(图5A和B), 从而使得三肽探针仅具备酰基受体的功能。通过在三

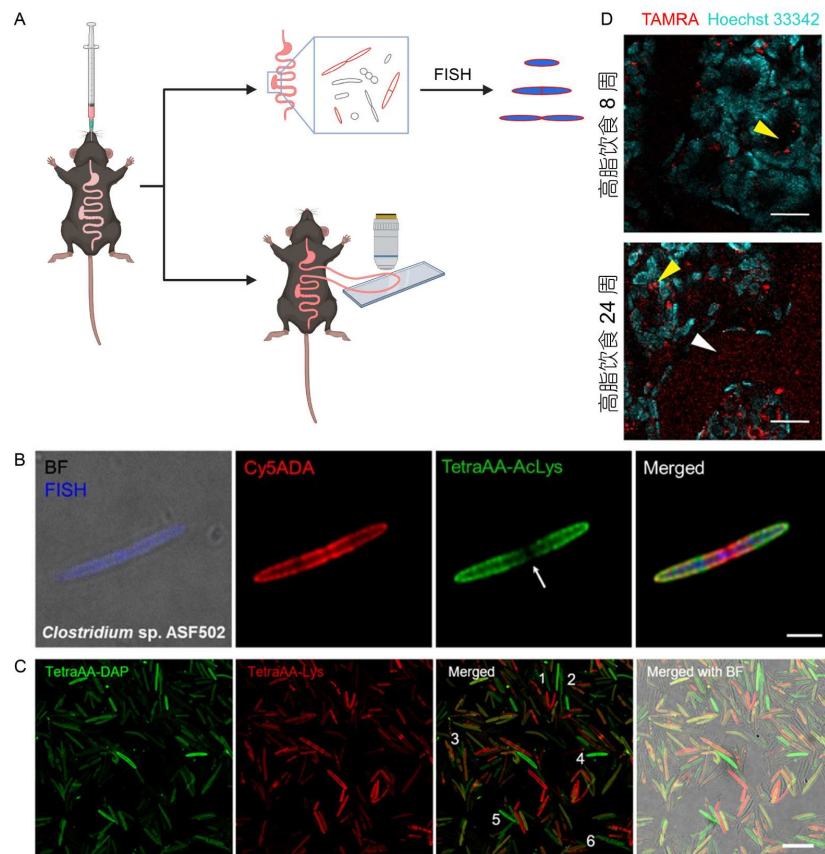


图 4 基于四肽酰基供体探针的小鼠肠道菌群体内标记。A: 小鼠活体内Ldt介导的肠道菌群标记与检测及活体双光子显微成像流程示意图; B: 荧光图像显示3-3交联结构(四肽酰基供体探针标记, 绿色)在*Clostridium* sp. ASF502细胞表面的定位分布, 该菌株通过荧光原位杂交标记为蓝色, 整体肽聚糖结构通过Cy5ADA(FDAA类探针, 红色)标记。比例尺: $2\ \mu\text{m}$ ^[41]; C: TetraAA-DAP(绿色)与TetraAA-Lys(红色)探针标记小鼠肠道菌群的荧光图像。比例尺: $2\ \mu\text{m}$ ^[43]; D: 通过活体双光子显微成像观察高脂饮食小鼠的小肠组织血管中带有荧光标记的移位细菌。在给予小鼠灌胃TetraFl-BHQ探针4 h后, 静脉注射Hoechst 33342(青色)标记细胞核, 随后手术暴露小肠组织并进行活体双光子成像。比例尺: $25\ \mu\text{m}$ ^[45]

Figure 4 *In vivo* labeling of the mouse gut microbiota using tetrapeptide acyl donor probes. A: Schematic illustration of the Ldt-mediated *in vivo* labeling of the mouse gut microbiota and live imaging of the fluorescently labeled bacteria by intravital two-photon microscopy; B: fluorescence imaging of the localization of 3-3 cross-linking structure (tetrapeptide acyl donor probe labeled, green) on the surface of *Clostridium* sp. ASF502 cells. The bacterial cells were stained by fluorescence *in situ* hybridization (FISH, blue), and the overall peptidoglycan architecture was labeled with Cy5ADA (FDAA probe, red). Scale bar: $2\ \mu\text{m}$ ^[41]; C: fluorescence imaging of mouse gut microbiota labeled with the TetraAA-DAP (green) and the TetraAA-Lys (red). Scale bar: $2\ \mu\text{m}$ ^[43]; D: intravital two-photon imaging of fluorescently labeled translocated bacteria within the intestinal vasculature of mice fed a high-fat diet. Four hours after oral gavage of the TetraFl-BHQ probe, Hoechst 33342 (cyan) was injected intravenously to label cell nuclei, followed by surgical exposure of the small intestine for imaging. Scale bar: $25\ \mu\text{m}$ ^[45]

肽探针3号位上连接不同的肽桥, 比较其在细菌中(包括屎肠球菌、粪肠球菌和金葡菌)的标记效率, 分析转肽酶对肽桥结构的识别偏好和包容度。结果发现, 屎肠球菌偏好二号位为D-iGln和连接D-iAsn的三肽探针(图5C), 且二号位和肽桥侧链的酰胺化是探针被转肽酶识别的必要条件。与屎肠球菌不同的是, 在粪肠球菌中底物识别逻辑更为宽松, 虽然同样是与自身结构类似的(带有L-Ala-L-Ala肽桥的)探针标记效果更好, 但二号位D-iGln的酰胺化并不是受体链被识别的必要

条件。作者进一步发现, 在三肽探针上连接单个Gly即可显著提升其在金葡菌中的标记效率, 且肽桥额外增加到6个Gly并不显著影响交联效率, 说明转肽酶对受体链的识别具有一定灵活性。值得注意的是, 三肽探针并不是Ldt或Ddt专一性的, 因为二者均可能识别探针并将其整合入肽聚糖。

除L-Lys型的受体探针外, Pires团队^[47]还开发一种用于模拟*m*-DAP型肽聚糖结构的受体探针。相较于合成L-Lys型四肽探针, 含*m*-DAP的肽段化学合成难度更

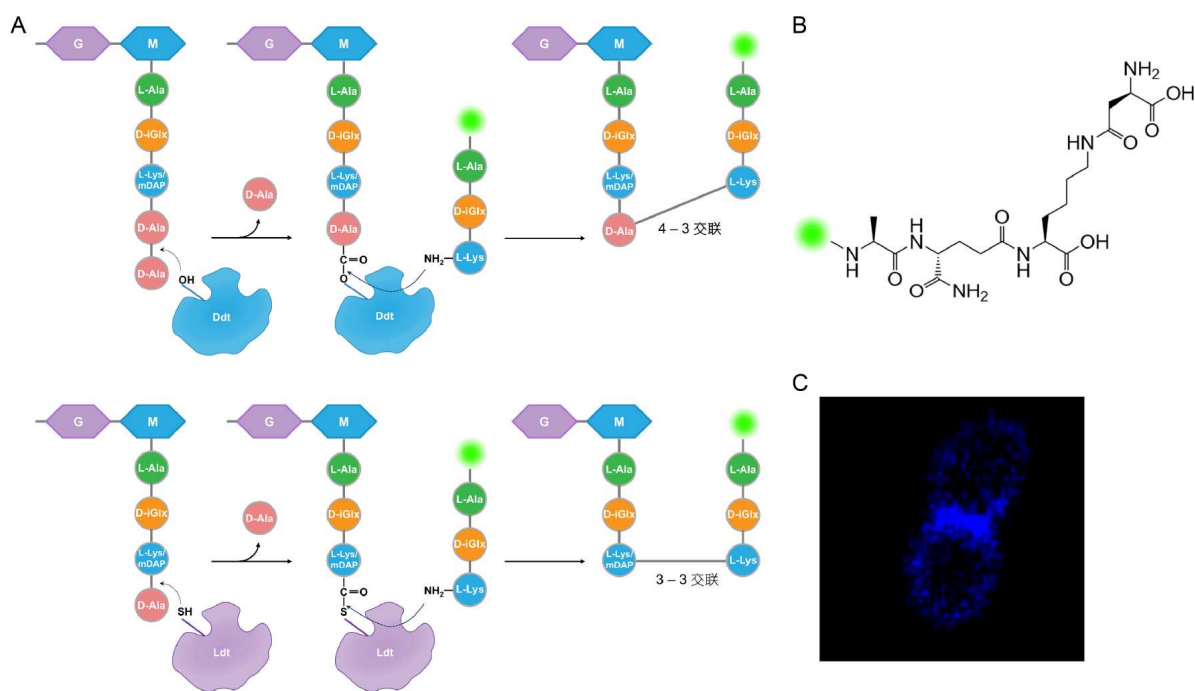


图 5 荧光三肽探针(fluorescent tripeptide probes, TriFl)作为酰基受体通过转肽反应标记肽聚糖。A: TriFl的标记机制示意图。上图展示了为Ddt介导的标记过程, 下图为Ldt介导的标记过程; B: TriFl 结构式。探针序列为: 荧光基团-L-Ala-D-iGln-L-Lys(D-iAsp); C: 屎肠球菌经TriFl标记的荧光图像^[46]

Figure 5 Peptidoglycan labeling by TriFl as an acyl acceptor through transpeptidation. A: Schematic illustration of TriFl labeling mechanism. The upper panel shows labeling mediated by Ddt, and the lower panel shows labeling mediated by Ldt; B: structure of TriFl (fluorophore-L-Ala-D-iGln-L-Lys(D-iAsp)); C: fluorescent imaging of *Enterococcus faecalis* labeled with TriFl^[46]

高。为克服这一障碍, 他们在三肽探针中采用meso-半胱氨酸(m-CYT)来模拟m-DAP的结构特征。与带有m-DAP型肽聚糖的耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)共孵育后, m-CYT三肽探针(TriFl-CYT)可被高效整合入细胞壁结构中。此策略为研究肽聚糖含m-DAP的细菌提供一种便捷的方法, 但是m-CYT的二硫键结构在多种化学或酶促环境中十分脆弱, 一定程度上限制m-CYT在复杂体系中的应用。

4 总结和展望

肽聚糖的基本结构在细菌中极为特殊并且高度保守, 因此其相关生物合成过程作为抗生素开发的有效靶点一直受到广泛的研究和关注^[1]。然而, 我们对肽聚糖生物合成时空特征的认识仍存在局限性。可以靶向肽聚糖不同合成步骤的化学探针的开发使得我们可以直观地可视化肽聚糖的定位和合成过程, 为细菌细胞壁的进一步深入研究提供新的工具。同时, 肽聚糖的

前体合成、修饰和回收涉及多个步骤也为设计针对肽聚糖不同阶段反应的化学探针提供很大的发挥空间。本综述中, 回顾不同的肽聚糖肽尾类似物短肽探针, 包括靶向肽聚糖转肽酶PBP和Ldt的五肽/四肽, 以及延伸出的乙酰化供体四肽探针和受体三肽探针(表1)。通过改换连接的修饰基团, 这些探针也被成功应用于免疫激活、细胞壁化学改造、细菌荧光激活标记等领域, 展现出其结构灵活可变性及应用潜力。

基于肽尾类似物的代谢标记策略为研究肽聚糖的合成、修饰和重塑提供新的工具, 但在应用中仍存在若干挑战。首先, 细菌间肽聚糖结构存在显著多样性, 包括三号位氨基酸(L-Lys/m-DAP)不同、二号位D-iGln的酰胺化修饰、不同菌种肽桥的序列差异^[3], 这些因素都会影响探针在不同细菌中的掺入标记效率存在。此外, 细菌转肽酶的表达量、结构差异及底物偏好^[27], 乃至3-3和4-3交联比例的差异^[29], 以及体内微生态环境的复杂性, 可能会导致探针在体内外标记实验的结果并不完全一致。这些因素共同限制在肠道菌

表 1 肽尾类似物短肽探针的结构特征、标记机制及其应用对比

Table 1 Structural features, labeling mechanisms, and applications of stem peptide-mimicking probes

分类	探针名称	探针序列	主要特点	参考文献
五肽类	Fl-KAA	L-Lys-Gly-Gly-L-Lys-D-Ala-D-Ala	可视化PBP催化的4-3交联	[31]
	PentaFl	L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala		[33]
四肽类	TetraFl	L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala	可视化Ldt催化的3-3交联	[35,37,39]
	TetraFl-LysAc	L-Ala-D-iGln-L-Lys(Ac)-D-Ala	仅作为酰基供体被Ldt识别	[34,41,43,45]
	TetraFl-DAP	L-Ala-D-iGln- <i>m</i> -DAP-D-Ala	可区分 <i>m</i> -DAP/L-Lys型肽聚糖的细菌	[43]
三肽类	TriFl	L-Ala-D-iGln-L-Lys(D-iAsp)	仅作为酰基受体被PBP/Ldt 识别	[46]
	TriFl-CYT	L-Ala-D-iGln- <i>m</i> -CYT	模拟 <i>m</i> -DAP型肽聚糖的受体链	[47]

群等复杂体系中开展针对性的探针设计与应用。

尽管经典模式菌株的肽聚糖结构和交联模式已被深入解析，但对大量难以体外培养的肠道厌氧菌和环境菌，其肽聚糖的肽尾和肽桥组成以及交联类型等信息仍难以获知。基因组学分析虽然可以预测潜在的转肽酶，但这些蛋白在不同生理条件下的真实活性与底物范围仍难以确定^[8]。上述蛋白结构与酶学信息的不完整性共同限制了针对这些菌种特异选择性探针的设计，因此也使得寡肽探针在多菌种体系中的表现仍具有一定不可预测性。

在此背景下，如何在复杂的肠道菌群中通过寡肽探针实现广谱标记成为另一重要挑战。不同肠道菌在肽尾结构、肽桥组成以及转肽酶体系上均存在显著差异，而体内环境中细菌代谢状态的动态变化进一步放大这些肽聚糖结构多样性^[8]。因此，单一结构的短肽探针往往难以被各类菌的转肽酶系统识别，从而在体内

表现出一定对标记偏好。未来针对肠道菌群的广谱探针设计可能需要综合不同转肽酶的底物偏好和容忍度，实现对肠道菌群中更大范围细菌的高效原位标记和成像分析，为解析体内微生境中的细胞壁代谢活动和细菌位置分布提供更具普适性的研究工具。

尽管存在上述局限，关于肽尾类似物探针的研究仍具有广泛发展前景和优化空间。未来可通过充分解析不同细菌肽聚糖的底物特征，并结合结构生物学与酶学数据，发展具备更好的菌种分辨能力的短肽探针设计策略，以提升其在复杂菌群中的适用性。此外，肽聚糖从头合成途径和循环途径涉及多个酶促反应，蕴含众多可用于代谢标记的潜在靶点。联合使用多类代谢标记探针，有望实现对肽聚糖时空动态过程的多维度互补式解析^[48]。同时，短肽探针良好的体内稳定性和生物正交特性，使其在活体共生菌群和感染部位病原体定位方面具备应用潜力。

参考文献

1 Salton M R J. Chapter 1 The bacterial cell envelope—a historical perspective. In Pollen: New Comprehensive Biochemistry. Vol 27. Amsterdam: Elsevier, 1994. 1–22

2 Osborn M J. Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Annu Rev Biochem*, 1969, 38: 501–538

3 Vollmer W, Blanot D, De Pedro M A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32: 149–167

4 Egan A J F, Errington J, Vollmer W. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18: 446–460

5 Schleifer K H, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev*, 1972, 36: 407–477

6 Work E. Biochemistry of the bacterial cell wall. *Nature*, 1957, 179: 841–847

7 Vollmer W, Bertsche U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778: 1714–1734

8 Aliashkevich A, Cava F. LD-transpeptidases: the great unknown among the peptidoglycan cross-linkers. *FEBS J*, 2022, 289: 4718–4730

9 Mainardi J L, Legrand R, Arthur M, et al. Novel mechanism of β -lactam resistance due to bypass of DD-transpeptidation in *Enterococcus faecium*. *J Biol Chem*, 2000, 275: 16490–16496

10 Loskill P, Pereira P M, Jung P, et al. Reduction of the peptidoglycan crosslinking causes a decrease in stiffness of the staphylococcus aureus cell

- envelope. *Biophys J*, 2014, 107: 1082–1089
- 11 Calabretta P J, Hodges H L, Kraft M B, et al. Bacterial cell wall modification with a glycolipid substrate. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 9262–9272
 - 12 Chang J D, Wallace A G, Foster E E, et al. Peptidoglycan compositional analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm by stable isotope labeling by amino acids in a bacterial culture. *Biochemistry*, 2018, 57: 1274–1283
 - 13 Romaniuk J A H, Cegelski L. Peptidoglycan and teichoic acid levels and alterations in *Staphylococcus aureus* by cell-wall and whole-cell nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 2018, 57: 3966–3975
 - 14 Bourdeau R W, Lee-Gosselin A, Lakshmanan A, et al. Acoustic reporter genes for noninvasive imaging of microorganisms in mammalian hosts. *Nature*, 2018, 553: 86–90
 - 15 Lakshmanan A, Jin Z, Nety S P, et al. Acoustic biosensors for ultrasound imaging of enzyme activity. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 988–996
 - 16 Ghuysen J M. Serine β -lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol*, 1991, 45: 37–67
 - 17 Goffin C, Ghuysen J M. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 1079–1093
 - 18 Kelly J A, Moews P C, Knox J R, et al. Penicillin target enzyme and the antibiotic binding site. *Science*, 1982, 218: 479–481
 - 19 Wilke M S, Lovering A L, Strynadka N C. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8: 525–533
 - 20 Tooke C L, Hinchliffe P, Bragginton E C, et al. β -lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century. *J Mol Biol*, 2019, 431: 3472–3500
 - 21 Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, 1994, 264: 382–388
 - 22 Tuomanen E, Cozens R. Changes in peptidoglycan composition and penicillin-binding proteins in slowly growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1987, 169: 5308–5310
 - 23 Bielnicki J, Devedjiev Y, Derewenda U, et al. *B. subtilis* ykuD protein at 2.0 Å resolution: insights into the structure and function of a novel, ubiquitous family of bacterial enzymes. *Proteins*, 2006, 62: 144–151
 - 24 Gupta R, Lavollay M, Mainardi J L, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* protein LdtMt2 is a nonclassical transpeptidase required for virulence and resistance to amoxicillin. *Nat Med*, 2010, 16: 466–469
 - 25 Peltier J, Courtin P, El Meouche I, et al. *Clostridium difficile* has an original peptidoglycan structure with a high level of *N*-acetylglucosamine deacetylation and mainly 3-3 cross-links. *J Biol Chem*, 2011, 286: 29053–29062
 - 26 Gokulan K, Varughese K I. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and targeting the L,D-transpeptidase enzyme. *Drug Dev Res*, 2019, 80: 11–18
 - 27 Goffin C, Ghuysen J M. Biochemistry and comparative genomics of SxxK superfamily acyltransferases offer a clue to the mycobacterial paradox: presence of penicillin-susceptible target proteins versus lack of efficiency of penicillin as therapeutic agent. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66: 702–738
 - 28 Biarrotte-Sorin S, Hugonnet J E, Delfosse V, et al. Crystal structure of a novel β -lactam-insensitive peptidoglycan transpeptidase. *J Mol Biol*, 2006, 359: 533–538
 - 29 Mainardi J L, Morel V, Fourgeaud M, et al. Balance between two transpeptidation mechanisms determines the expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *J Biol Chem*, 2002, 277: 35801–35807
 - 30 Magnet S, Arbeloa A, Mainardi J L, et al. Specificity of L,D-transpeptidases from gram-positive bacteria producing different peptidoglycan chemotypes. *J Biol Chem*, 2007, 282: 13151–13159
 - 31 Gautam S, Kim T, Shoda T, et al. An activity-based probe for studying crosslinking in live bacteria. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 10492–10496
 - 32 Atilano M L, Pereira P M, Yates J, et al. Teichoic acids are temporal and spatial regulators of peptidoglycan cross-linking in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 18991–18996
 - 33 Gautam S, Kim T, Spiegel D A. Chemical probes reveal an extraseptal mode of cross-linking in *Staphylococcus aureus*. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 7441–7447
 - 34 Pidgeon S E, Apostolos A J, Nelson J M, et al. L,D-transpeptidase specific probe reveals spatial activity of peptidoglycan cross-linking. *ACS Chem Biol*, 2019, 14: 2185–2196
 - 35 Shaku M T, Ocius K L, Apostolos A J, et al. Amidation of glutamate residues in mycobacterial peptidoglycan is essential for cell wall cross-linking. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1205829
 - 36 Wolf A J, Underhill D M. Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18: 243–254

- 37 Dalesandro B E, Pires M M. Induction of endogenous antibody recruitment to the surface of the pathogen *Enterococcus faecium*. *ACS Infect Dis*, 2021, 7: 1116–1125
- 38 Bansal-Mutalik R, Nikaido H. Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 4958–4963
- 39 Liu Z, Lepori I, Chordia M D, et al. A metabolic-tag-based method for assessing the permeation of small molecules across the mycomembrane in live mycobacteria. *Angew Chem Int Ed*, 2023, 62: e202217777
- 40 Agard N J, Prescher J A, Bertozzi C R. A strain-promoted [3+2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 15046–15047
- 41 Lin H, Lin L, Du Y, et al. Biodistributions of L,D-transpeptidases in gut microbiota revealed by *in vivo* labeling with peptidoglycan analogs. *ACS Chem Biol*, 2021, 16: 1164–1171
- 42 Franchi L, Warner N, Viani K, et al. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*, 2009, 227: 106–128
- 43 Lin H, Zheng X, Lin L, et al. Revealing NOD1-activating gram-positive gut microbiota via *in vivo* labeling with a meso-diaminopimelic acid probe. *ACS Chem Biol*, 2025, 20: 62–68
- 44 Lin L, Du Y, Song J, et al. Imaging commensal microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Acc Chem Res*, 2021, 54: 2076–2087
- 45 Fan X, Zhou Y, Bai W, et al. Intravital imaging of translocated bacteria via fluorogenic labeling of gut microbiota *in situ*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2025, 122: e2415845122
- 46 Apostolos A J, Pidgeon S E, Pires M M. Remodeling of cross-bridges controls peptidoglycan cross-linking levels in bacterial cell walls. *ACS Chem Biol*, 2020, 15: 1261–1267
- 47 Apostolos A J, Nelson J M, Silva J R A, et al. Facile synthesis and metabolic incorporation of *m*-DAP bioisosteres into cell walls of live bacteria. *ACS Chem Biol*, 2020, 15: 2966–2975
- 48 Lin H, Yang C, Wang W. Imitate to illuminate: labeling of bacterial peptidoglycan with fluorescent and bio-orthogonal stem peptide-mimicking probes. *RSC Chem Biol*, 2022, 3: 1198–1208

Recent advances in the peptidoglycan-targeting bacterial labeling with stem peptide-mimicking probes

TAN ZhiYing, ZHAO GuoPing* & WANG Wei*

Fudan Microbiome Center, Department of Microbiology and Immunology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

* Corresponding authors, E-mail: microbiome@fudan.edu.cn; w_w@fudan.edu.cn

Bacterial peptidoglycan is highly conserved across most bacterial species and serves as a critical target for antibiotic development. Its chemical structure and biosynthetic pathways have been extensively studied for decades. PGN cross-linking, mediated by two distinct classes of enzymes, D,D-transpeptidase and L,D-transpeptidase, occurs at the stem peptide and is essential for cell wall biosynthesis. However, the spatiotemporal dynamics of this process remain challenging to resolve, limiting our understanding of PGN's synthesis and remodeling. In the past decade, stem peptide-mimicking chemical probes have emerged as a valuable tool for PGN-labeling and dynamic investigation of the cross-linking process. This review summarizes the different types of stem peptide-mimicking probes designed for labeling PGN via either D,D- or L,D-transpeptidase-mediated cross-linking, with a focus on their design rationale, functioning mechanisms, and research applications. The structural flexibility and diversity of these probes offer broad potential applications in PGN labeling, antibiotic development, and microbiota analysis in different biological contexts.

bacterial transpeptidase, metabolic labeling, stem peptide-mimicking probes, fluorescence imaging, peptidoglycan cross-linking

doi: [10.1360/SSV-2025-0269](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0269)