

in petri dishes containing filter paper or paper pulp (Whatman CF 11) moistened with a colorless aqueous solution of saturated or 1/10 saturated 2,2'-dipyridyl (DIP). All observations were made with a Wild M-5 stereomicroscope. Dissections were performed in *Drosophila* ringers-solution. For in vitro studies Schneider's *Drosophila* media (Difco) diluted with aqueous DIP was employed.

Ingested solutions of DIP were found to produce specific pink localizations in larval tissues. Newly hatched and 2-day-old larvae placed on saturated solutions (1:200 DIP: distilled water) developed orange-pink Malpighian tubules in a few h and died. Often the color in the tubules could be seen to occur as granules.

A 1/10 saturated DIP solution (1:2000, DIP: distilled water) was found to reduce mortality in larvae fed at 2 and 3 days after hatching. Such larvae showed additional sites of staining when observed the day following feeding. Larvae fed at 2 days showed only slight or no staining within the proximal portion of the Malpighian tubules. The gut was tinged pink with heavier staining occurring in variable positions, the gut contents were deeply stained. In all larvae examined the proventriculus remained unstained. In addition to gut and Malpighian tubule structures, some of the imaginal discs and the brain were stained pink. The eye and antennal disc were often visibly pink as was the anterior cap on the male gonad (probably the apical cells). The female gonad was not identified in these small larvae. As with the Malpighian tubules colored granules could usually be detected as the source of color on the brain surface. Larvae fed at 3 days showed the same localization pattern as described with the exception that the ring gland stained much more deeply than the other structures and could be seen as a cherry red organ on a pink background even in the intact larva. At this time the discs were all distinctly pink so that the location of the wing, haltere and third leg discs were readily seen without dissection. The staining described was very distinct and by comparison there was no staining in salivary glands, fat body or muscle.

When larvae were fed DIP at 3 days pupation was somewhat delayed compared to water controls. Shortly after pupation larval type localizations were observed, however, by this time both anterior and posterior portions of gonads of both sexes were stained. It would appear that the stained tissue is the connective tissue of mesodermal origin which was stained in the apical region in 2-day larvae and which eventually enveloped the gonad².

As pupation proceeded the whole pupa took on a pink cast as more tissues became involved. Adults which ingested DIP as larvae retained this coloration. When

normal adults from a dry culture were transferred to media moistened with DIP, ingestion occurred. Of particular interest was the preferential staining of testicular tips under such circumstances. This is compatible with CARSON's³ demonstration of the persistence of apical cells in adult Diptera.

In vitro incubation studies were undertaken to determine if DIP combined first with substances in the hemolymph which were then picked up by cells or if DIP combined initially with intracellular molecules. For these studies organs from 3 day larvae were incubated at room temperature in Schneider's media diluted 1:1 with saturated DIP. In Malpighian tubules colored granules could be seen within 20 min suggesting that DIP reacted directly with cell components. Aside from the gut and its contents no staining was detected among other cultured organs (imaginal discs, brain, ring gland, fat body, salivary gland).

The nature of the cell component stained by DIP is of interest. As DIP is a chelating agent which specifically binds to ferrous ions producing a colored product it is most likely that the stained tissues contain a high concentration of ferrous ions either free or in bound form.

At the present time we can envision the use of DIP vital staining as a rapid method of screening for mutants which have small ring glands or which lack particular discs. As the nature of the stained molecules is elucidated, it may be possible in the future to detect more subtle alterations in the chemical composition of these organs.

Résumé. On décrit l'utilisation du 2,2'-dipyridyle comme colorant vital chez *Drosophila*. Si l'on en nourrit les formes larvaires, les disques imaginaires, la glande annulaire, les tubules de Malpighi, l'intestin et les pointes des gonades embryonnaires deviennent roses.

ELLEN W. RAPPORT and MAYA MENON^{4,5}

Pestology Centre and Department of Biological Sciences, Simon Fraser University, Burnaby 2 (British Columbia, Canada), 20 November 1972.

¹ J. HURWYCH and M. CHVAPIL, *Biochim. biophys. Acta* 65, 361 (1965).

² A. N. ABOIM, *Revue suisse Zool.* 52, 53 (1945).

³ H. L. CARSON, *J. Morph.* 77, 141, (1945).

⁴ Acknowledgments. We wish to thank Dr. K. K. NAIR for advice, encouragement and use of facilities during the course of this work. Both he and Dr. N. M. G. BHAKTHAN made helpful comments on the manuscript. Mr. M. HARDON kindly translated the summary into French.

⁵ Present address: Department of Biology, Barnard College, Columbia University, New York, N.Y. 10027, USA.

Ultramikromethoden¹. Darstellung von Diazomethan; Methylierung von Fettsäuren mittlerer Kettenlänge

Kleine Mengen Diazomethan, wie sie für die unten beschriebenen Methylierungsexperimente benötigt werden, lassen sich mit Hilfe der in Figur 1 skizzierten Vorrichtung erzeugen. In dem durchbohrten Korkzapfen A steht ein mit einem Stiel versehenes Glasröhrchen B, das als Stielröhrchen bezeichnet werden soll (Gesamtlänge 80 mm, ohne Stiel 20 mm, ä. ø 7 mm). Das Glasröhrchen D (Länge 80 mm, ä. ø 3,3 mm, i. ø 1.8 mm) führt durch einen Polypropylenbecher E (Zentrifugenbecher, auf 40 mm gekürzt, ø 35 mm) und eine Silicongummimembran C

(GC-Einspritzmembran). Der Becher E wird an einem Stativ befestigt. Man füllt ihn mit Eis und gibt nacheinander 1 mg fein pulverisiertes N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid, 1 Tropfen Äthanol und 1 Tropfen 40% (G/G) KOH in das Stielröhrchen B. In das inzwischen vorgekühlte Glasröhrchen D lässt man eine 3–4 mm hohe Säule Äther aufsteigen und hebt anschliessend das Stielröhrchen B so weit an, bis seine Öffnung durch die Gummimembran C verschlossen wird. Das entstehende Diazomethan löst sich in dem im Röhrchen D befindlichen

	Trennkapillare Länge in m/i. Ø in mm	Ofen		Trägergas		Retentionszeit (min)
		Temperatur (°C)	Heizleistung (%)	Atm.	ml/min	
Buttersäure-methylester	24/0,34	60	20	0,2	1,0	4,7
Capronsäure-methylester	24/0,34	80	40	0,4	1,7	3,3
Caprylsäure-methylester	24/0,34	100	100	0,5	2,1	3,3
Caprinsäure-methylester	24/0,34	120	100	0,6	2,3	3,7
Laurinsäure-methylester	15/0,32	120	100	0,5	2,0	3,6

Äther auf. Die Diazomethan-Entwicklung dauert einige min., während welcher Zeit sich die Äthersäule im Röhrenchen D auf 1–2 mm reduziert.

Die Methylierungsreaktionen können nach dem Verfahren durchgeführt werden, das sich bei der Acetylierung von Alkoholen² und bei der Hydrolyse von Essigsäureestern¹ bewährt hat. In die Mitte einer Probenkapillare überführt man eine 2 mm lange Äthersäule, enthaltend 1 ng der zu methylierenden Säure, und setzt anschliessend im oben beschriebenen Apparat die Diazomethan-Entwicklung in Gang. Wenn letztere beendet und das Lösungsmittel in der Probenkapillare verdunstet ist,

wird eine 1–2 mm lange Säule der Diazomethanolösung in die Mitte der Probenkapillare aufgenommen. Man lässt die Probenkapillare liegen, bis die Reagenslösung sich verflüchtigt hat und weist hierauf den gebildeten Methylester auf die früher beschriebene Weise^{1,2} gaschromatographisch nach. Die Methode lässt sich auf die Säuren anwenden, deren Methylester in der Tabelle aufgeführt sind, mit der Einschränkung, dass im Falle der Buttersäure erhebliche Verdunstungsverluste eintreten.

Gaschromatographische Daten: Apparat Fractovap Carlo Erba, Mod. GI (FID); Trennkapillaren aus Glas, nach dem Verfahren von GROB³ mit der Trennflüssigkeit SF-96 belegt⁴; Trägergas Helium; Verdampfertemperatur 150 °C; Abschwächung 1 × 4; Messbereich des Schreibers 1 mV. Die übrigen, für die einzelnen Substanzen verschiedenen Daten, sind aus der Tabelle ersichtlich. Figur 2 zeigt a) das Gaschromatogramm von 1 ng authentischem Caprinsäure-methylester und b) das Gaschromatogramm von Caprinsäure-methylester, der aus 1 ng Caprinsäure entstanden ist.

Versuche, die Methode auf längerkettige Fettsäuren, nämlich Myristinsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure, auszudehnen, schlugen fehl, und zwar aus dem Grund, weil bei der gaschromatographischen Untersuchung die betreffenden Methylesterpeaks zusammenfielen mit Fremdpeaks, die sich auf die Diazomethanolösung zurückführen liessen. Diese Versuche wurden mit 2 verschiedenen Trennkapillaren durchgeführt, die mit den Trennflüssigkeiten SF-96 bzw. Ucon HB 5100 belegt waren^{3,4}.

Summary. A device for the small-scale generation of diazomethane is described, as well as the methylation by this reagent of nanogram amounts of the following fatty acids: butyric, caproic, caprylic, capric, lauric.

S. HUWYLER⁵

Organisch-chemisches Institut der Universität,
Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich (Schweiz),
1. Dezember 1972.

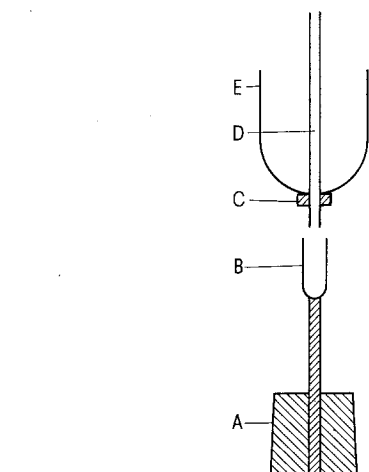


Fig. 1. Vorrichtung zur Darstellung kleiner Mengen Diazomethan. A, Korkzapfen; B, Stielröhrchen; C, Silicongummimembran; D, Glasrohr; E, Polypropylenbecher.

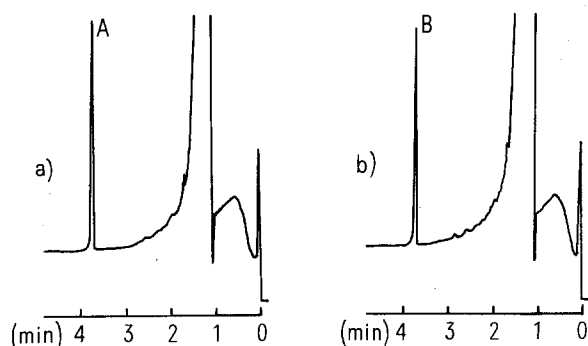


Fig. 2. a) Gaschromatogramm von 1 ng authentischem Caprinsäure-methylester (Peak A); b) Gaschromatogramm von Caprinsäure-methylester, aus 1 ng Caprinsäure entstanden (Peak B).

¹ 3. Mitteilung: S. HUWYLER, *Experientia* 28, 1393 (1972).

² S. HUWYLER, *Experientia* 28, 718 (1972).

³ K. GROB, *Helv. chim. Acta* 51, 718 (1968).

⁴ Bezugsquelle: H. und G. JAEGGI, Labor für Gaschromatographie, CH-9043 Trogen (Schweiz).

⁵ Herrn Prof. Dr. M. VISCONTINI danke ich für wertvolle Diskussionen und dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die finanzielle Unterstützung.